



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA – UEPB
PRÓ - REITORIA DE PÓS - GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL
DOUTORADO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO TÓXICO DE CIANOTOXINAS E
SEUS SUBPRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR PROCESSOS OXIDATIVOS
AVANÇADOS**

MARIA VIRGÍNIA DA CONCEIÇÃO ALBUQUERQUE

Linha de pesquisa: Tecnologias de Tratamento de Água e de Resíduos

Orientador: Prof. Dr. Wilton Silva Lopes

CAMPINA GRANDE - PB

2022

MARIA VIRGÍNIA DA CONCEIÇÃO ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO TÓXICO DE CIANOTOXINAS E
SEUS SUBPRODUTOS DE DEGRADAÇÃO POR PROCESSOS OXIDATIVOS
AVANÇADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, em cumprimento as exigências para obtenção do título de Doutor em Engenharia Ambiental.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Wilton Silva Lopes

CAMPINA GRANDE - PB

2022

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.

A345a Albuquerque, Maria Virgínia da Conceição.

Avaliação do potencial efeito tóxico de cianotoxinas e seus subprodutos de degradação por processos oxidativos avançados [manuscrito] / Maria Virgínia da Conceição Albuquerque. - 2022.

177 p. : il. colorido.

Digitado.

Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia , 2022.

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

1. Tratamento de água. 2. Cianobactérias. 3. Ecotoxicidade. 4. Processo Oxidativo Avançado - POA. I. Título

21. ed. CDD 628.3

MARIA VIRGÍNIA DA CONCEIÇÃO ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO TÓXICO DOS SUBPRODUTOS
FORMADOS NA DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA-LR POR PROCESSOS
OXIDATIVOS AVANÇADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, em cumprimento as exigências para obtenção do título de Doutor em Engenharia Ambiental.

Aprovada em 26 de agosto de 2022,

BANCA EXAMINADORA



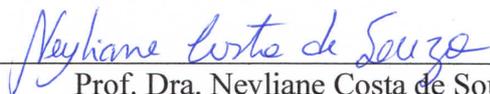
Prof. Dr. Wilton Silva Lopes
Orientador



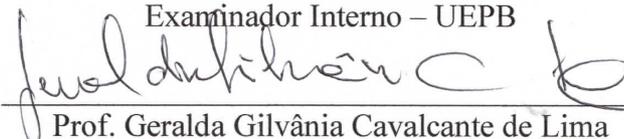
Prof. Dra. Wilza da Silva Lopes
Examinador Externo - UFERSA



Prof. Dra. Juliana Delgado Tinoco
Examinador Externo - UFRN



Prof. Dra. Neyliane Costa de Souza
Examinador Interno - UEPB



Prof. Geralda Gilvânia Cavalcante de Lima
Examinador Interno - UEPB

Dedicatória

A minha Mãe, Josélia Albuquerque de Farias Leite ♥

Fonte de amor e inspiração.
Exemplo de força e coragem.
Por depositar toda confiança, acreditando em
meus sonhos e objetivos.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Virgem Maria, pela presença constante, fiel companhia, por me conduzirem tão firmemente. Obrigada por toda proteção de vida e amor, não permitindo desistir mesmo diante das dificuldades acadêmicas, e dificuldades impostas pelo isolamento social devido ao Coronavírus (2020 – 2021), que ocasionou em várias mudanças desta Pesquisa. E principalmente, por serem minha força e suporte de resiliência diante das perdas irreparáveis ao longo destes 4 anos.

Agradeço a minha família, pelo apoio constante e compreensão nos momentos em que precisei me ausentar para poder chegar até aqui: A minha querida e amada Mãe, Josélia Albuquerque de Farias Leite ♥ - que se orgulhava com minhas escolhas...que me acompanhou nas três etapas iniciais deste processo e sonhava estar comigo na defesa final. Foi muito difícil este último ano sem suas orações de perto, sem seu abraço, sem seu incentivo, sem seu amor. Esse Título é nosso Mãe! Conseguimos! Sei que do Alto a senhora intercedeu por mim!

