



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

JULYA KAROLYNE NERES COSTA SOARES

**IDENTIFICAÇÃO E EFEITOS TOXICOLÓGICOS DOS SUBPRODUTOS
GERADOS NA DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA-LR POR PROCESSOS
OXIDATIVOS AVANÇADOS**

CAMPINA GRANDE - PB

2019

JULYA KAROLYNE NERES COSTA SOARES

**IDENTIFICAÇÃO E EFEITOS TOXICOLÓGICOS DOS SUBPRODUTOS
GERADOS NA DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA-LR POR PROCESSOS
OXIDATIVOS AVANÇADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Tecnologias de Tratamento de Água e Resíduos

Orientador: Prof^o. Dr. Wilton Silva Lopes

CAMPINA GRANDE - PB

2019

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.

S676i Soares, Julya Karolyne Neres Costa.
Identificação e efeitos toxicológicos dos subprodutos gerados na degradação de Microcistina-LR por Processos Oxidativos Avançados [manuscrito] / Julya Karolyne Neres Costa Soares. - 2019.
46 p. : il. colorido.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, 2020.
"Orientação : Prof. Dr. Wilton Silva Lopes, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - CCT."
1. Microcistina-LR. 2. Cianotoxinas. 3. Eutrofização. 4. Processos Oxidativos Avançados. I. Título
21. ed. CDD 628

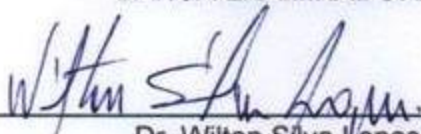
JULYA KAROLYNE NERES COSTA SOARES

IDENTIFICAÇÃO E EFEITOS TOXICOLÓGICOS DOS SUBPRODUTOS
GERADOS NA DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA-LR POR PROCESSOS
OXIDATIVOS AVANÇADOS

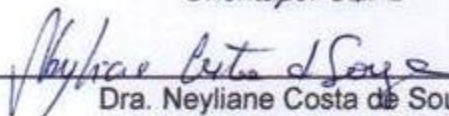
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, em cumprimento aos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Aprovada em 20 de Dezembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA



Dr. Wilton Silva Lopes
Orientador UEPB



Dra. Neyliane Costa de Souza
Examinador Externo – UFOPA



Fernando Fernandes Vieira
Examinador Interno - UEPB

Campina Grande, 2019.

Dedicatória

Primeiramente a Deus pela força concedida, ao meu filho João Victor, aos meus pais e irmão por sempre me apoiarem.

AGRADECIMENTOS

À Deus e a Maria, pela força, discernimento, amor e sabedoria a mim concedidos. Por estarem comigo sempre, sem me deixar desistir, desanimar ou cair diante das dificuldades.

Ao meu filho amado João Victor Neres, por ser esse filho maravilhoso, inteligente e divertido, ser meu abrigo, meu companheiro e meu amor incondicional, por me dar tanta força. Com você aprendi a ser melhor e mais feliz.

Aos meus pais, Maria José Costa Soares e Jocier Leite Soares, por me darem abrigo, apoio, suporte e coragem diante dos problemas, pelo imenso amor por mim.

Ao meu irmão, Manoel Cardoso Costa Segundo, pelos conselhos e por ser esse irmão maravilhoso sempre.

Aos demais familiares, por me apoiarem sempre em tudo que faço.

Às minhas melhores amigas, Júlia Lima, Luana Laís, Thais Vanessa e Sophia Idalina, por tudo que sempre fizeram, por serem colo, carinho e amor, por serem incentivo, apoio e suporte, pela nossa amizade sincera e livre. Amo muito vocês!

Às minhas queridas Welinágila e Lívia, por me acolherem tão bem, quando eu mais precisei. Vocês sempre terão um lugar especial no meu coração. Obrigada por tanto!

Ao meu orientador, Dr Wilton Silva Lopes, por todo ensinamento, pelo apoio e incentivo à não desistir diante das dificuldades.

À banca examinadora, Dr. Fernando Fernandes e Dra. Neyliane Costa, pelas contribuições concedidas.

À professora, Dra. Beatriz Ceballos, por seus ensinamentos.

À minha amiga/irmã Carla Araújo por dividir comigo esses anos de mestrado, por ser essa pessoa maravilhosa e companheira. Por me ajudar e apoiar sempre. Por me emprestar sua família em Campina Grande e por ensinar tanto.

Aos meus colegas do Programa de Ciência e Tecnologia Ambiental turma 2017, em especial Carla Araújo, Eliane, Jessica, Tardelli, Valneli, Ana Alice, Célia, Vinicius, Jaine, Alvânia e Danielle, à vocês meu muito obrigada por serem companheiros, pela parceria e por fazerem dessa caminhada mais leve.

Aos meus colegas de laboratório, Virginia, Ediano e Amanda, por me ajudarem sempre. Muito Obrigada!

À CAPES pela concessão da bolsa.

RESUMO

Dentre os efeitos deletérios provocados pelo processo de eutrofização de águas naturais, um importante destaque, deve ser dado ao surgimento de florações de cianobactérias e a consequente geração de cianotoxinas com potente efeito hepatotóxico (ex. microcistina-LR). A presença de linhagens de cianobactérias produtoras de cianotoxinas, tem efeitos negativos nos corpos hídricos e em particular nos destinados a abastecimento público, devido ao efeito nocivo dessas substâncias à saúde humana e de animais. Os tratamentos convencionais de água, se mostram ineficientes para a remoção total destas toxinas, portanto são necessárias novas tecnologias alternativas, como os processos oxidativos avançados. No entanto, essas tecnologias favorecem a formação de subprodutos desconhecidos. O presente trabalho buscou avaliar os efeitos toxicológicos dos possíveis subprodutos formados da degradação de Microcistina-LR por processos oxidativos avançados. Foram utilizados dados de 4 estudos de caso que utilizaram dois processos oxidativos avançados: o UV/H₂O₂ e Fenton, para obtenção dos fragmentos de íons de *m/z* obtidos. Os estudos de caso utilizaram água contaminada com Microcistina-LR em diferentes concentrações. Foi realizado a análise das amostras por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM). Os softwares ChemDraw e ChemSketch foram empregados para formação das estruturas e fórmulas químicas referentes a cada fragmento. Para identificar a toxicologia dos fragmentos foram utilizadas as bases de dados Pubchem, Echa, Ecotox, TSCA e MolBase. Foram obtidos 33 fragmentos identificados nos 4 estudos de caso. Os primeiros subprodutos identificados apresentaram uma estrutura molecular cíclica intacta e ao decorrer da degradação foram sendo linearizados. Os fragmentos de *m/z* 967 e 553 tiveram toxicidade registrada pelas bases de dados. O tratamento UV/H₂O₂ gerou subprodutos tóxicos e moléculas grandes. O tratamento utilizando Fenton apresentou o melhor desempenho sendo indicado para tratamento de Microcistina-LR em águas destinadas a abastecimento.

Palavras chaves: Microcistina-LR. Subprodutos. Toxicologia. Degradação.

ABSTRACT

Among the harmful effects caused by the process of eutrophication of natural waters, an important highlight should be given to the appearance of cyanobacterial blooms and the consequent generation of cyanotoxins with a potent hepatotoxic effect (eg microcystin-LR). The presence of strains of cyanobacteria that produce cyanotoxins has negative effects on water bodies and in particular those destined for public supply, due to the harmful effect of these substances on human and animal health. Conventional water treatments are inefficient for the total removal of these toxins, so new alternative technologies are needed, such as advanced oxidative processes. However, these technologies favor the formation of unknown by-products. The present work sought to evaluate the toxicological effects of possible by-products formed from the degradation of Microcystin-LR by advanced oxidative processes. Data from 4 case studies were used that used two advanced oxidative processes: UV / H₂O₂ and Fenton, to obtain the obtained m / z ion fragments. The case studies used water contaminated with Microcystin-LR in different concentrations. Sample analysis was performed using high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-EM). The ChemDraw and ChemSketch software were used to form the structures and chemical formulas for each fragment. The Pubchem, Echa, Ecotox, TSCA and MolBase databases were used to identify the toxicology of the fragments. 33 fragments identified in the 4 case studies were obtained. The first by-products identified showed an intact cyclic molecular structure and during the course of the degradation they were linearized. The fragments of m / z 967 and 553 had toxicity registered by the databases. The UV / H₂O₂ treatment generated toxic by-products and large molecules. The treatment using Fenton presented the best performance, being indicated for the treatment of Microcystin-LR in water destined for supply.

Keywords: Microcystin-LR. Byproducts. Toxicology. Degradation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da Microcistina.....	18
Figura 2: Estrutura Geral da Microcistina-LR.....	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos principais Processos Oxidativos Avançados	21
Tabela 2: Referências correspondentes a cada razão m/z	28
Tabela 3: Fontes e dados de identificação referente a cada fragmento	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

•OH – Radical Hidroxila

AE – Água de Estudo

ECHA - Agência Europeia dos Produtos Químicos

EM – Espectometria de Massas

ETA – Estação de Tratamento de Água

LA- Leucina-Alanina

LR - Leucina-Arginina

MC – Microcistina

MS – Ministério da Saúde

M/Z – Razão massa/carga

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NIH - National Institutes of Health

OCDE - Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico

OMS – Organização Mundial da Saúde

POA – Processos Oxidativos Avançados

RR- Arginina-Arginina

UV - Ultravioleta

VMP – Valor Máximo Permitido

YR- Tirosina-Arginina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivo Geral	11
2.2. Objetivos Específicos	11
3. REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1. Eutrofização	12
3.2. Cianobactérias	13
3.3. Cianotoxinas	14
3.4. Microcistina	18
3.5. Aplicação de Processos Oxidativos Avançados no tratamento de água	20
3.5.1. Formação de subprodutos	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1. Obtenção dos fragmentos	24
4.2. Identificação estrutural	26
4.3. Toxicologia dos subprodutos	26
5. RESULTADO E DISCUSSÕES	27
5.1. Fragmentos obtidos	27
5.2. Identificação estrutural dos fragmentos	29
5.3. Toxicologia dos subprodutos	36
6. CONCLUSÕES	38
7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	39
REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

O acelerado crescimento populacional, vem causando ocupação desordenada de bacias hidrográficas e contribuindo com o aumento de atividades antropogênicas, como urbanização, industrialização e expansão agrícola, promovendo o lançamento de nutrientes (nitrogênio e fósforo) importantes para processo de eutrofização nos reservatórios. Estas atividades resultam no decréscimo da qualidade da água de rios, lagos e reservatórios, causando severos impactos ambientais e socioeconômico no mundo todo.

Uma das principais consequências da eutrofização é a floração excessiva de cianobactérias ou “blooms” que interferem no equilíbrio dos ecossistemas aquáticos, pois criam um biofilme superficial, alterando a transparência do meio, conduzindo à desoxigenação do corpo d’água. As cianobactérias são microrganismos produtores de cianotoxinas (endotoxinas) que ficam no interior da célula podendo serem liberadas no ambiente aquático por lise celular, ficando dissolvidas na água e tornando as florações extremamente perigosas para saúde pública e para a biota aquática (RAMOS, et. al., 2016).

A microcistina – LR, constitui a cianotoxina mais comumente encontrada em corpos aquáticos eutrofizados. Seguindo diretrizes da Organização Mundial de Saúde (OMS), a Portaria de Consolidação Nº 5 de 2017 do Ministério da Saúde, estabelece como Valor Máximo Permitido (VMP) de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ para a soma das variantes de microcistinas em águas destinadas ao abastecimento público (BRASIL, 2017).

As tecnologias de tratamento de água que realizam o ciclo completo, referidas como “convencionais” e que incluem a coagulação, floculação, sedimentação, filtração rápida, e desinfecção, são ineficientes para remoção de micropoluentes orgânicos como as microcistinas e outras cianotoxinas dissolvidas na água (ROEGNER et. al., 2014), tornando necessário o emprego de métodos mais específicos para sua remoção ou destruição.

