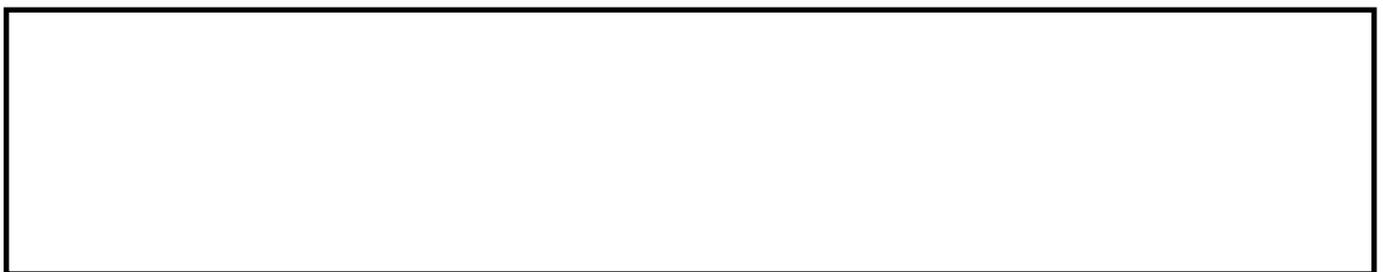


Análise de dados categóricos de integridade celular de cianobactérias.

CLEMENTE, A., OLIVEIRA, S., MENEZES, I., CARLOTO, I. and CAPELO NETO, J.

2021



Análise de dados categóricos de integridade celular de cianobactérias

Categorical data analysis of cell integrity of cyanobacteria

• **Data de entrada:**
23/01/2019

• **Data de aprovação:**
12/12/2019

Allan Clemente^{1*} | Samylla Oliveira¹ | Indira Menezes¹ | Ismael Carloto¹ | José Capelo Neto¹

DOI: <https://doi.org/10.36659/dae.2021.015>

ORCID ID

Clemente A  <https://orcid.org/0000-0003-4364-5362>

Oliveira S  <https://orcid.org/0000-0002-6665-8257>

Menezes I  <https://orcid.org/0000-0002-8997-1625>

Carloto I  <https://orcid.org/0000-0003-2548-5043>

Capelo Neto J  <https://orcid.org/0000-0002-7669-7153>

Resumo

As técnicas utilizadas em estudos de integridade/viabilidade celular de cianobactérias fornecem duas respostas: células intactas ou não. Esses valores categóricos e dicotômicos dificultam muitas vezes a análise estatística dos resultados. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho é apresentar duas metodologias para análise desses dados, mostrando uma sequência detalhada de procedimentos que permitam avaliar, com o rigor estatístico necessário, dados categorizados de integridade celular. Para tal, foram utilizados 3600 registros de integridade celular de *Dc* e *Rr*. Na abordagem tradicional identificou-se associação entre causa (perda de integridade celular) e efeito (condições de mistura) somente para *Dc*. Todavia, para quantificar essas associações, fez-se necessário o cálculo da razão de chances (*OR*), o que tornou o processo mais laborioso. Já na abordagem alternativa (regressão logística), as *OR* foram estimadas por meio da comparação das chances de dois cenários, tornando o processo mais rápido. No entanto, devido ao sinergismo entre as variáveis do modelo, deve-se ter cautela com as interpretações dos resultados. Portanto, a combinação dessas abordagens, seguindo os procedimentos propostos, permite uma interpretação mais assertiva de fenômenos com respostas dicotômicas, tais como integridade/viabilidade de cianobactérias.

Palavras-chave: Teste exato de Fisher. Odds ratio. Regressão binomial logística. Cianobactérias filamentosas. *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Dolichospermum circinale*. Análise multivariada.

Abstract

The techniques used in cyanobacterial cell integrity/viability studies provide two outcomes: intact cells or not. These categorical and dichotomous values often make statistical analysis of the results difficult. In this context, the aim of this paper is to present two methodologies for the analysis of these data, showing a detailed sequence of procedures that allow analyzing, with the necessary statistical accuracy, categorized cell integrity data. For this, 3600-records database was used with the results of cellular integrity of Dc and Rr. Among the results, the traditional approach proved appropriate to identify the association between causes and effect respecting the specific characteristics of each species and the odds ratio (OR) calculation allowed to measure the associations. In this multivariate approach, the estimated OR requires a differentiated interpretation in relation to the traditional approach since the estimates are adjusted for the effect of all other variables of the model.

Keywords: Fisher exact test. Odds ratio. Logistic binomial regression. Filamentous cyanobacteria. *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Dolichospermum circinale*. Multivariate approach.

¹ Universidade Federal do Ceará - Fortaleza - Ceará - Brasil.

* **Autor correspondente:** allan.clemente@alu.ufc.br.

1 INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços tecnológicos no tratamento de água, as cianobactérias continuam sendo um dos principais problemas enfrentados pelas empresas de saneamento no mundo (JIN et al., 2019; LI, D.; LIU, 2019). Além disso, a presença desses organismos nos corpos hídricos pode comprometer a qualidade do tratamento de água pela liberação de metabólitos tóxicos ou que conferem sabor e odor à água tratada (CAPELLI et al., 2017; CHERNOVA et al., 2017; DÍEZ-QUIJADA et al., 2019; DREHER et al., 2018; LIU et al., 2017). Estudos revelam uma disparidade no comportamento de diferentes cianobactérias frente aos estresses causados nas etapas do tratamento de água, tais como a pré-oxidação (JIAN et al., 2019; LI, H. et al., 2018; LIN et al., 2018; XIE et al., 2016), a coagulação (LI, H. et al., 2018; LIN et al., 2016; ZAMYADI et al., 2015), a filtração (PESTANA et al., 2018) e até nos estoques de lodo (PESTANA et al., 2016; ZAMYADI et al., 2015). Em parte, essas constatações foram possíveis graças a estudos que avaliaram a integridade ou a viabilidade celular.

No que se refere à técnica de estudo de integridade, o SYTOX green é um corante verde que pode permear células de cianobactérias e identificar as células que perderam a integridade da parede celular (DUGAN; SMITH; SANAN, 2018; FAN et al., 2018; LÜRLING et al., 2017). Esse produto é capaz de corar o ácido nucleico de células comprometidas, fazendo com que células com maior fluorescência verde sejam identificadas como não íntegras. Já Zamyadi et al. (2012a) avaliaram a viabilidade celular de *Microcystis aeruginosa*, *Raphidiopsis raciborskii* (na época *Cylindrospermopsis raciborskii*), *Dolichospermum circinale*, *Aphanizomenon issatschenkoi* após cloração usando diacetato de fluoresceína (FDA) - coloração por iodeto de propídio (IP). O IP apenas infiltra a membrana das células danificadas, liga-se aos ácidos nucleicos, e causa um aumento da fluorescência vermelha ao microscópio.

Markelova; Vladimirova; Kuptsova (2000) constataram em ensaios de integridade que células coradas com eritrosina B eram facilmente discernidas de células não coradas. A eritrosina B ($C_{20}H_{14}Na_2O_5$) é um corante biológico que pode ser usado para distinguir células íntegras das não íntegras. Esse corante não adentra células íntegras, que mantêm sua aparência natural mesmo em sua presença. Já em células com a integridade comprometida, a eritrosina B penetra e se acumula no citoplasma, produzindo uma cor rosa passível de ser observada por microscopia óptica (KOHLEHARDT-FLOEHR et al., 2010; ZHENG et al., 2019). Esse fenômeno também ocorre em células de cianobactérias, tais como *Microcystis aeruginosa* (CALOMENI; JR, 2015; TSAI, 2015).

Além do uso de eritrosina B, Calomeni; Jr (2015) avaliaram em *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii* e *Pseudokirchneriella subcapitata* outras 5 técnicas de medidas de integridade/viabilidade (densidade celular, coloração vital (vermelho neutro), concentração de clorofila-a, concentração de feofitina-a e respiração por produção de 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolium formazan [INT formazan]). Segundo os autores, se um determinado estímulo interrompe a integridade da membrana celular de um organismo, a eritrosina B pode ser útil na coloração das células afetadas por esse estímulo e ainda fornece maior precisão na determinação viabilidade.

A maioria das técnicas mencionadas anteriormente para o estudo de integridade celular fornece valores categóricos e dicotômicos (e.g. células íntegras ou não íntegras) como resultados. Nesses casos, tabelas de contingência 2×2 são comumente usadas para a realização do teste qui-quadrado de Pearson. Nesse teste, a hipótese nula (H_0 : não existe associação entre o fator experimentado e o desfecho observado) é confrontada com a alternativa (H_A : existe associação entre o fator experimentado e o desfecho observado) com intuito de verificar se a proporção (ou

probabilidade) de organismo íntegros na amostra controle é a mesma do teste, por exemplo. Sendo assim, a um dado nível de significância α (geralmente 10%, 5% ou 1%), por meio do teste qui-quadrado é possível afirmar se as diferenças entre os valores das proporções no controle e na amostra teste (valores obtidos nas variáveis resposta) foram ocasionadas devidos aos fatores experimentais ensaiados (covariáveis) ou foram causados pela aleatoriedade do sistema (AGRESTI, 2012; GIOLO, 2017; OLEA-POPELKA; ROSEN, 2019; PAGANO; GAUVREAU, 2010).

Desde seu surgimento em 1900, o teste qui-quadrado desenvolvido por Karl Pearson foi aprimorado. Apesar disso, nos casos em que as observações são dependentes ou pareadas (e.g. estudos em que os mesmos indivíduos são observados em momentos distintos) e que o valor em cada célula da tabela de contingência 2 x 2 não é pelo menos 5, o teste qui-quadrado não é recomendável. Nessas situações, as opções mais acertadas seriam o teste de McNemar, para

dados dependentes (ou pareados), e o de teste exato Fisher, caso as células da tabela de contingência apresentem valores menores ou iguais a 5 (AGRESTI, 2012; OLEA-POPELKA; ROSEN, 2019; PAGANO; GAUVREAU, 2010).