Ao meu querido pai Dorgival Cândido de Albuquerque. Aos meus irmãos: Roberta Albuquerque, Dorgival Júnior e Danyllo Wagner Albuquerque por serem meus exemplos de resiliência, força e fé. Agradeço aos meus amados sobrinhos: Rafael, Maria Eduarda, Gabriel, Eliza e Lis por todo amor e alegria nos momentos de descanso e descontração.

Ao meu esposo Leonardo Fragoso Martins, que foi meu esteio de força, compreensão e amor ao longo desses anos. Obrigada meu Amor! Sem ti, seria mais difícil. Te amo!

Agradeço ao meu Orientador Prof. Dr. Wilton Silva Lopes, pela oportunidade, disposição e por todo aprendizado compartilhado. Obrigada pela paciência nas minhas dúvidas e orientação na Pesquisa.

As professoras Dra. Wilza Lopes, Juliana Tinôco, Neyliane Costa e Gilvânia Cavalcante por prontamente aceitarem o convite de integrar a Banca Examinadora, dispondo de seu tempo, atenção e experiência para o enriquecimento e melhorias desse trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, em especial ao prof. Valderi Leite, prof. José Tavares (*in memoriam*) e a prof. Beatriz Ceballos, pelos ensinamentos, estímulos e conselhos.

A Giselaïne, Chayenny, Luciana, Regina, Milena e Ana Alice por todas as trocas de conhecimentos, dúvidas durante as disciplinas cursadas e pelos momentos de descontração e incentivo.

Agradeço a todos os funcionários, técnicos, graduandos, pós graduandos e pós Doc's da EXTRABES que me auxiliaram durante o desenvolvimento da Pesquisa. Obrigada Extrabianos (as) por toda parceria e aprendizado ao longo desses 6 anos de Pós-Graduação.

A Railson Ramos, pela amizade e por todo auxílio nas dúvidas de modelagem e estatística dos dados.

Aos meus amigos (as) que me fortaleceram nos momentos de fragilidade e me transmitiram alegria nos momentos de distração. Eu sou grata a Deus por cada um. Tê-los em minha vida é um privilégio.

A UEPB pela oportunidade do Doutorado, e a CAPES pela concessão da bolsa.

“Pela persistência e fé, respaldadas na sinceridade dos que crêem na força humana e de Deus, não tardará que o impossível mude-se no difícil e este no possível, a depender tão só do que tenhamos no íntimo. Não importam e nem contam os tropeços da caminhada; o importante é caminhar na perseguição consciente da meta a atingir-se, mesmo que custosa e, por vezes, aparentemente inatingível”.

(Autor desconhecido).

RESUMO

As cianobactérias estão distribuídas em todo o mundo e suas florações são preocupantes em ecossistemas aquáticos uma vez que reduzem a qualidade d'água e a eficiência do fluxo de energia dos produtores para os consumidores, pois possuem baixo valor nutricional e geram cianotoxinas. A aplicação de tratamentos isolados e/ou complementar pode ser uma solução na redução ou eliminação destes microrganismos. Neste caso, os processos oxidativos avançados (POA's) constituem uma classe especial de técnicas de oxidação apontadas como propícias, produzindo radicais livres de hidroxilas (OH[·]), os quais são tradicionalmente considerados como espécies ativas, responsáveis pela reação rápida de diversas moléculas orgânicas, todavia, apresentam restrições de aplicação em condições de elevada concentração dos poluentes e há formação de subprodutos de reação, os quais em alguns casos são tóxicos. Neste contexto, esta pesquisa teve por objetivo identificar, quantificar e avaliar o potencial efeito tóxico de cianotoxinas e subprodutos formados da degradação de microcistina-LR por processo oxidativo avançado Fenton. Para tanto, a pesquisa foi dividida em cinco etapas. No primeiro momento buscou-se compreender o estado da arte das pesquisas relacionadas ao tema, partindo de uma análise descritiva, com posterior análise aprofundada de estudos atuais, descrito no capítulo 1. O capítulo 2 e 3 descrevem os efeitos crônicos e agudos de cianotoxinas (MC-LR, SXT, ATX-A e CYN) utilizando como organismos teste a *Chlorella vulgaris* e *Daphnia magna*, respectivamente. A eficiência do processo oxidativo avançado (Fenton) na degradação de microcistina-LR e seus subprodutos foram avaliados por modelagem molecular computacional, espectrometria de massa e testes *in vivo* com *Chlorella vulgaris* e *Daphnia magna* e encontram-se apresentados no capítulo 4. Por fim, o quinto e último capítulo apresenta a fitotoxicidade dos extratos lisados de cianotoxinas sobre a germinação, crescimento do hipocótilo, alongamento radicular e desenvolvimento inicial das plântulas de sementes de alface (*Lactuca sativa L.*), bem como avaliação dos subprodutos de MC-LR obtidos após o processo oxidativo Fenton. O estudo de tratamento toxicológico e de oxidação promoveu a determinação de efeitos deletérios destes micropoluentes orgânicos, possibilitando a verificação das características ecotoxicológicas, mecanismos de ação sobre organismos vivos e definição de diretrizes para controle da qualidade dos efluentes eutrofizados.