Os Processos de Oxidação Avançada (POA) que se baseiam na formação de radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$), estimulam interesses por alguns pesquisadores por ser uma tecnologia promissora frente aos processos de tratamento convencional de águas existentes, esses processos podem operar em conjunto ou paralelo com o tratamento convencional na degradação de micropoluentes (JACOBS et al. 2013; HE et al. 2015; MIRANDA, 2016).

No entanto, os POAs podem apresentar a desvantagem de gerar subprodutos tóxicos resultantes da degradação de poluentes. Portanto, a avaliação dos subprodutos de transformação e toxicidade ganha importância ao ampliar o entendimento da eficiência geral dos POAs para a degradação de poluentes ambientais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Identificar os efeitos toxicológicos dos subprodutos formados da degradação de Microcistina-LR por processos oxidativos avançados.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os subprodutos gerados através dos processos oxidativos avançados UV/H₂O₂ e Fenton aplicados ao tratamento de Microcistina-LR presentes em águas destinadas ao abastecimento público.
- Identificar os efeitos toxicológicos dos subprodutos formados utilizando bases de dados.
- Verificar quais dos tratamentos geraram os subprodutos mais tóxicos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Eutrofização

Em decorrência do rápido crescimento demográfico mundial (7,7 bilhões em 2019 com previsão de 9,7 bilhões em 2050) (NAÇÕES UNIDAS, 2019), da acelerada urbanização e de outras atividades antrópicas como agricultura, indústrias e mineração. Para satisfazer as necessidades dessa população, os corpos hídricos estão submetidos, simultaneamente, a uma maior demanda de água e à deterioração de sua qualidade por serem receptores dos resíduos líquidos e sólidos descartados no ambiente.

Entre as consequências desses impactos se destacam a eutrofização de rios, lagos e represas e a contaminação dessas águas com substâncias tóxicas diversas que afetam a pele, o sistema nervoso e diferentes órgãos causando desde dermatites, diferentes manifestações de autismo, tumores, cânceres e óbitos (ZEGURA et. al., 2011; MOREIRA et. al., 2013; PANTELIC et. al., 2013; WEIRICH et. al., 2014).

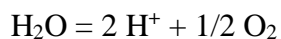
Em relatório produzido originalmente para a Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) em 1968, o primeiro que apresentou uma síntese do conhecimento científico sobre o processo de eutrofização acelerada de águas lênticas, associou o fenômeno com a resposta trófica dos lagos à carga de nutrientes. Os estudos realizados para quantificar essa relação permitiu elaborar o conceito de níveis aceitáveis e excessivos de carga de macronutrientes (principalmente fósforo e nitrogênio) para o gerenciamento de lagos (VOLLENWEIDER, 1987). Desde então aumentaram as pesquisas acerca da frequência, intensidade e dispersão da eutrofização e os estudos sobre componentes e diversidade fitoplanctônicas das florações, sendo observada a predominância de cianobactérias em ambientes de água doce acompanhada de aumentos nas concentrações de fósforo de origem antropogênica (CODD, 1995).

Atualmente a eutrofização é um dos maiores problemas globais, intensificada pela elevação de temperatura global e o aumento da poluição antropogênica, que causa o enriquecimento excessivo das águas com matéria orgânica e macronutrientes inorgânicos que estimulam o crescimento exuberante dos produtores primários como as plantas aquáticas e de componentes do fitoplâncton (microalgas e cianobactérias). Estas, em excesso, alteram o aspecto e a qualidade das águas que perdem seu valor paisagístico, dificultam a pesca e seu uso como mananciais de água potável (ESTEVES, 2011; RIGOSI, et. al., 2014).

O crescimento explosivo das cianobactérias (florescimento ou blooms) se manifesta no reservatório como manchas de cor verde intensa na água que crescem e formam camadas densas com elevadas concentrações de células, em torno de $1,5 \times 10^6$ cel.mL⁻¹, que flutuam na subsuperfície e provocam o sombreamento das camadas inferiores, dificultando a passagem da luz ao longo da coluna de água, limitam e até impedem a fotossíntese, diminuindo a oxigenação da água nas áreas mais profundas (RABALAIS et. al., 2010; SINHA et.al., 2017). As consequências são as alterações do equilíbrio ecológico do ambiente hídrico (GER, et. al., 2014) como a morte dos organismos aeróbios, entre eles bactérias e peixes, e a predominância de organismos anaeróbios associados aos processos de fermentação e putrefação da matéria orgânica que produzem gases de odores desagradáveis que saem da água para atmosfera (LE MOAL et. al., 2019).

3.2. Cianobactérias

As cianobactérias são microrganismos procariontes autotróficos com metabolismo fotossintético oxigênico, ou seja, desenvolveram um complexo sistema metabólico capaz de utilizar luz solar e água como fontes de energia para a fixação redutora de dióxido de carbono e a consequente biossíntese de matéria orgânica (biomassa) para crescerem e se multiplicarem. Nesse processo há a liberação de oxigênio molecular (O₂) para a atmosfera, produzido a partir da quebra da molécula de água (Equação 1), que não é utilizado no seu metabolismo (KLUGE et al, 2015; BOROWITZKA et al, 2016).



1

Surgiram na Terra há cerca de 2,8 a 3 bilhões de anos e ainda são os organismos fotossintéticos mais importantes do planeta para ciclar carbono e nitrogênio. São denominadas cianobactérias e antigamente "algas verdes azuis" devido à cor verde escura. Foram os primeiros organismos fototróficos produtores de O₂ o qual ao ser liberado no meio ambiente oxigenou o planeta Terra e formou a camada de ozônio (O₃) na atmosfera, que possui a capacidade de filtrar as radiações solares e proteger os seres vivos contra os efeitos letais dessas radiações que destroem a molécula de DNA (BOROWITZKA et al, 2016). Sua produção global de O₂ é fundamental para a manutenção da concentração de 20% de oxigênio molecular na atmosfera terrestre atual que permite a vida de todos os seres aeróbios (MADIGAN et. al., 2016; ESTEVES-FERREIRA et. al., 2017).

Distribuídas em diversos ambientes terrestres, água doce, salobra e marinha, habitats extremos como frio da Antártida, fontes termais e desertos, as cianobactérias apresentam densos crescimentos em lagos ricos em nutrientes e algumas espécies podem produzir toxinas potentes, cujas funções ecológicas não estão ainda bem conhecidas, mas alguns pesquisadores consideram um possível efeitos alelopáticos (MOREIRA et al, 2013).

3.3. Cianotoxinas

As cianotoxinas são metabólitos secundários tóxicos geneticamente determinados e produzidos geralmente sob condições de estresse biótico e abiótico, sendo liberadas com a morte ou lises das cianobactérias por serem, na sua maioria, endotoxina. De acordo com a toxicidade em órgãos alvos, as cianotoxinas são classificadas em: hepatotoxinas que afetam o fígado (microcistinas, nodularina, cilindrospermopsina), neurotoxinas que afetam o sistema nervoso (anatoxina-a, saxitoxina), e dermatotoxinas que agem sobre a pele. Os mecanismos fisiológicos da expressão dos efeitos tóxicos das diversas cianotoxinas são diferentes porque são produtos químicos estruturalmente diversos que correspondem a três grupos: peptídeos cíclicos (microcistina e nodularina), alcalóides (anatoxina-a, saxitoxina, cilindrospermopsina) e lipopolissacarídeos (PANTELIC et. al., 2013; BOROWITZKA et al, 2016).

Os primeiros registros de gêneros de cianobactérias com efeitos tóxicos datam da metade do século passado (BISHOP et al, 1959). Os estudos sobre florações com cianotoxinas incrementaram nos anos 1990, em especial focando as múltiplas causas das florações tóxicas (CARMICHAEL, GORHAM (1981). Estudos dos últimos anos evidenciaram algumas cianotoxinas com efeitos genotóxicos e cancerígenas (ZEGURA et al., 2011; MOREIRA et. al., 2013). Os mesmos autores relatam que foram identificados aproximadamente 150 gêneros de cianobactérias com mais de 2.000 espécies e dentre elas mais de 40 gêneros com espécies toxigênicas.

Intoxicações por cianotoxinas são comumente observadas em crianças, adolescentes e adultos jovens, causadas pelo contato com uma ou mais dessas toxinas por exposições frequentes. O consumo ou contato contínuo estão associadas a doenças crônicas e câncer de fígado causados pelas hepatoxinas (WEIRICH et. al., 2014). Os humanos estão expostos as cianotoxinas através de várias rotas: pela via parenteral acidental, exposição da derme e inalação e oral. A via oral é a mais frequente pela ingestão de água contaminada, com efeitos

que podem ser agudos ou crônicos, de acordo com a quantidade de toxinas na água e o tempo de ingestão (ZEGURA et. al., 2011). Estudos recentes indicaram que o nível sérico de microcistina-LR (MC-LR) está positivamente ligado ao risco de carcinoma hepatocelular humano (CHC) (LI et al, 2018; ZEGURA et. al., 2011).

Testes em laboratório *in vitro* (com células de ratos) e *in vivo* (ratos) sugerem fortemente que a MC-LR induz hepatocarcinogênese ao estimular o aumento dos níveis de gankirina (proteína codificada no cromossomo Xq22.3, altamente conservado ao longo do processo evolutivo), e normalmente presente em altas concentrações em pacientes com câncer (LI et al, 2018). Estas pesquisas evidenciam a importância sanitária de sua eliminação das águas para consumo humano e de seu controle no ambiente, considerando a saúde humana e as possíveis ações negativas, ainda não bem conhecidas, sobre a biota dos ecossistemas terrestres e aquáticos.

Recentemente observaram-se mais intensas e frequentes alterações do clima que se expressam regionalmente com chuvas torrenciais com duração de poucas horas ou poucos dias seguidas de secas severas que se prolongam por meses e até anos, como a última que afetou o nordeste do Brasil entre de 2012 e 2017 (MARENGO et al, 2017). Essas mudanças climáticas ao influenciar os padrões de precipitação e de estiagem impulsionam ainda com mais força o processo de eutrofização (RIGOSI et al, 2014).

Chuvas intensas aumentam as descargas de nutrientes nos corpos d'água junto com os dejetos da bacia de drenagem e substâncias tóxicas que escoam dos campos destinados à agroindústria, entre outras fontes. A seguir, a diminuição das chuvas e a elevada temperatura causam aumentos da evapotranspiração e cuja consequência é o aumento do tempo de residência da água e a concentração das cargas poluidoras, incluídos os nutrientes, que ficam capturadas no reservatório menos profundo e promovem as florações (PAERL; HUSSMANN, 2009; SINHA et.al., 2017).

No nordeste semiárido do Brasil, as florações tem-se tornado muito frequentes e com duração mais longa associadas as mudanças do ciclo de chuvas e de secas. Verifica-se atualmente chuvas fortes e de curta duração seguidas por secas prolongadas, com distribuição aleatória temporal e geográfica, o que aumentou a vulnerabilidade dos reservatórios ao favorecer o crescimento exuberante de cianobactérias, com o agravante de que os florescimentos se tornaram permanentes em diversos ambientes com espécies produtoras de cianotoxinas (VASCONCELOS et al., 2011). Os mesmos autores relatam ocorrência de

florações de cianobactérias em reservatórios da Paraíba com aumentos sucessivos de frequência entre 2006 a 2009: dos 20 maiores reservatórios de abastecimento do estado, 3% apresentavam cianobactérias em 2006, em 2007 já foram 20%, em 2008 foram 45% e 62% em 2009; acompanhadas de crescente acúmulo de fósforo total (medias de 30,50 g.L⁻¹ até 178,7 g.L⁻¹).

