



**Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Faculdade de Medicina**  
**Departamento de Patologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina**  
**Área de Concentração em Anatomia Patológica**

**PROCESSO DE DESINFECÇÃO DE  
ÁGUA USANDO RADIAÇÃO SOLAR E UM  
FOTOCATALIZADOR SEGURO: UM ESTUDO  
PARA VALIDAÇÃO DO SEU USO EM  
POPULAÇÕES BRASILEIRAS ATRAVÉS DE  
TÉCNICAS *IN SILICO, IN VITRO E IN VIVO***

**Janine Simas Cardoso Rurr**

**Rio de Janeiro – RJ - Brasil**

**2024**



**Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Faculdade de Medicina**  
**Departamento de Patologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina**  
**Área de Concentração em Anatomia Patológica**

**PROCESSO DE DESINFECÇÃO DE  
ÁGUA USANDO RADIAÇÃO SOLAR E UM  
FOTOCATALIZADOR SEGURO: UM ESTUDO  
PARA VALIDAÇÃO DO SEU USO EM  
POPULAÇÕES BRASILEIRAS ATRAVÉS DE  
TÉCNICAS *IN SILICO, IN VITRO E IN VIVO***

**Janine Simas Cardoso Rurr**

Orientadores: Prof.<sup>a</sup> Dra. Claudia de Alencar Santos Janot Pacheco e  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Nadia Campos de Oliveira Miguel

Coorientação: Prof. Dr. Bryan Hudson Hossy

**Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina, Área de Concentração em Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Ciências.**

**Rio de Janeiro – RJ – Brasil**

**2024**

## FICHA CATALOGRÁFICA

### CIP - Catalogação na Publicação

R948p Rurr , Janine Simas Cardoso  
PROCESSO DE DESINFECÇÃO DE ÁGUA USANDO RADIAÇÃO SOLAR E UM FOTOCATALIZADOR SEGURO: UM ESTUDO PARA VALIDAÇÃO DO SEU USO EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS ATRAVÉS DE TÉCNICAS IN SILICO, IN VITRO E IN VIVO / Janine Simas Cardoso Rurr . -- Rio de Janeiro, 2024.  
199 f.

Orientadora: Claudia de Alencar Santos Janot Pacheco.  
Coorientadora: Nadia Campos de Oliveira Miguel.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós Graduação em Medicina (Anatomia Patológica), 2024.

1. SODIS . 2. FOTOCATALIZADOR. 3. IN SILICO. 4. IN VITRO. 5. IN VIVO. I. Pacheco, Claudia de Alencar Santos Janot , orient. II. Miguel, Nadia Campos de Oliveira , coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**Janine Simas Cardoso Rurr**

**PROCESSO DE DESINFECÇÃO DE ÁGUA USANDO  
RADIÇÃO SOLAR E UM FOTOCATALIZADOR SEGURO:  
UM ESTUDO PARA VALIDAÇÃO DO SEU USO EM  
POPULAÇÕES BRASILEIRAS ATRAVÉS DE  
TÉCNICAS *IN SILICO*, *IN VITRO* E *IN VIVO***

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Medicina, Área de  
Concentração em Anatomia Patológica, Faculdade  
de Medicina da Universidade Federal do Rio de  
Janeiro, como parte dos requisitos necessários à  
obtenção do título de Doutor em Ciências.**

Aprovada em: 16 de setembro de 2024.



gov.br

Documento assinado digitalmente  
**CLAUDIA DE ALENCAR SANTOS JANOT PACHEC**  
Data: 23/09/2024 16:10:16-0300  
verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª Drª Claudia de Alencar Santos Janot Pacheco  
Presidente da Banca

gov.br

Documento assinado digitalmente  
**NADIA CAMPOS DE OLIVEIRA MIGUEL**  
Data: 26/09/2024 16:52:45-0300  
verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa Dra Nadia Campos de Oliveira Miguel  
Coorientadora

gov.br

Documento assinado digitalmente  
**SUELEN ADRIANI MARQUES**  
Data: 24/09/2024 09:16:55-0300  
verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª Drª Suelen Adriani Marques

gov.br

Documento assinado digitalmente  
**FERNANDA MARTINS DE ALMEIDA MAIA**  
Data: 23/09/2024 19:10:03-0300  
verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª Drª Fernanda Martins de Almeida

gov.br

Documento assinado digitalmente  
**CELSO SANCHEZ PEREIRA**  
Data: 30/09/2024 14:14:17-0300  
verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof Dr Celso Sánchez Pereira

gov.br

Documento assinado digitalmente  
**MARCELO DE PADULA**  
Data: 24/09/2024 20:56:27-0300  
verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof Dr Marcelo de Pádula

Rio de Janeiro – RJ – Brasil  
2024

*“Rugas, são como os rios numa floresta. Traz beleza, tranquilidade e definem os caminhos. É a comprovação que houve uma vida repleta de diferentes momentos”.*

*Luiza Gosuen*

Tenho rugas...

Olhei para o espelho e descobri que tinha muitas rugas, em volta dos olhos, na boca, na testa.

Tenho rugas porque tive pais e irmãs... com todas as imperfeições e razões para quererem trilhar juntos aprendendo com a vida;

Eu tenho rugas porque conheci o amor que me fez espremer os olhos de alegria;

Eu tenho rugas porque tive um filho e fiquei preocupada com ele desde a concepção e passei muitas noites em claro, mas também porque sorri para todas as suas novas descobertas.

Tenho rugas porque o vi crescer, bater asas e ganhar o mundo. Construir o seu mundo e alçar voo.

Tenho rugas porque eu também chorei... chorei pelas pessoas que amei e que foram embora, por pouco tempo ou para sempre, sabendo ou sem saber o porquê;

Tenho rugas porque passei horas sem dormir para estudar, desenvolver e finalizar este projeto, mas também para cuidar da minha espiritualidade.

Eu tenho rugas porque eu tive OS MELHORES amigos... e nós cantamos, rimos, brincamos, nos amamos mas tanto, até às lágrimas.

Vi lugares lindos, novos, que me fizeram abrir a boca espantada.

Vi também lugares antigos que me fizeram chorar ao recordar.

Dentro de cada sulco no meu rosto e no meu corpo se esconde a minha história... onde escondem as emoções que vivi... a minha beleza mais íntima. E se apagar isso, apaga a mim mesmo. Quero todas elas! Cada ruga é uma anedota da minha vida, uma batida do meu coração, o álbum de fotos das minhas memórias mais importantes!!!

Carrego todas elas comigo no corpo e na alma, com orgulho e a leveza de quem viveu bem obrigada.

Autor desconhecido, adaptado por mim.

## **Dedicatória**

*Dedico esta Tese de Doutorado a Deus nosso Criador, ao Mestre Jesus, Mãe Maria, meus Guias e Mentores Espirituais que tem mostrado que tudo na vida tem o momento certo para acontecer.*

*Ao meu Filho Gabriel, meu amor, meu amigo, meu maior tesouro que com os seus discursos, me fez acreditar que seria possível. Porque ser mãe de menino é ganhar um parceiro, protetor e admirador para o resto da vida. Filho, você é de fato a maior inspiração da minha vida.*

*Aos meus queridos pais Zuhyla e José pelo amor, carinho e pela preciosa lição de que sem dignidade de caráter e sem luta por um ideal é impossível vencer.*

*Ao Zé por toda paciência e dedicação que muito ajudaram nesta jornada.*

*Às minhas parceiras desta e de outras vidas, Claudia Lage e Rita de Cassia, pela ajuda na formação deste sonho, pelo amor, carinho, compreensão, fé, luta e especialmente pelo que somos juntas, uma base forte consolidada no amor.*

*Dedico ainda a todas as mulheres e as mulheres mães que se desdobram para seguir a carreira científica acadêmica com todas as dificuldades, conciliando com a educação de seus filhos, os cuidados geriátricos de seus pais e toda a administração de sua casa.*

## Agradecimento

*“Nenhum de nós é tão bom, quanto todos nós juntos.”*

Sou grata pelo momento em que vivo. Agradeço a Deus, pela minha fé e principalmente por ser a única certeza, em dias onde a dúvida era constante.

Agradeço a minha chefe e orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia Lage, pela atenção e apoio constantes e por todo conhecimento adquirido. Expresso minha admiração pela excelência do seu trabalho como professora e pesquisadora, que constituem uma grande fonte de inspiração profissional para mim e para todos que pertencem ao Laboratório de Radiações em Biologia (LaRBio) e principalmente, por ser parte importante nesse capítulo da minha vida;

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Nadia Campos de Oliveira Miguel, minha orientadora, pela oportunidade de poder estudar, aprender e desenvolver os testes *in vivo* durante o meu doutoramento. Pelos ensinamentos científicos na elaboração do projeto que resultou na minha tese. Pelas enriquecedoras orientações que em muito contribuíram para mais essa conquista em minha vida;

Ao Prof Dr Bryan Hudson Hossy, meu coorientador, doutor de inteligência e sagacidade indispensáveis para a conclusão deste estudo. Pelos ensinamentos científicos e de vida. Por ensinar-me a fazer tudo com amor. Pelo incentivo, pelo carinho, cumplicidade, sorriso sempre presente e preocupação para que tudo desse certo;

As ex-alunas Natália Almeida, hoje farmacêutica e Mariana Dantas, hoje bióloga, vocês foram fundamentais para a consolidação desta tese. Pelas importantes contribuições científicas que culminaram em premiações durante suas graduações acadêmicas;

A minha tutora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Almeida por acreditar nesta linha de pesquisa e pelas enriquecedoras orientações científicas durante todo o desenvolvimento deste projeto;

A prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Martinez por me permitir usar o material e as dependências do Laboratório de Neurodegeneração e Reparo – HU/UFRJ;

Gostaria de expressar minha gratidão às professoras Suelen Marques e Mônica Freiman por prontamente aceitarem o convite para participar como professoras titulares no meu exame de qualificação.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosane Silva pelos resultados de Metagenoma obtidos no Laboratório de Metabolismo Macromolecular Firmino Torres de Castro IBCCF/UFRJ e por manter a chama do fascínio científico através da excelência em divulgar ciência;

A Dr<sup>a</sup> Grasiella Matioszek pelas imagens geradas junto ao Microscópio Confocal – ICB/UFRJ;

Quero expressar minha gratidão ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFRJ (PPGAP/FM/UFRJ) coordenado pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Katia Carneiro e ao corpo docente por me conceder a oportunidade de ingressar como aluna. Estou profundamente agradecida por essa chance de desenvolvimento profissional e pessoal;

Aos alunos do Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFRJ (PPGAP/FM/UFRJ) pela amizade e torcida;

Aos antigos alunos, parceiros, amigos e colaboradores do laboratório de Radiação em Biologia eu gostaria de expressar minha sincera gratidão em ordem alfabética!

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Alves, pelo incentivo, por acreditar nesta conquista desde o início do trabalho e, além disso, sempre presente em todos os momentos necessários com suas terapias integrativas;

Ao Prof Dr Alvaro Leitão, pelos ensinamentos científicos desde 1988 no Laboratório de Radiobiologia Molecular (RadMol), em todos os momentos, foi sempre importante. Devo a você muito do que sou hoje.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Sheila, pelo carinho, confiança e encorajamento desde sempre;

A Doutoranda Caroline Antunes, pela amizade, companheirismo, viagens e pelas histórias que temos para contar e especialmente pelas que ainda escreveremos;

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia Ribeiro, pelo exemplo, dedicação e coragem nas suas escolhas;

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Deise Felício pela força, carinho e apoio;

Ao Doutorando Gustavo Loureiro, pela força, carinho e apoio, fundamental nesta reta final;

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Patrão por nunca poupar esforços em me auxiliar sempre que necessário;

Ao Prof Dr Leonardo Vidal por torcer por mim nesta reta final e pelas inesperadas gargalhadas;

Ao Prof Dr Marcelo de Padula pelo incentivo, confiança no meu trabalho e pelas longas trocas de experiências de vida.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mariana Chantre por ser uma mulher admirável e referência na ciência;

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Raiane Diniz, pelos ensinamentos científicos certos, pela paciência em transmiti-los, presença em momentos difíceis e de dúvida;

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvia Regina pela parceria e de quem eu guardo momentos incríveis;



A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiana Muniz pelas contribuições dispensadas por ocasião da sua orientação no Mestrado Profissional em 2015 e que em muito contribuíram para mais essa conquista em minha vida;

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tula Celeste pelos ensinamentos de muitas técnicas, pelas experiências de vida e pela dedicação a tudo que faz;

A amizade dos novos alunos e professores do LaRBio, Alex, Amanda, Ana Beatriz, Bea, Gabriel Brito, Gabriele Herdy, Prof<sup>a</sup> Gilda, Javier, Joelma Lessa, Joyce, Laryssa, Luana, Lucas, Nathália Dumas, Prof<sup>a</sup> Marcia, Mariana, Nina, Tatiana Ossola, Roberto, Yasmim. A todos vocês, agradeço pelos preciosos momentos que se tornarão memórias eternas em meu coração. Estou certa de que a ciência está e estará muito bem representada;

A minha turma do ensino médio do Colégio Lemos de Castro, aos “*VERDADEIROS LOUCOS DE 1982*”, Ângela, Conceição, Edna, Edson Werneck, Eloisa, Eneida, Isabela, Johnny Cigano, Lauro, Marcos Pinto, Paulo, Oebio, Regininha, Simone, Vera, Wagner, Willis. Pela amizade e fraternidade que nasceu e se fortaleceu durante todo este tempo, principalmente pelo amor que nos uniu, uni e unirá;

Ao CNPq, FAPERJ, CAPES e INPeTAm pelo apoio financeiro fundamental;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização do presente trabalho e pela sincera amizade de vocês **MUITO OBRIGADA!!!!**

## Epígrafe

*“Porque se chamavam homens, também se chamavam  
sonhos. . . E sonhos não envelhecem.”*

Milton Nascimento, Lô Borges e Marcio Borges.

## RESUMO

Rurr, Janine Simas Cardoso. PROCESSO DE DESINFECÇÃO DE ÁGUA USANDO RADIAÇÃO SOLAR E UM FOTOCATALIZADOR SEGURO: UM ESTUDO PARA VALIDAÇÃO DO SEU USO EM POPULAÇÕES BRASILEIRAS ATRAVÉS DE TÉCNICAS *IN SILICO*, *IN VITRO* E *IN VIVO*. Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina, Área de Concentração em Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

O estudo investigou a melhoria da técnica de Desinfecção Solar de água (SODIS) pela adição de Azul de Metileno (AM), visando acelerar a descontaminação microbiológica de água, especialmente em regiões com baixa incidência solar. A água contaminada por microrganismos é uma das principais causas de doenças em países em desenvolvimento, e a desinfecção solar tem se mostrado eficaz, porém limitada em condições climáticas desfavoráveis. A inclusão do AM, um corante fotossensível, acelera o processo, gerando oxigênio reativo ao ser exposto à luz solar, o que inativa os microrganismos. O estudo foi dividido em três partes: *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. No estudo *in silico*, foram realizadas simulações para prever a toxicidade aguda e a mutagenicidade do AM nas formas oxidada (azul) e reduzida (leuco). Ambas as formas apresentaram baixa toxicidade, com a forma leuco sendo ainda menos tóxica. A mutagenicidade foi observada na forma oxidada em alguns testes, mas a forma leuco se mostrou segura. Nos experimentos *in vitro*, foram analisadas amostras de água de poço artesiano, contaminadas com patógenos. A análise metagenômica identificou a presença de microbiota intestinal humana e animal, além de patógenos causadores de doenças graves. Após a aplicação do método AM/SODIS, houve uma redução significativa no número de microrganismos, comprovando a eficácia do tratamento na descontaminação da água. No estudo *in vivo*, camundongos foram expostos ao consumo de água tratada com AM/SODIS por 13 semanas. Após a análise de fígados e rins dos animais, não foram observadas alterações histopatológicas ou sinais de citotoxicidade, genotoxicidade ou mutagenicidade. A análise da expressão de proteínas relacionadas à morte celular também não indicou estresse celular, autofagia ou apoptose, sugerindo que o uso do AM na concentração de 100 ng/ml é seguro para consumo humano. Os resultados do estudo indicam que a combinação do SODIS com o AM melhora a eficiência do processo de desinfecção de água, tornando-o uma opção viável para uso em regiões com pouca insolação ou em situações de emergência. A técnica é simples, de baixo custo e pode ser aplicada em áreas carentes, contribuindo para a redução de doenças causadas por água contaminada. Além disso, o estudo não encontrou evidências de toxicidade significativa nas formas de AM utilizadas, tornando o método seguro para o consumo humano. A pesquisa contribui para o desenvolvimento de tecnologias de baixo custo para o tratamento de água, alinhando-se aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU, especialmente em relação ao acesso à água potável e saneamento. A aplicação da técnica em larga escala pode ajudar a mitigar os efeitos da falta de saneamento em comunidades vulneráveis, prevenindo doenças como diarreia, especialmente em crianças.

**Palavras-chave:** SODIS, AM/SODIS, radiação solar, fotocatalisador, *in silico*, *in vitro*, *in vivo*, metagenômica, teste de Ames, *S. cerevisiae*, camundongo *hairless*, coloração HE, imunofluorescência, caspase-3, beclina-1 e estresse oxidativo (OKL-38).

## ABSTRACT

Rurr, Janine Simas Cardoso. WATER DISINFECTION PROCESS USING SOLAR RADIATION AND A SAFE PHOTOCATALYST: A STUDY FOR VALIDATING ITS USE IN BRAZILIAN POPULATIONS THROUGH *IN SILICO*, *IN VITRO*, AND *IN VIVO* TECHNIQUES. Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina, Área de Concentração em Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

The study investigated the improvement of the Solar Water Disinfection (SODIS) technique through the addition of Methylene Blue (MB), aiming to accelerate the microbiological decontamination of water, especially in regions with low sunlight exposure. Microbiologically contaminated water is one of the leading causes of diseases in developing countries, and solar disinfection has proven effective but limited under unfavorable weather conditions. The inclusion of MB, a photosensitive dye, accelerates the process by generating reactive oxygen when exposed to sunlight, which inactivates microorganisms. The study was divided into three parts: *in silico*, *in vitro*, and *in vivo*. In the *in silico* study, simulations were conducted to predict the acute toxicity and mutagenicity of MB in its oxidized (blue) and reduced (leuco) forms. Both forms showed low toxicity, with the leuco form being even less toxic. Mutagenicity was observed in the oxidized form in some tests, but the leuco form was found to be safe. In the *in vitro* experiments, samples of artesian well water contaminated with pathogens were analyzed. Metagenomic analysis identified the presence of human and animal intestinal microbiota, as well as pathogens causing severe diseases. After applying the AM/SODIS method, there was a significant reduction in the number of microorganisms, demonstrating the efficacy of the treatment in water decontamination. In the *in vivo* study, mice were exposed to water treated with AM/SODIS for 13 weeks. After analyzing the liver and kidneys of the animals, no histopathological alterations or signs of cytotoxicity, genotoxicity, or mutagenicity were observed. The analysis of the expression of proteins related to cell death also indicated no cellular stress, autophagy, or apoptosis, suggesting that the use of MB at a concentration of 100 ng/ml is safe for human consumption. The study's results indicate that the combination of SODIS with MB improves the efficiency of the water disinfection process, making it a viable option for use in regions with low sunlight or emergency situations. The technique is simple, low-cost, and can be applied in underprivileged areas, helping to reduce waterborne diseases. Furthermore, the study found no significant toxicity in the MB forms used, making the method safe for human consumption. This research contributes to the development of low-cost technologies for water treatment, aligning with the United Nations Sustainable Development Goals, particularly regarding access to clean water and sanitation. The large-scale application of the technique could help mitigate the effects of poor sanitation in vulnerable communities, preventing diseases like diarrhea, especially in children.

**Keywords:** SODIS, MB/SODIS, solar radiation, photocatalyst, *in silico*, *in vitro*, *in vivo*, metagenomics, Ames test, *S. cerevisiae*, hairless mouse, HE staining, immunofluorescence, caspase-3, beclin-1, and oxidative stress. OKL38

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Procedimento padrão para a técnica.....	32
<b>Figura 2</b>	Regiões no Mundo onde utilizam o método SODIS .....	33
<b>Figura 3</b>	Faixa da radiação solar.....	34
<b>Figura 4</b>	Mapa de radiação solar global.....	36
<b>Figura 5</b>	Representação esquemática da oxidação de um substrato pela ação fotodinâmica de um fotossensibilizador ativado.....	40
<b>Figura 6</b>	Fórmula estrutural e o espectro de absorção do Azul de Metileno.....	42
<b>Figura 7</b>	Demonstração do aumento da inativação microbiológica em amostras de água pela técnica da membrana filtrante.....	44
<b>Figura 8</b>	Um mapa gráfico unindo regiões do mundo de baixa irradiação solar (áreas bege) com densidade populacional.....	47
<b>Figura 9:</b>	Desenho experimental do estudo.....	49
<b>Figura 10</b>	Mapa elaborado através de imagens de satélite LANDSAT-TM 7 e a base Cartográfica da ANEEL.....	68
<b>Figura 11</b>	Fotografia de uma Placa de Petri contendo colônias de <i>E. coli</i> e coliformes totais crescidas no Meio <i>Chromocult</i> <sup>®</sup> .....	69
<b>Figura 12</b>	Esquema metodológico para metagenômica .....	70
<b>Figura 13</b>	Fotografias mostrando as garrafas PET contendo água limpa adicionada de diferentes concentrações de AM, expostas à luz solar ( <i>sunlight</i> , à esquerda) ou mantidas no escuro ( <i>dark</i> , à direita).....	74
<b>Figura 14</b>	Fotografia da apresentação das garrafas PET com água do poço artesiano AM durante a exposição ao sol pleno entre 11h e 16h no dia 7 de junho de 2019.....	75
<b>Figura 15</b>	Fotografia do liofilizador K120.....	76
<b>Figura 16</b>	Esquema da metodologia por incorporação em placa do Teste de Ames para avaliação da citotoxicidade e mutagênese em <i>S. typhimurium</i> testadas nos tratamentos SODIS, AM/SODIS, AM/ESCURO e AM/CALOR/ESCURO com ou sem ativação metabólica.....	78
<b>Figura 17</b>	Esquema da metodologia para avaliação da citotoxicidade e mutagênese em levedura testadas com a forma leuco do AM.....	80
<b>Figura 18</b>	Presença de coliformes fecais e totais em 100 ml de água do poço.....	82

<b>Figura 19</b>	Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.....	82
<b>Figura 20</b>	Distribuição dos <b>domínios</b> filogenéticos encontrados na amostra da água de poço.....	83
<b>Figura 21</b>	Distribuição dos grupos <b>filogenéticos</b> na amostra de água do poço artesiano.....	84
<b>Figura 22</b>	Distribuição taxonômica de <b>classes</b> presentes nas amostras de água do poço artesiano.....	85
<b>Figura 23</b>	Distribuição taxonômica de <b>ordens</b> presentes nas amostras de água do poço artesiano .....	85
<b>Figura 24</b>	Distribuição taxonômica de <b>famílias</b> presentes nas amostras de água do poço artesiano .....	85
<b>Figura 25</b>	Distribuição taxonômica de <b>gêneros</b> presentes nas amostras de água do poço artesiano.....	86
<b>Figura 26</b>	Fragments de DNA na região hipervariável do gene 16S rRNA.....	87
<b>Figura 27</b>	Monitoramento das taxas de dose de radiação solar (UV-A e UV-B).....	88
<b>Figura 28</b>	Gráficos (A, B, C): citotoxicidade e mutagenicidades cepas de <i>S. typhimurium</i> .....	91
<b>Figura 29</b>	Gráficos (D, E, F): citotoxicidade e mutagenicidade das cepas de <i>S. typhimurium</i> ativado metabolicamente com a fração S9.....	92
<b>Figura 30</b>	Gráficos representando a fração de sobrevivência ( $N/N_0$ ) das leveduras submetidas aos tratamentos AM/leuco (200 µg/l).....	93
<b>Figura 31</b>	Gráficos representando a mutagênese ( $Can^R/10^7$ células) das leveduras submetidas aos tratamentos AM/leuco (200 µg/l).....	94
<b>Figura 32</b>	Esquema representativo do fígado e suas estruturas principais.....	100
<b>Figura 33</b>	Parênquima hepático do camundongo <i>hairless</i> .....	101
<b>Figura 34</b>	Aspecto macroscópico de uma secção do rim.....	102
<b>Figura 35</b>	Parênquima renal de camundongos <i>hairless</i> .....	104
<b>Figura 36</b>	Representação esquemática de eventos apoptóticos.....	106
<b>Figura 37</b>	A relação entre apoptose, inflamação e fibrose no fígado.....	107
<b>Figura 38</b>	Esquema do papel da apoptose na injúria celular glomerular, dependendo do contexto patológico específico.....	110
<b>Figura 39</b>	Um esquema simplificado das vias de macroautofagia no fígado.....	112

<b>Figura 40</b> Principais funções da autofagia na fisiologia e patologia do fígado.....	115
<b>Figura 41</b> Homeostase redox no fígado.....	117
<b>Figura 42</b> O esquema geral do mecanismo de estresse oxidativo induzido por vários fatores na doença hepática.....	116
<b>Figura 43</b> Causas e possíveis consequências do estresse oxidativo nas doenças renais agudas e crônicas.....	119
<b>Figura 44</b> Esquema da metodologia <i>in vivo</i> utilizada.....	122
<b>Figura 45</b> Imagem ilustrativa referente ao alojamento dos animais durante o período do experimento.....	122
<b>Figura 46</b> Peso médio das vísceras (fígado e rim) de camundongos <i>hairless</i> dos grupos de estudo após o tratamento.....	126
<b>Figura 47:</b> Peso médio das vísceras (fígado e rim) de camundongos <i>hairless</i> entre os grupos testados.....	126
<b>Figura 48(A)</b> (Água de poço) Cortes histológicos do <b>fígado</b> de grupos de camundongos <i>hairless</i> após tratamentos.....	129
<b>Figura 48(B)</b> (Água filtrada) Cortes histológicos do <b>fígado</b> de grupos de camundongos <i>hairless</i> após tratamentos.....	130
<b>Figura 49(A)</b> (Água de poço) Cortes histológicos do <b>rim</b> de grupos de camundongos <i>hairless</i> após tratamentos.....	131
<b>Figura 49(B)</b> (Água filtrada) Cortes histológicos do <b>rim</b> de grupos de camundongos <i>hairless</i> após tratamentos.....	132
<b>Figura 50(A)</b> Fotomicrografias confocal a laser mostrando expressão do marcador caspase-3 (seta vermelha) em amostras de <b>fígado</b> .....	134
<b>Figura 50(B)</b> Fotomicrografias confocal a laser mostrando expressão do marcador caspase-3 (seta vermelha) em amostras de <b>rim</b> .....	135
<b>Figura 51</b> Gráficos de barras mostrando a quantificação da intensidade relativa da marcação do anticorpo anti-caspase-3 por imunofluorescência no <b>fígado</b> (A) e rim (B) dos grupos de camundongos <i>hairles</i> .....	136
<b>Figura 52(A)</b> Fotomicrografias confocal a laser mostrando expressão do marcador beclina-1 (seta vermelha) em amostras de <b>fígado</b> .....	137
<b>Figura 52(B)</b> Fotomicrografias confocal a laser mostrando expressão do marcador beclina-1 (seta vermelha) em amostras de <b>rim</b> .....	138

<b>Figura 53</b>	Gráficos de barras mostrando a quantificação da intensidade relativa da marcação do anticorpo anti-beclina-1 por imunofluorescência no <b>fígado</b> (A) e rim (B) dos grupos de camundongos <i>hairless</i> .....	139
<b>Figura 54(A)</b>	Fotomicrografias confocal a laser mostrando expressão do marcador OKL-38 (seta vermelha) em amostras de <b>fígado</b> .....	140
<b>Figura 54(B)</b>	Fotomicrografias confocal a laser mostrando expressão do marcador OKL-38 (seta vermelha) em amostras de <b>rim</b> .....	141
<b>Figura 55</b>	Gráficos de barras mostrando a quantificação da intensidade relativa da marcação do anticorpo OKL-38 por imunofluorescência no <b>fígado</b> (A) e rim (B) dos grupos de camundongos <i>hairless</i> .....	142
<b>Figura 56</b>	Os 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU.....	147
<b>Figura 57</b>	Esquema proposto para o uso doméstico do AM na técnica SODIS para 10 litros de água.....	149



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Resultados da ação SODIS para a inativação de bactérias enteropatogênicas.....	38
<b>Tabela 2</b>	Avaliação qualitativa <i>in silico</i> da toxicidade aguda do AM oxidado e reduzido (leuco) em ratos, e da mutagenicidade com e sem ativação metabólica a partir da fração microsomal de fígado de ratos em <i>S. typhimurium</i> (Teste de Ames).....	55
<b>Tabela 3</b>	Escala de toxicidade Hodge e Sterner.....	56
<b>Tabela 4</b>	Resultado dos testes de rotina para identificar o genótipo das cepas de <i>S. typhimurium</i> .....	89
<b>Tabela 5</b>	Atividade mutagênica expressa pelo índice mutagênico (IM), média do número de revertentes por placa das cepas TA98, TA100 e TA102 de <i>S. typhimurium</i> expostas aos tratamentos SODIS, AM/SODIS, AM/ESCURO e AM/ESCURO/CALOR com ou sem a fração S9 e porcentagem de sobreviventes.....	90
<b>Tabela 6</b>	Resumo da avaliação histológica do fígado e rim de grupos de cinco camundongos <i>hairless</i> submetidos aos tratamentos.....	128

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Padrão físico-químico e microbiológico da água recomendado para o consumo humano (Ministério da Saúde, BRASIL, 2011).....	30
<b>Quadro 2</b>	Listagem das cepas de <i>S. Typhimurium</i> e <i>S. cerevisiae</i> empregadas nos estudos de mutagenicidade e citotoxicidade <i>in vitro</i> bem como as mutações específicas s.....	65
<b>Quadro 3</b>	Desenho experimental dos grupos em estudo.....	123

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UNICEF	<i>United Nations Children's Fund</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
MS	Ministério da Saúde
WHO	<i>World Health Organization</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
IFAD	International Fund for Agricultural Development
WFP	<i>World Food Programme</i>
Pnad	Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
SNIS	Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
EAWAG	Instituto Federal Suíço de Ciência e Tecnologia Aquática
SANDEC	Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S.typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SODIS	<i>Solar Disinfection</i>
PET	polietileno tereftalato
UV	Ultra violeta
O <sub>3</sub>	Gás ozônio
ERRO	Espécie reativa de oxigênio
•OH	Radical hidroxil
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CPD	Dímeros de pirimidinas ciclobutano
NM	Nanômetros
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
AM	Azul de metileno
AM/SODIS	Método SODIS associado ao azul de metileno
TDI	Ingestão diária aceitável
GV	Valor de referência
BW	Peso corporal
P	Fração de TDI em outros alimentos (0,8)

C	Consumo diário de água (L)
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
H <sub>2</sub> O	Água
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Íons sulfato
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Íons de amônio
ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Eliminação e Toxicidade
AlkPhos	Fosfatase alcalina
SGOT	Transaminase glutâmica oxalacética sérica
SGPT	Transaminase glutâmica pirúvica sérica
GGT	Gama-glutamil transferase
LDH	Lactato desidrogenase
DL	Dose letal
HIS	Histidina
S9	Fração microsomal de fígado de rato
3R's	<i>Repair, Recombination, Replication</i>
MG-RAST	<i>Metagenomics Rapid Annotation using Subsystem Technology</i>
B(a)P	Benzo [a] pireno
Mitomic C	Mitomicina C
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
IM	Índice de Mutagenicidade
UFC	Unidade formadora de colônia
Can <sup>R</sup>	Canavanina resistente
N <sub>2</sub>	Nitrogênio atmosférico
J	Joule
4-NQO	4-nitroquinolina N-óxido
DEHA	di(2-etilhexil) adifato
DEHP	di(2-etilhexil) ftalato
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
HE	Hematoxilina e eosina

## SUMÁRIO

	Páginas
<b>HISTÓRICO DO PROJETO AM/SODIS.....</b>	<b>25</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	
1.1 Considerações Gerais.....	27
1.2 A problemática da água e do saneamento básico no mundo.....	27
1.3 A problemática da água e do saneamento básico no Brasil.....	28
1.4 Prevenção de diarreias.....	29
1.5 Como amenizar o problema de obter água potável de forma barata e acessível.....	30
1.6 O Método da Desinfecção Solar da água (SODIS, do inglês <i>Solar Disinfection</i> ).....	31
1.7 Aspectos Históricos da Metodologia SODIS.....	32
1.8 O espectro da radiação solar.....	33
1.9 A inativação dos microorganismos pela radiação solar.....	34
1.10 Regiões onde a metodologia SODIS tem maior eficiência.....	35
1.11 Quantificação do efeito SODIS sobre diferentes agentes patogênicos.....	36
1.12 Limitações do método.....	39
1.13 Ação Fotodinâmica.....	40
1.14 Inativação bacteriana em amostras de água estéril, com diferentes concentrações de AM.....	42
1.15 Emprego farmacológico do AM.....	43
1.16 Ação fotossensibilizadora e a escolha do Azul de Metileno (AM) para a associação com o processo SODIS.....	43
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>46</b>
<b>3 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>48</b>
<b>4 ESTRUTURA DA TESE.....</b>	<b>48</b>
4.1 Desenho experimental do estudo.....	49
<b>5 CAPÍTULO 1</b>	
5.1 INTRODUÇÃO ao estudo <i>in silico</i> .....	51
5.2 OBJETIVO ESPECÍFICO DO CAPÍTULO 1.....	52
5.3 MATERIAL E METODOLOGIA <i>in silico</i> .....	52

<b>5.4 RESULTADOS <i>in silico</i></b> .....	<b>53</b>
<b>5.4.1 Estudos sobre a toxicidade da forma Leuco do AM <i>in silico</i></b> .....	<b>53</b>
<b>5.5 DISCUSSÃO <i>in silico</i></b> .....	<b>56</b>
<b>5.6 CONCLUSÃO DAS ANÁLISES <i>in silico</i></b> .....	<b>58</b>
<b>6 CAPÍTULO 2</b>	
<b>6.1 INTRODUÇÃO AO ESTUDO <i>in vitro</i></b> .....	<b>61</b>
<b>6.1.1 Metagenômica</b> .....	<b>61</b>
<b>6.1.2 Estudos sobre a citotoxicidade e mutagenicidade da forma leuco do AM. O uso de <i>Salmonella typhimurium</i> como modelo de estudo <i>in vitro</i></b> .....	<b>61</b>
<b>6.1.3 Estudos sobre a citotoxicidade e mutagenicidade da forma leuco do AM O uso de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudo <i>in vitro</i></b> .....	<b>63</b>
<b>6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO CAPÍTULO 2</b> .....	<b>65</b>
<b>6.3 MATERIAL E METODOLOGIA <i>in vitro</i></b> .....	<b>65</b>
<b>6.3.1 Cepas utilizadas</b> .....	<b>65</b>
<b>6.3.2 Meios de cultura, soluções e tampões para o Teste de Ames</b> .....	<b>66</b>
<b>6.3.3 Meios de cultura, soluções e tampões para leveduras</b> .....	<b>67</b>
<b>6.3.4 Localidade selecionada para o estudo</b> .....	<b>68</b>
<b>6.3.5 Análises de amostras de água - determinação da contaminação microbiológica</b> .....	<b>68</b>
<b>6.3.6 Análise da composição microbiana de amostras de água real (proveniente de poço artesiano)por metagenoma antes do tratamento</b> ..	<b>70</b>
<b>6.3.7 Processamento da amostra de água do poço - Extração e amplificação de DNA</b> .....	<b>71</b>
<b>6.3.8 Sequenciamento paralelo massivo</b> .....	<b>71</b>
<b>6.3.9 Análise por metagenoma da composição microbiana de amostras de água real (proveniente de poço artesiano) depois dos tratamentos</b> ....	<b>72</b>
<b>6.4 Distribuição das bactérias por sequenciamento NGS (<i>Next-Generation Sequencing</i>) do gene 16S rRNA e sequenciamento em <i>Ion S5</i></b> .....	<b>72</b>
<b>6.5 Fotossensibilizador</b> .....	<b>73</b>
<b>6.6 Fontes de radiação</b> .....	<b>73</b>
<b>6.6.1 Dosimetria das radiações UV</b> .....	<b>73</b>

6.6.2	Preparação de soluções concentradas de AM-azul ou AM-leuco em água destilada para os ensaios de citotoxicidade e mutagênese.....	73
6.6.3	Confirmação dos genótipos das cepas de <i>S. typhimurium</i> a serem testadas.....	76
6.6.4	Manutenção e estoque das cepas de <i>S. typhimurium</i> e <i>S. cerevisiae</i> .....	77
6.6.5	Mutateste.....	77
6.6.6	Controles.....	78
6.6.7	Forma de análise dos resultados da mutagenicidade pelos diferentes tratamentos.....	79
6.6.8	Forma de análise dos resultados da sobrevivência bacteriana (Citotoxicidade).....	79
6.6.9	Estudo da citotoxicidade e da mutagênese à forma AM-leuco em levedura ( <i>S. cerevisiae</i> ).....	79
<b>6.7</b>	<b>ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....</b>	<b>81</b>
<b>6.8</b>	<b>RESULTADOS <i>in vitro</i>.....</b>	<b>81</b>
6.8.1	Análise por metagenômica das amostras de água.....	81
6.8.2	Análise por metagenômica e diversidade toxonômica antes do tratamento AM/SODIS da água contaminada.....	83
6.8.3	Análise por metagenômica e diversidade taxonômica depois do tratamento AM/SODIS da água contaminada .....	86
6.8.4	Dosimetria das radiações UV.....	87
6.8.5	Confirmação dos genótipos.....	88
6.8.6	Controles da citotoxicidade e da mutagênese espontânea (água) ou induzida (4NQO).....	93
6.8.7	Citotoxicidade da forma leuco do AM testada nas cepas FF18733 e AWP001.....	93
6.8.8	Mutagenicidade da forma leuco do AM testada nas cepas FF18733 e AWP001.....	94
<b>6.9</b>	<b>DISCUSSÃO <i>in vitro</i>.....</b>	<b>94</b>
<b>6.10</b>	<b>CONCLUSÃO DAS ANÁLISES <i>in vitro</i>.....</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>CAPÍTULO 3</b>	
7.1	INTRODUÇÃO AO ESTUDO <i>in vivo</i> .....	99

7.1.1	Possível aplicação do processo AM-SODIS para consumo humano: investigação sobre a segurança do método.....	99
7.1.2	Análise da expressão de marcadores de morte celular e toxicidade em células humanas.....	104
<b>7.2</b>	<b>Apoptose.....</b>	<b>105</b>
7.2.1	Apoptose hepático.....	106
7.2.2	Apoptose renal.....	108
7.2.3	Injúria das células tubulares.....	108
7.2.4	Injúria celular glomerular.....	109
<b>7.3</b>	<b>Autofagia.....</b>	<b>111</b>
7.3.1	Autofagia dos hepatócitos.....	112
7.3.2	Autofagia no rim.....	114
<b>7.4</b>	<b>Estresse Oxidativo.....</b>	<b>114</b>
7.4.1	Estresse oxidativo hepático.....	115
7.4.2	Estresse oxidativo renal.....	117
<b>7.5</b>	<b>Estudos sobre a toxicidade sub-crônica da forma leuco do AM. O uso de camundongos como modelo de estudo <i>in vivo</i>.....</b>	<b>120</b>
<b>7.6</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO CAPÍTULO 3.....</b>	<b>121</b>
<b>7.7</b>	<b>MATERIAL E METODOLOGIA <i>in vivo</i>.....</b>	<b>121</b>
7.7.1	Procedimentos cirúrgicos e microscopia óptica de rotina do fígado e rim em (HE).....	123
7.7.2	Imunofluorescência através de microscopia confocal a laser. Análise das respostas celulares com marcadores de apoptose, autofagia e estresse oxidativo.....	124
<b>7.8</b>	<b>ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....</b>	<b>125</b>
<b>7.9</b>	<b>RESULTADOS <i>in vivo</i>.....</b>	<b>125</b>
7.9.1	Pesagem.....	125
7.9.2	Análises histológicas de fígado e rim em camundongos <i>hairless</i> .....	127
7.9.3	Análises moleculares (marcadores para imuno-fluorescência associados à apoptose, autofagia e estresse oxidativo) em pele, fígado e rim de camundongos <i>hairless</i> .....	131
7.9.3.1	Controles.....	131
7.9.3.2	Caspase-3.....	131

7.9.3.3 Beclina-1.....	134
7.9.3.4 OKL-38.....	137
<b>8 DISCUSSÃO <i>in vivo</i></b> .....	<b>140</b>
<b>9 CONCLUSÃO DAS ANÁLISES <i>in vivo</i></b> .....	<b>144</b>
<b>10 CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	<b>144</b>
<b>11 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>145</b>
<b>10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>147</b>
<b>12 ANEXO A</b> (Artigo submetido/ <i>Photochemistry and Photobiology - Decision on Manuscript</i> ID PHP-2024-06-RAR-0150).....	<b>156</b>
<b>13 ANEXO B</b> (Artigo em preparação) .....	<b>179</b>



## 1 HISTÓRICO DO PROJETO AM/SODIS

A partir do Edital FAPERJ “Pensa Rio – Apoio ao Estudo de Temas Relevantes e Estratégicos para o Estado do Rio de Janeiro” em setembro de 2007 participei como bióloga de uma equipe que já possuía atuação anterior em projetos relacionados recursos hídricos. Neste momento, no laboratório de Radiobiologia Molecular, chefiado pelo professor Alvaro Augusto da Costa Leitão, começava a minha história com o projeto intitulado A DESINFECÇÃO SOLAR PROMOVEDO A QUALIDADE DA ÁGUA. Com a aquisição do Simulador Solar (ORIEL) foi possível fazer as experiências com alguns microorganismos causadores de diarreia, de maneira controlada. A Desinfecção Solar (SODIS) é uma técnica estudada a fim de melhorar a qualidade da água contaminada microbiologicamente através da radiação solar como fonte esterilizante de microorganismos. O procedimento consiste na exposição de garrafas PET com água não potável ao sol por um período de 6 horas. Esta é uma alternativa recomendada pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), Organização Mundial de Saúde (OMS) e Cruz Vermelha (EAWAG/SANDEC, 2009).

Com a criação do INPeTAm (Instituto Nacional de Pesquisa Translacional da Amazônia) em 2010, participei da I Visita Técnica ao Lago do Puruzinho - Humaitá – Rondônia para avaliar a qualidade sanitária da água consumida e divulgar a método SODIS. Foram recolhidas 13 amostras de água armazenadas em moringas de barro, amostras em vários pontos do Lago Puruzinho e como controle, foi utilizado água deionizada. Das 13 amostras coletadas, 4 seguiram o método de desinfecção solar - SODIS. Em todas as amostras avaliadas, os resultados sugeriram a presença de coliformes fecais, só que em diferentes quantidades. As amostras que foram submetidas ao SODIS mostraram uma redução drástica da quantidade de coliformes fecais, quando comparadas às quantidades observadas antes da aplicação da técnica. Isto indica que o SODIS é apropriado para promover a qualidade da água ingerida pela população local, melhorando também a sua qualidade de vida.

Em 2013 na Reunião Ambiente e Saúde & Educação no Lago do Puruzinho, analisamos a qualidade da água retirada do poço artesiano construído após a 1ª Expedição e também verificamos a qualidade sanitária das fontes hídricas e reservatórios da Comunidade do Buiçu, na margem do Rio Madeira/Humaitá – RO, que não possui poço artesiano e não usa água proveniente do Lago. Nas amostras retiradas do poço artesiano o número de bactérias foi muito pequeno em relação ao encontrado no armazenamento, indicando uma contaminação no transporte da água para as garrafas. Coliformes totais e fecais foram encontrados na margem e ausentes no centro do Lago. Na comunidade do Buiçu que utiliza

o Rio Madeira como fonte de abastecimento e não possui poço artesiano, todas as amostras apresentavam alto índice de contaminação por bactérias, coliforme fecal e total. Este consumo da água de beber microbiologicamente contaminada é a principal causa de diarreia. Comunidades com hábitos de consumir água diretamente da fonte não tratada, rios poluídos e lagos, estão colocando em risco a saúde porque os patógenos causadores de diarreias não são transmitidos apenas pela água contaminada, são transmitidas através das mãos sujas, comidas contaminadas, moscas etc.

Em 2015 com a dissertação do mestrado profissional da tese intitulada "Descontaminação Microbiológica de Água: Melhoramento da Técnica de Desinfecção Solar (SODIS) pela Utilização do Azul de Metileno" investiguei formas de melhorar o processo de desinfecção solar (SODIS) de água, utilizando o corante Azul de Metileno (AM) como fotocatalisador. A contaminação microbiológica da água é uma das principais causas de doenças, e a técnica SODIS, já era uma solução viável de baixo custo para inativar microorganismos. No entanto, esse processo pode ser demorado em dias nublados ou em regiões com menor incidência de radiação solar.

Neste contexto o estudo propôs o uso do AM para acelerar o processo de desinfecção. Através da ação fotodinâmica, o AM absorve a luz solar, gerando oxigênio singlete que inativa bactérias e vírus. Foram testadas duas espécies de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus epidermidis* e *Deinococcus radiodurans*), duas espécies Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*) e o fago lambda. Os resultados mostraram uma inativação bacteriana mais rápida e eficiente quando o AM foi utilizado em combinação com o SODIS (CARDOSO-RURR; DE PAIVA; PAULINO-LIMA; DE ALENCAR et al., 2019). A tese conclui que o método proposto pode ser uma solução eficaz para fornecer água segura em regiões menos ensolaradas ou onde o SODIS tradicional não seria eficiente, ajudando a inativar microorganismos mais resistentes.

## **2 INTRODUÇÃO**

### **2.1 Considerações Gerais**

Em junho de 2017, a população mundial alcançou 7,6 bilhões de pessoas, e estima-se que até 2050 ela aumentará para 9,7 bilhões, chegando a 10,4 bilhões em 2100. A África e a Ásia respondem pelas maiores taxas de crescimento populacional da atualidade, embora se estime que a África sozinha seja a principal responsável após 2050 (ECONOMIC; SOCIAL AFFAIRS, 2022)

O consumo mundial de água aumentou em seis vezes nos últimos cem anos, e continua a crescer de forma constante a uma taxa de cerca de 1% ao ano como resultado do aumento populacional, do desenvolvimento econômico e das mudanças nos padrões de consumo. Aliado a um abastecimento de água cada vez mais irregular e incerto, a mudança climática agrava a situação de regiões que já apresentam escassez de água, e provocará estresse hídrico em regiões onde a pobreza predomina (KONCAGÜL; TRAN; CONNOR, 2020)

Os recursos hídricos atualmente ainda são abundantes no planeta Terra. Todavia, além da quantidade, a qualidade da água também será prejudicada em decorrência do excesso de dejetos humanos e animais contaminantes, poluentes químicos e das temperaturas mais elevadas, com a conseqüente redução do oxigênio dissolvido. Neste contexto, o reuso da água (ou água reciclada) é uma alternativa confiável aos recursos hídricos convencionais para vários usos humanos, desde que seja tratada e/ou usada com segurança (KONCAGÜL; TRAN; CONNOR, 2020).

### **2.2 A problemática da água e do saneamento básico no mundo**

A UNICEF e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que cerca de 633 milhões de pessoas continuam sem acesso ao abastecimento de água tratada, e ainda são 2,4 bilhões de pessoas no mundo vivendo sem saneamento adequado. Mais de um bilhão de pessoas no mundo ainda não possuem acesso a um banheiro, e isso significa que uma em cada quatro pessoas continuam a fazer suas necessidades fisiológicas ao ar livre, uma prática muito problemática, por representar uma fonte contínua de doenças pela contaminação da água de consumo humano. As conseqüências das doenças associadas a essas condições são preocupantes, principalmente as que causam diarreia (ORGANIZATION, 2017).

Cerca de 1,7 bilhão de casos de diarreia na primeira infância anualmente são atribuídos à falta de água potável, saneamento e higiene nos países em desenvolvimento, mas impactam desproporcionalmente as crianças com menos de cinco anos, com 525.000 mortes por ano. De acordo com a OMS, são necessários aproximadamente 50 litros de água por pessoa por dia para garantir que as necessidades básicas sejam atendidas, ao mesmo tempo em que se mantém um baixo nível de riscos para a saúde pública (ORGANIZATION, 2017); (MEDLICOTT; WESTER; GORDON; MONTGOMERY, 2020).

Especialmente nesse contexto epidemiológico relacionado à água não tratada em todo o mundo, 149 milhões de crianças com menos de cinco anos de idade que sobrevive à diarreia sofrem de algum tipo de atraso do crescimento. A falta de acesso a serviços de água, saneamento e higiene contribuem para a subnutrição por meio da transmissão de agentes patogênicos, porque as infecções gastrointestinais inibem a absorção de nutrientes essenciais ao pleno desenvolvimento físico e mental infantil (ORGANIZATION, 2019a); (ORGANIZATION, 2019b).

### 2.3 A problemática da água e do saneamento básico no Brasil

Para que a água seja considerada potável do ponto de vista microbiológico, deve ser atendida a Portaria Nº 2.914 do Ministério da Saúde (MS), de 12 de dezembro de 2011, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano. Nela, o padrão de potabilidade é definido como: “*água para consumo humano cujos parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos atendam ao padrão de potabilidade e que não ofereça riscos à saúde*”. Microrganismos como *Escherichia coli* (*E. coli*) e demais bactérias classificadas como bacilos Gram negativos não esporulados e aeróbicos facultativos que habitam o trato intestinal dos seres humanos e de outros animais homeotérmicos são importantes contaminantes ambientais. Assim, a água denominada de potável deve estar isenta de (*E. coli*) e coliformes totais a cada 100 ml (BRASIL, 2011).

No Brasil, 83,62% dos brasileiros são atendidos com abastecimento de água tratada, entretanto, quase 35 milhões de brasileiros não têm acesso a este serviço básico (<http://snis.gov.br/painel-informacoes-saneamento-brasil/web/painel-abastecimento-agua>). Neste cenário, 14,3% das crianças e dos adolescentes não têm acesso à água e 6,8% delas não contam com sistema de água dentro de suas casas (<https://www.unicef.org/brazil/relatorios/pobreza-na-infancia-e-na-adolescencia>).

Os efeitos da escassez de água potável na saúde e no desenvolvimento humano foram estabelecidos como perspectivas em saúde pública, onde o acesso à água potável e boas práticas de higiene reduziria os episódios de diarreia em 45% (TARRASS; BENJELLOUN, 2012).

Adicionalmente, quase 100 milhões (46,3%) de brasileiros não são atendidos pela rede de coleta de esgoto (<http://snis.gov.br/painel-informacoes-saneamento-brasil/web/painel-egotamento-sanitario>). Em relação às crianças e adolescentes, cerca de 13 milhões não têm acesso ao saneamento básico, e 3,1% não têm sanitário em casa (<http://www.tratabrasil.org.br/artigos>).

Em termos nacionais, 2% da população brasileira ainda não tem acesso a um banheiro, são 4 milhões de brasileiros sem acesso ao atendimento sanitário básico e aproximadamente 24 milhões não têm acesso à água encanada, o que obriga a população a beber água sem o menor controle de contaminação (<https://www.ibge.gov.br/Pnad>). Como resultado dos baixos índices de tratamento de água potável, 65% das internações hospitalares do Brasil são devidas às doenças infecto contagiosas transmitidas pela água, como, por exemplo: disenteria, hepatite, meningite, ascaridíase, tracoma, esquistossomose e outras (<http://www.mma.gov.br>).

Todos os dias, sete crianças morrem no Brasil por causa da falta de saneamento básico. Para zerar o déficit de saneamento básico e oferecer acesso universal à coleta e ao tratamento de esgoto, o governo precisaria investir anualmente R\$ 10 bilhões nos próximos 20 anos. Parece uma soma vultosa, mas os prejuízos causados pela falta de saneamento são ainda maiores: cada R\$ 1 investido em saneamento representa uma economia de R\$ 4 em gastos com saúde coletiva (<http://www.tratabrasil.org.br/manifesto>).

## **2.4 Prevenção de diarreias**

O acesso à água potável e boas práticas de higiene são altamente eficazes na prevenção de diarreias, o que reduziria tais episódios em 45% no mundo (TARRASS; BENJELLOUN, 2012).

A questão da reforma sanitária vem sendo, por décadas, discutida pelas autoridades em saúde pública e identificada como essencial para prevenção e redução de doenças transmitidas por via hídrica. Mas dados estatísticos mostram ainda como é grande esse desafio (TEIXEIRA; GUILHERMINO, 2006). A qualidade da água urbana no país é seriamente comprometida pela descarga indiscriminada de resíduos domésticos e industriais não tratados,

o que agrava a obtenção de água para consumo dentro dos padrões de potabilidade exigidos (Quadro 1).

**Quadro 1** - Padrão físico-químico e microbiológico da água recomendado para o consumo humano (BRASIL, 2011).

PARÂMETROS / Portaria MS Nº 2.914/2011 de 12/12/2011 (Federal)		
<b>Físico-Químicos</b>		
pH		6,0 – 9,0
Cor / uH <sup>(1)</sup>		15
Turbidez / UNT		5
Condutividade Elétrica / $\mu\text{S cm}^{-1}$		100
<b>Microbiológico</b>		
Parte do sistema:	Parâmetros	VMP <sup>(3)</sup>
	<i>E. coli</i> <sup>(2)</sup>	Ausência em 100 ml
Na saída do tratamento	Coliformes totais <sup>(4)</sup>	Ausência em 100 ml
No sistema de distribuição (reservatórios e rede)	<i>E. coli</i>	Ausência em 100 ml
	Coliformes totais <sup>(5)</sup>	Sistemas ou soluções alternativas coletivas que abastecem a partir de 20.000 habitantes
		Apenas uma amostra, entre as amostras examinadas no mês, poderá apresentar resultado positivo.
		Ausência em 100 ml em 95% das amostras examinadas no mês

Notas:

(1) Unidade Hazen (mgPt-Co/L)

(2) Indicador de contaminação fecal

(3) Valor máximo permitido

(4) Indicador de eficiência de tratamento

(5) Indicador de integridade do sistema de distribuição (reservatório e rede)

Portaria MS Nº 2914 DE 12/12/2011 (Federal) /Data D.O.: 14/12/2011

## 2.5 Como amenizar o problema de obter água potável de forma barata e acessível?

Em 1984, uma publicação de Aftim Acra pela UNICEF preconizava que a radiação solar poderia ser utilizada para a desinfecção de água contaminada com micro-organismos. O método consistia em colocar água contaminada em garrafas PET e deixar no Sol pleno durante cerca de 6 horas.

Em 1991, em pesquisas de laboratório, o EAWAG (Instituto Federal Suíço de Ciência e Tecnologia Aquática) em conjunto com o SANDEC (Departamento de Saneamento e Água para Países em Desenvolvimento) constatou a eficácia do método e começaram a fazer experimentos em campo, comprovando que realmente a radiação solar era capaz de inativar

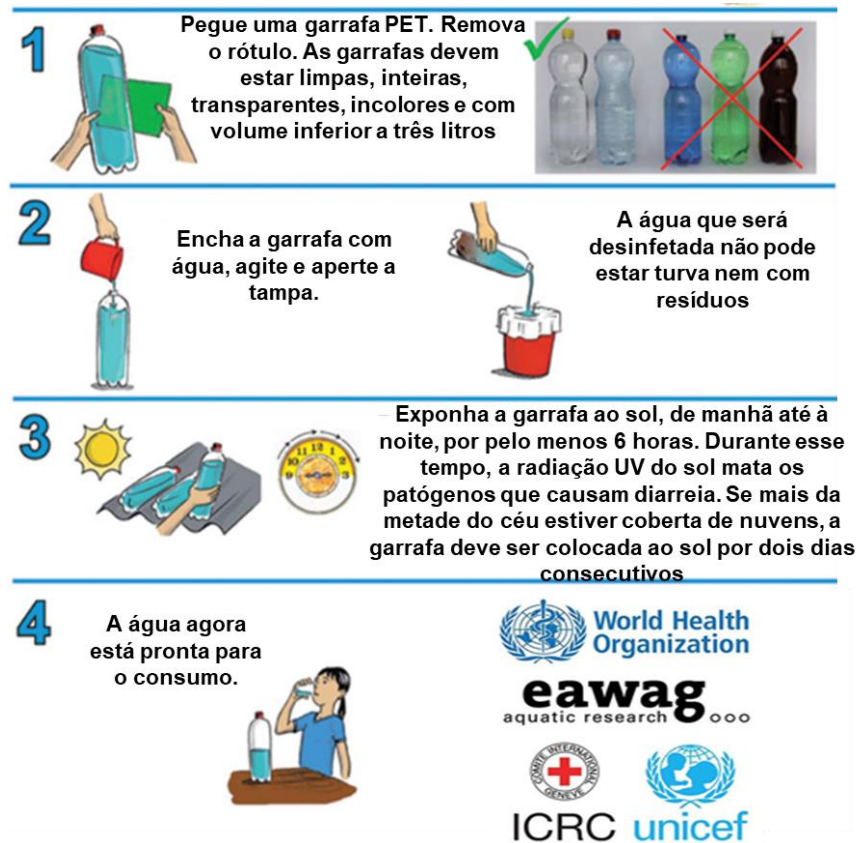
os micro-organismos presentes na água. Este método foi denominado SODIS - *Solar Water Disinfection* (CASLAKE; CONNOLLY; MENON; DUNCANSON *et al.*, 2004).

Diversas tecnologias vêm sendo implementadas para melhorar a qualidade da água para uso doméstico, dentre estas, a desinfecção solar da água (SODIS) (FISHER; IRIARTE; NELSON, 2012).

## **2.6 O Método da Desinfecção Solar da água (SODIS, do inglês *Solar Disinfection*)**

O procedimento padrão para a aplicação da técnica SODIS consiste no preenchimento de garrafas PET (sigla para polietileno tereftalato) transparentes e incolores com água não potável. Durante a exposição ao sol pleno por períodos entre 1-2 dias a radiação solar penetra o interior das garrafas e, somado às altas temperaturas dentro do líquido, ocorre praticamente 100% de letalidade dos patógenos presentes ([sodis.ch/methode/anwendung/ausbildungsmaterial/dokumente\\_material/manual\\_p.pdf](http://sodis.ch/methode/anwendung/ausbildungsmaterial/dokumente_material/manual_p.pdf)).

Assim, o processo SODIS pode deixar a água contaminada dentro dos padrões de potabilidade da OMS (MEIERHOFER; WEGELIN, 2002) e nacional (BRASIL, 2011). O método é muito simples e de baixíssimo custo, sendo, portanto, aplicável em comunidades pobres e que também não possuem água adequada para o consumo humano. Na figura 1 está esquematizada a aplicação do método SODIS padrão.



**Figura 1:** Procedimento padrão para a técnica SODIS. (1) a água contaminada é colocada dentro de garrafas PET incolor, transparente, inteira e com volume inferior a 3 litros. A água que será desinfetada não pode estar turva nem com resíduos; (2) e (3) as garrafas PET são expostas ao sol de manhã até à noite, por pelo menos 6 horas. Durante esse tempo, a radiação solar mata os patógenos que causam diarreia. Se mais da metade do céu estiver coberto de nuvens, a garrafa deve ser colocada ao sol por dois dias consecutivos ou mais; (4) a água está microbiologicamente descontaminada para consumo humano. Adaptado em 06 de junho de 2024.

<https://5store.mom/ProductDetail.aspx?iid=595459665&pr=65.88>

A radiação solar penetra o interior das garrafas atingindo os patógenos, destruindo-os e alcançando 99,9% de morte celular. De acordo com os padrões de potabilidade da OMS, a água SODIS pode ser classificada como sem risco nenhum de acordo com a detecção de coliformes fecais em 100 ml de suprimentos de água (SANDEC, 2002). Nessas condições, a taxa de dose recebida em Ultravioleta (UV) pode chegar a  $900 \text{ W/m}^2$  no verão e as temperaturas podem variar entre  $40^\circ\text{C}$  e  $60^\circ\text{C}$  no interior das garrafas (RIJAL; FUJIOKA, 2001), (LONNEN; KILVINGTON; KEHOE; AL-TOUATI *et al.*, 2005).

## 2.7 Aspectos Históricos da Metodologia SODIS

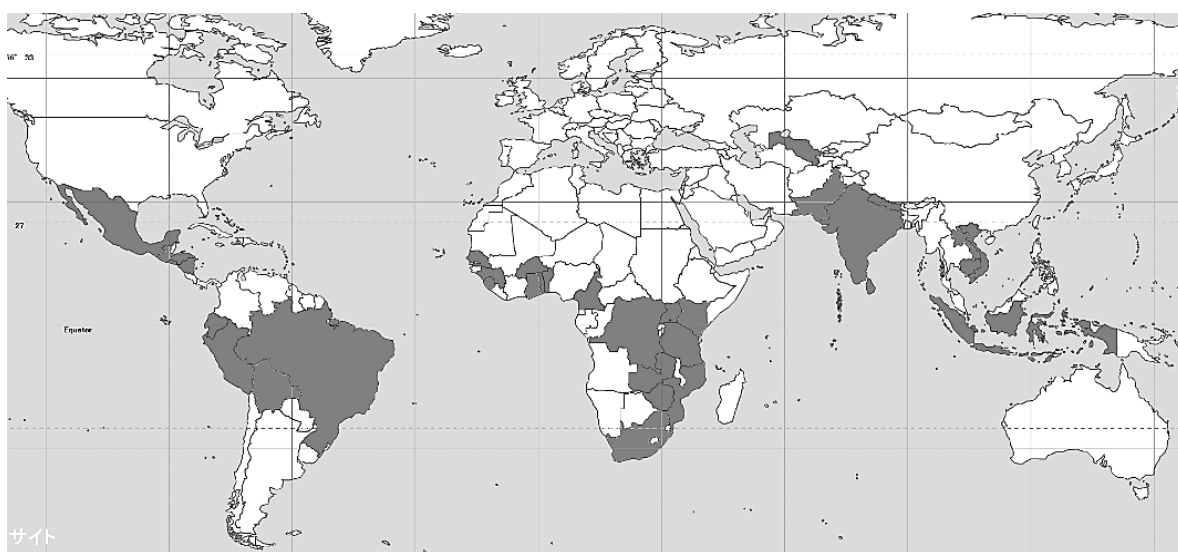
Em um estudo de surto de cólera ocorrido no Quênia em 1997/1998, crianças de menos de seis anos que usavam o método SODIS tiveram oito vezes menos cólera que as que



não usavam o método. Evidentemente, a diminuição dos casos de diarreia é acompanhada da diminuição dos casos de morte provocada pela enfermidade (CONROY; MEEGAN; JOYCE; MCGUIGAN *et al.*, 2001).

Em estudos epidemiológicos foi demonstrado que, nas regiões dos diferentes países nas quais o método SODIS é empregado pela população, houve diminuição dos casos de diarreia entre 20 a 80%, comparado com regiões dos mesmos países onde o método não é aplicado (MEIERHOFER; LANDOLT, 2009), (BITEW; GETE; BIKS; ADAFRIE, 2018) e (SOBOKSA; GARI; HAILU; DONACHO *et al.*, 2020).

Uma vez desenvolvido o método SODIS, a EAWAG/SANDEC começou a difundir o mesmo entre países pobres e em desenvolvimento, e hoje já é utilizado em diversas partes do mundo, estimando-se em cerca de cinco milhões de usuários distribuídos em mais de 50 países em desenvolvimento como indicado na figura 2 (MCGUIGAN; CONROY; MOSLER; DU PREEZ *et al.*, 2012)



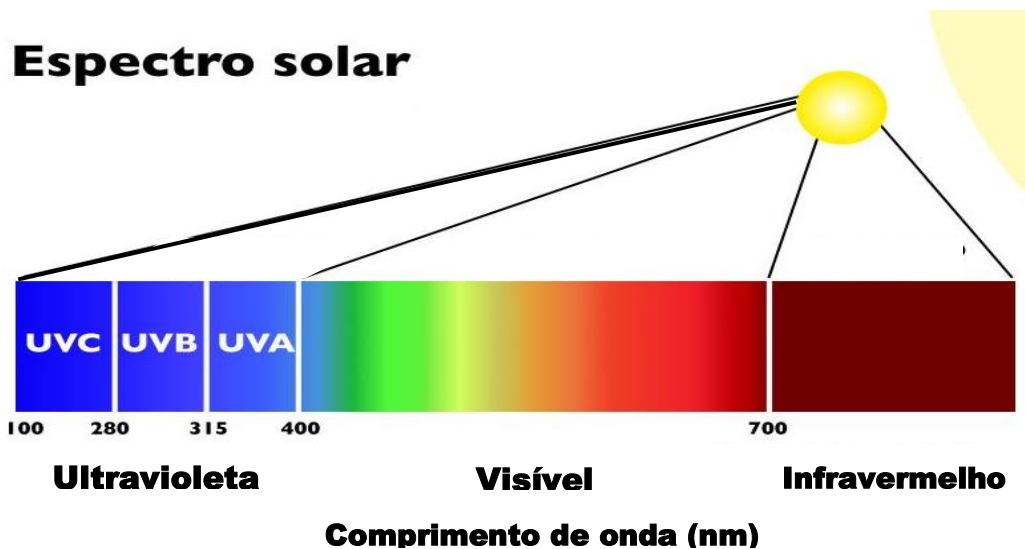
**Figura 2:** Regiões no Mundo onde o método SODIS já está sendo utilizado por parte da população (<https://themarginalized.com/2010/04/29/the-difference-is-drinkability-the-sodis-method/>).