Nos casos em que o investigador está interessado em avaliar o impacto de vários fatores no resultado (por exemplo, espécie de cianobactéria, presença e concentração de oxidantes na solução, gradiente de velocidade e tempo de mistura) uma abordagem alternativa usando regressão logística pode ser mais apropriada (AGRESTI, 2012; GIOLO, 2017; OLEA-POPELKA; ROSEN, 2019). Usando essa abordagem, pode-se prever resultados (NDONG et al., 2014; SHENG et al., 2012) e ainda mensurar o nível de associação entre os fatores (covariáveis) e o desfecho (variável resposta) por meio das chances estimadas (CRIDER et al., 2018; JAJA-CHIMEDZA et al., 2015). Em termos de análise da integridade celular, de acordo com Giolo (2017), pode-se definir chances como sendo:

$$\text{chance} = \frac{\text{probabilidade do evento ocorrer}}{\text{probabilidade do evento não ocorrer}} = \frac{\text{probabilidade de células íntegras}}{\text{probabilidade de células não íntegras}}$$

A abordagem tradicional (teste qui-quadrado, teste exato de Fisher ou teste de McNemar) não quantifica a intensidade da associação, apenas a identifica. Nesse caso, se o pesquisador necessitar quantificar o nível de associação utilizando tal abordagem, faz-se necessário o uso de medidas de associação, tais como: risco relativo, coeficiente de correlação de Pearson, coeficiente de correlação de Spearman e, principalmente, a razão de chances calculada (OR). Diante desse fato, fornecer por intermédio da chance uma medida de associação entre as covariáveis e a variável resposta pode representar uma vantagem para a abordagem da regressão logística. A partir dessa

medida, comparando-se dois momentos, pode-se facilmente estimar as OR ajustadas (\widehat{OR}) ao contexto geral do modelo. Portanto, essa necessidade de uma etapa a mais na análise dos dados geralmente torna a abordagem tradicional mais laboriosa do que a regressão logística.

Ressalta-se que a OR na abordagem tradicional é função apenas dos dados da tabela de contingência 2 x 2 usada no seu cálculo. Essa difere da OR, que é ajustada ao efeito de todas as variáveis de um modelo logístico da abordagem alternativa. Com isso, essa OR ajustada, representada por \widehat{OR} , pode revelar o efeito do sinergismo entre os

fenômenos estudados, o que requer uma atenção especial para sua interpretação (AGRESTI, 2012; GIOLO, 2017; OLEA-POPELKA; ROSEN, 2019).

Um modelo de regressão logística binomial foi utilizada por Sheng et al. (2012) no Lago Dianchi, China, para identificar a relação de resposta entre as florações de cianobactérias e os fatores ambientais influenciadores (tais como qualidade de água e condições climáticas). Osborne; Shaw; Webb (2007) realizaram um estudo nas proximidades de Bribie Island, Austrália, objetivando investigar a frequência e a gravidade das lesões associadas à exposição à cianobactéria *Lyngbya majuscula*. Por intermédio da \widehat{OR} os autores conseguiram evidenciar que o aumento de problemas cutâneos e oculares estavam associados com um aumento do nível de exposição à água e que a probabilidade de mulheres relatarem problemas de pele foi 50% maior do que a dos homens. Jaja-Chimedza et al. (2015) utilizou o teste exato de Fisher e regressão logística para determinar a relação entre a presença de polimetoxi-1-alcenos (PMA), um metabólito tóxico encontrado em *Raphidiopsis raciborskii* (na época *Cylindrospermopsis raciborskii*), e teratogenicidade em embriões de peixe-zebra (*Danio rerio*), utilizado como modelo de desenvolvimento de vertebrados. Dentre os resultados observados, o teste Exato de Fisher comprovou a associação entre os fatores estudados e a \widehat{OR} mensurou essa associação. A versatilidade da regressão logística também foi comentada por Stommel; Field; Caller (2013) nos seus trabalhos de investigação dos aerossóis de cianobactérias como fator de risco para esclerose lateral amiotrófica. Os resultados dos autores apontam que esse risco poderia ser estudado por análise de regressão logística, OR e seus respectivos intervalos de confiança de 95%, pois tal abordagem forneceria uma melhor compreensão de como os seres humanos podem ser ameaçados pelas cianotoxinas.

Além dos exemplos anteriores, outros trabalhos utilizaram a abordagem alternativa da regressão

logística e \widehat{OR} em outros temas como: qualidade da água, saneamento básico e risco de eutrofização (BAKER; SHOWERS, 2019; HARRISON et al., 2012); presença de compostos, organismos ou resíduos potencialmente prejudiciais à saúde presentes na água e não retirados pelas estações de tratamento (AUNG et al., 2019; EGOROV et al., 2018; GARCÍA-PÉREZ et al., 2016; TORNEVI et al., 2016) e desenvolvimento de modelos de previsão da probabilidade de cenários (O'DWYER et al., 2018). No entanto, até a presente data não foram encontrados trabalhos que avaliem os dados categóricos e dicotômicos de integridade celular de cianobactérias com as abordagens estatísticas apresentadas aqui.

Portanto, o objetivo principal deste trabalho é apresentar duas metodologias estatísticas para a análise de dados categóricos, evidenciando suas vantagens e desvantagens. Para tal foram utilizadas duas abordagens: (1) abordagem tradicional, utilizando teste exato de Fisher junto com a OR calculada a partir de tabelas de contingência 2 x 2 (com intervalo de confiança de 95%) como medida de associação; e (2) abordagem alternativa da regressão logística, consistindo na estimativa da \widehat{OR} (com intervalo de confiança de 95%), incluindo metodologias de avaliação da qualidade dos modelos propostos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Origem dos dados

No presente estudo foram utilizados dados provenientes dos experimentos realizados por Clemente (2019). Nesse conjunto de dados encontram-se os resultados dos testes de integridade celular (utilizando eritrosina B) das cianobactérias *Raphidiopsis raciborskii* (Rr) e *Dolichospermum circinale* (Dc) submetidas a experimentos de pré-oxidação e agitação rápida e lenta (Fig. 1).

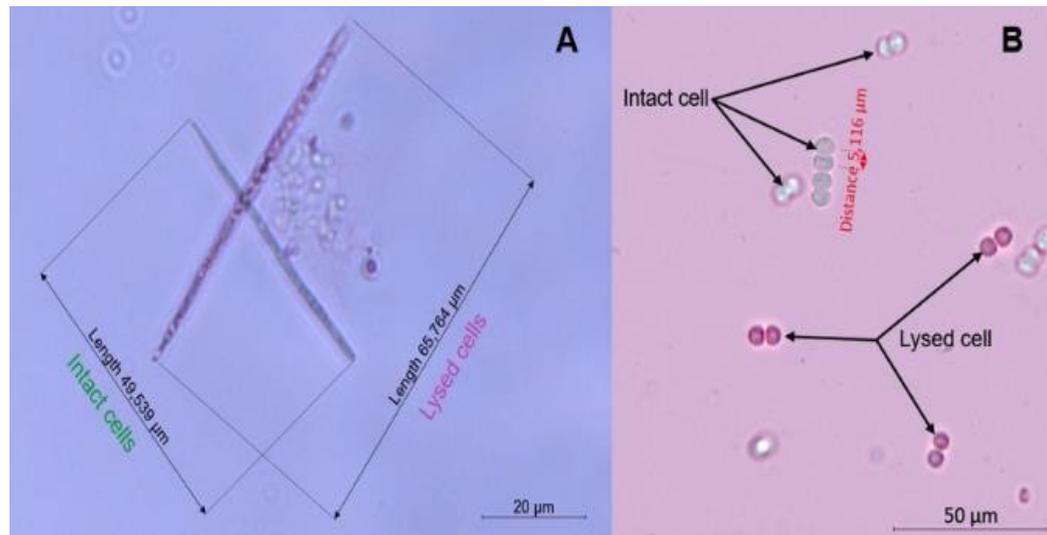


Figura 1 - Tricoma de *Raphidiopsis raciborskii* (Rr) (A) e as células dos tricomas de *Dolichospermum circinale* (Dc) (B) intactos e com a integridade comprometida (coloração rosa) na presença da eritrosina B

Os experimentos simularam em escala de bancada as condições de agitação (gradiente de velocidade) e tempo de mistura normalmente aplicadas em ETAs em larga escala. O objetivo principal foi observar os efeitos dos estresses das condições operacionais sobre a integridade de *Rr* e *Dc*, na presença ou não de pré-oxidação utilizando Cl_2 ou KMnO_4 , etapa que visa melhorar a coagulação. De acordo com Clemente (2019), foram definidos quatro parâmetros (covariáveis) para avaliar a integridade celular; são eles: (1) a concentração de oxidante (C_{ox}) utilizada na pré-oxidação (0, 1, 2, 4 mg L^{-1}); (2) a espécie de cianobactéria (*Rr* e *Dc*); (3) o tipo de oxidante utilizado (Cl_2 e KMnO_4) e (4) as condições experimentais (ECi), que foram subdivididos em 3 níveis:

- EC_0 : Fase inicial do experimento ($t = 0$ s) em que as células não foram expostas a nenhum estresse, ou seja, sem agitação e sem presença de químicos;
- EC_1 : Fase que simula a etapa de coagulação ou mistura rápida, na qual as cepas foram submetidas a um intenso gradiente de velocidade (por volta de 750 s^{-1}) durante um curto intervalo de tempo ($t = 60$ s), tanto na ausência como na presença de oxidantes;

- EC_2 : Fase que simula a etapa de floculação ou mistura lenta. Nessa fase as cepas foram submetidas a um baixo gradiente de velocidade (aproximadamente 70 s^{-1}) em um elevado tempo de mistura ($t = 15$ min), na presença ou não de oxidantes.