Ainda, não é raro encontrar codominância de espécies produtoras de cianotoxinas em mananciais da região semiárida, estando confirmada sua bioacumulação em peixes como a tilápia do Nilo, criada em grandes escala em tanques redes dentro dos açudes, transformando o que deveria ser um alimento fonte de proteína e de renda para as comunidades de pescadores em mais um problema ecológico e de saúde pública. (PANOSO et al 2007 , LINS et al, 2016). Revisões da literatura relatam estudos desde 1990 da acumulação de cianotoxinas em vertebrados e invertebrados aquáticos, em mexilhões e outros frutos do mar e de água doce assim como no zooplâncton, e consideram suas possíveis consequências para a saúde pública (SIVONEN; CHORUS, 1999; IBERLINGS E CHORUS, 2007)

3.3.1. Ocorrência e efeitos no ambiente

Um levantamento sobre os gêneros de cianobactérias mais frequentes nos ambientes lênticos (maioria reservatórios) com florações no Brasil, em artigos publicados nos bancos de dados Scielo, Scopus e ISI, entre os anos de 1990 e 2011, mostrou predominância de *Microcystis*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon* e *Nodularia*. *Microcystis* e *Anabaena*, destacaram-se em períodos quentes e chuvosos, enquanto em períodos secos a tendência foi a predominância de *Cylindrospermopsis* (SOARES et. al., 2013).

Estudos no Nordeste brasileiro mostram a presença dos gêneros citados. Panoso e colaboradores (2007), em cinco reservatórios do semiárido de Rio Grande do Norte, com dominância das espécies toxigênicas *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Microcystis* spp., *Aphanizomenon* spp, *Anabaena circinalis* e *Planktothrix agardii*, e em três deles confirmaram presença de cianotoxinas, com maior frequência de hepatotoxinas. Vasconcelos e colaboradores (2011), na Paraíba citam a predominância de *Microcystis aeruginosa*, *Cylindrospermopsis raciborskii* e *plankthotrix agardii*. Estudos de Lins e colaboradores, (2016) confirmaram floração permanente de cianobactérias em um dos reservatórios da bacia do rio Paraíba, com dominância e codominância de duas ou mais espécies assim como a presença de duas ou mais cianotoxinas.

Microcystis aeruginosa é muito frequente nas florações no Brasil e no mundo. É produtora de vários tipos de toxinas (microscitinas) e recebe grande atenção por estar geograficamente

distribuída em todos os continentes e pela ocorrência de intoxicações humanas comprovadas. Em 1994 foi isolada por primeira vez no Brasil na Lagoa das Garças, no estado de São Paulo, pela equipe de pesquisadoras da Universidade Federal de Rio de Janeiro (AZEVEDO et al, 1994).

Diversos gêneros de cianobactérias também possuem linhagens produtoras de microcistinas, em especial de microcistina-LR e compostos com significativo potencial hepatotóxico: *Oscillatoria*, *Planktothrix* e *Anabaena*, são os produtores mais frequentes e a igual que *Microcystis* pode liberar esta toxina em águas destinadas ao consumo humano, provocando diarreias e até óbitos de animais e seres humanos (MOREIRA et. al., 2013)

O evento intoxicação humana mais grave com microcistina LR, ocorreu em uma clínica de hemodiálise na cidade de Caruaru-PE em 1996, onde 100 de 131 pacientes desenvolveram insuficiência hepática aguda, devido a contaminação com MC-LR na água de hemodiálise; 52 pacientes foram a óbito numa semana desse ano e outros faleceram posteriormente (CARMICHAEL et. al., 2001). Há relatos antigos de intoxicações agudas que podem ser associadas à cianotoxinas em 1931 e outros em Estados Unidos, Austrália, Canadá, China, Suécia e Argentina até 2009 (ARAÚJO et al., 2018).

Essas ocorrências juntamente com as frequentes descobertas de novas cianotoxinas permitiram alocar, na época, as cianotoxinas na categoria de poluentes emergentes assim como fármacos humanos e veterinários, cosméticos e nanopartículas, entre outros, produzidos com avanços tecnológicos mais recentes (SUAVÉ, DESROSIERS, 2014),

Diante desses fatos, especialmente a tragédia de Caruaru, a Organização Mundial de Saúde (OMS) organizou grupos de estudos que objetivaram fornecer garantias à saúde pública frente aos riscos das cianotoxinas. Recomendou, para a água de beber ou seja na água tratada ou potável, o valor máximo permitido (VMP) de microcistinas totais de 1 µg.L⁻¹ e de saxitoninas de 3 µg.L⁻¹, valores que foram aceitos pelo Ministério da Saúde brasileiro e publicado na Portaria 518 de 2004, mantendo esse valor nas normativas posteriores, e atualmente, na Portaria de Consolidação No 5 de 2017- MS (BRASIL, 2017).

3.3.2. Remoção de cianotoxinas

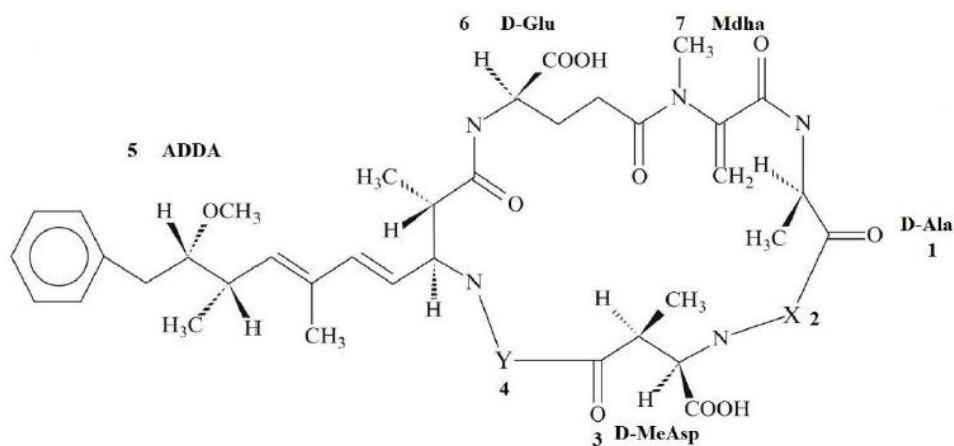
A eliminação das cianotoxinas da água bruta durante o tratamento convencional nas Estações de Tratamento de Água (ETAs) é difícil e, no geral, não são eliminadas todas ou não são eliminadas completamente. Já a presença de dois ou mais toxinas aumentam as dificuldades do tratamento por serem moléculas com diferentes características químicas que respondem de

forma diferenciada às etapas do processo aplicado. Ainda, a inclusão de uma etapa adicional com carbono ativado granular para eliminar as cianotoxinas evidencia alta eficiência para uma única toxina (GUERRA et al, 2015) , mas quando duas ou mais toxinas estão presentes não se mostra uma técnica promissora: testes com microcistina-LR e saxitoxina indicam que o carbono ativado granular não possui ou não aparenta ter capacidade de adsorver ambas cianotoxinas simultaneamente com a mesma eficiência, possivelmente por haver concorrência entre essas moléculas pelos poros das partículas de carbono ativado . Testes de bancada com essas duas cianotoxinas mostraram adsorção maior e mais uniforme para saxitoxinas, o que permitiria inferir, segundo os autores, que a adsorção de uma cianotoxina pode estar influenciada pela presença de outra (SILVA et. al., 2017).

3.4. Microcistina

As microcistinas são heptapeptídeos cíclicos com efeito hepatoxico (BOROWITZKA, et al, 2016; MOREIRA et. al., 2013). A molécula da microcistina (Figura 1) apresenta sete aminoácidos, possuindo uma porção invariável que contém três D-aminoácidos: β -eritro- β -metil ácido aspártico, alanina e γ -ácido glutâmico (D- β MeAsp, D-Ala e D-Glu), dois L-aminoácidos variáveis localizado na região X e Y (Figura 1) e dois aminoácidos raros (Mdha e Adda). O Mdha é o N-metildehidroalanina e o Adda, responsável pelo caráter tóxico da molécula é o 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8, trimetildeca-4,6-ácido dienóico (BITTENCOURT-OLIVEIRA et. al., 2014; CHANG et. al., 2015).

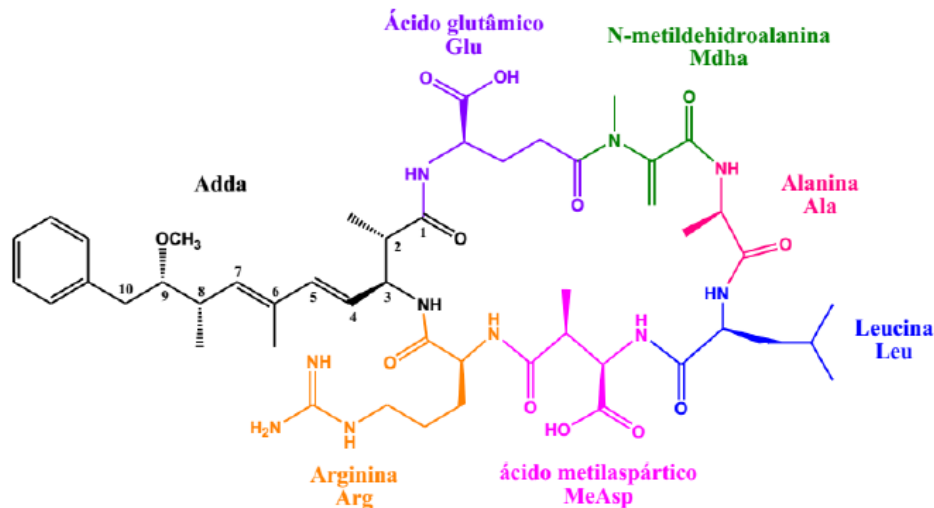
Figura 1: Estrutura da Microcistina



Fonte: Metcalf et. al., 2012.

São conhecidas cerca de 80 variantes de MC sendo seis as mais comuns. (MC-LR, MC-LA, MC-YR, MC-RR, MC-LF, and MC-LW). E entre elas, MC-LR (Figura 2) é a mais abundante, com 46 a 99,8% da concentração de todas as microcistinas nas florações (SHARMA et al, 2012).

Figura 2: Estrutura Geral da Microcistina-LR



Fonte: Miranda, 2016.

A toxicidade da microcistina varia de acordo com os dois L-aminoácidos variáveis, podendo ser classificada em: alta (MC-LR, MC-LA, MC-YR), média (MC-WR) e fraca (MC-RR). A variante LR além de ser mais comum nos reservatórios com florações, é uma das tóxicas, entre as demais (WELKER, VON DOHREN, 2006; DE LA CRUZ et. al., 2011; JEONG et. al., 2017).

A estrutura peptídica cíclica das microcistinas as torna altamente estáveis e resistentes à hidrólise química. Ainda algumas variantes podem reter sua toxicidade mesmo após a fervura (PANTELIC et. al., 2013). Além disso, sistemas de filtração doméstica como os filtros de barro ou cerâmica, amplamente usados no semiárido do nordeste do Brasil têm uma capacidade de remoção relativamente baixa (abaixo de 50%) (JACOBS et. al., 2013; BARBOSA, 2016), o que resalta a importância do uso de tecnologias mais avançadas para a completa remoção destes contaminantes.

3.5. Aplicação de Processos Oxidativos Avançados no tratamento de água

Compostos orgânicos tóxicos, presentes em águas de mananciais, devem ser removidos ou destruídos para proteger a saúde pública e ambiental. Os métodos de tratamento físicos usados nos sistemas convencionais não podem remover na sua totalidade compostos orgânicos tóxicos, como as microcistinas e outros microcontaminantes de ação perigosa para a saúde humana e ambiental. Em relação aos oxidantes convencionais, estes possuem capacidade de oxidar alguns constituintes tóxicos e nanocontaminantes, mas há incertezas com relação a formação de subprodutos tóxicos em função da oxidação química convencional não destruir completamente essas moléculas e considerando que esses procedimentos estão fortemente influenciados pelas concentrações das moléculas tóxicas e as condições de pH, temperatura e tempo de contato, entre outras variáveis (CRITTENDEN et. al., 2012). Além disso, a eficiência desses processos, diminui acentuadamente em ambientes com altos níveis de matéria orgânica, como as águas eutrofizadas, em sedimento e em lodos (PANTELIC et. al., 2013).