## 2.8 O espectro da radiação solar

A luz solar é composta pela radiação ultravioleta (UV), luz visível e infravermelha, sendo dividida em várias bandas em função do comprimento de onda e de efeitos biológicos. A radiação UV é de natureza eletromagnética não ionizante, compreendida entre 400 e 200 nm (alguns estendem até 100 nm). Do ponto de vista dos efeitos biológicos, esta radiação é

dividida em três faixas de energia: Ultravioleta C (UV-C) (200 – 280 nm), Ultravioleta B (UV-B) (280 – 315 nm) e Ultravioleta A (UV-A) (315 - 400 nm).

Grande parte da radiação UV-C e UV-B é absorvida pelos gases presentes na atmosfera, chegando apenas à superfície terrestre uma proporção de, aproximadamente, 5,1% de UV-A, 0,3% de UV-B; o UV-C é totalmente absorvido pelo oxigênio, que se dissocia formando o gás ozônio ( $O_3$ ), que blinda a sua passagem. A luz visível está compreendida entre 400 a 700 nm sendo que 62,7% chegam à superfície da Terra. Já o infravermelho próximo, compreendido entre 700 e 1400 nm, tem 31,9% atravessando os gases atmosféricos e atingindo o nível do mar (MADRONICH; MCKENZIE; BJÖRN; CALDWELL, 1998). O espectro da radiação solar encontra-se na figura 3.



**Figura 3:** Faixas da radiação solar (adaptado de <http://2.bp.blogspot.com/espectro+solar.png>)

## 2.9 Os mecanismos de inativação dos micro-organismos pela radiação solar

Embora o UV-A não seja suficientemente energético para modificar diretamente as bases do DNA, essa radiação desempenha papel importante na formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) na célula, como formação de oxigênio singlete, radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil ( $\cdot OH$ ). Além disso, a luz solar pode ser absorvida por fotossensibilizadores naturais exógenos presentes nas águas superficiais (ácidos húmicos e clorofilas), que potencializam tais efeitos produzidos por ERO (MCGUIGAN; CONROY; MOSLER; DU PREEZ *et al.*, 2012). Uma vez formadas, as ERO podem causar danos ao

DNA, oxidação de aminoácidos e de ácidos graxos poli insaturados presentes nas membranas celulares.

Apesar da baixa incidência do UV-B solar na superfície da Terra, é a região de maior energia do espectro UV, podendo induzir a formação de dímeros de pirimidinas ciclobutano (CPD) e o fotoproduto 6-4 pirimidina-pirimidona (NELSON; BOEHM; DAVIES-COLLEY; DODD *et al.*, 2018), portanto, é a faixa mais letal.

A luz visível, à qual nossos olhos são sensíveis, têm comprimentos de onda entre 400 a 700 nm e é classificada segundo a cor, violeta para os comprimentos de onda mais curto, e vermelho na região mais longa. Possui importantes aplicações terapêuticas quando em combinação com determinados fotossensibilizadores, que possuem a capacidade de transferir sua energia para alvos biológicos, processo conhecido como ação fotodinâmica (LEITÃO; LAGE; CABRAL-NETO, 2005).

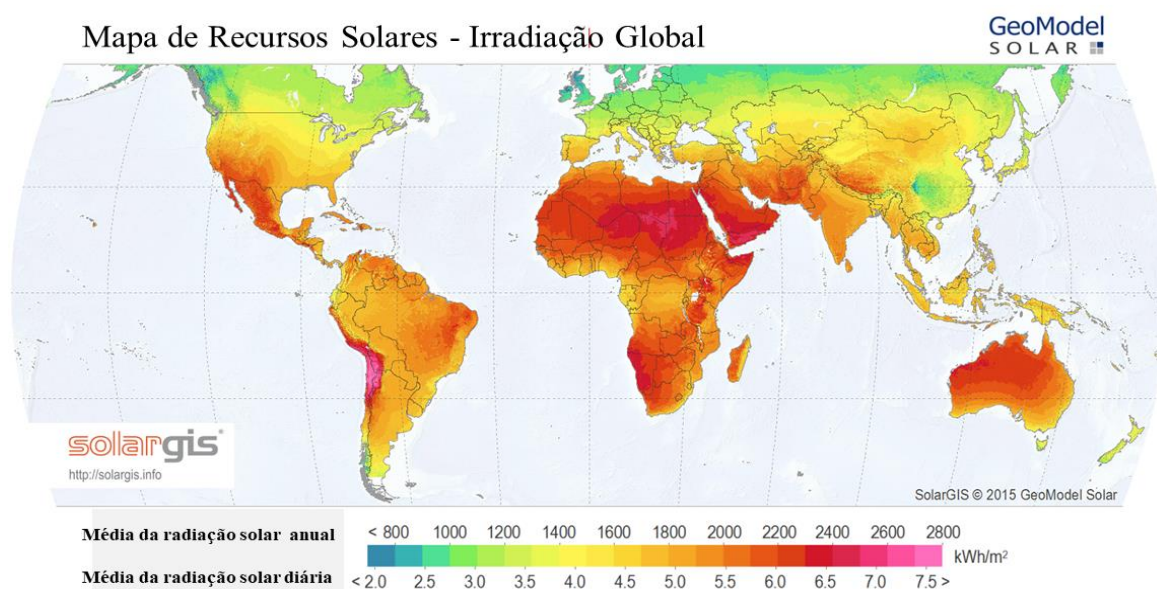
Já a radiação infravermelha é definida como a região de comprimentos de onda acima de 700 nm e, assim como a ultravioleta, não é percebida pelo olho humano; fortemente absorvida pela água e é responsável pelo seu aquecimento, é conhecida como a faixa térmica do Sol. Os microrganismos são sensíveis ao calor e, a partir de 50°C, as bactérias e cistos de protozoários começam a ser inativados por desnaturação, enquanto que os vírus necessitam de temperaturas acima de 60°C para começarem a perder viabilidade. Em temperaturas em torno de 30°C, a inativação de coliformes fecais ocorre em torno de 6 horas (99,9% de inativação das bactérias), mas esse mesmo nível de inativação pode ser obtido em tempos tão curtos como 1-2 horas se a temperatura atingir cerca de 50°C ([http://www.sodis.ch/methode/anwendung/ausbildungsmaterial/dokumente\\_material/sodisma\\_nual\\_2016.pdf](http://www.sodis.ch/methode/anwendung/ausbildungsmaterial/dokumente_material/sodisma_nual_2016.pdf)).

O material PET das garrafas utilizadas na metodologia SODIS absorve em torno de 75% da radiação UV-B e apenas 14% de UV-A. Então, dentre os componentes da radiação solar disponível, o UV-A e o infravermelho são as radiações responsáveis pelo maior sucesso do método SODIS para a desinfecção da água. Todavia, em horários e locais de muita insolação, a radiação UV-B, mais energética, pode ter uma contribuição importante na inativação biológica devido à sua maior energia (MCGUIGAN; CONROY; MOSLER; DU PREEZ *et al.*, 2012).

## **2.10 Regiões onde a metodologia SODIS tem maior eficiência**

Como o método depende de intensa radiação solar, existem regiões do planeta que são mais propícias que outras. Geralmente as regiões entre 15° e 35° de latitude Norte e Sul, as quais são semiáridas, com alta intensidade solar e pequena precipitação anual, recebem cerca de 3.000 horas de Sol por ano sendo mais propícias para utilização do método (centro-oeste, sudeste e sul do Brasil incluído). Em outras regiões onde a insolação é também muito boa para a aplicação do método são as situadas entre 0° e 15° de latitude norte e sul, que recebem cerca de 2.500 horas de Sol por ano (norte e nordeste do Brasil), como mostrado na figura 4.

Estimativas de 2015 apontam que 663 milhões de pessoas em todo o mundo ainda usam água não potável de poços e nascentes desprotegidas para fins de consumo (ORGANIZATION, 2015).



**Figura 4: Mapa de radiação solar global** mostra a quantidade de energia solar que chega à superfície da Terra em um plano horizontal. Este mapa é crucial para a avaliação do potencial de energia solar em diferentes regiões do mundo. **Áreas com alta irradiação solar:** regiões próximas ao equador, desertos e áreas com poucas nuvens têm maior incidência de radiação solar. **Áreas com baixa irradiação solar:** regiões polares, áreas com alta cobertura de nuvens ou nevoeiro têm menor incidência de radiação solar.

Fonte: SolarGIS © 2014 GeoModel Solar.

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SolarGIS-Solar-map-World-map-en.png>

## 2.11 Quantificação do efeito SODIS sobre diferentes agentes patogênicos

Evidentemente que o uso do SODIS leva à redução da incidência das principais doenças transmitidas pela contaminação da água, como diarreia infecciosa por *Escherichia sp.*; disenteria ou diarreia líquida por infecção com *Salmonella* ou *Shigella*; disenteria por infecção parasitária como *Giardia lamblia*, a giardíase); amebíase por *Entamoeba histolytica*;

ou cólera causada por *Vibrio cholerae*. As gastroenterites viróticas, produzidas principalmente por rotavirose e adenovirose também suas incidências reduzidas pelo tratamento SODIS.

A eficiência do processo SODIS já foi estabelecida de acordo com referências mostradas na tabela a seguir.

**Tabela 1:** Resultados da ação SODIS para a inativação das principais bactérias enteropatogênicas.

\* estimativas para intensidades de irradiação em países tropicais, principalmente no alto verão, isto é, para doses médias diárias de UV de 1MJ/m<sup>2</sup>.

Patógenos	Redução da viabilidade em 6h (em Ordens de Grandeza)*	Redução da concentração de patógenos (após 6h)	Tempo necessário para redução da viabilidade em 3 Ordens de Grandeza	Referências
<i>Escherichia coli</i>	2-5	99- 99,99%	1 dia	(MCGUIGAN; JOYCE; CONROY; GILLESPIE, 1998); (KEHOE; JOYCE; IBRAHIM; GILLESPIE <i>et al.</i> , 2001); (FUJIOKA; YONEYAMA, 2002); (BERNEY; WEILENMANN; EGLI, 2006); (BOYLE; SICHEL; FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ; ARIAS-QUIROZ <i>et al.</i> , 2008); (FISHER; KEENAN; NELSON; VOELKER, 2008); (FISHER; IRIARTE; NELSON, 2012); (KRUTI; SHILPA, 2012)
<i>Vibrio cholerae</i>	3-5	99,9– 99,999%	3h	(KEHOE; BARER; DEVLIN; MCGUIGAN, 2004); (BERNEY; WEILENMANN; EGLI, 2006)
<i>Salmonella spp.</i>	2-4	99- 99,99%	1 dia	(KEHOE; BARER; DEVLIN; MCGUIGAN, 2004); (BERNEY; WEILENMANN; EGLI, 2006); (BOSSHARD; BUCHELI; MEUR; EGLI, 2010)
<i>Shigella flexneri</i>	2-4	99- 99,99%	1 dia	(KEHOE; BARER; DEVLIN; MCGUIGAN, 2004); (BERNEY; WEILENMANN; EGLI, 2006); (BOSSHARD; BUCHELI; MEUR; EGLI, 2010)
<i>Shigella dysenteriae</i>	>4	>99,99%	< 1 dia	(KEHOE; BARER; DEVLIN; MCGUIGAN, 2004)
<i>Campylobacter jejuni</i>	>4	> 99,99%	< 1 dia	(BOYLE; SICHEL; FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ; ARIAS-QUIROZ <i>et al.</i> , 2008)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	>3	> 99,9%	1 dia	(BOYLE; SICHEL; FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ; ARIAS-QUIROZ <i>et al.</i> , 2008)
<i>Enterococcus faecalis</i>	2-5	99-99,999%	1 dia	(REED, 1997); (FUJIOKA; YONEYAMA, 2002)

## 2.12 Limitações do método

Evidentemente, como em todos os processos de descontaminação microbiana, existem limitações para a utilização do método SODIS, entre as quais podemos citar:

- 1 – O SODIS não melhora a qualidade química da água, entretanto este método é eficaz contra um grande gama de patógenos, embora alguns deles permaneçam resistentes à luz solar, comprometendo a eficiência máxima do método SODIS (BYRNE; FERNANDEZ-IBÁÑEZ; DUNLOP; ALROUSAN *et al.*, 2011);
- 2 – O SODIS funciona bem apenas quando a água tem baixa turvação;
- 3 – O SODIS depende de condições climáticas favoráveis. A sua eficiência atinge níveis satisfatórios após dois dias seguidos de exposição em dias nublados. Alguns autores relatam que, sob certas condições, com o tempo nublado, por exemplo, bactérias e vírus ainda são encontrados viáveis após a exposição à luz solar de um dia inteiro, sendo necessárias entre 10 a 48 horas para que ocorra a desinfecção adequada (SINTON; HALL; LYNCH; DAVIES-COLLEY, 2002); (RIJAL; FUJIOKA, 2004); (NOBLE; LEE; SCHIFF, 2004); (FISHER; KEENAN; NELSON; VOELKER, 2008).
- 4 Em dias chuvosos o SODIS simplesmente não funciona; e
- 5 – O SODIS é inadequado para tratar volumes de água maiores que os 2 litros padrão das garrafas PET.

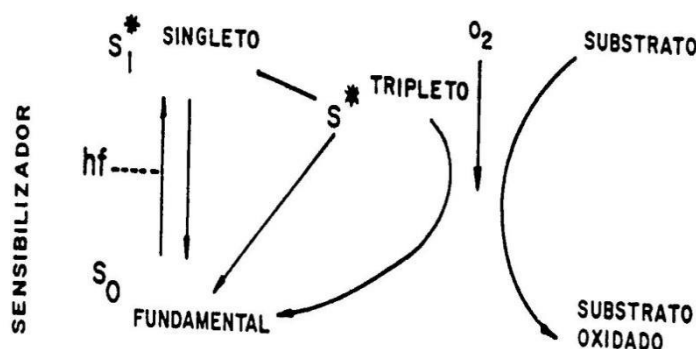
De acordo com Fisher e colaboradores (2012), aditivos químicos simples e de baixo custo foram analisados para aumentar as taxas de eficiência da desinfecção solar e pesquisas anteriores forneceram resultados sobre os mecanismos pelos quais esses aditivos aceleraram a inativação microbiana (EISENSTARK; BUZARD; HARTMAN, 1986); (FISHER; KEENAN; NELSON; VOELKER, 2008); (SICHEL; FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ; DE CARA; TELLO, 2009).

Em 2009 já se falava sobre a utilização de fotossensibilizadores nanoestruturados em um equipamento de baixo custo que utilizasse a energia solar para purificar a água em regiões carentes (ALROUSAN; DUNLOP; MCMURRAY; BYRNE, 2009). Além dos agentes físicos (UV e infravermelho) que operam a ação SODIS, a fotossensibilização é capaz de otimizar aproximadamente 15 vezes o potencial esterilizante da desinfecção solar quando não for possível atingir a irradiância e a temperatura adequadas.

### 2.13 Ação Fotodinâmica

A absorção da energia fotônica por uma determinada molécula e sua transferência para outra molécula, caracteriza o fenômeno de fotossensibilização. A ação fotodinâmica consiste em uma reação na qual um corante sensível à luz é ativado quando iluminado com o comprimento de onda adequado. No estado ativado, o fotossensibilizador pode reagir com outras moléculas à sua volta, especialmente o oxigênio, por transferência de energia, produzindo oxigênio singleto. Outras reações como transferências de prótons e elétrons também podem ocorrer, gerando outras ERO, como os radicais livres. Estas espécies formadas pela ação fotodinâmica são altamente reativas e capazes de oxidar as estruturas biológicas conduzindo à inativação desde moléculas até organismos (LEITÃO; LAGE; CABRAL-NETO, 2005).

O estado fundamental da molécula de oxigênio apresenta seu último par de elétrons em estado tripleto, ou seja, os elétrons estão com o mesmo sinal de spin nesses orbitais. Porém, quando as moléculas de  $O_2$  interagem com as moléculas ativadas do fotossensibilizador no estado tripleto, ocorre a inversão do spin de um dos elétrons, gerando oxigênio singleto, altamente reativo e oxidante. Na figura 5 está esquematizado o processo de oxidação de substratos pela ação fotodinâmica.



**Figura 5:** Representação esquemática da oxidação de um substrato pela ação fotodinâmica de um fotossensibilizador ativado. As moléculas do fotossensibilizador, inicialmente no estado fundamental singleto ( $S_0$ ), absorve um fóton ( $hf$ ) em um determinado comprimento de onda e passam para o estado singleto ( $S_1^*$  fotossensibilizador excitado) que, logo em seguida, passam para um estado tripleto mais longo ( $S^*$ ). As moléculas no estado tripleto ( $S^*$ ) transferem a energia para o oxigênio ( $O_2$ ); este, no estado excitado, reage com substratos celulares, oxidando-os (LEITÃO; LAGE; CABRAL-NETO, 2005).



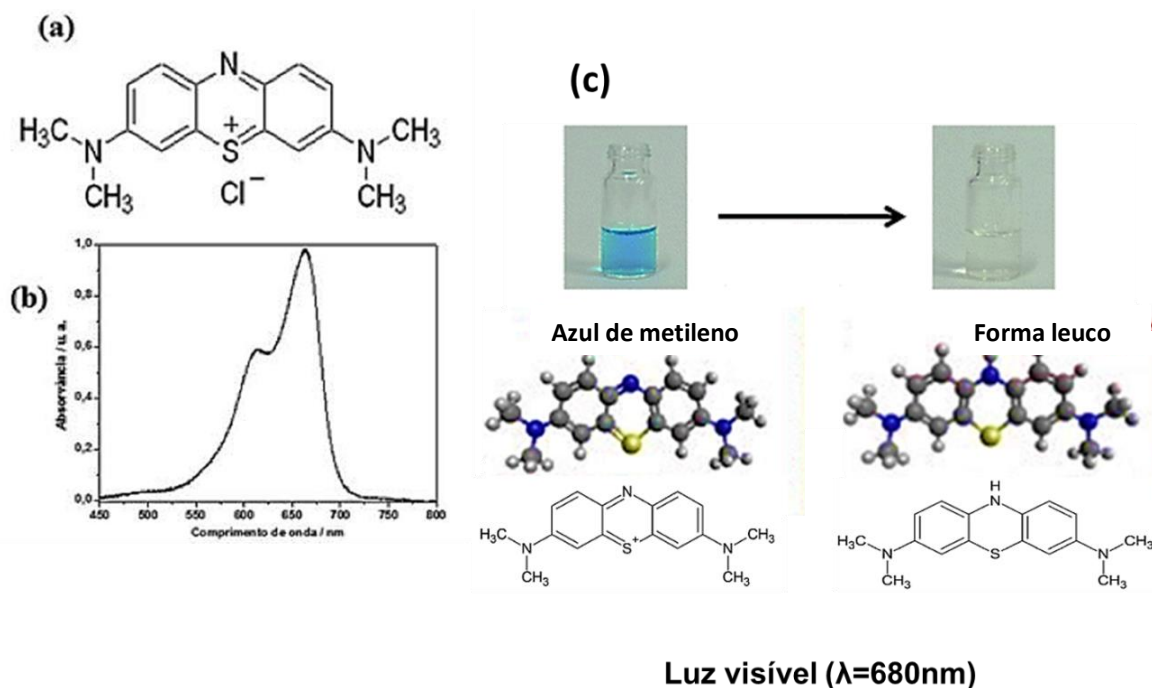
Importantes características para um fotossensibilizador é que seja uma molécula que não cause danos celulares tóxicos em organelas, microestruturas e tecidos quando no estado fundamental, mas que seja fotossensibilizadora quando excitada sob luz visível, um requisito essencial para o processo fotodinâmico. Corantes com carga positiva, principalmente das classes das fenotiazinas, apresentam características favoráveis para utilização como fotossensibilizadores. Também são relativamente lipofílicos, o que garante a sua permeação pelas membranas celulares (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006). O azul de metileno (AM) é um corante vital, aprovado pela *Federal Drug Administration* para o tratamento de metemoglobinemia. É amplamente utilizado *off-label* para Terapia Fotodinâmica, capaz de absorver luz visível entre 600-660 nm, portanto, um bom fotossensibilizador considerando a poderosa emissão solar na faixa vermelha. Quanto às suas propriedades físico-químicas, o AM é hidrofílico e isso determina muitos aspectos da sua farmacologia e da sua localização intracelular. Devido à presença de grupos dimetilamino nas posições 3 e 7, o AM está normalmente presente como um cátion em condições fisiológicas, ao contrário de outros corantes de fenotiazínico comercialmente disponíveis, como o azul de toluidina (WAINWRIGHT; PHOENIX; RICE; BURROW *et al.*, 1997). Seu eficiente poder de inativação microbiológica está precisamente associado ao aumento da produção de ERO, contribuindo para a inativação de micro-organismos (PERUSSI, 2007).

Em relação à saúde humana, alguns exemplos do uso do AM são:

- 1 – Antídoto no tratamento da metemoglobinemia (o sangue não consegue transportar oxigênio para as células) seja induzido (envenenamento por cianeto) ou hereditário (mutação na hemoglobina);
- 2 – Antisséptico no tratamento de cistite (inflamação da bexiga), desinfetante ocular e antisséptico tópico;
- 3 – Antiviral, contra hepatite C (HCV), AIDS (HIV), herpes, etc.;
- 4 – Antiparasitário, contra a malária (sozinho ou em combinação com outros medicamentos);
- 5 – Tratamento de disfunções cognitivas, como Doença de Alzheimer e outras;
- 6 – Diagnósticos auxiliar na localização de tumores para ressecção cirúrgica de mama, baço, etc. (os tumores ficam corados auxiliando a sua localização); e
- 7 – Inativação de vírus no plasma sanguíneo humano.

(TARDIVO; DEL GIGLIO; DE OLIVEIRA; GABRIELLI *et al.*, 2005); (PERUSSI, 2007); (GINIMUGE; JYOTHI, 2010); (SCHIRMER; ADLER; PICKHARDT; MANDELKOW, 2011).

Na figura 6 está representada a fórmula estrutural e o espectro de absorção do AM.



**Figura 6:** (a) Fórmula estrutural, (b) espectro de absorção do AM e (c) detalhando a formação do fotoproduto leuco (reduzido), após absorção de luz 680 nm pelo AM azul (oxidado). (<http://omLc.org/spectra/mb/>).

#### 2.14 Inativação bacteriana em amostras de água estéril, com diferentes concentrações de AM

A avaliação inicial do uso do AM como potencializador do SODIS foi realizada por CARDOSO-RURR; DE PAIVA; PAULINO-LIMA; DE ALENCAR *et al.* (2019). Diferentes concentrações de AM (50, 100 ou 200 ng/ml) foram aplicadas em amostras de água estéril contaminada com concentrações determinadas de *E. coli* e expostas à luz solar intensa no período entre 10h30 e 13h30 (Rio de Janeiro), sendo a inativação bacteriana verificada após. Ficou demonstrado que uma concentração do AM tão baixa quanto 100 ng/ml foi capaz de inativar 99,9% de toda a população de *E. coli* em apenas 30 min, muito mais eficiente na descontaminação de amostras de água do que o tratamento SODIS tradicional que só produziu a mesma % de inativação após 3 horas de exposição. Desta forma, escolhemos esta concentração do fotossensibilizador para os estudos subsequentes que compuseram o corpo desta tese.

### 2.15 Emprego farmacológico do AM

O AM é um fármaco seguro quando utilizado em doses terapêuticas de até 2 mg/kg sendo 75% excretado pela urina (GINIMUGE; JYOTHI, 2010). Não existem dados suficientes na literatura para avaliar com precisão a dose mínima tóxica ou letal desse composto. Em adultos, as doses orais de 300 mg por dia têm sido usadas no tratamento de metemoglobinemia, em conjunto com o ácido ascórbico (<http://toxnet.nlm.nih.gov>), mas doses superiores a 2 mg/kg podem provocar sinais e sintomas de toxicidade..

A ingestão diária aceitável (TDI) é uma estimativa da quantidade de uma substância que pode ser consumida com segurança durante todos os dias em alimentos e em água, medido em mg ou µg/kg de peso corporal, por toda a vida (WHO, 2011).

O valor de referência (GV) para qualidade da água é, então, derivado da TDI expresso na equação apresentada a seguir, onde:

GV = Valor de referência (mg/kg/dia),

BW = Peso corporal (kg),

P = Fração de TDI em outros alimentos (0,8)

C = Consumo diário de água (L)

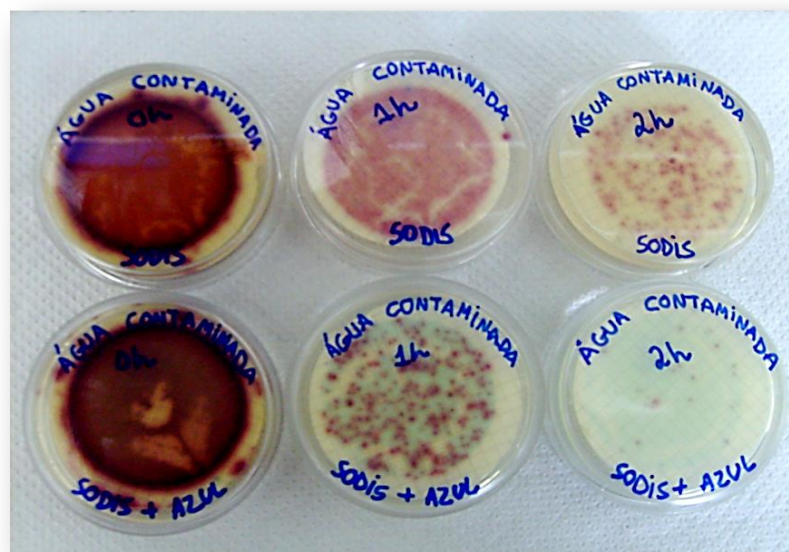
$$GV = \frac{TDI \times BW \times P}{C} \quad \Rightarrow \quad GV = \frac{300 \times 60 \times 0,8}{2} \quad \mathbf{GV = 7.200 \text{ mg/kg/dia}}$$

Supondo que uma pessoa beba 2 litros de água tratada com SODIS por dia, com a concentração de 100 ng/ml de AM adicionada na água, ela vai ingerir diariamente 4,8 mg/kg/dia de AM. Desta forma, a concentração diária utilizada no método AM/SODIS é 1.500 vezes menor do que a utilizada nos tratamentos de metemoglobinemia para uma pessoa de aproximadamente 60 kg. Cronicamente falando, essas quantidades mínimas devem ser excretadas por uma pessoa que ingira água AM/SODIS todos os dias, de forma que mesmo algum efeito residual de AM não excretado ficará muito abaixo do limite de toxicidade.

### 2.16 Ação fotossensibilizadora e a escolha do AM para a associação com o processo SODIS

O termo fotocatalise refere-se ao aumento da velocidade de uma fotoreativação pela ação de um catalisador. MATSUNAGA; TOMODA; NAKAJIMA e WAKE (1985) propuseram os primeiros catalisadores foto-eletrquímicos de  $TiO_2$  em associação com o processo SODIS, responsáveis pela intensificação da inativação de células microbianas. Em 2009 foi descrita a utilização do fotocatalisador dióxido de titânio em um equipamento utilizando a energia solar com o objetivo de purificar água em regiões carentes (ALROUSAN; DUNLOP; MCMURRAY; BYRNE, 2009). Apesar de incrementarem a eficiência do processo SODIS padrão, o composto é tóxico para o organismo humano, sendo requerido que o material adicionado à água fosse totalmente eliminado da água para consumo humano após o tratamento.

Programamos a fotocatalise com a adição de um corante não tóxico para potencializar a ação letal da radiação solar (figura 7). O fotocatalisador amplia a absorção da radiação solar, fazendo com que o processo SODIS tenha a mesma eficácia esterilizante mesmo com menores quantidades de radiação solar.



**Figura 7:** Demonstração do aumento da inativação microbiológica em amostras de água estéril, contaminadas de forma controlada com o indicador bacteriológico de coliformes fecais (*E. coli* K12A15), expostas aos tratamentos SODIS e AM/SODIS, irradiadas na LSS (luz solar simulada) e analisadas pela técnica da membrana filtrante. Inativação praticamente total de 1000 coliformes fecais por ml após apenas 2h de tratamento, em relação ao SODIS padrão (CARDOSO-RURR, 2015).

Esses resultados foram relatados em 2015 no trabalho de Mestrado e recentemente em artigo publicado (CARDOSO-RURR; DE PAIVA; PAULINO-LIMA; DE ALENCAR *et al.*,

2019), sustentando que um tratamento inovador como o AM/SODIS causou um efeito sinérgico mais eficiente ao inativar micro-organismos patogênicos. A baixa concentração do AM 50 ng/ml causou redução drástica no tempo necessário para a desinfecção regular do SODIS (6 h contra 3 h com o AM/SODIS), eliminando efetivamente bactérias e vírus em água pura artificialmente contaminada. Com relação à inicialmente cor azulada apresentada pela água, sabemos que o AM sofre decomposição pela radiação solar, fazendo com que a água fique incolor (forma leuco) ao longo do processo AM/SODIS (CARDOSO-RURR; DE PAIVA; PAULINO-LIMA; DE ALENCAR *et al.*, 2019), evitando qualquer rejeição para o seu consumo humano.

O AM faz parte de uma categoria especial de agentes fotossensibilizadores porque são corantes vitais. Estes exercem sua ação nas partes vivas das células sem alterar seu metabolismo e destacando suas estruturas. Como fotossensibilizadores, são capazes de intensificar a produção de ERO ao absorverem um fóton de luz de comprimento de onda na faixa de 660 nm (luz visível vermelha), são ativados e reagem com moléculas de oxigênio, por transferência de energia, elétrons ou prótons. Esse processo gera radicais livres e oxigênio singleto, ocasionando a destruição das células. O AM é decomposto pela radiação solar, causando alteração no aspecto da água, que do tom azulado característico, passa ao incolor (LEUCO), para o consumo (PERUSSI, 2012).

No conjunto, tais atributos foram previstos como eficazes para usar o AM como um agente para melhorar o protocolo regular do SODIS. É um método potencialmente aplicável à desinfecção de água proveniente de locais de condições sub-ótimas de temperatura e radiação solar e também durante o inverno (CARDOSO-RURR; DE PAIVA; PAULINO-LIMA; DE ALENCAR *et al.*, 2019).

A motivação para o estudo sobre a adição do AM como fotossensibilizador no processo SODIS deriva do seu grande potencial para o tratamento de água nos países em desenvolvimento. Todavia, em períodos nublados ou inverniais, o processo pode exigir 48 horas ou mais para a desinfecção adequada da água. Assim, estudos anteriores mostraram que o uso de um aditivo de baixo custo, como o AM, foi capaz de acelerar o processo SODIS, o que o torna de imensa importância para a aplicação em comunidades carentes de água potável, que dependem do Sol para desinfecção da água, durante o ano inteiro (CARDOSO-RURR; DE PAIVA; PAULINO-LIMA; DE ALENCAR *et al.*, 2019).

O desaparecimento da cor azul, ou seja, a transformação do AM na sua forma leuco, ocorre porque o AM sofre reações de redução após excitação eletrônica quando iluminado no comprimento de 660 nm, gerando um radical semi reduzido.

Mas seria possível a aplicação do processo AM/SODIS para consumo humano? Neste contexto, estudamos sobre a toxicidade da forma leuco do AM e possível aplicação do processo AM/SODIS.

### 3 JUSTIFICATIVA

A água contaminada por microrganismos é um veículo importante de enfermidades nos países em desenvolvimento, principalmente em áreas rurais e em comunidades sob fragilidade socioeconômica (MINTZ; BARTRAM; LOCHERY; WEGELIN, 2001) e (CASLAKE; CONNOLLY; MENON; DUNCANSON *et al.*, 2004). O acesso à água potável é restrito nessas regiões, por diversos fatores, levando ao consumo de água diretamente de fontes não tratadas.

O método SODIS é uma ferramenta com grande aplicação para descontaminação de água, de baixo custo, de fácil realização e já bastante utilizada em diversos países do mundo. Entretanto, apresenta duas limitações importantes: em dias nublados ou inverniais é necessário um tempo maior de exposição à luz solar para desinfecção adequada, e a resistência de microrganismos a radiação (FISHER; KEENAN; NELSON; VOELKER, 2008).

Em uma perspectiva global, o processo do AM/SODIS deve impactar algumas centenas de milhões de pessoas que vivem em áreas de baixa insolação. O método AM/SODIS é potencialmente aplicável como um processo de desinfecção em locais de boas condições de temperatura e radiação solar durante diferentes estações do ano, aumentando a eficácia da inativação de micro-organismos mais resistentes.

Um mapa gráfico unindo áreas de baixa irradiância com a densidade populacional estimou que cerca de 1,5 bilhão de pessoas vivem em condições desfavoráveis ao método regular do SODIS (figura 8). Estas populações seriam especialmente beneficiadas pelo processo melhorado do AM/SODIS (CARDOSO-RURR; DE PAIVA; PAULINO-LIMA; DE ALENCAR *et al.*, 2019).



**Figura 8:** Regiões do mundo com baixa irradiação solar (áreas bege) (soma diária  $<4,4 \text{ kWh/m}^2$ ), enquanto áreas vermelhas representam áreas com radiação solar relevante (soma diária  $\geq 4,4 \text{ kWh/m}^2$ ). O número de pessoas que vivem dentro da área bege (áreas mal irradiadas) foi estimado em cerca de 3 bilhões de pessoas usando o *software Population Explore*<sup>TM</sup>. Considerando que o norte dos EUA, o Canadá e a Europa contêm amplo acesso à água potável, isso significa que quase metade desse contingente, ou seja, ~ 1,5 bilhão de pessoas, se beneficiaria de um processo como o AM/SODIS em todo o mundo (CARDOSO-RURR; DE PAIVA; PAULINO-LIMA; DE ALENCAR *et al.*, 2019).

A partir do que foi exposto acima, foi desenhado um estudo do efeito fotocatalisador do AM associado ao SODIS como um processo mais eficiente para descontaminação microbiológica da água em nível caseiro, de baixo custo e potencialmente de mínima toxicidade. Desta forma, a utilização do processo AM/SODIS para a inativação de microrganismos em geral, resistentes ou insensíveis ao SODIS convencional seria capaz de prover água segura a populações brasileiras sem oferta de água tratada e com baixa insolação.

Estudos em modelos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* foram realizados para certificar o AM/SODIS como uma opção eficaz e segura para a descontaminação microbiológica de água a nível doméstico em regiões sem acesso conveniente à água tratada. Especialmente os ensaios toxicológicos foram parametrizados para determinar se os níveis de ingestão das substâncias presentes na água não causaram danos ao ser humano.

#### 4 OBJETIVO GERAL

Investigar a segurança e a toxicidade (hepática e renal) da administração oral da água tratada pelo processo AM/SODIS na sua forma normal (azul) e reduzida (leuco) por meio de análises *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

#### 5 ESTRUTURA DA TESE

Para uma melhor compreensão da aplicação do processo AM/SODIS para consumo humano, a segurança do método foi explorada neste estudo e o corpo de resultados da presente tese foi dividido em três capítulos. Além disso, são apresentadas introdução, justificativa, objetivo geral e específico (em cada capítulo), discussão, conclusões e perspectivas e referências.

O primeiro capítulo um estudo preditivo da mutagênese para os compostos químicos AM/azul e AM/leuco foi realizado *in silico*.

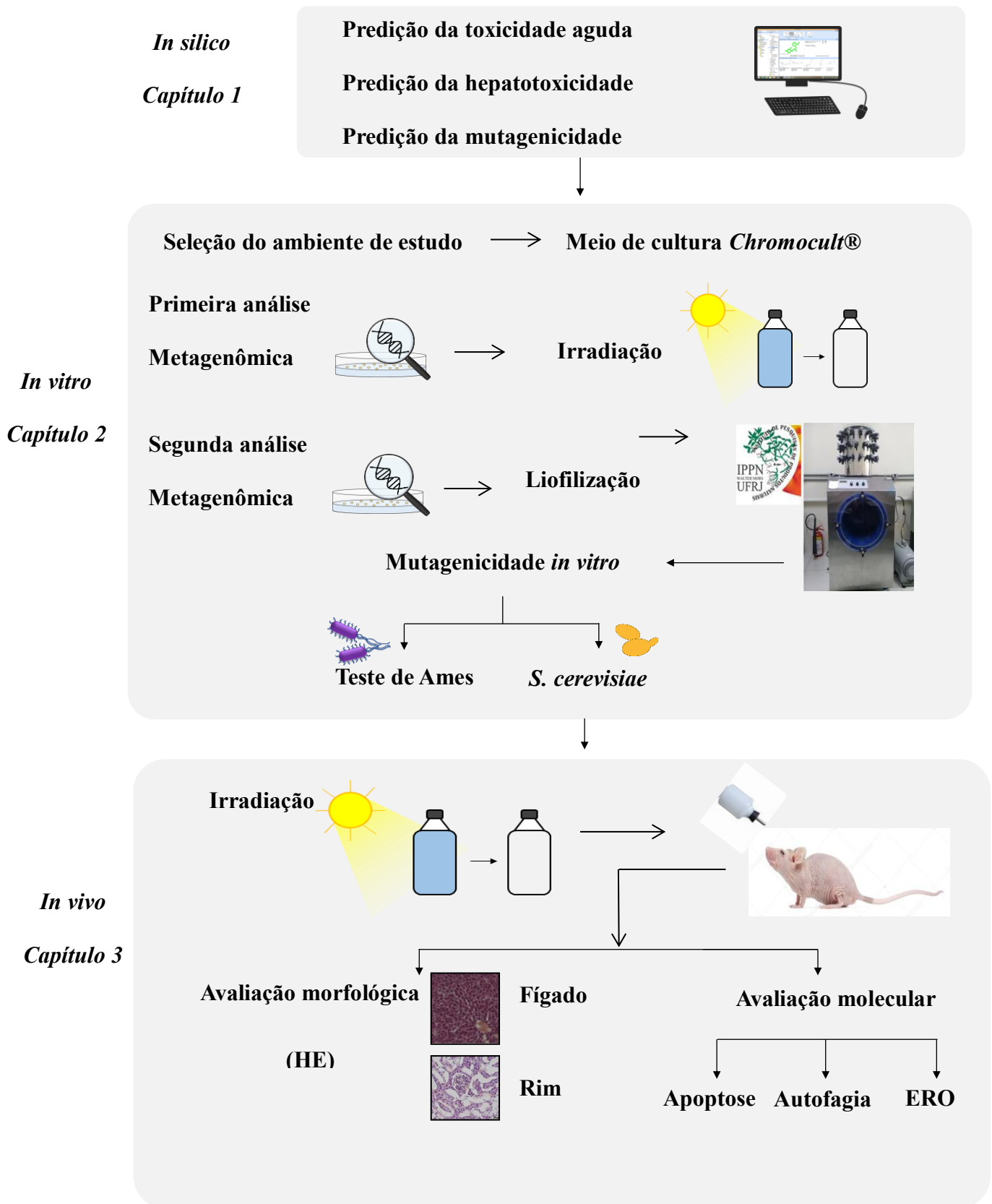
Enquanto isso, o segundo capítulo analisou a composição microbiana de amostras de água provenientes de poço artesiano para consumo humano em zona urbana do RJ, através de análise por metagenoma, antes e depois dos tratamentos SODIS e AM/SODIS além dos parâmetros físicos como a dosimetria das radiações UV e temperaturas.

Na sequência, foram descritas as análises de mutagenicidade e citotoxicidade *in vitro* com a bactéria *S. typhimurium* através do Teste de Ames, sendo este considerado o ensaio padrão ouro empregado para monitorar os níveis de dano celular induzidos pelos compostos presentes na água (ISO 11350, 2012). Outro microrganismo utilizado nesta etapa do trabalho foi a levedura *S. cerevisiae* como modelo eucariótico de estudos de mutagenicidade e citotoxicidade. Este modelo apresenta similaridade de suas funções de reparo de DNA com os sistemas de reparo presentes em humanos (GIRARD; BOITEUX, 1997).

No terceiro capítulo foram relatados os resultados das análises *in vivo* obtidas com camundongos *hairless* como modelo de estudo em carcinogenicidade. Inicialmente foi analisada a morfologia dos tecidos (fígado e rim) através de microscopia óptica de rotina utilizando a técnica de coloração por hematoxilina em todos os animais dos grupos estudados, além das análises moleculares focalizadas em marcadores associados à apoptose, autofagia e estresse oxidativo. Essas análises foram realizadas através da quantificação das expressões de caspase-3, beclina-1, OKL-38 no rim e fígado de grupos de animais não tratados ou tratados com AM/SODIS. Como controle positivo e negativo foi usado pele em estado cicatricial e toda metodologia utilizada está representada na figura 9.



5.1 Figura 9: Desenho experimental do estudo



## **CAPÍTULO 1**

### **TESTE *IN SILICO***



## 6 CAPÍTULO 1

### 6.1 INTRODUÇÃO AO ESTUDO *in silico*

A toxicologia *in silico* é utilizada para fornecer informações preliminares, adicionais e/ou complementares na investigação toxicológica, aumentando a confiabilidade de análises *in vitro*, reduzindo a necessidade de ensaios *in vivo* e, em último nível, contribuindo para uma tomada de decisão preliminar em uma análise de risco (MYATT; AHLBERG; AKAHORI; ALLEN *et al.*, 2018)).

Os métodos de toxicologia *in silico* são fundamentados em modelos matemáticos e estatísticos, os quais são construídos com base em dados experimentais, relações estrutura-atividade e conhecimento científico, sendo implementados em softwares especializados. Cada modelo *in silico* geralmente é projetado para prever um parâmetro específico dentro do campo da toxicologia preditiva. Existem duas principais abordagens de predição: (1) métodos estatísticos (baseados em QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*)), que empregam modelos matemáticos derivados de descritores moleculares, como fragmentos estruturais e propriedades físico-químicas, para estabelecer a relação entre a estrutura e a atividade, e (2) métodos baseados em alertas estruturais (baseados em regras), que se baseiam na identificação de subestruturas moleculares associadas ao potencial toxicológico investigado. À medida que novas evidências experimentais são divulgadas na literatura e as relações estrutura-atividade são mais bem caracterizadas, esses modelos são atualizados, o que amplia sua aplicabilidade, robustez e confiabilidade preditiva (MYATT; AHLBERG; AKAHORI; ALLEN *et al.*, 2018).

Os modelos *in silico* para genotoxicidade foram desenvolvidos a partir de dados experimentais provenientes de diferentes mecanismos de toxicidade genética e seus respectivos métodos de detecção *in vivo* e *in vitro* (HASSELGREN; AHLBERG; AKAHORI; AMBERG *et al.*, 2019). Nesse sentido, um dos modelos de predição de genotoxicidade *in silico* melhor estabelecidos são os baseados na mutagenicidade bacteriana, a partir de dados gerados pelo Teste de Ames (BENIGNI; LAURA BATTISTELLI; BOSSA; GIULIANI *et al.*, 2019).

O ADMET Predictor™ (*Simulations Plus, Inc., Lancaster, CA, EUA*) é um programa computacional desenvolvido para estimar certas propriedades ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Eliminação e Toxicidade) de produtos químicos, em modelos qualitativos e quantitativos, a partir de suas estruturas moleculares. Portanto, a avaliação

ADMET pode ser útil em modelos *in silico* para avaliação de toxicidade (MODI; HUGHES; GARROW; WHITE, 2012).

A pesquisa que utiliza métodos *in silico* visa prever ou compreender certas propriedades ou atividades moleculares para investigação do processo toxicológico dos xenobióticos (GAO; CHEN; CAI; XU, 2017), (WANG; YANG; WU; WANG *et al.*, 2018), (SAXENA; SHARMA; SIDDIQUI; KUMAR, 2019), (MIAO; XIA; CHEN; HUANG *et al.*, 2019), (SINGH; DIVAKARAN; KONDA; KRISTAM, 2020), (DHAR; FALCONE; CHEN; HAMZEHLOO *et al.*, 2020), por intermédio de ferramentas computacionais. Além disso, o estudo da toxicologia *in silico* utiliza tais ferramentas para organizar, analisar, modelar, simular, visualizar ou prever a toxicidade de produtos químicos (RAIES; BAJIC, 2016). Assim, a utilização de abordagens computacionais representa uma excelente estratégia inicial na avaliação da segurança de xenobióticos.

A atividade tóxica e mutagênica das formas reduzidas (azul) e oxidada (leuco) do AM foi testada por métodos computacionais para superar a ausência de evidências robustas na literatura sobre as propriedades da forma leuco, justamente a que estará presente na água de consumo humano.

## 6.2 OBJETIVO ESPECÍFICO DO CAPÍTULO 1

Gerar predições toxicológicas *in silico* da mutagenicidade e toxicidade aguda do AM nas suas formas oxidada (azul) e reduzida (leuco) a partir do *software* ADMET Predictor™.

## 6.3 MATERIAL E METODOLOGIA *in silico*

As análises *in silico* foram conduzidas no *software* ADMET Predictor™ versão 9.5 (Simulations Plus, Inc., Lancaster, CA, EUA). A mutagenicidade foi avaliada utilizando o modelo *in silico* de mutagenicidade bacteriana, o qual se baseou em quatro cepas individuais de *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*): TA 97, TA 98, TA 100 e TA 102 com ou sem ativação metabólica por extrato hepático de rato S9, de acordo com a literatura (MARON; AMES, 1983). O modelo de toxicidade aguda em ratos baseia-se na quantidade de produto químico administrado por via oral em mg/kg de peso corporal que produziu letalidade em 50% dos animais/organismos de teste dentro de 24 h de exposição em cada estudo respectivo, independentemente do modo de ação (ADMET Predictor Manual 9.5).

As estruturas moleculares dos dois compostos foram inseridas no programa e, então, geradas as predições a partir do banco de dados para mutagenicidade baseado em Teste de Ames e toxicidade baseada na toxicidade aguda em ratos.

Os resultados expressos em porcentagem (%) referem-se à confiabilidade da predição fornecida pelo programa, a partir do domínio de aplicabilidade do banco de dados para a molécula em investigação.

## 6.4 RESULTADOS *in silico*

### 6.4.1 Estudos sobre a toxicidade da forma leuco do AM *in silico*

#### 1. Toxicidade aguda

**DL50 para toxicidade aguda letal em ratos:** Este parâmetro indica a dose letal média (DL50) necessária para causar morte em 50% dos ratos expostos oralmente ao AM oxidado (azul) e AM reduzido (leuco). Os valores foram preditos como 773,36 mg/kg e 823,43 mg/kg, respectivamente. Isso sugere que o AM reduzido tem uma DL50 ligeiramente maior, indicando uma toxicidade aguda ligeiramente menor em comparação com o AM oxidado.

**TD50 - dose para induzir tumores:** Esses valores indicam a dose administrada oralmente necessária para induzir tumores em 50% dos ratos (TD50) e camundongos ao longo de suas vidas. Os valores foram respectivamente preditos como 3,67 mg/kg/dia do AM oxidado (azul) , 8,56 mg/kg/dia do AM reduzido (leuco) e 9,46 mg/kg/dia do AM oxidado (azul), 11,17 mg/kg/dia do AM reduzido (leuco). Assim, o AM reduzido também mostrou uma dose ligeiramente maior para induzir tumores em comparação com o AM oxidado, o que indica um potencial carcinogênico relativamente menor.

#### 2. Mutagenicidade:

Os resultados da mutagenicidade são apresentados para diferentes cepas de *S. typhimurium* usadas no Teste de Ames:

**TOX\_MUT\_98 (*frameshift* - deleção de um par G:C):** O AM oxidado e reduzido mostraram resultados negativos para mutagenicidade, com percentuais de confiabilidade de predição de 73% e 87%, respectivamente. Isso significa que não houve evidência de indução de mutações do tipo *frameshift* (deleção ou inserção de pares de bases) na cepa TA 98 sem ativação metabólica.

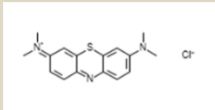
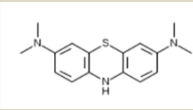
**TOX\_MUT\_100 (substituição bases nitrogenadas - G:C para A:T):** Ambas as formas do AM também apresentaram resultados negativos para mutagenicidade nesta categoria, com percentuais de 74% e 84% para o AM oxidado e reduzido, respectivamente. Isso indica ausência de indução de mutações do tipo substituição de bases nitrogenadas na cepa TA 100.

**TOX\_MUT\_102 (substituição das bases nitrogenadas - A:T para G:C):** O AM oxidado mostrou resultado positivo para mutagenicidade na cepa TA 102, com 63% de confiabilidade, enquanto o AM reduzido foi negativo com 98% de confiabilidade. Isso sugere que a forma oxidada do AM tem potencial mutagênico para induzir mutações específicas na cepa TA 102.

**TOX\_MUT\_m98, TOX\_MUT\_m100, TOX\_MUT\_m102 (com ativação metabólica):** Quando o AM foi avaliado com ativação metabólica simulada (representada pelo 'm'), os resultados foram mistos. Ambas as formas do AM mostraram potencial mutagênico em algumas cepas (TA 98 e TA 100), especialmente o AM oxidado, que foi positivo para a maioria das cepas com ativação metabólica.

Os resultados *in silico* indicam que o AM reduzido (forma leuco) geralmente apresenta menor toxicidade aguda e menor potencial mutagênico em comparação com o AM oxidado (forma azul). A ativação metabólica pode alterar esses resultados, aumentando o potencial mutagênico especialmente para o AM oxidado. Já a forma leuco do AM demonstrou resultados predominantemente negativos para mutagenicidade, especialmente sem ativação metabólica, sugerindo um perfil menos preocupante para a segurança toxicológica, particularmente em contextos de consumo humano conforme apresentado na tabela 2.

**Tabela 2:** Avaliação qualitativa *in silico* da toxicidade aguda do AM oxidado e reduzido (leuco) em ratos, e da mutagenicidade com e sem ativação metabólica a partir da fração microsomal de fígado de ratos em *S. typhimurium* (Teste de Ames).

Ensaio <i>in silico</i>	Parâmetro	AM oxidado (azul) 	AM reduzido (leuco) 
<b>Toxicidade aguda</b>	Dose máxima terapêutica recomendada (mg/kg/dia)	Acima 3,1 (96%)	Acima 3,1 (96%)
	DL50 para toxicidade aguda letal em ratos, todos os mecanismos (mg/kg)	773,36	823,43
	TD 50 é a dose oral de um composto necessário para induzir tumores em 50% de uma população de ratos após exposição ao longo de uma vida normal (mg/kg/dia)	3,67	8,56
	TD 50 é a dose oral de um composto necessário para induzir tumores em 50% de uma população de camundongos após exposição ao longo de uma vida normal (mg/kg/dia)	9,46	11,17
<b>Mutagenicidade</b>	TOX_MUT_98 ( <i>frameshift</i> – deleção de um par G:C)	Negativo (73%)	Negativo (87%)
	TOX_MUT_100 (substituição das bases nitrogenadas - G:C para A:T)	Negativo (74%)	Negativo (84%)
	TOX_MUT_102 (substituição das bases nitrogenadas - A:T para G:C)	Positivo (63%)	Negativo (98%)
	<b>TOX_MUT_m98</b>	<b>Positivo (60%)</b>	<b>Positivo (88%)</b>
	<b>TOX_MUT_m100</b>	<b>Positivo (59%)</b>	<b>Negativo (61%)</b>
	<b>TOX_MUT_m102</b>	<b>Negativo (86%)</b>	<b>Negativo (93%)</b>

OBS.: o **m** na identificação das cepas significa a presença de ativação metabólica. A mutação do tipo “*frameshift*” reverte a mutação pré-existente adicionando ou deletando 1 par de bases G:C, reiniciando a síntese da enzima participante da biossíntese de histidina, ou por substituição das bases nitrogenadas G:C da trinca – GGG-, que codifica o aminoácido prolina, pelo par de bases AT, restituindo a trinca original –GAG- que codifica a leucina (transição e transversão) (AMES; MCCANN; YAMASAKI, 1975).

## 6.5 DISCUSSÃO *in silico*

Existem duas maneiras da molécula do AM se transformar na forma reduzida leuco (incolor): metabolizado pelo fígado ou irradiado com luz solar na região vermelha da radiação visível (GAUDETTE; LODGE, 2005).

Neste contexto, para a utilização do AM/SODIS foi necessário avaliar a segurança dessa técnica na descontaminação da água, e os ensaios toxicológicos foram feitos para determinar os níveis de ingestão das substâncias que não causem dano ao organismo humano. Para isso, a determinação desse nível deve ser feita analisando-se diversos parâmetros.

Na toxicidade aguda foi medida a capacidade de um composto para matar 50% dos animais / organismos de teste dentro de 24 h de exposição (DL50), e expressa os riscos relativos associados à exposição aos produtos de degradação do mesmo. As duas moléculas estudadas, AM oxidado (azul) e AM reduzido (leuco), apresentaram valores preditos classificados como ligeiramente tóxicos de acordo com a escala de classificação de toxicidade de HODGE e STERNER (1949) conforme a tabela 3, indicando a baixa toxicidade aguda do corante em ambas as formas.

Uma vez que a classificação da toxicidade aguda pelo AM reduzido (azul) se enquadre como ligeiramente tóxico na predição *in silico* e na classificação de Hodge e Sterner, há que se ressaltar que a forma oxidada (leuco) mostrou-se menos tóxica.

**Tabela 3:** Escala de toxicidade Hodge e Sterner.

Índice ou classe de toxicidade	Termo comumente usado	Parâmetro toxicológico (DL50) (ratos via oral)
1	Extremamente Tóxico	Menos de 1 mg/kg
2	Altamente Tóxico	1 - 50 mg/kg
3	Moderadamente Tóxico	50 - 500 mg/kg
4	<b>Ligeiramente Tóxico</b>	500 - 5000 mg/kg
5	Praticamente não tóxico	5.000 - 15.000 mg/kg

HODGE, H.C. e STERNER, J.H. Tabulation of Toxicity Classes, **American Industrial Hygiene Association Quarterly**, vol.10, ed.4, p: 93-96, 1949. DOI: 10.1080/00968204909344159. Adaptada pelo autor em outubro/2023.

No teste de Ames, as mutações de deslocamento de quadro (*frameshift*) ou substituições de pares de bases nitrogenadas, podem ser detectadas pela exposição das cepas dependentes de histidina de *S. typhimurium* a um composto de teste. Quando essas cepas são expostas a uma substância mutagênica, mutações reversas que restauram a capacidade funcional da bactéria de sintetizar histidina permitem o crescimento de colônias bacterianas



em um meio deficiente em histidina ("revertentes"). Como muitos produtos químicos interagem com o material genético apenas após a ativação metabólica por sistemas enzimáticos não disponíveis na célula bacteriana, os compostos de teste são, em muitos casos, examinados adicionalmente na presença de um sistema metabólico de mamíferos, que contém microsomas hepáticos (com mistura de S9) (AMES; MCCANN; YAMASAKI, 1975).

O Teste de Ames compõe uma parte substancial da bateria de testes padrão para a avaliação de mutagenicidade, que deve ser realizado para cada registro de novos medicamentos, sendo rotineiramente conduzido por muitos laboratórios no mundo por ser considerado padrão ouro em avaliação de efeitos mutagênicos de compostos. Este ensaio *in vitro* é uma ferramenta fundamental para avaliação de mutagenicidade devido ao seu histórico consolidado, robustez e protocolo padrão bem estabelecido. As ferramentas disponíveis *in silico* foram desenvolvidas nos últimos anos em um esforço para prever a mutagenicidade de compostos químicos utilizando resultados produzidos pelo Teste de Ames (HILLEBRECHT; MUSTER; BRIGO; KANSY *et al.*, 2011).

Neste contexto, a mutagenicidade foi investigada para as cepas de *S. typhimurium* TA98, TA100 e TA102, com e sem ativação metabólica (microsomal).

As cepas bacterianas de *S. typhimurium* TA98 e TA100 detectam mutágenos que induzem mutações por deslocamento do quadro de leitura ("*frameshift mutations*") e por substituição de base nitrogenada, respectivamente nos sítios GC (guanina-citosina) dos genes-alvo relacionados a síntese de histidina. A mutação hisD 3052 na cepa TA98 resulta de uma deleção que causa um deslocamento no quadro de leitura, provavelmente causada pela perda de um par de bases G-C em uma sequência repetitiva próxima –C-G-C-G-C-G-C-G-. Esta região específica, propensa a erros de pareamento, é o *hot spot* sensível ao carcinógeno na mutação 3052. Os carcinógenos policíclicos, como o 2-nitroso-G-C-fluoreno, têm a capacidade de reverter essa mutação deletando um par de bases –C-G- da sequência de DNA –C-G-C-G-C-G-C-G-/G-C-G-C-G-C-G-C (ISONO; YOURNO, 1974).

Várias moléculas capazes de adicionar uma base podem induzir a reversão dessa mutação para o estado selvagem. Agentes intercalantes não carcinogênicos exibem uma gama mais ampla de especificidade mutagênica. A reversão com esses mutagênicos ocorre principalmente por dois mecanismos: um é semelhante ao observado com carcinógenos policíclicos, enquanto o outro envolve adições de +1 em uma terceira região de DNA próxima, mas distinta do local 3052 (MARON; AMES, 1983).

Portanto, mesmo sendo considerado um composto de baixa toxicidade para humanos, o composto AM metabolizado (forma leuco) indicou ter tido ação mutagênica na cepa de *S.*

*typhimurium* mTA98. Entretanto não podemos prever se estes revertentes foram realmente induzidos pelo composto AM metabolizado (forma leuco) ou são espontâneos, visto que esta cepa aparentemente responde inespecificamente a qualquer forma de estresse já que as verdadeiras reversões para o tipo selvagem são eventos raros ou não ocorrem em 3052 (ISONO; YOURNO, 1974), (MARON; AMES, 1983).

As cepas de *S. typhimurium* TA98 e a TA100 são complementares, na medida em que permitem a caracterização de diferentes tipos de mutações e também têm sido as mais utilizadas para avaliar o potencial mutagênico de águas superficiais (OHE; WATANABE; WAKABAYASHI, 2004).

Por outro lado, a cepa TA102 detecta mutações no sítio AT (adenina-timina). A literatura mostra que vários agentes carcinogênicos genotóxicos são detectados pela cepa TA102, o que justifica a sua inclusão em um conjunto de cepas-teste (LEVIN; HOLLSTEIN; CHRISTMAN; SCHWIERS *et al.*, 1982).

O resultado positivo com a cepa TA102 prediz que o composto usado pode induzir danos oxidativos (ou seja, produção de radicais livres) ou ser um agente de ligação cruzada de DNA. A cepa TA102 é especialmente sensível para detectar danos por ligação cruzada de DNA porque possui um mecanismo de reparo por excisão de DNA intacto (selvagem), que é necessário para o reparo de tais danos (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Nesta cepa, a mutação está contida no gene plasmidial *hisG*, e, sendo assim, o sítio crítico da reversão é o par de base AT, o que a diferencia das demais cepas que são revertidas nos alvos GC.

## 6.6 CONCLUSÃO DAS ANÁLISES *in silico*

Um composto é considerado positivo para o teste de Ames se ele resultar em um aumento significativo no crescimento de colônias revertentes em pelo menos uma das geralmente cinco cepas testadas, independentemente da presença ou ausência da mistura de S9. Por outro lado, um composto é classificado como negativo se não causar um aumento significativo no crescimento de colônias revertentes em nenhuma das cepas testadas, tanto na presença quanto na ausência da mistura de S9.

Essa definição sugere que compostos inicialmente classificados como negativos para o teste de Ames no conjunto de dados de referência, quando testados apenas em cepas específicas, podem eventualmente revelar indução de mutações reversas ao serem avaliados em cepas adicionais. Como resultado, os compostos classificados como positivos para o teste

de Ames no conjunto de dados de referência são mais precisamente definidos, pois essa classificação não se altera com testes adicionais.

Em uma análise de risco genotóxico, a utilização de diferentes modelos *in silico* como métodos complementares e/ou independentes pode aumentar o peso da evidência do desfecho toxicológico analisado. Cabe ressaltar que uma avaliação crítica pós-análise e, inclusive, condução de novos ensaios experimentais complementares são estratégias necessárias em situações em que um ou mais resultados não são concordantes.

## **CAPÍTULO 2**

### **TESTE *IN VITRO***



## 7. CAPÍTULO 2

### 7.1 INTRODUÇÃO AO ESTUDO *in vitro*

#### 7.1.1 Metagenômica

Atualmente é possível obter informações dos genomas diretamente de comunidades microbianas em seus habitats naturais. Esses dados de sequências de DNA retirados diretamente do ambiente constituem os metagenomas (WOOLEY; GODZIK; FRIEDBERG, 2010). Conceitualmente, a metagenômica é uma análise baseada no acesso ao material genético e expressão funcional dos genomas coletivos de microrganismos contidos em uma amostra ambiental (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005).

Uma amostra ambiental é coletada e, dessa amostra, o material genético encontrado nela é sequenciado. A partir desse sequenciamento é que estudamos a composição da população de micro-organismos desse ambiente. As sequências foram analisadas pelos programas MG-RAST (*Metagenomics Rapid Annotation using Subsystem Technology*).

O objetivo desta técnica foi caracterizar a microbiota bacteriana da água do poço artesiano em seu aspecto qualitativo (identificação taxonômica). Para avaliar a contaminação microbiológica e concluir as análises das amostras de água do poço, realizamos a caracterização taxonômica da comunidade bacteriana por meio do sequenciamento metagenômico, permitindo uma análise detalhada da diversidade microbiana.

#### 7.1.2 Estudos sobre a citotoxicidade e mutagenicidade da forma leuco do AM.

##### O uso de *S. typhimurium* como modelo de estudo *in vitro*

Testes *in vitro* com micro-organismos modelo são essenciais para detectar a toxicidade de substâncias utilizadas primariamente em modelos animais, para que se conheça o efeito da substância antes da aplicação posterior em seres humanos.

O conhecimento de mecanismos de reparo contra lesões no DNA em bactérias, e sua similaridade com aqueles presentes em células humanas permitiu a elaboração de metodologias investigativas usadas em diversos estudos de substâncias para uso humano com potencial mutagênico. Dentre as diferentes abordagens usadas para avaliar a atividade mutagênica de uma substância e, conseqüentemente, o seu potencial cancerígeno, está o teste

de Ames, ou teste com *Salmonella*/fração microsossomal de fígado de rato (MARON; AMES, 1983), padrão ouro para esse tipo de avaliação (ISO, 2012).

O teste de Ames caracteriza-se pela utilização de linhagens indicadoras de *S. typhimurium* com mutações pré-existentes que as deixam impossibilitadas de sintetizar um aminoácido essencial, a histidina, além de serem deficientes em reparo de DNA e, assim sendo, sensíveis a substâncias capazes de induzir diferentes tipos de mutação. Quando expostas a agentes que possam induzir mutações no *operon* responsável pela síntese da histidina, ou alternativamente, na sequência dos genes codificantes dos tRNAs que transportam histidina durante a síntese de proteínas. A função de síntese do aminoácido histidina pode ser restaurada, revertendo para o fenótipo selvagem. Desta forma, as bactérias conseguem crescer e formar colônias na ausência da histidina no meio de cultura. O número de colônias formadas após a exposição das várias cepas bacterianas a uma gama de concentrações do agente químico em estudo estará diretamente relacionado com o seu potencial mutagênico (MORTELMANS; ZEIGER, 2000)

Neste teste são empregadas cepas de *S. typhimurium*, cuja reversão  $his^- \rightarrow his^+$  ocorre por defasagem no referencial de leitura ou *frameshift* nas cepas TA97 e TA98, ou por substituição das bases nitrogenadas (transição e transversão nas cepas TA100 e TA102). Tais cepas, além da mutação em um dos genes responsáveis pela síntese da histidina, apresentam mutação no gene *rfa*, que causa uma modificação na camada lipopolissacarídica da membrana celular, tornando-as mais permeáveis a agentes mutagênicos (AMES; DURSTON; YAMASAKI; LEE, 1973).

Outra característica importante é que essas cepas são incapazes de reparar lesões por excisão de nucleotídeos (deleção do gene de reparo de DNA *uvrB*), ou seja, a deleção deste gene impede a remoção de danos no DNA e a reposição da base correta, levando à fixação das possíveis mutações, (AMES; DURSTON; YAMASAKI; LEE, 1973; MARON; AMES, 1983); (AMES; DURSTON; YAMASAKI; LEE, 1973).

