



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA**  
**CURSO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL**

**ANTÔNIO CAVALCANTE PEREIRA**

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE SUBPRODUTOS DECORRENTES DA  
OXIDAÇÃO DE MICROCISTINA-LR UTILIZANDO O PROCESSO FENTON**

**CAMPINA GRANDE – PB**  
**2018**

ANTÔNIO CAVALCANTE PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE SUBPRODUTOS DECORRENTES DA  
OXIDAÇÃO DE MICROCISTINA-LR UTILIZANDO O PROCESSO FENTON**

Monografia apresentada como Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), a Coordenação de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba como exigência para obtenção do título de Engenheiro Sanitarista e Ambiental, sob orientação do Prof. Dr. Wilton Silva Lopes/UEPB

CAMPINA GRANDE – PB  
2018

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

P436a Pereira, Antônio Cavalcante.

Avaliação da formação de subprodutos decorrentes da oxidação de Microcistina-LR utilizando o processo Fenton [manuscrito] : / Antonio Cavalcante Pereira. - 2018.

51 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia , 2018.

"Orientação : Prof. Dr. Wilton Silva Lopes , Coordenação do Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental - CCT."

1. Tratamento de água. 2. Cianotoxinas. 3. Processos Oxidativos Avançados. 4. Espectrometria de massas.

21. ed. CDD 628.162



ANTÔNIO CAVALCANTE PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE SUBPRODUTOS DECORRENTES DA  
OXIDAÇÃO DE MICROCISTINA-LR UTILIZANDO O PROCESSO FENTON**

Monografia apresentada como Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), à Coordenação de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba como exigência para obtenção do título de Engenheiro Sanitarista e Ambiental.

Aprovada em: 21, 06 /2018

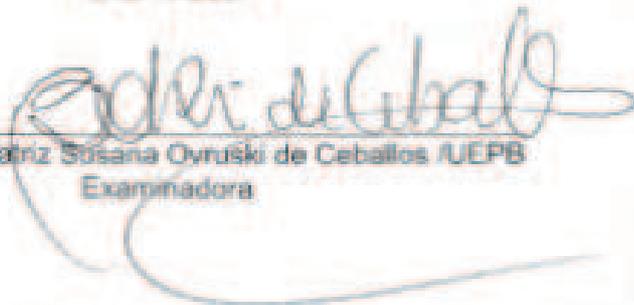
Nota: 100 (Dez, zeros)



Prof. Dr. Wilton Silva Lopes /UEPB  
Orientador (a)



Prof. Dr. Fernando Fernandes Vieira /UEPB  
Examinador



Profa. Dra. Beatriz Sísana Ovruski de Ceballos /UEPB  
Examinadora

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida e por toda força e fé que tem me dado.

A minha família, em especial a minha mãe, Noilma e meu pai, Antônio, por todos ensinamentos, apoio, paciência e perseverança para apoiar toda a minha longa vida acadêmica. Ao meu irmão Anderson e minha sobrinha Maria Vitória.

A todos os meus amigos, principalmente ao grupo “poison”, composto por Ronnan, Carolina e Luan e ao grupo “infitetes” – composto por Maria Clara, Leticia e Michelle e “SEJEMENAS” composto por Luênia, Ricardo e Laís, assim como Dênis Pequeno, Natália, Amanda, Marizabel, Wendel, Leon e Ana Aparecida que me ajudaram diretamente ou indiretamente na elaboração, revisão e aperfeiçoamento deste trabalho.

Agradeço ao grupo da LAQUISA, composto por Amanda, Virginia, Anna Paula e Wanderley Nascimento por todos os ensinamentos e ajuda e Catarina Simone pelo apoio em todas análises e por todas as contribuições na construção do texto do meu TCC.

Agradeço a professora Geralda Gilvânia Cavalcante de Lima, por me apresentar esse curso, enquanto PIBIC-Jr no ano 2010, o qual me apaixonei e estou em fase de conclusão no momento.

Ao meu orientador, Wilton Silva Lopes por toda a disposição, paciência e pelos conhecimentos transmitidos ao longo do período de orientação.

Ao prof. Fernando Fernandes e a profa. Beatriz Susana Ovruski pelos ensinamentos e conselhos, estando presente nas contribuições deste trabalho desde o início.

Por fim, sou grato a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação e possivelmente a realização deste trabalho.

*“[...] você é o único representante  
do seu sonho na face da terra  
se isso não fizer você correr, [...]”  
Eu não sei o que vai”  
Levanta e Anda - Emicida e Rael*

## RESUMO

Devido a intensificação de períodos secos causados pelas mudanças climáticas combinadas com o aumento do aporte de nutrientes em recursos hídricos, existe o favorecimento do desenvolvimento de microrganismos resilientes, entre elas as denominadas cianobactérias. As quais geram um grupo diverso de toxinas naturais, denominados de cianotoxinas. A mais frequente delas é um hepatotoxina formada por um heptapeptídeo cíclico denominado Microcistina-LR. De modo a reduzir a exposição a cianotoxinas, órgãos responsáveis pela regulação do tratamento de água impõem valores máximos permissíveis para a mesma. Para alcançar essas diretrizes, diversas são as tecnologias de tratamento utilizadas, sendo a oxidação, mais precisamente a utilização do processo Fenton destacada, devido sua fácil implantação e alta capacidade de geração de radicais hidroxila. Contudo a principal preocupação com oxidação de qualquer substância, nesse caso a toxina MC-LR, é o possível efeito de sua poluição secundária, caracterizada pela formação de subprodutos de oxidação de igual ou maior toxicidade do que o composto original. Diante do exposto, o objetivo dessa pesquisa foi a avaliação da formação de subprodutos durante a oxidação de Microcistina-LR em água tipo I (água ultrapura) com a utilização do processo Fenton e possível elucidação dos seus fragmentos de massa gerados. Resultados assinalam que o processo Fenton possui maior efetividade em pHs ácidos, nos valores 3 e 5, com maior taxa de degradação da toxina em ambos. Adicionalmente, foi-se elucidado 5 fragmentos-moléculas de oxidação os quais foram m/z: 649 ( $C_{24}H_{39}N_7O_{14}$ ), 689 ( $C_{28}H_{45}N_7O_{13}$ ), 729 ( $C_{29}H_{48}N_{10}O_{12}$ ), 769 ( $C_{33}H_{56}N_{10}O_{11}$ ), 808 ( $C_{35}H_{56}N_{10}O_{12}$ ) com cálculos de formulas químicas aproximadas. Notou-se que a MC-LR foi oxidada através da quebra do grupo Adda, o que resulta na perda de atividade biológica da molécula, além de outras vias de oxidação, nos peptídeos: Mdha, Leucina e Arginina. Em todos os subprodutos estudados a estrutura cíclica da MC-LR ficou intacta. Recomenda-se para próximos estudos a utilização de substâncias padrões de MC-LR para contaminação da água de estudo, avaliação da formação de fragmentos em outras matrizes e purificação dos subprodutos para análises de biotoxicidade.

**Palavras-chave:** Tratamento de água; Cianotoxinas, Processos Oxidativos Avançados, Espectrometria de massas.

## ABSTRACT

Due to the dry periods intensification caused by climatic changes combined with the nutrient input increase in water resources, the development of resilient microorganisms, named cyanobacteria in this environment, is favored. Which generate a diverse group of natural toxins, called cyanotoxins. The main one being a hepatotoxin formed by a cyclic heptapeptide called Microcystin-LR. Thus, in order to reduce exposure to cyanotoxins, organizations responsible for water treatment regulation impose maximum permissible values for the toxin concentration. For meeting these guidelines, several treatment technologies are used, and oxidation, specifically the Fenton process use can be highlighted, due to its easy deployment and high hydroxyl radicals' capacity generation. However, the main concern with any substance oxidation, in this case the MC-LR toxin, is its secondary pollution, characterized by the oxidation by-products formation of equal or greater toxicity than the parent compound. In view of the above, the objective of this research was to evaluate the formation of by-products during the oxidation of Microcystin-LR in type I water using the Fenton process and possible elucidation of its mass fragments. Results indicate that Fenton process is more effective in acidic pHs, in the values 3 and 5 studied, with a higher rate of toxin degradation in both. Furthermore, it was elucidated 5 mass fragments which were  $m/z$ : 649 ( $C_{24}H_{39}N_7O_{14}$ ), 689 ( $C_{28}H_{45}N_7O_{13}$ ), 729 ( $C_{29}H_{48}N_{10}O_{12}$ ), 769 ( $C_{33}H_{56}N_{10}O_{11}$ ), 808 ( $C_{35}H_{56}N_{10}O_{12}$ ) with approximate chemical formula. The MC-LR was oxidized through the breakdown of the Adda group, which results in the molecule biological activity loss. In addition, other oxidation pathways, was in Mdha, Leucine and Arginine peptides. In all by-products studied the MC-LR cyclic structure was intact. It is recommended, for further research the use MC-LR standard substances for study water contamination, evaluation of fragments formation in others matrices and by-products purification for biotoxicity analyzes.

**Keywords:** Water Treatment, Cyanotoxins, Advanced Oxidative Processes, Mass Spectrometry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química geral das microcistinas.....	20
Figura 2 – Estrutura química da Microcistina-LR.....	22
Figura 3 – Fragmentos de oxidação em função do tempo para o pH 3,0.....	38
Figura 4 – Fragmentos de oxidação em função do tempo para o pH 5,0.....	39
Figura 5 – Fragmentos de oxidação em função do tempo para o pH 7,0.....	40
Figura 6 – Fragmentos de oxidação em função do tempo para o pH 9,0.....	41
Figura 7 – Estrutura química dos fragmentos de oxidação a) m/z 649 e b) m/z 689.....	42
Figura 8 – Estrutura química dos fragmentos de oxidação a) m/z 729 e b) m/z 769.....	43
Figura 9 – Estrutura química do fragmento de oxidação m/z 808.....	43

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Resumo de estruturas químicas, cianobactérias produtoras e modos de ação das principais cianotoxinas.....	18
Quadro 2 –Diretrizes ou padrões para toxinas de cianobactérias em água potável para vários países.....	23

## LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
POAs	Processos Oxidativos Avançados
MC	Microcistina
MC-LR	Microcistina-LR
EM	Espectrometria de massas
Ala	Alanina
MeAsp	Ácido metilaspártico
Glu	Ácido glutâmico
Adda	Amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-trimetildeca-4,6- dienóico
LD <sub>50</sub>	Dose letal média
IDT	Ingestão diária tolerável
IARC	Instituto Internacional do Câncer
CAP	Carbono ativado pulverizado
CAG	Carbono ativado granular
MO	Matéria orgânica
EXTRABES	Estação Experimental de Tratamento Biológico do Esgotamento Sanitário
ELISA	Ensaio imunoenzimático
SIE	Sonda de ionização por eletrospray
CCL	Lista de candidatos a contaminantes

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>2.1 OBJETIVO GERAL</b>	<b>15</b>
<b>2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>15</b>
<b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>16</b>
<b>3.1 CORPOS HÍDRICOS, SECAS, EUTROFIZAÇÃO E CIANOBACTÉRIAS</b>	<b>16</b>
<b>3.2 CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS</b>	<b>16</b>
<b>3.3 MICROCISTINA</b>	<b>19</b>
<b>3.4 MICROCISTINA-LR</b>	<b>21</b>
<b>3.5 LEGISLAÇÃO PERTINENTE</b>	<b>22</b>
<b>3.6 TECNOLOGIAS DE TRATAMENTO PARA REMOÇÃO DE CIANOTOXINAS</b>	<b>23</b>
<b>3.7 ESPECTROMETRIA DE MASSAS</b>	<b>26</b>
<b>3.8 PROCESSO FENTON</b>	<b>26</b>
<b>3.9 SUBPRODUTOS DE OXIDAÇÃO DA MC-LR - ESTADO DA ARTE</b>	<b>28</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
<b>4.1 REAGENTES UTILIZADOS</b>	<b>31</b>
<b>4.2 CULTIVO DA CIANOBACTÉRIA</b>	<b>31</b>
<b>4.3 EXTRAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E SEMIPURIFICAÇÃO DA MC-LR</b>	<b>32</b>
<b>4.4 ÁGUA DE ESTUDO</b>	<b>33</b>
<b>4.5 EXPERIMENTO DE OXIDAÇÃO E TRATAMENTO DE AMOSTRAS</b>	<b>33</b>
<b>4.6 SUBPRODUTOS DA OXIDAÇÃO DE MICROCISTINA-LR</b>	<b>34</b>
<b>4.7 ANÁLISE DE SUBPRODUTOS EM FUNÇÃO DE TEMPO</b>	<b>34</b>
<b>4.8 ELUCIDAÇÃO DE FRAGMENTOS</b>	<b>35</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>36</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Devido à intensificação de períodos secos causados pelas mudanças climáticas (IPCC, 2007; ELLIOTT, 2012; O'NEIL *et al.*, 2012; PAERL E PAUL, 2012; PAERL E SCOTT, 2010, LEHMAN *et al.*, 2017) combinadas com o aumento do aporte de nutrientes (fósforo e nitrogênio) em recursos hídricos (BRASIL *et al.*, 2017, ADWG,2011), alguns microrganismos fitoplânctons tendem a prevalecer em detrimento de outros neste meio, devido à sua resiliência a essas novas condições.