Métodos que usem técnicas avançadas de oxidação podem ser utilizados para a destruição dessas moléculas, e em seu conjunto são denominados Procesos Oxidativos Avançados. Estes se mostram como alternativas promissoras no tratamento de águas, esgotos e outras matrizes ambientais contaminadas com moléculas de elevada toxicidade, devido ao seu elevado potencial não seletivo de destruição ou de transformação em subprodutos menos tóxicos, e possibilitando até a completa mineralização desses subprodutos, sendo apropriados para serem aplicados às cianotoxinas e a micropoluentes tóxicos de diferentes origens. (SHARMA et al, 2012)

Os POAs transformam a maioria dos compostos orgânicos em CO₂, ânions inorgânicos e água através de reações de degradação que envolvem espécies transitórias oxidantes, principalmente o radical OH[•] em concentrações elevadas, sendo este um forte oxidante com capacidade de realizar a oxidação da maioria dos componentes orgânicos (METCALF; EDDY, 2016).

São processos limpos que não deixam resíduos e que podem degradar diversos compostos orgânicos em presença ou não de outros, sejam em fase aquosa ou gasosa ou adsorvidos em matrizes sólidas. Nessas reações os radicais hidroxilas liberados mostram elevada eficácia na destruição de poluentes porque são eletrólitos de elevado potencial de oxidação (2,8V) que reagem rápido, não seletivamente, operando em temperatura e pressões normais (DOMENÈCH, et al, 2001; SHARMA, et. al., 2012).

Os POAs são classificados em sistemas heterogêneos e homogêneos, de acordo com a forma de gerar o radical hidroxila, com ou sem irradiação. Nos sistemas heterogêneos são usados catalizadores semicondutores como o TiO_2 , ZnO , Fe_2O_3 , SiO_2 e Al_2O_3 que aceleram a velocidade da reação até atingir o equilíbrio químico, sem sofrerem alteração química enquanto os sistemas homogêneos envolvem o uso de oxidantes como ozônio (O_3), ferro e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (NOGUEIRA, 2007). Na Tabela 1, mostra-se a classificação típica dos principais POAs.

Tabela 1: Classificação dos principais Processos Oxidativos Avançados

	COM IRRADIAÇÃO	SEM IRRADIAÇÃO
HOMOGÊNEOS	$\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ O_3/UV Foto-Fenton $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ Feixe de elétrons	$\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (Fenton) $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ O_3/OH^-
HETEROGÊNEOS	$\text{TiO}_2/\text{O}_2/\text{UV}$ $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{UV}$	Eletro-Fenton

Fonte: HUANG et al, (1993); Fioreze et. al., (2014)

Estas técnicas avançadas para o tratamento de poluentes, possuem inúmeras vantagens (CHIRON et al., 2000; ANTONOPOULOU, et al., 2014), dentre elas:

- Apresentam-se como principais aplicações no tratamento de água e efluentes, remediação de solos e água subterrâneas, desinfecção e remoção de odores;
- Pode ser aplicado de forma isolada - principalmente na utilização para degradação de substâncias de águas pouco contaminadas, como é o caso, por exemplo, de águas poluídas com compostos organohalogenados (hidrocarbonetos clorados) e defensivos agrícolas;
- No caso de efluentes com grau de poluição mais elevado ou complexo, o dispêndio na etapa de oxidação pode ser consideravelmente reduzido através de uma combinação com outras etapas de tratamento como, por exemplo, o biológico e/ou coagulação/floculação/sedimentação;
- Apresentam rápidas velocidades de reação, além da oxidação não seletiva, o que permite que vários contaminantes sejam tratados ao mesmo tempo pelo mesmo reagente;

- A sua inespecificidade viabiliza a sua utilização para a degradação de substratos de qualquer natureza química, sendo destaque a degradação de contaminantes refratários e tóxicos, cujo tratamento biológico pode ser viabilizado através da oxidação avançada parcial;
- Oferecem variadas maneiras possíveis para a produção de radicais OH• além de outros radicais, permitindo assim uma melhor conformidade com os requisitos específicos de um determinado tratamento;

Dentre as limitações, se destacam (DOMÈNECH et al., 2001; FREIRE et al., 2000):

- Nem todos os processos estão disponíveis em escala adequada;
- Os custos podem ser elevados, principalmente devido ao consumo de energia;
- Há formação de subprodutos de reação, os quais em alguns casos são tóxicos;
- Apresentam restrições de aplicação em condições de elevada concentração dos poluentes;

Os contaminantes orgânicos podem ser oxidados pelo radical hidroxila de acordo com diferentes mecanismos básicos. Estes mecanismos dependem da estrutura do contaminante orgânico, sendo estes: a) abstração de átomo de hidrogênio; b) transferência eletrônica; e c) adição eletrofílica (NOGUEIRA et al., 2007; BRITO & SILVA, 2012;).

Atualmente os POAs vêm sendo utilizados no tratamento de água (PARK et. al., 2018), efluentes domésticos (MIKLOS et. al., 2018), industriais (ABBAS & ABBAS, 2019; RAJORIYA et. al., 2018), petróleo (FERNANDES et. al., 2018), corantes (REHMAN et. al., 2018), compostos orgânicos voláteis (FERNANDES et. al., 2019), fármacos (HAVLIKOVA et. al., 2016; THANEKAR et. al., 2018), desreguladores endócrinos (INCE, 2018), lixiviado (DA COSTA et. al., 2018), entre outras substâncias de natureza orgânicas que são difíceis de serem removidas pelo tratamento convencional.

3.5.1. Formação de subprodutos

Uma grande preocupação com o tratamento por oxidação é a formação de subprodutos ou produtos intermediários, que podem resultar numa poluição secundária. Influenciada por compostos orgânicos coexistentes e qualidade da água, a mineralização completa da Microcistina se torna inviável, podendo ocorrer formação de subprodutos resultantes desta oxidação (ZONG et. al., 2013).

Devido à complexidade da molécula de microcistina-LR, é difícil propor um mecanismo de degradação (JACOBS et. al., 2013). De acordo com Antoniou e colaboradores (2008), a maioria dos intermediários de degradação aparece nos primeiros 2 minutos de tratamento e alguns são eliminados após aproximadamente 120 min. Os intermediários poli-hidroxilados são inicialmente formado ($m/z > 1000$) por adição ou substituição de hidroxila aos grupos insaturados dos resíduos de Mdha e Adda. A ligação C8-C9 do resíduo Adda pode ser facilmente quebrada por resíduos de peptídeos, o que resulta na formação de fragmentos com uma razão m/z de aproximadamente 850. Como mais resíduos de peptídeos intramoleculares são eliminados, pode ocorrer ciclização, que forma ciclos com menor massa (m/z de 700).

AL MOMANI e JARRAH (2010) avaliaram os principais intermediários da degradação e a toxicidade de solução tratada por processo ozônio. Os subprodutos identificados foram relacionados a dose de ozônio. A alta concentração de ozônio disponível degradou as toxinas em subprodutos menores e levou a uma abertura do anel. Por outro lado, em dose baixa de ozônio, foram detectados intermediários maiores. Também se verificou que a toxicidade da solução tratada estava relacionada ao ozônio disponível na solução aquosa; uma alta dose de ozônio levou à clivagem da cadeia lateral Adda da toxina e reduziu a toxicidade.

Liu e colaboradores (2016), investigaram as vias de reação envolvidas no processo UV/H₂O₂ na degradação de Microcistina. Classificaram os subprodutos em dois grupos: grupo 1, consistindo de peptídeos do anel contendo uma porção Adda; e grupo 2, consistindo de peptídeos do anel sem a fração Adda. Dado que a estrutura de dieno conjugado de Adda na MC-LR é essencial para a inibição das proteínas fosfatases 1 e 2A, determinaram que os produtos com resíduos peptídicos sem uma porção Adda sejam desintoxicados.

Jeong e colaboradores (2017), utilizaram permanganato de potássio (KMnO₄) por 60 min seguida da adição de carvão ativado em pó na oxidação de Microcistina. Vários subprodutos tóxicos com uma cadeia Adda intacta foram observados durante a reação, mas desapareceram completamente após 60 min.

Os POAs podem ser usados para degradação e mineralização parcial de poluentes, a fim de economizar custo, mas isso tem a principal desvantagem de gerar produtos de transformação que são mais tóxicos do que seus compostos originais (KARCI et. al., 2018). Neste ponto, a avaliação dos produtos de transformação e toxicidade ganha importância ao ampliar o entendimento da eficiência geral dos POAs para a degradação de poluentes ambientais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos fragmentos

Os dados dos fragmentos íons formados no período reacional de degradação da MC-LR de m/z foram obtidos de trabalhos realizados por Da Silva (2015), Miranda (2016) e Albuquerque (2017), divididos em 4 estudos de caso descritos abaixo:

Estudo de caso 1: Avaliou a eficiência do Reagente Fenton na oxidação de água desclorada contaminada com Microcistina-LR seguido das etapas de coagulação, floculação e sedimentação. Os experimentos de oxidação, coagulação, floculação e sedimentação foram realizados em JarTest simulando as etapas iniciais que fazem parte do ciclo completo de uma Estação de Tratamento de Água convencional. A concentração inicial de MC-LR foi de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$. Os valores de pH utilizados no estudo foram 2, 4.5 e 7, as concentrações de Fe^{2+} de 5, 17.5 e 30mg.L^{-1} e os tempos de sedimentação de 5, 12.5 e 20min. Em todos os tratamentos as concentrações detectadas foram inferior a $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ (DA SILVA, 2015).

Estudo de caso 2: Avaliou a eficiência da oxidação da microcistina-LR de água destinada a abastecimento público, utilizando Reagente Fenton, seguido de coagulação, sedimentação e filtração. Os experimentos de oxidação, coagulação, floculação e sedimentação foram realizados em homegeneizador de soluções modelo (H1M1) simulando as etapas iniciais que fazem parte do ciclo completo de uma Estação de Tratamento de Água convencional. A concentração inicial de MC-LR foi de $4 \mu\text{g.L}^{-1}$. O valor de pH utilizado foi de 8,5. As dosagens de $\text{Fe}^{2+} : \text{H}_2\text{O}_2$ foram utilizadas na proporção 1:3 respectivamente, correspondendo a 14 tratamentos com valores de 1, 1.25, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 10, 15, 20mM de Fe^{2+} . Os tratamentos 12, 13 e 14 obtiveram concentrações detectadas inferior a $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ (ALBUQUERQUE, 2017).

Estudo de caso 3: Investigou a degradação de microcistina-LR em solução aquosa aplicando processo oxidativo avançado (UV/ H_2O_2). Os experimentos de irradiação com concentração inicial de MC-LR ocorreram em câmara fotocatalítica (0,46 m de altura e 0,70 m de comprimento e 0,40 m de largura) na qual foram acopladas três lâmpadas germicidas de 15W cada, que emitem radiação UV no comprimento de onda de 254 nm e um sistema de agitação mecânica. Os experimentos ocorreram em placa de Petri com volume de 50 mL com uma distância de 11 cm das lâmpadas. A intensidade da radiação foi medida com um radiômetro com comprimento de onda de 254 nm (Coleparmer instrument Co. Chicago, III, 60648, séries 9811). A concentração inicial de MC-LR foi de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$. A concentração de H_2O_2 utilizada foi de 4mM e os tempos de reação foram de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 45 e 60min. A concentração de $0,7 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR foi alcançada com 15 minutos de reação (MIRANDA, 2016).

Estudo de caso 4: Avaliou a eficiência de um reator fotocatalítico de baixo custo para degradação de microcistina-LR em água de abastecimento, utilizando o processo UV/ H_2O_2 . Após o tratamento convencional, a água de estudo (AE) foi conduzida ao reator fotocatalítico (51 cm de altura e 7,5 cm de diâmetro), composto de um cano de PVC e tubo de quartzo que apresentou 50 cm de altura e 4,4 cm de diâmetro e uma lâmpada UVC com 15 w de potência e comprimento de 48 cm, para realização dos ensaios de oxidação. A concentração inicial de MC-LR foi de $3.6 \mu\text{g.L}^{-1}$. As concentrações de H_2O_2 utilizadas foram de 5, 25, 50, 100, 500, e 1000 mM e os tempos de reação foram de 0, 2.5, 5, 15, 30, 45 e 60 min. O tratamento com 1000 mM de H_2O_2 após 15 min atingiu valor de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$, aos 60 min apresentou valor de $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ (ALBUQUERQUE, 2017).