A presença do plasmídeo pKM101 confere resistência ao antibiótico ampicilina e também aumenta a mutagênese devido ao fato dele carrear os genes *mucA* e *mucB*, que codificam uma mutapolimerase mutagênica. O plasmídeo pAQ1 inserido na cepa TA102 confere resistência à tetraciclina, na qual foi também inserida uma mutação *hisG428* do tipo ocre (mutação que bloqueia a transcrição gênica por gerar um códon de parada de síntese de proteínas), com o objetivo de amplificar o número de alvos, já que esta mutação é revertida por agentes mutagênicos que causam danos oxidativos (AMES; DURSTON; YAMASAKI; LEE, 1973).

O resultado é visto com a presença de colônias revertentes para o fenótipo His<sup>-</sup> → His<sup>+</sup> mediante estímulo mutagênico (MARON; AMES, 1983).

Para realizar um teste com características metabólicas similares às das células eucarióticas, as bactérias são expostas aos agentes-teste na ausência e na presença de homogenato de fração microsomal de fígado de rato (fração S9). Uma vez que algumas substâncias químicas cancerígenas são biologicamente inativas no reino microbiano, é adicionado um sistema exógeno de ativação metabólica de mamífero via do citocromo P450 (AMES; DURSTON; YAMASAKI; LEE, 1973).

Normalmente é utilizado o sistema exógeno designado como “fração S9”, preparado a partir da fração de fígado de ratos machos *Sprague Dawley* após indução das enzimas hepáticas com o composto tóxico Aroclor 1254 (mistura de compostos bifenil policlorinados – PCB). A fração S9 ativada foi preparada imediatamente antes de cada experimento, segundo a técnica descrita por MARON & AMES (1983), sendo mantida no gelo e ao abrigo da luz até a sua utilização.

### **7.1.3 Estudos sobre a citotoxicidade e mutagenicidade da forma leuco do AM. O uso de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) como modelo de estudo *in vitro***

A levedura *S. cerevisiae* é utilizada como modelo experimental em pesquisas genéticas por se tratar de um micro-organismo eucariótico não patogênico, de fácil manipulação genética em laboratório e de rápido crescimento. Além disso, é um modelo celular de fácil manipulação por processos de engenharia genética e, portanto, apresenta um grande número de cepas deficientes em diversos mecanismos de reparo de DNA e atende às exigências das agências regulatórias, que preconizam testes alternativos de cito e genotoxicidade baseando-se no princípio dos 3R's (*Repair, Recombination, Replication*) (BARR, 2003).

Os estudos utilizando *S. cerevisiae* como modelo eucariótico se justificam pela similaridade enzimática existente entre seus genes de reparo de DNA com o sistema de reparo presente em humanos (GIRARD; BOITEUX, 1997). Tal característica foi evidenciada uma vez que *S. cerevisiae* foi o primeiro micro-organismo eucarioto a ter seu genoma completamente sequenciado (GOFFEAU; BARRELL; BUSSEY; DAVIS *et al.*, 1996). *S. cerevisiae* possui diversos genes ortólogos aos encontrados nas células de mamíferos (LAURENT; YOUNG; KACHROO; MARCOTTE, 2016), incluindo diversos genes de reparo de DNA e de sinalização de reparo de lesões pré-mutagênicas, como é o caso, por exemplo, do gene *YNO1*, que codifica a enzima *Yeast NADPH-oxidase* (Yno1), ortóloga às

NADPH-oxidases humanas, responsáveis pela sinalização e defesa celular contra o estresse oxidativo (RINNERTHALER; BÜTTNER; LAUN; HEEREN *et al.*, 2012). Nesse sentido, diversos estudos mostraram que *S. cerevisiae* é um efetivo modelo bioindicador de respostas contra danos ao DNA eucariótico (PINTO; DEODATO; CARDOSO; OLIVEIRA *et al.*, 2010); (PAIVA; SANTOS; KIBWILA; GONÇALVES *et al.*, 2014); (HOSSY; DA COSTA LEITÃO; DOS SANTOS; MATSUDA *et al.*, 2017); (DINIZ; PAIVA; AQUINO; GONÇALVES *et al.*, 2019); (PAIVA; DINIZ; LEITAO; CABRAL *et al.*, 2020).

As cepas empregadas neste estudo foram selecionadas em função de suas características genotípicas, de forma que a proficiência ou deficiência do sistema *YNO1* de sinalização de reparo contra danos celulares possa servir de indicativo da ocorrência de lesões mutagênicas no DNA frente aos tratamentos SODIS ou AM/SODIS, contribuindo, inclusive, com uma elucidação do possível mecanismo de mutagênese.

A cepa de *S. cerevisiae* selvagem FF18733 é proficiente em todos os sistemas de reparo de DNA, permitindo a medida comparativa entre efeitos dos agentes externos, como radiação e substâncias genotóxicas testadas, em relação ao processamento dos diferentes danos induzidos pelos mecanismos de reparo de DNA. Por sua vez, a cepa mutante AWP001 (*yno1*) é deficiente no gene *YNO1* que codifica a NADPH oxidase Yno1. A proteína Yno1 é ortóloga às NADPH oxidases humanas (NOXs), responsáveis por produzir  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  de forma indireta para sinalizar a resposta a eventos endógenos ou exógenos, tais como a geração de ROS em resposta ao UV-A, UV-B ou a outros estímulos genotóxicos. Portanto, na ausência dessa proteína, as células tendem a ficar propensas à apoptose e às mutações, evidenciando a ausência de reparo dos danos induzidos no DNA (AGUIRRE; LAMBETH, 2010); (RINNERTHALER; BÜTTNER; LAUN; HEEREN *et al.*, 2012).

Na análise da mutagênese direta ao tratamento AM-leuco, foi utilizado o sistema de resistência à Canavanina. É um sistema de “mutagênese direta” que detecta todas as mutações que inativam o gene da arginina permease, *CAN1*. Este gene, presente na levedura *S. cerevisiae*, codifica a proteína de membrana, a arginina-permease (Can1p), responsável pelo importe de arginina. No entanto, esta permease também transporta o análogo tóxico da arginina, a L-canavanina (L-can), e, em altas concentrações de canavanina no meio de cultivo, haverá incorporação deste análogo de arginina, inativando a célula. As células que possuem o gene *CAN1* mutado por qualquer tratamento irão sobreviver, pois não importarão a canavanina do meio (DZIERZBICKI; KOPROWSKI; FIKUS; MALC *et al.*, 2004); (SOUZA, 2009); (PINTO; DEODATO; CARDOSO; OLIVEIRA *et al.*, 2010).



## 7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO CAPÍTULO 2

- 1 Dosimetria da radiação UV solar durante a exposição SODIS;
- 2 Analisar a composição microbiana de amostras de água real (proveniente de poço artesiano), antes e após tratamentos SODIS e AM/SODIS por metagenômica;
- 3 Determinar a citotoxicidade e mutagenicidade do AM, na forma azul e leuco (descorada pelo Sol), através do Teste de Ames em cepas de *S. typhimurium*; e
- 4 Determinar a citotoxicidade e mutagenicidade da forma leuco do AM (descorada pelo Sol) em cepas bioindicadoras de *S. cerevisiae*.

## 7.3 MATERIAL E METODOLOGIA *in vitro*

### 7.3.1 Cepas utilizadas

As diferentes cepas de *S. typhimurium* e da levedura *S. cerevisiae* usadas nesse estudo, bem como suas características genéticas e origens, estão listadas na quadro 2.

**Quadro 2:** Listagem das cepas de *S. typhimurium* e *S. cerevisiae* empregadas nos estudos de mutagenicidade e citotoxicidade *in vitro* bem como das mutações específicas pertinentes ao estudo

Designação das cepas	Características genéticas das cepas e origens
TA 98	<i>S. typhimurium uvrB rfa</i> pKM101 amp <sup>R</sup> (20 µg/ml). Mutação <i>hisD3052</i> , sensível a <i>frameshift</i> no locus <i>his</i> por deleção de um par G:C (P. Quillardet e B. Ames).
TA 100	<i>S. typhimurium uvrB rfa</i> pKM101 amp <sup>R</sup> (20 µg/ml). Mutação <i>hisG46</i> , sensível à troca de base no locus <i>his</i> por substituição das bases nitrogenadas - G:C para A:T (P. Quillardet e B. Ames).
TA 102	<i>S. typhimurium selvagem rfa</i> amp <sup>R</sup> (20 µg/ml) tet <sup>R</sup> (12,5 µg/ml) pKM101 pAQ1. Mutação <i>hisG428</i> , sensível à troca de base no locus <i>his</i> por substituição das bases nitrogenadas - A:T para G:C (P. Quillardet e B. Ames).
FF18733	<i>S. cerevisiae selvagem</i> , MATa, <i>leu2-3-112</i> , <i>trp1-289</i> , <i>his7-2</i> , <i>ura3-52</i> , <i>lys1-1</i> (F. Fabre).
AWP001	<i>S. cerevisiae Δyno1</i> , FF18733 com <i>yno1::KanMX6</i> (Aquino, Wilmart e Pádula)

P. Quillardet – Instituto Pasteur, Paris (França) e B. Ames – Universidade de Berkeley, Califórnia (EUA).

F.Fabre - CEA, Fontenay aux Roses (France). Aquino, Wilmart e Pádula UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro (Brasil). Fonte: (DINIZ; PAIVA; AQUINO; GONÇALVES *et al.*, 2019)

### 7.3.2 Meios de cultura, soluções e tampões para o Teste de Ames.

O meio LB foi utilizado para o crescimento das amostras contendo bactérias, o tampão M9 para fazer as diluições seriadas, e os demais meios para os ensaios de mutagênese bacteriana. A composição de cada meio está descrita a seguir:

#### Meio LB (MILLER, 1972) - pH 7,0

NaCl (MERCK)	10 g
Bacto-triptona (Bacto™)	10 g
Extrato de levedura (Bacto™)	5 g
Água deionizada q.s.	1000 ml
Meio LB solidificado com 1,5% ágar (Difco Laboratories)	

#### Tampão M9 (MILLER, 1972) - pH 7,0

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anidro (ISO FAR)	6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> anidro (ISO FAR)	3 g
NH <sub>4</sub> Cl (ISO FAR)	1 g
NaCl (MERCK)	0,5 g
Água deionizada q.s.p.	1000 ml

**OBS:** Após o preparo, os meios LB líquido e sólido, assim como o tampão M9 foram autoclavados durante 30 minutos a 120°C. Após a autoclavagem, à temperatura ambiente, foram adicionados ao tampão M9 100 µl de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (MERCK) 1mM e 100 µl de CaCl<sub>2</sub> (ISO FAR) 0,1mM a cada 100ml do tampão.

#### Meio E de Vogel-Bonner (MEVB 50X) - pH 7,0

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (MERCK)	10 g
H <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> .H <sub>2</sub> O (Química Moura Brasil)	100 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anidro (ISO FAR)	500 g
Na(NH <sub>4</sub> )HPO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O (Química Moura Brasil)	175 g
Água deionizada (45°C) q.s.p.	1000 ml

**OBS:** Distribuir em diversos frascos e autoclavar por 20 min a 120°C.

#### Meio E de Vogel-Bonner (MEVB sólido)

Agar (Difco™)	9 g
Água deionizada	558 ml

**OBS:** autoclavar por 30 min e após, adicionar, ao meio ainda morno 12 ml de MEVB (50X) e 30 ml D-Glicose (MERCK) (40%).

#### Solução Mista

Monocloridrato de L-histidina monohidratada (MERCK)	11 g
D-biotina (MERCK)	12,36 mg
Água deionizada estéril q.s.p.	100 ml

**OBS:** Adicionar todos os ingredientes em recipiente adequado e esterilizar por filtração em filtros Millipore 0,22 µm.

**Meio GS**

NaCl (MERCK)	0,5%
Agar (Difco™)	0,6%
Água deionizada q.s.p.	1000 ml

**OBS:** Adicionar todos os ingredientes em recipiente adequado e autoclavar a 120°C por 30 minutos. Após a autoclavagem, adicionar 10 ml de Solução Mista para cada 100 ml de GS.

**S9 mix padrão (reagentes adicionados na ordem indicada abaixo)**

Água destilada estéril	19,75 ml	1°
0,2 M tampão fosfato pH 7,4	25 ml	2°
0,1 M NADP	2 ml	3°
1M glicose-6-fosfato	0,25 ml	4°
MgCl <sub>2</sub> – KCl	1 ml	5°
S9-Lyophilized Aroclor 1254 (Molecular Toxicology, Inc) (4%)	2 ml	6°

**OBS:** A solução deve ser preparada fresca e no gelo. Todos os ingredientes devem ser refrigerados. Qualquer sobra de mistura S9 ou S9 mix deve ser descartada

**7.3.3 Meios de cultura e soluções para o crescimento da *S. cerevisiae*****Meio Yeast Peptone D-Glucose (YPD) líquido e sólido (THOMAS *et al.*, 1997) - pH 7,0**

Extrato de levedura (Bacto™)	10 g
Bacto- peptona (Bacto™)	10 g
D-Glicose (MERCK)	20 g

**Meio Yeast Nitrogen Base (YNBD) sólido (THOMAS *et al.*, 1997).**

YNB (Difco™)	7 g
D-Glicose (MERCK)	20 g
Água deionizada (q.s.p.)	1000 ml

**OBS:** Adicionar todos os ingredientes em recipiente adequado e autoclavar a 120°C por 30 minutos. Distribuir em frascos estéreis de 100 ml, para meio líquido Para meio YPD sólido, acrescentar ágar (Bacto™) 2%. Para meio YNBD sólido, acrescentar ágar (Bacto™) 2%. Suplementar com solução de aminoácidos e bases conforme auxotrofia de cada cepa.

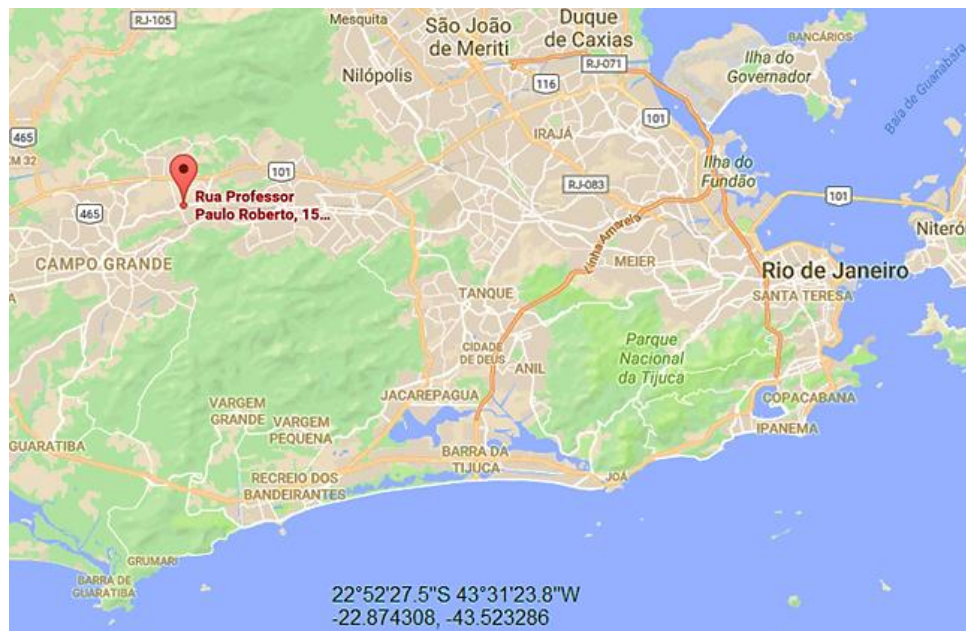
**Soluções de aminoácidos e base nitrogenada para suplementação\***

Histidina (Sigma-Aldrich®)	2%
Leucina (Sigma-Aldrich®)	1%
Triptofano (Sigma-Aldrich®)	0,2%
Lisina (Sigma-Aldrich®)	0,4%
Uracila (Sigma-Aldrich®)	0,2%

**OBS:** Esterilizar por autoclavagem durante 15 minutos à 120°C. Utilizar 10 ml de cada aminoácido e base para suplementação do meio YNBD de acordo com a auxotrofia de cada cepa. Para determinar a mutagênese, acrescentou-se 60 mg/l de canavanina (Sigma-Aldrich®). \*Frasco protegido da luz.

### 7.3.4 Localidade selecionada para o estudo

Para o presente estudo foram analisadas amostras de água coletadas de um poço artesiano, localizado na Rua Professor Paulo Roberto, casa 15, em Campo Grande, Rio de Janeiro, RJ e sua localização geográfica está indicada na figura 10. As coletas foram realizadas em garrafas PET de 2 litros, higienizadas primeiramente com água destilada seguidas de álcool 70% e secagem a temperatura ambiente.



**Figura 10:** Mapa elaborado através de imagens de satélite LANDSAT-TM 7 e a base Cartográfica da ANEEL (<http://www.aneel.gov.br>).

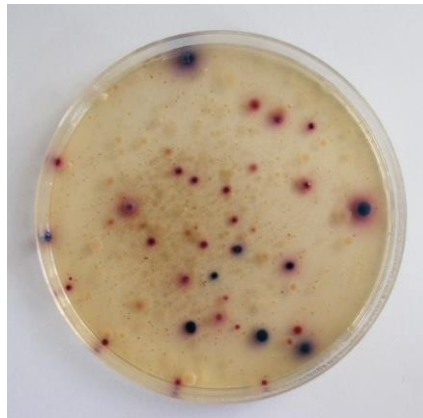
### 7.3.5 Análises de amostras de água - determinação da contaminação microbiológica.

O *Chromocult* é um meio de cultura seletivo que diferencia coliformes fecais e totais, através da detecção de duas enzimas, a  $\beta$ -glicuronidase e a  $\beta$ -galactosidase, respectivamente. Além desta característica que o torna diferencial, este meio possui um composto chamado Tergitol7, que inibe o crescimento de outras bactérias da flora microbiana.

Também possui o SALMON-GAL, que é um substrato para a enzima  $\beta$ -galactosidase (específica do grupo dos coliformes). Após a hidrólise, o SALMON-GAL gera um composto cromogênico que leva colônias bacterianas possuidoras desta enzima a desenvolver coloração

variando entre salmão e vermelho. Ao mesmo tempo, este meio possui o X-GLUC, que é substrato para a enzima  $\beta$ -glicuronidase (específica da bactéria *E. coli*).

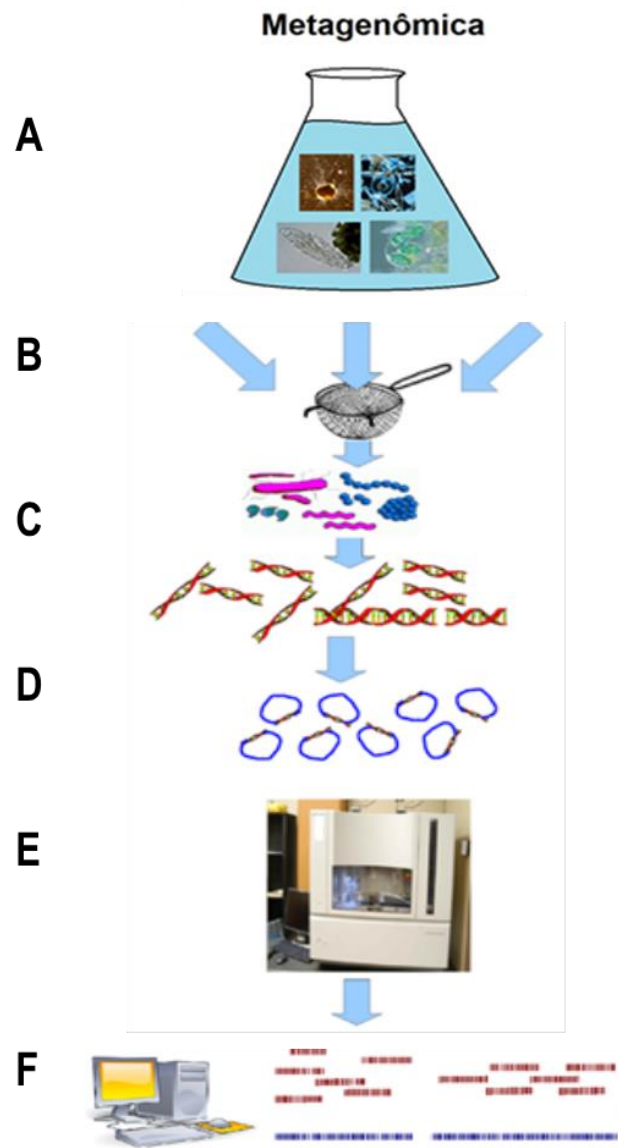
Após hidrólise do substrato, uma substância é gerada, levando ao crescimento de colônias de coloração variando entre o azul claro e o turquesa. Como a *E. coli* produz ambas as enzimas, ela é capaz de provocar a clivagem de ambos os substratos (o SALMON-GAL e o X-GLUC). A hidrólise simultânea destes compostos faz com que cresçam colônias de coloração entre o azul escuro e o violeta (figura 11), tornando as colônias de coliformes fecais facilmente distinguíveis dos outros coliformes. Assim, para determinar a contaminação microbiológica da água do poço antes e depois da exposição das garrafas ao sol, aplicadas amostras de 100 ml foram submetidas à técnica de membrana filtrante. Os filtros foram depositados sobre o meio de cultura *Chromocult*<sup>®</sup> depositado em placas de Petri



**Figura 11:** Fotografia de uma placa de Petri contendo colônias de *E. coli* e coliformes totais crescidas no Meio *Chromocult*<sup>®</sup>. As colônias azuis escuras e violeta são de coliformes fecais, e as demais colônias, de coliformes totais (<http://enfo.agt.bme.hu>).

### 7.3.6 Análise da composição microbiana de amostras de água (proveniente de poço artesiano) por metagenoma antes dos tratamentos

#### Esquema metodológico



**Figura 12: Esquema metodológico para metagenômica:** (A) Amostras de água do poço. (B) (C) (D) Extração, cópia e fragmentação do DNA das amostras. (E) Sequenciamento massivo em paralelo ou Sequenciamento de Alta Performance - os sequenciadores de nova geração podem ler até bilhões de fragmentos ao mesmo tempo resultando em um arquivo contendo a posição exata de cada nucleotídeo na cadeia de DNA. (F) Montagem computador das sequências dos fragmentos, obtendo-se as sequências originais. Análise Metagenômica Servidor MG-RAST ([mg-rast.org](http://mg-rast.org)). *Metagenomics Rapid Annotation using Subsystem Technology* (MG-RAST) é um pipeline metagenômico *web*.

### 7.3.7 Processamento da amostra de água do poço - Extração e amplificação de DNA

Um volume total de 100 ml de água coletada do poço artesiano usada neste projeto da região de Campo Grande foi filtrado e posteriormente a amostra foi macerada com nitrogênio líquido e armazenada à temperatura ambiente. A extração do DNA total da comunidade microbiana presente na amostra foi feita utilizando o *kit PowerSoil™ DNA Isolation* (QIAGEN) (nº cat. 12855-50) e quantificação no fluorímetro Qubit® (Invitrogen®), utilizando o Qubit dsDNA *high-sensitivity assay* (Invitrogen®) (nº cat. Q32854), ambos seguindo os protocolos dos fabricantes.

A amplificação multiplex foi feita com os pares de iniciadores do painel de genes desenvolvido no Laboratório de Metabolismo Macromolecular Firmino Torres de Castro do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (LMMFTC-UFRJ), utilizando o *Multiplex PCR Kit* (QIAGEN®) (nº cat. 206143), de acordo com o protocolo do fabricante, no termociclador Veriti® 96-Well (*Applied Biosystems*®).

O produto de PCR foi purificado com as esferas magnéticas *Agencourt AMPure XP* (*Beckman Coulter*) (cat no. A63880) e analisado por eletroforese em gel de agarose 1,0%, banhado em solução contendo brometo de etídio e água a uma concentração de 0,5 µg/ml. Em seguida, foi visualizado no fotodocumentador *Bio-Imaging System* (DNR®) através de detecção a 260 nm. O padrão de peso molecular utilizado na eletroforese foi de 2000 pb (*Invitrogen*®) (nº cat. 15628019).

### 7.3.8 Sequenciamento paralelo massivo

A biblioteca para o sequenciamento do produto de PCR foi feita utilizando os *kits Ion Xpress Plus Fragment Library Kit* (*ThermoFisher Scientific*®). Para a amplificação clonal foi feito um PCR em emulsão no equipamento *Ion OneTouch™ 2 System* (*ThermoFisher Scientific*®), utilizando o *Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit* (*ThermoFisher Scientific*®) (nº cat. A27739) para a biblioteca de 400 pb, de acordo com recomendações do fabricante.

Em seguida, foi feito o enriquecimento das *Ion Sphere™ Particles* (ISPs) positivas utilizando o *Ion OneTouch™ ES* (*ThermoFisher Scientific*®) e *Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit* (*ThermoFisher Scientific*®) (nº cat. A27739).

O protocolo de sequenciamento foi feito com o *Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit* (*ThermoFisher Scientific*®) (nº cat. A25592) e a biblioteca sequenciada utilizando o *Ion*

318™ *Chip* (no cat. 4488146) na plataforma *Ion Torrent PGM* (*ThermoFisher Scientific*®) no LMMFTC-UFRJ.

### **7.3.9 Análise da composição microbiana de amostras de água contaminada real (proveniente de poço artesiano) por metagenoma depois dos tratamentos**

As amostras de água coletadas do poço artesiano foram divididas em garrafas PET em três grupos: sem tratamento (ST), tratamento SODIS (SO) e tratamento AM/SODIS (AMSO). Cada tratamento com um volume total de 2000 ml de água do poço foi filtrado e posteriormente cada amostra foi macerada com nitrogênio líquido e armazenada a temperatura ambiente. A extração de DNA da comunidade microbiana total presente nas amostras foi feita utilizando o *ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit* (*Zymo Research*) seguindo as orientações do fabricante. A quantificação do DNA foi feita no fluorímetro Qubit® (*Invitrogen*).

### **7.4 Distribuição das bactérias por sequenciamento NGS (*Next-Generation Sequencing*) do gene 16S rRNA e sequenciamento em *Ion S5***

Para identificação do microbioma, foi sequenciada uma região hipervariável do gene 16S rRNA: V6V7V8 (*primer forward* - CGA WGCAACGCGAARAACCT, reverso - CGAGTTGCAGACTVCAATCCG) (DIAS *et al.*, 2020).

Os *primers* contêm diferentes *barcodes* que possibilitaram o sequenciamento de várias amostras em um único chip. A amplificação das sequências foi feita por PCR e os *primers* usados listados acima amplificaram regiões de cerca de 360 bp. A reação de PCR foi feita no termociclador Veriti-96 *well Thermal Cycler* com a seguinte programação: ativação da enzima por 3 min a 94°C, seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 s para desnaturação, baixar a temperatura a 58°C por 30 s para etapa de emparelhamento e elevação da temperatura a 68°C por 1 min etapa de extensão ou alongamento. Com as sequências amplificadas e purificadas, a quantificação foi feita no fluorímetro Qubit® (*Invitrogen*). Por fim, as bibliotecas quantificadas foram combinadas em proporções iguais para gerar um pool equimolar. A amplificação clonal e enriquecimento das bibliotecas foram feitas no *Ion Chef™*, utilizando o *Ion S5™ Chef Supplies* (*Thermo Fisher*).

O protocolo do sequenciamento foi feito com *Ion S5™ Sequencing Reagents* (*Thermo Fisher*) (Nº A27768). As bibliotecas foram sequenciadas no *Ion S5™ System* utilizando o *Ion 530™ Chip* com capacidade para 15 a 20 milhões de *reads*.



## **7.5 Fotossensibilizador**

O fotossensibilizador AM (*Sigma-Aldrich*) foi preparado como solução-estoque de 1 mM com água deionizada estéril. Essa solução permaneceu em temperatura ambiente, em tubo de rosca e protegida da luz. Mesmo sendo uma solução estável, ela foi preparada na medida do uso.

## **7.6 Irradiação com luz solar**

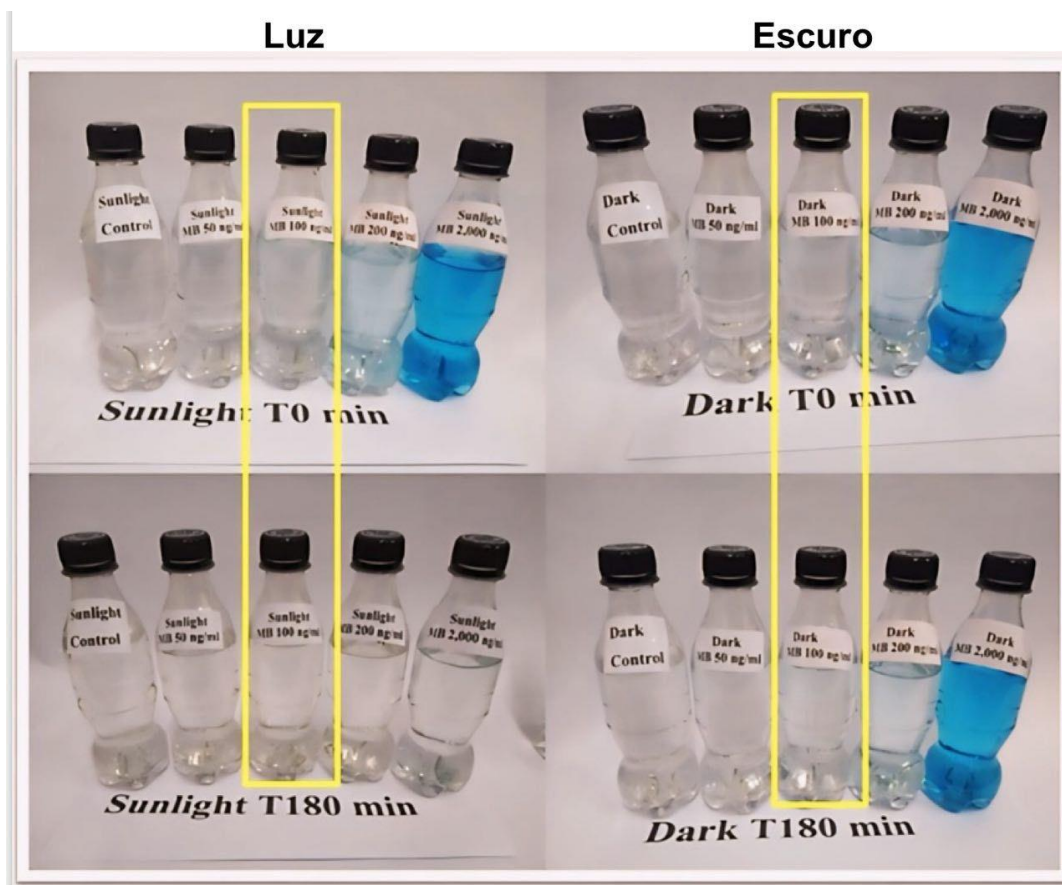
A luz do sol na cidade do Rio de Janeiro, Brasil (Latitude  $-22^{\circ} 54' 10''$ , Longitude  $-43^{\circ} 12' 27''$ ) ao meio-dia (entre 11:00 h e 13:00 h) foi a fonte natural para realização do processo SODIS.

### **7.6.1 Dosimetria das radiações UV**

A intensidade da radiação solar natural foi medida, assim como a temperatura, por meio de termômetro inserido no interior das garrafas PET com água. O dosímetro BLAK-RAY – J-221 foi utilizado para dosar a intensidade dos raios UV-A. Para os raios UV-B o dosímetro utilizado foi o VILBER LOURMAT – VLX – 3 W acoplado a uma fotocélula para 312 nm, série 21-216.

### **7.6.2 Preparação de soluções concentradas de AM-azul ou AM-leuco em água destilada para os ensaios de citotoxicidade e mutagênese**

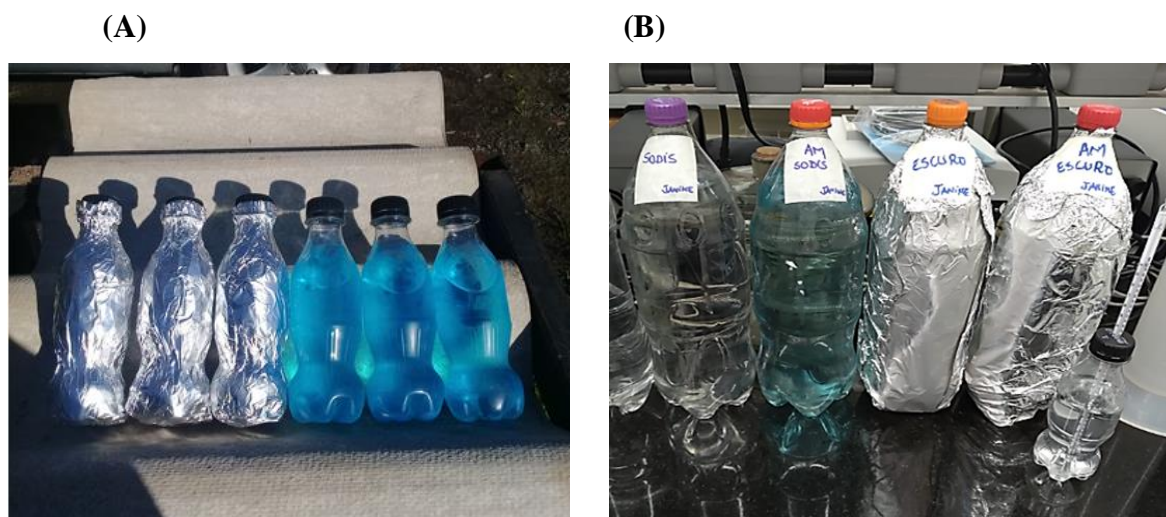
O desenho experimental do estudo foi concebido de forma a se obter amostras de AM-azul e AM-leuco conforme condições de tratamento indicados na figura 13.



**Figura 13:** Fotografias mostrando as garrafas PET contendo água limpa adicionada de AM em concentrações de 0 (controle), 50, 100, 200 e 2000 ng/ml antes da exposição à luz solar de ambas as amostras "LUZ" e "ESCURO"; abaixo: após 180 minutos de exposição à luz solar, a fotodecomposição do AM pode ser observada apenas nas garrafas "LUZ" (parte inferior esquerda), enquanto a cor azul permanece naquelas não expostas à luz solar envolvidas em papel alumínio (parte inferior direita). (CARDOSO-RURR; DE PAIVA; PAULINO-LIMA; DE ALENCAR *et al.*, 2019), material suplementar. Os retângulos amarelos indicam a concentração de 100 ng/ml do AM utilizada neste estudo.

A esta água foi aplicada a metodologia SODIS ou AM/SODIS na concentração equivalente ao que seria consumido por uma pessoa em 2 litros de água em um dia, e, assim, obter a massa de 200  $\mu\text{g}$  de AM azul ou leuco, conforme ilustrado na figura 14.

O AM usado (*Sigma-Aldrich* M9140 – 25G) foi preparado como solução-estoque de 1 mM em água deionizada estéril. A solução permaneceu em temperatura ambiente, em tubos de rosca e protegida da luz. Apesar da estabilidade química dessas soluções, elas foram preparadas frescas quando necessário.



**Figura 14** – (A) Fotografia da apresentação das garrafas PET com água do poço artesiano com AM (200  $\mu$ g) durante a exposição ao sol pleno entre 11 h e 16 h no dia 7 de junho de 2019. (B) Cada garrafa simula o quanto de AM é consumido em 2 litros de água (200 $\mu$ g). Tratamentos: SODIS, AM/SODIS, AM/ESCURO e AM/CALOR/ESCURO.

Após exposição ao sol, as amostras de 100 ml foram congeladas durante a noite no freezer à  $-80^{\circ}\text{C}$  para serem liofilizadas no dia seguinte (Liofilizador K120 do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais Walter Mors/UFRJ, figura 15) por quatro dias consecutivos, com o objetivo de retirar toda água da amostra por meio de congelamento a vácuo. O processo de desidratação das amostras acontece por conta da pressão negativa que o vácuo ocasiona no material fazendo a passagem da água em estado sólido para o estado gasoso com mínimo prejuízo aos compostos lá presentes.

Após a liofilização, os resíduos concentrados dos tratamentos SODIS ou AM/SODIS foram solubilizados em 0,5 ml de água destilada estéril. Estas alíquotas foram aplicadas nas culturas da bactéria *S. typhimurium* ou da levedura *S. cerevisiae* a fim de avaliar os efeitos mutagênicos e citotóxicos do AM nas formas azul (oxidada) e leuco (reduzida).



**Figura 15** - Fotografia do liofilizador K120 (Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais Walter Mors/UFRJ).

### 7.6.3 Confirmação dos genótipos das cepas de *S. typhimurium* testadas

As características genéticas e fenotípicas das cepas de *S. typhimurium* foram cheçadas rotineiramente. Para verificar a auxotrofia à histidina, foi observada a ausência de crescimento em placas de Petri contendo meio seletivo MEVB enriquecido somente com 0,1 ml de solução de D-Biotina 0,5 mM, e, como contra prova, tais cepas cresciam normalmente em placas de MEVB acrescidas de solução mista (L-histidina + D-biotina).

Para a confirmação da mutação *rfa*, foi realizado um controle quanto à sensibilidade ao Cristal Violeta (AMES; DURSTON; YAMASAKI; LEE, 1973). Para este teste, placas de Petri com o meio MEVB foram semeadas com culturas das cepas a serem testadas e 10 µl de uma solução 1 mg/ml de cristal violeta colocados no centro da placa. Após incubação a 37°C durante a noite, uma zona clara de inibição (aproximadamente 14 mm) aparece ao redor do disco, indicando a presença da mutação *rfa* que permite que grandes moléculas, como o cristal violeta, penetrem e matem as bactérias.

A mutação *uvrB* foi confirmada pela sensibilidade das cepas à radiação UVC (254nm) por 8 segundos, e a presença de plasmídeos de resistência à ampicilina (20 µg/ml) e tetraciclina (12 µg/ml somente na cepa TA 102) foram verificadas de acordo com MARON e AMES (1983).

#### 7.6.4 Manutenção e estoque das cepas de *S. typhimurium* e *S. cerevisiae*

As cepas de *S. typhimurium* ficaram estocadas em tubos para congelamento (1,5 ml), a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para que todas as suas características genéticas se mantivessem inalteradas. Para cada 0,9 ml da cultura bacteriana ( $10^9$  células/ml), foram adicionados 0,1 ml de DMSO, como substância crioprotetora.

As cepas de *S. cerevisiae* foram mantidas em estoques contendo a cultura em fase estacionária de crescimento, em glicerol 87% (MERCK) na proporção 1:1 a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 7.6.5 Mutateste

As cepas de *S. typhimurium* foram cultivadas em meio LB líquido, contendo 20  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina e 12  $\mu\text{g/ml}$  de tetraciclina (somente para a cepa TA 102) durante a noite (aproximadamente 15 horas de crescimento) com aeração constante. As cepas foram testadas quanto aos efeitos mutagênicos do AM (100 ng/ml) não metabolizado (sem fração S9) e metabolizado (com fração S9) através do teste de reversão à prototrofia ( $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$ ) para a síntese do aminoácido histidina (Teste de Ames), nas formas azul e leuco.

Foi empregada a metodologia de pré-incubação em banho-maria por 20 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , desenvolvida por MARON; AMES (1983). Em tubos de ensaio foram colocados 0,1 ml de cultura das bactérias ( $1-2 \times 10^9$  células/ml), 0,5 ml de cada tratamento testado [200 $\mu\text{g}$ /placa do AM na forma oxidada (azul) ou reduzida (leuco)] sem a fração S9. Quando metabolizado, a esta cultura foi adicionado 0,4 ml da fração S9 Mix.

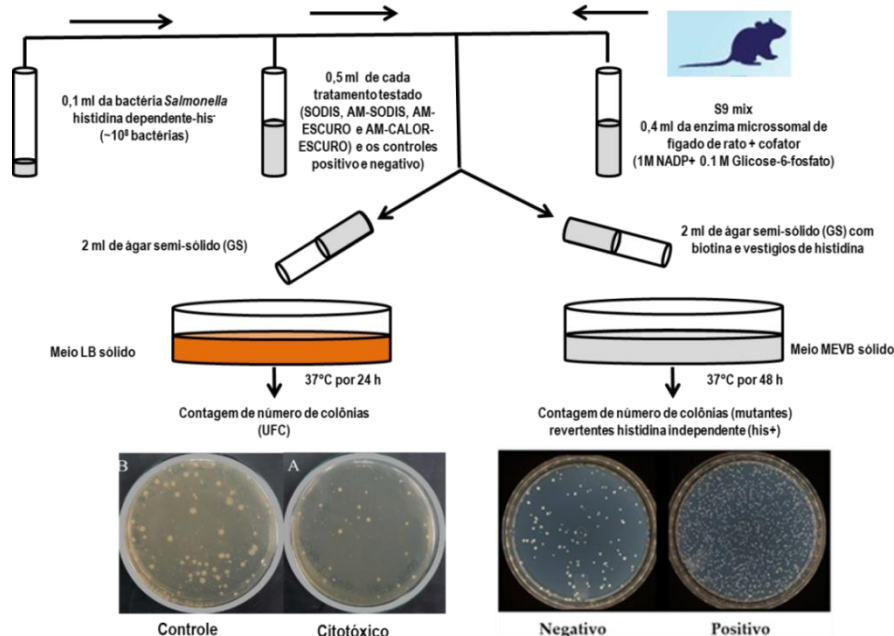
Os tubos com estas misturas foram incubados por 20 minutos. Após este tempo, foram adicionados em cada tubo para o plaqueamento, 2 ml de gelose de superfície (GS) acrescido de uma solução de histidina/biotina 0,5 mM (solução mista) na proporção 1:10. Em seguida, os tubos foram agitados e vertidos em placas de Petri contendo o meio MEVB para seleção de revertentes prototróficos para histidina.

A adição de traços de histidina é suficiente para possibilitar as primeiras divisões celulares para fixação da reversão  $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$ , indispensáveis para que ocorra a expressão da prototrofia  $\text{His}^+$ . A reversão espontânea é característica de cada cepa nas culturas sem tratamento, assim, as colônias revertentes  $\text{His}^+$  após os tratamentos SODIS ou AM/SODIS são facilmente visíveis em placas de meio MEVB enriquecido com a solução mista (L-histidina + D-biotina), em contraste com o tapete auxotrófico, que formam uma fina camada do crescimento bacteriano (*background*).

Essas placas foram incubadas por 48 horas a 37°C. Após esse tempo, os revertentes foram expressos em número absoluto de revertentes prototróficos para histidina ( $\text{His}^+$ ) em relação ao número total de colônias. Os ensaios foram realizados incluindo também os controles positivo e negativo (conforme descritos no item 6.6.5) para confirmar os revertentes para o tratamento SODIS e AM/SODIS. Todos os experimentos foram realizados de forma independente, por, pelo menos, três vezes.

### 7.6.6 Controles

Como controle negativo, utilizou-se água destilada estéril acrescentada às amostras, e, para o controle positivo, na ausência de ativação metabólica com todas as cepas, foi o agente mutagênico 4-nitroquinolina *N*-óxido (4NQO–*Sigma-Aldrich*) numa concentração final de 30 ng/placa. Os controles positivos para ativação metabólica das cepas TA97 e TA100 foram Benzo [a] pireno (B(a)P - *Sigma-Aldrich* – B1760) numa concentração final de 1 µg/placa, e Mitomicina C (MitC - Bristol-Myers Squibb, Brazil S/A) na concentração final de 0.5 µg/placa para a cepa TA 102. Todos os controles positivos foram dissolvidos em DMSO (dimetil sulfóxido). O desenho experimental representando as etapas envolvidas no ensaio de incorporação em placas para realização do Teste de Ames está apresentado na figura 16.



**Figura 16:** Esquema da metodologia por incorporação em placa do Teste de Ames para avaliação da citotoxicidade (sobrevivência) e mutagênese em *S. typhimurium* testadas nos tratamentos SODIS, AM/SODIS, AM/ESCURO e AM/CALOR/ESCURO, na concentração de 200µg/l do AM, com ou sem ativação metabólica. UFC: unidade formadora de colônias; S9: extrato liofilizado de fígado de ratos; GS: gelose de superfície; MEVB: meio E de Vogel-Bonner.

### **7.6.7 Forma de análise dos resultados da mutagenicidade pelos diferentes tratamentos**

A partir dos resultados obtidos, foi calculado o Índice de Mutagenicidade (IM) que é o valor médio o número de revertentes nas triplicatas de cada tratamento em cada cepa, dividido pelo valor médio do número de revertentes obtido das triplicatas do controle negativo. Assim, com base na literatura, os tratamentos foram considerados mutagênicos quando o número de colônias revertentes é, pelo menos, duas vezes maior que o número de revertentes espontâneos ( $IM \geq 2$ ). Por sua vez, o tratamento foi considerado negativo para o Teste de Ames quando o mesmo não induziu aumento significativo no número de revertentes e seus IM foram menores que 2 (MARON; AMES, 1983).

### **7.6.8 Forma de análise dos resultados da sobrevivência bacteriana (citotoxicidade)**

Para avaliar a citotoxicidade, calculou-se o valor médio da sobrevivência obtida dos ensaios em triplicatas, a partir da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) de cada tratamento, dividido pelo valor médio das UFC em triplicatas do controle negativo. Sendo assim, foi considerado como citotóxico um percentual de sobrevivência bacteriana menor ou igual a 70% (MARON; AMES, 1983); (AIUB; FELZENSZWALB, 2011); (OECD, 2020).

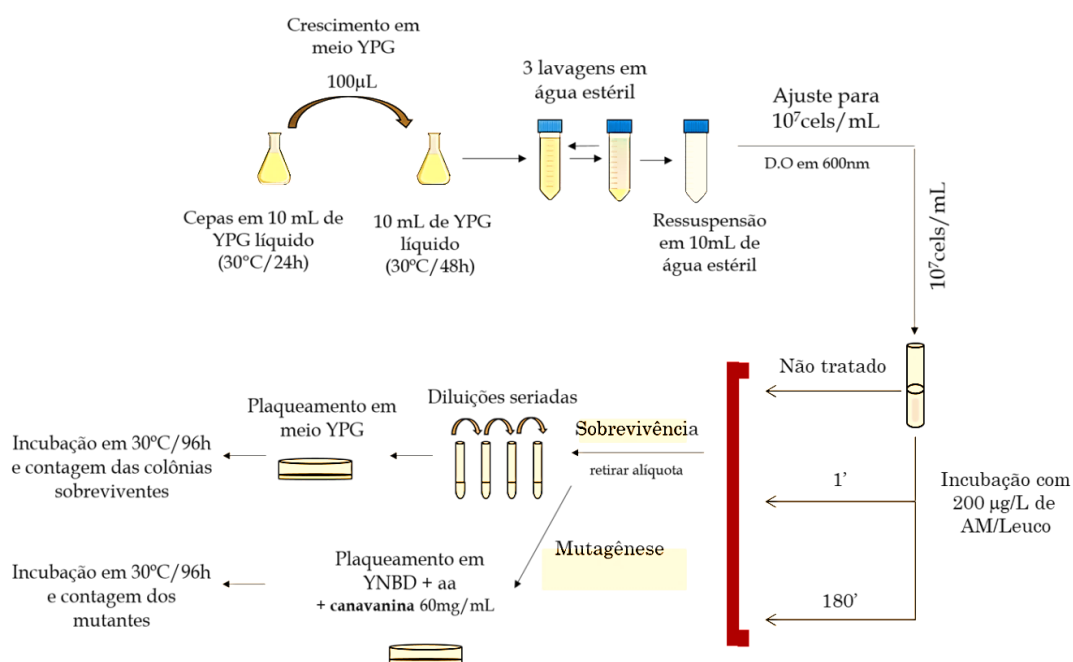
### **7.6.9 Estudo da citotoxicidade e da mutagênese à forma AM-leuco em levedura (*S. cerevisiae*)**

Para análise da citotoxicidade das substâncias testadas, as cepas FF18733 e AWP001 foram cultivadas em 10 ml de YPD líquido ( $\sim 30^{\circ}\text{C}$  sob agitação por 24 horas), em seguida, 100  $\mu\text{l}$  foram repicados em 10 ml de YPD líquido ( $\sim 30^{\circ}\text{C}$  sob agitação por 48 horas) até a fase estacionária. As culturas foram centrifugadas por 10 minutos a 7000 rpm (centrífuga de bancada modelo EP022620701Eppendorf® *Centrifuge* 5427R com rotor FA-45-30-11) em temperatura ambiente e ressuspendidas em 10 ml de água estéril. Foi verificada a densidade ótica (D.O.) em 600 nm e as células foram diluídas para  $10^7$  células/ml (o que corresponde à D.O. igual a 1,0).

Em seguida, foram realizados os tratamentos, que consistiram em manter a cultura de *S. cerevisiae* em aproximadamente 30°C sob agitação em tubos de ensaio contendo  $10^7$  células/ml e 200 µg/l de AM na forma leuco, com volume final de 3 ml, por 3 horas. Foram retiradas alíquotas para determinação da sobrevivência celular e mutagênese antes da adição da substância teste (0 minuto, não tratado), imediatamente após a adição da substância teste (1 minuto) e após incubação por 3 horas (180 minutos). Para a avaliação da sobrevivência celular pós-os tratamentos, foram feitas diluições seriadas em água estéril e as alíquotas foram plaqueadas em duplicatas em meio YPD sólido e mantidas em estufa a 30°C por aproximadamente 96 horas. Para a avaliação da mutagênese celular após tratamento, alíquotas concentradas de 500 µl foram plaqueadas em duplicatas em meio YNBD sólido acrescido de canavanina (60 mg/ml), e mantidas em estufa a 30°C por aproximadamente 96 horas.

As colônias de sobreviventes e mutantes Can<sup>R</sup> foram contadas após um período de aproximadamente 96 horas. Em seguida, foi plotada a média dos resultados em gráficos de fração de sobrevivência ( $N/N_0$ ) (mais ou menos o erro padrão) x tempo, onde  $N_0$  representa o número inicial de células e  $N$  é o número de células após cada tratamento, e em gráficos de número de mutantes/ $10^7$  células x tempo. Todos os experimentos foram realizados de forma independente, por, pelo menos, três vezes.

Na figura 17 está o esquema da metodologia para avaliação da citotoxicidade e mutagênese em levedura testadas com a forma leuco do AM



**Figura 17** Esquema da metodologia para avaliação da citotoxicidade (sobrevivência) e mutagênese em levedura testadas com a forma leuco do AM. aa: aminoácidos; D.O: Densidade ótica; YNBD: meio *Yeast Nitrogen Base*; YPD: meio *Yeast Peptone Glucose* Fonte: adaptado de DINIZ; PAIVA; AQUINO; GONÇALVES *et al.* (2019).



## 7.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas usando o *GraphPad Prism version 6.00* para Windows.

Os dados com distribuição paramétrica da citotoxicidade e mutagênese ( $\text{His}^- \rightarrow \text{His}^+$ ) foram obtidos através do método *One-way ANOVA* seguido do pós-teste *Turkey's Multiple Comparison Test*, sendo considerado um nível de significância de  $p < 0,05$ .

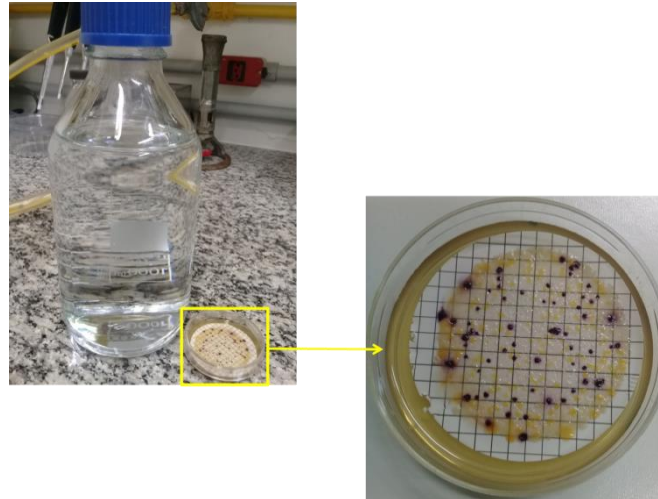
Para os dados com distribuição não paramétrica da citotoxicidade e mutagênese direta ( $\text{Can}^R$ ) foram utilizados os testes *t-student* seguido do teste de *Mann-Whitney*, adotando diferença significativa quando  $p < 0,05$ .

Na bioestatística, asteriscos são utilizados para indicar o nível de significância estatística alcançado em um teste de hipótese entre grupos ou condições. Um asterisco (\*) representa um nível de significância de 95%, indicando uma diferença estatisticamente significativa. Dois asteriscos (\*\*) indicam um nível de significância de 99%, enquanto três asteriscos (\*\*\*) representam um nível de significância de 99,9%. Quanto mais asteriscos, maior a certeza estatística da diferença observada entre os grupos comparados. Em gráficos de barras, asteriscos acima das barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos representados.

## 7.8 RESULTADOS *in vitro*

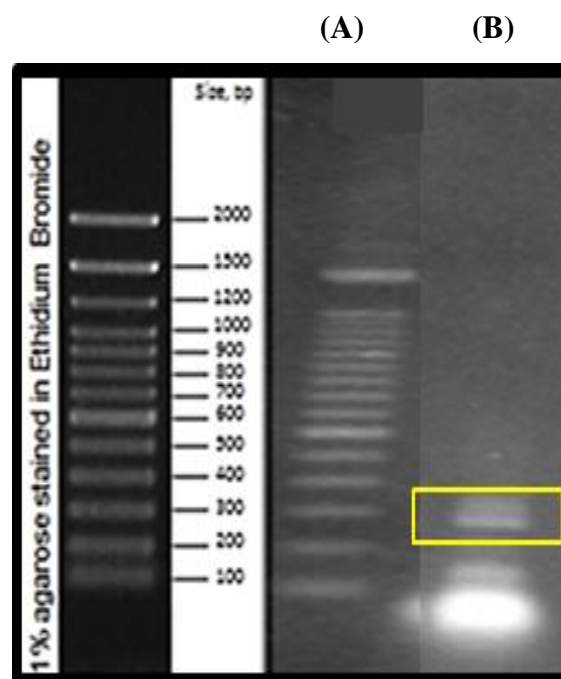
### 7.8.1. Análise por metagenômica das amostras de água

Através da técnica de membrana filtrante, foi possível verificar a presença de 70 colônias de coliformes fecais e incontáveis coliformes totais em amostra de 100 ml de água do poço artesiano conforme mostrado na figura 18.



**Figura 18:** Presença de coliformes fecais e totais em 100 ml de água do poço de água contaminada.

Após a extração e amplificação do DNA genômico das amostras, os produtos de PCR foram purificados e analisados por eletroforese em gel de agarose. As amostras da água do poço apresentaram um produto intensamente amplificado com aproximadamente 250pb, como apresentado na figura 19.



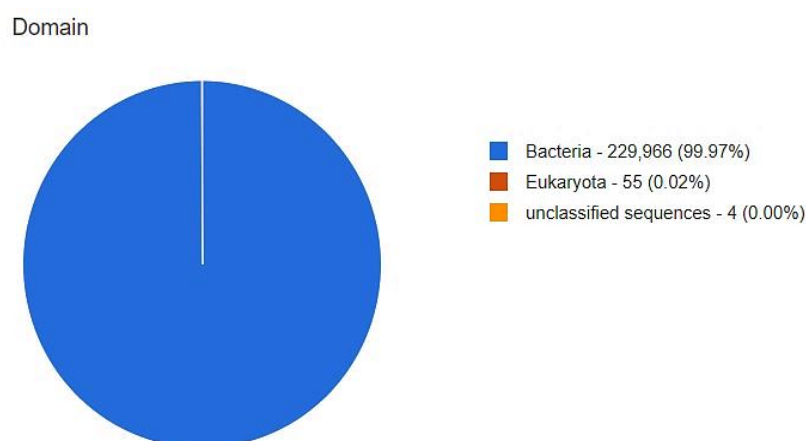
**Figura 19:** Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. (A) marcador de peso molecular de 2000 pb. (B) produto de PCR da amostra de água do poço em gel de agarose 1,5%. Retângulo amarelo indicando o tamanho dos fragmentos de DNA encontrados nas amostras de água do poço.

### 7.8.2 Análise por metagenômica e diversidade toxonômica antes do tratamento AM/SODIS da água contaminada

O *Metagenomics Rapid Annotation using Subsystem Technology* (MG-RAST) é um *pipeline* metagenômico disponível online. Após a análise, filtragem de sequências baseadas em qualidade de leitura (tamanho das sequências) e a classificação de espécies e classificação das diferentes funções gênicas, foram realizadas análises taxonômicas e filogenéticas pelo banco de dados MG-RAST. O conjunto de dados *poco. IonXpress\_005\_200pb* foi carregado em 05/11/2019 às 17:44:26 e obteve 333.762 sequências totalizando 78.610.179 pares de bases com comprimento médio de 236 bp.

Os resultados mostrados aqui são exibidos para avaliar a qualidade e o conteúdo do conjunto de dados que representam a análise automatizada gerada pelo *pipeline* de processamento automatizado MG-RAST. Os gráficos abaixo representam a distribuição das taxas usando um algoritmo contigLCA, encontrando uma única entidade taxonômica consensual para todos os recursos em cada sequência individual.

Foi demonstrada a predominância do domínio Bacteria (99,97%) na amostra de água do poço conforme apresentado na figura 20.



**Figura 20:** Distribuição dos domínios filogenéticos encontrados na amostra da água de poço.

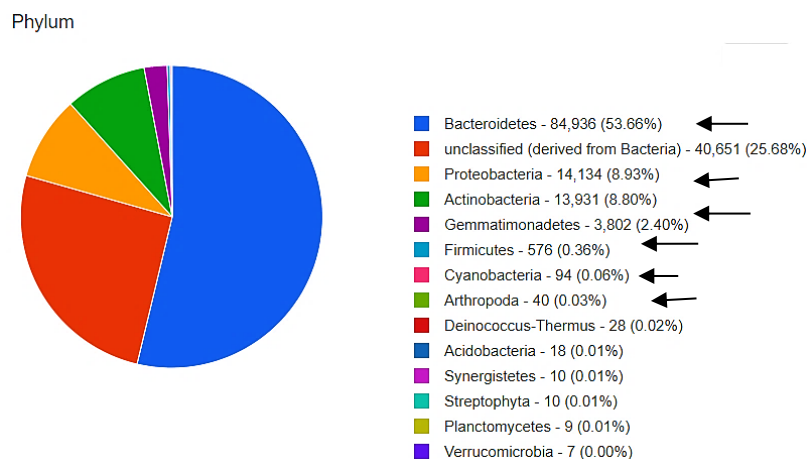
O domínio Bacteria foi caracterizado principalmente pela presença dos grupos Bacteriodetes não classificadas (derivadas de bactérias), Proteobacteria, Actinobacteria, Gemmatimonadetes, Firmicutes e Cyanobacteria, como apresentados na figura 21.

As bactérias dos filos Bacteriodetes (Gram-negativas ou didermos) e Firmicutes (Gram-positivas ou monodermos) são constituintes da microbiota residente intestinal em humanos e

animais. Os Gemmatimonadetes são um gênero bactérias que possui uma única ordem e família. (ZHANG; SEKIGUCHI; HANADA; HUGENHOLTZ *et al.*, 2003).

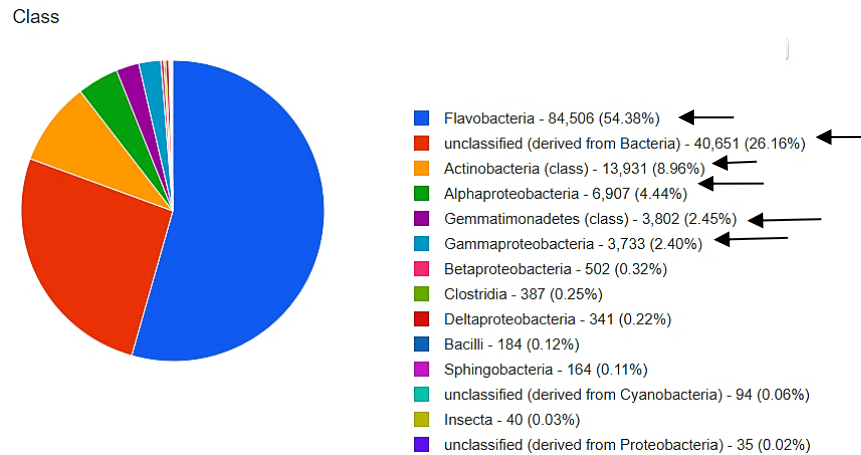
Os Actinomicetos causam graves moléstias no homem e nos animais. Dentre os patógenos incluídos no grupo, podemos mencionar o *Mycobacterium tuberculosis*, causador da tuberculose e o *Mycobacterium leprae*, causador da hanseníase.

Determinados gêneros de cianobactérias são fixadores de nitrogênio atmosférico e alguns gêneros produzem cianotoxinas, enquanto outros são produtores de hepatoxinas ou neurotoxinas, podendo ainda causar gastroenterites em mamíferos, inclusive na espécie humana. Isso ocorre apenas quando estão em proliferação, quando o ambiente se torna favorável a ela (METCALF; CODD, 2012).

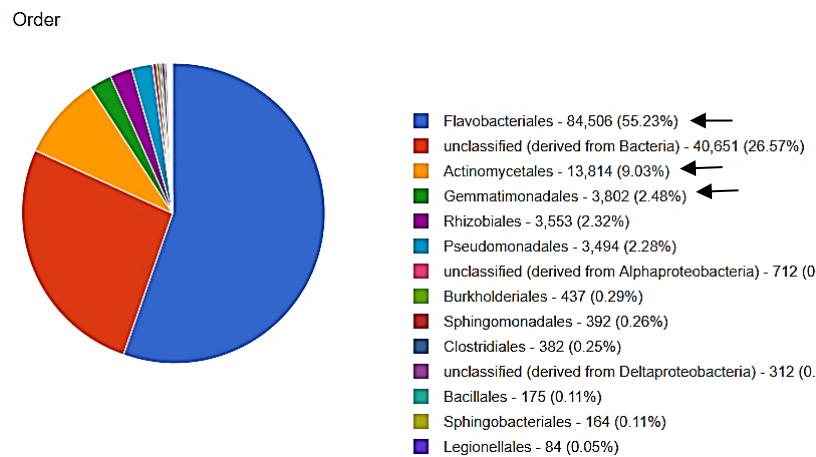


**Figura 21:** Distribuição dos grupos filogenéticos na amostra de água do poço artesiano não tratado. As setas indicam a prevalências dos principais grupos bacterianos patogênicos.

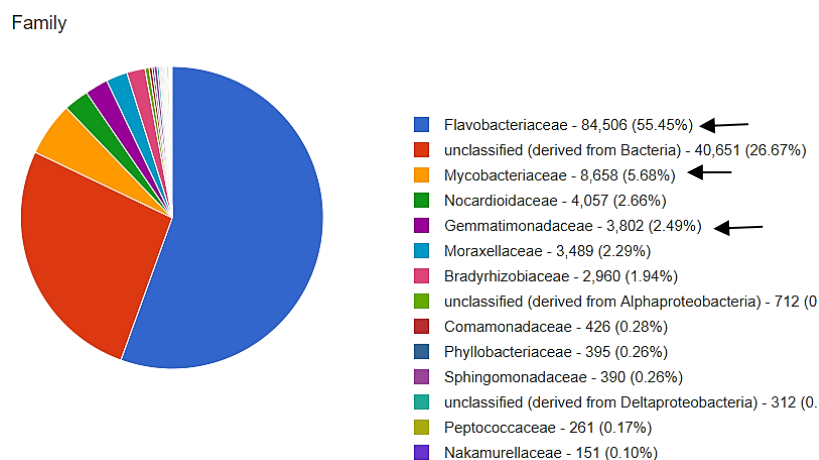
No domínio Bacteria, a classe predominante do filo Bacteroidetes foi a Flavobactéria, com 54,38%. O filo Proteobacteria (8,92%), como já mencionado, é um dos filis mais abundantes na microbiota intestinal humana. Muitos patógenos comuns entre humanos são encontrados neste filo, como, por exemplo, os gêneros *Brucella* e *Rickettsia* que pertencem à classe Alphaproteobacteria, os gêneros *Bordetella* e *Neisseria*, à classe Betaproteobacteria, enquanto os gêneros *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella* e *Yersinia* na classe Gammaproteobacteria (RIZZATTI; LOPETUSO; GIBIINO; BINDA *et al.*, 2017) figura 22.



**Figura 22:** Distribuição taxonômica de classes presentes nas amostras de água do poço artesiano sem tratamento. As setas indicam a prevalências dos principais grupos bacterianos patogênicos.