Em cada experimento foram avaliados 100 organismos de cada espécie após cada condição experimental (EC_0 , EC_1 e EC_2) em triplicata (900 observações por espécie). Cada espécie foi submetida a diferentes concentrações (0, 1, 2 ou 4 mg L^{-1}) de dois oxidantes (Cl_2 ou KMnO_4). Assim, foram obtidos 14.400 resultados de integridade celular [$3(EC_i) \times 300$ (Triplicata) $\times 2$ (Espécies) $\times 4$ (contrações) $\times 2$ (oxidantes)] em 12 experimentos. Os resultados de integridade celular obtidos em cada experimento foram representados pela média da triplicata na Tabela 1. Mais detalhes do experimento podem ser vistos em Clemente (2019).

Para que fosse realizada e discutida a importância da análise prévia da estrutura inicial da base de dados e a relevância da seleção inicial das possíveis variáveis integrantes do modelo, neste trabalho foram considerados os dados de integridade celular apenas para concentrações

de 0 mg L⁻¹ (Tabela 1). Dessa forma, os efeitos da pré-oxidação não foram avaliados, sendo apenas investigada a ação exclusiva dos estresses hi-

dráulicos do gradiente de velocidade e do tempo de mistura sobre a integridade celular de Rr e Dc nas duas abordagens apresentadas.

Tabela 1 - Dados de integridade celular de Rr e Dc provenientes da base de dados de CLEMENTE (2019). Cox representa a concentração de oxidante e (ECi) representa as condições experimentais avaliadas.

C _{ox} [mg L ⁻¹]	Espécie	Oxidante	EC (Tempo)	Média de células	
				Íntegras	Não íntegras
0	Rr	Cl ₂	EC ₀ (0 s)	100	0
			EC ₁ (60 s)	99	1
			EC ₂ (15 min)	98	2
		KMnO ₄	EC ₀ (0 s)	100	0
			EC ₁ (60 s)	100	0
			EC ₂ (15 min)	100	0
	Dc	Cl ₂	EC ₀ (0 s)	71	29
			EC ₁ (60 s)	54	46
			EC ₂ (15 min)	53	47
		KMnO ₄	EC ₀ (0 s)	85	15
			EC ₁ (60 s)	55	45
			EC ₂ (15 min)	62	38

2.2 Abordagem tradicional

Os valores de integridade celular foram considerados variáveis categóricas dicotômicas (organismos íntegros ou não). De posse da média das triplicatas dos resultados de integridade celular da Tabela 1, foram elaboradas tabelas 2 x 2, denominadas tabelas de contingências. Nessas tabelas foram dispostos os valores de integridade nas duas colunas (organismos íntegros na coluna “Sim” e os organismos com estrutura comprometidas na coluna “Não”) e nas duas linhas, duas condições experimentais de um dado cenário de comparação. Foram considerados três cenários de comparação:

1. EC₁ x EC₀: verificação dos efeitos da mistura rápida na integridade celular em relação às condições iniciais;
2. EC₂ x EC₀: verificação dos efeitos combinados das misturas rápida e lenta na integridade celular em relação às condições iniciais;
3. EC₂ x EC₁: verificação dos efeitos da mistura lenta em relação à mistura rápida.

Por meio das tabelas de contingência, as hipóteses de associação entre integridade celular (efeito) e as condições experimentais EC₁ e EC₂ foram testadas nesses três cenários. Foi utilizado o teste exato de Fisher para a comprovação da hipótese de associação (dependência) ou não (independência) entre as causas e o efeito, visto que algumas células das tabelas de contingência obtidas apresentaram valores inferiores a 5 (inviabilizando o teste Qui-quadrado de Pearson) e os eventos independentes, impossibilitando o teste McNemar (AGRESTI, 2012).

Utilizando um nível de significância de 5%, associações significativas foram evidenciadas quando o teste exato de Fisher apresentou p < 0,05. Em seguida, calculou-se o nível de associação entre causa e efeito por meio da razão de chances (OR) definida de acordo com a Eq. 1:

$$OR_{CE_i} = \frac{P(EC_i)}{1 - P(EC_i)} \quad (1)$$

Em que $P(EC_i)$ e $1 - P(EC_i)$ na Eq. 1 representam, respectivamente, a probabilidade de células íntegras e não íntegras observadas numa dada condição experimental i ($i = 0, 1$ ou 2). Os valores de OR e seus intervalos de confiança $IC(OR)$ foram calculados usando o software RStudio. Nos casos com células da tabela de contingência iguais a zero, para eliminar indeterminações, somou-se um termo de correção ϵ a cada elemento da tabela 2×2 (PAGANO; GAUVREAU, 2010). Optou-se por três valores de ϵ : 0; 0,5 e 1. Assim, foi possível afirmar com 95% de confiança que as chances de células íntegras aumentaram ou reduziram nas condições experimentais EC_1 e EC_2 em relação às condições iniciais EC_0 , por meio

dos valores de OR e seus respectivos intervalos de confiança (IC). Foi considerado que:

- $OR > 1$ e $1 \notin IC(OR)$: aumento da chance de células íntegras de um cenário em relação a outro;
- $OR < 1$ e $1 \notin IC(OR)$: redução de chances de células íntegras de um cenário em relação a outro, e;
- $OR = 1$ ou $1 \in IC(OR)$: indicam que as chances são iguais entre os cenários comparados.

2.3 Abordagem alternativa: regressão logística

De acordo com Giolo (2017), o modelo logístico pode ser definido como:

$$\ln \left[\frac{\hat{P}(X_i)}{1 - \hat{P}(X_i)} \right] = \ln[Chance] = \text{logito}[\hat{P}(X_i)] = \beta_0 + \sum_{k=1}^p \beta_k \cdot X_k \quad (2)$$

Em que $\hat{P}(X_i)$ e $1 - \hat{P}(X_i)$ representam, respectivamente, a probabilidade de células íntegras e não íntegras estimada pelo modelo; $\text{logito}[\hat{P}(X_i)]$ representa a função de ligação equivalente ao $\ln[Chance]$ e β_0 e β_k são o intercepto (termo independente) e os coeficientes das p covariáveis X_k do modelo, respectivamente. A Eq. 2 usada na abordagem alternativa também foi avaliada com as funções de ligação *Probit*, *Clog-log* e *Cauchy*, com a finalidade de se encontrar o melhor ajuste.

Para o ajuste dos modelos logísticos, foram consideradas covariáveis categóricas a espécie de cianobactéria (X_{Spec}) e as condições experimentais (X_{ExCdi}). Sendo X_{ExCdi} politômicas com três níveis (EC_0 , EC_1 e EC_2), foram atribuídas as variáveis fictícias $X_{ExCd_{EC1}}$ e $X_{ExCd_{EC2}}$ para sua representação. Dessa forma, as variáveis foram definidas:

$$X_{Spec} = \begin{cases} 0 \Rightarrow Dc(\text{referência}) \\ 1 \Rightarrow Rr \end{cases}$$

$$X_{ExCd}(X_{ExCd_{EC1}}, X_{ExCd_{EC2}}) = \begin{cases} (0,0) \Rightarrow EC_0(\text{Referência}) \\ (1,0) \Rightarrow EC_1 \\ (0,1) \Rightarrow EC_2 \end{cases}$$

O melhor modelo foi obtido por meio da verificação da tabela contendo a análise de Deviance (ANODEV), em que os efeitos da inclusão de cada covariável (X_{Spec} e X_{ExCdi} a partir do modelo nulo (aquele sem nenhuma das covariáveis) são avaliados em termos dos valores da *Deviance*, da *Deviance* residual e do critério de informação de Akaike (AIC), utilizando o método *Stepwise*. Dessa forma, foi possível atestar a significância da inclusão de uma determinada variável ao modelo definitivo, utilizando os valores da diferença da *Deviance* antes e após a inclusão de tal variável

(Deviance residual). Foi considerado o melhor modelo aquele que apresentou os menores valores de Deviance residual e AIC.

Além da Deviance, da Deviance residual e do AIC, foram obtidos os p-valores de cada covariável por meio da estatística qui-quadrado com o número de graus de liberdade igual ao número de coeficientes associados às variáveis do modelo. Quando p-valor > 0,05, considerou-se que a inclusão da covariável não foi estatisticamente significativa.

Para assegurar a qualidade do ajuste do modelo proposto, os resíduos gerados foram testados, verificando se atenderam simultaneamente as seguintes proposições:

1. Análise gráfica dos resíduos de Pearson e da Deviance: resíduos aleatoriamente distribuídos não excedendo valores ± 3,0 atestam modelo ajustado (Giolo, 2017);
2. Gráfico de envelope simulado: resíduos da Deviance contidos dentro do envelope simulado indicam modelo satisfatório;
3. Estatística qui-quadrado da razão de verossimilhança (Q_L) e a Estatística qui-quadrado de Pearson (Q_p): em que p-valor > 0,05 certificam modelo ajustado.