As características trazidas para estes recursos hídricos pela seca, tais como: aumento da salinização, aumento da temperatura da água (apurada estratificação térmica vertical dos ecossistemas aquáticos), alterações nos padrões climáticos sazonais e anuais deste meio e mudanças nos períodos de residência evaporativo e hidráulico (aumentando, assim, a retenção de nutrientes), favorecem o desenvolvimento de cianobactérias (BRASIL *et al.*, 2017; LEHMAN *et al.*, 2017; JOURNEY, BEAULIEU E BRADLEY, 2013) causando, dessa forma, as florações excessivas.

Cianobactérias são bactérias aeróbias fotoautotróficas, pertencentes ao domínio Bacteria de acordo com classificação de WOESE, KANDLER e WHEELIS (1990), mas apresentando diversas características que as diferenciam de outros integrantes desse domínio. Dentre a diversidade desse filo, algumas cepas de cianobactérias podem ser produtoras de toxinas intracelulares e extracelulares, toxinas estas, tais como Anatoxina e Cilindropermopsina - (neurotoxinas), Microcistina (MC) - (hepatotoxina), as quais podem vir a contaminar os recursos hídricos.

Algumas dessas toxinas, tais como as MC são mais potentes que cianeto (CHORUS e BARTMAN, 1999) e representam riscos para a saúde humana e animal. A mesma toxina possui mais de 90 análogos estruturais já identificados (BORTOLI e VOLMER, 2014), dentre os quais a hepatotoxina Microcistina-LR (MC-LR), que é um dos análogos predominantes e de elevada toxicidade (CATHERINE *et al.*, 2017). Essa toxina possui uma molécula composta por sete aminoácidos conectados por ligações peptídicas em uma configuração cíclica, as quais garantem sua atividade biológica e solubilidade.

Dessa forma, de modo a reduzir a exposição a cianotoxinas, principalmente a MC em água de abastecimento, órgãos responsáveis pela regulação do tratamento

de água estabelecem um valor máximo permitido para a concentração da mesma. Esse valor é preconizado em  $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$  de MC-LR ou MC total, regulado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em suas diretrizes e na legislação de diversos países, salvo algumas exceções.

Como essas substâncias podem ser consideradas micropoluentes, processos de convencionais de tratamento de água, que incluem coagulação, floculação, sedimentação, filtração e desinfecção, possuem limitada efetividade na remoção de dessas toxinas. Outras tecnologias de tratamento, tais como processos de separação por membranas e carbono ativado (pulverizado ou granular), apenas transferem a toxina de meio, o que implica na necessidade de um pós-tratamento do material contaminado antes da sua disposição final.

De forma a contornar essa situação, oxidantes comuns, tais como cloro, permanganato de potássio, ozônio, peróxido de hidrogênio e ferrato podem ser utilizados para degradar essa toxina. Além disso, outras formas de oxidação, compostas por processos oxidativos avançados (POAs), têm chamado atenção de diversos pesquisadores, devido a seus resultados promissores. Dentre estes os processos oxidativos avançados destaca-se o Fenton.

O processo Fenton ocorre através da decomposição do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) catalisado por íons ferrosos ( $\text{Fe}^{2+}$ ) em meio ácido gerando radicais hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ) sendo muito utilizado para oxidação de compostos orgânicos, tais como a toxina estudada.

Diversos são os parâmetros que podem afetar a oxidação de um composto qualquer pelo processo Fenton, como: pH, dosagem de oxidante, qualidade da água, complexidade dos compostos a serem tratados e competição na degradação com a matéria orgânica dissolvida. Todos essas variáveis podem causar um maior consumo de oxidante, assim como ineficiência do mesmo.

Contudo, a principal preocupação com a oxidação de qualquer substância, nesse caso a toxina MC-LR, é sua poluição secundária, caracterizada pela formação de subprodutos de oxidação de igual ou maior toxicidade do que o composto original. Com isto, diversos métodos são utilizados para elucidação (identificação) desses compostos, dentre eles a Espectrometria de massas (EM) que apresenta resultados favoráveis para o conhecimento das estruturas químicas.

Diante do exposto, devido a crescente probabilidade no aumento da concentração dessa toxina em recursos hídricos, caracterizado pelas as variáveis: mudanças climáticas, aumento na frequência de períodos secos e aumento no aporte de nutrientes. Nota-se a necessidade do conhecimento e elucidação dos subprodutos de oxidação de microcistina-LR em tratamento com o processo oxidativos avançados, mais precisamente no processo Fenton. Visto que a literatura especializada é escassa na identificação de subprodutos de oxidação de MC-LR com o processo de tratamento em questão.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a formação de subprodutos durante a oxidação de microcistina-LR em água tipo I (água ultrapura) com a utilização do processo Fenton.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Investigar quais são os principais intermediários de degradação em diferentes condições de pH, para o tratamento proposto;
- Avaliar os padrões de pico dos espectrogramas de massa para identificação dos subprodutos com o tempo de oxidação;
- Comparar os subprodutos obtidos com os citados em literatura especializada, e
- Elucidar a composição dos fragmentos de massa encontrados.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 *Corpos hídricos, secas, eutrofização e cianobactérias*

Devido à intensificação dos períodos secos causados pelas mudanças climáticas (IPCC, 2007; ELLIOTT, 2012; PAERL E PAUL, 2012; PAERL E SCOTT, 2010; LEHMAN *et al.*, 2017) combinadas com o aumento do aporte de nutrientes (fósforo e nitrogênio) em recursos hídricos (O'NEIL *et al.*, 2012; BRASIL *et al.*, 2017, ADWG,2011), alguns microrganismos fitoplânctons tendem a prevalecer em detrimento de outros neste meio, devido à sua capacidade de adaptação a essas novas condições.

As características trazidas para estes recursos hídricos pela seca, tais como: alterações nos padrões climáticos sazonais e anuais deste meio e mudanças nos períodos de residência evaporativo e hidráulico (aumentando, assim, a retenção de nutrientes), aumento da temperatura da água (apurada estratificação térmica vertical dos ecossistemas aquáticos) e aumento da salinização, favorecem o desenvolvimento de cianobactérias (BRASIL *et al.*, 2017; LEHMAN *et al.*, 2017 ;JOURNEY, BEAULIEU E BRADLEY, 2013) causando, dessa forma, as florações excessivas das mesmas.

Com todas as alterações citadas, estudos afirmam que as mudanças climáticas, principalmente o aumento de temperatura na água favorecem o aumento de florações de cianobactérias (LEHMAN *et al.*, 2017), aumento na produção de cepas tóxicas dos gêneros de *Microcystis spp.* (MOWE *et al.*, 2015) assim como o aumento na concentração da toxina extracelular MC, liberada pela espécie, *Planktothrix agardhii* (WALLS *et al.*, 2018).

#### 3.2 *Cianobactérias e cianotoxinas*

Como explicado no item 3.1, alguns organismos fitoplânctons tendem a prevalecer em detrimento de outros em ambientes de clima quente, seco e com alta concentração de nutrientes dissolvidos no meio. Dentre os principais organismos podemos citar as cianobactérias, microrganismos antigos, com vasta distribuição global. Elas foram responsáveis pela a criação de atmosfera aeróbica na Terra cerca de 2220 – 2400 milhões de anos atrás, via sua produção de oxigênio pela fotossíntese,

sendo ainda hoje uma das maiores agentes no ciclo biológico do carbono, nitrogênio e minerais. (CODD, MERILUOTO e METCALF, 2017; JIANG *et al.*, 2014).

De acordo com Castenholz (2015), as cianobactérias possuem características muito peculiares as quais são citadas a seguir:

Além de compartilhar os recursos celulares básicos de outras Bactérias, as cianobactérias possuem características únicas, distinguindo-as de todos os outros procariontes e encaixando-as ela no domínio *Bacteria*, dentre tais características pode-se citar: a parede celular em cianobactérias é do tipo Gram-negativo (mais espessa que o normal); A divisão celular na maioria das cianobactérias unicelulares, coloniais e algumas formas filamentosas é por fissão binária; Em relação ao exterior e motilidade celular, as fímbrias (ou pili) ocorrem abundantemente com padrões diversos em muitas cianobactérias, distinguindo-os de todos os outros procariontes, e por fim o fotossistema duplo que permite o uso de H<sub>2</sub>O como fotorredutor com a consequente liberação de O<sub>2</sub>, principal característica que a difere das demais bactérias.

Além disso as cianobactérias produzem uma variedade de metabólitos incomuns, com funções não claras, que provocam efeitos sobre a biota do meio onde se encontram (CHORUS e BARTMAN, 1999). Esses metabólitos incomuns são denominados de cianotoxinas, sendo um grupo diverso de toxinas naturais do ponto de vista químico como toxicológico. Cabe salientar que essas cianotoxinas podem ser tanto extracelulares como intracelulares dependendo da cianobactéria produtora.

As cianotoxinas dividem-se em três grandes grupos de estruturas químicas diferentes: peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos (CODD, MERILUOTO e METCALF, 2017). Estes grupos apresentam diversos gêneros produtores e modos de ação no corpo humano. Na Quadro 1 verifica-se as principais toxinas produzidas, suas estruturas químicas, os respectivos gêneros de cianobactérias produtoras e seus principais modos de ação no corpo humano, de forma a entender esse complexo grupo de metabólitos.

**Quadro 1:** Resumo de estruturas químicas, cianobactérias produtoras e modos de ação das principais cianotoxinas.

<b>Cianotoxina</b>	<b>Estrutura química</b>	<b>Cianobactérias produtora</b>	<b>Modos de ação</b>
<b>Microcistina</b>	Heptapeptídeo cíclico	<i>Microcystis, Anabena, Nostoc, Planktothrix, Phormidium, Oscillatoria, Radiocistina, Gleotrichia, Anabaenopsis,</i>	Hepatotoxina, causadora de tumores, inibição das proteínas eucarióticas

		<i>Rivularia, Tolypothrix, Hapalosiphon, Pleactonema,</i>	fosfatases PP1, PP2 e fosfoproteína fosfatases PP4 e PP5.
<b>Nodularina</b>	Pentapeptídeo cíclico	<i>Nodularia spumigema, Nostoc (simbiótico)</i>	Idem a microcistina, além de ser um carcinogênico fraco.
<b>Cilindropermopsina</b>	Guanidina tricíclico alcalóides	<i>Cilindrospermopsis, Umezakia, Anabaena, Oscilatória, Raphidiopsis, Aphanizomenon</i>	Múltipla toxicidade em órgãos, neurotóxico, genotóxico e inibidor na síntese de proteínas.
<b>Anatoxina-a</b>	Alcalóides bicíclicos	<i>Anabaena, Phormidium e Aphanizomenon</i>	Neurotóxico, liga-se competitivamente a receptores de acetilcolina.
<b>Anatoxina-a(S)</b>	Fosforilada cíclico N-hidroxi-guanina	<i>Anabaena</i>	Neurotóxico inibe acetilcolina esterase
<b>Saxitoxina</b>	Alcalóides	<i>Aphanizomenon, Anabaena, Lyngbya, Cilindrospermopsis, Planktothrix</i>	Neurotóxico, bloqueia canais de sódio.
<b>Lyngbyatoxinas, Aplysiatoxinas</b>	Alcalóides indólicos	<i>Lygbya, Oscillatoria e Schzothrix</i>	Causador de tumores, liga-se à proteína eucariótica proteína quinase C.
<b>BMAA, DAB</b>	Diaminoácidos	Muitos gêneros	Neurotóxico, desenvolvimento de toxinas e inserção errônea em proteínas
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeos	Todos os gêneros	Inflamatório, promoção de secreção de citocinas

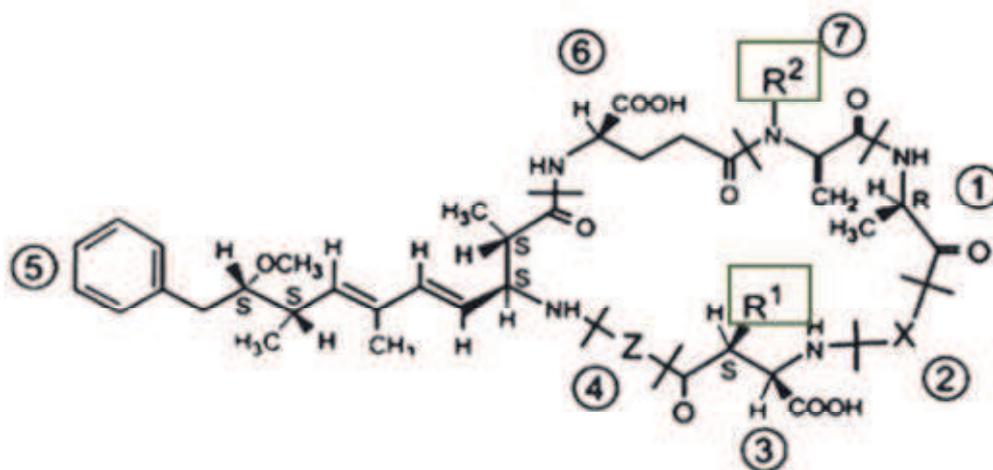
Fonte: *Adaptado de Meriluoto, Spoof e Codd (2017)*

### 3.3 Microcistina

Dentre todas as toxinas apresentadas, a MC é um peptídeo cíclico produzido não somente pelo gênero *Microcystis sp.*, atualmente o gênero mais cosmopolita das cianobactérias (van GREMBERGHE *et al.*, 2011; MOSLEY, 2015), como também por mais de vinte e três outros gêneros de cianobactérias e pelo menos quarenta e sete diferentes espécies, tais como *Anabaena spp.*, *Nostoc spp.*, *Planktothrix spp.* e *Cylindrospermopsis Raciborskii.* além da própria *Microcystis spp.* (SIVONEN e JONES, 1999). Dessa forma a distribuição global de cianobactérias produtoras de MC podem ser denotadas, o que representa a atual preocupação com essa toxina natural.