Palavra-Chave: Tratamento de água; Cianobactérias. Ecotoxicidade; Processo Oxidativo Avançado – POA.

ABSTRACT

Cyanobacteria are distributed throughout the world and their blooms are a concern in aquatic ecosystems since they reduce water quality and the efficiency of energy flow from producers to consumers, as they have low nutritional value and generate cyanotoxins. The application of associated and/or complementary treatments can be a solution in the reduction or elimination of these microorganisms. In this case, advanced oxidative processes (AOP's) constitute a special class of oxidation techniques indicated as favorable, producing hydroxyl free radicals (OH.), which are traditionally considered as active species, responsible for the rapid reaction of several organic molecules, however, they present application restrictions in conditions of high concentration of pollutants and there is formation of reaction by-products, which in some cases are toxic. In this context, this research aimed to identify, quantify and evaluate the potential toxic effect of cyanotoxins and by-products formed from the degradation of microcystin-LR by Fenton's advanced oxidative process. Therefore, the research was divided into five stages. At first, we sought to understand the state of the art of research related to the topic, starting from a descriptive analysis, with subsequent in-depth analysis of current studies, described in chapter 1. Chapter 2 and 3 describe the chronic and acute effects of cyanotoxins (MC-LR, SXT, ATX-A and CYN) using *Chlorella vulgaris* and *Daphnia magna* as test organisms, respectively. The efficiency of the advanced oxidative process (Fenton) in the degradation of microcystin-LR and its by-products were evaluated by computational molecular modeling, mass spectrometry and in vivo tests with *Chlorella vulgaris* and *Daphnia magna* and are presented in chapter 4. Finally, the fifth and last chapter presents the phytotoxicity of lysed extracts of cyanotoxins on germination, hypocotyl growth, root elongation and initial development of seedlings of lettuce seeds (*Lactuca sativa L.*), as well as evaluation of the MC-LR by-products obtained after the Fenton oxidative process. The study of toxicological and oxidation treatment promoted the determination of deleterious effects of these organic micropollutants, allowing the verification of ecotoxicological characteristics, mechanisms of action on living organisms and definition of guidelines for quality control of eutrophic effluents.

Keyword: Water treatment; Cyanotoxins. Ecotoxicity; Advanced Oxidative Process; Ecotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Espécie <i>Microcystis aeruginosa</i>	31
Figura 2. Estrutura geral da microcistina - LR.....	32
Figura 3. Espécie <i>Raphidiopsis raciborskii</i>	34
Figura 4. Estrutura molecular da saxitoxina	35
Figura 5. Estrutura molecular da cilindrospermopsina.....	37
Figura 6. Espécie <i>Dolichospermum solitarium</i>	38
Figura 7. Estrutura molecular da anatoxina – a.....	39
Figura 8. Organismos representantes de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar..	51