A partir do melhor modelo ajustado, foi elaborada uma matriz com 12 linhas (números de observações da Tabela 1) e 4 colunas referente aos possíveis valores de X_{Spec} e X_{Excd} ($X_{Excd_{EC1}}$, $X_{Excd_{EC2}}$). A primeira coluna da matriz 12 x 4 foi preenchida com 1 pois esta faz referência ao intercepto (β_0). Essa matriz foi multiplicada por outra 4 x 3 contendo em

cada coluna os coeficientes estimados pelo melhor modelo, o limite inferior e o limite superior do intervalo de confiança estimado (95% de certeza), respectivamente. Os intervalos de confiança foram estimados conforme Eq. 3. A exponencial do resultado dessa multiplicação é a chance estimada pelo modelo. A razão entre dois cenários de interesse origina a \widehat{OR} . A interpretação dos valores de \widehat{OR} e dos IC é similar à do item anterior. Todas as análises foram realizadas no programa RStudio.

$$IC[\widehat{OR}] = \exp [\ln \widehat{OR} \pm 1,96. EP(\widehat{OR})] \quad (3)$$

Em que:

$IC[\widehat{OR}]$ = intervalo de confiança (estimado a 95%);

$EP(\widehat{OR})$ = erro padrão associado aos \widehat{OR}

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Abordagem tradicional

Os resultados de integridade celular da Tabela 1 foram divididos em quatro sistemas (S1, S2, S3 e S4) e apresentados na Tabela 2. Em cada um desses sistemas foi realizado o teste exato de Fisher. Para simplificar a apresentação, na Tabela 2 os valores de integridade celular dos organismos que sofreram lise celular (coluna “Média de células” em “não íntegros” da Tabela 1) foram suprimidos. Os resultados apontam que a Rr e a Dc não são igualmente afetadas pelo estresse mecânico do gradiente de velocidade, devido à diferença do número relativo de organismos íntegros em cada condição experimental.

Tabela 2 – Média das triplicatas dos resultados de integridade celular de Rr e Dc de cada Sistema (Si) após cada condição experimental e o valor p do teste exato de Fisher. Em negrito os valores significantes (p<0.05)

Sistema (Si) / (Espécie/Experimento)	Média de tricomas/Cel. (DP)			Cenário comparados		
	ECO	EC1	EC2	CE1 X CEO	CE2 X CEO	CE2 X CE1
S1 / (Rr / Experimentos com Cl ₂)	100	99	98	1,000	0,497	1,000
S2 / (Rr / Experimentos com KMnO ₄)	100	100	100	1,000	1,000	1,000
S3 / (Dc / Experimentos com Cl ₂)	71	54	53	0,019	0,013	1,000
S4 / (Dc / Experimentos com KMnO ₄)	85	55	62	<0,001	<0,001	0,389

Para *Rr*, em todas as comparações realizadas não se verificou associação entre as diferentes condições experimentais e a integridade celular em S_1 e S_2 ($p > 0,05$, Tabela 2). Essa ausência de associação indica que a proporção (ou probabilidade) de organismos (íntegros ou não) de *Rr* no início do experimento (EC_0) não difere significativamente da encontrada após a mistura rápida (EC_1) nem após a mistura lenta (EC_2).

A partir desses resultados, rechaça-se a hipótese de que a *Rr* tenha sido afetada pelo estresse hidráulico proporcionado pelos gradientes da mistura rápida e lenta aplicados. Isso sugere que diferenças nas quantidade de organismos íntegros ou não da Tabela 2, como as observada em S_1 , foram ocasionadas pela aleatoriedade do sistema, e não pela ação dos fatores avaliados (gradiente de velocidade e tempo de mistura). Portanto, pode-se afirmar que as condições hidráulicas dos gradientes da mistura rápida (durante 60 s) seguida da mistura lenta (durante 14 min, após os 60 s da mistura rápida) não foram associadas à lise nos experimentos realizados com a *Rr*.

No entanto, quando se analisa a espécie *Dc*, existem evidências de associação entre as condições da mistura rápida e lenta e a integridade celular dessa espécie ($p < 0,05$, Tabela 2). Dessa forma, existem indícios suficientes para afirmar que as quantidades (ou proporções) de organismos (íntegros ou não) em EC_1 e EC_2 são significativamente diferentes de EC_0 , tanto em S_3 como em S_4 . Analisando o cenário $EC_1 \times EC_0$, pode-se concluir que as condições hidráulicas severas de alto gradiente de velocidade podem ter comprometido as células de *Dc*, reduzindo o número de organismos íntegros em EC_1 , observado tanto em S_3 como em S_4 , na comparação com EC_0 , mesmo no curto intervalo de tempo de 60 s. Nesse estudo, isso sugere que as condições de mistura rápida estiveram associadas aos eventos de lise celular de *Dc*.

Já no cenário $EC_2 \times EC_0$, onde foram avaliados os efeitos das condições hidráulicas da mistura lenta (após a mistura rápida), notou-se que também há uma redução significativa do número de células íntegras em EC_2 , em relação a EC_0 , tanto em S_3 como em S_4 . Todavia, esse cenário de comparação por si só não deixa claro se os efeitos de lise em *Dc* ocorrem apenas na mistura rápida ou se a mistura lenta também comprometeu significativamente a integridade das células desse organismo. Assim, de acordo com o cenário de comparação $EC_2 \times EC_1$, observou-se que os números de células íntegras após EC_2 é muito próximo de EC_1 em S_3 e razoavelmente maior em S_4 (Tabela 2). Curiosamente, em primeira análise, esse fato pode ser interpretado de duas formas distintas: (1) as cepas estabeleceram a integridade celular após a lise, fato improvável; (2) por serem filamentosas e possuírem uma estrutura característica (Fig. 1), os estresses hidráulicos podem ter comprometido uma célula específica do tricoma ocasionando um ponto de lise, que, por sua vez, rompeu-se em filamentos menores com um maior número de células íntegras.

No entanto, em face do resultado da estatística de Fisher para o cenário $EC_2 \times EC_1$ ($p > 0,05$, Tabela 2), existem indícios suficientes para atribuir essas diferenças nos números de organismos íntegros ou não à casualidade, similar ao que se observou em S_1 para *Rr*. Portanto, os eventos de lise em *Dc* estão associados aos impactos do intenso gradiente da mistura rápida (durante 60 s) e não à ação prolongada do baixo gradiente de velocidade da mistura lenta. Estimou-se o nível da associação, ou seja, o quanto as chances de células íntegras aumentaram ou diminuíram por meio da razão de chances, *OR*, e seus respectivos intervalos de confiança, *IC*. Os valores calculados encontram-se na Tabela 3 e foram representados em percentual devido suas magnitudes.

Tabela 3 - Valores de OR, limite inferior (L_i) e superior (L_s) dos intervalos de confiança estimados com 95% de certeza [IC(95%)] calculados para os dados sem e com transformação ($\epsilon=0,5$ e $\epsilon=1,0$). Os (-) representam indeterminações.

S_i	Exp. Cond.	Dados s/ transformação ($\epsilon=0$)			Primeira transformação ($\epsilon=0,5$)			Segunda transformação ($\epsilon=1,0$)		
		OR (%)	IC[95%] (%)		OR (%)	IC[95%] (%)		OR (%)	IC[95%] (%)	
			L_i	L_s		L_i	L_s		L_i	L_s
S_1	EC1 x ECO	0,0	0,0	3900,0	0,0	0,0	542,3	49,7	0,8	968,2
	EC2 x ECO	0,0	0,0	531,6	0,0	0,0	531,6	32,8	0,6	416,8
	EC2 x EC1	49,7	0,8	968,4	98,0	6,9	1376,4	66,1	5,4	590,3
S_2	EC1 x ECO	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	100,0	1,2	7921,0
	EC2 x ECO	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	100,0	1,2	7921,7
	EC2 x EC1	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	100,0	1,3	7921,7
S_3	EC1 x ECO	48,1	25,6	89,5	49,1	26,2	90,8	48,9	26,2	90,3
	EC2 x ECO	46,2	24,5	85,9	47,1	25,2	86,7	47,1	25,2	86,7
	EC2 x EC1	96,1	53,1	173,9	95,9	53,10	172,9	96,2	53,4	172,9
S_4	EC1 x ECO	21,7	10,2	44,2	22,8	10,9	45,7	22,8	10,9	45,7
	EC2 x ECO	29,0	13,5	59,5	30,5	14,5	61,9	30,2	14,4	61,1
	EC2 x EC1	133,3	73,1	244,1	133,8	73,6	244,3	132,5	73,1	240,1

Apesar de serem espécies filamentosas, *Rr* e *Dc* diferem em algumas características morfológicas (GENUÁRIO et al., 2019; KOMÁREK; JOHANSEN, 2015; SANT'ANNA, 2012). Essas diferenças podem justificar os comportamentos diferenciados dessas cepas. Como os tricomas de *Dc* apresentavam flexibilidade, a intensa mistura pode ter flexionado os tricomas e a combinação desse efeito com o alto cisalhamento (principalmente durante a mistura rápida) pode ter ocasionado a lise em *Dc*, fato evidenciado tanto pelo teste exato de Fisher da Tabela 2, que associou à integridade as condições experimentais, como pelas reduções das chances de células íntegras após a mistura rápida (EC_1) e a mistura lenta (EC_2) apresentadas na Tabela 3. Apesar de em ambos os casos a tendência geral (associação ou não) ter sido preservada, os valores de ϵ alteraram sensivelmente os valores de OR e IC para *Dc* e consideravelmente para *Rr*.

De acordo com Clemente (2019), nas análises de microscopia, os tricomas de *Rr* não apresentaram tanta flexibilidade quanto os de *Dc*. Portanto, as torções e taxas de cisalhamento parecem não ter impactado esse organismo de forma

significativa, fato evidenciado pelo teste exato de Fisher, que constatou independência entre os valores observados de integridade celular dessa espécie e as condições experimentais ensaiadas (Tabela 2) e os valores do OR não significantes (Tabela 3). Nesse estudo, tanto os resultados do teste exato de Fisher como os OR (associados aos seus intervalos de confiança) calculados para *Rr*, corroboram com algumas observações de outros autores. H. Li et al. (2018) constataram que há um efeito insignificante nas células de *Rr* sob estresse de agitação mecânica. Pestana et al. (2018), analisando cianobactérias filamentosas, observaram que *Dc* foi mais impactada do que *Rr* pelos estresses ocasionados em diversas etapas do tratamento de água.