A MC um heptapeptídeo cíclico, com estrutura geral caracterizada por D-alanina<sup>1</sup>-X<sup>2</sup>-D-MeAsp<sup>3</sup>-Z<sup>4</sup>-Adda<sup>5</sup>-D-glutamato<sup>6</sup>-Mdha<sup>7</sup>, em que X e Z representam dois L-aminoácidos variáveis, D-MeAsp corresponde a D-eritro-β-metil ácido aspártico e Mdha equivale a Nmetildehidroalanina (Figura 1).

**Figura 1:** Estrutura química geral das microcistinas



Fonte: Chorus e Bartman (1999)

Com base no seu padrão de metilação e nos dois aminoácidos variáveis nas posições X e Z da estrutura apresentada, mais de 90 análogos estruturais já foram identificados (BORTOLI e VOLMER, 2014). A nomenclatura atual adotada para essa toxina baseia-se nas variações dos L-aminoácidos na posição X e Z das moléculas. Como exemplo, temos os análogos mais tóxicos destacando-se a MC – LR constituída

dos aminoácidos leucina e arginina; MC – LW com aminoácidos triptofano e arginina; MC–LF com aminoácidos leucina e fenilalanina (FAASSEN e LÜRLING, 2013; CATHERINE *et al.*, 2017).

A estrutura geral da MC é relativamente estável e hidrofílica (polar) (CATHERINE *et al.*, 2017), sendo facilmente solúvel em água, com solubilidade superior a 1 g.L<sup>-1</sup> permanecendo na fase aquosa, em vez de ser adsorvida em sedimentos ou em partículas suspensas. (RIVASSEAU, MARTINS E HENNION, 1998). Dessa forma, devido a sua alta solubilidade, implicações importantes pela sua persistência ambiental e exposição aos seres humanos em corpos hídricos podem ser apontadas.

A principal rota de exposição a essas hepatotoxinas provém do consumo de água contaminada (CHEN, SHEN, E FANG, 2013). No entanto, os relatos desse tipo de intoxicação, não estão bem documentados. Devido que os sintomas causados por hepatotoxinas em água potável se assemelham a várias outras doenças gastrointestinais ligadas a bactérias patogênicas ou a contaminação com metais pesados, seu diagnóstico é bastante complicado (FALCONER E HUMPAGE, 2005; GIANNUZZI *et al.*, 2011).

Outras vias de exposição à MC são através do consumo de águas subterrâneas, que possuem sistemas de recarga artificial no lençol freático de lagos contaminados (EYNARD, 2000), e em suplementos alimentares diversos (BRUNO *et al.*, 2006; VICHI *et al.*, 2012).

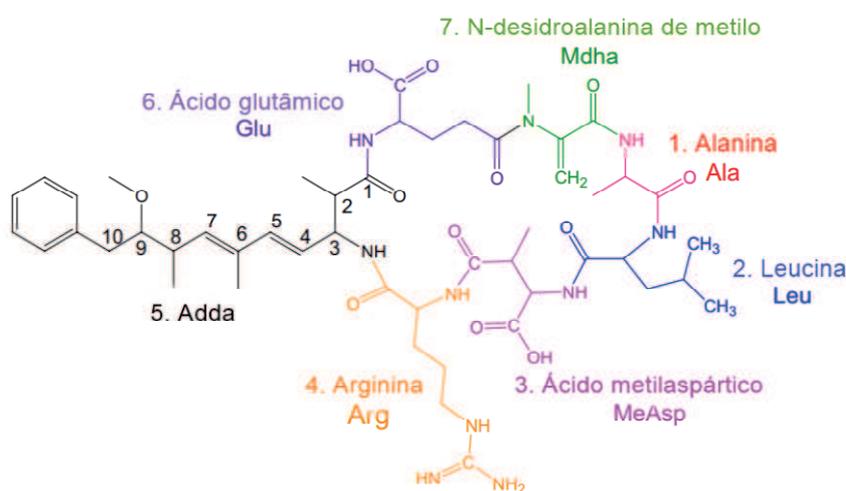
Numerosas intoxicações animais e humanas por MC já foram relatadas (HILBORN *et al.*, 2007; STEWART, SEAWRIGHT E SHAW 2008). A maioria foram limitadas a gastroenterite, mas quando a água contendo a toxina foi usada para hemodiálise, as MCs causaram a morte de 60 pacientes no Centro de diálise brasileiro de Caruaru em 1996 (YUAN *et al.*, 2006; AZEVEDO *et al.*, 1994).

Seus mecanismos de toxicidade são mediados através de sua forte ligação a enzimas celulares chaves, inibindo as proteínas eucarióticas fosfatases PP1, PP2 e fosfoproteína fosfatases PP4 e PP5 (CATHERINE *et al.*, 2017). Com essa inibição ocorre uma fosforilação aumentada de proteínas em células hepáticas, afetando vários processos tais como as vias metabólicas da síntese de glicogênio, a contratilidade celular, o transporte de membrana, secreção, divisão celular, tradução e transcrição gênica, ou seja ocorre a morte celular (DAWSON, 1998).

### 3.4 Microcistina-LR

Com estrutura química consistindo de três D-aminoácidos (Alanina (Ala<sub>1</sub>), ácido metilaspártico (MeAsp<sub>3</sub>), e ácido glutâmico (Glu<sub>6</sub>), dois aminoácidos incomuns (3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-trimetildeca-4,6- dienóico (Adda<sub>5</sub>) e N-desidroalanina de metilo (Mdha<sub>7</sub>)), e dois L-aminoácidos (leucina, Leu<sub>2</sub> e arginina, Arg<sub>4</sub>). A variante Microcistina-LR (MC-LR) é a mais estudada da família das MCs, sendo considerada a mais tóxica, salvo exceções anteriormente citadas no item 3.3 (FAASSEN e LÜRLING, 2013; CATHERINE *et al.*, 2017). Sua estrutura é representada na Figura 2.

**Figura 2:** Estrutura química da Microcistina-LR



Fonte: Adaptado de Antoniou *et al.*, (2010)

Da sua estrutura podemos destacar o grupo Adda como sendo um dos principais componentes para a atividade biológica, amplamente responsável pela toxicidade da molécula devido ao seu dieno conjugado (JIANG *et al.*, 2014; MOON *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2016).

A MC-LR é frequentemente detectada em águas superficiais, sendo extremamente estável em ambientes extremos, como alta temperatura ou baixo pH (ZHANG, 2016). Sua dose letal média (LD<sub>50</sub>) é de 122 µg.kg<sup>-1</sup> em ratos e o valor de ingestão diária tolerável (IDT) de 0.04 µg MC.kg<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup> para humanos (CHORUS E BARTMAN, 1999). Esses valores são utilizados de modo a estabelecer valores máximos permissíveis dessa toxina em água potável. Além disso, a MC-LR é classificada como um possível

carcinógeno para humanos (grupo 2B), de acordo com o Instituto Internacional do Câncer (IARC) (MOON *et al.*, 2017).

### 3.5 Legislação pertinente

Como a MC é uma potente hepatotoxina, o controle de seus níveis na água potável torna-se de grande importância. Com esse objetivo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e diversos países utilizam o valor máximo permissível de 1,0 µg.L<sup>-1</sup> de MC ou MC-LR. Canadá e Austrália, por outro lado, determinam 1,3 e 1,5 µg.L<sup>-1</sup>, respectivamente para a toxina (CHORUS AND BARTRAM, 1999; MEREL *et al.*, 2013; ZAMYADI *et al.*, 2015). A Tabela 2 apresenta os principais valores de concentração da MC/MC-LR nas normas específicas de cada país, além de comentários pertinentes das respectivas normas.

**Quadro 2:** Diretrizes ou padrões para toxinas de cianobactérias em água potável para vários países

País	Diretrizes	Comentários
<b>Austrália</b>	1.3 µg.L <sup>-1</sup> de microcistinas totais, expressas como equivalentes de toxicidade de microcistina-LR	E vedada a notificação inicial às autoridades de saúde quando os números de <i>M. Aeruginosa</i> atingirem 30% da densidade equivalente ao valor de orientação de 1,3 µg.L <sup>-1</sup> de microcistina (2.000 células.mL <sup>-1</sup> ; biovolume 0,2 mm <sup>3</sup> .L <sup>-1</sup> ), enquanto um alerta deve ser fornecido quando o número de células é equivalente ao valor da diretriz (6.500 células.mL <sup>-1</sup> ; biovolume 0,6 mm <sup>3</sup> .L <sup>-1</sup> )
<b>Brasil</b>	1.0 µg.L <sup>-1</sup> para microcistinas	Valores de referência para microcistinas, saxitoxinas e cilindrospermopsina, com programas de monitoramento de biomassa. Valor de referência para microcistinas adotadas como obrigatórias. Valores de referência para equivalentes de saxitoxinas e para cilindrospermopsina incluídos como recomendações. O uso de algicidas não é permitido. Testes de toxicidade / análise de cianotoxinas é necessário quando a contagem de células exceder 10.000 células.mL <sup>-1</sup> ou biovolume 1 mm <sup>3</sup> .L <sup>-1</sup> . (Anexo XX da Norma de Consolidação Nº 5 de 2017)
<b>Canadá</b>	1.5 µg.L <sup>-1</sup> toxinas de cianobactérias como microcistina-LR (MAC).	O Canadá usa diretrizes para seu padrão de qualidade das águas onde as mesmas são expressas como unidade de Concentração Máxima Aceitável (MAC). Estes são derivados da IDT, que por sua vez é derivada de um nível de efeito adverso não observado (NOAEL) calculado a partir de dados de estudos em humanos ou animais.

<b>China</b>	1 µg.L <sup>-1</sup> para microcistina-LR	Diretriz da OMS para microcistina-LR. (Codd <i>et al.</i> , 2005)
<b>Japão</b>	1 µg.L <sup>-1</sup> para microcistina-LR	Diretriz da OMS para microcistina-LR. (Codd <i>et al.</i> , 2005).
<b>África do Sul</b>	0-0.8 µg.L <sup>-1</sup> para microcistina-LR	Níveis de orientação para microcistinas em água potável como uma “faixa de qualidade da água alvo”.
<b>Espanha</b>	1 µg.L <sup>-1</sup> para microcistina	Legislação nacional, quantidade máxima permitida em água potável. (Codd <i>et al.</i> , 2005)
<b>Estados Unidos da América (EUA)</b>	Nenhuma diretriz atualmente	Atualmente, não existem diretrizes regulatórias federais para cianobactérias ou suas toxinas na água potável ou em águas de recreação nos EUA. Alguns estados norte-americanos estabelecem diretrizes de monitoramento de cianotoxinas e níveis de limiar de cianotoxinas. Adicionalmente, as cianobactérias e suas toxinas são listadas como contaminantes microbiológicos na lista de candidatos a contaminantes (CCL). Contaminantes no CCL são uma prioridade para a Agência de Proteção Ambiental dos EUA, com o objetivo de definição de sua toxicidade.
<b>Organização Mundial de Saúde</b>	1 µg.L <sup>-1</sup> for microcistina-LR	Organização Mundial de Saúde (2004)

Fonte: Adaptado de *Chorus e Bartman(1999); Codd et al., (2005)* e websites

### 3.6 Tecnologias de tratamento para remoção de cianotoxinas

Como MC é a toxina de maior preocupação na maioria das diretrizes atuais de qualidade de água ao redor do mundo, é necessário o uso de tecnologias modernas para o atendimento desses padrões normativos. É conhecido que os processos convencionais de tratamento de água, incluindo coagulação, floculação, sedimentação e cloração não são confiáveis (efetivos) para a remoção de MC. Assim, são necessários processos de tratamento adicionais para que seja garantido sua remoção.