Para a identificação do composto alvo e dos subprodutos formados nos experimentos, se utilizou o Espectro de Massa (LCQ FLEET) triplo quadrupolo da marca Thermo Scientific de interface Electron-Spray Ion (ESI). O Ion Max Electrospray Ionization (ESI) foi aplicado no modo de ionização positiva. Os sistemas foram controlados pelo software Xcalibur. Para uma melhor seletividade das amostras, foram realizados no modo de aquisição por Monitoramento de Íon Específico com intervalo de varredura de 800 a 1100 m/z para MC-LR em 995,55 (M+1)⁺. A voltagem do Spray foi de 5kV para o modo positivo.

Para detecção da MC-LR remanescente no espectrômetro de massa foi necessário o emprego de técnica de concentração da amostra. Inicialmente um volume de 60 mL da amostra foi filtrada em membrana de acetato de celulose (Millipore®) de porosidade de 0,45 μm e posteriormente o volume filtrado foi concentrado em cartucho octadecil C18 para retenção da microcistina-LR. Antes de utilizar o cartucho (C18) realizou-se o processo de condicionamento utilizando 5 mL de metanol e 5 mL de água. Após concentrar a amostra, o filtrado foi descartado e o concentrado que ficou adsorvido na fase sólida no cartucho, foi recolhido e eluído com 5 mL de metanol.

4.2. Identificação estrutural

Após a coleta de dados dos fragmentos identificados nos experimentos, foi utilizado o programa ChemDraw (software de desenho químico) para formação das estruturas e fórmulas químicas e obtenção da massa exata e massa molecular de cada fragmento previamente identificado por espectroscopia de massas utilizando o Espectro de Massa (LCQ FLEET) triplo quadrupolo da marca Thermo Scientific de interface Electron-Spray Ion (ESI). Estes dados foram obtidos pelos números de íons correspondentes a diferença do íon precursor - microcistina-LR de m/z 995. Ou seja, os fragmentos foram identificados por tentativas de clivagem alterando a massa específica do peptídeo em estudo ou apenas identificando o fragmento do peptídeo intacto. Com as estruturas químicas montadas, o programa ChemSketch (software de desenho químico) foi utilizado para obtenção da nomenclatura referente a cada estrutura.

4.3. Toxicologia dos subprodutos

Para identificação dos efeitos toxicológicos dos subprodutos foram utilizados as seguintes bases de dados:

- Catálogo de toxicologia da Open Chemistry Database, acessado através da PubChem. O sistema é mantido pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI), um componente da National Library of Medicine, que faz parte dos U.S. National Institutes of Health (NIH).
- TSCA inventário de substâncias químicas da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos.
- A Agência Europeia dos Produtos Químicos (ECHA), a principal força promotora entre as autoridades reguladoras da implementação da legislação inovadora da UE em matéria de produtos químicos.
- Molbase Enciclopédia, é o banco de dados mais abrangente e inovador de produtos químicos disponíveis comercialmente na China.
- Base de dados ECOTOX database (USEPA, 2017).

Por meio de buscas nestas bases de dados, foram encontrados registros numéricos de Pubchem Cid (número de identificação da substância no site Pubchem), CE (número de registro na Comunidade Européia) e CAS Number (registro numérico de padrão mundial para substâncias químicas identificadas na literatura) referente a cada fragmento estudado.

5. RESULTADO E DISCUSSÕES

5.1. Fragmentos obtidos

Na CLAE-EM as moléculas da amostra são convertidas em íons, que são subsequentemente separados de acordo com sua razão massa (m) sobre a carga (z), m/z . A molécula protonada de MC-LR ($C_{49}H_{74}O_{12}N_{10}$) de massa $(M + H)+1 = 995$, foi selecionada em um segmento de modo de aquisição por monitoramento de íons específico (SIM). A identificação de subprodutos formados pelas reações UV/ H_2O_2 e Fenton foi realizada pelas análises de espectrometria de massas (EM) de acordo com a sensibilidade do LCQ Fleet – MS/MS, no monitoramento dos valores de m/z .

Em estudos realizados por Da Silva (2015), Miranda (2016) e Albuquerque (2017) utilizando os processos oxidativos avançados UV/ H_2O_2 e Fenton para degradação de Microcistina-LR detectaram 18 tipos de subprodutos ou fragmentos. As principais razões m/z (Tabela 2) obtidas nos experimentos com algumas repetições foram 967, 866, 860, 778, 728,

682, 681, 599, 553, 444, 375, 286, 214, 213, 161, 160, 135 e 70. Esses íons foram gerados pela clivagem de ligações peptídicas resultando em porções liberadas. Estes resultados são obtidos através dos números de íons correspondentes pela diferença do íon precursor MC-LR (m/z 995).

Tabela 2: Referências correspondentes a cada razão m/z

Razão m/z	Referência
967	Antoniou (2008)
866	Antoniou (2008), Benke (2015), Zong (2013), Zong (2013), Zong (2015)
860	Antoniou (2008)
778	-
728	Mayumi (2006)
682	Mayumi (2006), Zong (2013), Zong (2013), Antoniou (2008), Zong (2015)
681	Antoniou (2008)
599	Fastner (2001), Mayumi (2006), Antoniou (2008), Benke (2015), Zong (2015), Zong (2013)
Continuação...	
Razão m/z	Referência
553	Antoniou (2008), Mayumi (2006), Zong (2013), Zong (2013), Zong (2015)
444	-
375	Fastner (2001), Antoniou (2008), Al Momani (2010)
286	Fastner (2001), Zong (2015), Zong (2013)
214	Fastner (2001), Dahlmann & Luckas (2010), Zong (2013), Zong (2015)
213	-
161	Zong (2013)
160	-
135	Fastner (2001), Dahlmann & Luckas (2010)
70	Fastner (2001)

Os fragmentos mais encontrados na literatura foram de razões m/z 866, 682, 599, 553, 375, 286 e 214. Por outro lado, quando comparando os resultados obtidos por Miao et al. (2010) e Chang et al. (2014) os autores identificaram intermediários de peso molecular de m/z 855,

853, 835, 827, 815 e 795 aplicando o processo de ozonização, que diverge dos fragmentos de íons identificados nos experimentos. Os fragmentos de razões m/z 778, 444, 213 e 160 não foram encontrados na literatura.

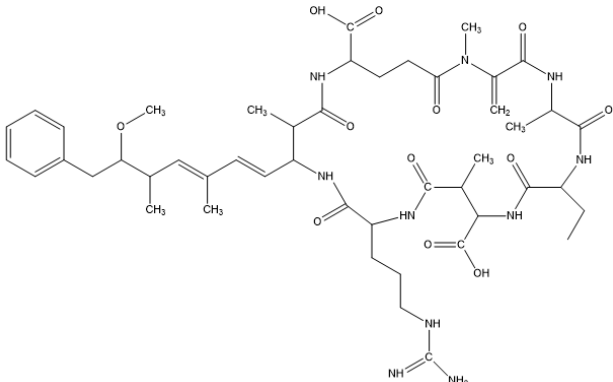
5.2. Identificação estrutural dos fragmentos

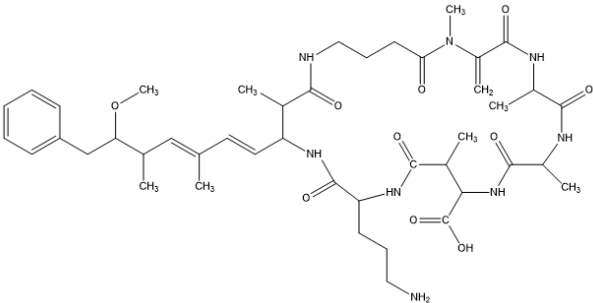
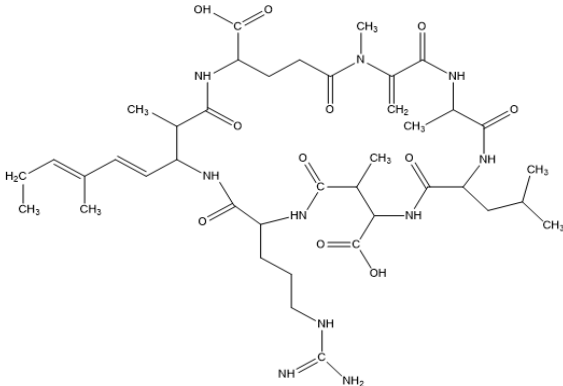
A microcistina-LR é uma molécula relativamente grande e apresenta vários grupos funcionais em diversas posições e cada grupo apresenta suscetibilidade para rompimento das ligações gerando os subprodutos da degradação (SILVA, 2015).

Embora a MC-LR apresente uma estrutura complexa, a alta eficiência de degradação por POAs pode ser atribuída pela clivagem das ligações peptídicas (CHANG et al. 2014). Segundo Lawton e Robertson (1999) relata que o radical $\text{OH}\cdot$ reage facilmente com ligações insaturadas, tais como aquelas incluídas na porção Adda da microcistina, este grupo (Adda) é comumente utilizado como um cromóforo para análise da toxina e a clivagem dessa porção resulta na eliminação da toxicidade.

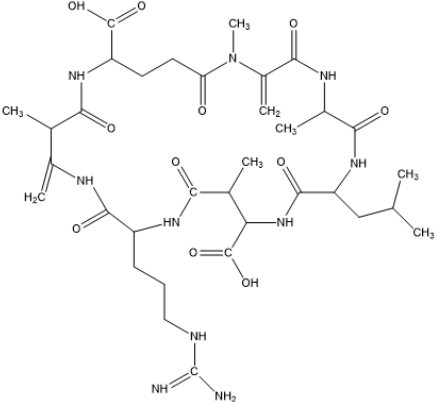
Com base nos valores de razão m/z , as fórmulas químicas e identificações estruturais dos fragmentos foram obtidas utilizando os softwares ChemDraw e ChemSketch conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3: Fontes e dados de identificação referente a cada fragmento

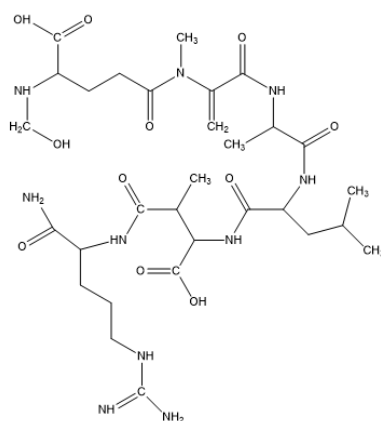
Nº	(m/z) / Fórmula Química / Registro	Estrutura Química	Estudo de caso
1	967 $\text{C}_{47}\text{H}_{70}\text{N}_{10}\text{O}_{12}$ CAS: 126268- 88-0 CID: 6441615		3

2	866 $C_{44}H_{66}N_8O_{10}$ CID: 130235479		1 e 2
3	860 $C_{40}H_{64}N_{10}O_{11}$ CID: 10284362		3 e 4

Continuação...

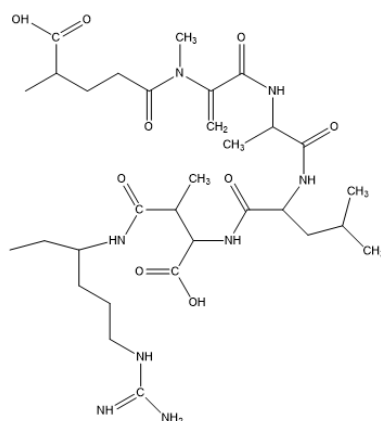
Nº	(m/z) / Fórmula Química / Registro	Estrutura Química	Estudo de caso
4	778 $C_{34}H_{54}N_{10}O_{11}$ CID: 10190796		3

5 728
 $C_{30}H_{52}N_{10}O_{11}$
 CAS: 852620-
 70-3
 CID: 71414300



1 e 2

6 682
 $C_{31}H_{54}N_8O_9$
 CAS: 852620-
 70-3
 CID: 71414300



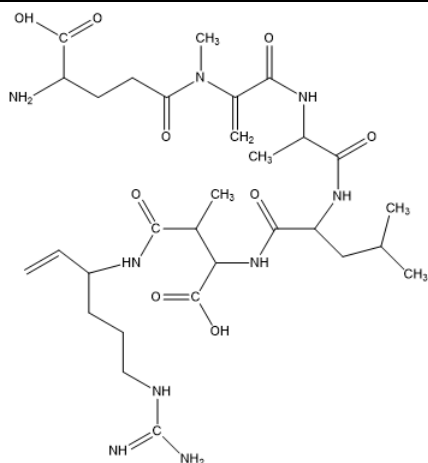
1 e 2

Continuação...