Portanto, contrastando com a resiliência de *Rr* ($1 \in IC$ em S_1 -*Rr* e S_2 em S_2 -*Rr*) na Fig. 2a, observa-se que os efeitos deletérios das condições de mistura rápida ensaiadas (750 s^{-1} em 60 s) podem reduzir para menos de 50% as chances de encontrar células íntegras de *Dc* (Fig. 2b). Em ambos os casos, os efeitos das condições de mistura lenta testados (75 s^{-1} em 14 min) não foram significantes ($1 \in IC$ na Fig. 2).

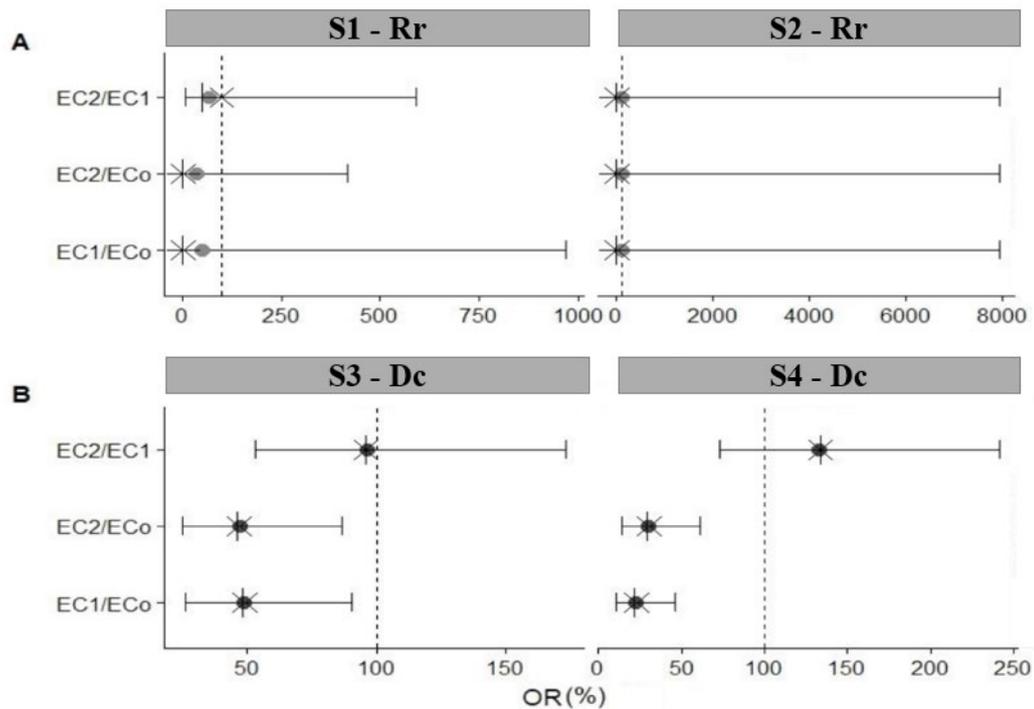


Figura 2 - OR (em percentual) e seus respectivos IC (95%) da comparação entre dois cenários para (A) Rr e (B) Dc. Os símbolos (+) e (x) representam as estimativas para $\epsilon=0,5$ e $\epsilon=1$, respectivamente. O ponto cinza representa os dados não transformados. Os IC que cruzam a reta pontilhada (valor 1 ou 100%) indicam chances iguais para os cenários comparados. OR e IC à esquerda da linha pontilhada indicam redução das chances de células íntegras e à direita o aumento das chances.

3.2 Abordagem alternativa: regressão logística

Diferentemente da abordagem tradicional, a OR em regressão logística (RL) é função dos parâmetros (covariáveis) utilizados para modelar o fenômeno observado. Isso significa que os valores obtidos são ajustados para efeito de todas as variáveis no modelo, fato não observado nas tabelas de contingência 2 x 2. Com isso, duas ressalvas devem ser feitas: (1) deve-se selecionar as variáveis cuidadosamente para evitar resultados viesados; (2) deve-se levar em conta o contexto geral do modelo (covariáveis e as saídas observadas) para a interpretação dos valores obtidos.

A Tabela 4 apresenta a forma preliminar do conjunto dos dados para a modelagem. Como as covariáveis concentração de oxidante (X_{Conc}) e tipo de oxidante (X_{Oxid}) não condizem com o escopo desse estudo (investigação apenas dos efeitos das condições hidráulicas na integridade celular de Rr e Dc), essas colunas devem ser suprimidas previamente. Ressalta-se que essas covariáveis poderiam ser significativas em outras análises, tais como a apreciação dos efeitos dos estresses químicos causados pela etapa de pré-oxidação. Portanto, na Tabela 5 encontra-se o formato da base de dados definitivo utilizado nas análises.

Tabela 4 - Estrutura preliminar da base de dados utilizada na modelagem

Concentração de oxidantes (X_{Conc})	Espécie cianobactéria (X_{Spec})	Tipo de oxidante (X_{Oxid})	Cond. Exp. (X_{ExCd})	Cel. íntegra Y(Sim)	Cel. não íntegra Y(Não)
0 mg L ⁻¹	Rr	Cl ₂	EC ₀	100	0
0 mg L ⁻¹	Rr	Cl ₂	EC ₁	99	1
0 mg L ⁻¹	Rr	Cl ₂	EC ₂	98	2
0 mg L ⁻¹	Rr	KMnO ₄	EC ₀	100	0
0 mg L ⁻¹	Rr	KMnO ₄	EC ₁	100	0
0 mg L ⁻¹	Rr	KMnO ₄	EC ₂	100	0
0 mg L ⁻¹	Dc	Cl ₂	EC ₀	71	29
0 mg L ⁻¹	Dc	Cl ₂	EC ₁	54	46
0 mg L ⁻¹	Dc	Cl ₂	EC ₂	53	47
0 mg L ⁻¹	Dc	KMnO ₄	EC ₀	85	15
0 mg L ⁻¹	Dc	KMnO ₄	EC ₁	55	45
0 mg L ⁻¹	Dc	KMnO ₄	EC ₂	62	38

Tabela 5 - Estrutura final da base de dados. Os asteriscos (*) representam as categorias de referência para cada covariável

Espécie cianobactéria (X_{Spec})	Cond. Exp. (X_{ExCd})	Cel. íntegra Y(Sim)	Cel. não íntegra Y(Não)
Rr	EC ₀ *	100	0
Rr	EC ₁	99	1
Rr	EC ₂	98	2
Rr	EC ₀	100	0
Rr	EC ₁	100	0
Rr	EC ₂	100	0
Dc*	EC ₀	71	29
Dc	EC ₁	54	46
Dc	EC ₂	53	47
Dc	EC ₀	85	15
Dc	EC ₁	55	45
Dc	EC ₂	62	38

Ainda na Tabela 5, optou-se por definir Dc como categoria de referência para a covariável X_{Spec} , pois essa espécie apresentou maior susceptibilidade aos efeitos das condições hidráulicas de mistura, de acordo com o teste de Fisher apresentado na seção anterior. Ademais, estudos revelaram um efeito insignificante nas células de Rr sob estresse de agitação mecânica menores do que 350 rpm, níveis próximos aos praticados nos experimentos deste trabalho (325 rpm) (H. Li et al., 2018). Assim, as baixas variações dos

valores de integridade celular dessa espécie e a ausência de associação revelada pelo teste de Fisher e OR (com seus respectivos IC) não significativos corroboram a escolha. Para X_{ExCd} a EC₀ foi escolhida, pois representa as condições iniciais em t = 0 s.

Na Tabela 6 são apresentados os efeitos de X_{Spec} , X_{ExCd} e sua interação ($X_{Spec} \cdot X_{ExCd}$) com uma sequência de modelos encaixados a partir do modelo nulo M1 (definido como aquele

que não possui nenhuma variável). Isso foi feito com o intuito de verificar quais covariáveis produzem redução significativa ($p < 0,05$) dos valo-

res da *Deviance* e AIC. Aquelas que produziram tais efeitos integraram o modelo utilizado, caso contrário não.

Tabela 6 - Análise da *Deviance* (ANODEV) e AIC obtidas no estudo da integridade celular de *Rr* e *Dc*.

Modelo	Covariáveis	Deviance	Graus de liberdade residual	Deviance residual	p-valor (Qui-quadrado)	AIC
M_1	Nulo	-	11	369,82	-	405,84
M_2	$M1 + X_{Spec}$	325,93	10	43,89	< 0,001	81,90
M_3	$M2 + X_{ExCd}$	30,78	8	13,10	< 0,001	55,12
M_4	$M3 + X_{Spec} \cdot X_{ExCd}$	1,45	6	11,66	0,485	57,67

Dessa forma, o modelo M_2 na Tabela 6 (inserção da variável X_{Spec} ao modelo nulo) apresentou a maior redução significativa da *Deviance*, fato que aponta que a espécie de cianobactéria apresenta a maior relevância para a previsão do grau de associação da integridade celular com as covariáveis. Esse fato está de acordo com as observações de alguns estudos que constataram diferentes alterações na integridade celular de espécies distintas de cianobactérias a determinados estímulos, tais como pré-oxidação, processos oxidativos avançados, etapas do tratamento de água, dentre outros (BAKHEET et al., 2018; PESTANA et al., 2018; QIAN et al., 2014; SHI et al., 2019). De acordo com Li et al. (2018). Isso sugere que, dependendo de qual das espécies domine o corpo hídrico destinado ao abastecimento, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias apropriadas para o tratamento dessas águas.