O tratamento da MC extracelular é realizado em duas categorias: remoção física (carbono ativado e processos de separação por membranas) e remoção por degradação química (tecnologias avançadas de oxidação e oxidação fotocatalítica e química). Cada tratamento possui peculiaridades, as quais são discutidas a seguir.

Na remoção física, o carbono ativado é usado no tratamento de água com duas variedades: fixo em reatores de leito como carbono ativado granular (CAG) ou aplicado na forma de carbono ativado pulverizado (CAP) em diferentes pontos do processo de tratamento. Diversas são os materias e biomassas são utilizadas para

sua produção tais como: madeira, carvão, quitosana, argilas e zeólitas naturais (WORCH,2012), assim como endocarpo do coco e ossos. Possuindo processo de manufatura semelhante, se diferenciam na área superficial, pois o tamanho das partículas dos CAP está na faixa média do micrômetro, enquanto as partículas do CAG têm diâmetros na faixa inferior do milímetro. Na sua granulometria e sua área superficial de adsorção.

Dessa forma, em uma estação de tratamento de água, o CAP é aplicado de uma maneira tal que não pode ser economicamente recuperado do fluxo de tratamento de água, por isso é removido com os resíduos sólidos do processo formado parte dos lodos. O CAG por sua vez pode ser aplicado como meio em um filtrante, sendo que após sua exaustão, esse devem ser removidos do reator e possivelmente reativados (CHOWDHURY *et al.*,2013).

Esse tipo de tratamento apresenta algumas particularidades, como por exemplo: o CAG fica saturado com o tempo e, portanto, deve ser reativado ou substituído periodicamente. Enquanto que o CAP pode requerer altas dosagens, seguidos de extensos tempos de contato para que a adsorção do contaminante seja efetiva. Dessa forma aumentando assim, nos dois casos o custo de operação desse tipo de tratamento.

Além disso, o uso de carbono ativado também introduz problemas com adsorção competitiva de matéria orgânica (MO), a qual faz com que os sítios do adsorvente sejam preenchidos pela MO ficando obstruídos, não tendo mais espaço para adsorver o contaminante desejado, nesse caso a MC-LR (ZHANG *et al.*, 2016). Logo, infere-se que essas técnicas dispendiosas só funcionam como meios de transferência altamente custosos não pode eliminar os efeitos adversos causadas pela toxina MC-LR.

Por sua vez, os processos de membranas se baseiam na separação por um material que permite que alguns componentes físicos ou químicos passem mais facilmente através dela do que outros. O que passa por ela torna-se o permeado e aqueles que são rejeitados por ele formam o concentrado (JUDD, 2006). Os quatro principais processos de separação por membrana, nos quais a água forma o produto permeado, são: Osmose Inversa (OI), nanofiltração (NF), ultrafiltração (UF) e Microfiltração (MF), com tamanho de poros do menor para o maior.

Essas técnicas são altamente dispendiosas e também funcionam apenas como meios de transferência, não podendo eliminar os efeitos adversos da MC-LR. Diversos estudos utilizam esse tipo de tecnologia para tratamento (ŞENGÜL, ERSAN, TÜFEKÇI, 2018; CAMACHO, 2015), mas como esse método não realiza a eliminação da toxina, têm-se a formação de um concentrado de toxina, assim como a formação de uma torta contaminada, os quais necessitaram de um tratamento adicional, antes da sua destinação final.

No caso de remoção por degradação, ou seja, a partir da utilização de oxidantes ou processos de oxidação para degradação dessa toxina, a lista é considerada extensa. Diversos oxidantes comuns já foram avaliados, tais como: permanganato de potássio (JEONG *et al.*, 2017), ozônio (CHANG *et al.*, 2014), cloro (ZHANG *et al.*, 2016) e ferrato VI (JIANG *et al.*, 2014). Assim como processos oxidativos avançados (POAs), que são definidos como os processos de oxidação que envolvem a geração de radicais hidroxila (OH·) em quantidade suficiente para efetuar a purificação da água (DENG E ZHAO, 2015) sendo eles : TIO<sub>2</sub>/UV (LIU, LAWTON, E ROBERTSON, 2003; ANTONIOU *et al.*, 2008), UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ZONG, SUN e SUN, 2013; MOON *et al.*, 2017) e Fenton (PARK *et al.*, 2017; PARK *et al.*, 2018).

Com essa oxidação, procura-se a mineralização de moléculas de compostos poluentes, no caso estudado a MC-LR. Contudo nota-se, a impossibilidade da mineralização da toxina com utilização do processo, devido à estabilidade da molécula. Desta forma, a principal preocupação com oxidação desse composto é sua poluição secundária causada pelos seus fragmentos de oxidação, em outras palavras a formação de subprodutos de oxidação de igual ou maior toxicidade do que o composto original.

Para facilitar essa identificação, métodos tais como a espectrometria de massas (EM) podem ser empregados. A EM oferece notáveis melhorias de sensibilidade e seletividade em relação à detecção óptica e fragmentos de massa característicos, produzidos tanto por fonte quanto por fragmentação podendo ser usado para a identificação confiável de toxinas.

### **3.7 Espectrometria de massas**

Com o avanço das tecnologias, surgiram novas metodologias que permitem a elucidação de estruturas químicas antes desconhecidas, com alta capacidade de seletividade e confiabilidade dos resultados. A EM é um exemplo dessa evolução. Os compostos eletricamente carregados, ou íons, são selecionados e medidos de acordo com a razão massa e carga ( $m/z$ ), resultados da ação de campos elétricos ou magnéticos gerados na região do analisador do equipamento que, comumente, pode estar disposto em diferentes configurações. A EM é uma técnica capaz de identificar, de forma simultânea, os análogos da MC; além de seus fragmentos em amostras de água (KONDO *et al.*, 2002).

De acordo com Skoog *et al.* (2002), a Espectrometria de Massas, dentre todas as ferramentas analíticas disponíveis, seja talvez a de mais ampla aplicabilidade no sentido que a técnica é capaz de fornecer informação sobre: a composição elementar das amostras, as estruturas de moléculas inorgânicas, orgânicas e biológicas, a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas, a estrutura e a composição de superfícies sólidas, e sobre razões isotópicas de átomos nas amostras.

Num espectro de massas típico se obtém o eixo x indicando a razão  $m/z$  para os íons (para aqueles com carga simples, corresponde à massa do íon), no eixo y a altura do sinal indica a abundância relativa de do íon baseado no pico base (pico de maior intensidade).

Além disso, uma terceira informação é fornecida a intensidade do sinal. Que indica a capacidade do íon de ser dessorvido no equipamento, em outras palavras, a magnitude registrada no equipamento para determinado íon. Dessa forma, com as devidas curvas de calibração, a intensidade pode ser correlacionada com a concentração do analito em estudo na amostra.

### **3.8 Processo Fenton**

Descoberto pelo engenheiro químico Henry Jonh Horstman Fenton (1854-1929), o processo Fenton ocorre através da decomposição do peróxido de hidrogênio

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) catalisado por íons ferrosos (Fe<sup>2+</sup>) em meio ácido gerando radicais hidroxila (OH) (Equação 1) que tem potencial de oxidação de 2,8 V (BOKARE e CHOI, 2014).

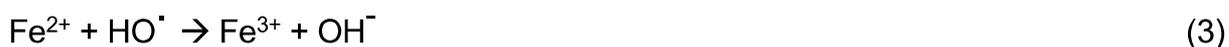


A radical hidroxila reage fortemente com a maioria das substâncias orgânicas através da abstração de hidrogênio ou da adição eletrofílica de ligações duplas. O radical peroxila pode também ser formado através da reação entre os radicais livres com o oxigênio molecular, dando início a uma sequência de reações de degradação oxidativa, que pode levar a completa mineralização do contaminante. O radical HO<sup>2-</sup> livre e sua conjugada O<sup>2-</sup> também contribuem para degradação dos compostos contaminantes, porém estes radicais apresentam reatividades menores do que os radicais livres (CHIRON *et al.*, 2000).

Várias reações secundárias podem ocorrer durante a reação Fenton. O íon férrico pode ser regenerado voltando ao ciclo através da redução do íon ferroso gerando também um radical hidroperoxila (HO<sub>2</sub>) e um próton (H<sup>+</sup>), (Equação 2)



Os íons ferrosos estão presentes como complexos em solução aquosa, em condições de baixo pH, na ausência de ligantes. A posição na série de potencial de oxidação do radical hidroxila é inferior apenas ao flúor (TEIXEIRA e ROSA., 2005). A reação de oxidação do íon férrico com a radical hidroxila produz íon ferroso e um íon hidroxila como mostra a equação 3.



O peróxido de hidrogênio pode ser produzido voltando ao ciclo através da reação entre dois radicais hidroxila (Equação 4).



Quando o peróxido de hidrogênio está em concentrações altas pode reagir com a radical hidroxila produzindo água e radical hidroperoxila causando efeito negativo na degradação dos poluentes (GULKAYA, SURUCU e DILEK, 2006) (Equação 5).



O pH é um parâmetro relevante na reação Fenton, por estar diretamente relacionado com a velocidade de degradação de compostos orgânicos. O valor do pH eficiente na degradação de compostos orgânicos situa-se entre 2,5 e 3,0 (BOKARE e CHOI 2014). Valores de pH acima de 3,0 contribuem para a formação de precipitado de  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  diminuindo drasticamente sua interação com peróxido de hidrogênio é conseqüentemente, a produção de  $\text{OH}^\cdot$  (YOON, LEE e KANG 2002). Em solução alcalina (pH 11) a radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio reagem para formar um óxido e um íon de peróxido de hidrogênio reagem para formar um óxido e um íon peróxido (AHMAD *et al.*, 2015).

### **3.9 Subprodutos de oxidação da MC-LR - Estado da Arte**

Com a oxidação da molécula de MC-LR, ocorre a poluição secundária devido aos fragmentos de molécula ali presentes, que possuem igual, maior ou não toxicidade do composto original. Dessa forma, com a utilização de técnicas como espectrometria de massas, é possível determinar quais são os possíveis subprodutos gerados, pois com a composição elementar do fragmento é possível elucidar como ocorreu sua oxidação.

Diversos estudos utilizando oxidantes comuns ou POAs já elencaram os possíveis subprodutos gerados nas suas reações de oxidação. Nota-se que variáveis como o tipo de oxidante, pH do meio, água matriz e dosagem de oxidante podem influenciar os tipos de intermediários de oxidação de MC-LR gerados, além do favorecimento para uma rota de reação em detrimento de outra.

Na aplicação de ozônio na oxidação de MC-LR Miao *et al.* (2010) investigaram os intermediários de ozonização em meio neutro (pH 7,0). Os autores isolaram quatro principais intermediários (pesos moleculares (MW): 795, 811, 835 e 1029) resultantes

da principal via de degradação da di-hidroilação e clivagens oxidativas das ligações dieno na cadeia lateral de Adda. Por sua vez, Chang *et al.* (2014) avaliaram os fragmentos em pH 6,0, além de obter os mesmos intermediários de reação de Miao *et al.* (2010), obtiveram as novas massas m/z 815,4; 827,3; 853,3 e 855,3. Eles afirmaram que as estruturas intermediárias demonstraram que o ozônio reagiu com dois sítios de MC-LR: as ligações dieno na cadeia lateral de Adda e o aminoácido Mdha na estrutura cíclica.

Por sua vez na aplicação de permanganato de potássio para avaliação de subprodutos de oxidação, Jeong *et al.* (2017) reportaram a formação de íons de m/z 795,4042; 1065,5463; 1027,5463; 1045,5579; 1015,5450. Eles propuseram quatro locais para a reação de oxidação em MC-LR, ou seja, o dieno e o anel aromático da Adda, o resíduo Mdha e as ligações amida. Com o oxidante emergente Ferrato, Jiang *et al.* (2014) em água deionizada em pH alcalino (8,0) obtiveram os seguintes fragmentos de massa 1011,5510; 1027,5459 e 1043,5408.

Para processos oxidativos avançados utilizando UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Moon *et al.* (2017) trabalhando em meio neutro com água deionizada reportaram onze subprodutos no processo de oxidação, com massas de m/z: 707,4; 414,7; 429,3; 445,3; 608,6; 1052,0; 313,4; 823,6; 357,3; 245,2 e 805,7. Em comparação Zong *et al.* (2013), elucidaram as seguintes massas m/z 162,3743; 301,6345; 447,3930; 580,1612; 835,4306; 1011,5509; 1029,5615.