N°	(m/z) / Fórmula Química / Registro	Estrutura Química	Estudo de caso
----	---	----------------------	----------------

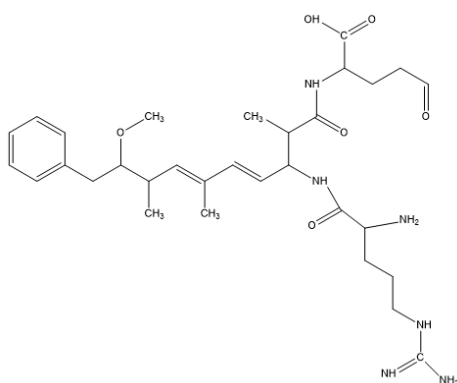
7 681 3 e 4

$C_{29}H_{47}N_9O_{10}$
CID: 88591091



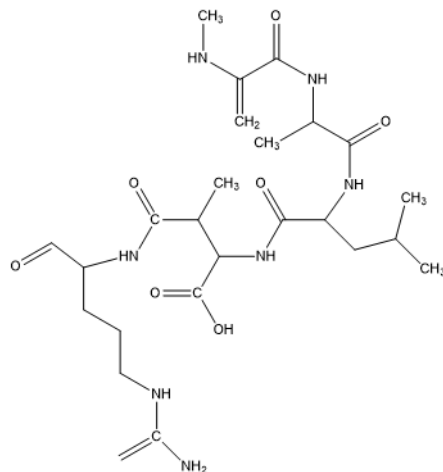
8 599 1 e 2

$C_{31}H_{48}N_6O_6$
CID: 449482



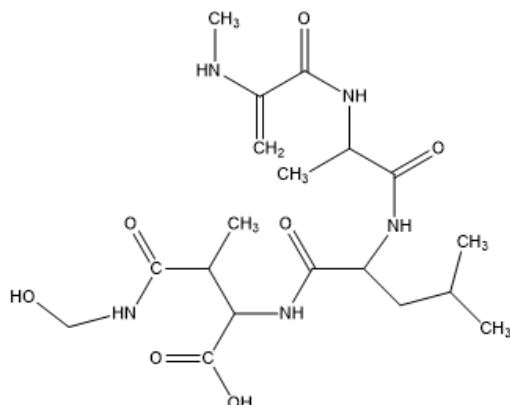
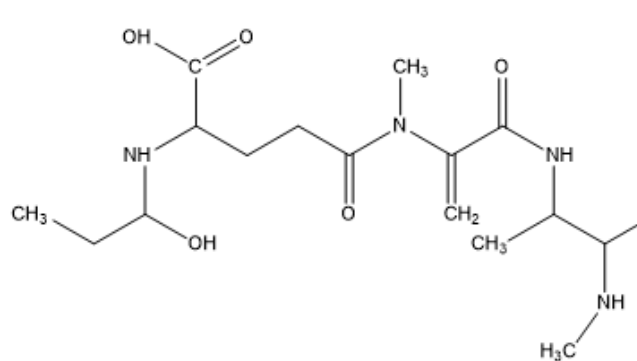
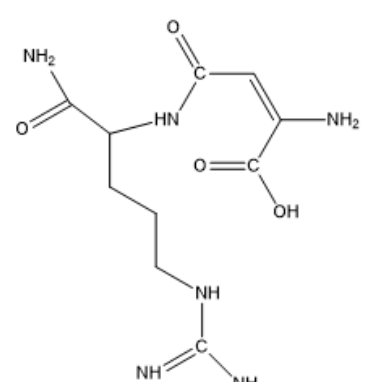
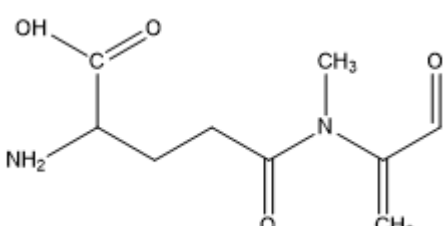
9 553 1, 2 e 3

$C_{25}H_{43}N_7O_7$
CID: 381425

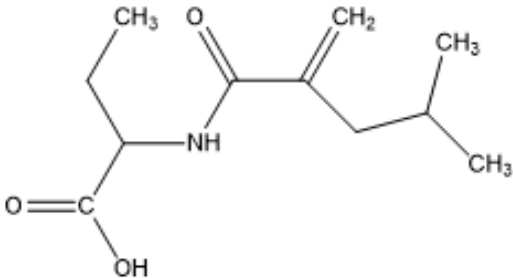
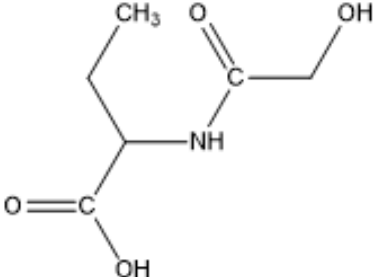
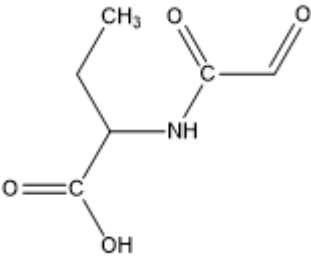
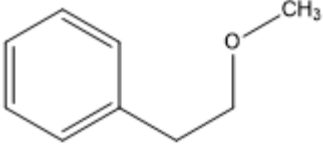
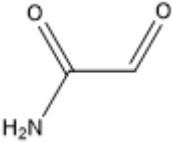


Continuação...

Nº	(<i>m/z</i>) / Fórmula Química / Registro	Estrutura Química	Estudo de caso
----	--	----------------------	----------------

- 10 444
 $C_{19}H_{33}N_5O_7$
 CID: 11568452
- 
- 11 375
 $C_{16}H_{30}N_4O_6$
 CID: 18220492
- 
- 12 286
 $C_{10}H_{18}N_6O_4$
 CAS: 674296-02-7
 CID: 3809863
- 
- 13 214
 $C_9H_{14}N_2O_4$
 CAS: 140-98-7
 CID: 5355031
- 

Continuação...

14	213 C ₁₁ H ₁₉ NO ₃ CID: 180642		3
15	161 C ₆ H ₁₁ NO ₄ CID: 56666828		3
16	160 C ₆ H ₉ NO ₄ CAS: 3103-38-6 CID: 76549 CE: 221-459-5		4
17	135 C ₉ H ₁₂ O CAS: 539-30-0 CID: 10873 CE: 208-714-6		1, 2 e 3
18	70 C ₂ H ₃ NO ₂ CAS: 60939-21-1 CID: 11708045		3

A primeira via de oxidação m/z 967 indica uma desmetilação na molécula de Microcistina-LR. Grupos metila nas porções aspartil e desidroalanina da microcistina LR são removidos (PUBCHEM, 2019). A segunda via de oxidação m/z 866 indica que houve pequenas

clivagens nas porções L-Leu, L-Arg e D-Glu. A via de oxidação com m/z de 860 indica ocorrência de quebras nos aminoácidos L-Leu, L-Arg e Adda.

A oxidação quase completa do grupamento Adda foi observada no fragmento de m/z de 778. Os fragmentos 728, 682 e 681 m/z , corresponde a completa oxidação do aminoácido Adda. Eliminando a porção responsável pela toxicidade da molécula (LAWTON E ROBERTSON, 1999). No entanto, a via de oxidação número 8 com m/z 599 está indicando uma possibilidade de clivagem nos aminoácidos Mdha e Measp, rompendo da molécula também as porções D-Ala e L-Leu.

No fragmento de m/z 553 pode-se observar uma oxidação dos aminoácidos Adda e D-Glu da molécula. No fragmento de m/z 444 encontra-se a oxidação dos aminoácidos Adda, D-Glu e L-Arg. A via de oxidação de m/z 375 indica clivagem nas porções L-Leu e Adda, liberando também os aminoácidos Measp, L-arg. O fragmento m/z 286 pode resultar na presença apenas dos aminoácidos MeAsp e L-Arg .

A razão m/z de 214 pode indicar a presença das porções Mdha e D-Glu. No entanto, o fragmento de m/z 213 observa-se presença dos aminoácidos L-Leu e MeAsp. O fragmentos de m/z 161 e 160 podem indica partes dos aminoácidos L-Leu e MeAsp, diferenciando na perda de um H no segundo. A via de oxidação 17 de m/z 135 indica a presença de parte do grupamento Adda. A razão m/z 70 pode estar relacionada a parte do grupamento MeAsp.

Zong et al., (2015) estudaram o efeito da cloração nas MC-LR e os potenciais riscos de subprodutos de desinfecção e identificaram diversos subprodutos incluindo os de m/z 214, 553 os quais correspondem aos fragmentos de íons [Glu-Mdha+H]⁺ e [Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg+H]⁺ respectivamente.

Sabe-se que o processo de degradação mediado por radical hidroxila se inicia com a incorporação de radicais hidroxila, usualmente 2, 3 ou 4, no grupamento Adda. Posteriormente, rearranjos permitem a eliminação de grupos mais lábeis (por exemplo, L-Arg e MeAsp), assim como reações de ciclização intramolecular, que levam à formação de ciclos de menor massa molar (CHANG et. Al., 2014). A princípio, a maior parte dos intermediários identificados apresenta uma estrutura molecular cíclica intacta e ao decorrer da degradação os intermediários foram sendo linearizados. Os peptídeos com peso molecular mais baixos podem ser identificados pela clivagem da porção MeAsp, L-Arg ou L-Leu.

5.3. Toxicologia dos subprodutos

Em relação a Microcistina-LR na sua forma inicial, de registros CAS: 101043-37-2, CID: 445434 e CE: 621-323-9, possui efeitos toxicológicos como dor abdominal, vômitos e diarreia, inflamação e hemorragia do fígado, pneumonia aguda, dermatite aguda, danos nos rins e potencial crescimento tumoral (EPA, 2014). Atua como hepatotóxica potente inibidora de fosfatases de proteína serina / treonina PP1 e PP2A, bem como pró-oxidantes, capazes de induzir estresse oxidativo nas células através da geração de espécies reativas de oxigênio. A LD50 pela via intraperitoneal é de aproximadamente 25-150 ug / kg de peso corporal em camundongos, a LD50 oral é de 5000 ug / kg de peso corporal em camundongos e maior em ratos (WHO, 2003). Danos graves no fígado são caracterizados por uma ruptura da estrutura celular do fígado (devido a danos no citoesqueleto), perda da estrutura sinusoidal, aumento do peso do fígado devido a hemorragia intra-hepática, choque hemodinâmico, insuficiência cardíaca e morte. Outros órgãos afetados são os rins, pulmões e intestinos (KUIPER-GOODMAN et. al., 1999).

A molécula $C_{47}H_{70}N_{10}O_{12}$ que refere-se a m/z 967, de registros CAS: 126268-88-0 e CID: 6441615, é heptapeptídeo tóxico de uma cepa axênica de *Microcystis aeruginosa* K-139. Possui as mesmas propriedades tóxicas da molécula inicial. A molécula $C_{44}H_{66}N_8O_{10}$ foi identificada como um tipo de macrolídeo, que são antibióticos que pertencem a uma família de compostos químicos caracterizada pela presença de um anel macrocíclico de lactona, cuja droga de referência é a eritromicina.