Ainda na Tabela 6, M_3 (inserção de X_{ExCd} ao modelo M_2) acarretou reduções significativas da *Deviance*. Isso significa que, para os dados analisados, as condições experimentais (gradiente de velocidade e tempo de mistura) devem estar associadas aos eventos de lise celular observados nas cepas de *Rr* e *Dc*, similares aos observados por Pestana et al. (2018) quando analisaram os efeitos ocasionados pelas etapas de tratamento em cianobactérias filamentosas. Já para M_4 (a inserção da interação entre as covariáveis

X_{Spec} e X_{ExCd} em M_3), observa-se um comportamento diferenciado aos demais modelos. Não se verificou redução significativa da *Deviance* ($p > 0,05$). Em M_4 também se constatou um ligeiro aumento do AIC, contrariando as sucessivas reduções até M_3 , nível mais baixo desse critério. Esse fato motivou a desconsideração desse parâmetro no modelo final.

Apesar dos resultados ligeiramente melhores da *Deviance* residual e do AIC para as funções de ligação *Probit* (12,62 e 54,63, respectivamente) e *Clog-log* (12,36 e 54,37, respectivamente), optou-se pelo *Logito* na abordagem alternativa, pois essa função de ligação fornece \widehat{OR} , facilitando a interpretação dos resultados do modelo. Dessa maneira, por ter apresentado a menor *Deviance* residual e AIC dentre os modelos com função de ligação *logito* da Tabela 6, o modelo M_3 , apresentado na Eq. 4, foi selecionado para estimar o grau de associação entre as covariáveis e a integridade celular por meio do \widehat{OR} . Ademais, o M_3 também atendeu simultaneamente às condições necessárias para os resíduos, conforme visto na Fig. 3, além das estatísticas $QL = 13,10$ ($p = 0,11$) e $QP = 12,57$ ($p = 0,13$). Portanto, os parâmetros de M_3 encontram-se na Tabela 7, onde também se pode observar que todos os coeficientes estimados foram significantes ($p < 0,05$), comprovando que os mesmos são estatisticamente diferentes de zero.

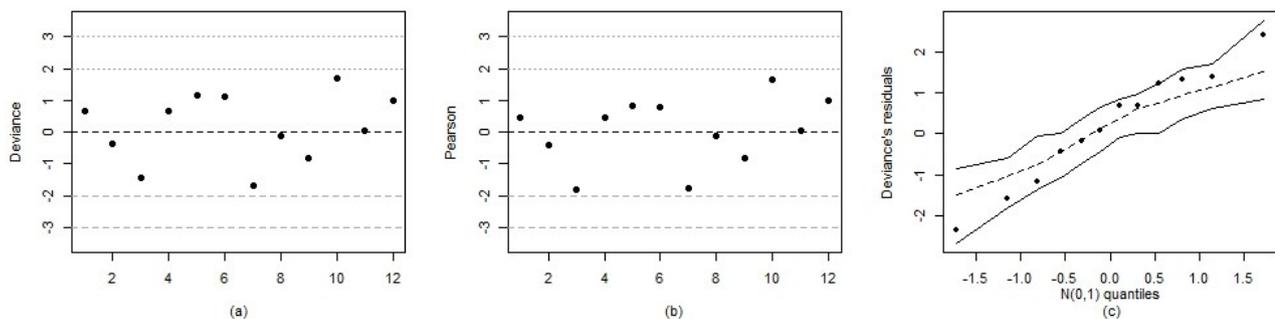


Figura 3 - Análise gráfica dos resíduos.

$$\ln \left[\frac{\widehat{P(x)}}{1 - \widehat{P(x)}} \right] = 1,28 + 4,82X_{Spec} - 1,10X_{ExCd_{EC1}} - 0,99X_{ExCd_{EC2}} \tag{4}$$

Em que:

$$\ln \left[\frac{\widehat{P(x)}}{1 - \widehat{P(x)}} \right] : \text{logito}[\widehat{P(x)}] = \ln[\text{Chance}];$$

X_{Spec} : 1 se espécies de cianobactéria Rr e 0, caso contrário;

$X_{ExCd_{EC1}}$ e $X_{ExCd_{EC2}}$: (0,0) se EC_0 ; (1,0) se EC_1 e (0,1) se EC_2 ;

Tabela 7 - Estimativa dos parâmetros do modelo M_3 .

Coefficientes	Estimativas	Erro padrão	P-valor
β_0 (Intercepto)	1,28	0,17	<0,0001
β_1	4,82	0,6	<0,0001
β_2	-1,10	0,22	<0,0001
β_3	-0,99	0,22	<0,0001

Na Eq. 4, as chances de células íntegras são elevadas dependendo da espécie de cianobactéria ($\beta_1 = 4,82$) e reduzidas pela ação das condições experimentais da mistura rápida e lenta ($\beta_2 = -1,10$ e $\beta_3 = -0,99$, respectivamente). Essas constatações podem ser atribuídas ao fato da adoção

da espécie Dc e a condição experimental EC_0 como categorias de referência. Verifica-se também que os coeficientes estimados corroboram os resultados obtidos da tabela ANODEV (Tabela 6), que enfatizaram a maior relevância da covariável espécie de cianobactéria (X_{Spec}) em relação às condições experimentais (X_{ExCd}).

De acordo com a Tabela 8, em qualquer condição experimental as chances de encontrar organismos íntegros de Rr foram 124 ($\approx \exp[4,82]$) vezes a de Dc. Esse fato confirma que Rr mostrou-se mais resistente aos efeitos do gradiente de velocidade do que a Dc, o que provavelmente motivou o baixo número de organismos com a membrana celular comprometida dessa espécie em oposição ao verificado com Dc. Isso está de acordo com as observações de Moisaner et al. (2002), que demonstraram que *Dolichospermum sp.* são mais suscetíveis ao estresse de cisalhamento do que outros gêneros de cianobactérias, possivelmente devido a sua morfologia, além dos estudos já mencionados (LI, H. et al., 2018; PESTANA et al., 2018).

Tabela 8 - Valores das chances e seus respectivos IC a 95%, conforme a Eq. 4. Os valores com asteriscos (*) são as categorias de referência.

Espécie Cianobactéria	Cond. Exp.	ln[Chance]	Chance	IC(95%)
<i>Rr</i> ($X_{\text{Spec}} = 1$)	EC_0^* $X_{\text{ExCd}} = (0,0)$	6,10	442,7	120,7 – 2542,7
	EC_1 $X_{\text{ExCd}} = (1,0)$	5,00	148,6	26,1 – 1.309,2
	EC_2 $X_{\text{ExCd}} = (0,1)$	5,11	164	28,8 – 1446,3
<i>Dc</i> [*] ($X_{\text{Spec}} = 0$)	EC_0^* $X_{\text{ExCd}} = (0,0)$	1,28	3,6	2,6 – 5,1
	EC_1 $X_{\text{ExCd}} = (1,0)$	0,18	1,2	0,6 – 2,6
	EC_2 $X_{\text{ExCd}} = (0,1)$	0,29	1,3	0,6 – 2,9

Dividindo-se de qualquer valor de EC_1 e EC_2 por EC_0 na Tabela 8, independentemente da espécie, as chances de células íntegras reduzem em EC_1 e EC_2 para menos de 40% das observadas nas condições iniciais EC_0 . Esses resultados sugerem que tanto *Rr* como *Dc* são impactadas semelhantemente pelas condições experimentais (EC_1 e EC_2), fato que não condiz com os resultados observados de integridade celular (Tabela 3) nem com as observações de diversos autores acerca da singularidade da resposta de cada espécie de cianobactéria frente a estresses semelhantes (JIN et al., 2019; LI, H. et al., 2018; PESTANA et al., 2018; SHI et al., 2019).

Para *Rr*, quando se associa a espécie de cianobactéria às condições experimentais, as chances de célula íntegra na Tabela 8 também são reduzidas de aproximadamente 443 em EC_0 para 147, em EC_1 , e 164, para EC_2 , vezes a chance de células não íntegras. Já para *Dc* não existem indícios suficientes para verificar reduções análogas às observadas em *Rr*. Devido aos intervalos de confiança ($1 \in IC$), as chances de células íntegras após as condições EC_1 e EC_2 não diferem das iniciais (EC_0) para *Dc*. Novamente, esses resultados não condizem com as observações da abordagem tradicional nem refletem o comportamento normalmente descrito dessas cepas frente aos estresses hidráulicos. Isso pode ser atribuí-

do ao fato de que tanto as chances como o \widehat{OR} são ajustados a todas as variáveis do modelo, característica particular da regressão logística. Assim, em M_3 , os dados de integridade de *Rr* são ajustados pelos de *Dc* e a recíproca é verdadeira. Dessa forma, necessita-se de cautela para a interpretação desses resultados obtidos por regressão logística.

Por conseguinte, para apreciar as características específicas de cada cepa frente aos estresses das condições experimentais, a base de dados da Tabela 5 foi subdividida em duas partes referentes aos resultados de integridade celular de *Rr* (6 primeiras linhas) e *Dc* (os registros da 7ª linha em diante).

Para o modelo que utilizou apenas os valores de integridade celular de *Rr*, M_5 , a Tabela 9 evidencia que todos os coeficientes do modelo não foram significativos ($p > 0,05$). Além disso, não houve redução relevante da *Deviance* residual (6,97 no modelo nulo para 4,18) e o AIC aumentou ligeiramente (de 13,55 no modelo nulo para 14,77). Portanto, todas essas informações permitem afirmar que para os experimentos realizados com *Rr* não existem evidências que comprovem a associação da integridade dessas cepas com as condições experimentais avaliadas, confirmando o que também foi visto na abordagem tradicional.