Em experimentos utilizando TiO<sub>2</sub> imobilizado em placas de vidro e de ferro (pH neutro) Antoniou *et al.*<sup>b</sup>, (2008), reportaram que os resultados indicaram que a degradação de MC-LR é iniciada em quatro locais da toxina; três no aminoácido Adda (anel aromático, grupo metoxi e ligações duplas conjugadas) e uma sobre a estrutura cíclica (Mdha aminoácido). Os intermediários apresentados nesse estudo com maiores m / z foram 1011,5; 1029,5; 1063,5. Por sua vez Antoniou *et al.*, (2008) TiO<sub>2</sub>/UV com o titânio imobilizado em placas de ferro e pH de 5,7. Onze novos m/z foram observados nas suas amostras, sendo os intermediários 1011,5 e 1029,5, mais representativos representando a substituição de hidroxila e a adição de ligações insaturadas de MC-LR, respectivamente.

Por fim, para a oxidação por meio do processo Fenton, os intermediários de degradação de MC-LR foram primeiramente reportados por Park *et al.* (2017) como m/z 1029,5; 1011,5; 835,5; 795,4 e 783,4, associados à ligação dieno na cadeia Adda.

A radical hidroxila é o oxidante predominante no processo de Fenton, e geralmente reage através de três tipos de vias concorrentes: adição de hidroxila, abstração de hidrogênio e abstração de elétron.

Logo, pelo apresentado, observa-se a diversidade de fragmentos de moléculas gerados nos tratamentos pela via de oxidação da MC-LR. Notando-se uma não constância de valores de massa/carga para as mesmas, pois os fragmentos de moléculas não se comportam de maneira constante. Com isto, são necessários maiores estudos na determinação dos parâmetros que influenciam a formação de um certo subproduto em detrimento de outro numa reação de oxidação.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes utilizados

Peróxido de hidrogênio 35%, sulfato de ferro II heptahidratado P.A., hidróxido de sódio micro pérola P.A., metanol P.A., ácido acético (Neon Comercial, Brasil) e ácido sulfúrico P.A. (PanReac ITW Companies, Alemanha). Todas as soluções foram preparadas em água tipo I (água ultrapura), e todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

### 4.2 Cultivo da cianobactéria

Culturas de uma cepa *M. aeruginosa* (World Data Center for Microorganisms 835) foi fornecida pelo Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos, SP, Brasil). O cultivo celular foi realizado na Estação Experimental de Tratamento Biológico do Esgotamento Sanitário (EXTRABES), empresa associada à Universidade Estadual da Paraíba e à Companhia de Água e Esgoto da Paraíba (Campina Grande, PB, Brasil).

As células da cianobactéria foram incubadas em tubos de ensaio replicados (20 mL) ou seja frascos cônicos (500 mL) contendo meio ASM-1 líquido (pH  $8,0 \pm 0,1$ ), e mantidos à temperatura ambiente ( $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ), sob fotoperíodo de 12 horas com intensidade de luz de aproximadamente 1200 lx fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40 W e com agitação diária (MOREIRA, BIANCHINI e VIEIRA, 2011).

O crescimento das culturas cianobactérias foi monitorado por contagem de células com o auxílio de um microscópio invertido. Culturas de células na fase de crescimento exponencial (densidade celular  $10^6$  cél.mL<sup>-1</sup>) foram concentradas por centrifugação a 3500 rpm por 15 min, e o sobrenadante foi descartado. O material peletizado foi submetido a três ciclos de lise de congelamento / descongelamento para liberação da microcistina-LR no meio de cultura (LAWRENCE, NIEDZWIADK e MENARD, 2005); BROOKE *et al.* 2006; CAPELO-NETO e BUARQUE 2016).

A concentração de microcistina-LR nos extratos livres de células foi determinada por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando um kit comercial (Beacon

Analytical Systems Inc., Saco, ME, EUA) e uma Thermoplate (São Paulo, SP, Brasil) leitor TP. O limite de detecção da microcistina-LR foi de  $0,16 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Todas as vidrarias e ferramentas usadas nas manipulações foram previamente esterilizadas sob luz ultravioleta.

#### **4.3 Extração, concentração e semipurificação da MC-LR**

O procedimento de extração e semipurificação da MC-LR foi realizado em 3 etapas sequenciais, usando-se a cultura previamente lisada:

- **Centrifugação:** utilizou-se para a separação na cultura previamente lisada, da parte sólida (extrato) da líquida, que é conservada. Neste procedimento uma centrífuga marca Fanem - modelo 206 foi empregada, com rotação de 3.500 rpm e tempo de centrifugação de 10 min.
- **Filtração:** a filtração é utilizada para a separação da cultura, ou líquido obtido na centrifugação dos fragmentos das células lisadas. A filtração é realizada em membrana de poliacetato de celulose atóxico com diâmetro de poros  $0,45 \mu\text{m}$ , como objetivo de remover os fragmentos das células lisadas.
- **Semipurificação:** trata-se de uma semipurificação/concentração da solução do material lisado obtido após a filtração, utilizando cartucho de extração em fase sólida C18 (SPF) da marca Sys Croma. O procedimento consistiu em fazer fluir esse material através da fase sólida. Para isso foram utilizados se usam 150 mL de material lisado e filtrado, um manifolde e o cartucho C18. O cartucho é previamente condicionado por lavagem com 6 mL de solução de metanol e 6 mL de água deionizada. As moléculas de microcistina ficaram adsorvidas no cartucho C18 (ou fase sólida), e para provocar sua eluição o cartucho foi novamente lavado com 6mL da solução de metanol, mas acidificada com 0,1% de ácido acético.

Após de extração, concentração e semipurificação da cultura lisada contendo a toxina MC-LR, a mesma foi quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a um Espectrômetro de Massas (CLAE/EM).

#### 4.4 Água de estudo

A água de estudo utilizada para os experimentos, foi água tipo I (água ultrapura) contaminada com a microcistina-LR semipurificada com concentrações de aproximadamente  $3 \mu\text{g.L}^{-1}$

A concentração inicial de toxina escolhida foi um pouco maior que a dos critérios estabelecidos pelas normas para qualidade de água, que variam de 1,0 a 1,5  $\text{mg.L}^{-1}$  de MC, pois procurou-se mimetizar a contaminação em níveis coerentes com aqueles encontrados tipicamente numa floração com cepas tóxicas produtoras de microcistina em recursos hídricos.

#### 4.5 Experimento de oxidação e tratamento de amostras

Os experimentos de oxidação foram realizados em um homogeneizador de soluções- KACIO. Onde o pH no procedimento experimental foi controlado com a adição de soluções de  $0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$  ou  $0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ NaOH}$ , para atingir o pH requerido para cada experimento antes da adição do oxidante, os quais foram pH 3, 5, 7 e 9.

A reação Fenton foi iniciada pela introdução de uma dose pré-determinada de  $\text{H}_2\text{O}_2$  combinado com uma solução de  $\text{Fe}^{2+}$ , as quais foram utilizadas  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  para ambos utilizando como parâmetro a remoção obtida por Park et. al. (2017), sendo o reagente em excesso nesse tratamento o peróxido de hidrogênio. A reação foi realizada o em tubos Falcon individuais com 15 mL de água de estudo, com rotação constante durante o período de oxidação, realizado em bancada do laboratório com a presença de radiação natural.

Para cada pH escolhido (pH 3, 5, 7 e 9) foi realizado o procedimento com tempo total de oxidação de 80 minutos. Amostras retiradas para a avaliação da formação de subprodutos durante os experimentos tiveram o processo de oxidação imediatamente interrompidos de acordo com a literatura específica. Em outras palavras, as amostras com  $\text{pH} < 8$  no final da oxidação foram tratadas com NaOH, imediatamente após a coleta, a fim de aumentar o pH e interromper o processo de oxidação, precipitando o ferro presente na amostra. (LOPES *et al.*, 2017). Após a interrupção da oxidação as

amostras foram submetidas a centrifugação (3.500 rpm por 10 min.) e mantidas no escuro antes de qualquer análise posterior.

Amostras de 2mL foram coletadas em frascos para análise imediata dos subprodutos após 0, 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 e 80 min de oxidação utilizando-se um espectrômetro de massas.

#### **4.6 Subprodutos da oxidação de Microcistina-LR**

Subprodutos da degradação de Microcistina-LR foram identificados pelos seus padrões de fragmentação, sendo eles monitorados por um Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA) Espectrômetro de massas de captosres iônicos LCQ Fleet™, equipado com uma fonte de íons Ion Max e sonda de ionização por eletrospray (SIE) controlada pelo software Xcalibur.

A tensão de pulverização do SIE foi ajustada em 5 kV para ionização positiva, e o sistema foi operado no modo específico de monitoramento de íons para melhor seletividade. A faixa de varredura foi de 600 a 1100 m/z, pois foram utilizadas informações presentes na literatura especializada (PARK *et al.*, 2017; PARK *et al.*, 2018); a temperatura do capilar de transferência iônica foi estabelecida em 350 °C; e os controles de gás de bainha, gás auxiliar e gás de arrasto foram ajustados em 30, 10 e 0 (unidades arbitrárias), respectivamente.

Cada amostra foi injetada com duração de 7 min com vazão de 8µL.min<sup>-1</sup>, sendo 3 min utilizado para estabilização da mesma no equipamento e os próximos 4 min para obtenção da média de 350 espectrograma de massas, os quais foram utilizados para análise posterior.

#### **4.7 Análise de subprodutos em função de tempo**

Para facilitar as análises dos fragmentos em função do tempo foi realizado uma pré-seleção dos dados, filtrando somente aqueles que possuíam persistência, ou seja, estavam presentes nos espectrogramas de massas durante os 80min de tratamento com abundância relativa superior a 60%. Desta maneira, com a pré-seleção estabelecida, os dados de intensidade registrados no equipamento puderam ser

plotados ao decorrer do tempo de oxidação com auxílio do Minitab® 17, para posterior avaliação dos padrões de pico.

#### **4.8 Elucidação de fragmentos**

Após a seleção das principais massas persistentes nos tratamentos, a estrutura molecular dos fragmentos foram elucidadas utilizando-se da literatura especializada (item 3.7) e o auxílio do software específico.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

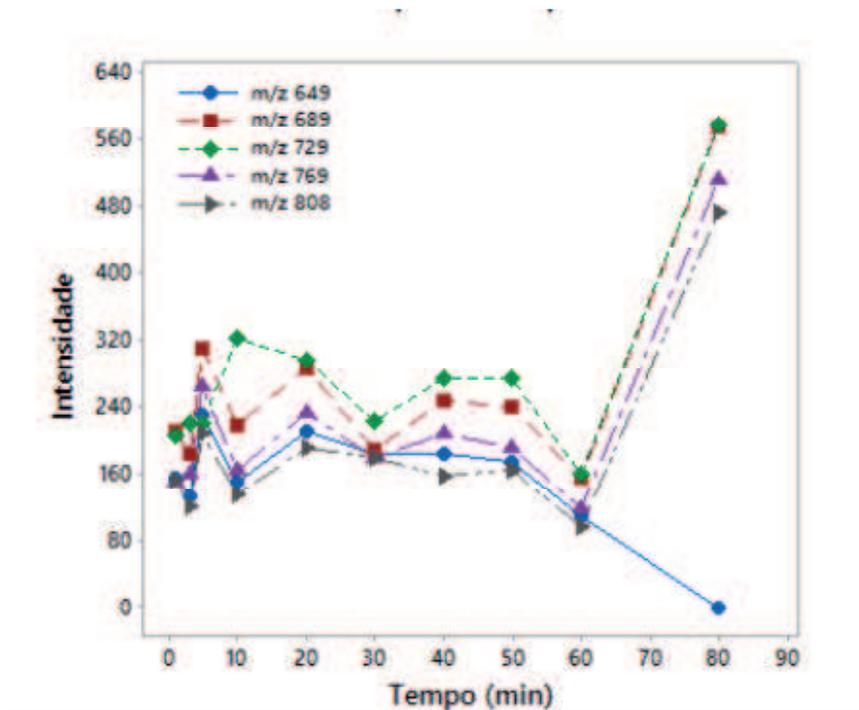
A seguir são apresentados os resultados referentes à análise da formação de subprodutos durante a oxidação de microcistina-LR em água tipo I (água ultrapura) com a utilização do processo Fenton em função do tempo, além da elucidação, das estruturas moleculares dos fragmentos de massas persistentes nos tratamentos.

Como esclarecido anteriormente (item 4.6), o EM foi operado na faixa de varredura entre 600 a 1100 m/z, pois objetivou-se identificar as possíveis moléculas-fragmentos que não possuíam o grupo Adda a elas conectado, não dando atenção ao fragmento Adda em si, ou fragmentos com menor massa molecular que poderiam vir a afetar os resultados. De modo a eliminar a interferência causado por massas de menor intensidade no espectrograma de massa foi estipulado filtros citados no item 4.7. Os gráficos foram representados com a intensidade registrada pelo equipamento para o analito (molécula-fragmento) em questão em função do tempo.