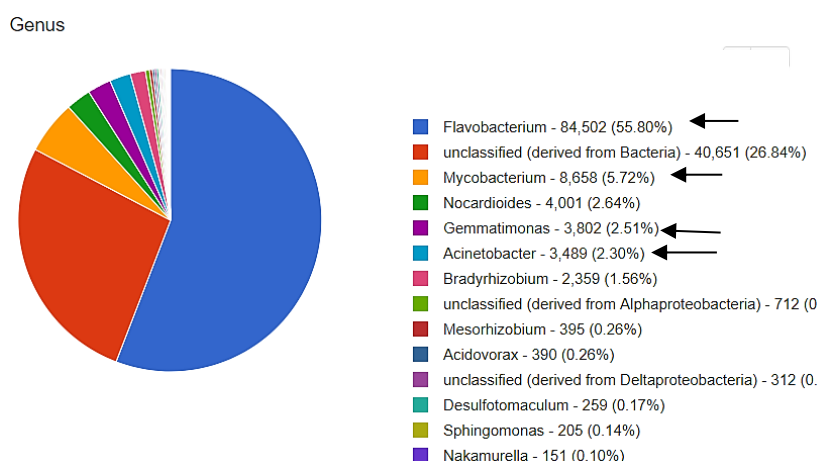
**Figura 23:** Distribuição taxonômica de ordens presentes nas amostras de água do poço artesiano sem tratamento. As setas indicam a prevalências dos principais grupos bacterianos patogênicos.



**Figura 24:** Distribuição taxonômica de famílias bacterianas presentes nas amostras de água do poço artesiano sem tratamento. As setas indicam a prevalências dos principais grupos bacterianos patogênicos.

Flavobacterium é um gênero de bactérias Gram-negativas, não-móveis e móveis, em forma de bacilo, são encontradas no solo e na água fresca, numa grande variedade de ambientes. Muitas espécies são conhecidas por causar doenças em peixes de água doce (BERNARDET; BOWMAN, 2006).

*Mycobacterium* ou micobactéria é um gênero de actinobactérias bacilares, aeróbicas obrigatórias, imóveis e altamente patogênicas, que causam diversas doenças, sendo as mais famosas a Hanseníase e tuberculose (figura 25). Acinetobacter é um gênero de bactéria Gram-negativa que pertence ao filo Proteobacteria. Não móveis, as espécies Acinetobacter são oxidase-negativas, e se apresentam em pares. São importantes organismos no solo, onde contribuem na mineralização de, por exemplo, compostos aromáticos. As Acinetobacter também são uma importante fonte de infecções hospitalares, quando atingem principalmente pacientes imunologicamente debilitados (GERISCHER, 2008).

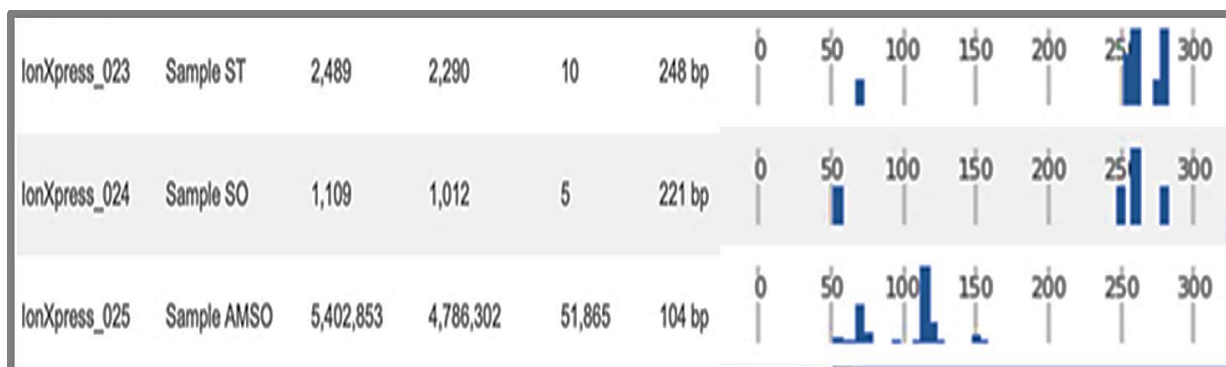


**Figura 25:** Distribuição taxonômica de gêneros presentes nas amostras de água do poço artesiano. As setas indicam a prevalências dos principais grupos bacterianos patogênicos.

### 7.8.3 Análise por metagenômica e diversidade taxonômica depois do tratamento AM/SODIS da água contaminada

Os resultados demonstraram que, após sequenciar uma região hipervariável do gene 16S rRNA, foi possível verificar fragmentos de DNA na amostra ST (sem tratamento) entre 50 pb e 100 pb assim como a partir de 248 pb ou mais. A presença de fragmentos maiores indica pouca ou nenhuma quebra do DNA. Na amostra SO (SODIS), verificou-se fragmentos de 50 pb e a partir de 221 pb sugerindo a fragmentação no DNA oriundas da exposição à

radiação solar. E, por fim, na amostra de água que foi submetida ao tratamento AMSO (AM/SODIS), foram encontrados fragmentos de tamanhos muito reduzidos, entre 50 e 150 pb indicando uma maior quebra do DNA, resultando na morte dos micro-organismos. Estes resultados estão representados na figura 26.

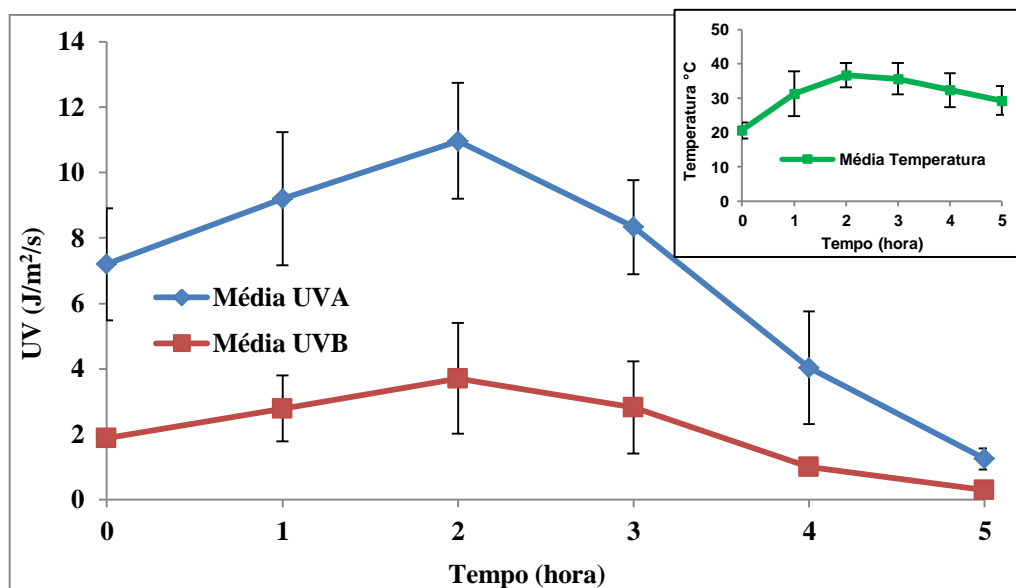


**Figura 26:** Distribuição dos tamanhos médios dos fragmentos amplificados após a amplificação do material genômico obtido após cada situação experimental. ST: sem tratamento; SO: tratamento SODIS; AMSO: tratamento AM/SODIS.

A quebra significativa do DNA em fragmentos menores após o tratamento AMSO resultando na morte dos micro-organismos demonstra a eficácia do processo de esterilização microbiológica da água. Os resultados corroboram estudos anteriores que mostram expressiva inativação microbiológica, como demonstrada por CARDOSO-RURR; DE PAIVA; PAULINO-LIMA; DE ALENCAR *et al.* (2019).

#### 7.8.4 Dosimetria das radiações UV

As garrafas PET foram expostas ao sol pleno entre 11:00 h e 16:00 h nos meses de junho de 2019 e janeiro e fevereiro de 2020 com temperaturas médias de 31°C no interior das garrafas. Durante as 5 horas do tratamento, as taxas médias de doses de radiação solar foram de 68,31 J/m<sup>2</sup>/s para UV-A e 2,08 J/m<sup>2</sup>/s para UV-B. Assim, as doses médias acumuladas de UV-A e UV-B são 1.229,58 kJ/m<sup>2</sup> e 37,44 kJ/m<sup>2</sup> respectivamente, para um período de 5 horas de exposição a sol pleno. As médias de doses e temperaturas estão representadas na figura 27, obtidas durante experimentos realizados sob luz solar no nível do mar, no Rio de Janeiro, Brasil (22,53°S, 43,17°W). Foram mensuradas as doses correspondentes de UV (taxas médias de dose) e as temperaturas medidas dentro da garrafa irradiada.



**Figura 27** – Monitoramento das taxas de dose de radiação solar (UV-A e UV-B) médias durante exposições de amostras nos meses de junho de 2019 e janeiro e fevereiro de 2020 entre 11:00 h e 16:00 h. No inserto, são registradas as temperaturas médias nas amostras de água expostas nas mesmas condições.

### 7.8.5 Confirmação dos genótipos em modelo bacteriano (Teste de Ames)

Os genótipos das cepas de *S. typhimurium* testadas devem ser confirmados: (a) imediatamente após a chegada das culturas no laboratório, (b) quando um novo conjunto de cepas é preparado para experimentos, (c) quando o número de revertentes espontâneos por placa sai da faixa normal ou (d) quando há perda de sensibilidade aos agentes mutagênico padrão. Assim, os controles das cepas TA 98, TA 100 e TA 102 foram confirmados conforme os dados apresentados na tabela 4.



**Tabela 4:** Resultados dos testes de rotina para certificação dos genótipos das cepas de *S. typhimurium* empregadas nos Testes de Ames

Testes	Cepas		
	TA 98	TA 100	TA 102
Cristal Violeta (1 mg/ml)	13 mm (halo de inibição)	14 mm (halo de inibição)	15 mm (halo de inibição)
Mutação de reparo de DNA ( <i>uvrB</i> )	Sensível	Sensível	Resistente
Dose de radiação UVC (1,5 J/m <sup>2</sup> /s)	(8 segundos)	(8 segundos)	(30 segundos)
Fator de resistência	Ampicilina resistente (25 µg/ml)	Ampicilina resistente (25 µg/ml)	Ampicilina resistente (25 µg/ml) Tetraciclina resistente (12 µg/ml)
Histidina (-)	Não cresceu	Não cresceu	Não cresceu
Mutantes espontâneos	30 -100	100 - 200	200 – 300

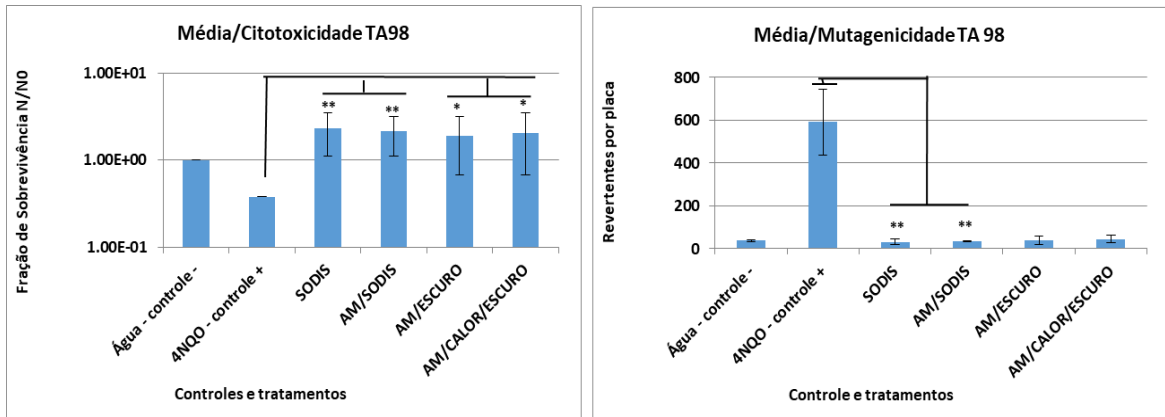
A tabela 5 mostra a atividade mutagênica expressa pelo Índice de Mutagênese (IM), a média do número de revertentes por placa e o percentual de sobrevivência aos tratamentos SODIS, AM/SODIS, AM/ESCURO E AM/ESCURO/CALOR após 20 min. Não foi observado o aumento de colônias revertentes His<sup>-</sup> → His<sup>+</sup> nas três cepas testadas estimuladas por esses tratamentos com ou sem a fração S9. Também não foi verificada a ocorrência de citotoxicidade, ou seja, nenhum desses tratamentos interferiu na sobrevivência bacteriana conforme apresentado nos gráficos das figuras 28 (A, B, C) e 29 (D, E, F). O DMSO (composto usado para solubilização dos controles positivos) não resultou em efeitos citotóxicos ou mutagênicos (dados não mostrados).

**Tabela 5:** Atividade mutagênica expressa pelo Índice de Mutagênese (IM), média do número de revertentes por placa das cepas TA 98, TA 100 e TA 102 de *S. typhimurium* expostas aos tratamentos controle positivo, SODIS, AM/SODIS, AM/ESCURO ou AM/ESCURO/CALOR com ou sem adição da fração S9 e porcentagem de sobreviventes.

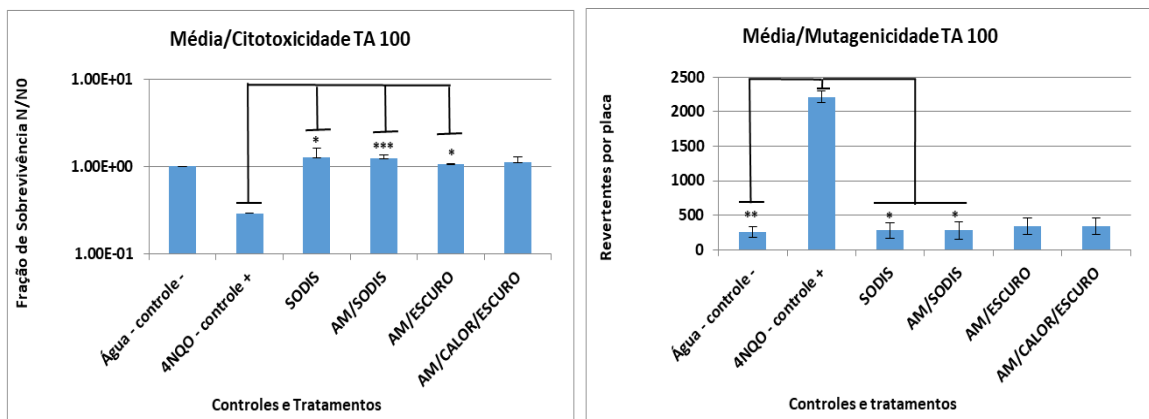
Cepa	Tratamentos	- Fração S9			+ Fração S9		
		IM <sup>(a)</sup>	His <sup>+</sup> (b)	% Sobrevivência <sup>(c)</sup>	IM <sup>(a)</sup>	His <sup>+</sup> (b)	% Sobrevivência <sup>(c)</sup>
TA 98	Água – controle negativo	1	37	100	1	74	100
	<b>Controle positivo</b>	<b>11 (4NQO)</b>	<b>403</b>	<b>17</b>	<b>7,8 (BaP)</b>	<b>575</b>	<b>33</b>
	SODIS	0,84	31	104	1,2	88	123
	AM/SODIS	0,95	35	97	1,3	98	108
	AM/ESCURO	1,06	39	86	1,3	99	78
	AM/ESCURO/ CALOR	1,19	44	94	1,3	94	98
TA 100	Água – controle negativo	1	259	100	1	109	100
	<b>Controle positivo</b>	<b>8,53 (4NQO)</b>	<b>2213</b>	<b>27</b>	<b>18,6(BaP)</b>	<b>2030</b>	<b>36</b>
	SODIS	1,08	280	117	1,8	199	122
	AM/SODIS	1,10	284	114	0,8	89	142
	AM/ESCURO	1,33	344	98	0,8	93	109
	AM/ESCURO /CALOR	1,32	344	103	0,8	90	84
TA 102	Água – controle negativo	1	373	100	1	104	100
	<b>Controle positivo</b>	<b>3,59 (4NQO)</b>	<b>1341</b>	<b>109</b>	<b>18,6 (MitC)</b>	<b>1940</b>	<b>38</b>
	SODIS	1,07	399	84	1,1	116	138
	AM/SODIS	1,00	376	85	1,1	112	139
	AM/ESCURO	1,07	399	91	1,5	160	142
	AM/ESCURO /CALOR	0,97	362	98	1,1	118	134

<sup>(a)</sup> Índice de Mutagênese (número de colônias His<sup>+</sup> induzidas na amostra tratada/número de colônias His<sup>+</sup> espontâneas no controle negativo); <sup>(b)</sup> colônias revertentes/placa; <sup>(c)</sup> porcentagem de sobrevivência calculada em relação ao controle negativo. A dose foi considerada tóxica quando a porcentagem de sobreviventes foi < 70%. O controle positivo na ausência de ativação metabólica com todas as cepas foi o 4-NQO [4-nitroquinolina N-óxido (0,5 µg/placa)]. Os controles positivos para ativação metabólica na concentração final de (1 µg/placa) foram B(a)P (Benzo [a] pireno) para as cepas TA 98 e TA 100, e MitC (Mitomicina C) na cepa TA 102. Os compostos usados como controles positivos foram dissolvidos em DMSO (dimetil sulfóxido). Os números em negrito correspondem aos efeitos mutagênicos e citotóxicos observados acima dos limites preconizados para o Teste de Ames sem e com ativação metabólica S9 (\**p* < 0,05).

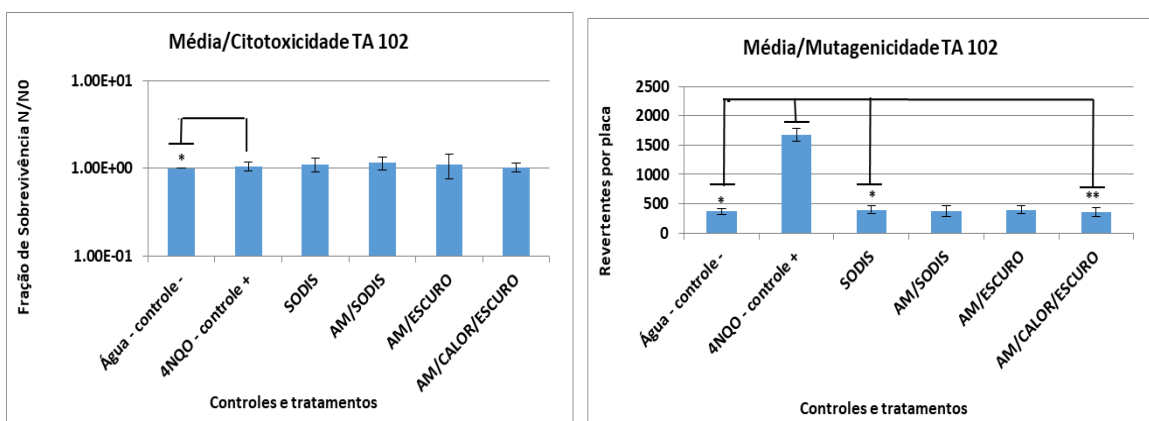
A



B

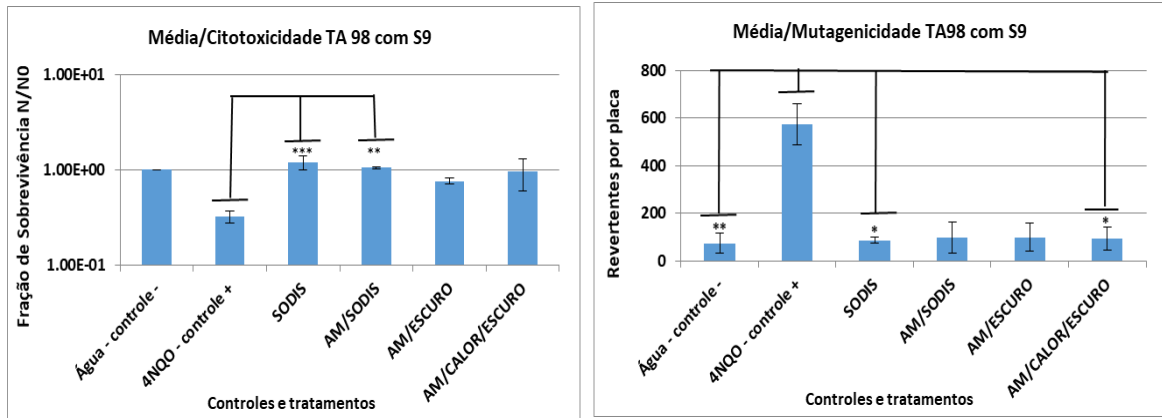


C

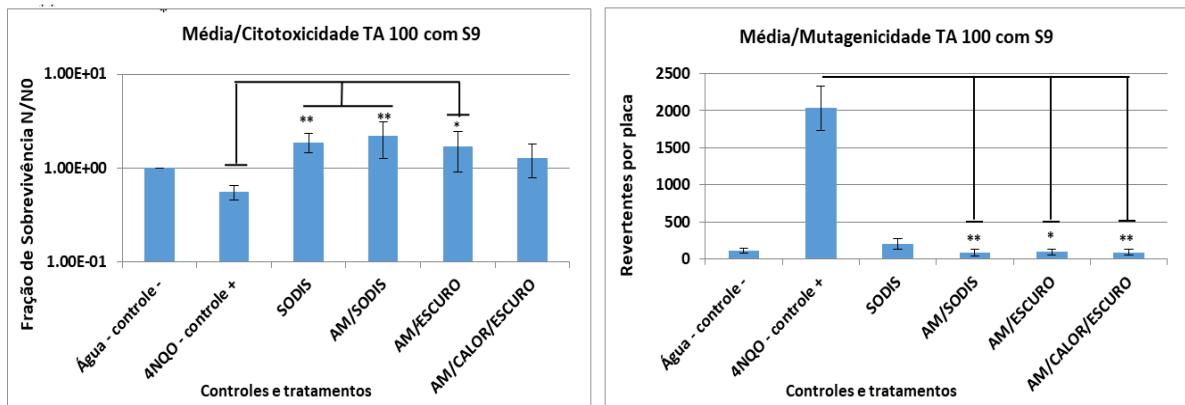


**Figura 28 (gráficos A, B, C)** – Culturas de *S. typhimurium* em fase estacionária de crescimento foram tratadas com os diferentes tratamentos indicados por 20 min, e diluídas  $10^{-7}$  vezes para determinar a fração de sobrevivência ( $N/N_0$ ), ou não foram diluídas para determinar as mutagêneses espontâneas e induzidas ( $His^- \rightarrow His^+$ ). Estes resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de, no mínimo, três experimentos independentes. A análise de variância (ANOVA One Way) com pós-teste *Dunn's multiple comparisons* revelou uma resposta significativa quando  $p \leq 0,05$ .

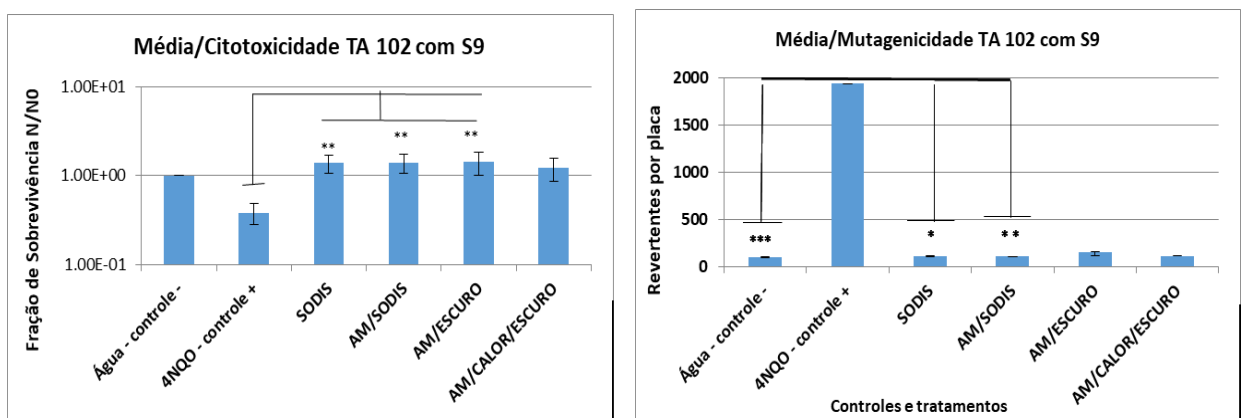
D



E



F



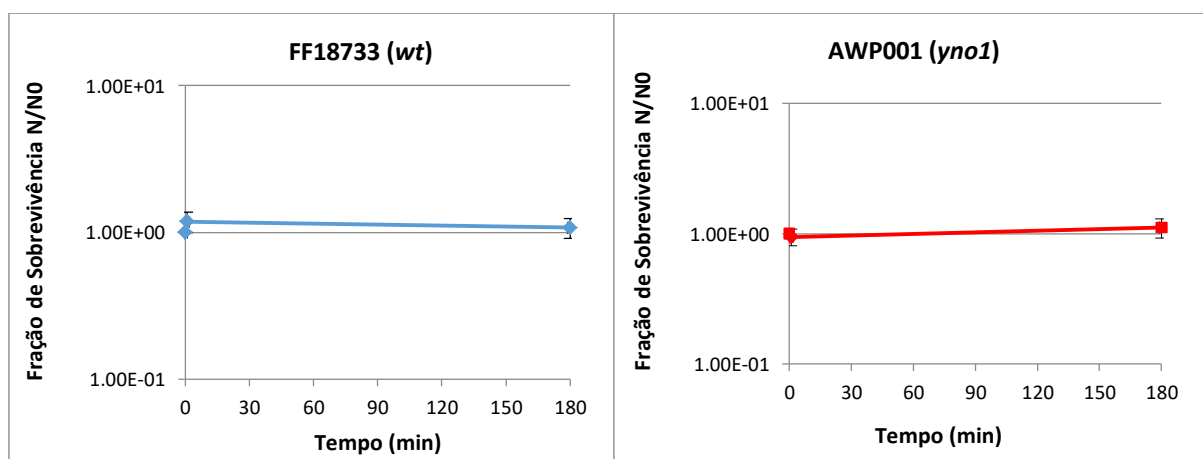
**Figura 29 (gráficos D, E, F)** – Culturas de *S. typhimurium* em fase estacionária de crescimento foram tratadas metabolicamente com a fração S9 nos diferentes tratamentos indicados por 20 min, e diluídas  $10^{-7}$  vezes para determinar a fração de sobrevivência ( $N/N_0$ ), ou não foram diluídas para determinar as mutagêneses espontâneas e induzidas ( $His^- \rightarrow His^+$ ). Estes resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de, no mínimo, três experimentos independentes. A análise de variância (ANOVA *One Way*) com pós-teste *Dunn's multiple comparisons* revelou uma resposta significativa quando  $p \leq 0,05$ .

### 7.8.6 Controles da citotoxicidade e da mutagênese espontânea (água) ou induzida (4NQO)

Tanto a citotoxicidade celular e a mutagênese espontânea (controle negativo, água) quanto a mutagênese induzida (controle positivo, 4NQO), são dados publicados de maneira que os controles não necessitaram de reprodução por se tratarem das mesmas cepas utilizadas neste estudo (DINIZ; PAIVA; AQUINO; GONÇALVES *et al.*, 2019) e (DINIZ; DOMINGOS; PINTO; CABRAL *et al.*, 2023). Foi possível observar que a cepa AWP001 (*yno1*) respondeu a concentrações crescentes de uma substância reconhecidamente cito- e genotóxica, a 4NQO, com uma relação dose-resposta diretamente proporcional, indicando seu potencial bioindicador de cito- e genotoxicidade induzidas por um composto químico que causa dano ao DNA. Tal etapa se configura como uma pré-validação interna da sensibilidade e capacidade preditiva do modelo celular adotado para os consequentes estudos de toxicidade em modelos animais (DINIZ; DOMINGOS; PINTO; CABRAL *et al.*, 2023).

### 7.8.7 Citotoxicidade da forma leuco do AM testada nas cepas FF18733 e AWP001

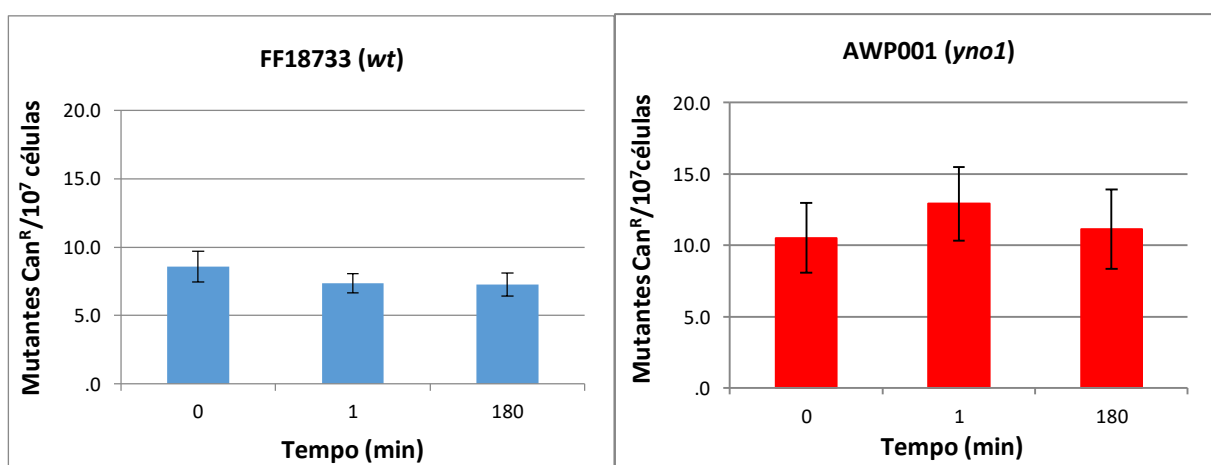
A citotoxicidade ou sobrevivência nas cepas FF18733 (*wt*) e AWP001 (*yno1*) está apresentada na figura 30. Como pode ser observado, o tratamento com 200 µg/l da forma leuco do AM não foi citotóxico nas leveduras durante 180 minutos de incubação.



**Figura 30** – Gráficos representando a fração de sobrevivência ( $N/N_0$ ) das cepas FF18733 (*wt*) e AWP001 (*yno1*). Estes resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de, no mínimo, três experimentos independentes. Todas as cepas que foram submetidas aos tratamentos AM-leuco (200 µg/l) nos tempos 1 minuto e 180 minutos não apresentaram diferença estatística com relação ao controle não tratado ( $p < 0,05$ ) – teste não-paramétrico *Mann-Whitney*.

### 7.8.8 Mutagenicidade da forma leuco do AM testada nas cepas FF18733 e AWP001

Com relação à mutagênese apresentada na figura 31, não foi possível observar o potencial mutagênico da forma leuco do AM na concentração de 200 µg/l durante 180 minutos, uma vez que não houve diferença estatística entre o número de mutantes  $\text{Can}^{\text{R}}/10^7$  células nas cepas tratadas e nas cepas não tratadas (controle).



**Figura 31** – Gráficos representando a mutagênese ( $\text{Can}^{\text{R}}/10^7$  células) das cepas FF18733 (wt) e AWP001 (*yno1*). Todas as cepas que foram submetidas aos tratamentos AM-leuco (200 µg/l) nos tempos 1 minuto e 180 minutos. Estes resultados representam a média ± erro padrão de no mínimo três experimentos independentes. Não houve diferença estatística com relação ao controle não tratado ( $p < 0,05$ ) – teste não-paramétrico *Mann-Whitney*.

## 7.9 DISCUSSÃO *in vitro*

A utilização de águas de fontes subterrâneas é uma alternativa de abastecimento em regiões urbanas, pois foram tradicionalmente consideradas como sendo de excelente qualidade física e química, estando aptas para o consumo humano, muitas vezes sem tratamento prévio e, principalmente, indispensável para as populações que não tem acesso à rede pública de abastecimento ou quando o abastecimento é irregular (FREITAS; BRILHANTE; ALMEIDA, 2001); (BAIRD, 2018).

Em um contexto de crise hídrica, que abrange, além da escassez da água potável, as águas subterrâneas, medidas de remediação que assumem um papel de protagonismo urbano (VILLAR, 2016).

Sabendo que a legislação federal brasileira determina os parâmetros de consumo de água limpa a serem analisados, bem como seus valores permitidos de tolerância de contaminação, torna-se necessária a verificação da qualidade destas águas consumidas pela população.

Nossos resultados permitiram concluir que a abordagem da metagenômica foi essencial na determinação das estruturas taxonômicas antes e após o tratamento AM/SODIS. Pôde-se observar a presença de micro-organismos constituintes da microbiota intestinal de humanos e animais que podem causar gastroenterites. Micro-organismos encontrados em esgotos, patógenos causadores de tuberculose, hanseníase e as *Acinetobacter* também são uma importante fonte de infecções hospitalares.

Estes resultados também permitiram verificar que a água de poço urbano analisada se encontra fora dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira para fins de potabilidade de água, uma vez que esta prevê a ausência dos microrganismos supracitados na tabela 1 (SAÚDE, 2011). Entretanto, após a irradiação solar, verificou-se a degradação geral do microbioma tratados com AM/SODIS, visto pelo sequenciamento da região hipervariável do gene 16S rRNA. A quebra do DNA resultando na morte dos micro-organismos prova que o tratamento AM/SODIS é eficaz no processo de esterilização microbiológica da água.

Este resultado corrobora os dados de CARDOSO-RURR; DE PAIVA; PAULINO-LIMA; DE ALENCAR *et al.* (2019) e com o artigo intitulado “*The Use of a Solar Simulator Device to Standardize Microbiological Decontamination of Contaminated Water by Solar Disinfection by the SODIS and MB/SODIS Protocols*” que foi aceito para publicação na revista *Photochemistry and Photobiology - Decision on Manuscript ID PHP-2024-06-RAR-0150* apresentado no Anexo A.

Microbiologicamente falando, a água desinfetada com a radiação solar (SODIS) é segura, conforme foi investigado neste estudo. Estudos foram realizados para quantificar a migração dos plastificantes DEHA [di(2-etilhexil) adifato] e DEHP [di(2-etilhexil) ftalato] que vazam das garrafas PET para a água durante o processo SODIS. O DEHA presente nas amostras de água variou entre 0,001 e 0,0256 µg/l e as concentrações de DEHP variou de 0,006 a 0,5320 µg/l ([http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/GDWQ/Chemicals/di2ethylhexylsum.htm](http://www.who.int/water_sanitation_health/GDWQ/Chemicals/di2ethylhexylsum.htm) e [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/GDWQ/Chemicals/di2ethylhexyphtasum.htm](http://www.who.int/water_sanitation_health/GDWQ/Chemicals/di2ethylhexyphtasum.htm)).

Assim, os resultados deste estudo sugerem que, independentemente da condição (aquecimento, sem aquecimento e sob luz solar), a lixiviação é geralmente baixa sendo inferior às doses de referência (JAGANATHAN, SENTHILNATHAN & PHILIP, LIGY,

2009). Portanto, de acordo com as diretrizes da OMS para a qualidade da água potável, a concentração dos compostos DEHA e DEHP está dentro dos limites permitidos de 80 µg/l e 8 µg/l respectivamente (WHO, 2011).

No que diz respeito à mutagenicidade, a água SODIS tratada em garrafas PET é segura para uso até o 30º dia, após o qual tais garrafas devem ser descartadas e substituídas por garrafas novas (MORAA, 2015).

As Diretrizes de Testes de Toxicologia Genética da OCDE recomendam uma bateria de testes com sensibilidade e especificidade para cada um dos principais resultados genéticos (OECD, 2020).

Tradicionalmente, o ensaio de mutação reversa bacteriana, ou Teste de Ames, é um dos testes de mutagenicidade *in vitro* padrão ouro empregado para monitorar os níveis de toxicidade da água e o mais frequentemente realizado devido ao seu custo-efetividade. Esta norma foi revisada e confirmada pela última vez em 2017. Portanto, esta versão permanece atual (ISO, 2012) e (OECD, 2020).

Neste estudo, os resultados indicam que os tratamentos SODIS, AM/SODIS, AM/ESCURO e AM/ESCURO/CALOR, nas concentrações de 200 µg/placa de AM, não induziram atividade mutagênica, mesmo com ou sem ativação metabólica por atividade hepática de ratos. Nenhum dos tratamentos reverteu as mutações nas cepas de *S. typhimurium*, seja por defasagem do referencial de leitura ("frameshift"), como na cepa TA 98, ou por substituição de bases nitrogenadas (transição ou transversão), como nas cepas TA 100 e TA 102. Com relação à sobrevivência bacteriana foi observado que somente a dose utilizada nos controles positivos foi considerada tóxica, visto que a porcentagem de sobreviventes foi menor que 70%.

A quantidade de colônias revertentes His<sup>+</sup> induzidas espontaneamente por placa é estatisticamente constante. No entanto, quando uma substância mutagênica é adicionada à placa, o número de colônias revertentes por placa aumenta, geralmente de uma forma relacionada com a dose.

Para se considerar que uma substância química é positiva no teste de Ames se faz necessário que ela induza um aumento do número de revertentes comparados aos valores observados nos controles negativos e seja dose-dependente, em uma ou mais cepas, na presença ou ausência de S9 Mix. Com relação ao aumento do número de revertentes, o critério mais amplamente empregado para determinar a positividade é o aumento de no mínimo 2 vezes o valor da média dos revertentes espontâneos (GATEHOUSE; HAWORTH; CEBULA; GOCKE *et al.*, 1994).



A *S. cerevisiae* é usada como modelo em estudos de reparo de DNA devido à similaridade entre seus genes de reparo e os de eucariotos superiores. Por esta razão, tem se destacado como modelo biológico promissor, especialmente na área de toxicologia genética (EKI, 2018), (GIRARD; BOITEUX, 1997) e de novos candidatos a filtros solares e antioxidantes (PINTO; DEODATO; CARDOSO; OLIVEIRA *et al.*, 2010); (PAIVA; SANTOS; KIBWILA; GONÇALVES *et al.*, 2014); (HOSSY; DA COSTA LEITÃO; DOS SANTOS; MATSUDA *et al.*, 2017); (DA SILVA; PAIVA; DINIZ; DOS ANJOS *et al.*, 2019); (DINIZ; PAIVA; AQUINO; GONÇALVES *et al.*, 2019); (PAIVA; DINIZ; LEITAO; CABRAL *et al.*, 2020).

Desta forma, embora seja necessário um conjunto de 4 ou 5 cepas para o Teste de Ames determinar as mutações genéticas mais previsíveis, apenas uma cepa de *S. cerevisiae* [AWP001 (*Yno1*)] foi suficiente para detectar eventos mutagênicos com o sistema de resistência à canavanina, representando um sistema eucariótico complementar robusto para substâncias mutagênicas.

Assim, no que se refere à avaliação da mutagênese, não foi possível observar o potencial mutagênico do tratamento AM/leuco na concentração de 200 µg/placa durante 180 minutos, uma vez que não houve diferença estatística entre o número de mutantes  $\text{Can}^R/10^7$  células nas cepas tratadas e nas cepas não tratadas (controle).

Como pode ser observado o tratamento com 200 µg/placa da forma leuco do AM não foi citotóxico nas leveduras durante 180 minutos de incubação.

## 7.10 CONCLUSÃO DAS ANÁLISES *in vitro*

A partir da análise do conjunto de resultados obtidos *in vitro*, supondo que uma pessoa beba 2 litros de água por dia tratada com AM/SODIS na concentração testada, os nossos resultados sugerem, nestes ensaios *in vitro*, que existe similaridade ao controle negativo (água). Somente o controle positivo foi citotóxico e mutagênico nos testes com procariotos e eucariotos.

### **CAPÍTULO 3**

#### **TESTE *IN VIVO***



## CAPÍTULO 3

### 8 INTRODUÇÃO AO ESTUDO *in vivo*

#### 8.1 Possível aplicação do processo AM/SODIS para consumo humano: investigação sobre a segurança do método.

As exposições controladas de seres humanos a substâncias perigosas ou potencialmente perigosas são restringidas por considerações éticas. Por essa razão, utilizam-se estudos em animais, como modelos experimentais, permitindo uma análise comparativa dos efeitos que estas substâncias provocam em humanos (POCHMANN; AMORIM, 2003).

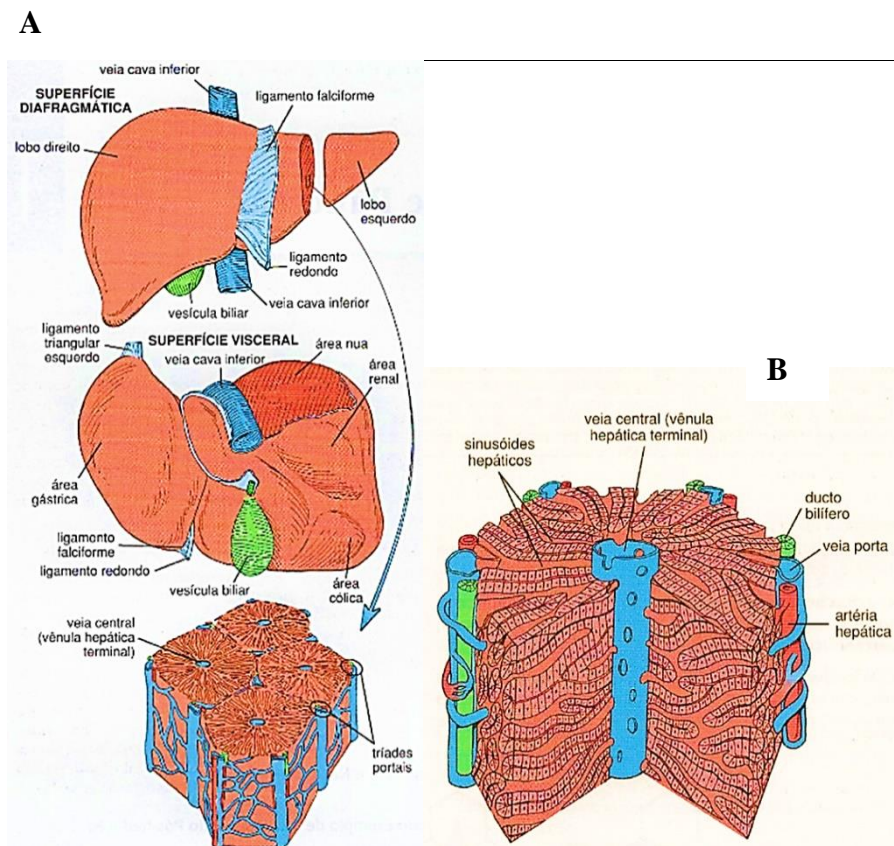
Os principais órgãos envolvidos na eliminação de xenobióticos são: o fígado e os rins. Devido ao seu metabolismo e relação única com o trato gastrointestinal, o fígado é um alvo importante para estudo da toxicidade de drogas, xenobióticos e estresse oxidativo. Os metabólitos gerados podem provocar lesões celulares devido à intensa participação deste órgão na detoxificação e excreção desses produtos. A lesão hepática provocada por drogas resulta em toxicidade direta e inclui degeneração hidrópica, esteatose, hepatite, necrose e apoptose (JAKUBOWSKI; AMBROSE; PARR; LINCECUM *et al.*, 2005) e (ZIMMERMAN, 2000).

Localizado na cavidade abdominal logo abaixo do diafragma é um dos maiores órgãos sólidos do corpo humano, apresentando uma massa média de cerca de 1,5 kg, correspondendo a até 2,5% da massa corporal total do adulto (VOLLMAR e MENGER, 2009).

É anatomicamente dividido por sulcos profundos os quais delimitam os chamados lóbulos hepáticos que são as unidades funcionais primária do fígado (figuras 32 A e B). Localizada ao longo do perímetro do lóbulo, a tríade portal consiste de uma pequena veia porta, artéria hepática e ducto biliar. O sangue entra no fígado pela veia porta e pela artéria hepática e flui através dos sinusóides em direção à veia central. Cordões de hepatócitos

formam o parênquima hepático. A superfície basolateral dos hepatócitos está em contato com endotélio descontínuo que constituem os sinusoidais. Esses vasos facilitam as interações entre o sangue e a superfície das células do hepatócito (WISSE, 1970).

A face apical dos hepatócitos adjacentes forma um canalículo biliar onde a bile é secretada e, em seguida, drenada em direção aos ductos biliares, que são revestidos por células epiteliais do ducto. Os canalículos biliares ligam-se aos ductos biliares através do Canal de *Hering*.



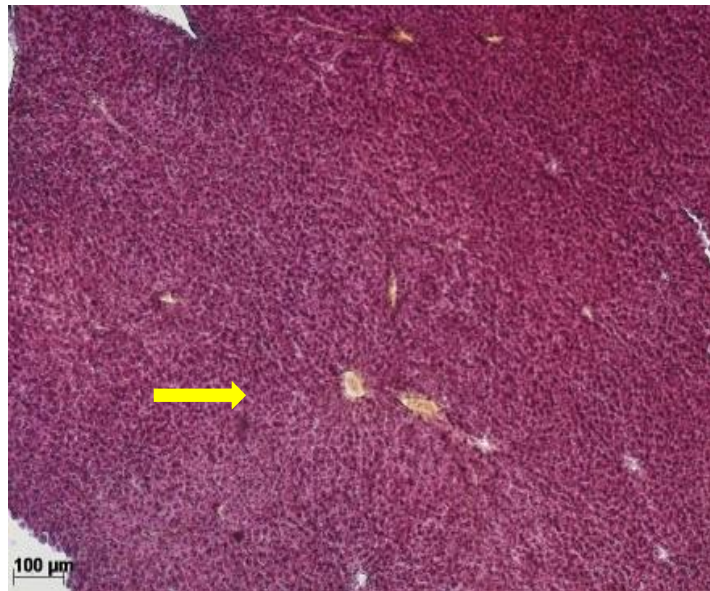
**Figura 32:** Esquema representativo do fígado e suas estruturas principais. Estrutura do lóbulo hepático (A) A triade portal consiste de ductos biliares, artéria hepática e veia porta. O sangue misturado a partir da veia porta e artéria hepática fluem pelos últimos hepatócitos através dos sinusóides revestidos por células endoteliais que drenam para a veia central. A bile produzida pelos hepatócitos é coletada no canalículo biliar e flui em direção ao ducto biliar. (B) Cada lóbulo hepático consiste em uma veia central e seis triades portais circundantes (DUNCAN; DORRELL; GROMPE, 2009).

O fígado participa de numerosos processos fisiológicos ligados à manutenção do equilíbrio metabólico. Sua principal função é a metabolização de substâncias endógenas e exógenas para posterior eliminação.

Além de controlar a homeostasia através da pressão arterial, os rins também são bastante afetados pela eliminação de substâncias tóxicas, pois constituem o principal

mecanismo de excreção dos metabólitos, dos quais o organismo já não necessita. Entre estas substâncias incluem-se a ureia, creatinina, ácido úrico, os produtos finais da degradação da hemoglobina, como a bilirrubina e os metabólitos de diversos hormônios. Essas substâncias têm que ser eliminadas do corpo tão rapidamente quanto são produzidas. Os rins também eliminam toxinas e outras substâncias ingeridas, como pesticidas, medicamentos e aditivos alimentares (HALL, 2021).

Nas observações ao microscópio óptico do fígado de camundongo *hairless* muitas células hepáticas aparecem uniformemente dispostas no corte histológico. Os sinusoides aparecem como áreas claras entre os cordões de células. Também presente nesta figura o parênquima hepático associado ao de tecido conjuntivo propriamente dito (estroma), a veia centro lobular em direção do qual se dispõem os cordões hepatócitos e entre estes os sinusoides formando lóbulos delimitados por septos e os espaços porta (figura 33).

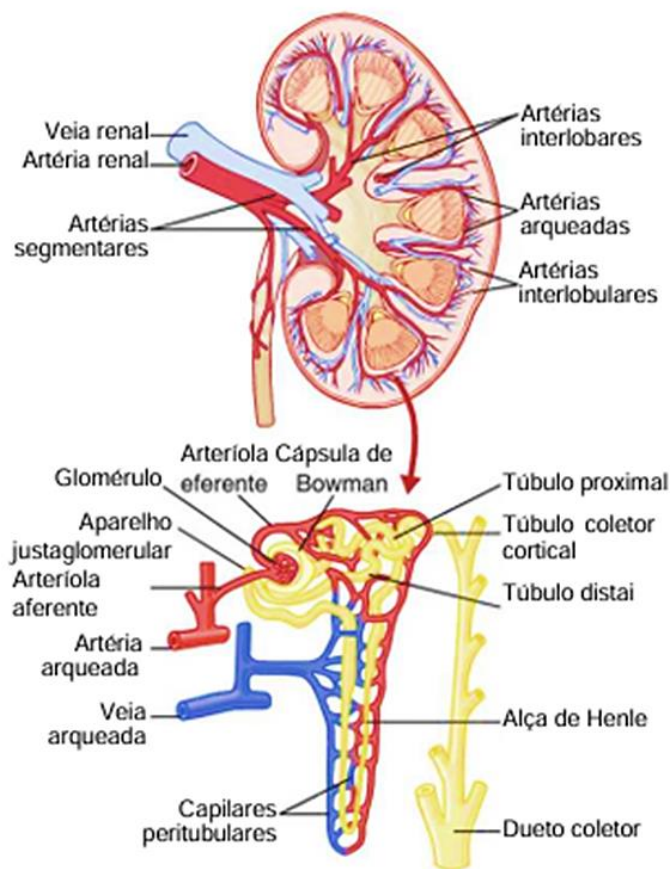


**Figura 33:** Parênquima hepático do camundongo *hairless* apresentando aspecto normal. Hepatócitos seta amarela; (HE). Barra de calibração 100 µm. Fonte: acervo do autor

O fígado possui um interessante repertório de respostas celulares e tissulares à lesão, independentemente da causa, assim como os produtos químicos não produzem o mesmo tipo de lesão hepática. Tais lesões ou efeito observado dependem do produto químico envolvido, da dose e da duração da exposição. Alguns tipos de lesão são o resultado de toxicidade aguda para o fígado, enquanto outros aparecem somente após exposição crônica ou tratamento. Nem toda toxicidade hepatocelular leva à morte celular. As células podem apresentar uma variedade de anormalidades morfológicas em resposta à injúria química e ainda se recuperar.

Estas incluem a degeneração de hepatócitos, morte celular por necrose, apoptose e autofagia de hepatócitos, inflamação e fibrose.

Os rins estão localizados no espaço retro peritoneal da parede abdominal posterior, cada um do lado da coluna vertebral, na altura da 12<sup>a</sup> vértebra torácica à terceira vértebra lombar, sendo o rim direito ligeiramente mais inferior, por causa da posição do fígado (figura 34). Cada rim pesa cerca de 150g e mede 10-12 cm de comprimento, 5 cm de largura e 2-3 cm de espessura (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).



**Figura 34:** Aspecto macroscópico de uma secção de um rim humano mostrando os vasos principais que suprem com fluxo sanguíneo o rim e esquema da micro- circulação de cada néfron (GUYTON; HALL; MORENO, 1971).

Com formato semelhante a um feijão, possui uma borda convexa e outra côncava, na qual se encontra o hilo, de onde sai o ureter e entram e saem os nervos e vasos sanguíneos. O hilo possui também dois ou três cálices, que se reúne para originar a pelve renal, parte superior, dilatada, do ureter. O rim é formado pela cápsula, de tecido conjuntivo denso, a zona cortical (camada mais externa e mais corada) e a zona medular (zona mais interna e menos corada). A zona medular é composta por 10 a 18 pirâmides medulares, ou de *Malpighi*, cujos

vértices apresentam saliências nos cálices renais, denominadas papilas, onde desembocam os ductos coletores, pelos quais a urina passa alcançando a pelve renal e o restante do ureter, bexiga e uretra. Da base de cada pirâmide saem os raios medulares, que penetram na região cortical do rim (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Cada lobo renal é composto por uma pirâmide e pelo tecido cortical que recobre suas bases e seus lados. Um lóbulo é formado por um raio medular e pelo tecido cortical encontrado em sua periferia, delimitado pelas arteríolas interlobulares (ROSS; PAWLINA; BARNASH, 2016).

Cada rim é constituído por 1 a 4 milhões de néfrons, que são as unidades funcionais dos rins, pois são capazes de realizar todas as funções renais. Este, por sua vez, é constituído por uma região dilatada, denominada corpúsculo renal ou de *Malpighi* (composto pelo glomérulo e pela cápsula de *Bowman* através da qual se produz a filtração do sangue e eliminação dos resíduos metabólicos) (ROSS; PAWLINA; BARNASH, 2016).

Ao penetrar na cápsula de *Bowman*, a arteríola aferente (abastece os néfrons desempenhando um importante papel na regulação da pressão arterial com o mecanismo da realimentação túbulo-glomerular) divide-se em várias alças capilares, formando o glomérulo. Esses capilares se unem novamente para formar a arteríola eferente, que resulta da convergência dos capilares do glomérulo. Essa arteríola desempenha um papel importante na manutenção da pressão de filtração glomerular, independentemente das flutuações da pressão arterial, e sai da cápsula de *Bowman* pelo pólo vascular (OGOBUIRO; TUMA, 2020).

Quando o sangue passa pelos capilares glomerulares, água e outras substâncias saem do sangue, passam através das células endoteliais e caem no espaço de *Bowman*, de onde seguem para os túbulos renais. Esse líquido produzido pelo glomérulo recebe o nome de filtrado glomerular e o processo pelo qual ele se formou chama-se filtração glomerular. Nos túbulos renais o filtrado glomerular é processado e transformado em urina (OGOBUIRO; TUMA, 2020).

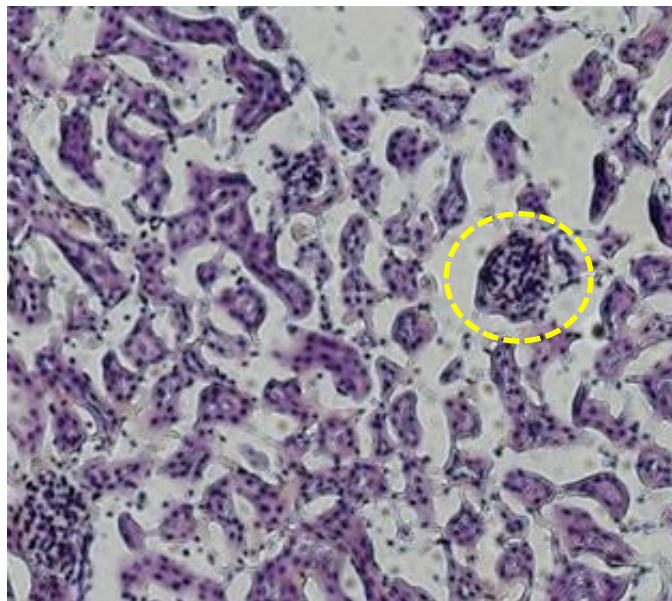
Os capilares glomerulares são formados por células endoteliais fenestradas. Existe uma membrana entre as células endoteliais e os podócitos chamados lamina basal glomerular. Essa lamina basal possui de 100 a 300 nm de espessura e é a principal barreira na filtração glomerular, impedindo que células e macromoléculas do sangue passem do sangue para o espaço de *Bowman*. A lâmina basal é formada por heparan sulfato, ácido siálico, colágeno tipo IV e glicoproteínas aniônicas, dispostas em forma de rede, formando uma verdadeira peneira. As fendas entre os pedicelos prolongamentos das células denominadas de podócitos as quais formam o folheto visceral da cápsula de *Bowman* constituindo assim uma barreira

física para a filtração glomerular. Além disso, as glicoproteínas aniônicas repelem a maioria das proteínas de carga negativa, constituindo uma barreira eletroquímica (OGOBUIRO; TUMA, 2020).

A lamina basal glomerular é composta por três camadas distintas: a lamina rara interna, que aparece clara na microscopia eletrônica e está localizada próxima às células endoteliais; a lamina densa, que é mais escura; e a lamina rara externa, que está próxima aos podócitos e tem uma tonalidade mais clara.

Outros componentes dos glomérulos incluem as células mesangiais, localizadas entre as alças dos capilares. Elas produzem uma substância amorfa chamada matriz mesangial e são responsáveis por fornecer suporte estrutural ao glomérulo. Além disso, as células mesangiais têm função contrátil e podem contrair o tufo capilar em situações de isquemia renal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Nas observações ao microscópio óptico do corte longitudinal do rim de camundongo *hairless* apresentados na figura 35, a ampliação de 100x apresenta o córtex e medula renais (corpúsculo de *Malpighi* e túbulos renais), espaço capsular glomerular, glomérulos e podócitos.



**Figura 35:** Parênquima renal de camundongos *hairless* com aspecto histológico normal. Corpúsculos renais linhas tracejadas amarelas. (HE) em ampliação de 100X. Barra de calibração- 100  $\mu$ m. Fonte: acervo do autor.

A exposição contínua dos seres humanos e outros animais a xenobióticos, a avaliação da função hepática e renal é essencial para compreender o grau de toxicidade promovido por diferentes substâncias (HALL, 2021).



## 8.2 Análise da expressão de marcadores de morte celular e toxicidade em células humanas

O método AM/SODIS combina a Desinfecção Solar com o AM como agente fotodinâmico, que ao absorver luz visível gera oxigênio singlete, inativando microorganismos de forma mais eficaz. Essa abordagem sinérgica é promissora para desinfecção microbiológica em regiões com baixa exposição solar e sem acesso à água tratada (CARDOSO-RURR; DE PAIVA; PAULINO-LIMA; DE ALENCAR *et al.*, 2019).

Neste contexto, devido à preocupação de que a forma leuco do AM possa ser prejudicial à saúde, avaliamos seus possíveis efeitos colaterais por meio de ensaios de viabilidade celular e identificação de moléculas envolvidas na morte celular.

### 8.2.1 Apoptose

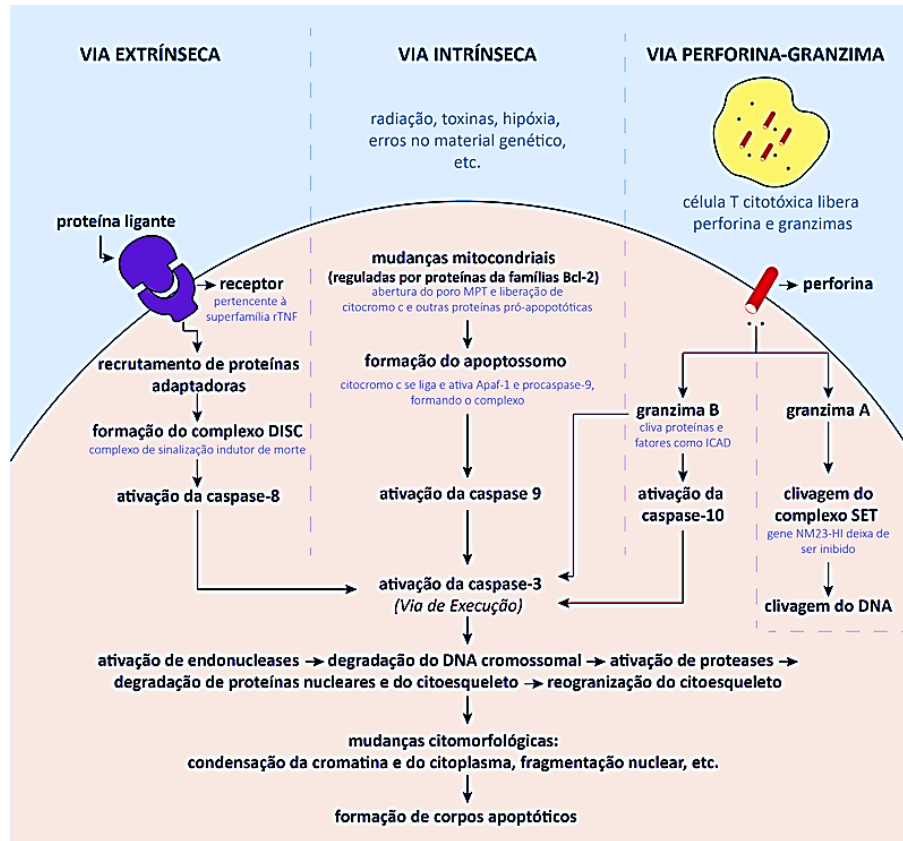
A apoptose é geralmente considerada uma morte celular programada mediada por caspases e esse processo leva à fragmentação do DNA nuclear e a degradação das estruturas intracelulares. As características morfológicas da apoptose incluem formação de vesículas de membrana celular, retração celular, condensação da cromatina e fragmentação nucleossômica, não havendo, porém, fragmentação da membrana celular. Sob circunstâncias normais, as células em apoptose são reconhecidas por macrófagos ou células vizinhas que fagocitam restos celulares (ELLIS; HORVITZ, 1986).

Duas famílias de proteínas estão envolvidas na morte celular por apoptose: a família Bcl-2, que controla a integridade da membrana mitocondrial e as caspases, que participam da cascata de reações que culminam com a desorganização do núcleo. Existem duas vias de sinalização moleculares distintas que levam à morte celular por apoptose: (a) a via intrínseca ou mediada por dano mitocondrial e (b) a via extrínseca ou extracelular ativada (LINDEN; REHEN; CHIARINI, 1999).

A via intrínseca é geralmente ativada em resposta a sinais de estresse intracelular, que incluem danos ao DNA e altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), bem como por infecção viral e ativação de oncogenes. A via extrínseca é desencadeada pela ligação de um ligante extracelular a um receptor na membrana plasmática. Ambas as vias provocam a ativação de caspases (proteases específicas para cisteína e ácido aspártico). Estas existem na forma inativa e quando ativadas são capazes de promover alterações na morfologia celular. Podem ser do tipo iniciadoras/ apicais (caspase-8, caspase-9 e caspase-10) e as caspases

efetoras / executoras (caspase-3, caspase-6 e caspase-7) (CREAGH; CONROY; MARTIN, 2003) e (CHEN; KANG; FU, 2018).

Os mecanismos da apoptose são altamente complexos e sofisticados, envolvendo uma cascata de eventos moleculares dependentes de energia conforme figura 36.



**Figura 36:** Representação esquemática de eventos apoptóticos. As duas principais vias de apoptose são extrínsecas e intrínsecas, bem como uma via perforina/granzima. Cada um requer sinais de disparo específicos para iniciar uma cascata de eventos moleculares dependentes de energia. Cada via ativa sua própria caspase iniciadora (8, 9, 10) que por sua vez ativará a caspase-3 executora. No entanto, a granzima A funciona de forma independente de caspases. A via de execução resulta em características citomorfológicas características, incluindo encolhimento celular, condensação da cromatina, formação de bolhas citoplasmáticas e corpos apoptóticos e, finalmente, fagocitose dos corpos apoptóticos por células parenquimatosas adjacentes, células neoplásicas ou macrófagos. Adaptado de ELMORE (2007).

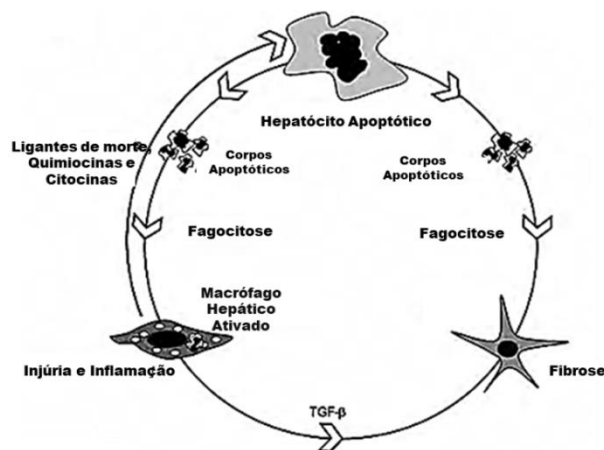
### 8.2.2 Apoptose dos hepatócitos

A morte celular no fígado ocorre principalmente por apoptose ou necrose, embora outras formas de morte celular possam ocorrer ocasionalmente (figura 37). A apoptose desempenha um papel crucial na remoção de células indesejadas, como células danificadas ou senescentes, e na remodelação tecidual durante o desenvolvimento, garantindo a homeostase do tecido hepático durante a renovação celular normal e controlando o crescimento e

regeneração do fígado. A identificação da apoptose *in vivo*, especialmente sob condições fisiológicas, pode ser desafiadora devido às baixas taxas de renovação celular e à rápida eliminação dos corpos apoptóticos. Em fígados normais, os corpos apoptóticos são identificados preferencialmente na área perivenular (zona 3) (BENEDETTI; JÉZÉQUEL; ORLANDI, 1988).

A apoptose é fundamental para a regulação do volume hepático, incluindo hiperplasia hepática substancial em camundongos deficientes no receptor de morte Fas/CD95, regressão da hiperplasia hepática por apoptose em diferentes modelos experimentais e regressão de ductos biliares anormalmente proliferados por apoptose em modelos de ratos. (ADACHI; SUEMATSU; KONDO; OGASAWARA *et al.*, 1995) e (GRASL-KRAUPP; ROSSMANITH; RUTTKAY-NEDECKY; MÜLLAUER *et al.*, 1998).

Além disso, a apoptose promove a regeneração do fígado, liberando sinais de crescimento que estimulam a proliferação de células progenitoras. Camundongos sem caspase 3 ou caspase 7, principais executores da apoptose, apresentam regeneração hepática prejudicada. As vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose se cruzam no fígado através da clivagem mediada pela caspase 8 do membro proapoptótico da família Bcl-2 (LI; HUANG; CHEN; PENG *et al.*, 2010).