Tabela 9 - Estimativa dos parâmetros do modelo M_5 , que avaliou os efeitos das condições experimentais apenas em Rr (categoria de referência adotada foi EC_0)

Coefficientes	Estimativas	Erro padrão	P-valor
β_0 (Intercepto)	24,30	8155,3	0,998
$\beta_2(x_{ExCd_{EC1}})$	-19,01	8155,3	0,998
$\beta_3(x_{ExCd_{EC2}})$	-19,72	8155,3	0,998

No modelo M_6 foram examinados apenas os valores de integridade celular de Dc . Na Tabela 10 são mostrados os coeficientes de M_6 , que foram todos significativos ($p < 0,05$), diferentemente de M_5 . Observou-se redução da *Deviance* residual (36,92 no modelo nulo para 7,47) e do AIC

(de 68,35 no modelo nulo para 42,90). Além do mais, as estatísticas $Q_L = 7,74$ ($p = 0,06$) e $Q_p = 7,39$ ($p = 0,06$) bem como os critérios para os resíduos (Fig. 4) atenderam simultaneamente às condições necessárias para atestarem a qualidade do modelo M_6 .

Tabela 10 - Estimativa dos parâmetros do modelo M_6 , que avaliou os efeitos das condições experimentais apenas em Dc (categoria de referência adotada foi EC_0)

Coefficientes	Estimativas	Erro padrão	P-valor
β_0 (Intercepto)	1,27	0,17	<0,0001
$\beta_2(x_{ExCd_{EC1}})$	-1,08	0,22	<0,0001
$\beta_3(x_{ExCd_{EC2}})$	-0,96	0,22	<0,0001

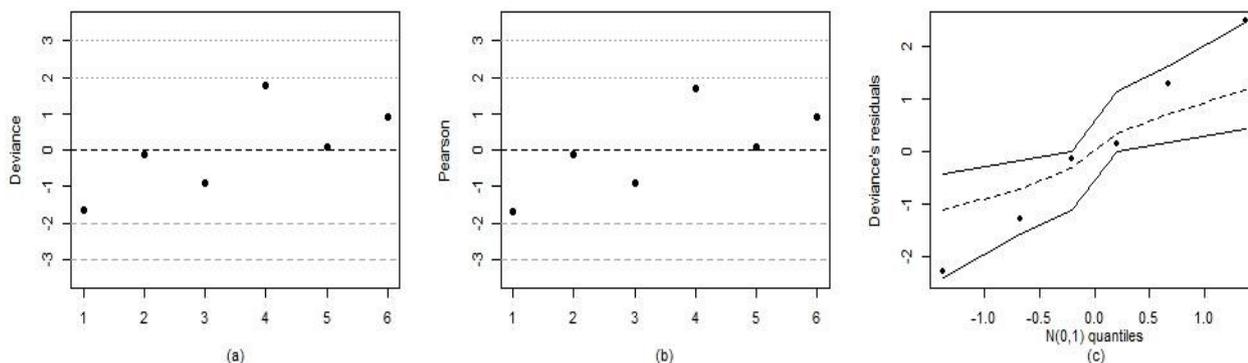


Figura 4 - Análise gráfica dos resíduos do modelo M_6 .

Portanto, de acordo com a Tabela 10, as chances de células íntegras em EC_1 e EC_2 são reduzidas para menos do que 35% ($= \exp\beta[2] = \exp[\beta3]$) das observadas nas condições iniciais EC_0 , similar ao verificado na abordagem tradicional para Dc . Também de forma análoga, os impactos da mistura lenta (EC_2 em relação a EC_1) não foram significativos, uma vez que a chances estimadas são aproximadamente 1.

Portanto, os resultados de M_5 e M_6 seguiram a mesma tendência da abordagem tradicional. Isso significa que esses modelos foram mais apropriados para mensurar o nível de associa-

ção entre integridade celular e os estresses hidráulicos das condições experimentais do que o modelo mais global M_3 . Destaca-se também que os valores desses modelos descrevem melhor os fenômenos estudados, visto que se leva em consideração o contexto geral dos dados em suas estimativas. Isso significa que as diferenças dos resultados de integridade observados em experimentos diferentes (e.g. Cl_2 em S_1 e S_3 e $KMnO_4$ em S_2 e S_4 na Tabela 4) são sumarizados em uma única resposta (Tabela 8, 9 e 10), permitindo uma apreciação generalizada e não uma particular, como na abordagem tradicional.

4 CONCLUSÕES

- O uso do teste exato de Fisher permitiu confirmar estatisticamente que as diferenças entre os resultados de integridade celular vistos na Tabela 2 foram ocasionados pelas condições experimentais da mistura rápida (EC_1 e EC_2 em comparação a EC_0) e que as observadas durante a mistura lenta (EC_2 x EC_1) foram ocasionadas por um mero acaso.
- Na abordagem tradicional, as comparações são individualizadas, ou seja, os efeitos particulares de cada indivíduo analisado (e.g. Rr e Dc) não interferem no resultado dos outros. Porém, cada experimento pode fornecer um valor diferente para essas estatísticas, o que pode representar um risco em caso de experimentos enviesados.
- A metodologia do termo de correção ϵ ($\epsilon = 0; 0,5$ ou 1) na abordagem tradicional permitiu superar a limitação das indeterminações (Tabela 3), porém os valores de OR e IC foram em alguns casos ligeiramente diferentes dos observados com os dados originais (valores da Dc da Tabela 3), mas discrepantes em outros (valores da Rr da Tabela 3), como observado na Fig. 2. Ressalta-se, entretanto, que em ambos os casos a tendência geral (associação ou não) foi preservada.
- Na abordagem alternativa com regressão logística, como o contexto geral do modelo (covariáveis e as saídas observadas) é utilizado para as estimativas da chance e do \widehat{OR} , para os casos em que se deseja comparar espécies com comportamento diferenciados (como Rr e Dc , por exemplo) expostas às mesmas condições experimentais (M_3), os resultados obtidos devem ser confrontados com os resultados individuais de cada espécie (M_5 e M_6) e com a literatura. De posse dessas três informações, a interpretação dos resultados é mais assertiva.

- A sequência proposta para a análise da qualidade do modelo na abordagem alternativa mostrou-se capaz de identificar modelos bem ajustados (M_3 e M_6) e não ajustados (M_5).
- Recomenda-se que os parâmetros hidráulicos gradiente de velocidade e tempo de mistura sejam considerados na estratégia de operação das estações de tratamento de água.
- As informações reveladas tanto pela abordagem tradicional como pela alternativa são importantes para nortear a tomada de decisão das companhias de saneamento na definição dos parâmetros operacionais ideais (e.g. gradiente de velocidade e tempo de mistura) nas ETAs, tendo em vista que alguns gêneros (tais como os estudados aqui) são potencialmente produtores de metabólitos tóxicos ou que atribuem sabor e odor à água. Portanto, evitar a solubilização desses compostos durante o processo de tratamento, devido ao aumento das chances de lise celular, deve ser considerada uma estratégia indispensável para uma gestão na qual se almeja prover água para abastecimento público de alta qualidade a baixos custos operacionais.

5 AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES [PROEX 20/2016 e PRINT 41/2017] e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq [Projeto Universal 403116/2016-3 e Bolsa de produtividade em pesquisa edital 12/2017].

6 CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Todos os autores contribuíram de forma igualitária.

7 REFERÊNCIAS

- AGRESTI, A. **Categorical Data Analysis**. 2. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2012. 721 p.
- AUNG, M. T. et al. Preterm birth in relation to the bisphenol A replacement, bisphenol S, and other phenols and parabens. **Environmental Research**, [s.l.], v. 169, no June 2018, p. 131–138, 2019. ISSN: 10960953. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.10.037>
- BAKER, E. B.; SHOWERS, W. J. Hysteresis analysis of nitrate dynamics in the Neuse River, NC. **Science of the Total Environment Journal**, [s.l.], v. 652, no 8, p. 889–899, 2019. ISSN: 0048-9697. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.254>
- BAKHEET, B. et al. Electrochemical inactivation of *Cylindrospermopsis raciborskii* and removal of the cyanotoxin cylindrospermopsin. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 344, p. 241–248, 2018. ISSN: 18733336. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.10.024>
- CALOMENI, A. J.; JR, J. H. R. Ecotoxicology and Environmental Safety Evaluation of the utility of six measures for algal (*Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix agardhii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*) viability. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 111, p. 192–198, 2015. ISSN: 0147-6513. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.033>
- CAPELLI, C. et al. Biogeography of bloom-forming microcystin producing and non-toxicogenic populations of *Dolichospermum lemmermannii* (Cyanobacteria). **Harmful Algae**, [s.l.], v. 67, p. 1–12, 2017. ISSN: 18781470. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.05.004>
- CHERNOVA, E. et al. *Dolichospermum* and *Aphanizomenon* as neurotoxins producers in some Russian freshwaters. **Toxicon**, [s.l.], v. 130, p. 47–55, 2017. ISSN: 18793150. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.02.016>
- CRIDER, Y. et al. Can you taste it? Taste detection and acceptability thresholds for chlorine residual in drinking water in Dhaka, Bangladesh. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 613–614, p. 840–846, 2018. ISBN: 00489697 (ISSN), ISSN: 18791026. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.135>
- DÍEZ-QUIJADA, L. et al. Microcystin-RR: Occurrence, content in water and food and toxicological studies. A review. **Environmental Research**, [s.l.], v. 168, no April 2018, p. 467–489, 2019. ISSN: 10960953. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.07.019>
- DREHER, T. W. et al. Anabaena/*Dolichospermum* as the source of lethal microcystin levels responsible for a large cattle toxicosis event. **Toxicon: X**, [s.l.], p. 100003, 2018. ISSN: 25901710. <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2018.100003>
- DUGAN, N. R.; SMITH, S. J.; SANAN, T. T. Impacts of Potassium Permanganate and Powdered Activated Carbon on Cyanotoxin Release. **Journal - American Water Works Association**, [s.l.], p. 1–12, 2018. ISSN: 0003150X. <https://doi.org/10.1002/awwa.1125>
- EGOROV, A. I. et al. Application of a salivary immunoassay in a prospective community study of waterborne infections. **Water Research**, [s.l.], v. 142, p. 289–300, 2018. ISSN: 18792448. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.030>
- FAN, J. et al. Evaluation of potassium ferrate as an alternative disinfectant on cyanobacteria inactivation and associated toxin fate in various waters. **Water Research**, [s.l.], v. 129, p. 199–207, 2018. ISSN: 18792448. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.11.026>
- GARCÍA-PÉREZ, J. et al. Risk of neuroblastoma and residential proximity to industrial and urban sites: A case-control study. **Environment International**, [s.l.], v. 92–93, p. 269–275, 2016. ISBN: 0160-4120. ISSN: 18736750. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.04.023>
- GENUÁRIO, D. B. et al. Cyanobacteria From Brazilian Extreme Environments. **Microbial Diversity in the Genomic Era**, [s.l.], p. 265–284, 2019. ISBN: 9780128148495. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814849-5.00016-2>
- GIOLO, S. R. **Introdução à análise de dados categóricos com aplicações**. São Paulo: Blucher, 2017. 256 p.
- HARRISON, M. et al. Smart growth and the septic tank: Wastewater treatment and growth management in the Baltimore region. **Land Use Policy**, [s.l.], v. 29, no 3, p. 483–492, 2012. ISBN: 0264-8377, ISSN: 02648377. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2011.08.007>
- JAJA-CHIMEDZA, A. et al. Identification of teratogenic polymethoxy-1-alkenes from *Cylindrospermopsis raciborskii*, and taxonomically diverse freshwater cyanobacteria and green algae. **Harmful Algae**, [s.l.], v. 49, p. 156–161, 2015. ISBN: 1568-9883, ISSN: 15689883. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.09.010>
- JIAN, Z. et al. Removal of micropollutants and cyanobacteria from drinking water using KMnO₄ pre-oxidation coupled with bioaugmentation. **Chemosphere**, [s.l.], v. 215, p. 1–7, 2019. ISSN: 00456535. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.013>
- JIN, Y. et al. Application of N-TiO₂ for visible-light photocatalytic degradation of *Cylindrospermopsis raciborskii* — More difficult than that for photodegradation of *Microcystis aeruginosa*? **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 245, p. 642–650, 2019. ISSN: 02697491. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.056>
- KOHLHARDT-FLOEHR, C. et al. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation - Studies on human cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s.l.], v. 101, no 1, p. 97–102, 2010. ISBN: 1873-2682 (Electronic)r1011-1344 (Linking), ISSN: 10111344. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.06.017>
- KOMÁREK, J.; JOHANSEN, J. R. Filamentous Cyanobacteria. **Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification**. [s.l.]: [s.n.], 2015. 135-235 p. ISBN: 9780123858771, ISSN: 0029-8549. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385876-4.00004-9>