CAPÍTULO 2

Figura 1. Curva de Crescimento da espécie microalgal <i>Chlorella vulgaris</i>	75
Figura 2. Crescimento médio (duplicações/dia) de <i>Chlorella vulgaris</i> após 24, 48, 72 e 96h de exposição as cianotoxinas, avaliado pela densidade celular (cel.mL ⁻¹).....	78
Figura 3. Taxa de incremento (Cla-a/dia) após 96h de exposição de <i>Chlorella vulgaris</i> as cianotoxinas.....	80
Figura 4. Percentuais de inibição da clorofila–a no de crescimento de <i>Chlorella vulgaris</i> a exposição a diferentes cianotoxinas.....	81
Figura 5. Valores de pH durante o monitoramento sistemas com <i>Chlorella vulgaris</i> na presença de diferentes cianotoxinas.	82

CAPÍTULO 3

Figura 1. Avaliação da CE ₅₀ sobre a sensibilidade de <i>Daphnia magna</i> a dicromato de potássio.....	101
Figura 2. Percentual de imobilidade (CE ₅₀) em <i>Daphnia magna</i> após 48h de exposição a diferentes diluições tipos de cianotoxinas extracelular.....	102
Figura 3. Percentual de imobilidade (CE ₅₀) em <i>Daphnia magna</i> após 48h de exposição a diferentes diluições tipos de cianotoxinas intracelular.....	104
Figura 4. Percentual de imobilidade (CE ₅₀) em <i>Daphnia magna</i> após 48h de exposição a diferentes concentrações de saxitoxina (SXT).....	108

CAPÍTULO 4

Figura 1. Remoção de cor, turbidez e MC-LR durante as etapas de coagulação, decantação e filtração	124
Figura 2. Espectros (m/z) dos subprodutos obtidos após degradação de MC-LR por Fenton.....	126
Figura 3. Área de superfície polar topológica obtida por modelagem computacional. (a) – molécula 3D de subproduto m/z 445; (b) – molécula 3D de MC-LR; (c) – área de superfície polar topológica do subproduto m/z 445; (d) – área de superfície polar topológica de MC-LR.....	128
Figura 4. Inibição do crescimento de <i>Chlorella vulgaris</i> em função da concentração de MC-LR no meio de exposição (a) e imobilidade de <i>Daphnia magna</i> em função da concentração de MC-LR no meio de exposição (b)	130
Figura 5. Superfície de resposta de inibição do crescimento de <i>Chlorella vulgaris</i> e curva de inibição de clorofila após 96 horas de exposição.....	132

CAPÍTULO 5

- Figura 1.** Índice de germinação de semente de *Lactuca sativa* de expostas a cianotoxinas presentes em extratos brutos de cianobactérias **161**
- Figura 2.** Inibição de crescimento do hipocótilo de *Lactuca sativa* à exposição de diferentes cianotoxinas **162**
- Figura 3.** Inibição de crescimento radicular de *Lactuca sativa* à exposição de diferentes cianotoxinas. **163**
- Figura 4.** Percentual de inibição de germinação em *L. sativa* exposta a diferentes concentrações de *Microcystis aeruginosa* e efluente Fenton (EF) tratado (valores após a linha direita representam resposta positiva para toxicidade em comparação ao controle **164**
- Figura 5.** Percentual de inibição do crescimento radicular em *L. sativa* exposta a diferentes concentrações de *Microcystis aeruginosa* e efluente Fenton (T) tratado (valores após a linha a direita representam resposta positiva para toxicidade em comparação ao controle).....**165**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Valores Máximos Permitidos (VMP) para cianotoxinas em águas para consumo humano 40

Tabela 2. Classificação dos sistemas típicos de processos oxidativos avançados..... 42

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade com *Chlorella vulgaris*.. 74

Tabela 2. Médias das taxas de crescimento (duplicações/dia) e inibição (%) de *Chlorella vulgaris* após a exposição de Sulfato de zinco heptahidratado obtidas pela densidade celular e após 96h pelo conteúdo de clorofila – a..... 76

Tabela 3. Médias de inibição de crescimento de *Chlorella vulgaris* após 96h de exposição das cianotoxinas..... 83

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Preparo das diluições teste a partir da solução-estoque de dicromato de potássio..... 99

Tabela 2. Resumo dos requisitos para o ensaio toxicidade aguda com *Daphnia magna*.....99

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Principais fragmentos identificados nos efluentes de oxidação MC-LR e seus compostos moleculares.....126

Tabela 2. Propriedades moleculares de MC-LR e subproduto m/z 445 obtidos por modelagem computacional.....129