**Figura 37:** A relação entre apoptose, inflamação e fibrose no fígado é ilustrada neste diagrama, onde a apoptose dos hepatócitos desempenha um papel central. Quando expostos a estímulos apoptóticos, como sais biliares tóxicos ou ácido palmítico, hepatócitos vulneráveis passam por morte celular, formando corpos apoptóticos. Esses corpos podem ser fagocitados por macrófagos hepáticos (células de Kupffer) ou células estreladas hepáticas. Os macrófagos ativados liberam ligantes de morte, como Fas ligand e TRAIL, que podem induzir a apoptose dos hepatócitos. Além disso, citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, são secretadas por macrófagos ativados, contribuindo para a inflamação e lesão hepática. Em um ambiente inflamado, com sinais fibrogênicos aumentados, como TGF- $\beta$ , a fagocitose dos corpos apoptóticos pelas células estreladas hepáticas resulta em sua ativação em miofibroblastos. Essas células remodelam a matriz extracelular, levando à fibrose e eventualmente cirrose hepática (GUICCIARDI; MALHI; MOTT; GORES, 2013).

### 7.2.3 Apoptose das células do parênquima renal

A apoptose é um processo essencial no funcionamento normal dos rins onde as células apoptóticas são prontamente removidas por células vizinhas, evitando resposta inflamatória. No entanto, se as células apoptóticas não são removidas adequadamente, podem progredir para necrose secundária, causando inflamação e lesões renais (HAVASI; BORKAN, 2011).

Durante o desenvolvimento, o rim passa por um processo de alta taxa de apoptose, onde a morte celular é considerada em termos do órgão como um todo, e não apenas em compartimentos específicos. Este equilíbrio entre proliferação e morte celular é crucial para manter constante o número total de células, eliminando aquelas danificadas ou não mais necessárias. Durante esse processo, o rim não apenas contém células apoptóticas, mas também expressa níveis elevados de vários genes relacionados à apoptose (HO, 2014).

Entretanto o rim maduro dos mamíferos é um órgão quiescente com pouca atividade mitótica e apoptose mínima nos rins humanos adultos, limitando o processo de nefrogênese ao período embrionário. No entanto, o rim maduro é capaz de proliferação celular em certas circunstâncias, incluindo células renais diferenciadas. Observações indicam a existência de células-tronco no rim adultas envolvidas na manutenção da homeostase tecidual e recuperação após lesão (THOMASOVA; ANDERS, 2015).

Na lesão do rim adulto, a morte celular pode afetar diferentes compartimentos, como os tubulares e glomerulares, e diversos tipos celulares, incluindo células tubulares proximais e distais, além de células endoteliais e glomerulares. Esse processo desempenha um papel crucial nas doenças renais, sendo a perda celular geralmente resultado de necrose regulada ou liberação de células vivas, em vez de apoptose. (HAVASI; BORKAN, 2011).

### 7.2.4 Injúria das células tubulares do parênquima renal

A injúria das células tubulares é crucial na investigação da morte celular na doença renal. Fatores como lesões tóxicas ou isquemia afetam predominantemente as células epiteliais tubulares, especialmente o segmento tubular proximal ativo metabolicamente. Isso é um mediador chave da lesão renal aguda (LRA), levando a um rápido declínio na função renal (KENNEDY II; STENBERG; LACKGREN; HENSLE *et al.*, 1994). Em condições como obstrução ureteral unilateral aguda, a apoptose das células tubulares é desencadeada por distensão, isquemia e estresse oxidativo. Na isquemia renal seguida de reperfusão (I/R), a apoptose nas células tubulares proximais é iniciada, resultando em danos às células e função

renal comprometida. Na doença renal crônica, a apoptose e necrose das células tubulares contribuem para a atrofia e fibrose renal, impulsionando a progressão da doença. Na doença renal diabética, a hiperglicemia induz estresse oxidativo e apoptose nas células tubulares (PRICE; HODEIFY, 2012).

Agentes tóxicos, toxinas, metais pesados e agentes antineoplásicos também podem induzir a apoptose das células tubulares renais. Estudos mostram que diferentes modalidades de morte celular podem coexistir na mesma lesão renal, destacando a importância das vias de sinalização e funções celulares específicas na determinação do tipo de morte celular (ORRENIUS; NICOTERA; ZHIVOTOVSKY, 2011) e (VERVAET; D'HAESE; VERHULST, 2017).

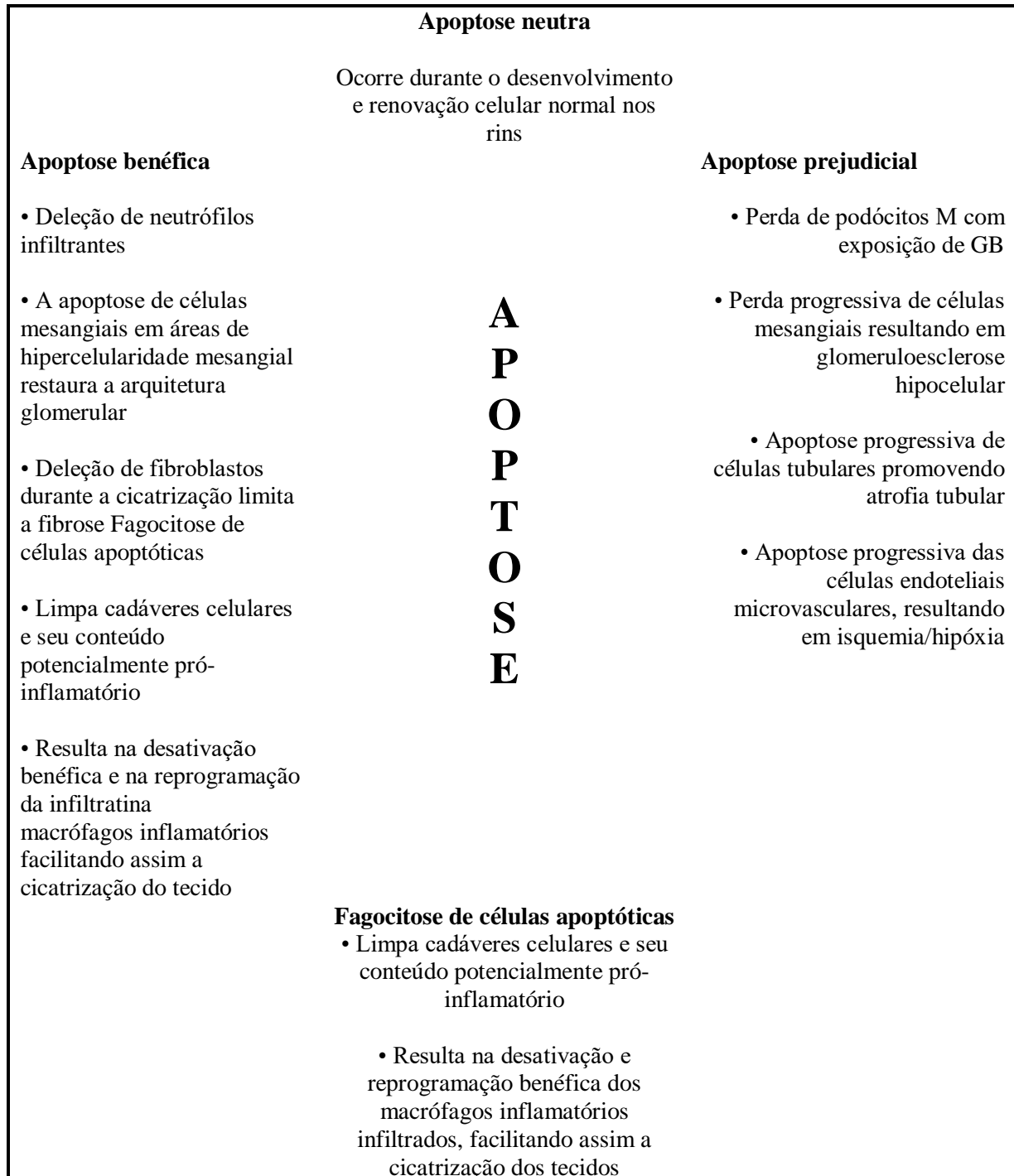
### **7.2.5 Injúria Celular Glomerular**

Na glomerulonefrite proliferativa, a falta de morte celular compensatória resulta em um aumento da densidade celular no glomérulo devido à proliferação de células mesangiais e endoteliais. Na glomerulonefrite crescente, a progressão da doença está relacionada à fibrose dos crescentes glomerulares e do interstício renal, onde a proliferação de macrófagos e células epiteliais parietais desempenha papéis cruciais. Apesar da presença de apoptose, seu papel parece ser menos significativo que o da proliferação celular na glomerulonefrite crescente (SAVILL, 1999).

A morte celular, especificamente a apoptose, é importante na regulação da hiperplasticidade e na reparação glomerular. Na glomerulonefrite, a apoptose é essencial para controlar o tamanho da população glomerular e eliminar células em excesso, contribuindo para a restauração da função glomerular normal. No entanto, em casos de glomerulosclerose progressiva, a apoptose pode se tornar um mecanismo de esgotamento celular, correlacionando-se com a esclerose glomerular e a diminuição da função renal (JUNG; LEE; KWAK; LI et al., 2012).

Na síndrome nefrótica idiopática, o comprometimento dos podócitos desempenha um papel crucial. Tanto as células glomerulares residentes quanto os leucócitos infiltrantes podem entrar em apoptose nos glomérulos, e há sinais de corpos apoptóticos em glomérulos inflamados. Esses indícios sugerem que a apoptose serve como um mecanismo homeostático que contribui para a regulação da densidade celular no glomérulo. Em resumo, a apoptose desempenha um papel complexo na injúria celular glomerular, sendo essencial para a regulação da hiperplasticidade em algumas condições e contribuindo para a patogênese em

outras, dependendo do contexto patológico específico, figura 38 (BURLAKA; NILSSON; SCOTT; HOLTBACK *et al.*, 2016).

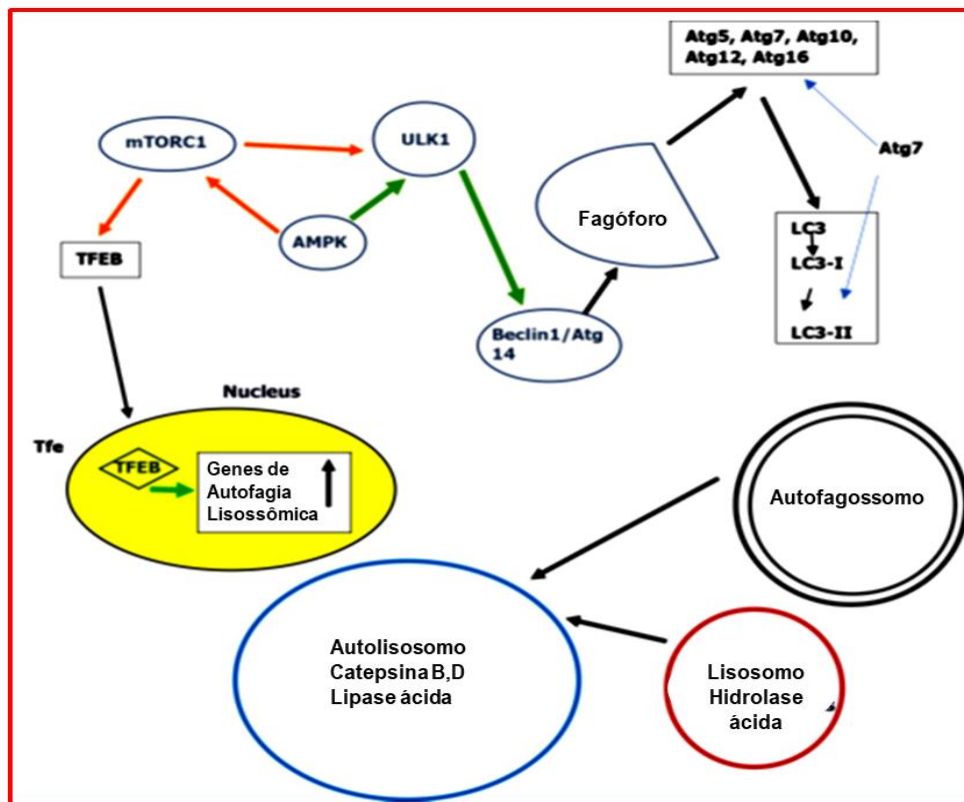


**Figura 38:** Esquema do papel da apoptose na injúria celular glomerular, dependendo do contexto patológico específico. A apoptose é extensivamente investigada em modelos experimentais de glomerulonefrite e em doenças humanas, sendo reconhecida como uma situação de dupla atuação. Ocorre dentro do rim como parte da homeostase normal dos tecidos. Durante a inflamação renal pode ter efeitos prejudiciais ou benéficos, dependendo do contexto biológico em que ocorre. Adaptado de: HUGHES e SAVILL (2005).

### 8.3 Autofagia

A autofagia é um processo evolutivamente antigo através do qual as células eucarióticas eliminam material citoplasmático descartável ou potencialmente perigoso, para apoiar o metabolismo bioenergético e adaptar-se ao estresse. A autofagia acontece em todas as células do reino animal em condições basais, sendo um mecanismo de eliminação de resíduos intracelulares e de proteção em condições de estresse celular, principalmente de deficiência nutricional, hipóxia ou estresse oxidativo. O processo de autofagia está subdividido em etapas de indução, alongação e maturação. Um processo característico da autofagia é a formação de vesículas multimembranares denominadas fagóforos, os quais se alongam e se fecham sobre si mesmos formando autofagossomos ou vacúolos autofágicos responsáveis por carregar os resíduos citoplasmáticos até os lisossomos. Existem três vias principais de degradação, as quais diferem essencialmente nos meios de entrega de carga para o lisossoma, que são: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (MURROW; DEBNATH, 2013).

A proteína beclina-1 (ou BECN1), juntamente com a P13-K e a Atg 14, forma um complexo que regula o processo de nucleação e formação de vesícula, isto é, a formação do fagóforo no início do processo e que pode ser inibido pela família Bcl-2, Bcl2/Bcl-XL (proteínas anti-apoptóticas) na ausência de estímulos estressantes. A beclina 1 pode ser considerada marcador do processo de autofagia conforme figura 39 (UCHIYAMA; SHIBATA; KOIKE; YOSHIMURA *et al.*, 2008).



**Figura 39:** Um esquema simplificado das vias de macroautofagia no fígado. A iniciação começa com a ativação do complexo quinase 1 tipo unc-51 (ULK1, Atg1 em levedura) seguido por beclin 1 (Atg6 em levedura) e uma cascata subsequente de proteínas Atg levando à formação de autogossomo onde LC3 (Atg8 em levedura) está implicado. LC3 é posteriormente processado para formar inicialmente LC3-I e depois LC3-II. A fusão dos autogossomos com os lisossomos forma o autolisossomo, onde as proteases ácidas (entre as quais as catepsinas são importantes) e as lipases degradam proteínas e lipídios. O início da autofagia é controlado por dois sensores metabólicos, o alvo do complexo 1 de rapamicina em mamíferos (mTORC1) e a proteína quinase ativada por AMP (AMPK). mTORC1 regula negativamente a autofagia inibindo ULK1. A AMPK suprime a atividade do mTORC1. A regulação em longo prazo da autofagia é realizada pelo fator de transcrição EB (TFEB), principal regulador da biogênese lisossômica e da autofagia. Sob condições ricas em nutrientes, o mTORC1 fosforila o TFEB e retém o TFEB no citosol. Setas laranjas: Inibição. Setas verdes: Regulação positiva. mTORC1: alvo mamífero do complexo 1 de rapamicina; TFEB: Fator de transcrição EB; ULK1: Complexo quinase 1 semelhante a Unc-51 complex. Adaptado de KOUROUMALIS; VOUMVOURAKI; AUGOUSTAKI e SAMONAKIS (2021).

### 8.3.1 Autofagia dos hepatócitos

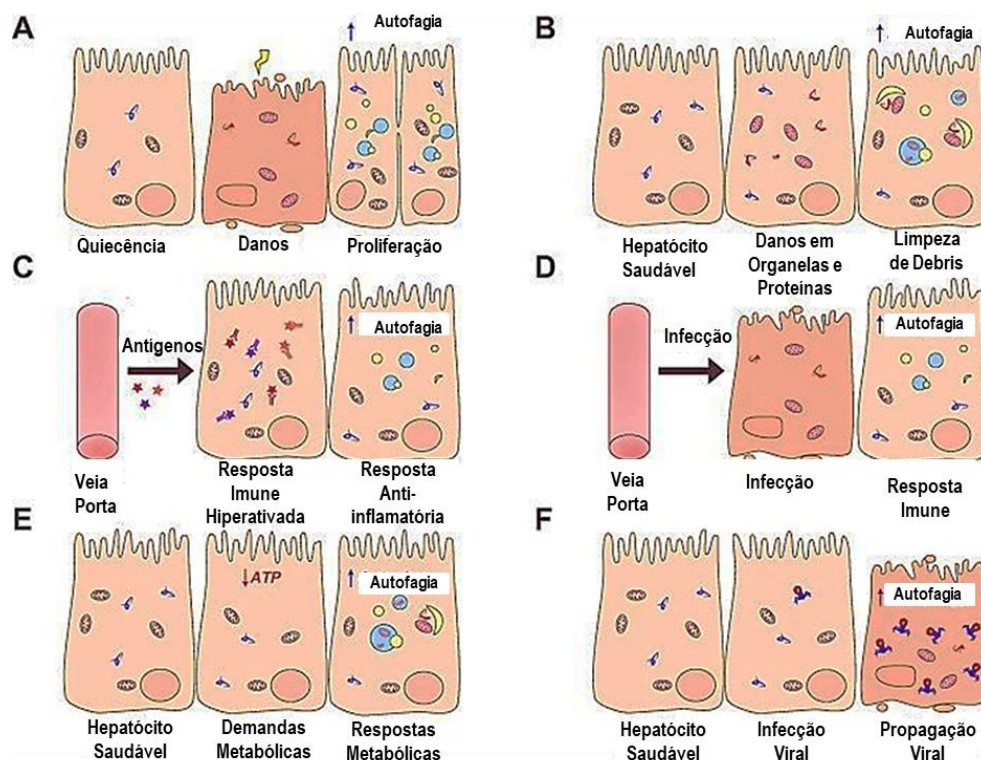
A autofagia ocupa uma posição chave na regulação de múltiplas funções hepáticas, bem como na preservação da homeostase do fígado. Embora os hepatócitos geralmente permaneçam em repouso, eles podem proliferar rapidamente em resposta a lesões, aumentando o risco de transformação maligna na ausência de autofagia eficiente. Além disso, as funções hepáticas essenciais no metabolismo de glicose e lipídios estão intimamente



ligadas à autofagia (GALLUZZI; PIETROCOLA; BRAVO-SAN PEDRO; AMARAVADI *et al.*, 2015).

A autofagia basal no fígado é significativamente maior do que em outros órgãos, como o cérebro. E os hepatócitos têm renovação limitada, o que os torna suscetíveis à acumulação de subprodutos celulares prejudiciais sem uma autofagia eficiente (UENO; KOMATSU, 2017).

A autofagia no fígado desempenha um papel fundamental ao fornecer importantes efeitos citoprotetores e anti-inflamatórios, especialmente em resposta à exposição a xenobióticos e mediadores inflamatórios. Além disso, atua como uma linha de defesa primária contra infecções por vírus hepatotrópicos, os quais são a principal causa de distúrbios hepáticos em escala global. No entanto, é essencial notar que vários vírus, incluindo o vírus da hepatite B, desenvolveram estratégias para explorar a maquinaria autofágica, visando promover sua replicação e disseminação, figura 40 (GALLUZZI; GREEN, 2019).



**Figura 40:** Principais funções da autofagia na fisiologia e patologia do fígado. (A) A autofagia ocupa um papel central na preservação da homeostase do fígado, porque apoia o elevado potencial regenerativo do órgão, (B) limpa os hepatócitos de subprodutos potencialmente citotóxicos do metabolismo celular normal, (C) limita as respostas inflamatórias potencialmente prejudiciais às toxinas e antígenos da circulação portal, (D) apoia respostas imunes contra patógenos invasores e (E) desempenha um papel crítico na manutenção do metabolismo local e sistêmico. (F) No entanto, vários vírus hepatotrópicos adquiriram a capacidade de aproveitar a maquinaria autofágica para seu próprio benefício. Adaptado de KOUROUMALIS; VOUMVOURAKI; AUGOUSTAKI e SAMONAKIS (2021).

### 8.3.2 Autofagia no rim

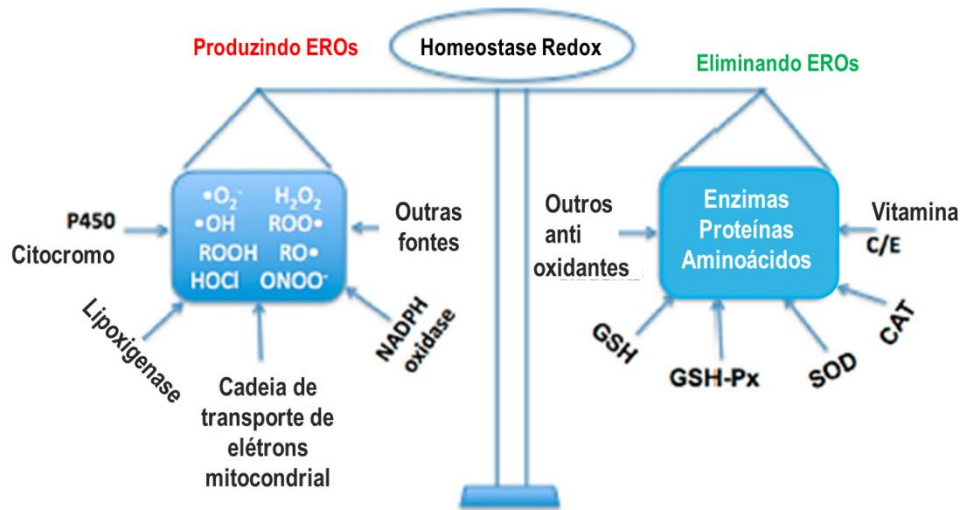
A autofagia é claramente necessária para manter a saúde do rim. Várias injúrias renais comuns têm sido mostradas para causar alterações na autofagia, incluindo isquemia, lesão tóxica e inflamação. A autofagia desregulada, excessiva e defeituosa está implicada em uma variedade de estados patológicos. Por exemplo, a autofagia excessiva contribui para a expansão de colônias de células malignas no câncer de células renais; a autofagia insuficiente, um resultado da isquemia renal, facilita a morte celular; e a autofagia desregulada leva à inflamação crônica, doenças autoimunes e modifica o ambiente inflamatório intra-renal, potencialmente prevenindo a infiltração de células imunes. Muitas injúrias renais comuns, como isquemia e lesão tóxica, principalmente afetam as células epiteliais tubulares, especialmente o segmento tubular proximal altamente metabolicamente ativo. Os túbulos são responsáveis pela reabsorção e secreção de vários solutos e o dano a essa parte do néfron é um mediador chave da lesão renal aguda, definida como uma rápida deterioração da função renal. (JIANG; WEI; DONG; KOMATSU *et al.*, 2012), (LEVENTHAL; HE; ROSS, 2014), (DECUYPERE; CEULEMANS; AGOSTINIS; MONBALIU *et al.*, 2015).

Distúrbios na autofagia renal, como isquemia, lesão tóxica e inflamação, são comuns e contribuem para várias doenças. A regulação inadequada da autofagia pode levar a várias doenças. A autofagia desregulada causa inflamação crônica e doenças autoimunes, quando excessiva pode contribuir para a expansão de células malignas no câncer de células renais e autofagia insuficiente é resultado de isquemia renal e facilita a morte celular. A taxa de morte celular renal pode variar em diferentes nefropatias, promovendo a perda celular em condições como a necrose tubular aguda, rejeição aguda, glomerulonefrite necrotizante ou atrofia renal, enquanto pode diminuir em glomerulonefrite proliferativa, doença renal policística e neoplasias (HAVASI; DONG, 2016).

## 8.4 Estresse Oxidativo

O termo "estresse oxidativo" é usado para descrever o dano oxidativo em macromoléculas biologicamente relevantes, como ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e carboidratos, quando as moléculas relacionadas excedem as defesas antioxidantes celulares. ERO importantes, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e ânion superóxido ( $O_2^-$ ), além de aldeídos relacionados à peroxidação lipídica, atuam como mediadores que afetam vias de sinalização celular e a resposta de células-alvo, figura 41. A concentração de moléculas

relacionadas ao estresse oxidativo afeta a citotoxicidade, apoptose e a progressão da fibrose no nível tecidual, celular e molecular, podendo ser influenciada por diferentes condições, incluindo fatores de crescimento, citocinas e outros mediadores (CADENAS, 1989).



**Figura 41:** Homeostase redox no fígado. Adaptado de LI; TAN; WANG; ZHANG *et al.* (2015)

#### 8.4.1 Estresse oxidativo hepático

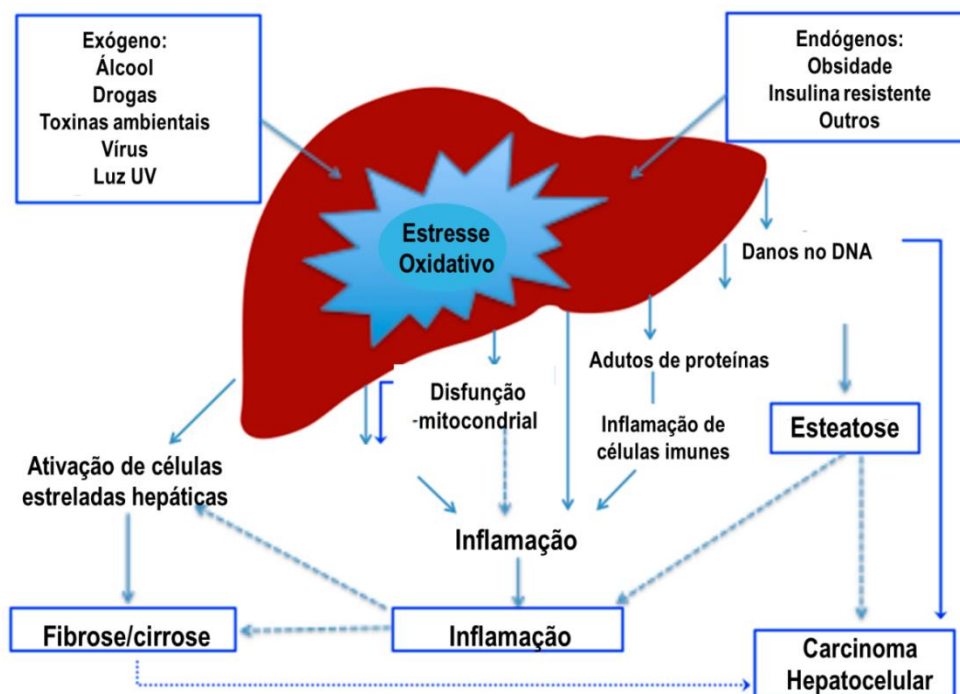
O estresse oxidativo desempenha um papel fundamental na iniciação e progressão de várias doenças hepáticas, incluindo hepatite viral crônica, doenças hepáticas alcoólicas e esteato-hepatite não alcoólica. Ele não apenas causa danos diretos ao fígado, mas também modula diversas vias biológicas normais, como transcrição gênica, expressão de proteínas, apoptose celular e ativação de células estreladas hepáticas. Esse mecanismo patológico complexo envolve interações entre fatores patológicos, inflamação, radicais livres e respostas imunológicas. O estresse oxidativo sistêmico decorrente de doenças hepáticas também pode afetar órgãos extra-hepáticos, como o cérebro e os rins, contribuindo para a patofisiologia de várias doenças renais (FENG; WANG; YE; LI *et al.*, 2011)

A fibrose hepática, por sua vez, é uma resposta celular dinâmica e integrada à lesão hepática crônica, caracterizada pela necrose parenquimatosa, hepatite crônica e alterações na matriz extracelular. Moléculas relacionadas ao estresse oxidativo desempenham um papel patogênico nesse processo, modulando eventos celulares e teciduais envolvidos na progressão da fibrose hepática, em um processo semelhante ao observado em outras doenças

crônicas, como a aterosclerose e doenças degenerativas do sistema nervoso central (SINGAL; JAMPANA; WEINMAN, 2011)

O fígado é um órgão altamente afetado pelas espécies reativas de oxigênio (ROS). As células parenquimatosas do fígado são particularmente suscetíveis a danos causados pelo estresse oxidativo. Estruturas como mitocôndrias, microsomas e peroxissomos nessas células podem gerar ROS, regulando o PPAR, que desempenha um papel central na expressão gênica relacionada à oxidação de ácidos graxos hepáticos. Além disso, células como *Kupffer*, estrelas hepáticas e endoteliais são mais expostas ou sensíveis a moléculas relacionadas ao estresse oxidativo. Durante o estresse oxidativo, células de Kupffer podem produzir citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , aumentando a inflamação e a apoptose (SÁNCHEZ-VALLE; C CHAVEZ-TAPIA; URIBE; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, 2012).

No caso das células estreladas hepáticas, a peroxidação lipídica causada pelo estresse oxidativo desencadeia sua proliferação e síntese de colágeno. Os mamíferos desenvolveram um sistema antioxidante complexo para manter a homeostase redox no fígado, (figura 42), no entanto, um excesso de ROS pode perturbar essa homeostase, levando ao estresse oxidativo, que desempenha um papel crítico em doenças hepáticas e outros distúrbios crônicos e degenerativos (CICHOŹ-LACH; MICHALAK, 2014).



**Figura 42:** O esquema geral do mecanismo de estresse oxidativo induzido por vários fatores na doença hepática. Adaptado de LI; TAN; WANG; ZHANG *et al.* (2015).

#### 8.4.2 Estresse oxidativo renal

O estresse oxidativo desempenha um papel crucial na fisiopatologia tanto da Lesão Renal Aguda (LRA) quanto da Doença Renal Crônica (DRC) figura 43. Na LRA, ocorre uma perda abrupta da função renal, levando ao acúmulo de produtos tóxicos no sangue e à diminuição da produção de urina. Pode se manifestar de forma pré-renal, como consequência da diminuição do fluxo sanguíneo renal, a nível renal, devido a danos no parênquima renal ou pós-renal, causada pela obstrução do fluxo de urina do sistema coletor (RIM) e ureteres (VIAS URINÁRIAS). Em nível celular, a fisiopatologia da LRA envolve interações complexas entre células imunes e renais, resultando em inflamação. O processo de reparação pode levar à restauração da função renal ou ao desenvolvimento de fibrose renal crônica (PAVLAKOU; LIAKOPOULOS; ELEFThERIADIS; MITSIS *et al.*, 2017).

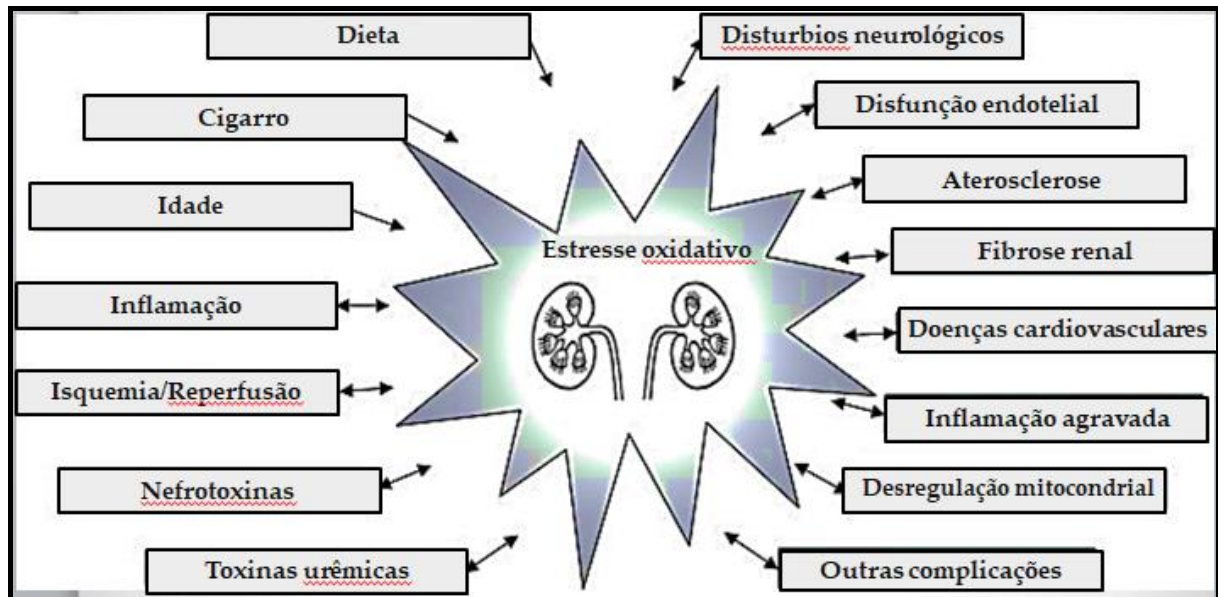
A hipoperfusão renal, causada pela diminuição do fluxo sanguíneo para os rins, é a principal causa de Lesão Renal Aguda (LRA). Isso pode levar à necrose tubular aguda isquêmica, afetando principalmente as células tubulares proximais e da alça ascendente espessa medular, devido às suas altas demandas de oxigênio. Após a lesão, ocorrem alterações estruturais ou morte celular, desencadeando inflamação e estresse oxidativo, principalmente nas mitocôndrias, que são a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS). As enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase e glutathione redutase, podem ser esgotadas. Essas alterações ocorrem tanto em casos de isquemia renal quanto de nefrotoxicidade. Além disso, a lesão isquêmica aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias e atrai fagócitos, que também produzem ROS, influenciando a vasoconstrição e a resistência vascular renal (DENNIS; WITTING, 2017).

A lesão renal causada pela sepse é resultado de causas tanto pré-renais (alterações hemodinâmicas, disfunção endotelial) quanto intrarrenais (inflamação e dano ao tecido renal, trombose nos glomérulos e obstrução tubular), embora a sequência exata de eventos ainda não seja completamente compreendida. Espécies reativas de oxigênio (ROS) estão envolvidas no desenvolvimento dessa lesão em múltiplos níveis. A indução inflamatória do óxido nítrico sintase induzível leva à produção excessiva de óxido nítrico (NO), que, por sua vez, desacopla a óxido nítrico sintase endotelial, gerando superóxidos altamente reativos pela oxidação do oxigênio. O NO excessivo compete com a superóxido dismutase (SOD) e reage com os radicais superóxido, criando peroxinitrito, que tem um efeito danoso direto nas células tubulares. Além disso, como a expressão do óxido nítrico sintase induzível é heterogênea, as

concentrações de NO variam, resultando em perfusão desigual. (PAVLAKOU; LIAKOPOULOS; ELEFTHERIADIS; MITSIS *et al.*, 2017).

As células inflamatórias, como as células dendríticas e os neutrófilos, utilizam espécies reativas de oxigênio (ROS) como parte de sua ação durante a Lesão Renal Aguda (LRA) séptica. As células dendríticas contribuem para o estresse oxidativo indiretamente, recrutando e ativando neutrófilos. Por sua vez, os neutrófilos ativados empregam dois mecanismos dependentes de ROS para combater ameaças imediatas: fagocitose e NETose. Ambos os processos requerem a ativação da NADPH oxidase 2 (NOX2) e a produção de superóxido. Estudos recentes demonstraram que o bloqueio da NOX2 e do óxido nítrico sintase induzível em neutrófilos reduz a lesão renal em modelos de camundongos com LRA induzida por sepse (AL-HARBI; NADEEM; AHMAD; ALANAZI *et al.*, 2019).

A necrose tubular induzida por drogas é uma forma aguda intrínseca de Lesão Renal Aguda (LRA) que resulta do efeito tóxico direto das drogas nas células tubulares renais. Um exemplo comum é a cisplatina, uma droga usada na quimioterapia contra vários tipos de câncer. A cisplatina desencadeia um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) após ser ativada em uma forma altamente reativa, ao reagir com moléculas contendo tiol, como a glutathiona (GSH), e esgotando-as. A redução nos antioxidantes celulares pode levar ao acúmulo de ROS endógenos, ativando vias de sinalização que resultam na morte das células tubulares renais. Além disso, a cisplatina pode causar disfunção mitocondrial, aumentando ainda mais a produção de ROS, e induzir a formação de ROS nos microssomos por meio de enzimas do citocromo P450. Estudos em pacientes gravemente enfermos com sepse e LRA mostraram uma correlação entre níveis elevados de produtos oxidativos proteicos e lipídicos circulantes e mediadores pró-inflamatórios, pró-oxidativos e citocinas. A relação entre LRA e estresse oxidativo é bidirecional em pacientes gravemente enfermos, já que o estresse oxidativo induzido na LRA contribui para danos adicionais (HANIF; BALI; RAMPHUL, 2023).



**Figura 43:** Causas e possíveis consequências do estresse oxidativo nas doenças renais agudas e crônicas. O aumento do estresse oxidativo ocorre como consequência de fatores comportamentais e processos fisiológicos e fisiopatológicos no corpo humano (painel esquerdo). Por sua vez, o estresse oxidativo contribui para o desenvolvimento de uma variedade de lesões (painel direito), que podem promover ainda mais o estresse oxidativo e agravar a causa inicial, criando um "círculo vicioso" entre estresse oxidativo e lesão tecidual. Adaptado de GYURÁSZOVÁ; GURECKÁ; BÁBÍČKOVÁ e TÓTHOVÁ (2020).

O gene OSGIN1, também conhecido como OKL38 (*Ovary, Kidney And Liver Protein 38*) no rim e fígado está localizado no cromossomo 16 e foi descrito para codificar uma proteína que regula a resposta ao estresse oxidativo e morte celular. Em células normais, a expressão de OSGIN1 é mediada pelo fator de transcrição relacionado ao fator nuclear E2 (NRF2), onde a proteína OSGIN1 pode então inibir a proliferação de células expostas a estresse oxidativo (LI; CHEN; YANES; LEE *et al.*, 2007)

Além disso, a OSGIN1 também pode ser regulada pelo supressor tumoral p53, que pode alterar a atividade do gene do núcleo para a mitocôndria, forçando a OSGIN1 a induzir apoptose (YAO; LI; VENTERS; ZHENG *et al.*, 2008) e (HU; YAO; GAN; TOKARSKI *et al.*, 2012). Portanto, a perda ou *downregulation* de OSGIN1 foi relatada para promover o crescimento do tumor em diferentes tecidos, principalmente no fígado (ONG; LEONG; TAN; VAN *et al.*, 2007).

A expressão da proteína OKL38 é importante na verificação da segurança e toxicidade causadas em sistemas biológicos, principalmente quando se envolve o estresse oxidativo induzido por múltiplos fatores tais como: radiação ionizante, xenobióticos, etc (HOSSY; DA COSTA LEITÃO; DOS SANTOS; MATSUDA *et al.*, 2017).

### 8.5 Estudos sobre a toxicidade subcrônica da forma leuco do AM. O uso de camundongos como modelo de estudo *in vivo*

Os modelos de estudos toxicológicos *in vivo* abordam ensaios de toxicidade aguda, subcrônica e crônica, onde estes devem tratar da mutagenicidade, embriofetotoxicidade, alterações de fertilidade, carcinogenicidade, e indução de dependência. Nos testes de toxicidade subcrônica, ou de curta duração, o experimento dura, geralmente, entre 21 e 90 dias, permitindo identificar se o efeito é cumulativo ou não. Desta forma, é possível detectar os órgãos afetados após serem submetidos a doses múltiplas (VALADARES, 2006).

Assim, a escolha de camundongos *hairless* para este experimento baseou-se em estudo anterior do nosso grupo e no de outros autores que mostraram grande sucesso na utilização destes animais nos modelos de indução da carcinogênese mostrando-se perfeitamente adaptável ao estudo da toxicologia (HOSSY; DA COSTA LEITÃO; DOS SANTOS; MATSUDA *et al.*, 2017).

Em 1924, a mutação *hairless* (Hrhr) foi encontrada em um camundongo que estava em um aviário em Londres, o qual foi levado ao The Jackson Laboratory em 1956, onde o Dr. Green cruzou este animal com uma fêmea BALB/c. Posteriormente, os descendentes foram cruzados entre si e em 1964, na geração F24, a espécie foi nomeada HRS/J (*The Jackson Laboratory. JAX® Mice Data Sheet* [text on line]; Disponível em: <http://jaxmice.jax.org/strain/000673.html>).

Esses camundongos homozigotos apresentam, além da falta de pelos, um timo rudimentar ou a total ausência dele, o que faz com que os animais tenham deficiência na produção de linfócitos T (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2006).

Neste contexto, a escolha do animal com baixa imunidade permitiu avaliar os possíveis danos causados pela molécula do AM nas suas formas leuco e oxidada, em baixíssimas concentrações, fazendo com que tais efeitos possam ser mais facilmente detectados.



## 8.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO CAPÍTULO 3

1. Analisar através da técnica de coloração por hematoxilina-eosina a morfologia no rim e fígado de animais submetidos à ingestão de água tratada ou não pelo método AM/SODIS;
2. Analisar através da técnica de imuno-fluorescência as expressões de caspase-3, beclina-1 e OKL-38 no rim e fígado de animais submetidos à ingestão de água tratada ou não pelo método AM/SODIS; e
3. Realizar a quantificação da fluorescência através do *GraphPad Prism* obtida com a expressão dos marcadores caspase-3, beclina-1 e OKL-38 através do programa *Leica Application Suite X (LAS X)* da *Leica Microsystems*.

## 8.7 MATERIAL E METODOLOGIA *in vivo*

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas todos adultos (HRS/J – UFRJ) (n=60), provenientes do biotério do Laboratório de Farmacologia Experimental - LEFEX do Departamento de Fármacos da Faculdade de Farmácia da UFRJ. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno medindo 41 x 34 x 16 cm, com capacidade para até 15 camundongos, as mesmas foram forradas com serragem. Os animais foram mantidos à temperatura de 25°C a 28°C, em fotoperíodo de 12/12 horas com iluminação artificial. Os animais receberam ração para roedores e a substância foi adicionada à água filtrada ou a água de poço e colocada em frascos de beber que foram acoplados às gaiolas dos animais, e oferecidos *ad libitum*, até completar as 13 semanas, (HEJTMANCIK; RYAN; TOFT; PERSING *et al.*, 2002) apresentados na figura 44. Os procedimentos adotados no estudo estão registrados sob Protocolo CEUA DAHEICB No. 65.



**Figura 44:** Esquema da metodologia *in vivo* utilizada adaptada de HEJTMANCIK; RYAN; TOFT; PERSING *et al.* (2002); CARMO (2007); HOSSY; DA COSTA LEITÃO; DOS SANTOS; MATSUDA *et al.* (2017).

Os camundongos foram distribuídos em 6 grupos: metade (10) bebeu água de poço e a outra (10), como controle, água filtrada. No primeiro grupo, denominado G1, os animais beberam água de poço irradiada com luz solar (SODIS); no segundo grupo (G2), os animais beberam água de poço adicionada de AM (100 ng/ml) (AM/SODIS) e submetida à luz solar. No terceiro grupo (G3), os animais beberam água de poço adicionada de AM que não foi submetida à radiação solar (ESCURO). A outra metade do grupo, que foi usada como controle, seguiu o mesmo desenho experimental proposto (G4, G5 e G6 respectivamente), porém, com água filtrada (Quadro 3) e figura 45.



**Figura 45:** Imagem ilustrativa referente ao alojamento dos animais durante o período do experimento, realizado no biotério do Laboratório de Farmacologia Experimental – LEFEX/FF.

**Quadro 3:** Desenho experimental dos grupos em estudo:

	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>	<b>G5</b>	<b>G6</b>
<b>Características dos grupos</b>	Água de poço irradiada com luz solar (controle)	Água de poço + AM (100ng/ml) irradiada com luz solar	Água de poço + AM (100ng/ml) no escuro	Água filtrada irradiada com luz solar (controle)	Água filtrada + AM (100ng/ml) irradiada com luz solar	Água filtrada + AM (100ng/ml) no escuro
<b>Número de animais e sexo</b>	10 mista	10 fêmeas	10 fêmeas	10 mista	10 machos	10 machos

### 8.7.1 Procedimentos cirúrgicos e microscopia óptica de rotina do fígado e rim em (HE)

Para realização das biopsias dos órgãos alvos do estudo, os animais foram submetidos à câmara de CO<sub>2</sub> para eutanásia. Posteriormente as vísceras (rim e fígado) foram removidas para análise. Em sequência estes órgãos foram submetidos à fixação em solução de paraformaldeído 4,0%, pH 7,4. Estas vísceras foram crioprotetidas em soluções crescentes de sacarose até 30% para montagem dos blocos. Os cortes histológicos (7,0 µm) em criostato (*Leica* CM1850 UV) foram submetidos à técnica de coloração de rotina [coloração por hematoxilina e eosina (HE)]. Após lavagem em tampão fosfato pH 7.4 por três minutos, as lâminas contendo os cortes foram hidratadas em soluções de álcool etílico 100%, 90%, 80% e 70%, sendo cada imersão de um minuto. Após lavagem com água destilada, foram imersas na hematoxilina por 2-3 minutos, e posteriormente imersas em um *Becker* contendo água. Foram então submersas em eosina por 5 minutos. Por fim, as lâminas foram montadas utilizando entellan e analisadas ao microscópio óptico (*Zeiss Axioskop 2 Plus, Carl Zeiss, Baltimore, Maryland, USA*) (HOSSY; DA COSTA LEITAO; LUZ; DOS SANTOS *et al.*, 2013).

Na avaliação das diversas alterações histopatológicas, foram consideradas as ocorrências das seguintes características: degeneração hidrópica e gordurosa (esteatose), necrose, fibrose, infiltrado inflamatório e lesões vasculares.

### 8.7.2 Imunofluorescência através de microscopia confocal a laser. Análise das respostas celulares com marcadores de apoptose, autofagia e estresse oxidativo

Os marcadores de morte celular por apoptose, autofagia e estresse oxidativo foram avaliados através da expressão das proteínas caspase-3, beclina-1 e OKL-38, respectivamente, no fígado e rim dos camundongos *hairless*, por meio da técnica de imunofluorescência. A pele de camundongos *hairless* alterada por radiação solar e em fase de cicatricial foi utilizada como controle positivo e negativo. A partir das imagens obtidas de amostras dos fígados e rins dos grupos estudados captadas através da técnica de microscopia confocal, foi realizada a quantificação da fluorescência para caspase-3, beclina-1 e OKL-38 através do programa *Leica Application Suite X (LAS X)* da *Leica Microsystems*.

Para evidenciar a expressão da caspase-3, beclina-1 e OKL-38 os cortes histológicos foram permeabilizados com 3 lavagens consecutivas, com duração de 5 minutos cada, de uma solução de Triton a 0,3% em tampão fosfato (PBS). O antígeno inespecífico foi bloqueado utilizando solução de soro fetal bovino (BSA) (Sigma) 10% por 30 minutos. Após o bloqueio o material foi submetido a 3 lavagens, com duração de 5 minutos cada, com solução Triton a 0,3% em PBS e em seguida recebeu o anticorpo-primário policlonal anti-caspase 3 (FINETEST), anticorpo-primário policlonal anti-beclina 1 (FINETEST) e anticorpo-primário policlonal anti-OSGIN1 (FINETEST). Cada um dos anticorpos foi diluído em PBS em proporções de acordo com as indicações dos fabricantes (1:100, 1:50 e 1:100 respectivamente), deixando *overnight* em câmara úmida à temperatura 4 graus Celsius.

No dia seguinte, após 3 lavagens com PBS com duração de 5 minutos cada, o anticorpo secundário foi adicionado e permaneceu nos cortes por duas horas. O anticorpo utilizado para revelação da marcação primária para caspase-3, beclina-1 e OKL-38 foi o Alexa 488 (*Donkey anti-Rabbit*), na diluição 1:300, 1:400 e 1:400 respectivamente pelo tempo de 2h. Depois da incubação, três lavagens consecutivas com PBS foram realizadas por 5 min cada, e posteriormente o material foi imerso em solução DAPI (corante nuclear) na diluição 1:1000 por 30 segundos. Em seguida, os cortes foram lavados com solução PBS e montados com *Fluoromount™ (Fluoromount Aqueous Mounting Medium; Sigma-Aldrich Corp)* para a observação no microscópio confocal a laser (LEICA TCS SPE). As imagens foram obtidas utilizando o *software Fiji*.

## 8.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas usando o *GraphPad Prism version 6.00* para *Windows*.

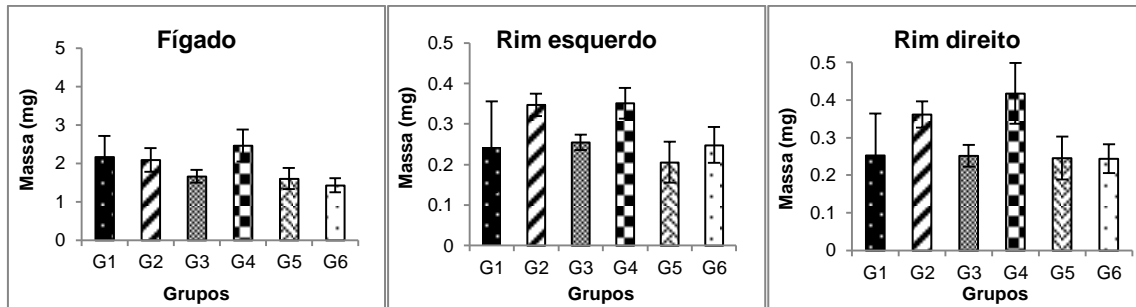
A estatística do peso desses órgãos foi obtida através do método “*One-way ANOVA*” sendo os valores de  $p < 0,05$ . O método de *Tukey* para comparações múltiplas foi utilizado como pós-teste.

Foi realizada a quantificação da fluorescência para caspase-3, beclina-1 e OKL-38 através do programa *Leica Application Suite X (LAS X)* da *Leica Microsystems*. Os resultados para apoptose, autofagia e estresse oxidativo foram obtidos em triplicatas e expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças entre os grupos (água de poço e água filtrada) no que diz respeito ao SODIS, AM/SODIS, AM/ESCURO foram analisadas com *One-way ANOVA* seguido do pós-teste *Tukey* para comparações múltiplas. As diferenças dentro de cada grupo (G1.....G6) foram analisadas com *t student test* e o *Mann-Whitney test*. O nível de relevância significativa foi  $p < 0,05$ .

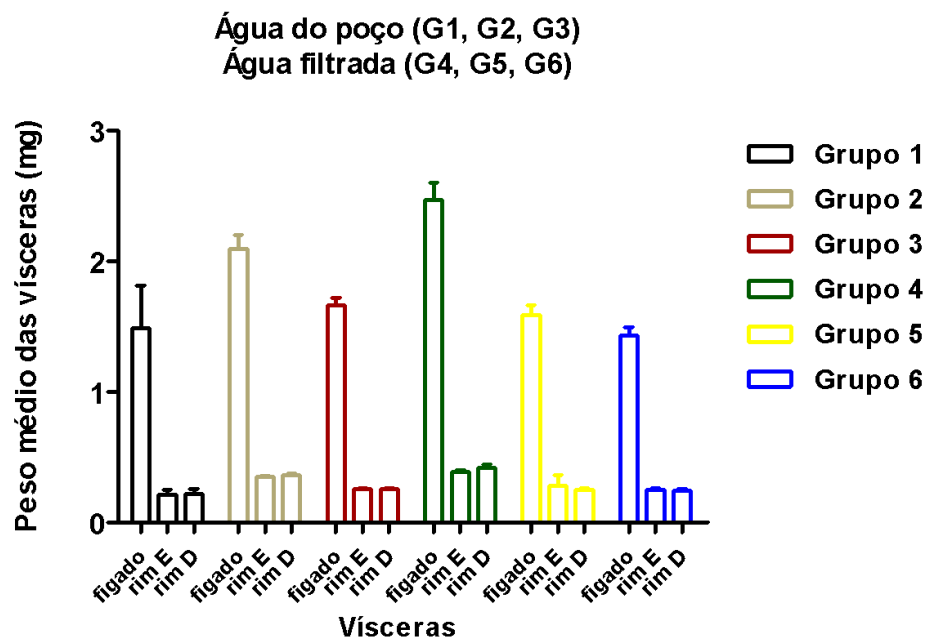
## 8.9 RESULTADOS *in vivo*

### 8.9.1 Pesagem

A análise de peso das vísceras foi realizada para investigar possíveis disparidades entre os grupos de animais (machos e fêmeas) e aqueles que mimetizam uma prole, as quais são comuns na natureza. Embora tenha sido observada uma variação entre os grupos experimentais, esta variação provavelmente decorreu das diferenças naturais entre os sexos dos animais. Os gráficos A, B e C (representados na figura 46) demonstraram que os pesos dos rins esquerdos, rins direitos e fígados foram semelhantes entre os grupos. Consequentemente, quando aplicado o pós-teste, não foi observada uma diferença significativa entre os grupos. Nesse contexto, é plausível que a variação observada inicialmente, através da análise de variância unidirecional, possa ter sido um resultado aleatório (figura 47). Todos os resultados foram obtidos a partir de seis grupos independentes, cada um contendo no mínimo dez animais.



**Figura 46:** Peso médio das vísceras (fígado e rim) de camundongos *hairless* dos grupos de estudo após o tratamento. Grupos de estudo: G1 (MISTA) água de poço/SODIS; G2 (MISTA) água de poço/SODIS; G3 (FÊMEA) água de poço/AM/Escuro; G4 (FÊMEA) água filtrada; G5 (MISTA) água filtrada/AM/SODIS e G6 (MACHO) água filtrada/AM/Escuro. Para a análise macroscópica em relação ao peso desses órgãos, foi feita a análise estatística através do método “One-way ANOVA”. Os valores de *p* foram significativos para todas as análises, ficando abaixo de 0,05



**Figura 47:** Peso médio das vísceras (fígado e rim) de camundongos *hairless* entre os grupos testados: tanto para água de poço quanto para água filtrada após o tratamento indicado no Quadro 3: [ G1 (Água de poço irradiada com luz solar (controle)), G2 (Água de poço +AM (100ng/ml) irradiada com luz solar), G3 (Água de poço AM (100ng/ml) no escuro), G4 (Água filtrada irradiada com luz solar (controle)), G5 (Água filtrada + AM (100ng/ml) irradiada com luz solar) e G6 (Água filtrada + AM (100ng/ml) no escuro)]. Pós teste o método de *Tukey* para comparações múltiplas.

### 8.9.2 Análises histológicas de fígado e rim em camundongos *hairless*

Foram analisadas imagens provenientes de cortes transversais e coradas com HE. Na leitura das lâminas, considerou-se padrão de normalidade para o fígado o bom estado de conservação, homogeneidade de aspecto, identificação de lóbulos hepáticos íntegros, espaço porta íntegro e veias hepáticas bem definidas além de capilares sinusoidais presentes íntegros, confluindo para veia centro-lobular.

Nos rins, a normalidade obedeceu aos quesitos: bem conservados, apresentando corpúsculos de *Malpighi*, túbulos renais proximais e distais íntegros e os glomérulos formados por capilares, sem alterações histológicas.

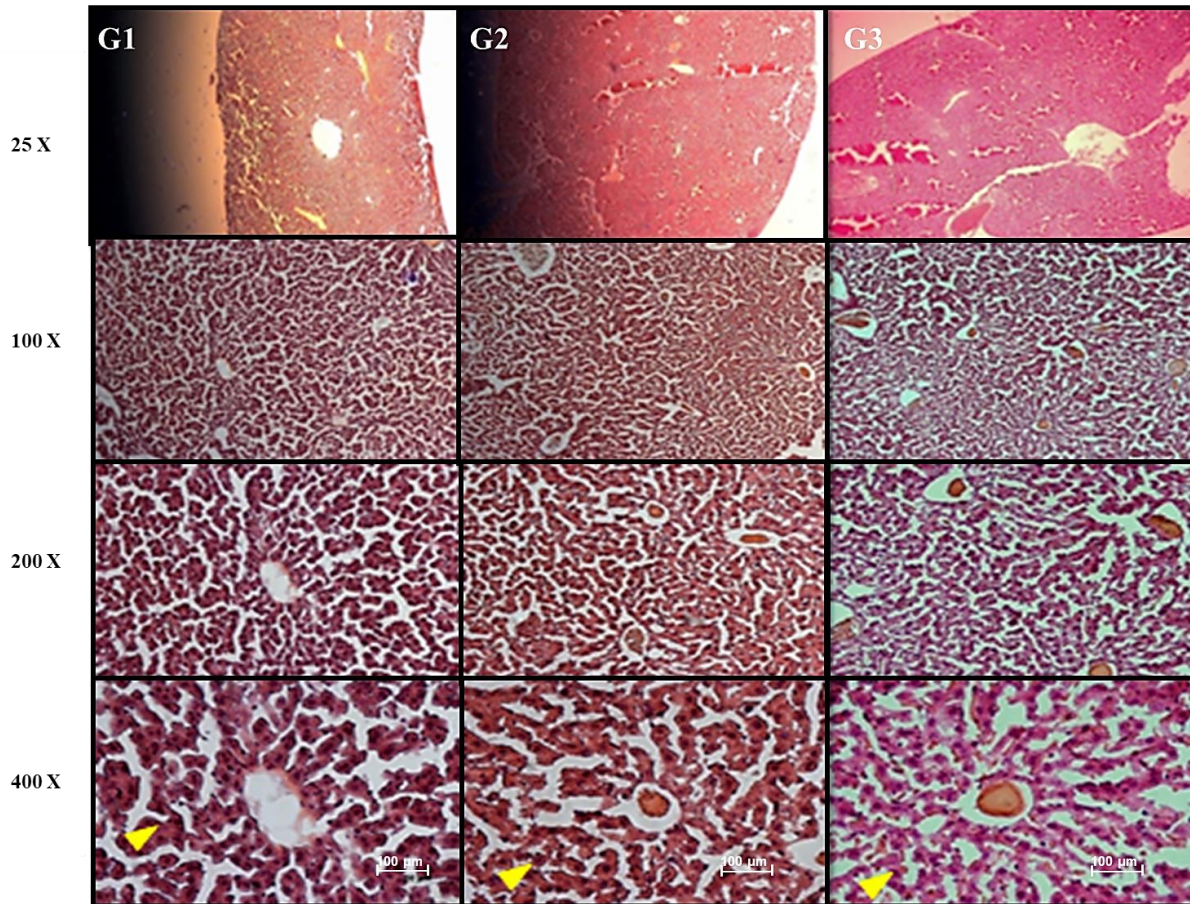
Assim, de acordo com o tratamento descrito nas figuras 48 e 49, todos os animais dos grupos citados apresentaram aspectos histológicos do fígado e rim dentro dos padrões da normalidade. Nos fígados foram facilmente visualizados lóbulos hepáticos, espaços porta e veias hepáticas bem delineadas. Os hepatócitos formavam cordões confluentes para a veia centro-lobular (Figura 48). Esse quadro morfológico esteve presente em todas as lâminas dos animais dos grupos estudados.

O aspecto morfológico dos rins apresentou-se muito semelhante em todos os grupos estudados, nos quais se observaram corpúsculos renais e túbulos contorcidos proximais e distais dentro dos padrões de normalidade mostrando tanto no córtex quanto na medula, sem sinais de alteração celular (Figura 49).

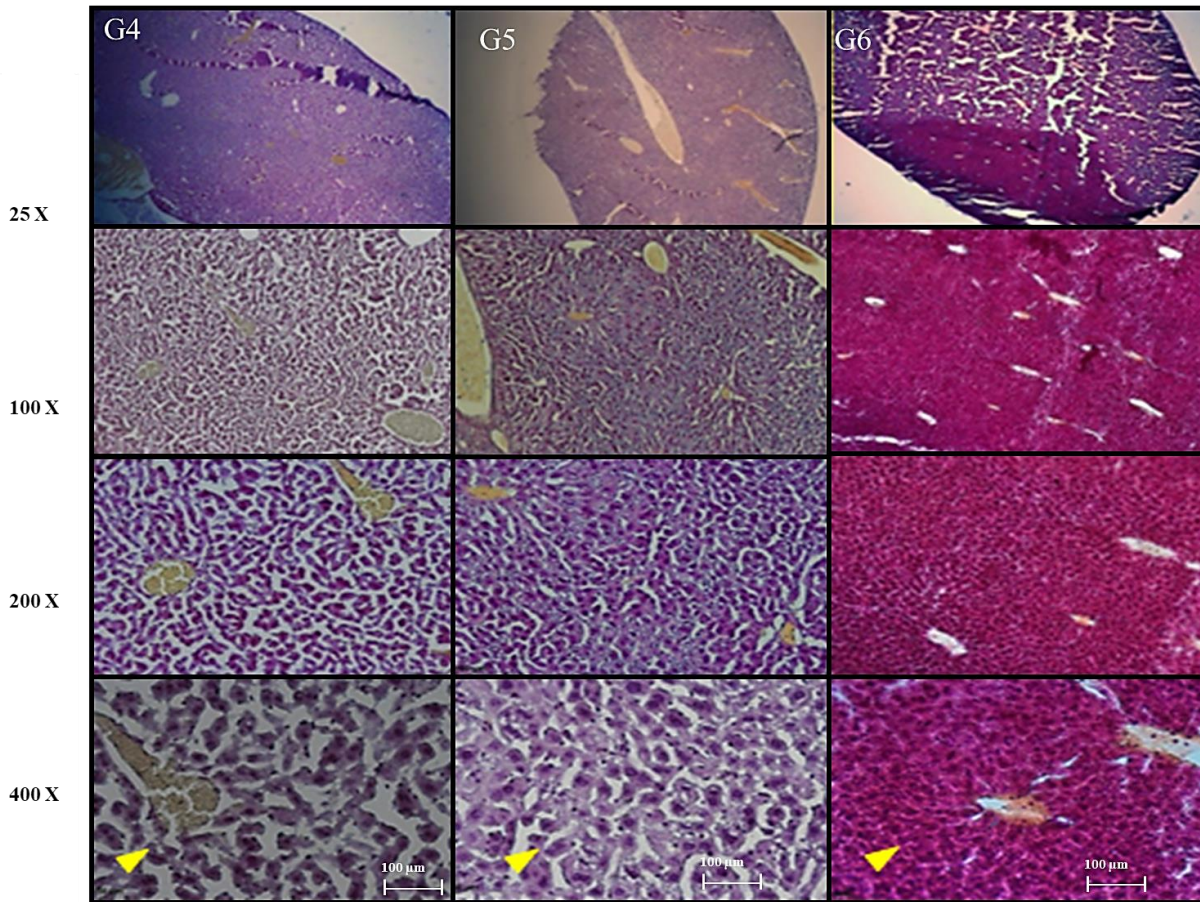
O fígado e rim dos animais também foram avaliados ao microscópio quanto à presença ou ausência de degeneração hidrópica e gordurosa, necrose, fibrose, infiltração inflamatória e lesão vascular. A observação das imagens histológicas dos fígados e rins não mostrou alterações morfológicas induzidas pelo xenobiótico AM ou algum dos seus metabólitos dos grupos estudados conforme tabela 6.