- LI, D.; LIU, S. Water Quality Early Warnings. **Water Quality Monitoring and Management**. [s.l.]: [s.n.], 2019. p. 199–210. ISBN: 9780128113301. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811330-1.00006-5>
- LI, H. et al. Behavior of *Cylindrospermopsis raciborskii* during coagulation and sludge storage – higher potential risk of toxin release than *Microcystis aeruginosa*? **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 347, p. 307–316, 2018. ISSN: 18733336. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.01.009>
- LIN, J. L. et al. Pretreatment of algae-laden and manganese-containing waters by oxidation-assisted coagulation: Effects of oxidation on algal cell viability and manganese precipitation. **Water Research**, [s.l.], v. 89, p. 261–269, 2016. ISSN: 18792448. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.11.042>
- _____. Algal removal from cyanobacteria-rich waters by preoxidation-assisted coagulation–flotation: Effect of algogenic organic matter release on algal removal and trihalomethane formation. **Journal of Environmental Sciences (China)**, [s.l.], v. 63, p. 147–155, 2018. ISSN: 18787320. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.02.007>
- LIU, B. et al. *Microcystis aeruginosa*-laden water treatment using enhanced coagulation by persulfate/Fe(II), ozone and permanganate: Comparison of the simultaneous and successive oxidant dosing strategy. **Water Research**, [s.l.], v. 125, p. 72–80, 2017. ISBN: 1879-2448 (Electronic) 0043-1354 (Linking), ISSN: 18792448. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.035>
- LÜRLING, M. et al. Critical assessment of chitosan as coagulant to remove cyanobacteria. **Harmful Algae**, [s.l.], v. 66, p. 1–12, 2017. ISSN: 18781470. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.04.011>
- MARKELOVA, A.; VLADIMIROVA, M.; KUPTSOVA, E. A comparison of cytochemical methods for the rapid evaluation of microalgal viability. **Russian Journal of Plant Phycology**, [s.l.], v. 47, no 6, p. 815–819, 2000. ISBN: 1021-4437, ISSN: 10214437. <https://doi.org/10.1023/a:1026619514661>
- MOISANDER, P. H. et al. Small-scale shear effects on heterocystous cyanobacteria. **Limnology and Oceanography**, [s.l.], v. 47, no 1, p. 108–119, 2002. ISBN: 0024-3590, ISSN: 00243590. <https://doi.org/10.4319/lo.2002.47.1.0108>
- NDONG, M. et al. Estimating the risk of cyanobacterial occurrence using an index integrating meteorological factors: Application to drinking water production. **Water Research**, [s.l.], v. 56, p. 98–108, 2014. ISBN: 4352642711438, ISSN: 18792448. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.023>
- O'DWYER, J. et al. Development of a hierarchical model for predicting microbiological contamination of private groundwater supplies in a geologically heterogeneous region. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 237, p. 329–338, 2018. ISSN: 18736424. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.052>
- OLEA-POPELKA, F.; ROSEN, L. E. A Practical Guide for Statistics in Wildlife Studies. **Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy, Volume 9**. [s.l.]: Elsevier Inc., 2019. 21–27 p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-55228-8.00005-9>
- OSBORNE, N. J.; SHAW, G. R.; WEBB, P. M. Health effects of recreational exposure to Moreton Bay, Australia waters during a *Lyngbya majuscula* bloom. **Environment International**, [s.l.], v. 33, no 3, p. 309–314, 2007. ISBN: 0160-4120, ISSN: 18736750. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.10.011>
- PAGANO, M.; GAUVREAU, K. **Princípios de bioestatística**. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 506 p.
- PESTANA, C. J. et al. Fate of cyanobacteria in drinking water treatment plant lagoon supernatant and sludge. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 565, p. 1192–1200, 2016. ISBN: 0048-9697, ISSN: 18791026. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.173.4>
- _____. The effect of water treatment unit processes on cyanobacterial trichome integrity. **Science of The Total Environment**, [s.l.], p. #pagerange#, 2018. ISSN: 00489697. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.337>
- QIAN, F. et al. The effect of pH on the release of metabolites by cyanobacteria in conventional water treatment processes. **Harmful Algae**, [s.l.], v. 39, p. 253–258, 2014. ISBN: 1568-9883, ISSN: 15689883. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.08.006>
- SANT'ANNA, C. L. et al. **Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras**. Instituto de Botânica, [s.l.], p. 175, 2012. ISBN: 978-85-7523-040-4. <https://doi.org/10.13140/2.1.4417.1208>
- SHENG, H. et al. Analysis on cyanobacteria bloom in Waihai of Lake Dianchi. **Shengtai Xuebao/ Acta Ecologica Sinica**, [s.l.], v. 32, no 1, p. 0056–0063, 2012. ISBN: 1574-9541, ISSN: 10000933. <https://doi.org/10.5846/stxb201011261680>
- SHI, X. et al. A comparison of trichloromethane formation from two algae species during two pre-oxidation- coagulation-chlorination processes. **Science of the Total Environment**, [s.l.], v. 656, p. 1063–1070, 2019. ISSN: 18791026. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.461>
- STOMMEL, E. W.; FIELD, N. C.; CALLER, T. A. Aerosolization of cyanobacteria as a risk factor for amyotrophic lateral sclerosis. **Medical Hypotheses**, [s.l.], v. 80, no 2, p. 142–145, 2013. ISBN: 0306-9877, ISSN: 03069877. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2012.11.012>
- CLEMENTE, A. **Efeito em cianobactérias filamentosas das condições hidráulicas da coagulação e floculação na presença ou não de pré-oxidação**. 2019. 124 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil: Saneamento Ambiental, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

TORNEVI, A. et al. Efficacy of water treatment processes and endemic gastrointestinal illness - A multi-city study in Sweden. **Water Research**, [s.l.], v. 102, p. 263–270, 2016. ISBN: 0043-1354, ISSN: 18792448. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.06.018>

TSAl, K. P. Effects of two copper compounds on *Microcystis aeruginosa* cell density, membrane integrity, and microcystin release. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s.l.], v. 120, p. 428–435, 2015. ISBN: 9780717143931, ISSN: 10902414. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.024>

XIE, P. et al. A mini review of preoxidation to improve coagulation. **Chemosphere**, [s.l.], v. 155, p. 550–563, 2016. ISSN: 18791298. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.003>

ZAMYADI, A. et al. Fate of toxic cyanobacterial cells and disinfection by-products formation after chlorination. **Water Research**, [s.l.], v. 46, no 5, p. 1524–1535, 2012. ISBN: 5143404711, ISSN: 00431354. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.06.029>

----- Fate of geosmin and 2-methylisoborneol in full-scale water treatment plants. **Water Research**, [s.l.], v. 83, p. 171–183, 2015. ISBN: 1879-2448 (Electronic) 0043-1354 (Linking), ISSN: 18792448. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.06.038>

ZHENG, H. et al. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in manure-free piggery wastewater with high-strength ammonium for nutrients removal and biomass production: Effect of ammonium concentration, carbon/nitrogen ratio and pH. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 273, no November 2018, p. 203–211, 2019. ISSN: 18732976. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.019>