Tabela 3. Crescimento médio de *Chlorella vulgaris* após 24, 48, 72 e 96h de exposição aos subprodutos de oxidação de MC-LR e dados de inibição de clorofila após 96h de exposição.....**131**

Tabela 4. Resultados dos testes de toxicidade após 48 h de exposição de *D. magna* aos subprodutos da oxidação do MC-LR.....**135**

CAPÍTULO 5

Tabela 1. Resumo dos requisitos para o ensaio de fitotoxicidade**157**

Tabela 2. Classificação dos efeitos fitotóxicos..... **159**

Tabela 3. Taxa de germinação e coeficiente de variação (CV%) do controle negativo..
..... **160**

Tabela 4. Coeficiente de variação (%) dos ensaios em relação ao crescimento da radícula e hipocótilo.....**162**

Tabela 5. Crescimento médio das plântulas de *Lactuca sativa* expostas a diferentes concentrações de *Microcystis aeruginosa* e efluente Fenton **168**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS e UNIDADES

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

AD – Água decantada

AE – Água de Estudo

AF – Água filtrada

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AO – Água oxidada

APHA - American Public Health Association

ATX-A – Anatoxina - a

CE₅₀ - Concentração efetiva que causa efeito tóxico a 50% dos organismos teste

CENO – Concentração de efeito não observado

CEO – Concentração de efeito observado

CL₅₀ - Concentração Letal que causa efeito tóxico a 50% dos organismos teste

CLAE/EM – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas.

COD – Carbono orgânico dissolvido

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CYN – Cilindrospermopsina

DP – Desvio Padrão

DL – Dose letal

EFS – Extração de Fase Sólida

ETA – Estação de Tratamento de Água

EXTRABES – Estação Experimental de Tratamento Biológico de Esgotos Sanitários

Fe²⁺ - Íons ferroso

Fe³⁺ - Íons férrico

FL – Filtro de Laboratório

FTd – Fator de diluição

g - Grama

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

H₂O - Água

I- Inibição

ISO- Organização Internacional de Normalização
LAQUISA – Laboratório de Química e Sanitária Ambiental
LR- Leucina-Arginina
MON – Matéria orgânica natural
MC-LR – Microcistina-LR
mg. L – Miligramas por litro
MIB – 2-metilisoborneol
NAg – Nanopartículas de prata
OCDE - Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OH – Hidroxila
OMS – Organização Mundial de Saúde
pH – Potencial hidrogeniônico
POA – Processo Oxidativo Avançado
RR - arginina-Arginina
STX – Saxitoxina
SFE – Extração de fase sólida
SP – São Paulo
TiO₂ - Dióxido de titânio
T0 – Tratamento inicial
T1- Tratamento 1
T2- Tratamento 2
T3- Tratamento 3
T4 -Tratamento 4
T5- Tratamento 5
UEPB – Universidade Estadual da Paraíba
USEPA - Agência de proteção ambiental dos EUA
UV – Ultravioleta
VMP – Valor Máximo Permitido
YA- Tirosina-Alanina
YR -Tirosina-Arginina
µg. L⁻¹ – micrograma por litro

SUMÁRIO

ESTRUTURA DA TESE.....	21
INTRODUÇÃO GERAL	24
 CAPÍTULO 1	
1. Eutrofização	28
2. Cianobactérias e Cianotoxinas	28
2.1 <i>Microcystis aeruginosa</i> (Kützing) Kützing 1846	31
2.1.1 Microcistina-LR	32
2.2 <i>Raphidiopsis raciborskii</i> (Woloszynska) Aguilera, Berrendero Gómez, Kastovsky, Echenique & Salerno 2018.....	33
2.1 Saxitoxina	35
2.2.2 Cilindropermopsina	36
2.3 <i>Dolichospermum solitarium</i> (Rabenhorst ex Bornet & Flahault) P.Wacklin, L.Homann & J.Komárek 2009).	38
2.3.1 Anatoxina-A	38
3. Legislação: padrões, limites nacionais e monitoramento de cianotoxinas.	39
4. Tecnologias avançadas de tratamento de água e remoção de cianotoxinas. ...	42
4.1 Processos oxidativos avançados (POAs)	42
4.1.1 Catálise homogênea utilizando reagente Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$)	44
4.1.2 Mecanismos de reações envolvidas no processo clássico de Fenton	45
5. Subprodutos produzidos da oxidação da cianotoxinas	47
6. Ecotoxicologia como ferramenta integrada de avaliação ambiental.	48
6.1 Legislação sobre toxicidade.....	49
6.2 Níveis tróficos.....	51
6.2.1 Microalga <i>Chlorella vulgaris</i> como indicador biológico	51
6.2.2 Microcrustáceo <i>Daphnia magna</i>	53
6.3 Fitotoxicidade como bioindicador a <i>Lactuca sativa</i>	55
6.4 Ecotoxicidade aplicada ao tratamento de água com cianotoxinas	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