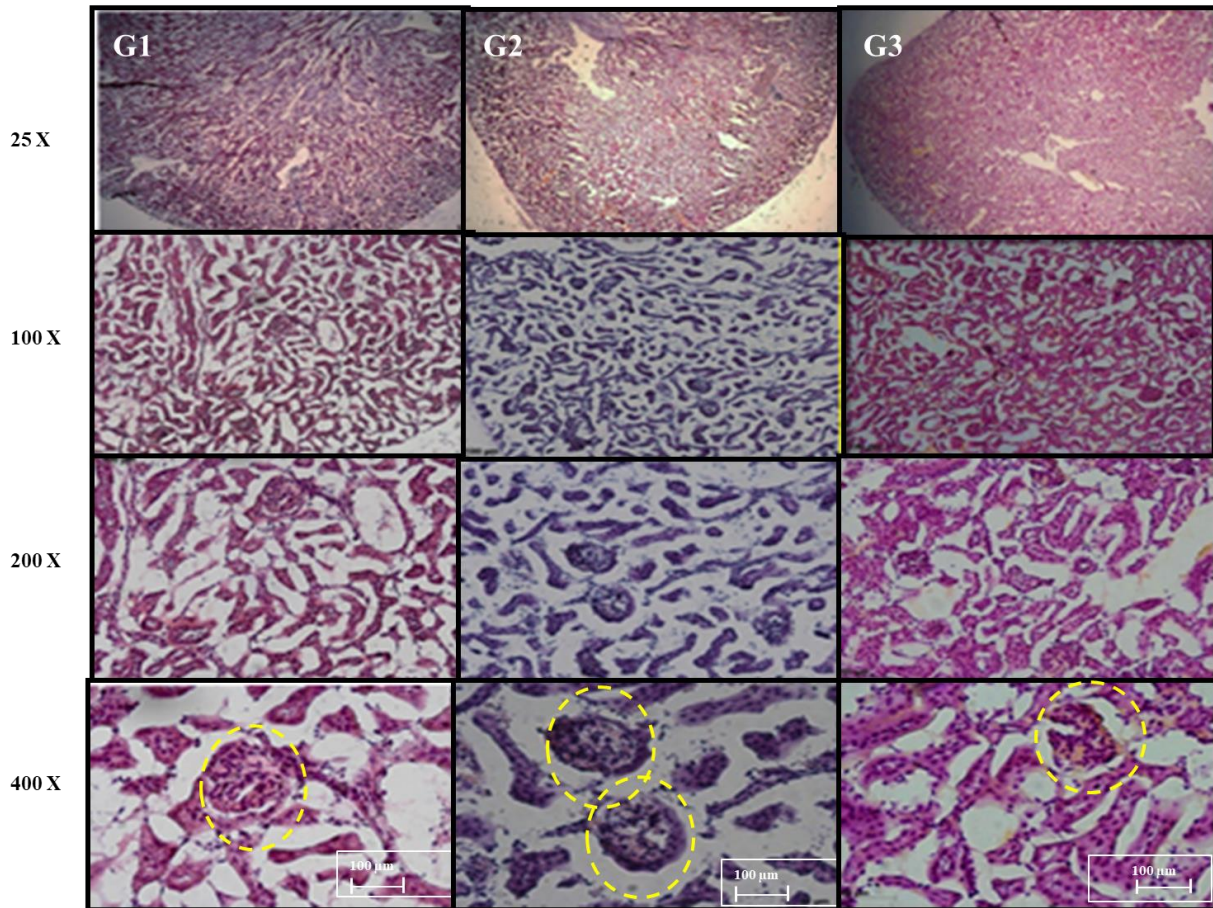




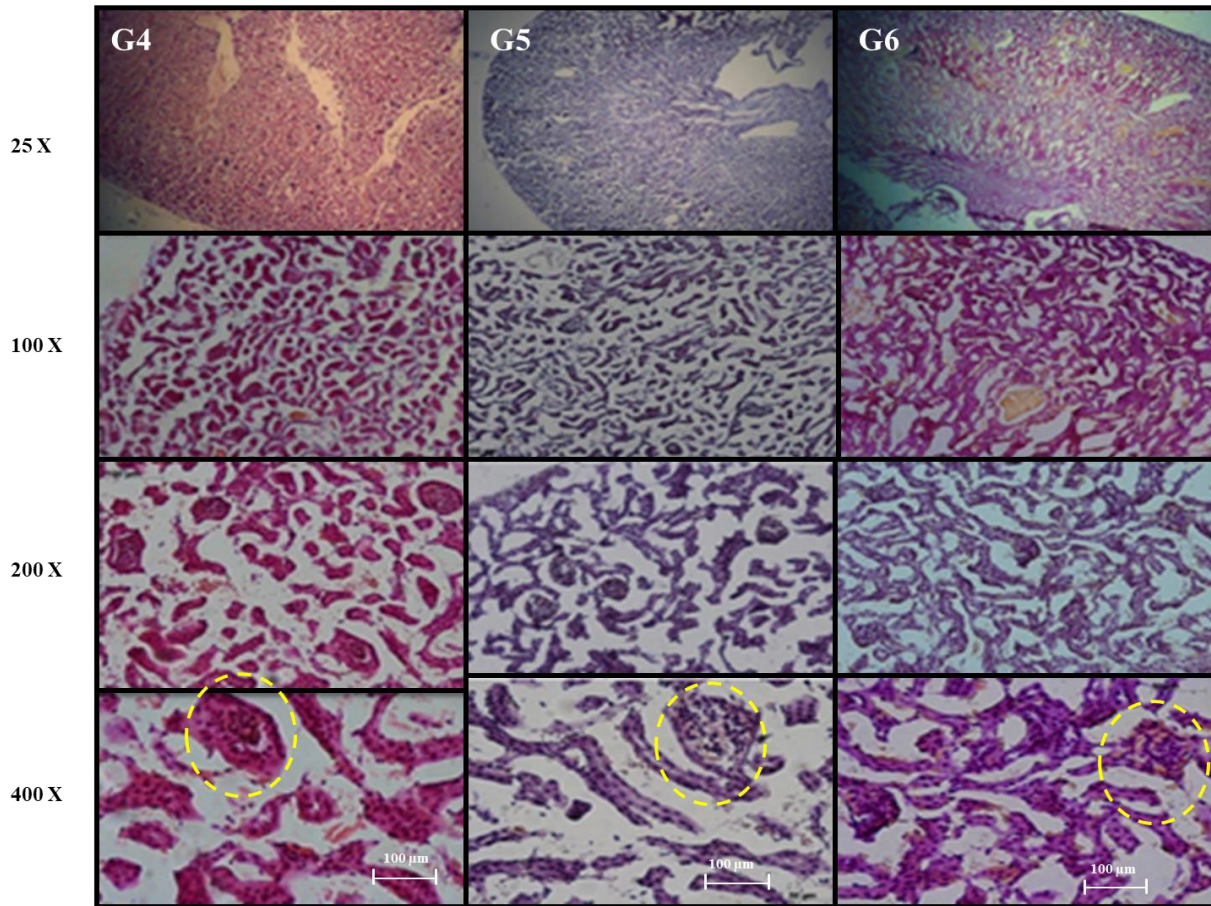
**Figura 48 (A): (Água de poço) Cortes histológicas do fígado de grupos de camundongos *hairless* após tratamentos:** grupo G1- tratamento com SODIS; grupo G2 - tratamento com AM-SODIS na concentração de 100ng/ml e grupo G3 – tratamento com AM na concentração de 100ng/ml acondicionada no escuro. As garrafas PET foram irradiadas sob a luz solar por 3 horas. Aumentos 25x, 100x, 200x e 400x mostram o parênquima hepático dividido em lóbulos por septos de tecido conjuntivo (estroma), a veia centrolobular em torno do qual se dispõem os hepatócitos e, entre estes, capilares sinusóides e o espaço porta. Parênquima hepático apresentando aspecto normal em nenhum dos tratamentos. Hepatócitos setas amarelas; (HE).



**Figura 48 (B): (Água filtrada) Cortes histológicos do fígado de grupos de camundongos *hairless* após tratamentos:** grupo G4 - tratamento com SODIS; grupo G5 - tratamento com AM-SODIS na concentração de 100ng/ml e grupo G6 – tratamento com AM na concentração de 100ng/ml acondicionada no escuro. As garrafas PET foram irradiadas sob a luz solar por 3 horas. Aumentos 25x, 100x, 200x e 400x mostram o parênquima hepático dividido em lóbulos por septos de tecido conjuntivo (estroma), a veia centrolobular em torno do qual se dispõem os hepatócitos e, entre estes, capilares sinusóides e o espaço porta. Parênquima hepático apresentando aspecto normal em nenhum dos tratamentos. Hepatócitos setas amarelas; (HE).



**Figura 49 (A): (Água de poço) Cortes histológicas do rim de grupos de camundongos *hairless* após tratamentos:** grupo G1 - tratamento com SODIS; grupo G2 - tratamento com AM-SODIS na concentração de 100ng/ml e grupo G3 – tratamento com AM na concentração de 100ng/ml acondicionada no escuro. As garrafas PET foram irradiadas sob a luz solar por 3 horas. Aumentos 25x, 100x, 200x e 400x mostrando o córtex e medula renais, (corpúsculo de *Malpighi* e túbulos renais). Rim apresentando aspecto histológico normal. Corpúsculos renais linhas tracejadas; (HE).



**Figura 49 (B): (Água filtrada) Cortes histológicas do rim de grupos de camundongos *hairless* após tratamentos:** grupos G4 - tratamento com SODIS; grupo G5 - tratamento com AM-SODIS na concentração de 100ng/ml e grupo G5 – tratamento com AM na concentração de 100ng/ml acondicionada no escuro. As garrafas PET foram irradiadas sob a luz solar por 3 horas. Aumentos 25x, 100x, 200x e 400x mostrando o córtex e medula renais, (corpúsculo de *Malpighi* e túbulos renais). Rim apresentando aspecto histológico normal. Corpúsculos renais linhas tracejadas; (HE).

### **8.9.3 Análises dos marcadores para imunofluorescência associados à apoptose, autofagia e estresse oxidativo em pele, fígado e rim de camundongos *hairless*.**

#### **8.9.3.1 Controles**

Para as análises moleculares associados a apoptose, autofagia e estresse oxidativo foi utilizada como controle positivo para a expressão de caspase-3, beclina-1 e OKL-38 respectivamente, para todos os grupos estudados, a pele de camundongos *hairless* submetida à radiação solar e em fase de cicatricial, assim como também foi realizado um controle negativo utilizando a mesma pele.

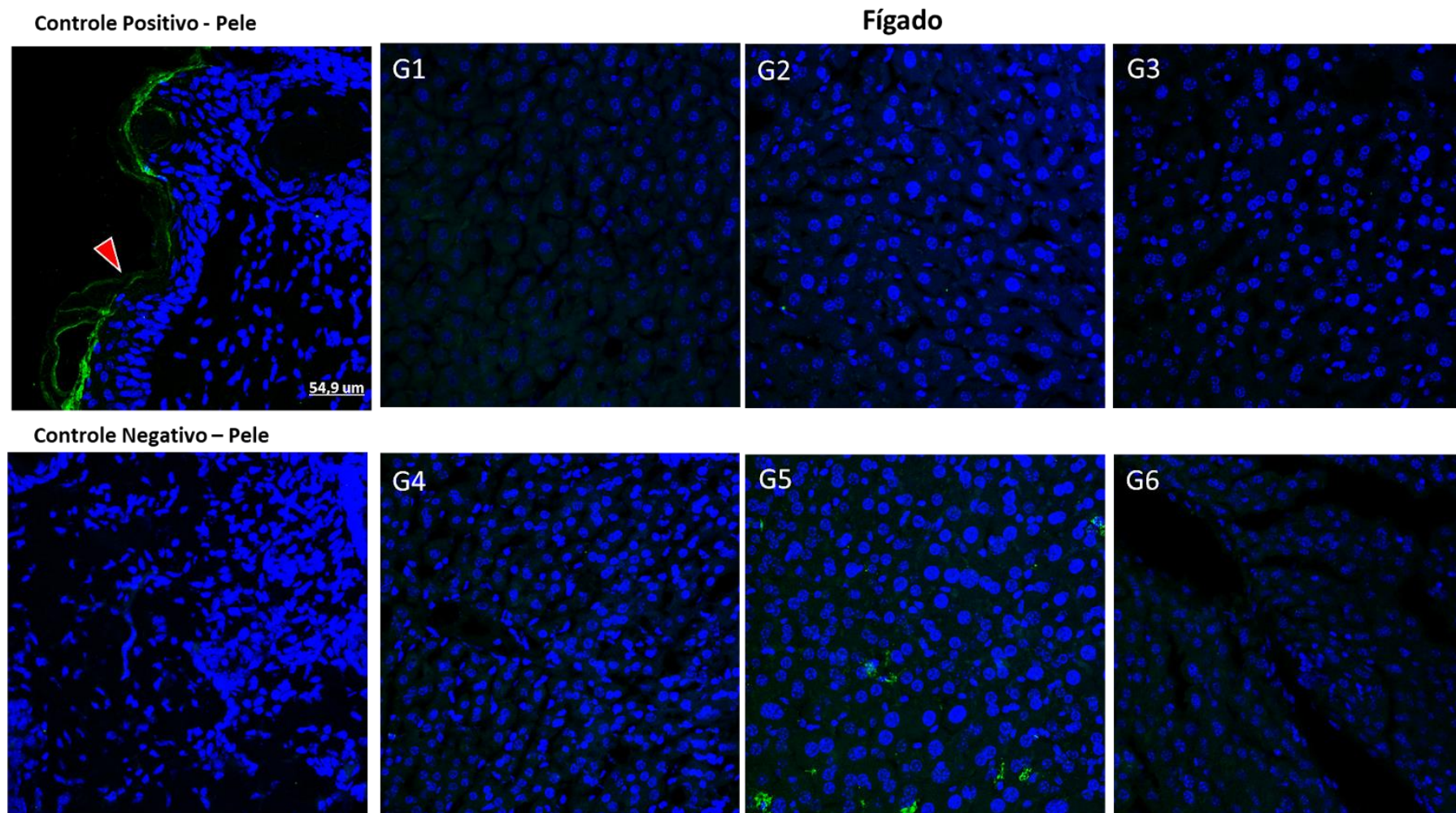
#### **8.9.3.2 Caspase-3**

Conforme as fotomicrografias obtidas das amostras dos órgãos em estudo, não foi observada a expressão significativa do marcador para caspase-3 nos grupos testados, quando comparados com o controle positivo, conforme imagens apresentadas na figura 50 (fígado (A) e rim (B)).

É possível perceber uma marcação positiva para a caspase-3 no controle positivo e uma expressão basal nos grupos estudados. Não houve nenhuma expressão acentuada, tanto na presença quanto na ausência do AM e que não existe diferença causada pela presença do AM tanto na forma azul quanto leuco, indiferentemente do tipo de água utilizada.

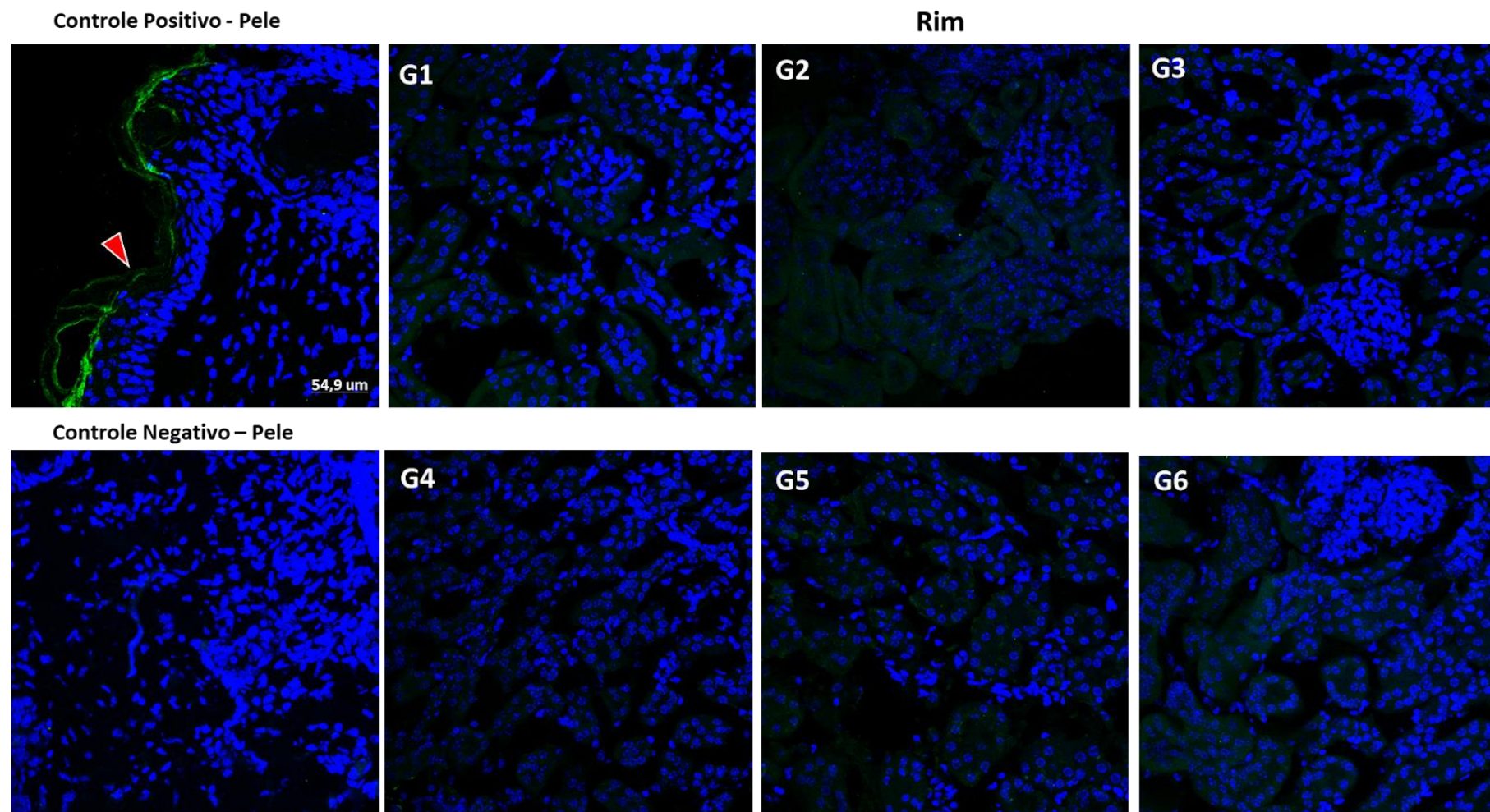
Os gráficos da figura 51 representam as médias e seus desvios padrão das marcações obtidas em triplicatas, sendo o valor da intensidade da marcação do anticorpo anti-caspase-3 em relação ao marcador nuclear DAPI.

(A)

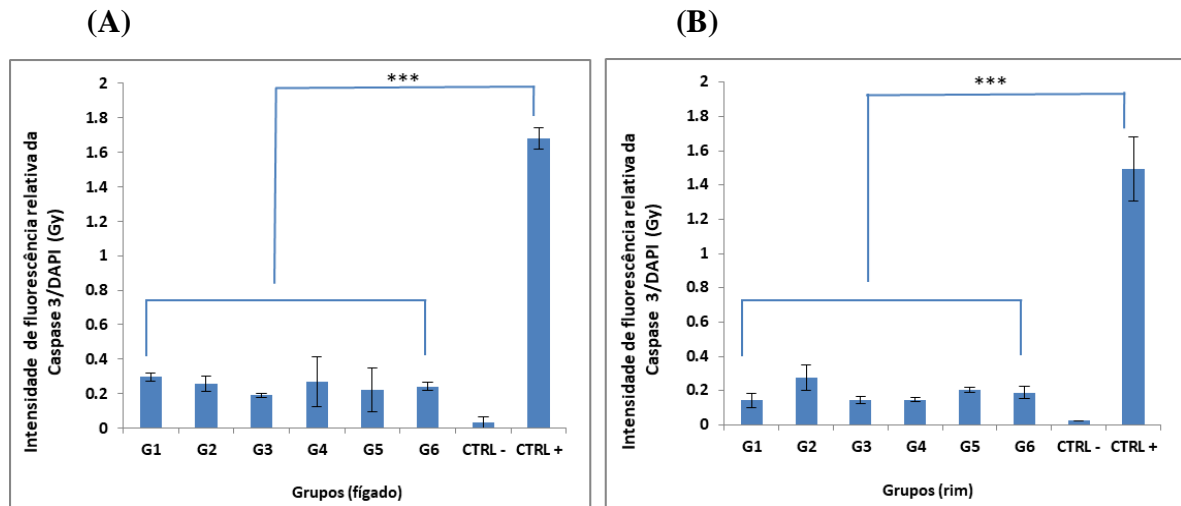


**Figura 50(A):** Fotomicrografias confocal a laser mostrando expressão do marcador caspase-3 (seta vermelha) em amostras de fígado nos diferentes grupos de estudo tendo como controle positivo uma lesão de pele em estágio de cicatrização. A seta aponta para o perfil de marcação do antígeno pesquisado. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Barra de calibração- 54.9  $\mu$ m

(B)



**Figura 50(B):** Fotomicrografias confocal a laser mostrando expressão do marcador caspase-3 (seta vermelha) em amostras de rim nos diferentes grupos de estudo tendo como controle positivo uma lesão de pele em estágio de cicatrização. A seta aponta para o perfil de marcação do antígeno pesquisado. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Barra de calibração- 54.9 μm.



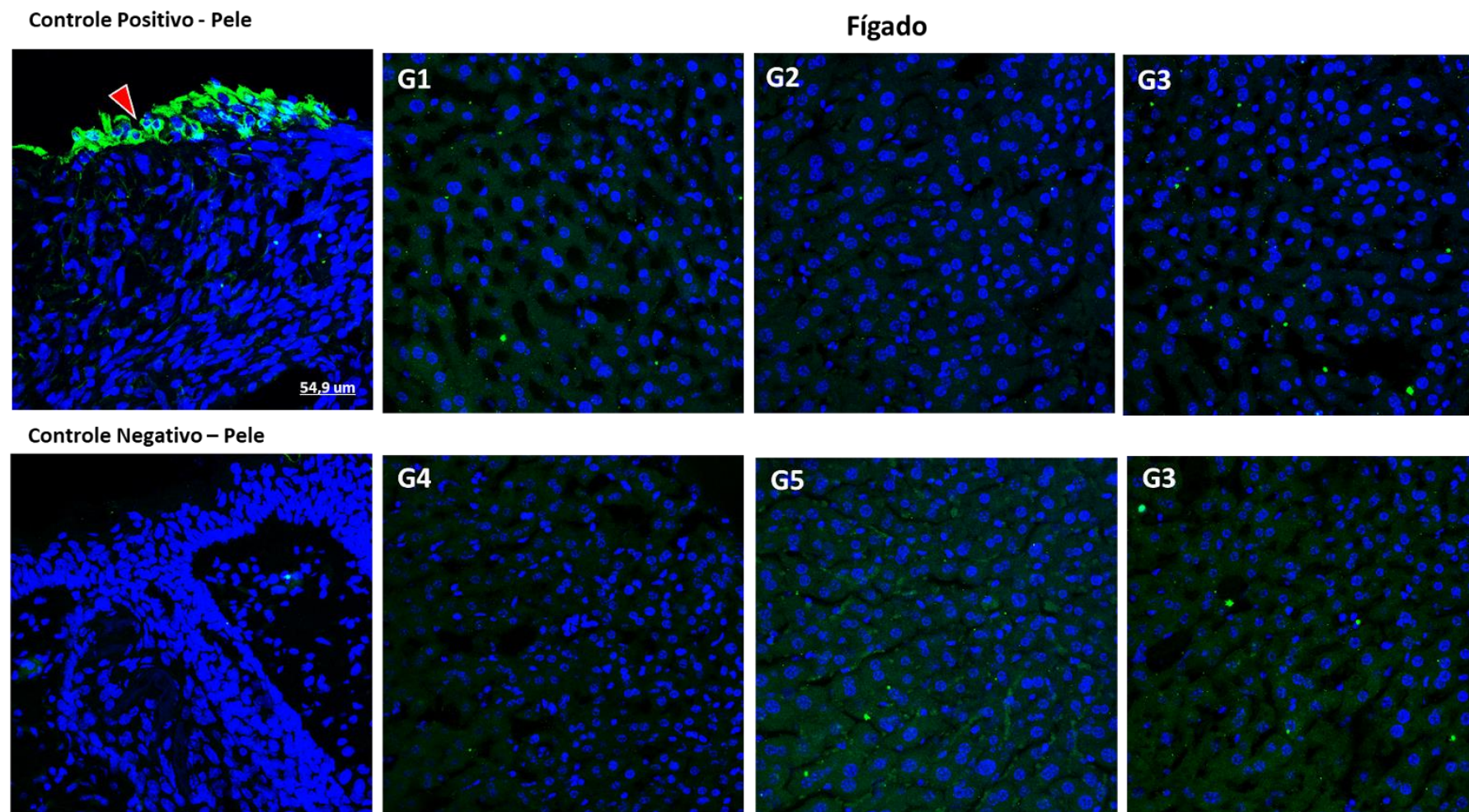
**Figura 51:** Gráficos de barras mostrando a quantificação da intensidade relativa da marcação do anticorpo anti-caspase-3 por imunofluorescência no fígado (A) e rim (B) dos grupos de camundongos *hairless*. Os valores representam a razão entre fluorescência do marcador em relação a marcação com DAPI. Os resultados foram obtidos em triplicata e expressos como média  $\pm$  desvio padrão  $p < 0,05$ .

### 8.9.3.3 Beclina-1

A observação das fotomicrografias dos órgãos em estudo mostrou a fraca expressão do marcador para beclina-1 nos grupos estudados (G1, G2, G3, G4, G5 e G6), conforme imagens apresentadas na figura 52 (fígado (A) e rim (B)). Essas marcações não se apresentam intensas o suficiente para serem consideradas como uma expressão significativa. Os gráficos da Figura 53 representam as médias e seus desvios padrão das marcações obtidas em triplicatas, sendo considerado o valor relativo da intensidade da marcação do anticorpo anti-beclina-1 em relação ao marcador nuclear DAPI. Os resultados da quantificação da imunofluorescência do marcador beclina-1 representados na figura 53, sugerem a ausência de alterações pela introdução do AM tanto na sua forma azul quanto leuco quando comparado à marcação observada nas provenientes do grupo tratado somente com o SODIS padrão.

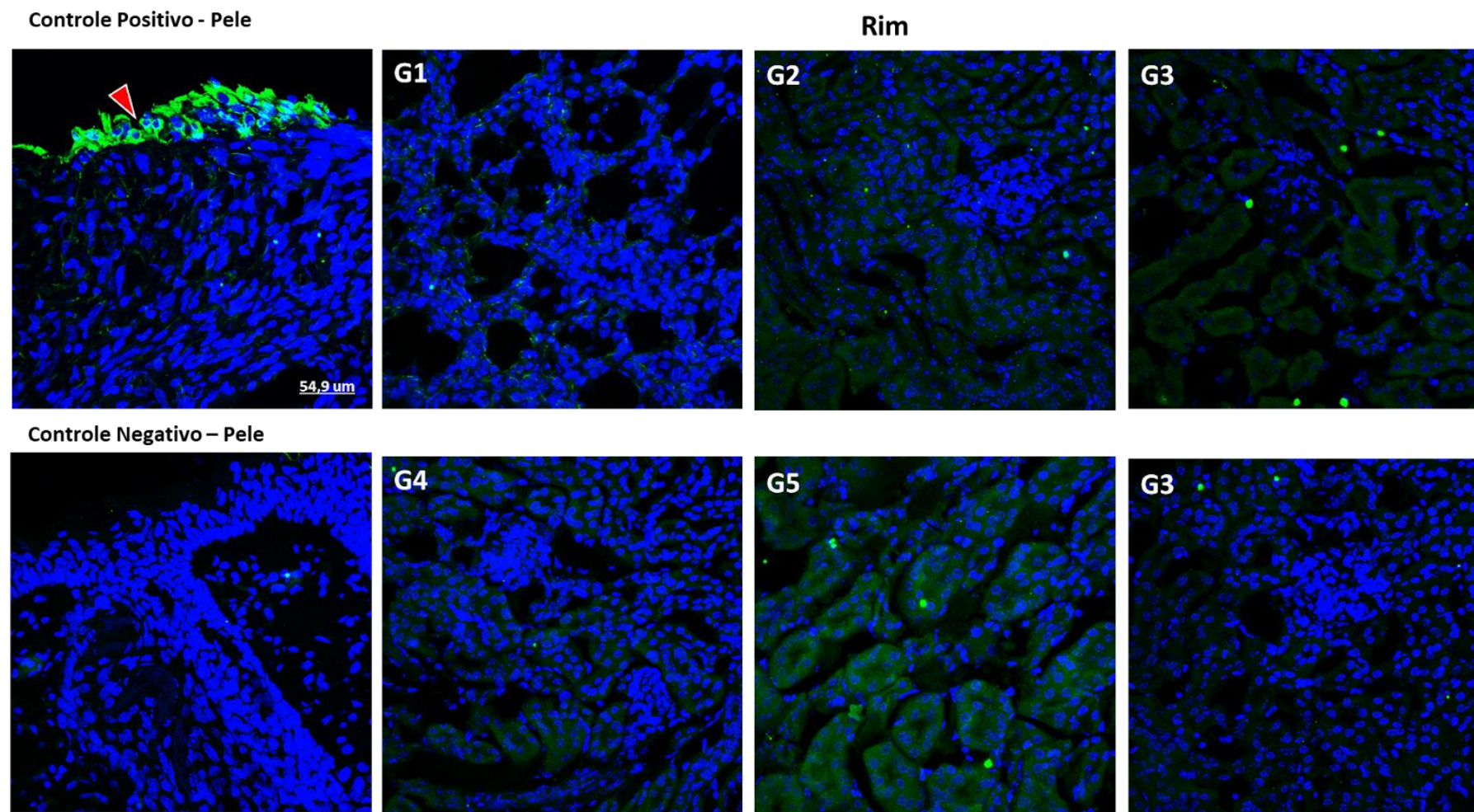


(A)

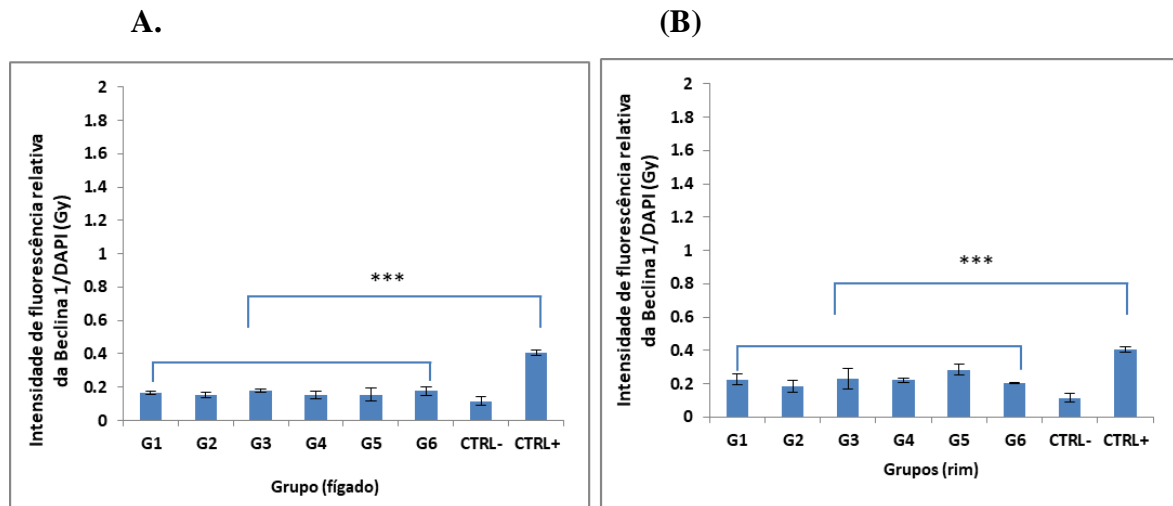


**Figura 52(A):** Fotomicrografias confocal a laser mostrando expressão do marcador beclina-1 (seta vermelha) em amostras de fígado nos diferentes grupos de estudo tendo como controle positivo uma lesão de pele em estágio de cicatrização. A seta aponta para o perfil de marcação do antígeno pesquisado. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Barra de calibração- 54.9 μm

(B)



**Figura 52 (B):** Fotomicrografias confocal a laser mostrando expressão do marcador beclina-1 (seta vermelha) em amostras de rim nos diferentes grupos de estudo tendo como controle positivo uma lesão de pele em estágio de cicatrização. A seta aponta para o perfil de marcação do antígeno pesquisado. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Barra de calibração- 54.9 μm



**Figura 53:** Gráficos de barras mostrando a quantificação da intensidade relativa da marcação do anticorpo anti-beclina-1 por imunofluorescência no fígado (A) e rim (B) dos grupos de camundongos *hairless*. Os valores representam a razão entre fluorescência do marcador em relação à marcação com DAPI. Os resultados foram obtidos em triplicata e expressos como média  $\pm$  desvio padrão.  $p < 0,05$ .

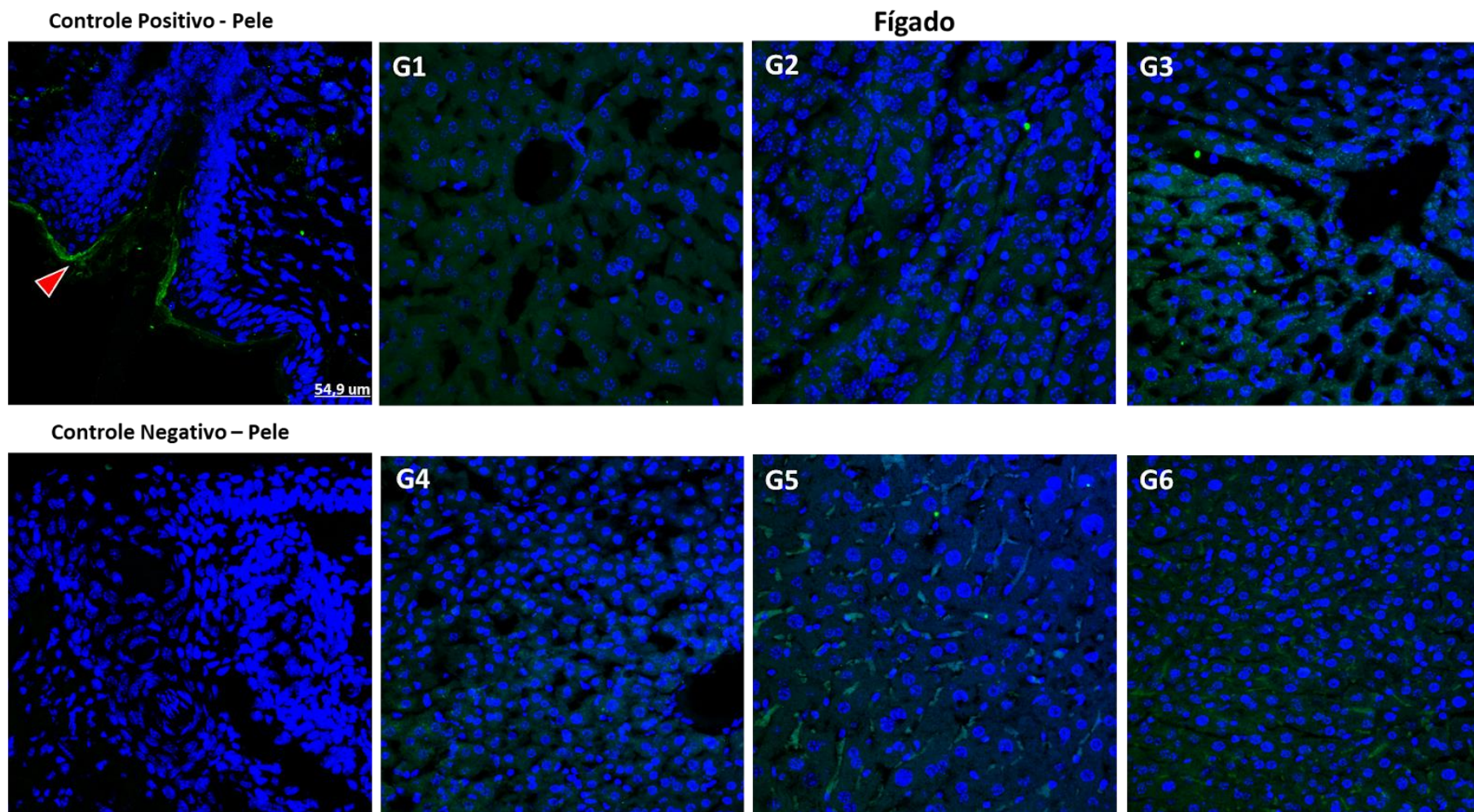
#### 8.9.3.4 OKL-38

A expressão do marcador OKL-38, foi avaliada através da mesma técnica de imunofluorescência, analisando a ocorrência de estresse oxidativo no fígado e rim dos grupos estudados. Nas fotomicrografias dos órgãos em estudo não foi observada a expressão desse marcador nos grupos de camundongos *hairless* quando comparados com o controle positivo de pele em cicatrização (figuras 54 (fígado (A) e rim (B))).

Os gráficos da figura 55 representam os resultados das médias e seus desvios padrão das quantificações obtidas em triplicata sendo o valor relativo da intensidade da marcação do anticorpo anti-OKL-38 calculada em relação ao marcador nuclear DAPI.

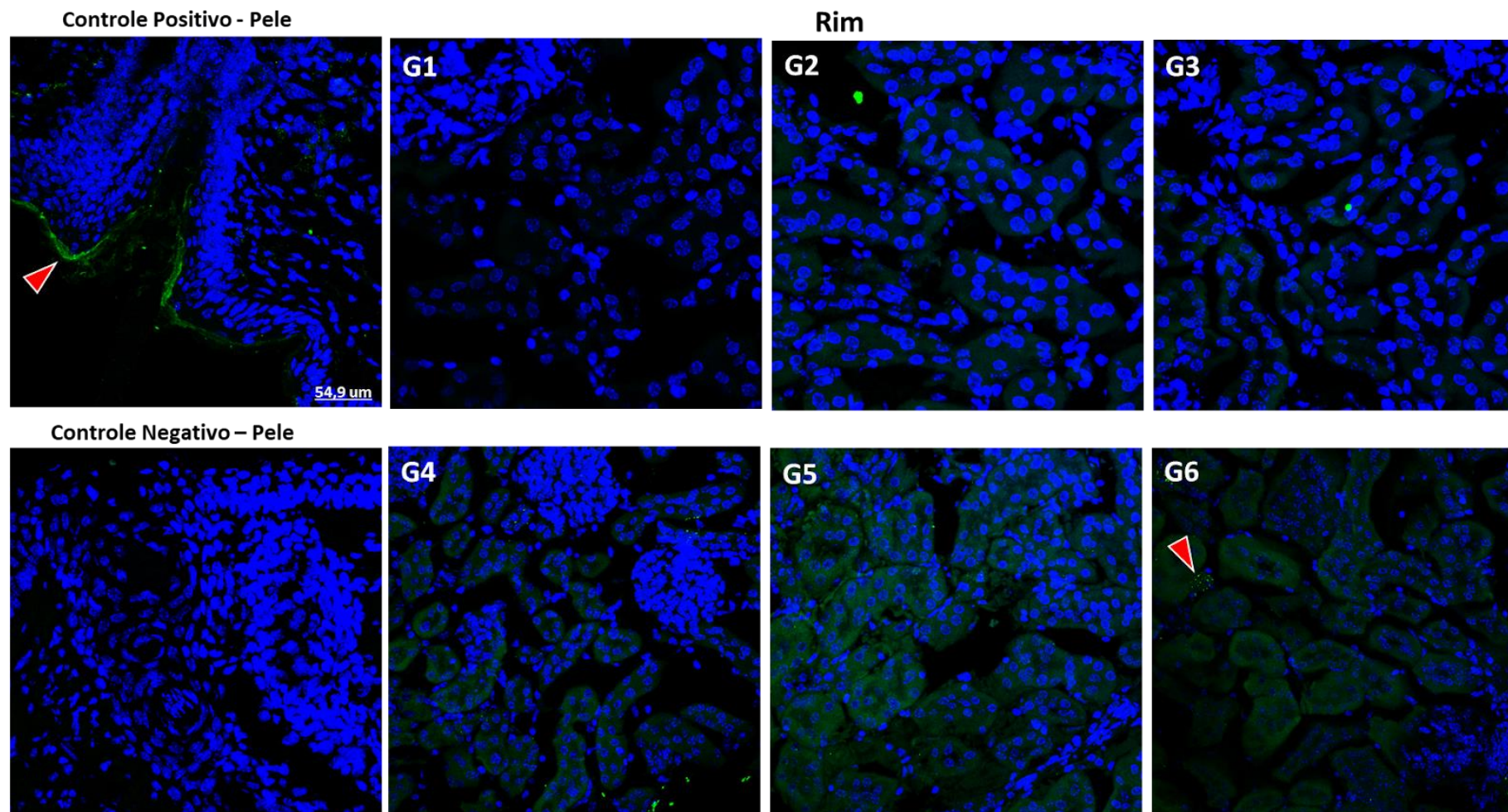
Os resultados da quantificação da marcação de OKL-38 sugerem a ausência de alterações pela introdução do AM tanto na sua forma azul, quanto leuco quando comparado à marcação obtida nas amostras provenientes do grupo tratado somente com o SODIS padrão.

(A)

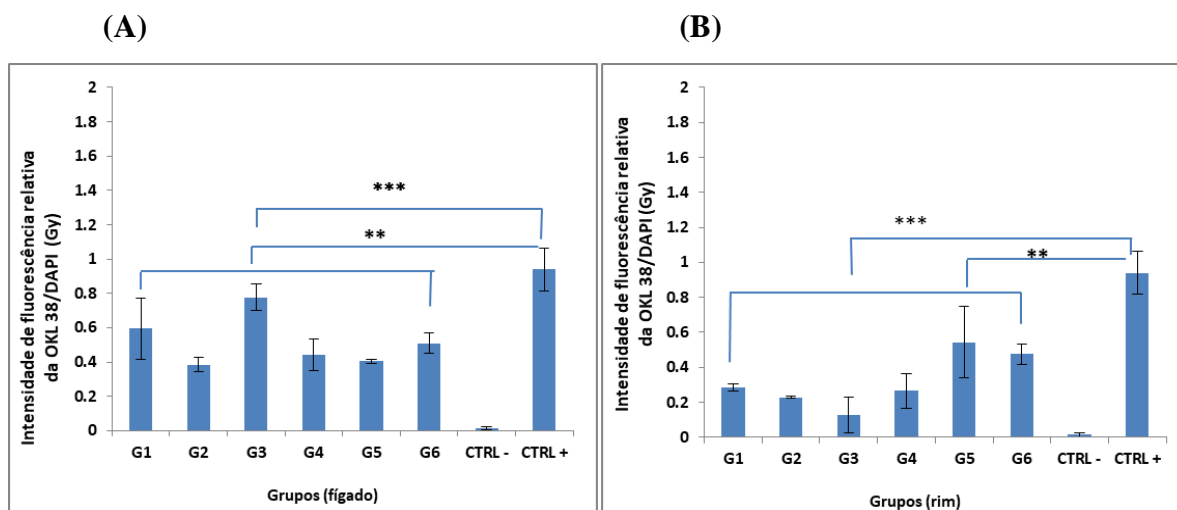


**Figura 54(A)** Fotomicrografias confocal a laser mostrando expressão do marcador OKL-38 (seta vermelha) em amostras de fígado nos diferentes grupos de estudo tendo como controle positivo uma lesão de pele em estágio de cicatrização. A seta aponta para o perfil de marcação do antígeno pesquisado. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Barra de calibração- 54.9 μm

(B)



**Figura 54(B)** Fotomicrografias confocal a laser mostrando expressão do marcador OKL-38 (seta vermelha) em amostras de rim nos diferentes grupos de estudo tendo como controle positivo uma lesão de pele em estágio de cicatrização. A seta aponta para o perfil de marcação do antígeno pesquisado. Os núcleos celulares foram corados com DAPI (azul). Barra de calibração- 54.9 μm.



**Figura 55:** Gráficos de barras mostrando a quantificação da intensidade relativa da marcação do anticorpo OKL-38 por imunofluorescência no fígado (A) e rim (B) dos grupos de camundongos *hairless*. Os valores representam a razão entre fluorescência do marcador em relação à marcação com DAPI. Os resultados foram obtidos em triplicata e expressos como média  $\pm$  desvio padrão.  $p < 0,05$ .

## 9 DISCUSSÃO *in vivo*

Resultados sugerem que a utilização do AM como sensibilizador associado ao tratamento SODIS, permitiu a redução drástica do tempo necessário para a desinfecção solar. A fotocatalise aumenta a eficiência da descontaminação por bactérias e vírus presentes na água mesmo em condições adversas de temperatura e radiação solar, durante diferentes épocas do ano, fator de extrema relevância em populações que não têm acesso a água potável (CARDOSO-RURR; DE PAIVA; PAULINO-LIMA; DE ALENCAR *et al.*, 2019).

O AM oxidado é bem absorvido, reduzido e 75% excretado pela urina na forma reduzida (leuco). É seguro quando utilizado em doses terapêuticas de até 2 mg/kg, entretanto doses superiores podem provocar sinais e sintomas de toxicidade (GINIMUGE; JYOTHI, 2010). Para esse estudo, a quantidade utilizada foi 1500 vezes menor (considerando que seja ingerido 2 litros de água tratada com AM por dia) do que o mínimo para deflagrar efeitos adversos importantes. Durante a revisão bibliográfica, não foram encontrados dados em relação à toxicidade do AM administrado em sua forma leuco originada de uma ação fotoquímica e não metabólica.

Logo, o resultado histológico esperado foi não encontrar qualquer indício de toxicidade ou degeneração acentuada pelo uso da água tratada em nenhum grupo,

incluindo o grupo que ingeriu AM de forma leuco. Certificando que o protocolo AM/SODIS encontra-se dentro de uma margem de segurança para uso humano.

Como o principal órgão de metabolização e de excreção das substâncias ingeridas são o fígado e o rim, realizamos algumas análises que permitiram avaliar as possíveis toxicidades hepáticas ou renais.

O fígado é o principal órgão para metabolização de drogas e detoxificação, portanto a hepatotoxicidade em estudos pré-clínicos é um desafio para uso terapêutico de novas drogas, uma vez que as lesões neste órgão vital inviabilizam a adoção de novas terapias. O rim é um órgão estruturalmente complexo que evoluiu para desenvolver o papel de depuração importante no organismo: excreção de resíduos metabólicos e a osmorregulação (controle das concentrações de sais nos tecidos e células) (FOLGUEIRA; BRENTANI, 2004) e (MIDDENDORF; WILLIAMS, 2000).

Nas análises histopatológicas dos grupos estudados, a primeira manifestação estrutural de quase todas as formas de dano celular é o acúmulo intracelular de água ou degeneração hidrópica. Quando ocorre em um órgão inteiro, este pode se apresentar pálido. Outro desequilíbrio histológico é a esteatose hepática ou degeneração gordurosa do fígado que é a condição na qual ocorre acúmulo de triglicerídeos dentro dos hepatócitos, mas também pode ocorrer no coração, no músculo e nos rins (KUMAR; ABBAS; JON, 2015).

Fibrose é uma condição histopatológica que acontece quando o fígado em resposta à lesão celular hepática crônica e repetida resulta de uma resposta cicatricial substituindo as células mortas. A necrose é a morte da célula que ocorre devido a uma lesão exógena irreversível. Assim, as células necróticas são incapazes de manter a integridade da membrana resultando em perda do padrão lobular do fígado. Conseqüentemente, observam-se agrupamentos de hepatócitos (pseudo lóbulos) separados por tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório crônico inespecífico e proliferação de células dos ductos biliares (KUMAR; ABBAS; JON, 2015).

Com relação aos resultados histopatológicos obtidos nos grupos estudados não se observaram quaisquer alterações morfológicas sendo considerada a normalidade das estruturas, sem alterações visíveis e os dados obtidos colaboram com a hipótese de que a ingesta do AM na forma leuco não é tóxico, certificando que o protocolo AM/SODIS encontra-se dentro de uma margem de segurança para uso humano confirmado na coloração de rotina (HE).

Somando a esses resultados, foi investigada através da técnica de imunofluorescência, as expressões de caspase-3, beclina-1 e OKL38 no rim e fígado de camundongos *hairless* submetidos à ingestão de água tratada ou não pelo método AM/SODIS. Avaliação de mecanismos de morte celular programada envolvido na toxicidade de xenobióticos consiste numa cascata de eventos bem definidos a nível celular. É um processo fundamental na manutenção e fisiologia normal de diferentes tecidos e órgãos, havendo, para tanto, um equilíbrio homeostático entre as taxas de crescimento e morte celular. Todavia, as falhas neste equilíbrio podem estar relacionadas com o desenvolvimento de mecanismos tóxicos (FEDERICO; CARDAIOLI; DA POZZO; FORMICHI *et al.* 2012); (CHEN; KANG; FU, 2018).

Modelos animais empregados em pesquisas e no ensino em geral podem ser ferramentas muito poderosas e representações muito aplicáveis dos seres humanos (ANDREOLLO; SANTOS; ARAÚJO; LOPES, 2012).

Neste estudo, o modelo animal utilizado possui uma mutação no gene HR, que codifica uma proteína que está envolvida no desenvolvimento de pelagem normal durante os primeiros dias de vida do animal. Esses camundongos não pigmentados permitem pronta manipulação da pele, aplicação de agentes tópicos e exposição UV, bem como fácil visualização da resposta cutânea.

Assim, a escolha de camundongos *hairless* baseou-se em estudo anterior do nosso grupo e nos de outros autores que mostraram grande sucesso na utilização destes animais nos modelos de indução da carcinogênese mostrando-se perfeitamente adaptável ao estudo da toxicologia (NONCHEV; BRANCAZ; FOLCO; ROMERO *et al.*, 2006); (BENAVIDES; OBERYSZYN; VANBUSKIRK; REEVE *et al.*, 2009); (HOSSY; DA COSTA LEITAO; LUZ; DOS SANTOS *et al.*, 2013).

Durante 13 semanas *ad libidum*, foi administrado água conforme o protocolo estabelecido e baseado no estudo de HEJTMANCIK; RYAN; TOFT; PERSING *et al.* (2002) no qual foi estudado a toxicologia do AM em ratos e camundongos durante 13 semanas. Então o que tudo isso significa? Neste caso podemos fazer uma comparação direta simples entre a vida útil dos ratos/camundongos e os humanos mesmo sabendo que não significa que ele viva uma vida humana em miniatura dentro desses três anos (QUINN, 2005).

Assim:

- 1 O camundongo de laboratório médio vive aproximadamente 3 anos;
- 2 O ser humano médio vive aproximadamente 80 anos;



$$3 \quad (80 \times 365) \div (3 \times 365) = 26,7 \text{ dias humanos} = 1 \text{ dia de rato};$$

$$4 \quad 365 \div 26,7 = 13,7 \text{ dias de rato} = 1 \text{ ano humano}$$

Desta forma, o estudo da toxicidade da ingesta dos tratamentos AM/SODIS por 13 semanas de rato equivalem há aproximadamente 5,4 anos humano. A maior incógnita para o experimento foi a possibilidade de o metabólito reduzido produzir algum tipo de toxicidade, considerando a ausência de dados relevantes na literatura sobre a forma leuco, no entanto, os resultados demonstraram que não houve diferença entre os grupos que fizeram uso do AM tanto na forma azul quanto leuco. Por isso, os resultados em relação a sua forma azul se tornam apenas uma confirmação do que já é observado pela literatura (KHAN; SAEED; ZEKKER; ZHANG *et al.*, 2022).

O AM pode ser usado como um fármaco eficaz para a doença de Alzheimer e, seus efeitos farmacológicos e toxicológicos no sistema nervoso central são de particular interesse. Assim, a caspase-6 ativada (Casp6) está associada ao comprometimento cognitivo dependente da idade e à doença de Alzheimer. Camundongos idosos com superexpressão de Casp-6 com deficiência cognitiva foram tratados com AM na água potável por 1 mês. O tratamento com AM não alterou os níveis de caspase-6, mas inibiu a atividade de caspase-6 marcada com fluorescência em neurônios intactos (ZHAO; LIANG; XU; YAN *et al.*, 2016).

Além disso, o AM inibiu a atividade de Casp3 em um modelo agudo de toxicidade hepática em ratos (PAKAVATHKUMAR; SHARMA; KAUSHAL; FOVEAU *et al.*, 2015). Isso levanta o seu potencial como substância anti apoptótica, por sua capacidade de inibir caspases efetoras, interrompendo o processo de apoptose. Neste estudo, os resultados na imunofluorescência para a expressão de Caspase-3, um marcador para a apoptose, sugeriu somente uma expressão basal deste marcador nos grupos de camundongos *hairless* testados, quando comparados com o controle positivo.

A beclina-1 (o ortólogo mamífero da função codificada pelo gene ATG6 de levedura) foi bem caracterizada por desempenhar um papel fundamental como regulador chave na autofagia, que é um importante processo catabólico no qual a célula degrada macromoléculas e organelas danificadas em vacúolos autofágicos. Ocorre continuamente em níveis baixos, e pode ser ativada por uma variedade de eventos celulares, incluindo a diferenciação celular (NOGUCHI; HONDA; SAITOH; MATSUMURA *et al.*, 2019). Portanto, conforme as fotomicrografias obtidas das amostras dos órgãos em estudo mostraram pequena expressão do marcador beclina-1. Interpretamos que isso pode significar a sinalização do processo de autofagia fisiológico

na renovação natural de organelas, e não a morte celular por autofagia induzida pelo tratamento AM/SODIS.

E por fim, foi analisada a expressão da proteína de resposta ao estresse oxidativo em eucariotos, a OSGIN1 (OKL-38). Na literatura relacionada a outros órgãos além do pulmão, foi demonstrado que a expressão desta proteína é normalmente baixa. Danos no DNA a regulam positivamente, provavelmente por meio de um processo associado à ativação de p53. Como consequência da expressão de OKL-38, as células sofrem apoptose, provavelmente através da sua translocação para as mitocôndrias, com consequente liberação de citocromo C e morte celular. Assim, a OKL-38 participa de uma via pró-apoptótica relacionada à mitocôndria e genes alvo de p53 (YAO; LI; VENTERS; ZHENG *et al.*, 2008), (HU; YAO; GAN; TOKARSKI *et al.*, 2012) e (LIU; LI; CHEN; CHAN *et al.*, 2014).

O fígado é o principal órgão de metabolismo dos xenobióticos e onde ocorre extenso metabolismo aeróbico, levando a formação de ERO e com alta possibilidade de estresse oxidativo (ABDELHALIM; JARRAR, 2011). Os rins são órgãos responsáveis pela excreção de resíduos metabólicos e controle da homeostase, que por sua vez, consiste em regular o volume extracelular, metabolismo do cálcio, balanço eletrolítico e controle do balanço ácido-básico. Lesões severas nestes órgãos promovem hipotensão e falência irreversíveis (MIDDENDORF; WILLIAMS, 2000).

Entretanto, conforme os resultados obtidos dos órgãos estudados, não foram observados a expressão de uma das principais proteínas que regulam a resposta ao estresse oxidativo nos grupos de camundongos *hairless* estudados quando comparados com o controle positivo de pele em cicatrização.

## 10 CONCLUSÃO DAS ANÁLISES *in vivo*

Os resultados do modelo experimental indicaram que a ingestão da forma leuco do AM não causou alterações histopatológicas no fígado e nos rins dos camundongos *hairless*, conforme observado pela coloração HE. Não foram encontrados sinais de infiltrações celulares, vacuolizações, necroses ou outros indicadores de toxicidade relacionados à forma leuco do AM. Além disso, as análises por microscopia confocal a laser revelou que não houve morte celular por apoptose, autofagia ou estresse oxidativo nos órgãos avaliados, conforme demonstrado pela ausência de expressão das proteínas caspase-3, beclina-1 e OKL-38. Os valores de fluorescência das proteínas estudadas

estavam dentro dos limites esperados, indicando a ausência de atividades exacerbadas de morte celular programada por apoptose, autofagia ou estresse oxidativo.

## 11 CONCLUSÕES GERAIS

A combinação de parâmetros *in silico* e *in vitro* para estimar as propriedades TOXICOLÓGICAS dos compostos como os xenobióticos são abordagens valiosas e podem ser úteis para imitar o comportamento *in vivo*. A combinação de múltiplas abordagens aumenta o desempenho dessas previsões, em comparação com os resultados relacionados com um único modelo de estudo.

Neste contexto, em um conjunto de ensaios *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, nós encontramos evidências de que a forma leuco do AM não foi citotóxico, genotóxico e mutagênico nos organismos procaríotos e eucariotos mesmo na presença de ativação metabólica.

Este estudo representou um passo importante na validação de tecnologias alternativas de tratamento de água, visando contribuir para o alcance dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU, especialmente no que diz respeito às: 3-SAÚDE e BEM-ESTAR, 4- EDUCAÇÃO DE QUALIDADE, 6- ÁGUA POTÁVEL e SANEAMENTO, 10- REDUÇÃO DAS DESIGUALDADES.



**Figura 56:** Os 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU.  
<https://brasil.un.org/pt-br>

Os resultados discutidos nesta tese fazem parte de um manuscrito em desenvolvimento intitulado “*Safety Evaluation of Methylene Blue/Solar Disinfection (SODIS) in Water Treatment with alternative methods: In Silico, In Vitro, and In Vivo Studie*”s, que pode ser encontrado no Anexo B.

## 12 PERSPECTIVAS

- Evidentemente os resultados sugerem que a forma leuco do AM na concentração de 100 ng/ml não causou qualquer efeito tóxico nas metodologias aplicadas;
- A aplicação da técnica de Desinfecção Solar + AM pode ter seu uso potencialmente estratégico principalmente durante calamidades públicas, como alagamentos e enchentes;
- A capacitação de jovens (escolas e comunidades) para disseminar a técnica AM/SODIS em regiões carentes, desta forma, diminuindo os problemas associados ao consumo de águas contaminadas;
- O uso do método SODIS com AM é de extrema relevância, principalmente, para as regiões que não dispõem de intensidade solar suficiente. Essa adição de AM reduziria o tempo de espera drasticamente, e com apenas 1 hora de Sol pleno, a água estaria completamente descontaminada. Na figura 57 encontra-se o esquema prático para a utilização doméstica do AM.

O método consiste em 6 etapas simples representadas na “Cartilha AM-SODIS” (Fig 57).

1. Lave as garrafas de plástico: As garrafas devem estar limpas, transparente, incolor, com volume de 2 litros ou menor, e ter todos os rótulos de plástico ou papel removidos. Recomendamos usar garrafas PET e lavá-las com sabão antes do primeiro uso.

2. Filtre a água com uma peneira ou um pano limpo para retirada de folhas, terra ou qualquer resíduo sólido. A água não deve ser muito turva.

3. Adicione uma gota de azul de metileno (1%) para 10 litros de água. A água potencialmente contaminada é colocada em garrafas PET transparentes e incolores de até 2 litros.

4. Encha as garrafas com água, feche-as e agite-as bem.

5. Exponha as garrafas ao sol: As garrafas são expostas à luz solar direta por no mínimo 3 horas em dias principalmente ensolarados, ou 1 dia quando o céu estiver mais de 50% nublado.

6. Armazene água: A água tratada é armazenada nas garrafas até o consumo. As garrafas PET são eficientes até 30 dias de exposição ao sol.

# Cartilha AM-SODIS

**6 PASSOS PARA UMA ÁGUA SAUDÁVEL**

**1** Passo:



Para o primeiro uso da garrafa, lave-a bem com água e sabão.

**2** Passo:



Em seguida, filtre a água com paninho e as deixe separadas.

**3** Passo:



Adicione uma gota de Azul de Metileno 1% em 10 litros de água.

**4** Passo:



Feche as garrafas e agite bem.

**5** Passo:



Coloque as garrafas sob o Sol em um telhado durante 3 horas.

**6** Passo:



Quando a água esfriar, sirva-se e já pode beber.



**Figura 57** – Esquema proposto para o uso doméstico do AM na técnica SODIS para 10 litros de água e logomarca por Yasmin Bessa/2024.

## 12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, J.; LAMBETH, J. D. Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. **Free Radical Biology and Medicine**, 49, n. 9, p. 1342-1353, 2010.
- AIUB, C. A. F.; FELZENSZWALB, I. Os princípios do teste de ames (Salmonella/microsomo) e sua aplicabilidade. **Genética na Escola**, 6, n. 2, p. 11-16, 2011.
- AMES, B. N.; DURSTON, W. E.; YAMASAKI, E.; LEE, F. D. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 70, n. 8, p. 2281-2285, 1973.
- AMES, B. N.; MCCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutat. Res.;**(Netherlands), 31, 1975.
- ANDREOLLO, N. A.; SANTOS, E. F. d.; ARAÚJO, M. R.; LOPES, L. R. Rat's age versus human's age: what is the relationship? **ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, 25, p. 49-51, 2012.
- BAIRD, C. **Química ambiental**. Reverté, 2018. 8429194258.
- BARR, M. M. Super models. **Physiological genomics**, 13, n. 1, p. 15-24, 2003.
- BENAVIDES, F.; OBERYSZYN, T. M.; VANBUSKIRK, A. M.; REEVE, V. E. *et al.* The hairless mouse in skin research. **Journal of dermatological science**, 53, n. 1, p. 10-18, 2009.
- BERNARDET, J.-F.; BOWMAN, J. P. The genus flavobacterium. **The prokaryotes**, 7, p. 481-531, 2006.
- BITEW, B. D.; GETE, Y. K.; BIKS, G. A.; ADAFRIE, T. T. The effect of SODIS water treatment intervention at the household level in reducing diarrheal incidence among children under 5 years of age: a cluster randomized controlled trial in Dabat district, northwest Ethiopia. **Trials**, 19, p. 1-15, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, p. 39-46, 2011.
- CARDOSO-RURR, J. S.; DE PAIVA, J. P.; PAULINO-LIMA, I. G.; DE ALENCAR, T. A. *et al.* Microbiological decontamination of water: improving the solar disinfection technique (SODIS) with the use of nontoxic vital dye methylene blue. **Photochemistry and Photobiology**, 95, n. 2, p. 618-626, 2019.
- CARMO, E. D. d. Avaliação da ação sistêmica de extrato liofilizado de *Pfaffia glomerata* na carcinogênese quimicamente induzida pelo DMBA em pele de camundongos Hairless. 2007.
- CASLAKE, L. F.; CONNOLLY, D. J.; MENON, V.; DUNCANSON, C. M. *et al.* Disinfection of contaminated water by using solar irradiation. **Applied and environmental microbiology**, 70, n. 2, p. 1145-1151, 2004.

- CHEN, Q.; KANG, J.; FU, C. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. **Signal transduction and targeted therapy**, 3, n. 1, p. 18, 2018.
- CONROY, R. M.; MEEGAN, M.; JOYCE, T.; MCGUIGAN, K. *et al.* Solar disinfection of drinking water protects against cholera in children under 6 years of age. **Archives of disease in childhood**, 85, n. 4, p. 293-295, 2001.
- DA SILVA, A. C.; PAIVA, J. P.; DINIZ, R. R.; DOS ANJOS, V. M. *et al.* Photoprotection assessment of olive (*Olea europaea* L.) leaves extract standardized to oleuropein: In vitro and in silico approach for improved sunscreens. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 193, p. 162-171, 2019.
- DHAR, R.; FALCONE, G. J.; CHEN, Y.; HAMZEHLOO, A. *et al.* Deep learning for automated measurement of hemorrhage and perihematomal edema in supratentorial intracerebral hemorrhage. **Stroke**, 51, n. 2, p. 648-651, 2020.
- DINIZ, R. R.; DOMINGOS, T. F.; PINTO, G. R.; CABRAL, L. M. *et al.* Use of in silico and in vitro methods as a potential new approach methodologies (NAMs) for (photo) mutagenicity and phototoxicity risk assessment of agrochemicals. **Science of The Total Environment**, 904, p. 167320, 2023.
- DINIZ, R. R.; PAIVA, J. P.; AQUINO, R. M.; GONÇALVES, T. C. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* strains as bioindicators for titanium dioxide sunscreen photoprotective and photomutagenic assessment. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 198, p. 111584, 2019.
- DZIERZBICKI, P.; KOPROWSKI, P.; FIKUS, M. U.; MALC, E. *et al.* Repair of oxidative damage in mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the MSH1-dependent pathway. **DNA repair**, 3, n. 4, p. 403-411, 2004.
- ECONOMIC, U. N. D. o.; SOCIAL AFFAIRS, P. D. World Population Prospects 2022: Summary of Results. 2022, UN DESA/POP/2022/TR/NO. 3. 2022.
- EKI, T. Yeast-based genotoxicity tests for assessing DNA alterations and DNA stress responses: a 40-year overview. **Applied microbiology and biotechnology**, 102, n. 6, p. 2493-2507, 2018.
- FEDERICO, A.; CARDAIOLI, E.; DA POZZO, P.; FORMICHI, P. *et al.* Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. **Journal of the neurological sciences**, 322, n. 1-2, p. 254-262, 2012.
- FISHER, M. B.; KEENAN, C. R.; NELSON, K. L.; VOELKER, B. M. Speeding up solar disinfection (SODIS): effects of hydrogen peroxide, temperature, pH, and copper plus ascorbate on the photoinactivation of *E. coli*. **Journal of Water and Health**, 6, n. 1, p. 35-51, 2008.
- FOLGUEIRA, M. A. A. K.; BRENTANI, M. M. Câncer de mama. **Oncologia Molecular**, 2004.
- FREITAS, M. B. d.; BRILHANTE, O. M.; ALMEIDA, L. M. d. Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. **Cadernos de Saúde Pública**, 17, p. 651-660, 2001.
- GAO, Z.; CHEN, Y.; CAI, X.; XU, R. Predict drug permeability to blood-brain-barrier from clinical phenotypes: drug side effects and drug indications. **Bioinformatics**, 33, n. 6, p. 901-908, 2017.