As moléculas $C_{40}H_{64}N_{10}O_{11}$ (CID: 130235479), $C_{34}H_{54}N_{10}O_{11}$ (CID: 10284362), $C_{30}H_{52}N_{10}O_{11}$ (CAS: 852620-70-3, CID: 10190796), $C_{31}H_{54}N_8O_9$ (CAS: 852620-70-3, CID: 71414300), $C_{29}H_{47}N_9O_{10}$ (CID: 71414300) e $C_{31}H_{48}N_6O_6$ (CID: 88591091) correspondentes a m/z 860, 778, 728, 682, 681 e 599 são peptídeos sem toxicidade registrada.

A molécula $C_{25}H_{43}N_7O_7$ que possui m/z de 553, de registros CAS: 864460-70-8 e CID: 381425, é um peptídeo Glicinamida. O Cloridrato de Glicinamida possui propriedades tóxicas como irritação cutânea (Categoria 2), Irritação ocular (Categoria 2) e toxicidade para órgãos-alvo específicos com exposição única, (categoria 3).

As razões m/z 444 e 375 correspondem as moléculas $C_{19}H_{33}N_5O_7$ (CID:11568452) e $C_{16}H_{30}N_4O_6$ (CID: 18220492), são peptídeos sem toxicidade registrada. A molécula $C_{10}H_{18}N_6O_4$ possui m/z 286 e registros CAS: 674296-02-7, CID: 3809863 é uma substância

química sem toxicidade registrada. As moléculas $C_{10}H_{18}N_6O_4$ (CAS: 674296-02-7, CID: 3809863) e $C_{11}H_{19}NO_3$ (CID: 180642) correspondem a m/z 214 e 213 são substâncias químicas sem registro de toxicidade. A molécula $C_6H_{11}NO_4$ (CID: 56666828) de m/z 161 corresponde ao composto Ácido 4 - [(hidroxi) (acetil) amino] butanoico que não possui toxicidade registrada.

A fórmula química $C_6H_9NO_4$ de m/z 160 e registros CAS: 3103-38-6, CID: 76549, CE: 221-459-5 corresponde ao aminoácido Glicina. A fórmula $C_9H_{12}O$ correspondente a m/z 135, de registros CAS: 539-30-0, CID: 10873, CE: 208-714-6 é éter benzílico etílico. A molécula $C_2H_3NO_2$ correspondente a m/z 70 com registros CAS: 60939-21-1, CID: 11708045 é o composto 2-Oxoacetamida pertencente a classe das glioxamidas. Estes compostos não possuem toxicidade registrada nas bases de dados.

AL MOMANI & JARRAH, 2010 e Liu e colaboradores, 2016, em estudos realizados sobre a degradação da Microcistina, remetem a toxicidade dos subprodutos da molécula à presença do grupamento Adda, apontando que os fragmentos sem o grupamento presente não sejam tóxicos.

Nos estudos de caso 1 e 2 apenas o fragmento 553 m/z apresentou registro de toxicidade, no entanto, na estrutura da molécula o grupamento Adda foi oxidado. Indicando que o fragmento não possui alta toxicidade. Porém no estudo de caso 1, o fragmento de m/z 866 apresentou o grupamento Adda em sua estrutura. Portanto o Processo Oxidativo Avançado (Fenton) pode ser empregado em Estações de Tratamento de Água na potabilização de água com concentrações elevadas de compostos orgânicos e microcistina-LR.

No estudo de caso 3 os fragmentos de íons dominantes no período reacional de m/z foram 967, 860, 778, 681, 553 e 444. Os fragmentos 967 e 553 apresentaram registros de toxicidade, indicando que o processo oxidativo avançado (UV/H_2O_2) utilizado no experimento gerou subprodutos tóxicos e de alta massa molecular na degradação de Microcistina-LR.

No experimento 4 os fragmentos não apresentaram toxicidade registrada nas bases de dados. No entanto o fragmento m/z 860 ainda apresentou parte do grupamento tóxico da molécula, além de massa molecular alta. Portanto, o Processo Oxidativo Avançado (UV/H_2O_2) utilizado apresentou pouca eficiência na oxidação da molécula de Microcistina-LR.

6. CONCLUSÕES

Foram identificados 33 subprodutos resultantes dos POAs aplicados na remoção de microcistina-LR. Entre os fragmentos identificados nas bases de dados, os de m/z 967 e 553 apresentaram toxicidade registrada. As estrutura dos fragmentos m/z 967, 866 e 860 apresentaram o grupamento tóxico da molécula (Adda), o que leva a concluir que muito provavelmente eles devem apresentar toxicidade. Tais subprodutos de oxidação não apresentaram registro de toxicidade nas bases de dados, sendo necessários testes de toxicidades registrados para uma melhor classificação toxicológica dos subprodutos gerados.

A comparação entre os processos oxidativos Fenton e UV/H₂O₂ indicou, que o Fenton apresentou melhor desempenho. Os resultados obtidos através da análise de subprodutos de oxidação de Microcistina-LR indicaram que o tratamento possibilitou a formação de compostos mais simples, com moléculas menores. Verificou-se que os processos Fenton formaram subprodutos de oxidação com moléculas menores e de baixa toxicidade, quando comparados à UV/H₂O₂. O POA UV/H₂O₂ (estudo de caso 3) gerou substâncias tóxicas e de massas moleculares maiores.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Z. I.; ABBAS, A. S. Oxidative Degradation of Phenolic Wastewater by Electro-Fenton Process Using MnO₂-graphite Electrode. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. v. 7, p. 103-108, 2019.
- AL MOMANI, F. A.; JARRAH, N. Treatment and kinetic study of cyanobacterial toxin by ozone. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*. v. 45:6, p. 719-731, 2010.
- ALBUQUERQUE, M. V. DC. Avaliação da degradação de Microcistina-LR no tratamento de água de abastecimento em sistema convencional seguido por Processo Oxidativo Avançado (POA). Dissertação de mestrado. Universidade Estadual da Paraíba, 129, 2017.
- ANTONIOU, M.G. et al. Unveiling new degradation intermediates/pathways from the photocatalytic degradation of microcystin-LR. *Environmental Science and Technology*, v. 42(23), p. 8877–8883, 2008.
- ANTONOPOULOU, M. A review on advanced oxidation processes for the removal of taste and odor compounds from aqueous media. *Water research*, v.53, p.215-234, 2014.
- ARAÚJO, L.S.; COUTINHO, A. D. R.; ALVAREZ-MENDES, M. O.; MORUZZI, R. B.; CALIJURI, M. D. C.; CUNHA, D. G. F. Caracterização e avaliação de fatores que determinam a remoção de microcistina-LR em carvão ativado granular produzido a partir de diferentes matérias-primas. *Engenharia Sanitaria Ambiental*. v. 23, p. 1131-1142, 2018.
- AZEVEDO, S.M.F.O.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W. & NAMIKOSHI, M. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology*. v. 6, p. 261-265, 1994.
- BARBOSA, A.S. Remoção de microcistina-LR de águas de abastecimento público com uso de fotocatalise homogênea (UV/H₂O₂) e avaliação de toxicidade dos possíveis subprodutos. Dissertação Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental - Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, 2016.
- BISHOP, C.T.; ANET, E.F.L.J.; GORHAM, P.R. Isolation and identification of the past-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Can.J.Biochem.Physiol*. v. 37, p. 453-471, 1959.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; HEREMAN, T. C.; CORDEIRO-ARAÚJO, M. K.; MACEDO-SILVA, I.; DIAS, C. T.; SASAKI, F. F. C.; MOURA, A. N. Phytotoxicity associated to microcystins: a review. *Brazilian Journal of Biology*. v. 74, p. 753-760, 2014.
- BOROWITZKA, M.A.; BEARDALL, J.; RAVEN, J.A. *The Physiology of Microalgae*. Springer, p. 681, 2016.
- BRASIL, 2017- Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação nº 5 de 28 de Setembro de 2017. In: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0005_03_10_2017.html. Acesso em 20/08/2019.

NAÇÕES UNIDAS, 2019 – População mundial deve chegar a 9,7 bilhões de pessoas em 2050, diz relatório da ONU In: <https://nacoesunidas.org/populacao-mundial-deve-chegar-a-97-bilhoes-de-pessoas-em-2050-diz-relatorio-da-onu/>

BRITO, N. N.; SILVA, V. B. M.; Processo Oxidativo Avançado e sua Aplicação Ambiental. Revista Eletrônica de Engenharia Civil, v. 1, p. 36-47, 2012.

CARMICHAEL, W.W., GORHAM, P.R. The mosaic nature of toxic blooms of cyanobacteria. In *The Water Environment – Algal Toxins and Health*. New York, Plenum Press, 1981.

CARMICHAEL, W.W.; AZEVEDO, S.M.F.O.; AN, J.S.; MOLICA, R.J.R.; JOCHIMSEN, E.M.; LAU, S.; RINEHART, K.L.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, v. 109, n. 7, p. 663-668, 2001.

CHANG, J.; CHEN, Z.; WANG, Z.; KANG, J.; CHEN, Q.; YUAN, L.; SHEN, J. Oxidation of microcystins-LR in water by ozone combined with UV radiation: The removal and degradation pathway. *Chemical Engineering Journal*. v. 276, p. 97-105, 2015.

CHIRON, S. et al. Pesticide chemical oxidation: State-of-the-art, *Water Research*. 34(2), 366-377, 2000.

CODD, G.A. Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance. *Water Science and Technology*, 32 (4): 149-156; 1995.

CRITTENDEN, J. C.; TRUSSEL, R. R.; HAND D. W.; HOWE, K. J.; TCHOBANOGLOUS, G. *Water Treatment: Principles and Design*, 3 ed., 2012.

DA COSTA, F. M.; DAFLON, S. D. A.; BILA, D. M.; DA FONSECA, F. V.; CAMPOS, J. C. Evaluation of the biodegradability and toxicity of landfill leachates after pretreatment using advanced oxidative processes. *Waste Management*. v. 76, p. 606-613, 2018.

DA SILVA, A. G. Avaliação do Ph de Oxidação do Processo Fenton na remoção de Microcistina-LR de água de abastecimento. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual da Paraíba, p. 105, 2015.

DE LA CRUZ, A. A.; ANTONIOU, M. G.; HISKIA, A.; PELAEZ, M.; SONG, W.; O`SHEA, K.; E.; HE, X.; DIONYSIOU, D. D. Can We Effectively Degrade Microcystins? - Implications on Human Health. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. v. 11, p. 19-37, 2011.

DOMÈNECH, X., JARDIM, W. F., LITTER, M. I. Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. In: *Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogênea*. Cap. 1, Rede CYTED, La Plata, 2001.

EPA, 2014. Cyanobacteria and Cyanotoxins: Information for Drinking Water Systems. Environmental Protection Agency, 2014. https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-08/documents/cyanobacteria_factsheet.pdf

ESTEVEES, F. A. Fundamentos de Limnologia. Editora Interciência, 3 ed., 2011.

ESTEVEES-FERREIRA, A. A.; CAVALCANTI, J. H. F.; VAZ, M. G. M. V.; ALVARENGA, L. V.; NUNES-NESE, A.; ARAUJO, W. L. Cyanobacterial nitrogenases: phylogenetic diversity, regulation and functional predictions. *Genetics and Molecular Biology*. v. 40, p. 261-275, 2017.

FERNANDES, A.; MAKOS, P.; BOCZKAJ, G. Treatment of bitumen post oxidative effluents by sulfate radicals based advanced oxidation processes (S-AOPs) under alkaline pH conditions. *Journal of Cleaner Production*. v. 195, p. 374-384, 2018.

FERNANDES, A.; MAKOS, P.; KHAN, J. A.; BOCZKAJ, G. Pilot scale degradation study of 16 selected volatile organic compounds by hydroxyl and sulfate radical based advanced oxidation processes. *Journal of Cleaner Production*. v. 208, p. 54-64, 2019.

FIGUEIREDO, M.; SANTOS, E.P.; SCHMACHTENBERG, N. Processos oxidativos avançados: fundamentos e aplicação ambiental. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, v.18, p.79-91, 2014.