Observou-se que 5 fragmentos apresentam constância em todos os tratamentos propostos, mudando somente em isômeros e intensidade em todos os pHs. As principais massas que foram persistentes em todos os tratamentos foram m/z: 649 (C<sub>24</sub>H<sub>39</sub>N<sub>7</sub>O<sub>14</sub>), 689 (C<sub>28</sub>H<sub>45</sub>N<sub>7</sub>O<sub>13</sub>), 729 (C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>N<sub>10</sub>O<sub>12</sub>), 769 (C<sub>33</sub>H<sub>56</sub>N<sub>10</sub>O<sub>11</sub>), 808 (C<sub>35</sub>H<sub>56</sub>N<sub>10</sub>O<sub>12</sub>) com cálculo de fórmulas químicas aproximadas. Quando os fragmentos elucidados foram comparados com os fragmentos de massas expostos no item 3.9, verificou-se a não semelhança com nenhuma massa ali apresentada. Desta forma adotaram-se as informações ali presentes para facilitar a elucidação das estruturas atômicas.

No primeiro tratamento, utilizando o pH 3,0 (Figura 3), notou-se valores elevados de intensidade, o que denota uma maior degradação da toxina. Além disso, ocorreu persistência dos subprodutos no decorrer do tratamento entre 20 a 40 min, com posterior ascensão na sua intensidade. Isso denota que pH ácido, possui melhor efetividade no processo oxidativo utilizando o Fenton e concorda com a literatura especializada (CHANG, *et al.*, 2008, PARK *et al.*, 2017). Provavelmente porque o tempo de vida do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é altamente afetado pelo pH, e a condição ácida entre 3 e 5 é preferida. Além disso, o pH em uma faixa ácida impede que o ferro dissolvido precipite (JUNG *et al.*, 2009).

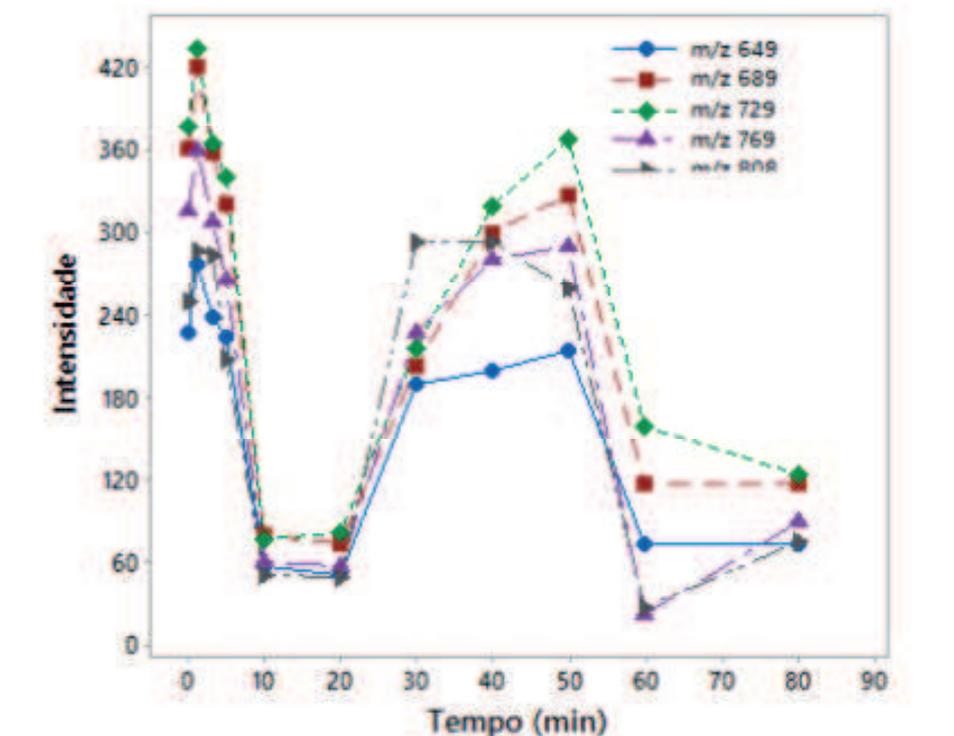
**Figura 3:** Fragmentos de oxidação em função do tempo para o pH 3,0



Fonte: Autor (2018)

O pH 5,0 (Figura 4), também apresentou valores elevados de intensidade, o que denota uma maior degradação da toxina. Porém nos primeiros 5 minutos de oxidação ocorreu a maior formação das massas citadas, inferindo-se uma degradação rápida da toxina, notada também por Al Monani, Smith e El-Din (2008). Aos 80 min todas as massas diminuíram de intensidade, o que pode ser explicado da seguinte maneira, as moléculas-fragmentos continuaram o processo de oxidação diminuindo assim suas massas, e conseqüentemente a intensidade dos fragmentos alvos estudados. Isso reafirma que o pH ácido, possui melhor efetividade no processo oxidativo avançado Fenton (CHANG, *et al.*, 2008, PARK *et al.*, 2017). Além disso, que o pH 5,0 possui uma taxa de degradação mais rápida quando comparado com o pH 3,0, devido a intensidade apresentada nos primeiros 5 minutos de oxidação.

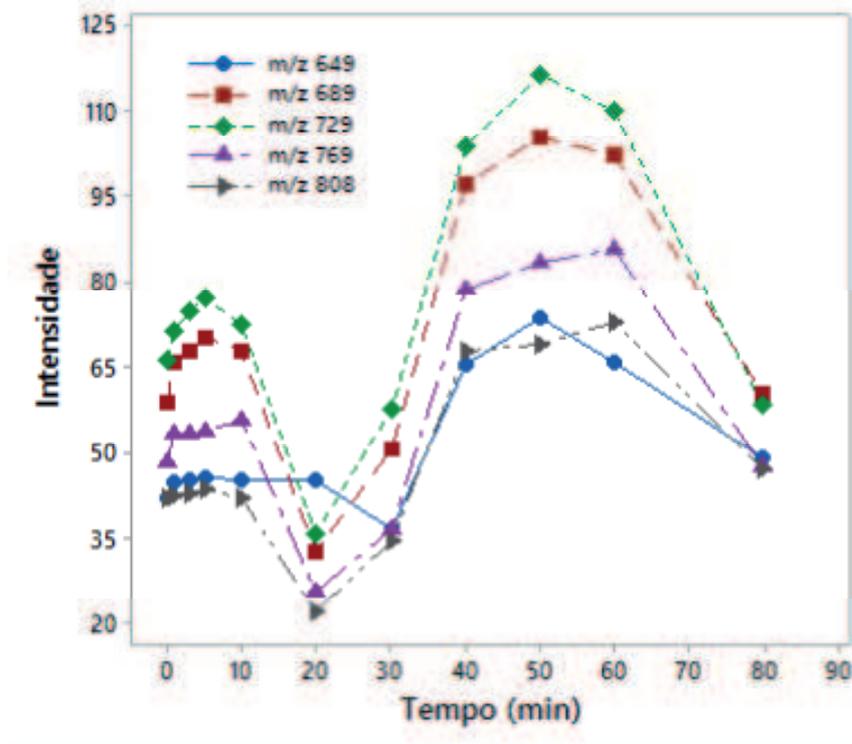
**Figura 4:** Fragmentos de oxidação em função do tempo para o pH 5,0



Fonte: Autor (2018)

Em pH 7,0 (Figura 5), diferentemente dos tratamentos anteriores, as intensidades diminuíram, o que denota menor degradação da toxina presente na amostra. Entre 0 e 20 min as moléculas-fragmentos foram geradas através da oxidação da MC-LR e continuaram o processo de oxidação diminuindo assim suas massas, e conseqüentemente a intensidade dos fragmentos alvos estudados. Pode-se notar comportamento semelhante entre 40-60 min, uma rápida ascensão seguida de um declínio que possuem a mesma explicação anterior.

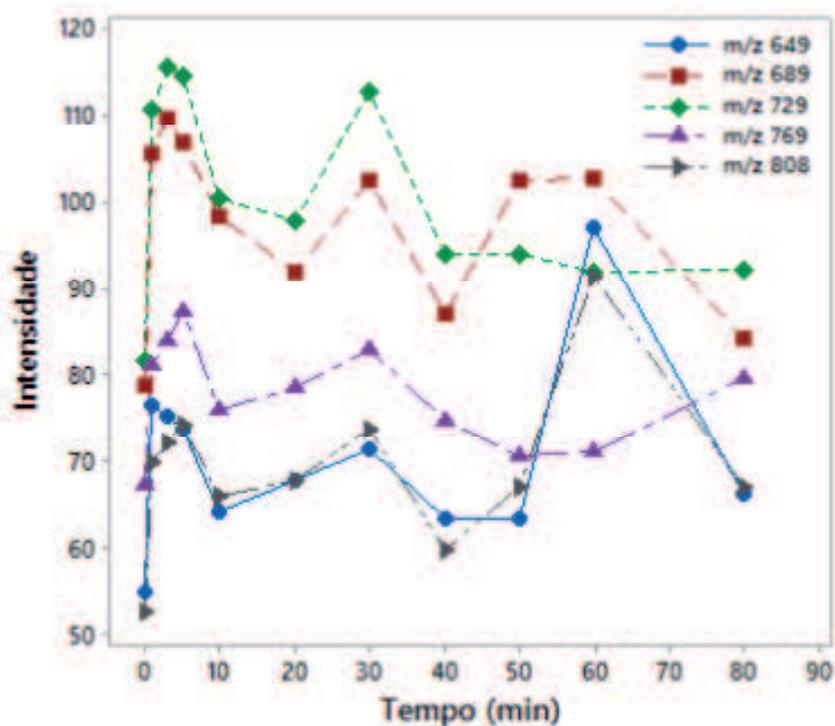
**Figura 5:** Fragmentos de oxidação em função do tempo para o pH 7,0



Fonte: Autor (2018)

Por fim, no pH 9,0 (Figura 6) as intensidades continuaram baixas como no pH 7,0 o que denota uma menor degradação da toxina presente, os fragmentos de massa apresentaram comportamento oscilatório com rápida ascensão seguida de declínio. Esses resultados denotam intervalos na oxidação, em outras palavras, a MC-LR oxidava e os fragmentos alvos eram formados e depois oxidados em massas menores.

**Figura 6:** Fragmentos de oxidação em função do tempo para o pH 9,0



Fonte: Autor (2018)

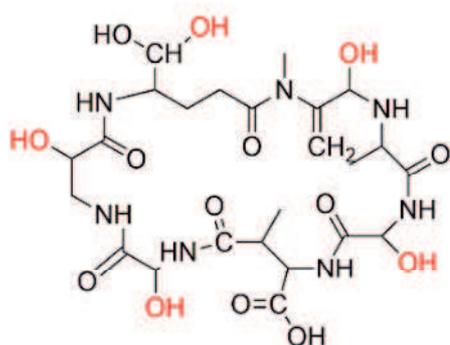
Em ambos os pHs (7,0 e 9,0) os comportamentos das baixas intensidades, podem ser explicados porque em pH maior que 6,0, a geração de radical hidroxila é mais lenta devido à formação de complexos de hidrocarbonetos férricos (TEKIN, 2006), diminuindo assim as espécies de ferro livre em solução, inibindo a regeneração de  $Fe^{2+}$ . Adicionalmente, o potencial de oxidação do radical hidroxila diminui com o aumento do pH (GOGATE E PANDIT, 2004). Podendo causar a precipitação do ferro ali existente.

Como explicado anteriormente foram elucidadas 5 estruturas dos principais fragmentos de oxidação persistentes em todos os tratamentos propostos nessa pesquisa, sendo eles os fragmentos de m/z: 649, 689, 729, 769, 808. Pela análise das estruturas notou-se que o principal meio de oxidação obedeceu a literatura especializada (PARK *et al.*, 2018), onde a radical hidroxila foi o oxidante predominante no processo de Fenton. Suas reações de oxidação tiveram mesmo comportamento de Park *et al.* (2017) onde a reação de oxidação ocorreu em três tipos de vias concorrentes: adição de hidroxila, abstração de hidrogênio e abstração de elétron.

Logo foi observado que os radicais hidroxila induziram na MC-LR nos tratamentos propostos predominantemente a oxidação através do grupo Adda, o que resulta na perda de atividade biológica da molécula, principalmente na sua ligação dieno conjugada, deixando ou não um fragmento. Além de outras vias de oxidação, foram: a dupla ligação Mdha e as cadeias dos peptídeos Leucina e Arginina. Notou-se também que em todos os subprodutos estudados a estrutura cíclica da MC-LR ficou intacta, o que também foi afirmado por Albuquerque (2017) em seus subprodutos no processo Fenton.