- GATEHOUSE, D.; HAWORTH, S.; CEBULA, T.; GOCKE, E. *et al.* Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, 312, n. 3, p. 217-233, 1994.
- GAUDETTE, N. F.; LODGE, J. W. Determination of methylene blue and leucomethylene blue in male and female Fischer 344 rat urine and B6C3F1 mouse urine. **Journal of analytical toxicology**, 29, n. 1, p. 28-33, 2005.
- GERISCHER, U. Acinetobacter molecular biology. **Int Microbiol**, 11, p. 147-150, 2008.
- GINIMUGE, P. R.; JYOTHI, S. Methylene blue: revisited. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, 26, n. 4, p. 517-520, 2010.
- GIRARD, P.; BOITEUX, S. Repair of oxidized DNA bases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimie**, 79, n. 9-10, p. 559-566, 1997.
- GOFFEAU, A.; BARRELL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W. *et al.* Life with 6000 genes. **Science**, 274, n. 5287, p. 546-567, 1996.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E.; MORENO, M. J. **Tratado de fisiología médica**. Interamericana México, 1971.
- HALL, J. E. **Guyton & Hall. Tratado de fisiología médica**. Elsevier Health Sciences, 2021. 8413820731.
- HEJTMANCIK, M.; RYAN, M.; TOFT, J.; PERSING, R. *et al.* Hematological effects in F344 rats and B6C3F1 mice during the 13-week gavage toxicity study of methylene blue trihydrate. **Toxicological Sciences**, 65, n. 1, p. 126-134, 2002.
- HODGE, H. C.; STERNER, J. H. Tabulation of toxicity classes. **American Industrial Hygiene Association Quarterly**, 10, n. 4, p. 93-96, 1949.
- HOSSY, B. H.; DA COSTA LEITÃO, A. A.; DOS SANTOS, E. P.; MATSUDA, M. *et al.* Phototoxic assessment of a sunscreen formulation and its excipients: An in vivo and in vitro study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 173, p. 545-550, 2017.
- HOSSY, B. H.; DA COSTA LEITAO, A. A.; LUZ, F. B.; DOS SANTOS, E. P. *et al.* Effects of a sunscreen formulation on albino hairless mice: a morphological approach. **Archives of dermatological research**, 305, p. 535-544, 2013.
- HU, J.; YAO, H.; GAN, F.; TOKARSKI, A. *et al.* Interaction of OKL38 and p53 in regulating mitochondrial structure and function. 2012.
- ISO. ISO 11350: 2012. Water Quality—Determination of the Genotoxicity of Water and Waste Water—Salmonella/Microsome Fluctuation Test (Ames Fluctuation Test). : ISO Geneva, Switzerland 2012.
- ISONO, K.; YOURNO, J. Chemical carcinogens as frameshift mutagens: Salmonella DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 71, n. 5, p. 1612-1617, 1974.
- JAKUBOWSKI, A.; AMBROSE, C.; PARR, M.; LINCECUM, J. M. *et al.* TWEAK induces liver progenitor cell proliferation. **The Journal of clinical investigation**, 115, n. 9, p. 2330-2340, 2005.



- KHAN, I.; SAEED, K.; ZEKKER, I.; ZHANG, B. *et al.* Review on methylene blue: Its properties, uses, toxicity and photodegradation. **Water**, 14, n. 2, p. 242, 2022.
- KONCAGÜL, E.; TRAN, M.; CONNOR, R. Relatório mundial das Nações Unidas sobre desenvolvimento dos recursos hídricos 2020: água e mudança climática, fatos e dados. 2020.
- LAURENT, J. M.; YOUNG, J. H.; KACHROO, A. H.; MARCOTTE, E. M. Efforts to make and apply humanized yeast. **Briefings in functional genomics**, 15, n. 2, p. 155-163, 2016.
- LIU, M.; LI, Y.; CHEN, L.; CHAN, T. H. M. *et al.* Allele-specific imbalance of oxidative stress-induced growth inhibitor 1 associates with progression of hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, 146, n. 4, p. 1084-1096. e1085, 2014.
- LONNEN, J.; KILVINGTON, S.; KEHOE, S.; AL-TOUATI, F. *et al.* Solar and photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in drinking water. **Water research**, 39, n. 5, p. 877-883, 2005.
- MADRONICH, S.; MCKENZIE, R. L.; BJÖRN, L. O.; CALDWELL, M. M. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 46, n. 1-3, p. 5-19, 1998.
- MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, 113, n. 3-4, p. 173-215, 1983.
- MCGUIGAN, K. G.; CONROY, R. M.; MOSLER, H.-J.; DU PREEZ, M. *et al.* Solar water disinfection (SODIS): a review from bench-top to roof-top. **Journal of hazardous materials**, 235, p. 29-46, 2012.
- MEDLICOTT, K.; WESTER, A.; GORDON, B.; MONTGOMERY, M. *et al.* Technical brief on water, sanitation, hygiene and wastewater management to prevent infections and reduce the spread of antimicrobial resistance. **WHO/FAO/OIE Recommendations Report**, 2020.
- MEIERHOFER, R.; LANDOLT, G. Factors supporting the sustained use of solar water disinfection—Experiences from a global promotion and dissemination programme. **Desalination**, 248, n. 1-3, p. 144-151, 2009.
- MEIERHOFER, R.; WEGELIN, M. Desinfecção solar da água: guia de aplicações do SODIS. **Dübendorf: EAWAG, SANDEC**, 2002.
- METCALF, J. S.; CODD, G. A. Cyanotoxins. *In: Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time*: Springer, 2012. p. 651-675.
- MIAO, R.; XIA, L.-Y.; CHEN, H.-H.; HUANG, H.-H. *et al.* Improved classification of blood-brain-barrier drugs using deep learning. **Scientific reports**, 9, n. 1, p. 8802, 2019.
- MIDDENDORF, P. J.; WILLIAMS, P. L. Nephrotoxicity: Toxic responses of the kidney. **Principles of toxicology: environmental and industrial applications**, p. 129-143, 2000.
- MILLER, J. H. Experiments in molecular genetics. **(No Title)**, 1972.
- MORAA, A. K. **Investigation of mutagenicity of solar disinfected (SODIS) water stored in plastic bottles**. 2015. -, University of Nairobi.

- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis**, 455, n. 1-2, p. 29-60, 2000.
- MYATT, G. J.; AHLBERG, E.; AKAHORI, Y.; ALLEN, D. *et al.* In silico toxicology protocols. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 96, p. 1-17, 2018.
- NELSON, K. L.; BOEHM, A. B.; DAVIES-COLLEY, R. J.; DODD, M. C. *et al.* Sunlight-mediated inactivation of health-relevant microorganisms in water: a review of mechanisms and modeling approaches. **Environmental Science: Processes & Impacts**, 20, n. 8, p. 1089-1122, 2018.
- NO, O. T. 471: Bacterial reverse mutation test. **OECD guidelines for the testing of chemicals, section**, 4, p. 1-11, 1997.
- NOGUCHI, S.; HONDA, S.; SAITOH, T.; MATSUMURA, H. *et al.* Beclin 1 regulates recycling endosome and is required for skin development in mice. **Communications biology**, 2, n. 1, p. 37, 2019.
- NONCHEV, S.; BRANCAZ, M.-V.; FOLCO, E.; ROMERO, Y. *et al.* Le gène hairless de la souris: Fonctions à la racine du poil et au coeur d'une subtile pléiotropie. **M/S: médecine sciences**, 22, n. 5, p. 525-530, 2006.
- OECD. **Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test**. 2020.
- OGOBUIRO, I.; TUMA, F. Physiology, Renal. 2020. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538339/>. Accessed August, 29, 2020.
- OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, 567, n. 2-3, p. 109-149, 2004.
- ORGANIZATION, W. H. Progress on sanitation and drinking water—2015 update and MDG assessment. 2015.
- ORGANIZATION, W. H. **Inheriting a sustainable world? Atlas on children's health and the environment**. World Health Organization, 2017. 924151177X.
- ORGANIZATION, W. H. **The state of food security and nutrition in the world 2019: safeguarding against economic slowdowns and downturns**. Food & Agriculture Org., 2019a. 9251315701.
- ORGANIZATION, W. H. **Water, sanitation, hygiene and health: a primer for health professionals**. World Health Organization. 2019b.
- PAIVA, J. P.; DINIZ, R. R.; LEITAO, A. C.; CABRAL, L. M. *et al.* Insights and controversies on sunscreen safety. **Critical Reviews in Toxicology**, 50, n. 8, p. 707-723, 2020.
- PAIVA, J. P.; SANTOS, B. A.; KIBWILA, D. M.; GONÇALVES, T. C. *et al.* Titanium dioxide–montmorillonite nanocomposite as photoprotective agent against ultraviolet B radiation-induced mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: A potential candidate for safer sunscreens. **Journal of pharmaceutical sciences**, 103, n. 8, p. 2539-2545, 2014.
- PINTO, A. V.; DEODATO, E. L.; CARDOSO, J. S.; OLIVEIRA, E. F. *et al.* Enzymatic recognition of DNA damage induced by UVB-photosensitized titanium dioxide and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for oxidatively DNA

damage generation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 688, n. 1-2, p. 3-11, 2010.

POCHMANN, M.; AMORIM, R. Atlas da exclusão social no Brasil. *In: Atlas da exclusão social no Brasil*, 2003. p. 221-221.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition**, 21, n. 6, p. 775, 2005.

RAIES, A. B.; BAJIC, V. B. In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, 6, n. 2, p. 147-172, 2016.

RIJAL, G.; FUJIOKA, R. Synergistic effect of solar radiation and solar heating to disinfect drinking water sources. **Water Science and Technology**, 43, n. 12, p. 155-162, 2001.

RINNERTHALER, M.; BÜTTNER, S.; LAUN, P.; HEEREN, G. *et al.* Yno1p/Aim14p, a NADPH-oxidase ortholog, controls extramitochondrial reactive oxygen species generation, apoptosis, and actin cable formation in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 109, n. 22, p. 8658-8663, 2012.

RIZZATTI, G.; LOPETUSO, L.; GIBIINO, G.; BINDA, C. *et al.* Proteobacteria: a common factor in human diseases. **BioMed research international**, 2017, 2017.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W.; BARNASH, T. A. **Atlas de histologia descritiva**. Artmed Editora, 2016. 8536327499.

SANDEC, E. Solar water disinfection: a guide for the application of sodis. *In: SANDEC Report No 06/02*: EAWAG SANDEC Duebendorf, Switzerland, 2002.

SAÚDE, B. M. d. Portaria N. 2.914, de 12 de Dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da água para consumo e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial [da] União**, 2011.

SAXENA, D.; SHARMA, A.; SIDDIQUI, M. H.; KUMAR, R. Blood brain barrier permeability prediction using machine learning techniques: an update. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 20, n. 14, p. 1163-1171, 2019.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. **Genome biology**, 6, p. 1-4, 2005.

SINGH, M.; DIVAKARAN, R.; KONDA, L. S. K.; KRISTAM, R. A classification model for blood brain barrier penetration. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, 96, p. 107516, 2020.

SOBOKSA, N. E.; GARI, S. R.; HAILU, A. B.; DONACHO, D. O. *et al.* Effectiveness of solar disinfection water treatment method for reducing childhood diarrhoea: a systematic review and meta-analysis. **BMJ open**, 10, n. 12, p. e038255, 2020.

TARRASS, F.; BENJELLOUN, M. The effects of water shortages on health and human development. **Perspectives in public health**, 132, n. 5, p. 240-244, 2012.

TEIXEIRA, J. C.; GUILHERMINO, R. L. Análise da associação entre saneamento e saúde nos estados brasileiros, empregando dados secundários do banco de dados indicadores e dados básicos para a saúde 2003-IDB 2003. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, 11, p. 277-282, 2006.

- VILLAR, P. C. As águas subterrâneas e o direito à água em um contexto de crise. **Ambiente & Sociedade**, 19, p. 85-102, 2016.
- VOLLMAR, B.; MENGER, M. D. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. **Physiological reviews**, 89, n. 4, p. 1269-1339, 2009.
- WANG, Z.; YANG, H.; WU, Z.; WANG, T. *et al.* In silico prediction of blood–brain barrier permeability of compounds by machine learning and resampling methods. **ChemMedChem**, 13, n. 20, p. 2189-2201, 2018.
- WHO, G. Guidelines for drinking-water quality. **World health organization**, 216, p. 303-304, 2011.
- WISSE, E. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. **Journal of ultrastructure research**, 31, n. 1-2, p. 125-150, 1970.
- WOOLEY, J. C.; GODZIK, A.; FRIEDBERG, I. A primer on metagenomics. **PLoS computational biology**, 6, n. 2, p. e1000667, 2010.
- YAO, H.; LI, P.; VENTERS, B. J.; ZHENG, S. *et al.* Histone Arg modifications and p53 regulate the expression of OKL38, a mediator of apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, 283, n. 29, p. 20060-20068, 2008.
- ZHANG, H.; SEKIGUCHI, Y.; HANADA, S.; HUGENHOLTZ, P. *et al.* Gemmatimonas aurantiaca gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 53, n. 4, p. 1155-1163, 2003.
- ZIMMERMAN, H. J. Drug-induced liver disease. **Clinics in liver disease**, 4, n. 1, p. 73-96, 2000.

#### **Material acessado em sites da internet:**

- <http://www.mma.gov.br/2009>. Acessado em: 16 de abril de 2016.
- <http://www.tratabrasil.org.br/manifesto>. Acessado em: 12 de maio de 2016 e julho de 2020.
- <https://themarginalized.com/2010/04/29/the-difference-is-drinkability-the-sodis-method/>
- [http://www.sodis.ch/methode/anwendung/ausbildungsmaterial/dokumente\\_material/manual\\_p.pdf](http://www.sodis.ch/methode/anwendung/ausbildungsmaterial/dokumente_material/manual_p.pdf)). Acessado em: 08 de junho de 2015.
- <http://2.bp.blogspot.com/espectro+solar.png> Acessado em 08 de junho de 2015.
- <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SolarGIS-Solar-map-World-map-en.png>). Acessado em: 18 de agosto de 2016.
- [http://www.sodis.ch/methode/anwendung/ausbildungsmaterial/dokumente\\_material/sodismanual\\_2016.pdf](http://www.sodis.ch/methode/anwendung/ausbildungsmaterial/dokumente_material/sodismanual_2016.pdf). Acessado em: 14 de julho de 2018.

<http://www.aneel.gov.br>. Acessado em 12 de fevereiro de 2019

<http://snis.gov.br/painel-informacoes-saneamento-brasil/web/painel-abastecimento-agua>. Acessado em 05 de março de 2020.

<http://snis.gov.br/painel-informacoes-saneamento-brasil/web/painel-esgotamento-sanitario>. Acessado em 05 de março de 2020.

<https://www.unicef.org/brazil/relatorios/pobreza-na-infancia-e-na-adolescencia>. Acessado em 22 de abril de 2020.

<http://www.tratabrasil.org.br/artigos>. Acessado em 18 de abril de 2020.

<https://www.ibge.gov.br> - Pnad (Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios) de 2018. Acessado em 08 de maio de 2020.

<http://omLc.org/spectra/mb/>.

<http://enfo.agt.bme.hu>. Acessado 10 de maio de 2015

<http://toxnet.nlm.nih.gov>.

U.S. National Library of Medicine database on Methylene Blue toxicology (2021).. Acessado em 23 de julho de 2021.

<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:SolarGIS-Solar-map-World-map-en.png>. Acessado em: 28 de maio de 2024.

<http://jaxmice.jax.org/strain/000673.html>

## 12 - ANEXO – A

Photochemistry and Photobiology - Decision on  
Manuscript ID PHP-2024-06-RAR-0150

Externa

**From: Andrés Thomas** <onbehalf@manuscriptcentral.com>  
2024, 09:09

To: lage, jean.cadet, mim, jupaiva\_rj, raiane.rdiniz, acleita, hudsonhossy,  
miguelnco

22-Jul-2024

Dear Dr. Lage:

Manuscript ID PHP-2024-06-RAR-0150 entitled "The Use of a Solar Simulator Device to Standardize Microbiological Decontamination of Contaminated Water by Solar Disinfection by the SODIS and MB/SODIS Protocols" which you submitted to Photochemistry and Photobiology, has been reviewed. The comments of the reviewers are included at the bottom of this letter. Major revision of your manuscript is required before it can be accepted for publication. You should address the reviewers' comments by revising your manuscript accordingly. Please highlight the changes to your manuscript within the document by using the track changes mode in MS Word or by using bold or colored text.

Our journal is currently transitioning to Wiley's Research Exchange submission portal. Please read these instructions carefully.

If you submitted your manuscript through our Research Exchange site, you will see a link below to submit your revised

manuscript: <https://wiley.atyponrex.com/submissionBoard/1/afbdb62e-c159-4926-a877-78cf7b6f2088/current> (If no link appears, follow the instructions in the next paragraph.)

Click on the link or go to [wiley.atyponrex.com/journal/PHP](https://wiley.atyponrex.com/journal/PHP). Sort by journal and submission status to locate this manuscript, then click the "Revise submission" button to submit your revision. You will be able to respond to the reviewer comments when asked to "Upload your Author Response". All supplementary and additional files will be carried over when you submit a revised manuscript. You may be required to provide additional files at the revision stage.

If you submitted your manuscript through ScholarOne, please use this link to submit your revised manuscript: \*\*\* PLEASE NOTE: This is a two-step process. After clicking on the link, you will be directed to a webpage to confirm. \*\*\*

[https://mc.manuscriptcentral.com/php?URL\\_MASK=ebd87074e09b41caa8add3d8f8ffae0b](https://mc.manuscriptcentral.com/php?URL_MASK=ebd87074e09b41caa8add3d8f8ffae0b) Click on the link or go to <https://mc.manuscriptcentral.com/php> and

enter your Author Center, where you will find your manuscript title listed under "Manuscripts with Decisions." Under "Actions," click on "Create a Revision".

You will be able to respond to the comments made by the reviewer(s) in the space provided. Your original files are available to you when you upload your revised manuscript. Please delete any redundant files before completing the submission.

When submitting your revised manuscript, you must provide a list of responses to the comments made by the reviewer(s) in the space provided. In order to expedite the processing of the revised manuscript, please be as specific as possible in your response to the reviewer(s). We ask that you complete the revision within 8 weeks of receiving this letter. If you require additional time please contact the editorial office at [asp.ed@usherbrooke.ca](mailto:asp.ed@usherbrooke.ca)

Please take a moment to carefully read through the Authors' instructions attached to this letter, bearing in mind that the Accepted Article procedure now used by Photochemistry and Photobiology implies that after acceptance papers will rapidly appear online as uncorrected pdf-files.

IMPORTANT: Your original files are available to you when you upload your revised manuscript. Please replace the files that are being updated at this revision stage (text, figures, tables, etc.) and delete any old files that are no longer appropriate. This journal offers a number of license options for published papers; information about this is available

here: [https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-](https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/licensing/index.html)

[Authors/licensing/index.html](https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/licensing/index.html). The submitting author has confirmed that all co-authors have the necessary rights to grant in the submission, including in light of each co-author's funder policies. If any author's funder has a policy that restricts which kinds of license they can sign, for example if the funder is a member of Coalition S, please make sure the submitting author is aware.

Thank you for submitting your manuscript to Photochemistry and Photobiology and I look forward to receiving your revision.

Wiley Editing Services Available to All Authors Should you be interested, Wiley Editing Services offers expert help with manuscript, language, and format editing, along with other article preparation services. You can learn more about this service option at [www.wileyauthors.com/eoo/preparation](http://www.wileyauthors.com/eoo/preparation). You can also check out Wiley's collection of free article preparation resources for general guidance about writing and preparing your manuscript at [www.wileyauthors.com/eoo/prepresources](http://www.wileyauthors.com/eoo/prepresources).

Sincerely,

Dr. Andrés Thomas

Associate Editor, Photochemistry and Photobiology

[athomas@inifta.unlp.edu.ar](mailto:athomas@inifta.unlp.edu.ar), [andresht1@hotmail.com](mailto:andresht1@hotmail.com)

**Fwd: Revised manuscript submitted to Photochemistry and Photobiology**  
1 mensagem

---

**Claudia de Alencar Santos Janot**

19 de agosto de

**Pacheco** <lage@biof.ufrj.br>

2024 às 18:28

Para: "janine@biof.ufrj.br" <janine@biof.ufrj.br>

----- Message transféré -----

De : **Photochemistry and Photobiology** <[no-reply@atyponrex.com](mailto:no-reply@atyponrex.com)>

Date : lundi 19 août 2024

Objet : Revised manuscript submitted to Photochemistry and Photobiology

À : CLAUDIA LAGE <[lage@biof.ufrj.br](mailto:lage@biof.ufrj.br)>

Dear CLAUDIA LAGE,

Your revised manuscript "The Use of a Solar Simulator Device to Standardize Microbiological Decontamination of Contaminated Water by Solar Disinfection by the SODIS and MB/SODIS Protocols" has been successfully submitted and is being delivered to the editorial office of *Photochemistry and Photobiology* for consideration. Further information about your submission will be emailed to you by the journal editorial office. You may review your submission using the following link: <https://submission.wiley.com/submissionBoard/1/2cf53a07-174a-4aa7-be06-cd6211b5be37>

Thank you for your manuscript submission.

Sincerely,

The Editorial Staff at Photochemistry and Photobiology

[asp.ed@usherbrooke.ca](mailto:asp.ed@usherbrooke.ca)

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more by reading our [data protection policy](#). In case you don't want to be contacted by this publication again, please send an email to [asp.ed@usherbrooke.ca](mailto:asp.ed@usherbrooke.ca).



## Your article has been accepted! Here's what comes next

Externa

**cs-author@wiley.com**

5 de set. de  
2024, 08:27

Dear Mrs. Janine Rurr ,

Article ID: PHP14023

Article Title: "The Use of a Solar Simulator Device to Standardize Microbiological Decontamination of Contaminated Water by Solar Disinfection by the SODIS and MB/SODIS Protocols"

Journal Title: Photochemistry and Photobiology

Congratulations your article has been accepted in Photochemistry and Photobiology! To register with Author Services, simply click [here](#) or paste this link into your browser.

Wiley has a new, unified log in process with CONNECT to streamline the author experience across all of its platforms. When you click on your invitation link, you will be redirected to log in through the new CONNECT portal before going back to manage your article.

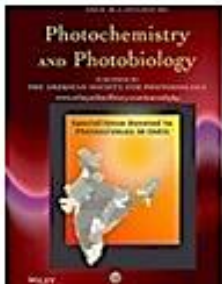
[https://authorservices.wiley.com/index.html#register-  
invite/WeRTaJl3bIjMwZzykWaedc2S4ElbKstvd6SzR48nI9g%3D](https://authorservices.wiley.com/index.html#register-invite/WeRTaJl3bIjMwZzykWaedc2S4ElbKstvd6SzR48nI9g%3D)

With Wiley Author Services you can:

Track your article's progress to publication  
Access your published article

If you need any assistance, please click here to view our Help section.

Sincerely,  
Wiley Author Services

	<p><b>Photochemistry and Photobiology</b></p> <p><b>The Use of a Solar Simulator Device to Standardize Microbiological Decontamination of Contaminated Water by Solar Disinfection by the SODIS and MB/SODIS Protocols</b></p> <p>DOI: 10.1111/php.14023</p> <p>Status: In Production</p>
---	---



Received: 27 June 2024 | Revised: 19 August 2024 | Accepted: 4 September 2024  
 DOI: 10.1111/php.14023



## RESEARCH ARTICLE

## The use of a solar simulator device to standardize microbiological decontamination of contaminated water by solar disinfection by the SODIS and MB/SODIS protocols

Janine Simas Cardoso Rurr<sup>1,2</sup> | Juliana Patrão de Paiva<sup>3</sup> | Raiane Rosales Diniz<sup>3</sup> |  
 Alvaro Augusto da Costa Leitao<sup>4</sup> | Bryan Hudson Hossy<sup>5</sup> |  
 Nádia Campos de Oliveira Miguel<sup>5</sup> | Claudia de Alencar Santos Lage<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup>Laboratório de Radiações em Biologia (LaRBio), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Microbiologia e Avaliação Genotóxica (LAMiAG), Faculdade de Farmácia, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>4</sup>Laboratório de Radiobiologia Molecular (RadMol), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>5</sup>Programa de Pesquisa em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biológicas, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

**Correspondence**

Claudia de Alencar Santos Lage,  
 Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.  
 Email: [lage@biof.ufrj.br](mailto:lage@biof.ufrj.br)

**Abstract**

Consuming microbiologically-contaminated water is the primary cause of many water-borne diseases and deaths worldwide. Governments aim at providing drinking water for vulnerable populations, especially through low-cost interventions. Therefore, the solar disinfection (SODIS) of such pathogens provides a simple and cost-effective way to obtain good quality water. In this procedure, PET bottles are filled with contaminated water and exposed to sunlight for 1–2 days. To accelerate decontamination, methylene blue (MB) dye added as a photocatalyst, boosts singlet oxygen generation upon absorbing red-band sunlight. This study explores the use of a Sunlight Simulator (SSL) device to research and standardize the SODIS method with a vital dye as MB. PET bottles were filled with artificially-contaminated water with *Streptococcus epidermidis* and *Deinococcus radiodurans* Gram-positive bacteria, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Gram-negative bacteria, or bacteriophage  $\lambda$  as well. In all experiments, 50 ng/mL MB ensued a synergistic lethal effect after SSL exposure. The results indicate that bacterial and bacteriophage inactivation can be achieved in shorter times with MB-SSL treatment compared to SSL without MB. In this sense, when compared to previous sunlight-SODIS results, the SSL source is a reliable tool to study the parameters of both SODIS and MB-SODIS protocols, and also a feasible tool to afford assays whenever there are unfavorable climate conditions.

**KEYWORDS**

methylene blue, simulated sunlight, SODIS, water decontamination, water-borne microorganisms

**Abbreviations:** MB, methylene blue; ROS, reactive oxygen species; SODIS, solar disinfection; SSL, simulated solar light.

**URL:** <https://pesquisa.biof.ufrj.br/biologia-molecular-estrutural/larbio/>

**13 - ANEXO – B (Artigo em preparação)****Safety Evaluation of Methylene Blue/Solar Disinfection (SODIS) in Water Treatment with alternative methods: In Silico, In Vitro, and In Vivo Studies**

Janine Simas Cardoso Rurr<sup>1,2</sup>, Bryan Hudson Hossy<sup>3,4</sup>, Natália Dos Santos Almeida<sup>5</sup>, Raiane Rosales Diniz<sup>6</sup>, Rosane Silva<sup>7</sup>, Alessandra M.T. de Souza<sup>8</sup>, Nádia Campos de Oliveira Miguel<sup>3,4</sup> and Claudia de Alencar Santos Lage<sup>1,2 \*</sup>

- 1- Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;
- 2- Laboratório de Radiações em Biologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;
- 3- Programa de Pesquisa em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Instituto de Ciências Biológicas, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;
- 4- Programa de Graduação de Histologia, Instituto de Ciências Biológicas, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil,
- 5- Graduação em Farmácia, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.
- 6- Laboratório de Microbiologia e Avaliação Genotóxica (LAMIAG), Faculdade de Farmácia, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
- 7- Laboratório de Metabolismo Macromolecular Firmino Torres de Castro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
- 8- Laboratório de Modelagem Molecular & QSAR (ModMolQSAR), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

\*Corresponding author:

Dr. Claudia de Alencar dos Santos Lage

Laboratório de Radiações em Biologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; Av. Carlos Chagas Filho 373- Bloco G0-36 Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil CEP-21949-902

Telephone number: +55 21 3938-6576

E-mail address: lage@biof.ufrj.br

URL: <https://pesquisa.biof.ufrj.br/biologia-molecular-estrutural/larbio/>

CV: <http://lattes.cnpq.br/4916914753471904>

**ABSTRACT**

Microbiologically contaminated water is a major health issue in developing countries, leading to significant child mortality in Brazil. The SODIS method, using sunlight for water disinfection, is effective but limited on cloudy days. To enhance its efficacy, photocatalysis with Methylene Blue (MB) was studied, focusing on the safety of both oxidized (blue) and reduced (leuco) forms of MB. The study included *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* analyses. *In silico* predictions indicated slight toxicity for both forms, with mutagenic activity observed only in some strains for oxidized MB. *In vitro*, metagenomic analyses confirmed the MB/SODIS treatment's effectiveness in reducing pathogens, with no mutagenic activity observed in the Ames test. Cytotoxicity tests in *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) showed no significant differences between treated and control strains. *In vivo*, mice ingesting treated water for 13 weeks showed no histopathological changes or signs of apoptosis, autophagy, or oxidative stress. The study concluded that the leuco form of MB is non-cytotoxic, non-genotoxic, and non-mutagenic, making the MB/SODIS method safe for human consumption and effective in water sterilization.

## INTRODUCTION

Water resources are currently abundant on Earth. However, besides quantity, water quality is also being compromised due to excess human and animal waste, chemical pollutants, and higher temperatures, which lead to reduced dissolved oxygen. In this context, water reuse (or recycled water) is a reliable alternative to conventional water resources for various human uses, provided it is treated and used safely (KONCAGÜL; TRAN; CONNOR, 2020). According to the WHO, approximately 50 liters of water per person per day are needed to meet basic needs while maintaining a low risk to public health (ORGANIZATION, 2017), (MEDLICOTT; WESTER; GORDON; MONTGOMERY *et al.*, 2020). In the global context of untreated water, 149 million children under five who survive diarrhea suffer from some form of growth delay. The lack of access to water, sanitation, and hygiene services contributes to malnutrition through the transmission of pathogens, as gastrointestinal infections inhibit the absorption of essential nutrients for full physical and mental development in children (ORGANIZATION, 2019a) e (ORGANIZATION, 2019b). The SODIS method is a widely used, low-cost, and easy-to-implement tool for water decontamination. However, it has two significant limitations: longer exposure to sunlight is required on cloudy or winter days for adequate disinfection, and microorganisms' resistance to radiation (FISHER; KEENAN; NELSON; VOELKER, 2008). Previous studies have shown that using a low-cost additive, such as MB, can accelerate the SODIS process, making it immensely important for application in communities lacking potable water and relying on the Sun for water disinfection throughout the year (CARDOSO-RURR; DE PAIVA; PAULINO-LIMA; DE ALENCAR *et al.*, 2019). The transformation of MB to its leuco form (colorless) occurs because MB undergoes reduction reactions after electronic excitation when illuminated at 660 nm, generating a semi-reduced radical. Thus, the aim of this study was to investigate the safety and toxicity (hepatic and renal) of orally administered water treated by the MB/SODIS process in its normal (blue) and reduced (leuco) forms through *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* analyses.

## METHODOLOGY

To understand the application of the MB/SODIS process for human consumption, this study explored the safety of the method through three chapters:

***In Silico analysis:*** The first chapter involved a predictive study of mutagenesis for the chemical compounds MB and MB/leuco.

***In Vitro* analysis:** The second chapter analyzed the microbial composition of water samples from an artesian well in Rio de Janeiro using metagenomic analysis before and after SODIS and MB/SODIS treatments. This included UV radiation dosimetry and temperature measurements. Additionally, mutagenicity and cytotoxicity were assessed using the bacterium *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) in the Ames Test, the gold standard for monitoring cellular damage in water (ISO, 2012). The yeast *S. cerevisiae* was also used as a eukaryotic model due to its DNA repair similarities with human systems (GIRARD; BOITEUX, 1997).

***In Vivo* analysis:** The third chapter involved in vivo analyses using hairless mice to study carcinogenicity. Tissue morphology (liver and kidney) was examined via routine optical microscopy with hematoxylin staining. Molecular analyses focused on markers of apoptosis, autophagy, and oxidative stress, quantifying the expressions of caspase-3, beclin-1, and OKL-38 in the kidney and liver of untreated and MB/SODIS-treated groups. Scar tissue skin was used as positive and negative controls.

## **CHAPTER 1: *IN SILICO* ANALYSIS**

**INTRODUCTION** The in silico toxicology analysis in this study provides essential insights that complement in vitro investigations, reducing the need for in vivo assays. Using mathematical and statistical models, such as QSAR and rule-based structural alerts, these methods predict specific toxicological parameters based on experimental data and scientific knowledge (MYATT; AHLBERG; AKAHORI; ALLEN *et al.*, 2018). The ADMET Predictor™ software, which estimates ADMET properties, was employed to assess the toxic and mutagenic potential of MB in both its oxidized (blue) and reduced (leuco) forms. This computational approach offers a reliable strategy for initial safety assessments of xenobiotics, crucial for evaluating drinking water safety. The primary aim of Chapter 1 was to generate in silico predictions of the mutagenicity and acute toxicity of MB using the ADMET Predictor™ software.

**MATERIALS AND METHODS:** Utilizing ADMET Predictor™ version 9.5 (Simulations Plus, Inc., Lancaster, CA, USA), mutagenicity was assessed using a bacterial mutagenicity model with four strains of *S. typhimurium*, with or without metabolic activation by rat liver S9 extract (MARON; AMES, 1983). Acute toxicity in rats was evaluated based on the lethal dose in mg/kg administered orally, causing lethality in 50% of test animals within 24 hours (ADMET Predictor Manual 9.5).

## **RESULTS**

***In silico* toxicity studies on the leuco form of MB:** This study assessed the acute toxicity and mutagenicity of the leuco form of MB using *in silico* methods. For acute toxicity, the median lethal dose (LD50) was determined for both the oxidized (blue) and reduced (leuco) forms of MB. The LD50 values were 773.36 mg/kg for the oxidized form and 823.43 mg/kg for the reduced form, indicating that the leuco form is slightly less toxic. Additionally, the tumor-inducing dose (TD50) was higher for the reduced form, suggesting a lower carcinogenic potential compared to the oxidized form.

Mutagenicity was evaluated using the Ames Test with different strains of *S. typhimurium*. The results showed that both forms were negative for mutagenicity in the TOX\_MUT\_98 (frameshift mutations) and TOX\_MUT\_100 (base substitutions) tests, with higher reliability for the reduced form. However, the oxidized form tested positive for mutagenicity in the TOX\_MUT\_102 strain, while the reduced form remained negative. When metabolic activation was simulated, the oxidized form exhibited mutagenic potential in several strains, whereas the reduced form showed fewer positive results. Overall, these findings suggest that the leuco form of MB has a lower acute toxicity and mutagenic potential than the oxidized form, suggesting a less concerning toxicological safety profile, particularly in contexts of human consumption as presented in Table 1.

<TABLE1>

1 Table 1: In silico qualitative assessment of acute toxicity of oxidized and reduced  
 2 (leuco) forms of MB in rats, and mutagenicity with and without metabolic activation  
 3 using rat liver microsomal fraction in *S. typhimurium* (Ames Test).

<i>In silico</i> assay	Parameter	Oxidized MB (blue)	Reduced MB (leuco)
<b>Acute Toxicity</b>	Recommended maximum therapeutic dose (mg/kg/day)	Above 3.1 (96%)	Above 3.1 (96%)
	LD50 for acute lethal toxicity in rats, all mechanisms (mg/kg)	773.36	823.43
	TD50 - oral dose inducing tumors in 50% of rats (mg/kg/day)	3.67	8.56
	TD50 - oral dose inducing tumors in 50% of mice (mg/kg/day)	9.46	11.17
<b>Mutagenicity</b>	TOX_MUT_98 (frameshift – G:C pair deletion)	Negative (73%)	Negative (87%)
	TOX_MUT_100 (base substitution – G:C to A:T)	Negative (74%)	Negative (84%)
	TOX_MUT_102 (base substitution – A:T to G:C)	Positive (63%)	Negative (98%)
	TOX_MUT_m98 (with metabolic activation)	Positive (60%)	Positive (88%)
	TOX_MUT_m100 (with metabolic activation)	Positive (59%)	Negative (61%)
	TOX_MUT_m102 (with metabolic activation)	Negative (86%)	Negative (93%)

4 Note: 'm' in strain identification signifies the presence of metabolic activation.  
 5 Frameshift mutation reverts the existing mutation by adding 1 G:C base pair, restarting  
 6 the synthesis of the enzyme involved in histidine biosynthesis, or by substituting G:C  
 7 nitrogenous bases of the triplet -GGG-, which encodes the amino acid proline, for the  
 8 AT base pair, restoring the original triplet -GAG- that encodes leucine (transition and  
 9 transversion) (AMES; MCCANN; YAMASAKI, 1975).



## 10 CHAPTER 2: *IN VITRO* ANALYSIS

### 11 INTRODUCTION

12 **Metagenomics:** Metagenomics allows for the direct analysis of genetic material from  
13 microbial communities in their natural habitats. This involves sequencing the DNA  
14 from environmental samples to study the microbial population composition. Using the  
15 MG-RAST program, the bacterial microbiota of artesian well water was characterized in  
16 terms of taxonomic identification and microbiological contamination (WOOLEY;  
17 GODZIK; FRIEDBERG, 2010) and (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005).

18 **Cytotoxicity and Mutagenicity Studies Using *S. typhimurium*:** *In vitro* tests with  
19 model microorganisms, such as *S. typhimurium*, are crucial for detecting the toxicity of  
20 substances before human application. The Ames test, using *S. typhimurium* strains with  
21 specific mutations, is a gold standard for evaluating mutagenic and carcinogenic  
22 potential. These strains, deficient in DNA repair and capable of reverting mutations,  
23 help assess the mutagenic effects of chemicals through the formation of revertant  
24 colonies. The test includes the addition of the S9 fraction to simulate eukaryotic cell  
25 metabolism (MARON; AMES, 1983), (ISO, 2012), (MORTELMANS; ZEIGER, 2000)  
26 and (AMES; DURSTON; YAMASAKI; LEE, 1973).

27 **Cytotoxicity and Mutagenicity Studies Using *S. cerevisiae*:** The yeast *S. cerevisiae*  
28 serves as an effective eukaryotic model for genetic research due to its ease of genetic  
29 manipulation and rapid growth. It shares significant DNA repair mechanisms with  
30 humans. The wild-type strain FF18733, proficient in DNA repair, and the mutant strain  
31 AWP001 (*yno1*), deficient in the *YNO1* gene, were used to study cellular responses to  
32 genotoxic stress. The Canavanine resistance system was employed to detect mutations  
33 in the *CAN1* gene, indicating the effectiveness of mutagenic treatments (GIRARD;  
34 BOITEUX, 1997), (GOFFEAU; BARRELL; BUSSEY; DAVIS *et al.*, 1996),  
35 (LAURENT; YOUNG; KACHROO; MARCOTTE, 2016), (RINNERTHALER;  
36 BÜTTNER; LAUN; HEEREN *et al.*, 2012), (PINTO; DEODATO; CARDOSO;  
37 OLIVEIRA *et al.*, 2010), (PAIVA; SANTOS; KIBWILA; GONÇALVES *et al.*, 2014),  
38 (HOSSY; DA COSTA LEITÃO; DOS SANTOS; MATSUDA *et al.*, 2017), (DINIZ;  
39 PAIVA; AQUINO; GONÇALVES *et al.*, 2019), (PAIVA; DINIZ; LEITAO; CABRAL  
40 *et al.*, 2020). Thus, the specific objectives of Chapter 2 were: to analyze the microbial  
41 composition of real water samples (from an artesian well) before and after SODIS and  
42 MB/SODIS treatments using metagenomics; to determine the cytotoxicity and  
43 mutagenicity of MB in both its blue and leuco (sunlight-decolorized) forms through the

44 Ames Test in *S. typhimurium* strains; and to determine the cytotoxicity and  
 45 mutagenicity of the leuco form of MB (sunlight-decolorized) in bioindicator strains of  
 46 *S. cerevisiae*.

47 <TABLE 2>

## 48 MATERIALS AND METHODS

49 **Table 2** List of *S. typhimurium* and *S. cerevisiae* strains used in in vitro mutagenicity  
 50 and cytotoxicity studies as well as specific mutations relevant to the study

TA 98	<i>S. typhimurium uvrB rfa</i> pKM101 amp <sup>R</sup> (20 µg/ml). Mutation <i>hisD3052</i> , sensitive to frameshift at the <i>his</i> locus by deletion of a G:C pair (P. Quillardet and B. Ames)
TA 100	<i>S. typhimurium uvrB rfa</i> pKM101 amp <sup>R</sup> (20 µg/ml). Mutation <i>hisG46</i> , sensitive to base exchange at the <i>his</i> locus by substitution of nitrogenous bases - G:C to A:T (P. Quillardet and B. Ames).
TA 102	<i>S. typhimurium wild type rfa</i> amp <sup>R</sup> (20 µg/ml) tet <sup>R</sup> (12.5 µg/ml) pKM101 pAQ1. Mutation <i>hisG428</i> , sensitive to base exchange at the <i>his</i> locus by substitution of nitrogenous bases - A:T to G:C (P. Quillardet and B. Ames).
FF18733	<i>S. cerevisiae wild-type</i> , MATa, <i>leu2-3-112</i> , <i>trp1-289</i> , <i>his7-2</i> , <i>ura3-52</i> , <i>lys1-1</i> (F. Fabre).
AWP001	<i>S. cerevisiae Δyno1</i> , FF18733 with <i>yno1::KanMX6</i> (Aquino, Wilmart e Pádula)

51 P. Quillardet – Pasteur Institute, Paris (France) and B. Ames – University of California,  
 52 Berkeley (USA). F. Fabre - CEA, Fontenay-aux-Roses (France). Aquino, Wilmart, and  
 53 Pádula UFRJ: Federal University of Rio de Janeiro (Brazil). Source: (DINIZ; PAIVA;  
 54 AQUINO; GONÇALVES *et al.*, 2019).

55

56 **Bacteria Media and growth conditions:** *S. typhimurium* strains were grown overnight  
 57 in in fresh liquid Lysogeny-Broth (LB) medium (Becton, Dickinson and Company,  
 58 Franklin Lakes, NJ) at 37 °C in a shaking incubator (Innova/USA, New Brunswick  
 59 Scientific, Edison, NJ) to a density of  $1 \times 10^9$ – $2 \times 10^9$  colony forming units (CFU)/mL  
 60 (MARON; AMES, 1983).

61 **Yeast media and growth conditions:** Yeast strains were grown at 30 °C in YPD  
 62 medium (1% yeast extract, 1% bactopectone, 2% glucose, with 2% agar for plates) or  
 63 YNBD medium (2% glucose, 0.7% yeast nitrogen base without amino acids with 2%  
 64 agar for plates) supplemented with appropriate amino acids and bases. Supplemented  
 65 YNBD medium lacking arginine but containing canavanine (Sigma) at 60 mg/l was  
 66 used for the selective growth of canavanine-resistant (Can<sup>R</sup>) mutants

67 **Location and Sample Collection:** This study analyzed water samples from an artesian  
 68 well located in Campo Grande (22°52'27.5"S 43°31'23.8"W) (-22.8986321,-  
 69 43.6230277) Rio de Janeiro, RJ, Brazil. The samples were collected in 2-liter PET

70 bottles, which were pre-cleaned with distilled water and 70% alcohol, followed by air  
71 drying at room temperature.

72 **Water Sample Analysis - Determination of Microbiological Contamination:**

73 Chromocult® is a selective culture medium that differentiates fecal and total coliforms  
74 by detecting two enzymes:  $\beta$ -glucuronidase and  $\beta$ -galactosidase. It contains Tergitol 7,  
75 which inhibits the growth of other bacteria, and SALMON-GAL, a substrate for  $\beta$ -  
76 galactosidase that turns coliform colonies salmon to red after hydrolysis. It also contains  
77 X-GLUC, a substrate for  $\beta$ -glucuronidase, which causes *E. coli* colonies to turn light  
78 blue to turquoise. Since *E. coli* produces both enzymes, it cleaves both substrates,  
79 resulting in dark blue to violet colonies, making fecal coliforms easily distinguishable.  
80 To determine microbiological contamination of well water before and after sun  
81 exposure, 100 ml samples were filtered, and the filters were placed on Chromocult®  
82 agar in Petri dishes.

83 **Sample Processing:** A volume of 100 mL of water was filtered, ground with liquid  
84 nitrogen, and stored at room temperature. The total DNA from the microbial community  
85 was extracted using the PowerSoil™ DNA Isolation Kit (QIAGEN) and quantified with  
86 the Qubit® Fluorometer (Invitrogen®). Amplification was performed using primers  
87 from the gene panel developed by the Laboratory of Macromolecular Metabolism  
88 Firmino Torres de Castro (LMMFTC-UFRJ), using the Multiplex PCR Kit  
89 (QIAGEN®). The PCR product was purified with Agencourt AMPure XP magnetic  
90 beads (Beckman Coulter) and analyzed by agarose gel electrophoresis.

91 **Sequencing:** The library for sequencing was prepared using the Ion Xpress Plus  
92 Fragment Library Kit (ThermoFisher Scientific®). Clonal amplification was performed  
93 using the Ion OneTouch™ 2 System and the Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit  
94 (ThermoFisher Scientific®). Sequencing was carried out on the Ion Torrent PGM  
95 platform at LMMFTC-UFRJ.

96 **Treatments and Microbial Composition Analysis:** The collected water was divided  
97 into three groups: untreated (ST), SODIS treatment (SO), and MB/SODIS treatment  
98 (MBSO). After filtration, the samples were ground, and DNA was extracted using the  
99 ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (Zymo Research). Quantification was performed  
100 with the Qubit® Fluorometer (Invitrogen). NGS sequencing was conducted for the  
101 V6V7V8 region of the 16S rRNA gene, using the Ion S5™ System.

102 **Preparation of Concentrated MB-blue or MB-leuco Solutions for Cytotoxicity and**  
103 **Mutagenesis Assays and irradiation:** A 1 mM stock solution of MB (Sigma-Aldrich

104 M9140) was prepared in sterile deionized water and stored at room temperature,  
105 protected from light. The SODIS or MB/SODIS methodology was applied to these  
106 solutions at a concentration equivalent to 200 µg of AM in 2 liters of water, simulating  
107 daily human consumption. Sunlight in Rio de Janeiro was used for the SODIS process,  
108 with UV-A and UV-B radiation dosimetry measured using the BLAK-RAY – J-221 and  
109 VILBER LOURMAT – VLX – 3 W dosimeters, respectively. After sun exposure, 100  
110 mL samples were frozen at -80°C and lyophilized for four days to remove all water. The  
111 concentrated residues were then dissolved in 0.5 ml of sterile distilled water and applied  
112 to *S. typhimurium* and *S. cerevisiae* cultures to assess the mutagenic and cytotoxic  
113 effects of AM in its blue (oxidized) and leuco (reduced) forms.

#### 114 **Mutagenicity studies**

115 **Ames test:** The methodology of pre-incubation in a water bath for 20 minutes at 37°C,  
116 was done as described by Maron and Ames (1983). *S. typhimurium* strains TA 98, TA  
117 100, and TA 102 were exposed to 0.5 mL of each tested treatment (200µg/plate) various  
118 treatments, including SODIS, MB combined with SODIS (MB/SODIS), MB in the dark  
119 (MB/DARK), and MB in the dark with heat (MB/DARK/HEAT). The treatments were  
120 performed with and without the addition of the S9 fraction, which simulates metabolic  
121 activation. The Mutagenesis Index (MI) was calculated by comparing the number of  
122 revertants per plate in the treated groups to those in the negative control group. Percent  
123 survival was also measured to assess cytotoxicity.

124 **Canavanine-resistant:** The methodology was adapted from (DINIZ; PAIVA;  
125 AQUINO; GONÇALVES *et al.*, 2019) e (DINIZ; DOMINGOS; PINTO; CABRAL *et*  
126 *al.*, 2023). The study assessed cytotoxicity by measuring the survival fraction (N/N0) in  
127 both FF18733 (wt) and AWP001 (yno1) yeast strains after exposure to 200 µg/L of the  
128 leuco form of MB for 180 minutes. Mutagenicity was evaluated by counting the number  
129 of Can<sup>R</sup> mutants per 10<sup>7</sup> cells (Can<sup>R</sup>/10<sup>7</sup> cells) in both strains under the same conditions.  
130 The results were compared against the negative control (untreated cells) to determine  
131 any statistically significant differences. The colonies of survivors and Can<sup>R</sup> mutants  
132 were counted after approximately 96 hours. The average results were plotted in graphs  
133 of survival fraction (N/N0) (plus or minus the standard error) x time, where N0  
134 represents the initial number of cells and N is the number of cells after each treatment,  
135 and in graphs of the number of mutants/10<sup>7</sup> cells x time. All experiments were  
136 conducted independently at least three times.

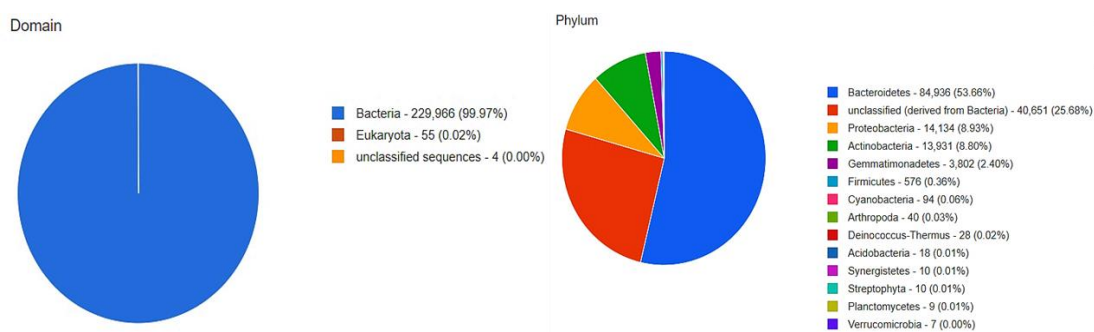
137 **Statistical Analysis:** Statistical analyses of the results were performed using GraphPad  
 138 Prism version 6.00 for Windows. Data with nonparametric distribution of cytotoxicity  
 139 and mutagenesis (His- → His+) were obtained through the One-way ANOVA method  
 140 followed by the Kruskal-Wallis test and, as a post-test, the Dunn's Multiple Comparison  
 141 Test, in which  $p < 0.05$  means that the results are different from each other with 95%  
 142 confidence (significant). For data with nonparametric distribution of cytotoxicity and  
 143 direct mutagenesis (Can<sup>R</sup>), the Student's t-test followed by the Mann-Whitney test were  
 144 used, adopting a significant difference when  $p < 0.05$ .

145 **RESULT**

146 **Metagenomic Analysis of Water Samples before MB/SODIS treatment:** Using the  
 147 membrane filtration technique, the presence of 70 colonies of fecal coliforms and  
 148 countless total coliforms was detected in 100 mL of artesian well water. The extracted  
 149 genomic DNA from these samples was amplified, and the PCR products were analyzed  
 150 by agarose gel electrophoresis, revealing an amplified product of approximately 250 bp.  
 151 Metagenomic analysis, performed using MG-RAST with a dataset containing 333,762  
 152 sequences, showed the predominance of the Bacteria domain (99.97%) in the well water  
 153 sample (Fig 1). The main bacterial groups identified were Bacteroidetes, Proteobacteria,  
 154 Actinobacteria, Gemmatimonadetes, Firmicutes, and Cyanobacteria. These groups  
 155 include constituents of the intestinal microbiota in humans and animals, as well as  
 156 significant pathogens such as *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*.

157 <FIGURE 1>

158



159

160

161

162 Figure 1: Distribution of phylogenetic domains found in the well water sample.

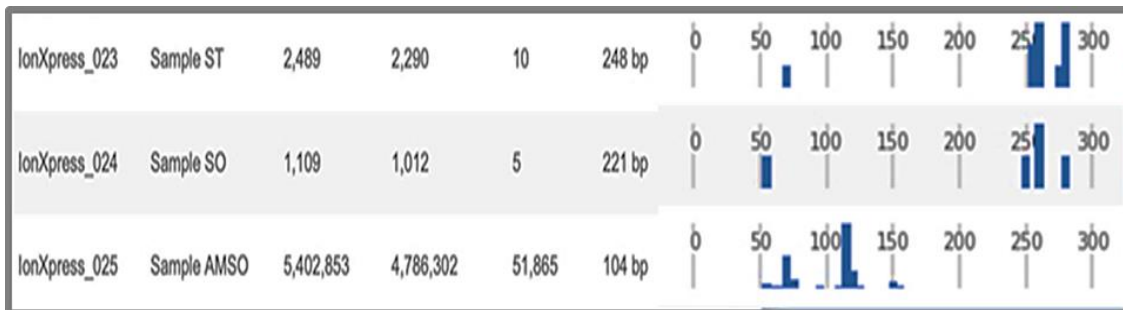
163

164 **DNA fragments after MB/SODIS treatment:** A comparison of DNA fragments  
 165 before and after MB/SODIS treatment revealed significant differences. In the untreated

166 sample (ST), DNA fragments ranged between 50 bp and 100 bp, and from 248 bp or  
 167 more. The SODIS-treated sample (SO) showed DNA fragments of 50 bp and from 221  
 168 bp, indicating DNA fragmentation due to solar radiation. The MB/SODIS-treated  
 169 sample (MBSO) displayed DNA fragments between 50 and 150 bp, suggesting greater  
 170 DNA fragmentation and microorganism death (Table 3). These results demonstrate the  
 171 effectiveness of MB/SODIS treatment in microbiological sterilization of water,  
 172 corroborating previous studies that reported significant microbiological inactivation.

173 <TABLE 3>

174 Table 3: Distribution of the average sizes of the amplified fragments after amplification  
 175 of the genomic material obtained after each experimental situation. ST: no treatment;  
 176 SO: SODIS treatment; MBSO: MB/SODIS treatment.



177

178 **Comparative Study of Results:** In strain TA 98, none of the treatments (SODIS,  
 179 MB/SODIS, MB/DARK, or MB/DARK/HEAT) produced a Mutagenesis Index (MI)  
 180 comparable to that of the positive controls. The highest MI observed was 1.19  
 181 (MB/DARK/HEAT without S9), significantly lower than the MI of 11 for 4NQO and  
 182 7.8 for BaP in the positive controls. The percent survival was generally high across  
 183 treatments, indicating low cytotoxicity. For strain TA 100, a slight increase in MI was  
 184 observed with the SODIS treatment in the presence of S9 (MI=1.8), but this was still  
 185 much lower than the MI of 18.6 for BaP. The other treatments showed minimal  
 186 increases in MI, with values ranging from 0.8 to 1.33. Percent survival remained high,  
 187 with only minor reductions observed in the MB/DARK/HEAT treatment. Strain TA 102  
 188 showed similar trends, with MIs ranging from 0.97 to 1.5 across all treatments, none of  
 189 which approached the MI of 3.59 (4NQO) or 18.6 (MitC) seen in the positive controls.  
 190 Survival rates were generally high, indicating low levels of cytotoxicity.

191 <TABLE 4>

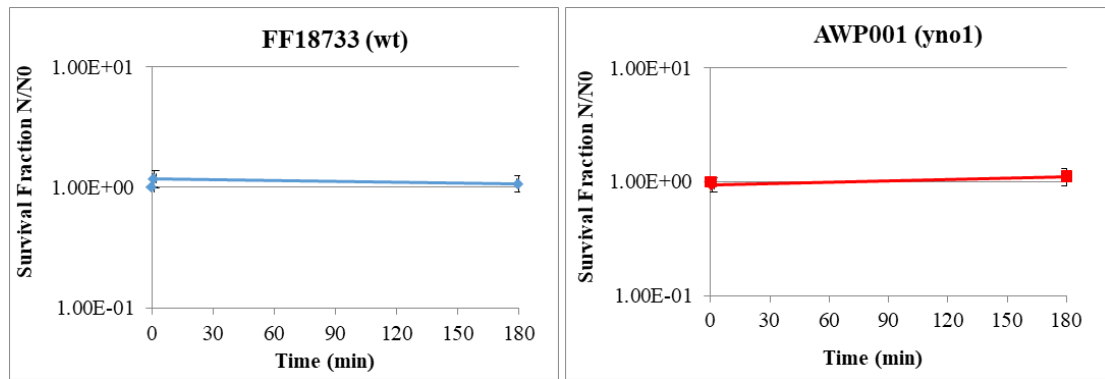
192 **Table 4:** Mutagenic activity expressed by the Mutagenesis Index (MI), average number of  
 193 revertants per plate of *S. typhimurium* strains TA 98, TA 100, and TA 102 exposed to positive  
 194 control treatments, SODIS, MB/SODIS, MB/DARK, or MB/DARK/HEAT with or without  
 195 addition of the S9 fraction and percentage of survivors.

Strain	Treatments	- S9 Fraction			+ S9 Fraction		
		IM <sup>(a)</sup>	His <sup>+</sup> (b)	% Survival <sup>(c)</sup>	IM <sup>(a)</sup>	His <sup>+</sup> (b)	% Survival <sup>(c)</sup>
TA 98	<b>Water –negative control</b>	1	37	100	1	74	100
	<b>Positive control</b>	<b>11</b>	<b>403</b>	<b>17</b>	<b>7,8 (BaP)</b>	<b>575</b>	<b>33</b>
		<b>(4NQO)</b>					
	SODIS	0,84	31	104	1,2	88	123
	MB/SODIS	0,95	35	97	1,3	98	108
	MB/DARK	1,06	39	86	1,3	99	78
	MB/DARK/HEAT	1,19	44	94	1,3	94	98
TA 100	<b>Water –negative control</b>	1	259	100	1	109	100
	<b>Positive control</b>	<b>8,53</b>	<b>2213</b>	<b>27</b>	<b>18,6(BaP)</b>	<b>2030</b>	<b>36</b>
		<b>(4NQO)</b>					
	SODIS	1,08	280	117	1,8	199	122
	MB/SODIS	1,10	284	114	0,8	89	142
	MB/DARK	1,33	344	98	0,8	93	109
	MB/DARK/HEAT	1,32	344	103	0,8	90	84
TA 102	<b>Water –negative control</b>	1	373	100	1	104	100
	<b>Positive control</b>	<b>3,59</b>	<b>1341</b>	<b>109</b>	<b>18,6</b>	<b>1940</b>	<b>38</b>
		<b>(4NQO)</b>			<b>(MitC)</b>		
	SODIS	1,07	399	84	1,1	116	138
	MB/SODIS	1,00	376	85	1,1	112	139
	MB/DARK	1,07	399	91	1,5	160	142
	MB/DARK/HEAT	0,97	362	98	1,1	118	134

196 (a) Mutagenesis Index (number of His<sup>+</sup> colonies induced in the treated sample/number of spontaneous  
197 His<sup>+</sup> colonies in the negative control); (b) revertant colonies/plate; (c) percentage of survival calculated in  
198 relation to the negative control. The dose was considered toxic when the percentage of survivors was <  
199 70%. The positive control in the absence of metabolic activation with all strains was 4-NQO [4-  
200 nitroquinoline 1-oxide (0.5 µg/plate)]. The positive controls for metabolic activation at a final  
201 concentration of (1 µg/plate) were B(a)P (Benzo[a]pyrene) for strains TA 98 and TA 100, and MitC  
202 (Mitomycin C) for strain TA 102. The compounds used as positive controls were dissolved in DMSO  
203 (dimethyl sulfoxide). The numbers in bold correspond to the mutagenic and cytotoxic effects observed  
204 above the recommended limits for the Ames test with and without S9 metabolic activation (\*p < 0.05).  
205

206 **Cytotoxicity of the leuco form of MB tested on strains FF18733 and AWP001:** The  
207 graphs depict the survival fraction (N/N<sub>0</sub>) over time for two different strains: FF18733  
208 (wild type, wt) and AWP001 (*yno1* mutant). Both graphs show the survival of these  
209 strains after being subjected to treatments with MB-leuco (200 µg/l) for 1 minute and  
210 180 minutes. The survival fraction (N/N<sub>0</sub>) of both FF18733 (wt) and AWP001 (*yno1*)  
211 remains stable at approximately 1.00 across the entire 180-minute time frame, showing  
212 no significant reduction in survival compared to the untreated control.

213 <FIGURE 2>



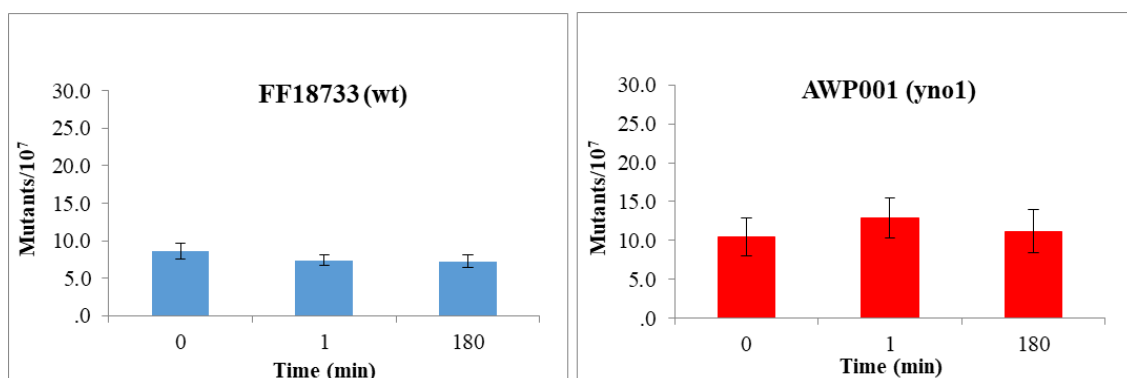
214

215 Figure 2: Graphs representing the survival fraction (N/N0) of the FF18733 (wt) and  
 216 AWP001 (yno1) strains. These results represent the mean ± standard error of at least  
 217 three independent experiments. All strains that were subjected to MB-leuco treatments  
 218 (200 µg/L) at 1 minute and 180 minutes did not show statistical difference in relation to  
 219 the untreated control ( $p < 0.05$ ) – non-parametric Mann-Whitney test.

220

221 **Mutagenicidade da forma leuco do MB testada nas cepas FF18733 e AWP001:** The  
 222 graphs illustrate the rate of mutagenesis, expressed as the number of Can<sup>R</sup> mutants per  
 223  $10^7$  cells, for the strains FF18733 (wild type, wt) and AWP001 (*yno1* mutant) at  
 224 different time points: 0 minutes (control), 1 minute, and 180 minutes following  
 225 treatment with MB-leuco (200 µg/L). The number of Can<sup>R</sup> mutants per  $10^7$  cells did not  
 226 significantly increase in either strain (FF18733 or AWP001) after treatment with the  
 227 leuco form of AM. There was no statistical difference in the number of Can<sup>R</sup> mutants  
 228 between treated and untreated cells, suggesting that the leuco form of AM does not  
 229 exhibit mutagenic potential under the tested conditions.

230 <FIGURE 3>



231

232 Figure 3: Graphs representing the mutagenesis (Can<sup>R</sup>/10<sup>7</sup> cells) of strains FF18733 (wt)  
 233 and AWP001 (yno1). All strains that were subjected to MB-leuco treatments (200 µg/l)  
 234 at 1 minute and 180 minutes. These results represent the mean ± standard error of at



235 least three independent experiments. There was no statistical difference in relation to the  
236 untreated control ( $p < 0.05$ ) – non-parametric Mann-Whitney test.

237

### 238 **CHAPTER 3: *IN VIVO* ANALYSIS**

#### 239 **INTRODUCTION**

240 Ethical constraints on controlled human exposure to hazardous substances necessitate  
241 the use of animal models to study the comparative effects of these substances on  
242 humans (POCHMANN; AMORIM, 2003). The liver and kidneys are the primary  
243 organs involved in xenobiotic elimination. The liver, due to its metabolic role and  
244 connection with the gastrointestinal tract, is especially susceptible to drug-induced  
245 toxicity and oxidative stress, leading to cellular injuries such as hydropic degeneration,  
246 steatosis, hepatitis, necrosis, and apoptosis (JAKUBOWSKI; AMBROSE; PARR;  
247 LINCECUM *et al.*, 2005) and (ZIMMERMAN, 2000). The liver, one of the body's  
248 largest organs, weighs about 1.5 kg and is divided into functional units called hepatic  
249 lobules (VOLLMAR; MENGER, 2009). These lobules consist of hepatocyte cords,  
250 sinusoidal vessels, and the portal triad, which together facilitate blood filtration and bile  
251 secretion (WISSE, 1970).

252 The kidneys, crucial for homeostasis, also play a key role in eliminating toxic  
253 substances, excreting various metabolites, toxins, and byproducts through urine (HALL,  
254 2021). Each kidney, located in the retroperitoneal space, is composed of a dense  
255 connective tissue capsule, cortical and medullary zones, and nephrons, which are  
256 responsible for blood filtration and waste elimination (ROSS; PAWLINA; BARNASH,  
257 2016). The glomerular capillaries, made of fenestrated endothelial cells, and the  
258 glomerular basement membrane are essential for filtration, blocking large molecules  
259 and blood cells from entering the filtrate. The glomerular basement membrane is  
260 comprised of three distinct layers: lamina rara interna, lamina densa, and lamina rara  
261 externa, which together regulate filtration (OGOBUIRO; TUMA, 2020).. Mesangial  
262 cells provide structural support to the glomerulus and can contract under ischemic  
263 conditions. Given the continuous exposure of humans and animals to xenobiotics,  
264 evaluating liver and kidney function is crucial to understanding the toxicity levels  
265 induced by various substances (HALL, 2021).

266 **Analysis of Cell Death Markers and Toxicity in Human Cells:** In riverine  
267 communities lacking access to potable water, the SODIS method has proven effective.  
268 To enhance microorganism inactivation, including bacteria and viruses, the use of

269 methylene blue (MB) as a photosensitizer was investigated. MB absorbs visible light,  
270 generating singlet oxygen that inactivates microorganisms, creating a synergistic lethal  
271 effect when combined with traditional SODIS. Therefore, the MB/SODIS method  
272 appears promising as a disinfection process, especially in regions with limited exposure  
273 to temperature and solar radiation, offering a viable option for microbiological water  
274 decontamination in household settings (CARDOSO-RURR; DE PAIVA; PAULINO-  
275 LIMA; DE ALENCAR *et al.*, 2019). Given concerns about potential health risks of  
276 MB's leuco form, this study evaluated its possible side effects through cell viability  
277 assays and identification of molecules involved in cell death.