CAPÍTULO 2

1. INTRODUÇÃO.....	70
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	71
2.1 Cepas de Cianobactérias.....	71
2.2 Extração de cianotoxinas.....	71
2.3 Cepa da microalga e organismo teste <i>Chlorella vulgaris</i>	72
2.4 Curva de crescimento de <i>Chlorella vulgaris</i>	72
2.5 Delineamento Experimental.....	73
2.5.1 <i>Chlorella vulgaris</i> x Cianotoxinas.....	73
2.5.2 Teste de toxicidade crônica utilizando <i>Chlorella vulgaris</i>	74
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
3.1 Curva de Crescimento da <i>Chlorella vulgaris</i>	75
3.2 Validação dos resultados obtidos no ensaio de sensibilidade de <i>Chlorella vulgaris</i>	76
3.3 Ensaio definitivos.....	77
3.3.1 Crescimento médio da <i>Chlorella vulgaris</i> a exposição de cianotoxinas.....	77
3.3.2 Clorofila-a.....	79
3.3.3 pH.....	82
3.4 Ecotoxicidade de <i>Chlorella vulgaris</i>	83
4. CONCLUSÃO.....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

CAPÍTULO 3

1. INTRODUÇÃO.....	95
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	97
2.1 Cepas de Cianobactérias.....	97
2.2 Preparação do extrato bruto de cianobactérias e extração das cianotoxinas.....	97
2.3 Cultivo do microcrustáceo <i>Daphnia magna</i> , Straus, 1820.....	98
2.4 Teste de toxicidade aguda utilizando <i>Daphnia magna</i>	99
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	100
3.1 Avaliação do ensaio de sensibilidade de <i>Daphnia magna</i> para validação dos resultados.....	100

3.2	Toxicidade aguda utilizando <i>Daphnia magna</i> a exposição extracelular de cianotoxinas.....	101
3.3	Toxicidade aguda utilizando <i>Daphnia magna</i> a exposição intracelular de cianotoxinas.....	103
4.	CONCLUSÃO	108
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

CAPÍTULO 4

1.	INTRODUÇÃO	119
2.	MATERIAL E MÉTODOS	120
2.1	Obtenção da microcistina-LR e água de estudo	120
2.2	Experimentos de degradação utilizando a MC-LR	121
2.3	Procedimentos analíticos	121
2.4	Modelagem computacional	122
2.5	Bioensaios de Toxicidade	122
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	123
3.1	Processo Oxidativo Avançado - Fenton	123
3.2	Subprodutos de oxidação.....	125
3.3	Modelagem molecular computacional de MC-LR e subprodutos produzidos	128
3.4	Testes de ecotoxicidade	129
3.4.1	Ecotoxicidade de microcistina – LR em <i>Chlorella vulgaris</i>	129
3.4.2	Ecotoxicidade dos subprodutos de degradação de MC-LR em <i>Chlorella vulgaris</i>	131
3.4.3	Ecotoxicidade de microcistina –LR em <i>Daphnia magna</i>	133
3.4.4	Ecotoxicidade dos subprodutos de degradação de MC-LR em <i>Daphnia magna</i>	134
3.5	Relação entre a formação dos subprodutos e os testes de toxicidade.....	135
4.	CONCLUSÃO	138
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138