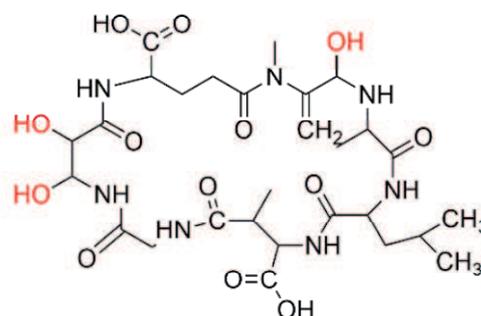
Para as massas 629 ( $C_{24}H_{39}N_7O_{14}$ ) e 689 ( $C_{28}H_{45}N_7O_{13}$ ) representadas na figura 7a) e 7b), respectivamente, observou-se a quebra da estrutura Adda sem deixar nenhum fragmento, o grupo Mdha teve sua dupla ligação modificada, além disso as estruturas leucina e arginina para a massa 649 e apenas leucina para a massa 689, também foram modificadas, ocorrendo a adições de hidroxila em ambas estruturas para atingir a massa desejada.

**Figura 7:** Estrutura química dos fragmentos de oxidação a) m/z 649 e b) m/z 689



Fórmula Química:  $C_{24}H_{39}N_7O_{14}$   
 Massa Aproximada: 649,0

(a)



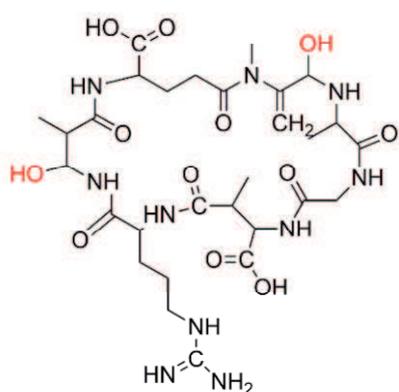
Fórmula Química:  $C_{28}H_{45}N_7O_{13}$   
 Massa Aproximada: 689,0

(b)

Fonte: Autor (2018)

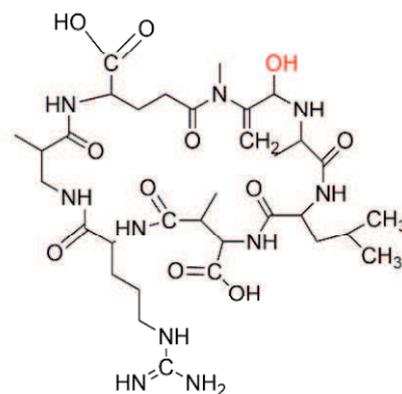
Para as massas 729 ( $C_{29}H_{48}N_{10}O_{12}$ ) e 769 ( $C_{33}H_{56}N_{10}O_{11}$ ) representadas na Figura 8a) e 8b), respectivamente, observou-se a quebra da estrutura Adda sem deixar nenhum fragmento do mesmo, além disso a estrutura leucina foi modificada (729) além de ocorrer a adição de hidroxila no grupo Mdha em ambas.

**Figura 8:** Estrutura química dos fragmentos de oxidação a) m/z 729 e b) m/z 789



Fórmula Química:  $C_{29}H_{48}N_{10}O_{12}$   
Massa Aproximada: 729,0

(a)



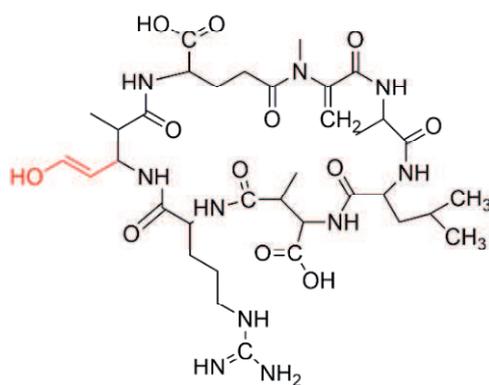
Fórmula Química:  $C_{33}H_{56}N_{10}O_{11}$   
Massa Aproximada: 769,0

(b)

Fonte: Autor (2018)

Para a massa 808 ( $C_{35}H_{56}N_{10}O_{12}$ ), representadas na Figura 8, respectivamente, observou-se a quebra da estrutura ADDA deixando um fragmento da mesma, onde ocorreu a adição de uma hidroxila.

**Figura 9:** Estrutura química do fragmento de oxidação m/z 808



Fórmula Química:  $C_{35}H_{56}N_{10}O_{12}$   
Massa Aproximada: 808,0

Fonte: Autor (2018)

## 6 CONCLUSÃO

Com a investigação dos principais intermediários de degradação em diferentes condições de pH durante a oxidação de microcistina-LR em água tipo I (água ultrapura) com a utilização do processo Fenton notou-se que pHs ácidos (3 e 5) possuem maior taxa de degradação da toxina. Adicionalmente, foram elucidados 5 fragmentos de oxidação os quais foram m/z: 649 ( $C_{24}H_{39}N_7O_{14}$ ), 689 ( $C_{28}H_{45}N_7O_{13}$ ), 729 ( $C_{29}H_{48}N_{10}O_{12}$ ), 769 ( $C_{33}H_{56}N_{10}O_{11}$ ), 808 ( $C_{35}H_{56}N_{10}O_{12}$ ) com cálculo de fórmulas químicas aproximadas. No tratamento proposto os radicais hidroxila induziram a reação de oxidação em três vias concorrentes: adição de hidroxila, abstração de hidrogênio e abstração de elétron. MC-LR foi oxidada através da quebra do grupo Adda, o que resulta na perda de atividade biológica da molécula, comprovando dessa forma a efetividade do tratamento Fenton. Além disso outras vias de oxidação, tais como: a dupla ligação da Mdha e as cadeias dos peptídeos Leucina e Arginina foram notadas. Em todos os subprodutos estudados a estrutura cíclica da MC-LR ficou intacta. Para próximos trabalhos recomenda-se a utilização de substâncias padrões de MC-LR para contaminação da água de estudo, repetição de experimentos para avaliação estatística das moléculas-fragmentos existentes, elucidção das rotas de reação dos fragmentos formados, avaliação da formação de fragmentos em outras matrizes (águas de reservatórios) e purificação dos subprodutos para análises de biotoxicidade.

## REFERÊNCIAS

AHMAD M; ASGHAR A; RAMAN, A.A.A.; DAUD, W.M.A.W (2015) Enhancement of Treatment Efficiency of Recalcitrant Wastewater Containing Textile Dyes Using a Newly Developed Iron Zeolite Socony Mobil-5 Heterogeneous Catalyst. **PLOS ONE** v.10(10): p. e0141348, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141348>.

AL MONANI, F.; SMITH, D. W.; EL-DIN, M. G. Degradation of cyanobacteria toxin by advanced oxidation processes, **Journal of Hazardous Materials**,v.150(2), p. 238-249, 2008, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.04.087>.

ALBUQUERQUE, M. V. da C. Avaliação da degradação de microcistina-LR no tratamento de água de abastecimento em sistema convencional seguido de Processo Oxidativo Avançado (POA). **Dissertação Mestrado** em Ciência e Tecnologia Ambiental), 2017.

ANTONIOU, M. G.; SHOEMAKER, J. A.; de la CRUZ, A. A.; DIONYSIOU, D. D. LC/MS/MS structure elucidation of reaction intermediates formed during the TiO<sub>2</sub> photocatalysis of microcystin-LR. **Toxicon**, v.51(6), p. 1103-1118, 2008, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.01.018> .

ANTONIOU<sup>b</sup>, M. G.; SHOEMAKER, J. A.; de la CRUZ, A. A.; DIONYSIOU, D. D. Unveiling New Degradation Intermediates/Pathways from the Photocatalytic Degradation of Microcystin-LR. **Environmental Science & Technology**, v. 42(23), p. 8877-8883, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1021/es801637z> .

AZEVEDO S.M.F.O; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W.; NAMIKOSHI, M. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystins aeruginosa*. **Journal of Applied Phycology** v.6: p.261-265, 1994. DOI : <https://doi.org/10.1007/BF02181936>

BOKARE , A. D.; CHOI, W. Review of iron-free Fenton-like systems for activating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in advanced oxidation processes, **Journal of Hazardous Materials**, v. 275, p.121-135, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.04.054>.

BORTOLI, S.; VOLMER, D., 2014. Characterization and identification of microcystins by mass spectrometry. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 20, p. 1-19, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1255/ejms.1250>

BRASIL, J.; ATTAYDE, J.L.; VASCONCELOS, F.R.; DANTAS, D. D. F.; HUSZAR, V. L. M. Drought-induced water-level reduction favors cyanobacteria blooms in tropical shallow lakes, **Hydrobiologia** v.770: p.145, 2016. DOI <https://doi.org/10.1007/s10750-015-2578-5>.

BROOKE, S.; NEWCOMBE, G.; NICHOLSON, B.; KLASS, G.. Decrease in toxicity of microcystins LA and LR in drinking water by ozonation. **Toxicon**, 48, 1054–1059,2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.08.010>

BRUNO, M.; FIORI, M.; MATTEI, D.; MELCHIORRE, S; MESSINEO, V; VOLPI, F; BOGIALLI, S; NAZZARI, M. ELISA and LC-MS/MS methods for determining cyanobacterial toxins in blue-green algae food supplements. **Natural Product**

**Research**, v. 20 (9), p. 827–834, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786410500410859> .

CAMACHO, F. P.; BONGIOVANI, M. C.; SILVA, M. O. COLDEBELLA, M. T. S. P.A.; BERGAMASCO, R. Coagulation/Flocculation/Flotation/Nanofiltration Processes Using *Moringa Oleifera* as Coagulant of Eutrophized River. **Chemical Engineering Transactions**, v.43, p. 1123-1128, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3303/CET1543188> .

CAPELO-NETO, J.; BUARQUE, N. M. S. (2016). Simulation of saxitoxins adsorption in full-scale GAC filter using HSDM. **Water Research**, 88, 558–565. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.10.048> .

CARMICHAEL W.W. Cyanobacteria secondary metabolites -The cyanotoxins. **Journal of Applied Microbiology**;v. 72:p. 445–459, 1992. DOI : <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01858.x> .

CARMICHAEL, W. W. The toxins of cyanobacteria. **Sci. Am**, v. 270, p. 78–86, 1994.

CASTENHOLZ, R. W., **General Characteristics of the Cyanobacteria**. In **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria** (eds W. B. Whitman, F. Rainey, P. Kämpfer, M. Trujillo, J. Chun, P. DeVos, B. Hedlund and S. Dedysh). ISBN: 9781118960608, 2015 DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118960608.cbm00019> .

CATHERINE, A.; BERNARD, C.; SPOOF, L.; BRUNO, M. **Microcystins and Nodularins**. In. **Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis** (eds J. Meriluoto, L. Spoof and G. A. Codd), p.109-118 ,2017 DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch11> .

CHANG, C.-Y.; HSIEH, Y.-H.; K.-Y.; L.-L., CHENG, Hsieh,; CHENG T.-C., YAO, K.-S., Effect of pH on Fenton process using estimation of hydroxyl radical with salicylic acid as trapping reagent, **Water Science & Technology**, v.58 , p.873-880, 2008. DOI: [doi: https://doi.org/10.2166/wst.2008.429](https://doi.org/10.2166/wst.2008.429).

CHANG, J.; CHEN, Z.; WANG, Z.; SHEN, J; CHEN, Q.; KANG, J.; YANG, L.; LIU, X.; NIE, C. Ozonation degradation of microcystin-LR in aqueous solution: Intermediates, byproducts and pathways, **Water Research**, v. 63, p. 52-61, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.06.007>.

CHEN, Y.; SHEN, D; FANG, D., 2013. Nodularins in poisoning. **Clinica Chimica Acta** v,.425, p. 18–29, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.07.005> .

CHIRON, S.; FERNANDEZ-ALBA, A.; RODRIGUEZ, A., GARCIA-CALVO, E. Pesticide chemical oxidation: state-of-the-art, **Water Research**, v.34 (2), 2000, p.366-377, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(99\)00173-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(99)00173-6).

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

CHOWDHURY, Z. K.; SUMMERS, R. S.; WASTERHOFF, B. J. L.; NOWACK, K.; CORWIN, C. J. **Activated. Carbon. Solutions for. Improving. Water** Quality. American Water Works Association, 2013. ISBN 9781613002025

CODD G. A.; AZEVEDO S. M. F. O.; BAGCHI, S. N.; BURCH M.D.; CARMICHAEL W. W.; HARDING, W. R.; KAYA. K.; UTKILEN H. C.; CYANONET, a **Global Network for Cyanobacterial Bloom and Toxin Risk Management: Initial Situation Assessment and Recommendations**. UNESCO IHP-VI, 2005.

CODD, G. A.; MERILUOTO, J.; METCALF, J. S. Introduction: Cyanobacteria, Cyanotoxins, Their Human Impact, and Risk Management. In: **Handbook of Cyanobacterial Monitoring and Cyanotoxin Analysis**. (eds J. Meriluoto, L. Spoof and G. A. Codd), p. 3-8., 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119068761.ch1>.