278 **Animals:** Male and female adult hairless mice (HRS / J - UFRJ) (n = 60) were obtained  
279 from the colony of the Laboratory of Experimental Pharmacology - LEFEX of the  
280 Pharmaceuticals Department of the Faculty of Pharmacy of the Federal University of  
281 Rio de Janeiro / Brazil. The animals were kept in polypropylene cages measuring: 41 x  
282 34 x 16 cm, with capacity for up to 15 mice, were covered with sawdust and kept at a  
283 temperature of 25 to 28°C, in a 12/12 hour photoperiod with artificial lighting. The  
284 animals received feed and the substance was added to the filtered water or well water  
285 and offered ad libitu for 13 weeks, until the time of sacrifice (HEJTMANCIK *et al.*,  
286 2002). They were placed in boxes according to the study design (Table 1), which was  
287 approved by the Evaluation Committee for the Use of Animals in Research at the  
288 Health Sciences Center of UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil, DAHEICB, protocol 65. The  
289 choice of hairless mice for this experiment was based on a previous study by our group  
290 and on that of other authors who showed great success in the use of these animals in  
291 models of induction of carcinogenesis, showing themselves perfectly adaptable to the  
292 study of toxicology (CARMO, 2007) and (HOSSY; DA COSTA LEITÃO; DOS  
293 SANTOS; MATSUDA *et al.*, 2017).

294 **Experimental design *in vivo*:** According to the study groups shown in Table 5, six  
295 groups, with 10 animals each (females and males), ingested the following water samples  
296 in test until sacrifice: Half of the mice were exposed to contaminated well water and the  
297 other half, filtered water. They were separated as G1 (well water treated with SODIS),  
298 G2 (well water treated with MB-SODIS (100ng/mL) and G3 (well water-MB  
299 (100ng/mL), non-irradiated). The same procedure was performed with groups G4, G5  
300 and G6 with filtered water. The animals were euthanized with CO<sub>2</sub> and had their organs  
301 (liver and kidney) removed for analysis. The fixation of the biological material was  
302 performed in a 4% paraformaldehyde solution, pH 7.4. The viscera were cryo-protected

303 in growing solutions of sucrose up to 30% for subsequent preparation of the blocks with  
 304 OCT Compound – TissueTek. Histological sections (10 µm) made in cryostat (Leica  
 305 CM1850 UV) and stained using the hematoxylin and eosin (HE) technique. They were  
 306 analyzed using an optical microscope (Zeiss Axioskop 2 Plus, Carl Zeiss) (HOSSY; DA  
 307 COSTA LEITAO; LUZ; DOS SANTOS *et al.*, 2013).

308 In the evaluation of the various histopathological alterations, the occurrence of the  
 309 following characteristics was considered: hydropic and fatty degeneration (steatosis),  
 310 necrosis, fibrosis, inflammatory infiltrate and vascular lesions.

311 <TABLE 5>

312 Table 5: Study design

	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>G4</b>	<b>G5</b>	<b>G6</b>
Characteristics of groups	Well water irradiated with sunlight ( <b>control</b> )	Well water + MB (100ng / ml) irradiated with sunlight	Well water + MB (100ng / ml) in the dark	Filtered water irradiated with sunlight ( <b>control</b> )	Filtered water + MB (100ng / ml) irradiated with sunlight	Filtered water + MB (100ng / ml) in the dark
Number of animals and sex	Mixed 10	Female 10	Female 10	Mixed 10	Male 10	Male 10

313

314 **Confocal Laser Scanning Microscopy: Analysis of Cellular Responses Using**  
 315 **Apoptosis, Autophagy, and Oxidative Stress Markers:** The study evaluated cell  
 316 death markers for apoptosis, autophagy, and oxidative stress by analyzing the  
 317 expression of caspase-3, beclin-1, and OKL-38 proteins, respectively, in the liver and  
 318 kidneys of hairless mice. Immunofluorescence was used to detect these markers. Skin  
 319 samples from hairless mice exposed to solar radiation and at a healing stage were used  
 320 as positive and negative controls. Histological sections were permeabilized using Triton  
 321 X-100 and blocked with 10% bovine serum albumin (BSA). The primary antibodies  
 322 used were anti-caspase 3 (FINETEST), anti-beclin 1 (FINETEST), and anti-OSGIN1  
 323 (FINETEST), applied overnight at 4°C. After washing, secondary antibodies conjugated  
 324 with Alexa 488 (Donkey anti-Rabbit), at dilution 1:300, 1:400 and 1:400 respectively  
 325 were applied for 2 hours. Following further washes, the sections were stained with  
 326 DAPI, at dilution 1:1000 and mounted for observation using confocal laser scanning

327 microscopy (LEICA TCS SPE). Fluorescence quantification was performed using the  
328 Leica Application Suite X (LAS X) software.

329 **Statistical Analysis Summary:** Statistical analyses were conducted using GraphPad  
330 Prism version 6.00 for Windows. Organ weight statistics were obtained using the "One-  
331 way ANOVA" method, with  $p$ -values  $< 0.05$  considered significant. Tukey's multiple  
332 comparisons test was used as a post-test. Fluorescence quantification for caspase-3,  
333 beclin-1, and OKL-38 was performed using the Leica Application Suite X (LAS X)  
334 software from Leica Microsystems. Results for apoptosis, autophagy, and oxidative  
335 stress were obtained in triplicates and expressed as mean  $\pm$  standard deviation.  
336 Differences between groups (well water and filtered water) with respect to SODIS,  
337 MB/SODIS, and MB/DARK were analyzed using One-way ANOVA followed by  
338 Tukey's multiple comparisons post-test. Differences within each group (G1...G6) were  
339 analyzed using the Student's  $t$ -test and the Mann-Whitney test, with a significance level  
340 set at  $p < 0.05$

341 **Controls Summary:** For molecular analyses associated with apoptosis, autophagy, and  
342 oxidative stress, positive controls for the expression of caspase-3, beclin-1, and OKL-  
343 38, respectively, were used for all studied groups. The positive control consisted of the  
344 skin from hairless mice that were exposed to solar radiation and in the scarring phase.  
345 Additionally, a negative control was conducted using the same type of skin.

346 **Histological Analysis of Liver and Kidney in Hairless Mice:** Images from transverse  
347 sections stained with HE were examined to assess liver and kidney morphology in  
348 hairless mice.

349 **Liver:** Normal patterns included good preservation, homogeneity, intact hepatic  
350 lobules, well-defined portal spaces, and intact hepatic veins with sinusoidal capillaries  
351 converging into the central vein. All animals displayed these normal features, with  
352 clearly visible hepatic lobules and veins, and hepatocytes forming appropriate cords.

353 **Kidney:** Normality was observed in the Malpighian corpuscles, intact proximal and  
354 distal renal tubules, and glomeruli composed of capillaries without histological  
355 alterations. The morphological aspect of the kidneys was consistent across groups, with  
356 well-preserved renal corpuscles and tubules in both cortex and medulla, and no cellular  
357 changes. No signs of hydropic or fatty degeneration, necrosis, fibrosis, inflammatory  
358 infiltration, or vascular injury were observed in the livers and kidneys, indicating that  
359 the xenobiotic MB and its metabolites did not induce significant morphological changes  
360 in the studied animals.

361 <TABLE 6> and <FIGURE 4>

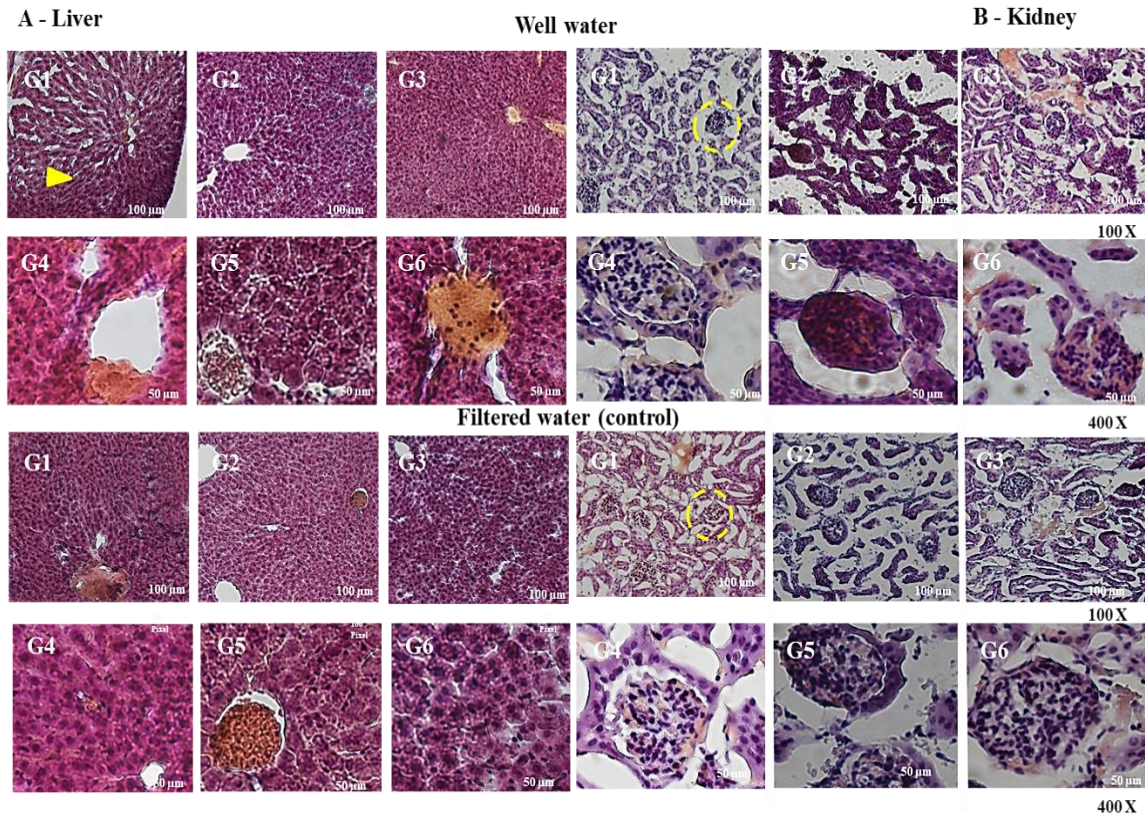
362 Table 6: Summary of Histological Evaluation of Liver and Kidney in Groups of Five  
 363 Hairless Mice Subjected to Treatments

364

Groups	Treatment	Hydropic Degeneration	Steatosis	Necrosis	Fibrosis	Inflammatory Infiltrate	Vascular Injury
<b>G1</b>	illuminated well water	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
<b>G2</b>	illuminated well water + MB	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
<b>G3</b>	dark well water + MB	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
<b>G4</b>	illuminated filtered water (control)	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
<b>G5</b>	filtered water + MB (control)	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
<b>G6</b>	dark well water + MB	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent

365

366



367

368 Figure 4: (Well water and filtered water) Histological sections of the liver (A) and  
 369 kidney (B) of groups of *hairless* mice after treatments: groups G1 and G4 - treatment  
 370 with SODIS; groups G2 and G5 - treatments with MB/SODIS at a concentration of  
 371 100ng/mL and groups G3 and G6 - treatments with MB at a concentration of 100ng/mL  
 372 stored in the dark. The PET bottles were irradiated under sunlight for 3 hours.  
 373 Magnifications of 100 x and 400 x showing (A): the hepatic parenchyma divided into  
 374 lobules by connective tissue septa (stroma), the centrilobular vein around which the  
 375 hepatocytes are arranged and, between these, sinusoidal capillaries and the portal space.  
 376 Hepatic parenchyma presenting a normal appearance in none of the treatments.  
 377 Hepatocytes arrows. (B) showing the renal cortex and medulla (Malpighian corpuscle  
 378 and renal tubules). Kidney showing normal histological appearance. Renal corpuscles  
 379 dashed lines; (HE).

380

381 **Analysis of immunofluorescence markers associated with apoptosis, autophagy,**  
 382 **and oxidative stress in the skin, liver, and kidney of hairless mice**

383 **Controls:** For molecular analyses related to apoptosis, autophagy, and oxidative stress,  
 384 positive controls for the expression of caspase-3, beclin-1, and OKL-38, respectively,  
 385 were utilized. The positive control was the skin of hairless mice subjected to solar

386 radiation and in the scarring phase. A negative control was also performed using the  
387 same skin samples. The graphics presents the mean values and standard deviations of  
388 the antibody staining intensity relative to the nuclear marker DAPI.

389 **Caspase-3:** The photomicrographs of the studied organs showed no significant  
390 expression of the caspase-3 marker in the test groups compared to the positive control,  
391 as shown in Figure 5 (liver (A) and kidney (B)). Positive caspase-3 staining was  
392 observed in the positive control and basal expression in the studied groups. No  
393 significant expression was detected, regardless of the presence of the MB in either its  
394 blue or leuco form, or the type of water used.

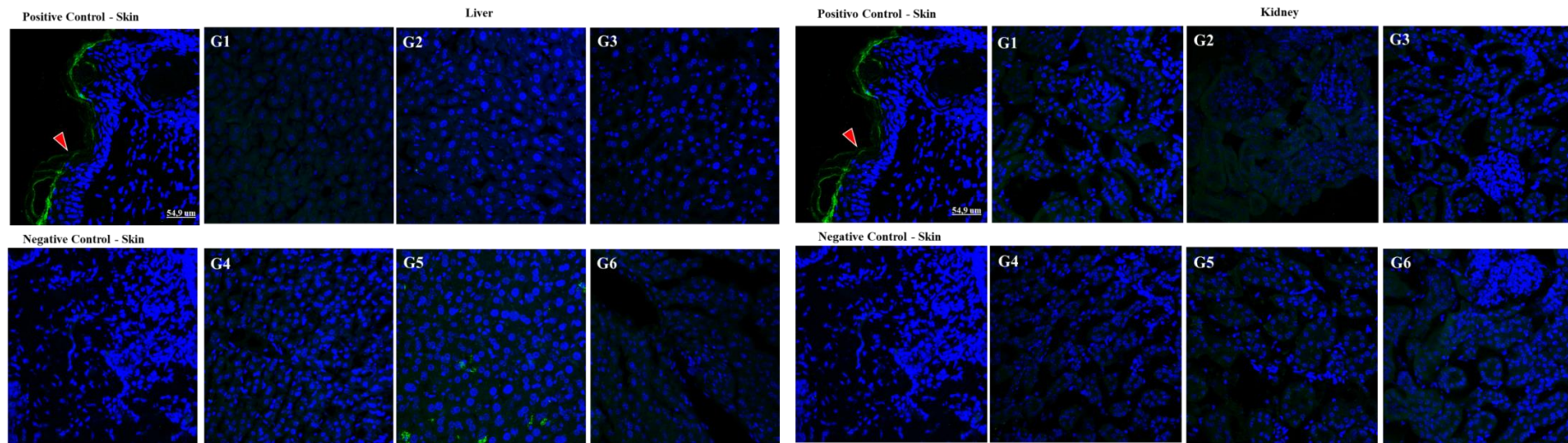
395 **Beclin-1:** Photomicrographs of the studied organs revealed weak expression of the  
396 beclin-1 marker in all test groups (G1, G2, G3, G4, G5, and G6), as shown in Figure 6  
397 (liver (A) and kidney (B)). The staining was not intense enough to be considered  
398 significant. The quantification results suggest no alterations due to the introduction of  
399 AM, in either its blue or leuco form, when compared to the staining observed in the  
400 group treated only with standard SODIS.

401 **OKL-38:** OKL-38 expression, indicative of oxidative stress, was assessed using the  
402 same immunofluorescence technique in the liver and kidney of the studied groups. The  
403 photomicrographs showed no expression of this marker in the hairless mouse groups  
404 when compared to the positive control of healing skin (Figures 7 (liver (A) and kidney  
405 (B))). The graphics showed that the introduction of MB, in either its blue or leuco form,  
406 did not alter the expression compared to the standard SODIS-treated group.

407 <FIGURE 5>

408 <FIGURE 6>

409 <FIGURE 7>

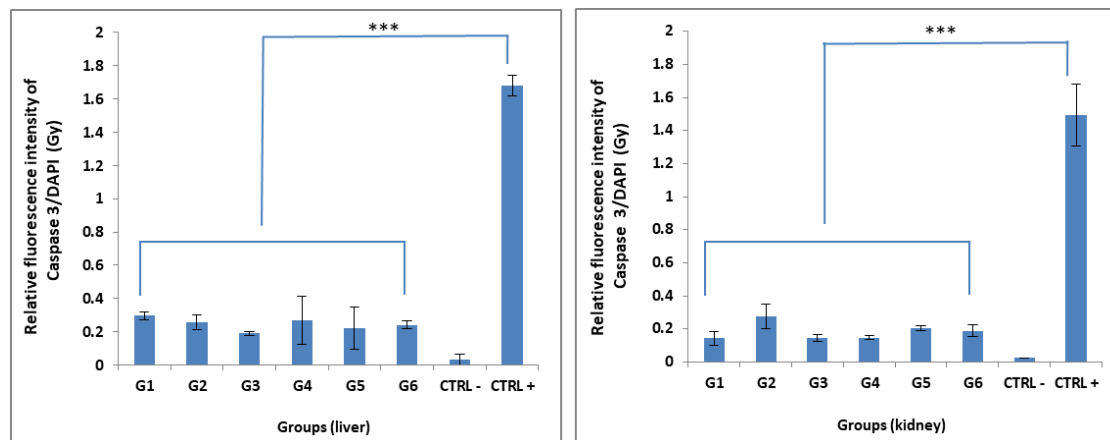


410

411

(A)

(B)

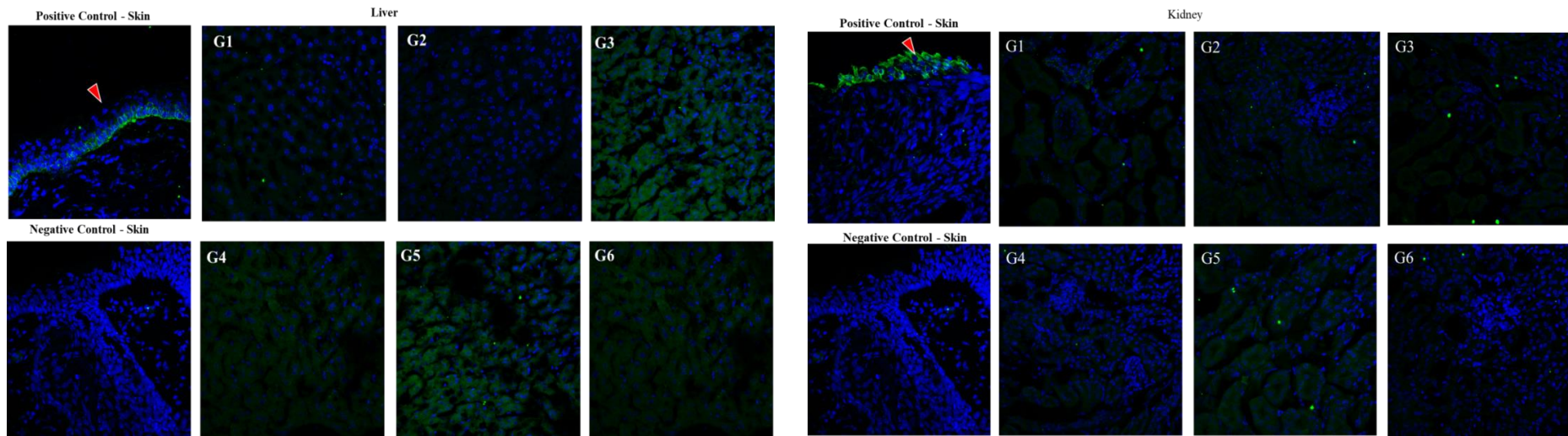


412

413

Figure 5: Confocal laser photomicrographs showing caspase-3 marker expression (red arrow) in liver and in kidney samples from different study groups, with a healing skin lesion as a positive control. The arrow points to the antigen staining profile. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Calibration bar - 54.9  $\mu$ m. Bar graphs showing the quantification of the relative intensity of anti-caspase-3 antibody staining by immunofluorescence in the liver (A) and kidney (B) of hairless mice groups. The values represent the ratio of marker fluorescence to DAPI staining. The results were obtained in triplicate and expressed as mean  $\pm$  standard deviation  $p < 0.05$ .



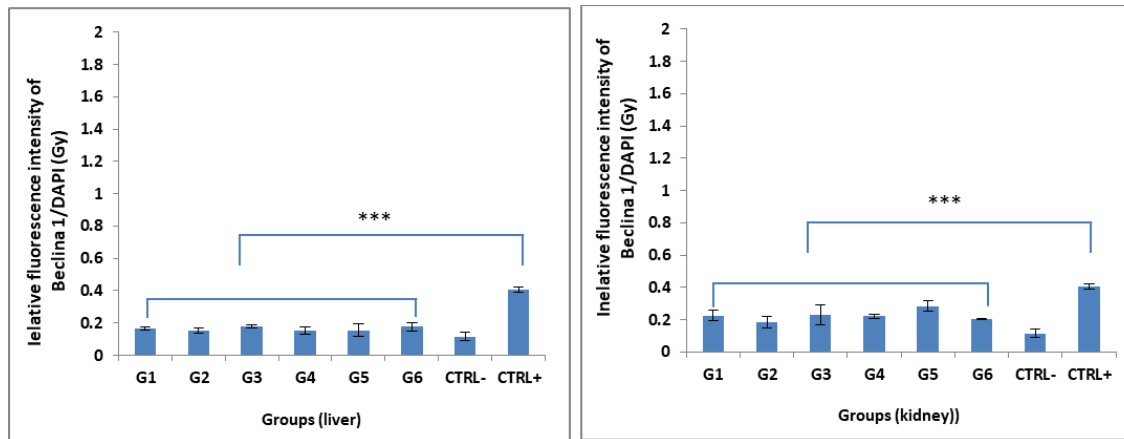


414

415

(A)

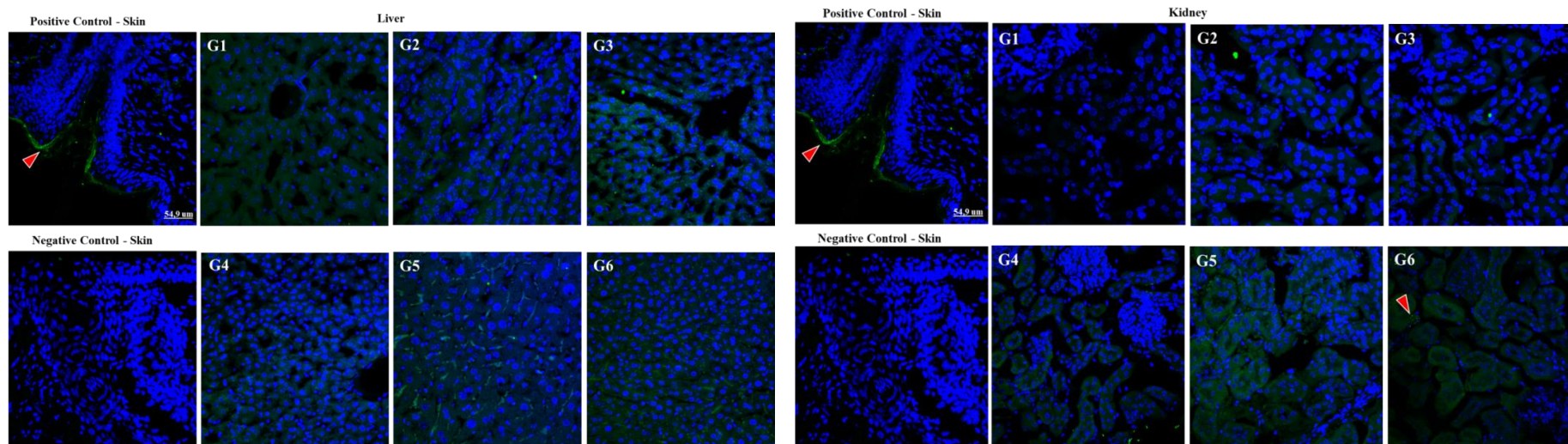
(B)



416

417

Figure 6: Confocal laser photomicrographs showing beclin-1 marker expression (red arrow) in liver and in kidney samples from different study groups, with a healing skin lesion as a positive control. The arrow points to the antigen staining profile. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Calibration bar - 54.9  $\mu\text{m}$ . Bar graphs showing the quantification of the relative intensity of anti-beclin-1 antibody staining by immunofluorescence in the liver (A) and kidney (B) of hairless mice groups. The values represent the ratio of marker fluorescence to DAPI staining. The results were obtained in triplicate and expressed as mean  $\pm$  standard deviation.  $p < 0.05$ .

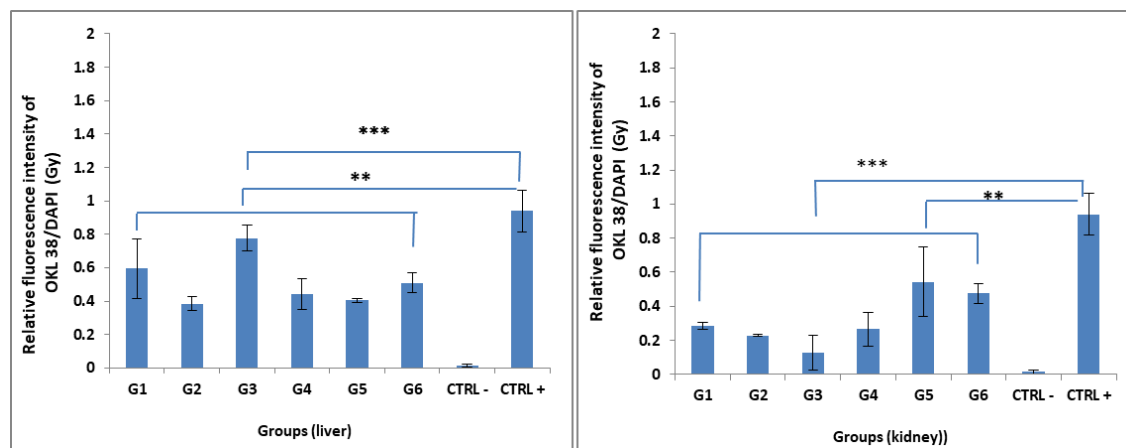


418

419

(A)

(B)



420

Figure 5: Confocal laser photomicrographs showing OKL-38 marker expression (red arrow) in liver and in kidney samples from different study groups, with a healing skin lesion as a positive control. The arrow points to the antigen staining profile. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Calibration bar - 54.9  $\mu$ m. Bar graphs showing the quantification of the relative intensity of OKL-38 antibody staining by immunofluorescence in the liver (A) and kidney (B) of hairless mice groups. The values represent the ratio of marker fluorescence to DAPI staining. The results were obtained in triplicate and expressed as mean  $\pm$  standard deviation.  $p < 0.05$ .

421 **DISCUSSION**

422 **Discussion *in silico*:** The MB molecule can transform into its reduced leuco form  
423 (colorless) through liver metabolism or sunlight irradiation in the red region of visible  
424 radiation (GAUDETTE; LODGE, 2005). Evaluating the safety of MB/SODIS for water  
425 decontamination required toxicological assays to determine safe ingestion levels. In  
426 *in silico* methods predict molecular properties and activities in xenobiotic toxicological  
427 processes (GAO; CHEN; CAI; XU, 2017), (WANG; YANG; WU; WANG *et al.*, 2018),  
428 (SAXENA; SHARMA; SIDDIQUI; KUMAR, 2019), (MIAO; XIA; CHEN; HUANG *et al.*,  
429 *et al.*, 2019), (SINGH; DIVAKARAN; KONDA; KRISTAM, 2020) and (DHAR;  
430 FALCONE; CHEN; HAMZEHLOO *et al.*, 2020) using computational tools.  
431 Specifically, *in silico* toxicology organizes, analyzes, models, simulates, visualizes, or  
432 predicts chemical toxicity (RAIES; BAJIC, 2016). This study focused on *in silico*  
433 analyses of acute toxicity and mutagenicity of the leuco form of MB. Acute toxicity was  
434 assessed by determining the LD50, showing both forms of MB (oxidized and reduced)  
435 as slightly toxic according to HODGE e STERNER (1949), indicating low acute  
436 toxicity. Interestingly, the oxidized form showed even lower toxicity. Mutagenicity was  
437 investigated using the Ames test on *S. typhimurium* strains TA98, TA100, and TA102,  
438 with and without metabolic activation. TA98 and TA100 strains detect mutagens  
439 inducing frame-shift mutations and base pair substitutions at G-C sites. The hisD3052  
440 mutation in TA98 results from a frame-shift due to a G-C base pair loss. Reversion can  
441 occur with polycyclic carcinogens or intercalating agents (MARON; AMES, 1983). The  
442 leuco form indicated mutagenic action in *S. typhimurium* mTA98 strain, though it is  
443 unclear if these were induced by the compound or are spontaneous (ISONO; YOURNO,  
444 1974) and (MARON; AMES, 1983). TA98 and TA100 strains complement each other  
445 in characterizing different mutation types and are used to assess the mutagenic potential  
446 of surface waters (OHE; WATANABE; WAKABAYASHI, 2004). TA102 detects  
447 mutations at A-T sites and is sensitive to oxidative damage or DNA cross-linking  
448 agents, owing to its intact DNA excision repair mechanism (MORTELMANS;  
449 ZEIGER, 2000). Positive results with TA102 suggest the compound may induce  
450 oxidative damage or act as a DNA cross-linking agent.

451 ***In silico* analysis conclusion:** A compound is considered positive in the Ames test if it  
452 results in a significant increase in revertant colony growth in at least one of the typically  
453 five tested strains, regardless of the presence or absence of the S9 mix. Conversely, a

454 compound is classified as negative if it does not cause a significant increase in revertant  
455 colony growth in any of the tested strains, both with and without the S9 mix.

456 This definition suggests that compounds initially classified as negative in the reference  
457 dataset for the Ames test may eventually reveal reverse mutations when tested in  
458 additional strains. Consequently, compounds classified as positive in the reference  
459 dataset for the Ames test are more precisely defined, as this classification remains  
460 unchanged with additional testing. In a genotoxic risk analysis, the use of different *in*  
461 *silico* models as complementary and/or independent methods can strengthen the  
462 evidence for the analyzed toxicological outcome. It is important to emphasize that  
463 critical evaluation post-analysis and even conducting additional experimental assays are  
464 necessary strategies when one or more results are discordant.

465 **Discussion *in vitro*:** The *in vitro* discussion of this study focused on evaluating the  
466 microbiological quality and toxicological safety of water treated using the MB/SODIS  
467 method, which combines solar disinfection (SODIS) with photocatalysis using MB. The  
468 use of groundwater as a source of water supply is common in urban areas, especially in  
469 regions with irregular access to public water networks. While these waters are  
470 traditionally considered to be of high quality, the study revealed that they often fail to  
471 meet the microbiological standards established by Brazilian legislation (BRAZIL, 2011)  
472 primarily due to the presence of pathogenic microorganisms. The metagenomic  
473 approach employed was crucial in identifying the taxonomic structure of the microbiota  
474 present in the water before and after MB/SODIS treatment. Pathogenic microorganisms  
475 were detected that are part of the human and animal intestinal microbiota, some of  
476 which are responsible for severe infections such as gastroenteritis, tuberculosis, and  
477 leprosy, as well as *Acinetobacter*, which is known for causing hospital-acquired  
478 infections. These results indicated that the well water analyzed was outside the  
479 potability standards defined by Brazilian legislation, which mandates the absence of  
480 these microorganisms (BRAZIL, 2011).

481 Following MB/SODIS treatment, a significant degradation of the microbiome was  
482 observed, confirmed by the sequencing of the hypervariable region of the 16S rRNA  
483 gene. The effectiveness of the treatment in eliminating microorganisms was further  
484 validated by DNA degradation, leading to the death of these organisms, consistent with  
485 findings from previous studies (CARDOSO-RURR; DE PAIVA; PAULINO-LIMA;

486 DE ALENCAR *et al.*, 2019). These findings reinforce the effectiveness of MB/SODIS  
487 as a safe and efficient method for microbiological water sterilization.

488 Moreover, concerns regarding the potential migration of plasticizers such as DEHA and  
489 DEHP from PET bottles into the water during the SODIS process were addressed. The  
490 concentrations of DEHA and DEHP detected were well below the limits established by  
491 the WHO, even after solar exposure, indicating minimal leaching of these compounds  
492 (JAGANATHAN, SENTHILNATHAN & PHILIP, LIGY, 2009) and (WHO, 2011).  
493 These results are particularly relevant as they confirm that the use of PET bottles in the  
494 SODIS process does not pose a significant chemical contamination risk.

495 Regarding mutagenicity, the study employed the Ames Test, widely recognized as the  
496 gold standard for *in vitro* mutagenicity assessment due to its sensitivity and cost-  
497 effectiveness (ISO, 2012) and (OECD, 2020). The results indicated that the SODIS,  
498 MB/SODIS, MB/DARK, and MB/DARK/HEAT treatments, at concentrations of 200  
499  $\mu\text{g/L}$  of MB, did not induce mutagenic activity in *S. typhimurium* strains (TA 98, TA  
500 100, and TA 102), regardless of the presence of metabolic activation. The number of  
501 spontaneous His<sup>+</sup> revertant colonies was statistically consistent, with no significant  
502 increase compared to negative controls, while only the positive control exhibited  
503 toxicity, reducing bacterial survival to less than 70% (GATEHOUSE; HAWORTH;  
504 CEBULA; GOCKE *et al.*, 1994).

505 In addition to the prokaryotic tests, the yeast *S. cerevisiae* was used as a model to  
506 evaluate cytotoxicity and mutagenicity in a eukaryotic system. Yeast is a robust  
507 biological model, particularly in genetic toxicology, due to the similarity between its  
508 DNA repair genes and those of higher eukaryotes (EKI, 2018) and (GIRARD;  
509 BOITEUX, 1997). In the experiment, treatment with 200  $\mu\text{g/l}$  of the leuco form of MB  
510 was not cytotoxic to yeast after 180 minutes of incubation, and no statistical difference  
511 was observed in the number of Can<sup>R</sup>/10<sup>7</sup> mutant cells between treated and untreated  
512 (control) strains, suggesting that the MB/leuco treatment is safe.

513 ***In vitro* analysis conclusion:** Based on the *in vitro* results, it can be inferred that daily  
514 consumption of 2 liters of water treated with MB/SODIS is safe, as no risk of  
515 cytotoxicity or mutagenicity was observed in both prokaryotic and eukaryotic systems.  
516 The effectiveness of the MB/SODIS method in microbiological water sterilization and  
517 the safety of using PET bottles were confirmed, making this method a viable and safe

518 solution for water disinfection in regions with limited access to treated potable water  
519 sources.

520 **Discussion *in vivo*:** The results suggest that the use of MB as a photosensitizer in  
521 combination with the SODIS treatment significantly reduced the time required for solar  
522 disinfection. Photocatalysis enhances the efficiency of bacterial and viral  
523 decontamination in water, even under adverse temperature and solar radiation  
524 conditions throughout different seasons. This is crucial for populations lacking access to  
525 potable water (CARDOSO-RURR; DE PAIVA; PAULINO-LIMA; DE ALENCAR *et al.*, 2019). MB is well absorbed, reduced, and 75% excreted in urine as the leuco form.  
527 It is considered safe at therapeutic doses up to 2 mg/kg, but higher doses can cause  
528 toxicity (GINIMUGE; JYOTHI, 2010). In this study, the amount used was 1500 times  
529 lower than the minimum dose known to cause adverse effects, assuming the  
530 consumption of 2 liters of MB-treated water per day. No data on the toxicity of MB in  
531 its leuco form, derived from a photochemical rather than metabolic process, were found  
532 in the literature. Histological results showed no signs of toxicity or significant  
533 degeneration in any group, including the one ingesting the leuco form of MB. This  
534 confirms that the MB/SODIS protocol remains within a safe margin for human use. As  
535 the liver and kidneys are the primary organs involved in the metabolism and excretion  
536 of ingested substances, we conducted analyses to evaluate potential hepatic or renal  
537 toxicities. The liver, being the main organ for drug metabolism and detoxification, is  
538 critical in preclinical studies to avoid hepatotoxicity, which can prevent the adoption of  
539 new therapies. The kidneys, responsible for excreting metabolic waste and  
540 osmoregulation, are structurally complex and crucial for maintaining the body's  
541 homeostasis (FOLGUEIRA; BRENTANI, 2004) and (MIDDENDORF; WILLIAMS,  
542 2000). Histopathological analyses of the studied groups showed no morphological  
543 alterations, indicating normal tissue structure. This supports the hypothesis that MB in  
544 its leuco form is non-toxic, confirmed by routine hematoxylin-eosin staining (HE).

545 Additionally, immunofluorescence was used to investigate the expression of caspase-3,  
546 beclin-1, and OKL-38 in the liver and kidneys of hairless mice. Programmed cell death  
547 mechanisms involved in xenobiotic toxicity are crucial for maintaining tissue  
548 homeostasis, and any imbalance may contribute to toxicological mechanisms  
549 (FEDERICO; CARDAIOLI; DA POZZO; FORMICHI *et al.*, 2012) and (CHEN;  
550 KANG; FU, 2018). The animal model used, with a mutation in the HR gene, allows for

551 easy manipulation of the skin, application of topical agents, and UV exposure, making it  
552 ideal for toxicological studies (ANDREOLLO; SANTOS; ARAÚJO; LOPES, 2012).  
553 Previous studies by our group and others have shown the effectiveness of these models  
554 in carcinogenesis studies (NONCHEV; BRANCAZ; FOLCO; ROMERO *et al.*, 2006),  
555 (BENAVIDES; OBERYSZYN; VANBUSKIRK; REEVE *et al.*, 2009) and (HOSSY;  
556 DA COSTA LEITAO; LUZ; DOS SANTOS *et al.*, 2013). Water was administered ad  
557 libitum according to the protocol established by HEJTMANCIK; RYAN; TOFT;  
558 PERSING *et al.* (2002), which evaluated the toxicity of MB in rats and mice over 13  
559 weeks. Considering the lifespan of mice and humans, this corresponds to approximately  
560 5.4 human years (QUINN, 2005). The main concern was whether the reduced  
561 metabolite might produce toxicity, given the lack of relevant data on the leuco form.  
562 However, results showed no difference between the groups using MB in its blue or  
563 leuco forms. Therefore, these results confirm the known safety of the blue form  
564 (KHAN; SAEED; ZEKKER; ZHANG *et al.*, 2022). MB has potential as an anti-  
565 apoptotic agent due to its ability to inhibit effector caspases, interrupting the apoptosis  
566 process. In this study, immunofluorescence results for caspase-3, a marker of apoptosis,  
567 indicated only basal expression in the tested hairless mouse groups compared to the  
568 positive control. Beclin-1, a key regulator of autophagy, is involved in the degradation  
569 of damaged macromolecules and organelles. The weak expression of beclin-1 observed  
570 in this study likely indicates physiological autophagy for organelle renewal rather than  
571 autophagic cell death induced by MB/SODIS treatment (NOGUCHI; HONDA;  
572 SAITOH; MATSUMURA *et al.*, 2019). Finally, the expression of OKL-38, a protein  
573 involved in the oxidative stress response, was analyzed. Normally expressed at low  
574 levels, OKL-38 is upregulated by DNA damage and associated with mitochondrial  
575 apoptosis via p53 activation (YAO; LI; VENTERS; ZHENG *et al.*, 2008), (HU; YAO;  
576 GAN; TOKARSKI *et al.*, 2012) and (LIU; LI; CHEN; CHAN *et al.*, 2014). However,  
577 no significant expression of OKL-38 was observed in the liver and kidneys of the  
578 treated hairless mice, indicating that MB/SODIS treatment did not induce oxidative  
579 stress in these organs. In summary, the study demonstrates the safety of the MB/SODIS  
580 protocol, with no observed toxic effects in the tested animal model, supporting its  
581 potential for safe human use.

582 ***In vivo* analysis conclusion:** The experimental model results indicated that ingestion of  
583 the leuco form of MB did not cause histopathological alterations in the liver and

584 kidneys of hairless mice, as observed through HE staining. No signs of cellular  
585 infiltration, vacuolization, necrosis, or other indicators of toxicity related to the leuco  
586 form of MB were detected. Furthermore, laser confocal microscopy analyses revealed  
587 no evidence of cell death by apoptosis, autophagy, or oxidative stress in the evaluated  
588 organs, as demonstrated by the absence of caspase-3, beclin-1, and OKL-38 protein  
589 expression. Fluorescence values for the studied proteins were within expected limits,  
590 indicating no excessive activity of programmed cell death through apoptosis,  
591 autophagy, or oxidative stress.

592 **General Conclusions:** The integration of *in silico* and *in vitro* approaches to estimate  
593 the toxicological properties of compounds, such as xenobiotics, proves to be valuable  
594 and can effectively mimic *in vivo* behavior. Combining multiple approaches enhances  
595 the accuracy of these predictions compared to results obtained from a single study  
596 model. In this context, through a series of *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* assays, we  
597 found that the leuco form of MB was neither cytotoxic, genotoxic, nor mutagenic in  
598 prokaryotic and eukaryotic organisms, even in the presence of metabolic activation.  
599 This study represents a significant step in validating alternative water treatment  
600 technologies, contributing to the achievement of the United Nations' Sustainable  
601 Development Goals, particularly in the areas of clean water and sanitation.

602

## 603 **ACKNOWLEDGMENTS**

604 The authors acknowledge the financial support provided by the following Brazilian  
605 funding agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
606 (CNPq), Instituto de Pesquisa Translacional em Saúde e Ambiente na Região  
607 Amazônica (INPeTAM), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
608 Superior (CAPES), and Fundação Carlos Chagas Filho de Apoio a Ciência do Estado do  
609 Rio de Janeiro (FAPERJ).

610

## 611 **REFERENCES**

612 AMES, B. N.; DURSTON, W. E.; YAMASAKI, E.; LEE, F. D. Carcinogens are  
613 mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria  
614 for detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 70, n. 8, p. 2281-  
615 2285, 1973.

616 AMES, B. N.; MCCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and  
617 mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutat.**  
618 **Res.;**(Netherlands), 31, 1975.



- 619 ANDREOLLO, N. A.; SANTOS, E. F. d.; ARAÚJO, M. R.; LOPES, L. R. Rat's age  
620 versus human's age: what is the relationship? **ABCD. Arquivos Brasileiros de**  
621 **Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, 25, p. 49-51, 2012.
- 622 ASIIMWE, J.; QUILTY, B.; MUYANJA, C.; MCGUIGAN, K. Field comparison of  
623 solar water disinfection (SODIS) efficacy between glass and polyethylene terephthalate  
624 (PET) plastic bottles under sub-Saharan weather conditions. **Journal of Water and**  
625 **Health**, 11, n. 4, p. 729-737, 2013.
- 626 BAIRD, C. **Química ambiental**. Reverté, 2018. 8429194258.
- 627 BARR, M. M. Super models. **Physiological genomics**, 13, n. 1, p. 15-24, 2003.
- 628 BENAVIDES, F.; OBERYSZYN, T. M.; VANBUSKIRK, A. M.; REEVE, V. E. *et al.*  
629 The hairless mouse in skin research. **Journal of dermatological science**, 53, n. 1, p. 10-  
630 18, 2009.
- 631 BERNARDET, J.-F.; BOWMAN, J. P. The genus flavobacterium. **The prokaryotes**, 7,  
632 p. 481-531, 2006.
- 633 BITEW, B. D.; GETE, Y. K.; BIKS, G. A.; ADAFRIE, T. T. The effect of SODIS  
634 water treatment intervention at the household level in reducing diarrheal incidence  
635 among children under 5 years of age: a cluster randomized controlled trial in Dabat  
636 district, northwest Ethiopia. **Trials**, 19, p. 1-15, 2018.
- 637 BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe  
638 sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo  
639 humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do**  
640 **Brasil**, p. 39-46, 2011.
- 641 CARDOSO-RURR, J. S.; DE PAIVA, J. P.; PAULINO-LIMA, I. G.; DE ALENCAR,  
642 T. A. *et al.* Microbiological decontamination of water: improving the solar disinfection  
643 technique (SODIS) with the use of nontoxic vital dye methylene blue. **Photochemistry**  
644 **and Photobiology**, 95, n. 2, p. 618-626, 2019.
- 645 CARMO, E. D. d. Avaliação da ação sistêmica de extrato liofilizado de *Pfaffia*  
646 *glomerata* na carcinogênese quimicamente induzida pelo DMBA em pele de  
647 camundongos Hairless. 2007.
- 648 CASLAKE, L. F.; CONNOLLY, D. J.; MENON, V.; DUNCANSON, C. M. *et al.*  
649 Disinfection of contaminated water by using solar irradiation. **Applied and**  
650 **environmental microbiology**, 70, n. 2, p. 1145-1151, 2004.
- 651 CHEN, Q.; KANG, J.; FU, C. The independence of and associations among apoptosis,  
652 autophagy, and necrosis. **Signal transduction and targeted therapy**, 3, n. 1, p. 18,  
653 2018.
- 654 CONROY, R. M.; MEEGAN, M.; JOYCE, T.; MCGUIGAN, K. *et al.* Solar  
655 disinfection of drinking water protects against cholera in children under 6 years of age.  
656 **Archives of disease in childhood**, 85, n. 4, p. 293-295, 2001.
- 657 DA SILVA, A. C.; PAIVA, J. P.; DINIZ, R. R.; DOS ANJOS, V. M. *et al.*  
658 Photoprotection assessment of olive (*Olea europaea* L.) leaves extract standardized to

- 659 oleuropein: In vitro and in silico approach for improved sunscreens. **Journal of**  
660 **Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 193, p. 162-171, 2019.
- 661 DHAR, R.; FALCONE, G. J.; CHEN, Y.; HAMZEHLOO, A. *et al.* Deep learning for  
662 automated measurement of hemorrhage and perihematomal edema in supratentorial  
663 intracerebral hemorrhage. **Stroke**, 51, n. 2, p. 648-651, 2020.
- 664 DINIZ, R. R.; DOMINGOS, T. F.; PINTO, G. R.; CABRAL, L. M. *et al.* Use of in  
665 silico and in vitro methods as a potential new approach methodologies (NAMs) for  
666 (photo) mutagenicity and phototoxicity risk assessment of agrochemicals. **Science of**  
667 **The Total Environment**, 904, p. 167320, 2023.
- 668 DINIZ, R. R.; PAIVA, J. P.; AQUINO, R. M.; GONÇALVES, T. C. *et al.*  
669 *Saccharomyces cerevisiae* strains as bioindicators for titanium dioxide sunscreen  
670 photoprotective and photomutagenic assessment. **Journal of Photochemistry and**  
671 **Photobiology B: Biology**, 198, p. 111584, 2019.
- 672 DZIERZBICKI, P.; KOPROWSKI, P.; FIKUS, M. U.; MALC, E. *et al.* Repair of  
673 oxidative damage in mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of  
674 the MSH1-dependent pathway. **DNA repair**, 3, n. 4, p. 403-411, 2004.
- 675 ECONOMIC, U. N. D. o.; SOCIAL AFFAIRS, P. D. World Population Prospects 2022:  
676 Summary of Results. 2022, UN DESA/POP/2022/TR/NO. 3. 2022.
- 677 EKI, T. Yeast-based genotoxicity tests for assessing DNA alterations and DNA stress  
678 responses: a 40-year overview. **Applied microbiology and biotechnology**, 102, n. 6, p.  
679 2493-2507, 2018.
- 680  
681 FEDERICO, A.; CARDAIOLI, E.; DA POZZO, P.; FORMICHI, P. *et al.* Mitochondria,  
682 oxidative stress and neurodegeneration. **Journal of the neurological sciences**, 322, n.  
683 1-2, p. 254-262, 2012.
- 684 FISHER, M. B.; KEENAN, C. R.; NELSON, K. L.; VOELKER, B. M. Speeding up  
685 solar disinfection (SODIS): effects of hydrogen peroxide, temperature, pH, and copper  
686 plus ascorbate on the photoinactivation of *E. coli*. **Journal of Water and Health**, 6, n.  
687 1, p. 35-51, 2008.
- 688 FOLGUEIRA, M. A. A. K.; BRENTANI, M. M. Câncer de mama. **Oncologia**  
689 **Molecular**, 2004.
- 690 FREITAS, M. B. d.; BRILHANTE, O. M.; ALMEIDA, L. M. d. Importância da análise  
691 de água para a saúde pública em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro: enfoque para  
692 coliformes fecais, nitrato e alumínio. **Cadernos de Saúde Pública**, 17, p. 651-660,  
693 2001.
- 694 GAO, Z.; CHEN, Y.; CAI, X.; XU, R. Predict drug permeability to blood–brain-barrier  
695 from clinical phenotypes: drug side effects and drug indications. **Bioinformatics**, 33, n.  
696 6, p. 901-908, 2017.
- 697 GATEHOUSE, D.; HAWORTH, S.; CEBULA, T.; GOCKE, E. *et al.*  
698 Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. **Mutation**

- 699 **Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, 312, n. 3, p. 217-233,  
700 1994.
- 701 GAUDETTE, N. F.; LODGE, J. W. Determination of methylene blue and  
702 leucomethylene blue in male and female Fischer 344 rat urine and B6C3F1 mouse  
703 urine. **Journal of analytical toxicology**, 29, n. 1, p. 28-33, 2005.
- 704 GERISCHER, U. Acinetobacter molecular biology. **Int Microbiol**, 11, p. 147-150,  
705 2008.
- 706 GINIMUGE, P. R.; JYOTHI, S. Methylene blue: revisited. **Journal of Anaesthesiology  
707 Clinical Pharmacology**, 26, n. 4, p. 517-520, 2010.
- 708 GIRARD, P.; BOITEUX, S. Repair of oxidized DNA bases in the yeast *Saccharomyces*  
709 *cerevisiae*. **Biochimie**, 79, n. 9-10, p. 559-566, 1997.
- 710 GOFFEAU, A.; BARRELL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W. *et al.* Life with 6000  
711 genes. **Science**, 274, n. 5287, p. 546-567, 1996.
- 712 GUYTON, A. C.; HALL, J. E.; MORENO, M. J. **Tratado de fisiología médica.**  
713 Interamericana México, 1971.
- 714 HALL, J. E. **Guyton & Hall. Tratado de fisiología médica.** Elsevier Health Sciences,  
715 2021. 8413820731.
- 716 HEJTMANCIK, M.; RYAN, M.; TOFT, J.; PERSING, R. *et al.* Hematological effects  
717 in F344 rats and B6C3F1 mice during the 13-week gavage toxicity study of methylene  
718 blue trihydrate. **Toxicological Sciences**, 65, n. 1, p. 126-134, 2002.
- 719 HODGE, H. C.; STERNER, J. H. Tabulation of toxicity classes. **American Industrial  
720 Hygiene Association Quarterly**, 10, n. 4, p. 93-96, 1949.
- 721 HOSSY, B. H.; DA COSTA LEITÃO, A. A.; DOS SANTOS, E. P.; MATSUDA, M. *et al.*  
722 Phototoxic assessment of a sunscreen formulation and its excipients: An in vivo and  
723 in vitro study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 173, p. 545-  
724 550, 2017.
- 725 HOSSY, B. H.; DA COSTA LEITAO, A. A.; LUZ, F. B.; DOS SANTOS, E. P. *et al.*  
726 Effects of a sunscreen formulation on albino hairless mice: a morphological approach.  
727 **Archives of dermatological research**, 305, p. 535-544, 2013.
- 728 HU, J.; YAO, H.; GAN, F.; TOKARSKI, A. *et al.* Interaction of OKL38 and p53 in  
729 regulating mitochondrial structure and function. 2012.
- 730 ISO. ISO 11350: 2012. Water Quality—Determination of the Genotoxicity of Water  
731 and Waste Water—Salmonella/Microsome Fluctuation Test (Ames Fluctuation Test). :  
732 ISO Geneva, Switzerland 2012.
- 733 ISONO, K.; YOURNO, J. Chemical carcinogens as frameshift mutagens: Salmonella  
734 DNA sequence sensitive to mutagenesis by polycyclic carcinogens. **Proceedings of the  
735 National Academy of Sciences**, 71, n. 5, p. 1612-1617, 1974.

- 736 JAKUBOWSKI, A.; AMBROSE, C.; PARR, M.; LINCECUM, J. M. *et al.* TWEAK  
737 induces liver progenitor cell proliferation. **The Journal of clinical investigation**, 115,  
738 n. 9, p. 2330-2340, 2005.
- 739 KHAN, I.; SAEED, K.; ZEKKER, I.; ZHANG, B. *et al.* Review on methylene blue: Its  
740 properties, uses, toxicity and photodegradation. **Water**, 14, n. 2, p. 242, 2022.
- 741 KONCAGÜL, E.; TRAN, M.; CONNOR, R. Relatório mundial das Nações Unidas  
742 sobre desenvolvimento dos recursos hídricos 2020: água e mudança climática, fatos e  
743 dados. 2020.
- 744 LAURENT, J. M.; YOUNG, J. H.; KACHROO, A. H.; MARCOTTE, E. M. Efforts to  
745 make and apply humanized yeast. **Briefings in functional genomics**, 15, n. 2, p. 155-  
746 163, 2016.
- 747 LIU, M.; LI, Y.; CHEN, L.; CHAN, T. H. M. *et al.* Allele-specific imbalance of  
748 oxidative stress-induced growth inhibitor 1 associates with progression of hepatocellular  
749 carcinoma. **Gastroenterology**, 146, n. 4, p. 1084-1096. e1085, 2014.
- 750 LONNEN, J.; KILVINGTON, S.; KEHOE, S.; AL-TOUATI, F. *et al.* Solar and  
751 photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in drinking  
752 water. **Water research**, 39, n. 5, p. 877-883, 2005.
- 753 MADRONICH, S.; MCKENZIE, R. L.; BJÖRN, L. O.; CALDWELL, M. M. Changes  
754 in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. **Journal of**  
755 **Photochemistry and Photobiology B: Biology**, 46, n. 1-3, p. 5-19, 1998.
- 756 MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test.  
757 **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, 113, n. 3-4,  
758 p. 173-215, 1983.
- 759 MCGUIGAN, K. G.; CONROY, R. M.; MOSLER, H.-J.; DU PREEZ, M. *et al.* Solar  
760 water disinfection (SODIS): a review from bench-top to roof-top. **Journal of**  
761 **hazardous materials**, 235, p. 29-46, 2012.
- 762 MEDLICOTT, K.; WESTER, A.; GORDON, B.; MONTGOMERY, M. *et al.* Technical  
763 brief on water, sanitation, hygiene and wastewater management to prevent infections  
764 and reduce the spread of antimicrobial resistance. **WHO/FAO/OIE Recommendations**  
765 **Report**, 2020.
- 766 MEIERHOFER, R.; LANDOLT, G. Factors supporting the sustained use of solar water  
767 disinfection—Experiences from a global promotion and dissemination programme.  
768 **Desalination**, 248, n. 1-3, p. 144-151, 2009.
- 769 MEIERHOFER, R.; WEGELIN, M. Desinfecção solar da água: guia de aplicações do  
770 SODIS. **Dübendorf: EAWAG, SANDEC**, 2002.
- 771 METCALF, J. S.; CODD, G. A. Cyanotoxins. *In: Ecology of cyanobacteria II: their*  
772 **diversity in space and time**: Springer, 2012. p. 651-675.
- 773 MIAO, R.; XIA, L.-Y.; CHEN, H.-H.; HUANG, H.-H. *et al.* Improved classification of  
774 blood-brain-barrier drugs using deep learning. **Scientific reports**, 9, n. 1, p. 8802, 2019.

- 775 MIDDENDORF, P. J.; WILLIAMS, P. L. Nephrotoxicity: Toxic responses of the  
776 kidney. **Principles of toxicology: environmental and industrial applications**, p. 129-  
777 143, 2000.
- 778 MILLER, J. H. Experiments in molecular genetics. (No Title), 1972.
- 779 MORAA, A. K. **Investigation of mutagenicity of solar disinfected (SODIS) water**  
780 **stored in plastic bottles**. 2015. -, University of Nairobi.
- 781 MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity  
782 assay. **Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis**,  
783 455, n. 1-2, p. 29-60, 2000.
- 784 MYATT, G. J.; AHLBERG, E.; AKAHORI, Y.; ALLEN, D. *et al.* In silico toxicology  
785 protocols. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 96, p. 1-17, 2018.
- 786 NELSON, K. L.; BOEHM, A. B.; DAVIES-COLLEY, R. J.; DODD, M. C. *et al.*  
787 Sunlight-mediated inactivation of health-relevant microorganisms in water: a review of  
788 mechanisms and modeling approaches. **Environmental Science: Processes &**  
789 **Impacts**, 20, n. 8, p. 1089-1122, 2018.
- 790 NO, O. T. 471: Bacterial reverse mutation test. **OECD guidelines for the testing of**  
791 **chemicals, section, 4**, p. 1-11, 1997.
- 792 NOGUCHI, S.; HONDA, S.; SAITOH, T.; MATSUMURA, H. *et al.* Beclin 1 regulates  
793 recycling endosome and is required for skin development in mice. **Communications**  
794 **biology**, 2, n. 1, p. 37, 2019.
- 795 NONCHEV, S.; BRANCAZ, M.-V.; FOLCO, E.; ROMERO, Y. *et al.* Le gène hairless  
796 de la souris: Fonctions à la racine du poil et au coeur d'une subtile pléiotropie. **M/S:**  
797 **médecine sciences**, 22, n. 5, p. 525-530, 2006.
- 798 OECD. **Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test**. 2020.
- 799 OGOBUIRO, I.; TUMA, F. Physiology, Renal. 2020. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538339/>. Accessed August, 29, 2020.
- 801 OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a  
802 review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, 567, n. 2-3, p. 109-149,  
803 2004.
- 804 ORGANIZATION, W. H. Progress on sanitation and drinking water–2015 update and  
805 MDG assessment. 2015.
- 806 ORGANIZATION, W. H. **Inheriting a sustainable world? Atlas on children's health**  
807 **and the environment**. World Health Organization, 2017. 924151177X.
- 808 ORGANIZATION, W. H. **The state of food security and nutrition in the world**  
809 **2019: safeguarding against economic slowdowns and downturns**. Food &  
810 Agriculture Org., 2019a. 9251315701.
- 811 ORGANIZATION, W. H. **Water, sanitation, hygiene and health: a primer for**  
812 **health professionals**. World Health Organization. 2019b.

- 813 PAIVA, J. P.; DINIZ, R. R.; LEITAO, A. C.; CABRAL, L. M. *et al.* Insights and  
814 controversies on sunscreen safety. **Critical Reviews in Toxicology**, 50, n. 8, p. 707-  
815 723, 2020.
- 816 PAIVA, J. P.; SANTOS, B. A.; KIBWILA, D. M.; GONÇALVES, T. C. *et al.* Titanium  
817 dioxide–montmorillonite nanocomposite as photoprotective agent against ultraviolet B  
818 radiation-induced mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: A potential candidate for  
819 safer sunscreens. **Journal of pharmaceutical sciences**, 103, n. 8, p. 2539-2545, 2014.
- 820 PINTO, A. V.; DEODATO, E. L.; CARDOSO, J. S.; OLIVEIRA, E. F. *et al.* Enzymatic  
821 recognition of DNA damage induced by UVB-photosensitized titanium dioxide and  
822 biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for oxidatively DNA  
823 damage generation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms  
824 of Mutagenesis**, 688, n. 1-2, p. 3-11, 2010.
- 825 POCHMANN, M.; AMORIM, R. Atlas da exclusão social no Brasil. *In: Atlas da  
826 exclusão social no Brasil*, 2003. p. 221-221.
- 827 QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years?  
828 **Nutrition**, 21, n. 6, p. 775, 2005.
- 829 RAIES, A. B.; BAJIC, V. B. In silico toxicology: computational methods for the  
830 prediction of chemical toxicity. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational  
831 Molecular Science**, 6, n. 2, p. 147-172, 2016.
- 832 RIJAL, G.; FUJIOKA, R. Synergistic effect of solar radiation and solar heating to  
833 disinfect drinking water sources. **Water Science and Technology**, 43, n. 12, p. 155-  
834 162, 2001.
- 835 RINNERTHALER, M.; BÜTTNER, S.; LAUN, P.; HEEREN, G. *et al.* Yno1p/Aim14p,  
836 a NADPH-oxidase ortholog, controls extramitochondrial reactive oxygen species  
837 generation, apoptosis, and actin cable formation in yeast. **Proceedings of the National  
838 Academy of Sciences**, 109, n. 22, p. 8658-8663, 2012.
- 839 RIZZATTI, G.; LOPETUSO, L.; GIBIINO, G.; BINDA, C. *et al.* Proteobacteria: a  
840 common factor in human diseases. **BioMed research international**, 2017, 2017.
- 841 ROSS, M. H.; PAWLINA, W.; BARNASH, T. A. **Atlas de histologia descritiva**.  
842 Artmed Editora, 2016. 8536327499.
- 843 SANDEC, E. Solar water disinfection: a guide for the application of sodis. *In:*  
844 **SANDEC Report No 06/02**: EAWAG SANDEC Duebendorf, Switzerland, 2002.
- 845 SAÚDE, B. M. d. Portaria N. 2.914, de 12 de Dezembro de 2011. Dispõe sobre os  
846 procedimentos de controle e vigilância da água para consumo e seu padrão de  
847 potabilidade. **Diário Oficial [da] União**, 2011.
- 848 SAXENA, D.; SHARMA, A.; SIDDIQUI, M. H.; KUMAR, R. Blood brain barrier  
849 permeability prediction using machine learning techniques: an update. **Current  
850 Pharmaceutical Biotechnology**, 20, n. 14, p. 1163-1171, 2019.
- 851 SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Metagenomics for studying unculturable  
852 microorganisms: cutting the Gordian knot. **Genome biology**, 6, p. 1-4, 2005.

- 853 SINGH, M.; DIVAKARAN, R.; KONDA, L. S. K.; KRISTAM, R. A classification  
854 model for blood brain barrier penetration. **Journal of Molecular Graphics and**  
855 **Modelling**, 96, p. 107516, 2020.
- 856 SOBOKSA, N. E.; GARI, S. R.; HAILU, A. B.; DONACHO, D. O. *et al.* Effectiveness  
857 of solar disinfection water treatment method for reducing childhood diarrhoea: a  
858 systematic review and meta-analysis. **BMJ open**, 10, n. 12, p. e038255, 2020.
- 859 TARRASS, F.; BENJELLOUN, M. The effects of water shortages on health and human  
860 development. **Perspectives in public health**, 132, n. 5, p. 240-244, 2012.
- 861 TEIXEIRA, J. C.; GUILHERMINO, R. L. Análise da associação entre saneamento e  
862 saúde nos estados brasileiros, empregando dados secundários do banco de dados  
863 indicadores e dados básicos para a saúde 2003-IDB 2003. **Engenharia Sanitária e**  
864 **Ambiental**, 11, p. 277-282, 2006.
- 865 VILLAR, P. C. As águas subterrâneas e o direito à água em um contexto de crise.  
866 **Ambiente & Sociedade**, 19, p. 85-102, 2016.
- 867 VOLLMAR, B.; MENGER, M. D. The hepatic microcirculation: mechanistic  
868 contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. **Physiological reviews**,  
869 89, n. 4, p. 1269-1339, 2009.
- 870 WANG, Z.; YANG, H.; WU, Z.; WANG, T. *et al.* In silico prediction of blood-brain  
871 barrier permeability of compounds by machine learning and resampling methods.  
872 **ChemMedChem**, 13, n. 20, p. 2189-2201, 2018.
- 873 WHO, G. Guidelines for drinking-water quality. **World health organization**, 216, p.  
874 303-304, 2011.
- 875 WISSE, E. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat  
876 liver sinusoids. **Journal of ultrastructure research**, 31, n. 1-2, p. 125-150, 1970.
- 877 WOOLEY, J. C.; GODZIK, A.; FRIEDBERG, I. A primer on metagenomics. **PLoS**  
878 **computational biology**, 6, n. 2, p. e1000667, 2010.
- 879 YAO, H.; LI, P.; VENTERS, B. J.; ZHENG, S. *et al.* Histone Arg modifications and  
880 p53 regulate the expression of OKL38, a mediator of apoptosis. **Journal of Biological**  
881 **Chemistry**, 283, n. 29, p. 20060-20068, 2008.
- 882 ZHANG, H.; SEKIGUCHI, Y.; HANADA, S.; HUGENHOLTZ, P. *et al.*  
883 *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-  
884 accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial  
885 phylum Gemmatimonadetes phyl. nov. **International journal of systematic and**  
886 **evolutionary microbiology**, 53, n. 4, p. 1155-1163, 2003.
- 887 ZIMMERMAN, H. J. Drug-induced liver disease. **Clinics in liver disease**, 4, n. 1, p. 73-96,  
888 2000.