GER, K. A.; HANSSON, L-A; LURLING, M. Understanding cyanobacteria-zooplankton interactions in a more eutrophic world. *Freshwater Biology*. v. 59, p. 1783-1798, 2014.

GUERRA, A.B. ; TONUCCI, M.C. ; CEBALLOS, B.S.O.; GUIMARÃES, H. I. R. C. ; LOPES, W.S; AQUINO, S. F; LIBÂNIO, M. Remoção de microcistina-LR de águas eutrofizadas por clarificação e filtração seguidas de adsorção em carvão ativado granular. *Engenharia Sanitária e Ambiental (Online)*. v. 20, p. 603-612, 2015.

HAVLIKOVA, L. SATINSKY, D. SOLICH, P. Aspects of decontamination of ivermectin and praziquantel from environmental waters using advanced oxidation technology. *Chemosphere*. v. 144, p. 21-28, 2016.

HOLLAND, A; KINNEAR, S. Interpreting the possible ecological role(s) of cyanotoxins: compounds for competitive advantage and/or physiological aide? . *Mar Drugs*. Jun 27;11(7):2239-58, 2013.

HUANG, C.P.; DONG, C.; TANG, Z. Advanced chemical oxidations: its present role and potencial future hazardous waste treatment. *Waste Manage*, v13, p.361-377, 1993.

IBERLINGS, B.W., CHORUS, I. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater seafood and its consequences for public health: a review. *Environ. Pollut. (Oxford, U. K.)*. v. 150 (1), p.177–192, 2007.

INCE, N. H. Ultrasound-assisted advanced oxidation processes for water decontamination. *Ultrasonics – Sonochemistry*. v. 40, p. 97-103, 2018.

JACOBS, L. C. V.; PERALTA-ZAMORA, P. CAMPOS, P. R.; PONTAROLO, R. Photocatalytic degradation of microcystin-LR in aqueous solutions. *Chemosphere*. v. 90, p. 1552-1557, 2013.

Jacobs, L.C. V et al. Photocatalytic degradation of microcystin-LR in aqueous solutions. *Chemosphere*, v. 90(4), p.1552–1557, 2013.

JEONG, B.; OH, M-S.; PARK, H-M.; PARK, C.; KIM, E-J.; 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.

KARCI, A.; WURTZLER, E. M.; DE LA CRUZ, A. A.; WENDELL, D.; DIONYSIOU, D. D. Solar photo-Fenton treatment of microcystin-LR in aqueous environment: Transformation products and toxicity in different water matrices. *Journal of Hazardous Materials*. v. 349, p. 282-292, 2017.

KLUGE, R. A.; TEZOTO-ULIANA, J. V.; SILVA, P. P. M. Aspectos fisiológicos e ambientais da fotossíntese. *Revista Virtual de Química*, Niterói, v. 7, n. 1, p. 56-73, 2015.

KUIPER-GOODMAN, T., FALCONER, I. & FITZGERALD, J. (1999). Human health aspects. In Chorus, I. & Bartram, J. (Eds). *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. E & FN Spon. London. New York. pp. 134-178.

LE MOAL, M.; GASCUEL-ODOUX, C.; SOUCHON, Y.; ETRILLARD, C.; LEVAIN, A.; MOATAR, F.; PANNARD, A.; SOUCHU, P.; LEFEBVRE, A.; PINAY, G. Eutrophication: A new wine in an old bottle?. *Science of the Total Environment*. v. 651, p. 1-11, 2019.

LI, H.; ZHANG, J; ZHE, C.; YANG, B. FENG.L. Gankyrin as a potential target for tumor therapy: evidence and perspectives *American J. Transl Res*;10(7):1949-1960; 2018.

LINS, R. P. M.; BARBOSA, L.G.; MINILLO, A.; CEBALLOS, B.S.O. Cyanobacteria in a eutrophicated reservoir in a semi-arid region in Brazil: dominance and microcystin events of blooms. *Revista Brasileira de Botânica*. v. 39, p. 583-591, 2016.

LIU, Y.; REN, J.; WANG, X.; FAN, Z. Mechanism and Reaction Pathways for

MADIGAN, M. T. et al. *Microbiologia de Brock*. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

MARENGO, J. A.; TORRES, R.R.; ALVES, L.M. Drought in Northeast Brazil—past, present, and future. *Theoretical and Applied Climatology*. Volume 129, pp 1189–1200, August 2017.

METCALF & EDDY. *Tratamento de Efluentes e Recuperação de Recursos*. 5 ed. Porto Alegre, 2016.

Microcystin-LR Degradation through UV/H₂O₂ Treatment. *PLOS ONE*, 2016. Em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156236>

MIKLOS, D. B.; HARLI, R.; MICHEL, K. G.; DREWES, J. E.; HUBNER, U. UV/H₂O₂ process stability and pilot-scale validation for trace organic chemical removal from wastewater treatment plant effluents. *Water Research*. v. 136, p. 169-179, 2018.

- MIRANDA, A. C. Degradação de microcontaminantes emergentes e inativação de cepa de *E. coli* resistentes a antibióticos por Processos Oxidativos Avançados. Tese de doutorado. Universidade Estadual da Paraíba. p. 149, 2016.
- MOREIRA, C.; VASCONCELOS, V.; ANTUNES, A. Phylogeny and Biogeography of Cyanobacteria and Their Produced Toxins. *Marine Drugs*. v. 11, p. 4350-4369, 2013.
- NOGUEIRA, R.F.P. Fundamentos e aplicações ambientais dos processos fenton e foto-fenton. *Química Nova*, v.30, n.2, p.400-408, 2007.
- PAERL, H. W.; HUISMAN, J.; Blooms Like it Hot. *Science*. v. 320, p. 57-58, 2009.
- PANOSO, R. ; COSTA, IVANEIDE A. S. ; , SOUZA, N. R , ATTAYDE, J.L. ; CUNHA, S. R. S.; GOMES, F. C. F. Cianobactérias e cianotoxinas em reservatórios do estado do Rio Grande do Norte e o potencial controle das florações pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Oecologia . Bras.*, 11 (3): 433-449, 2007.
- PANTELIC, D.; SVIRCEV, Z.; SIMEUNOVIC, J.; VIDOVIC, M.; TRAJCOVIC, I. Cyanotoxins: Characteristics, production and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia. *Chemosphere*. v. 91, p. 421-441, 2013.
- PARK, J-A.; 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, 2018.
- RABALAIS, N. N.; DIAZ, R. J.; LEVIN, L. A.; TURNER, R. E.; GILBERT, D.; ZHANG, J. Dynamics and distribution of natural and human-caused hypoxia. *Biogeosciences*. v. 7, p. 585-619, 2010.
- RAJORIYA, S.; BARGOLE, S.; GEORGE, S.; SAHARAN, V. K. Treatment of textile dyeing industry effluent using hydrodynamic cavitation in combination with advanced oxidation reagentes. *Journal of Hazardous Materials*. v. 334, p. 1109-1115, 2018.
- RAMOS, R. O. SILVA, J. N., ALBUQUERQUE, C. M. V., LOPES, W. S., Estudo de fatores que modificam a constante da cinética de reação no processo foto-Fenton, *Anais I CONIDIS*, v. 1, ISSN 2526-186X, 2016.
- REHMAN, F.; SAYED, M.; KHAN, J. A.; SHAH, N. S.; KHAN, H. M.; DIONYSIOU, D. D. Oxidative removal of brilliant green by UV/S₂O₈²⁻, UV/H₂SO₅ and UV/H₂O₂ processes in aqueous media: A comparative study. *Journal of Hazardous Materials*. v. 357, p. 506-514, 2018.
- RIGOSI, A.; CAREY, C. C.; IBELINGS, B. W.; BROOKES, J. D. The interaction between climate warming and eutrophication to promote cyanobacteria is dependent on trophic state and varies among taxa. *Limnology Oceanography*. v. 59, p. 99-114, 2014.
- SHAN YF, ZHOU WP, FU XY, YAN HX, YANG W, LIU SQ, CAO HF, KANG B, WU MC, WANG HY. The role of p28GANK in rat oval cells activation and proliferation. *Liver Int*; v. 26, p. 240-247, 2006.

SHARMA, V. K.; TRIANTIS, T. M.; ANTONIOU, M. G.; HE, X.; PELAEZ, M.; HAN, C.; SONG, W.; O'SHEA, K. E.; DE LA CRUZ, A. A.; KALOUDIS, T.; HISKIA, A.; DIONYSIOU, D. D. Destruction of microcystins by conventional and advanced oxidation processes: A review. *Separation and Purification Technology*. v. 91, p. 3-17, 2012.

SILVA, M. N. C. E.; OLIVEIRA, R. CEBALLOS, B. S. O.; GUERRA, A.B.; AQUINO, S. F.; LIBÂNIO, M. Hierarquização da eficiência de remoção de cianotoxinas por meio de adsorção em carvão ativado granular. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 22, p. 691-697, 2017.

SINHA, E.; MICHALAK, A. M.; BALAJI, V. Eutrophication will increase during the 21st century as a result of precipitation changes. *Science*. v. 357, p. 405-408, 2017.

SIVONEN, K.; GARY JONES, G. Cyanobacterial Toxins. In Ingrid Chorus and Jamie Bartram, (Editores) *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, 1999.

SOARES, M. C. S.; HUSZAR, V. L. M.; MIRANDA, M. N.; MELLO, M. M.; ROLAND, F.; LURLING, M. Cyanobacterial dominance in Brazil: distribution and environmental preferences. *Hydrobiologia*. v. 717, p. 1-12, 2013.

SUAVE, S.; DESROSIERS, M. A review of what is an emerging contaminant. *Chemistry Central Journal*. v. 8, p. 1-7, 2014.

TEXEIRA, C.R.A.B.; JARDIM, W. Caderno Temático 3. Processos Oxidativos Avançados. Conceitos Teóricos. UNICAMP., 83 pag, 2004. Em: <http://lqa.iqm.unicamp.br/cadernos/caderno3.pdf>

THANEKAR, P.; PANDA, M.; GOGATE, P. R. Degradation of Carbamazepine Using Hydrodynamic Cavitation Combined With Advanced Oxidation Processes. *Ultrasonics Sonochemistry*. v. 40, p. 567-576, 2018.

USEPA, 2017. ECOTOX User Guide: ECOTOXicology Database System, Version 4.0. U.S. Environmental Protection Agency (2017) <https://cfpub.epa.gov/ecotox/>

VASCONCELOS, J. F; BARBOSA, J.E.L.DINIZ, C.R.; CEBALLOS, B.S.O. Cianobactérias em reservatórios do Estado da Paraíba: ocorrência, toxicidade e fatores reguladores. *Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia*, v. 39, n. 2, p. 1-20, 2011.

VOLLENWEIDER, R. A. Scientific fundamentals of the eutrophication of lakes and flowing waters, with particular reference to nitrogen and phosphorus as factors in eutrophication. Organisation for Economic Co-operation and Development. Directorate for Scientific Affairs. Paris, 1968.

WEIRICH, C.A.; MILLER, T.R. Freshwater Harmful Algal Blooms: Toxins and Children's Health. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, v.44, p.2-24, 2014.

WELKER, M.; VON DOHREN, H. Cyanobacterial peptides – mature's own combinatórias biosynthesis. *FEMS microbiology reviews*. v. 30, p. 530-630, 2006.

WHITTON, B.A.;POTTS, M. Introduction to the cyanobacteria . In: WHITTON, B.A. (Org.) Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time, New York: Springer, p.1-13, 2012.

WHO, 2003. Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in Drinking-water. World Health Organization, 2003.
https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/cyanobactoxins.pdf

ZEGURA, B.; STRASER, A.; FILIPIC, M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins – a review. Mutation Research. v. 727, p. 16-41, 2011.

ZONG, W; SUN, F.; SUN, X. Oxidation by-products formation of microcystin-LR exposed to UV/H₂O₂: Toward the generative mechanism and biological toxicity. Water Research, v 47. p 1-9, 2013.