DAWSON, R. (1998) The toxicology of microcystins. **Toxicon**, v.36 (7), p. 953–962, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00102-5](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00102-5).

DENG, Y.; ZHAO, R. Advanced Oxidation Processes (AOPs) in Wastewater Treatment. *Current Pollution Report*, v.1, p.167-176, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40726-015-0015-z>.

ELLIOTT, J.A. Is the future blue-green? A review of the current model predictions of how climate change could affect pelagic freshwater cyanobacteria. **Water Research**. v. 46, p.1364–1371, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.018>.

EYNARD, F. Risk of cyanobacterial toxins in Riga waters (Latvia). **Water Research**, v.34 (1), p. 2979–2988, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00042-7](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00042-7).

FAASSEN, E.J.; LÜRLING, M., 2013. Occurrence of the Microcystins MC-LW and MC-LF in Dutch Surface Waters and Their Contribution to Total Microcystin Toxicity. **Marine Drugs**. v. 11, p. 2643-2654, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3390/md11072643>.

FALCONER, I.R.; HUMPAGE, A.R. Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.2 (1), p.43–50, 2005. DOI: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3814695/>.

GIANNUZZI, L.; SEDAN, D.; ECHENIQUE, R.; ANDRINOLO, D. An Acute Case of Intoxication with Cyanobacteria and Cyanotoxins in Recreational Water in Salto Grande Dam, Argentina. **Marine Drugs**, v.9(11), p. 2164–2175, 2011. DOI: <http://doi.org/10.3390/md9112164>.

GOGATE, P. R., e PANDIT, A. B.. A review of imperative technologies for wastewater treatment I: Oxidation technologies at ambient conditions. **Advances in Environmental Research**, v.8(3-4), p.501-551, 2004. DOI : [https://doi.org/10.1016/S1093-0191\(03\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S1093-0191(03)00031-5).

GULKAYA İ.; SURUCU, G. A.;DILEK,F. B. Importance of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> ratio in Fenton's treatment of a carpet dyeing wastewater, **Journal of Hazardous Materials**, v.136 (3), p. 763-769, 2006 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.01.006>.

HILBORN, E.D.; CARMICHAEL W.W.; SOARES, R.M.; YUAN, M., SERVAITES, J. C., BARTON, H.A.; AZEVEDO, S. M. F. O.. **Environmental Toxicology**; v.22:p.459–632, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/tox.20281>.

International Panel on Climate Change (IPCC). **Climate Change 2007, The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.** Cambridge University Press New York, NY, USA, 2007.

JEONG, B.; OH, M.; PARK, H.; PARK, C.; KIM, E.; HONG, S. W. Elimination of microcystin-LR and residual Mn species using permanganate and powdered activated carbon: Oxidation products and pathways. **Water Research**, v.114, p.189-199, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.02.043> .

JIANG, W.; CHEN, L.; BATCHU, S. R.; GARDINALI, P. R.; JASA, L., BLAHOSLAV, M.; ZBORIL, R.; DIONYSIOS, D. D.; O'SHEA, K. E.; SHARMA, V. K. Oxidation of Microcystin-LR by Ferrate(VI): Kinetics, Degradation Pathways, and Toxicity Assessments. **Environmental Science & Technology**, v.48 (20), p.12164-12172, 2014 DOI: <https://doi.org/10.1021/es5030355> .

JOURNEY, C. A.; BEAULIEU, K. M.; BRADLEY, P. M. Environmental Factors that Influence Cyanobacteria and Geosmin Occurrence in Reservoirs. In: **Current Perspectives in Contaminant Hydrology and Water Resources Sustainability Book.** ISBN: 978-953-51-1046-0, 2013. DOI: <https://doi.org/10.5772/54807>

JUDD, S. **The MBR Book: Principles and Applications of Membrane Bioreactors in Water and Wastewater Treatment.** Elsevier, second Edition, Oxford ,2006. ISBN: 978-0-08-096682-3

JUNG, Y.S.; LIM, W.T.; PARK, J.-Y.; KIM, Y.-H. Effect of pH on Fenton and Fentonlike oxidation, **Environmental Technology**, p.30, v.183–190, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1080/09593330802468848> .

KONDO, F; ITO, Y; OKA, H; YAMADA, S; TSUJI, K; IMOKAWA, M; NIIMI, Y; HARADA, K; UENO, Y; MIYAZAKI, Y. Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column. **Toxicon**, v.40, p.893, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00287-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00287-2) .

LAWRENCE, J. F.; NIEDZWIADK, B.; MENARD, C. Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using pre-chromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: collaborative study. **Journal of AOAC International**, 88, 1714–1732, 2005. DOI: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16526455> .

LEHMAN, P.W.; KUROBE, T.; LESMEISTER, S.; BAXA, D.; TUNG, A.; THE, S.J. Impacts of the 2014 severe drought on the Microcystis bloom in San Francisco Estuary, **Harmful Algae**, v. 63, p. 94-108, 2017 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2017.01.011>.

LIU, I.; LAWTON, L. A.; ROBERTSON, P. K. J. Mechanistic Studies of the Photocatalytic Oxidation of Microcystin-LR: An Investigation of Byproducts of the Decomposition Process. **Environmental Science & Technology**, v.37 (14), p.3214-3219, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1021/es0201855> .

LOPES, W.S.; BURITI, J.S.; CEBALLOS, B.S.O.; SOUSA, J. T; LEITE, V. D; VIEIRA, F. F. Removal of Microcystin-LR from Drinking Water Using a System Involving

Oxidation and Adsorption. **Water Air Soil Pollution**, p.228: 337, 2017. DOI : <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3504-4>

MEREL, S.; WALKER, D.; CHICANA, R.; SNYDER, S.; BAURES, E.; THOMAS, O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. **Environment International**, v.59, p. 303-327, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.013>.

MERILUOTO, J.; SPOOF, L.; & CODD, G. **Handbook of cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis**. (J. Meriluoto, L. Spoofo, & G. Codd). New York, NY: John Wiley. 2016. ISBN: 9781119068747. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119068761> .

MIAO, H-F; QIN, F.; TAO, G-J; TAO, W-Y; RUAN, W-Q. Detoxification and degradation of microcystin-LR and -RR by ozonation. **Chemosphere**, v.79(4), p.355-361, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.02.024>.

MOON, B.; KIM, T.; KIM, M.; CHOI, J.; ZOH, K. Degradation mechanisms of Microcystin-LR during UV-B photolysis and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> processes: Byproducts and pathways. **Chemosphere**, v.185, p.1039-1047, 2017, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.104> .

MOREIRA, I. C.; BIANCHINI Jr., I.; VIEIRA, A. A. H. Decomposition of dissolved organic matter released by an isolate of *Microcystis aeruginosa* and morphological profile of the associated bacterial community. **Brazilian Journal of Biology**, v.71, p.57–63, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842011000100009> .

MOSLEY, L. M., Drought impacts on the water quality of freshwater systems; review and integration. **Earth-Science Reviews**, v.140, p. 203-214, 2015. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2014.11.010> .

MOWE, M. A.D.; POROJAN, C.; ABBAS, F.; MITROVIC, S. M.; LIM, R. P.; FUREY, A.; YEO, D. C. J. Rising temperatures may increase growth rates and microcystin production in tropical *Microcystis* species, **Harmful Algae**, v.50. p.88-98, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2015.10.011> .

O'NEIL, J.M.; DAVIS, T.W.; BURFORD, M.A.; GOBLER, C.J. The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. **Harmful Algae**, v. 14, p.313–334, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.10.027>.

PAERL, H.W.; PAUL, V.J. Climate change, links to global expansion of harmful cyanobacteria. **Water Research**. v.46, p.1349–1363, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.002>

PAERL, H.W.; SCOTT, J.T. Throwing fuel on the fire, synergistic effects of excessive nitrogen inputs and global warming on harmful algal blooms. **Environmental Science & Technology**. v.44, p.7756–7758., 2010. DOI: <https://doi.org/10.1021/es102665e>

PARK, J.; YANG, B.; PARK, C.; CHOI, J.; van Genuchten, C. M.; LEE, S. Oxidation of microcystin-LR by the Fenton process: Kinetics, degradation intermediates, water

quality and toxicity assessment. **Chemical Engineering Journal**, v.309, p.339-348, 2017, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.10.083> .

PARL, J.; YANG, B.; KIM, J-H.; CHOI, J-W; PARK, H-D, LEE, S-H. Removal of microcystin-LR using UV-assisted advanced oxidation processes and optimization of photo-Fenton-like process for treating Nak-Dong River water, South Korea. **Chemical Engineering Journal**, v. 348. p.125-134. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.04.190>.

RIVASSEAU, C.; MARTINS, S.; HENNION, M.C. Determination of some physicochemical parameters of microcystins (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography, **Journal of Chromatography** , v. 799, p.155-169, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01095-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01095-9).

ŞENGÜL, A. B.; ERSAN, G.; TÜFEKÇİ, N. Removal of intra- and extracellular microcystin by submerged ultrafiltration (UF) membrane combined with coagulation/flocculation and powdered activated carbon (PAC) adsorption. **Journal of Hazardous Materials**, v. 343, p.29-35, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.09.018>.

SIVONEN, K.; JONES G. **Cyanobacterial toxins**, p.41 -111. In: Chorus, I. e Bartram, J. (ed.), *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring, and management.*, 1999 E & FN Spon, London, United Kingdom.

SKOOG, A. **Princípios de análise instrumental**. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman. 936p,2002. ISBN: 85-7307-976-2.

STEWART, I; SEAWRIGHT, A. A. ; SHAW, GR. Cyanobacterial poisoning in livestock, wild mammals and birds—an overview. In: Hudnell KH, editor. **Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs**. New York, USA: Springer; 2008. p. 613–37.

TEIXEIRA, M. R.; ROSA, M. J. Microcystins removal by nanofiltration membranes, **Separation and Purification Technology**, v.46(3), p.192-201,2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.05.013>.

TEKIN, H.; BILKAY, O.; ATABERK, S. S.; BALTA, T. H.; CERIBASİ, I. H.; SANIN, F. D., *et al.* Use of Fenton oxidation to improve the biodegradability of a pharmaceutical wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v.136(2), p.258-265, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.12.012> .

van GREMBERGHE, I.; LELIAERT, F.; MERGEAY, J.; VANORMELINGEN, P.; Van DER GUCHT, K.; DEBEER, A.; LACEROT, G.; De MEESTER, L.; VYVERMAN, W. **Lack of Phylogeographic Structure in the Freshwater Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Suggests Global Dispersal**. PLOS ONE 6(5): e19561, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019561>.

VICHI, S.; LAVORINI, P.; FUNARI, E., SCARDALA, S.; TESTAI, E. Contamination by *Microcystis* and microcystins of blue–green algae food supplements (BGAS) on the Italian market and possible risk for the exposed population. **Food and Chemical Toxicology**, v.50 (12), p. 4493-4499, 2012 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.029> .

WALLS, J. T.; WYATT, K. H.; DOLL, J. C.; RUBENSTEIN, E. M.; ROBER, A. R. Hot and toxic: Temperature regulates microcystin release from cyanobacteria, **Science of The Total Environment**, v.610–611, p.786-795, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.149>.

WOESE, CR; KANDLER, O; WHEELIS, ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.87(12):p.4576-4579,1990. DOI: <http://www.pnas.org/content/pnas/87/12/4576.full.pdf>

WORCH, E. **Adsorption Technology in Water Treatment. Fundamentals, Processes, and Modeling**. Berlin, Boston: De Gruyter, 2012. ISBN: 978-3-11-024022-1.

YUAN, M; CARMICHAEL, WW; HILBORN, ED. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. **Toxicon**; v.48, p.627–640, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.07.031> .

YOON, J; KANG, N.; LEE, D. S.; Kinetic modeling of Fenton oxidation of phenol and monochlorophenols, **Chemosphere**, Volume 47, Issue 9, 2002, Pages 915-924, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00067-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00067-X).

ZAMYADI, A.; CORAL, L. A.; BARBEAU, B.; DORNER, S.; LAPOLLI, F. R.; PRÉVOST, M. Fate of toxic cyanobacterial genera from natural bloom events during ozonation. **Water Research**, v.73, p. 204-215, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.01.029> .

ZHANG, Y.; SHAO, Y.; GAO, N.; CHU, W.; SUN, Z. Removal of microcystin-LR by free chlorine: Identify of transformation products and disinfection by-products formation. **Chemical Engineering Journal**, v.287, p.189-195, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.10.111>

ZONG, W.; SUN, F.; SUN, X. Oxidation by-products formation of microcystin-LR exposed to UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Toward the generative mechanism and biological toxicity. **Water Research**, v.47 (9), p. 3211-3219, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.03.037>.