CAPÍTULO 5

1.	INTRODUÇÃO	154
2.	MATERIAL E MÉTODOS	156
2.1	Cepas de Cianobactérias	156

2.2	Preparação do extrato bruto de cianobactérias e extração das cianotoxinas	156
2.3	Delineamento Experimental	157
2.3.1	Teste de fitotoxicidade utilizando as sementes de alface (<i>Lactuca sativa L</i>)	157
2.3.2	Experimentos de degradação de Fenton utilizando a MC-LR.....	159
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	160
3.1	Validação dos controles para os ensaios.....	160
3.2	Índice de germinação (%).....	160
3.3	Inibição da radícula e do hipocótilo (%)	162
3.4	Avaliação da fitotoxicidade dos subprodutos formados na degradação de microcistina – LR por processo Fenton	164
4.	CONCLUSÃO	168
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	169
	CONCLUSÃO GERAL	175
	RECOMENDAÇÕES.....	177

ESTRUTURA DA TESE

Composta de cinco capítulos, a presente tese procurou cobrir de forma abrangente a temática: Efeito tóxico de cianotoxinas e seus subprodutos de degradação por processos oxidativos avançados, estando organizada da seguinte forma:

Capítulo 1- Consiste numa revisão de literatura versando acerca de Cianobactérias e Cianotoxinas, com enfoque em suas características gerais, efeitos tóxicos, legislação e tratamento. Buscou-se compreender o estado da arte das pesquisas relacionadas ao tema, partindo de uma análise descritiva, com posterior análise aprofundada de estudos atuais. Este capítulo serviu de subsídio para os capítulos seguintes.

Capítulo 2- Este capítulo foi elaborado no formato de artigo científico. O estudo investigou os efeitos inibitórios de cianotoxinas sobre o crescimento, densidade, biomassa e ecotoxicidade de *Chlorella vulgaris*, através da alelopatia pelo qual os organismos sintetizam e liberam compostos bioativos no ambiente circundante, podendo influenciar positiva ou negativamente o crescimento de espécies vizinhas.

Capítulo 3- Este capítulo foi elaborado em forma de artigo científico. Avaliou-se a toxicidade aguda da espécie *Daphnia magna* a exposição extra e intracelular de diferentes cianobactérias e distintas concentrações de cianotoxinas. Os valores da Concentração Letal a 50% da população (CL₅₀) reforçaram o uso destes organismos em ensaios ecotoxicológicos e sua relação com ambientes eutrofizados.

Capítulo 4- Este capítulo apresenta o estudo de modelagem molecular computacional, espectrometria de massa e testes *in vivo* com *Chlorella vulgaris* e *Daphnia magna* utilizados para investigar a lipossolubilidade e ecotoxicidade dos subprodutos da degradação de MC-LR gerados após oxidação por radicais OH• no processo Fenton. O mesmo foi publicado no periódico Aquatic Toxicology, e encontra-se na versão de artigo em português conforme as normas e diretrizes da revista.

Capítulo 5- Este capítulo foi produzido no formato de artigo. O estudo pretendeu avaliar os efeitos tóxicos dos extratos lisados de linhagens de cianobactérias produtoras de cianotoxinas sobre a germinação de sementes, crescimento do hipocótilo, alongamento radicular e desenvolvimento inicial das plântulas de alface (*L. sativa*). Avaliou-se ainda a fitotoxicidade dos subprodutos de MC-LR obtidos após o processo oxidativo Fenton.

A seguir, estão listados alguns artigos publicados em revistas indexadas, capítulos de livros e anais de congressos nacionais e internacionais, durante o desenvolvimento do presente trabalho.

ALBUQUERQUE, M. V. C.; RAMOS, R. O.; SILVA, M. C. C. P. E.; CARTAXO, A. S. B.; RODRIGUES, R. M. M.; LEITE, V. D.; LOPES, W. S. Degradação de microcistina - LR no tratamento de água de abastecimento em sistema convencional seguido de fotocatalise homogênea (UV/H₂O₂). **Revista Ibero-americana de Ciências Ambientais**, v. 12, p. 274-286, 2022.

ALBUQUERQUE, M. V. C.; RAMOS, R. O.; LEITE, V. D.; SOUSA, J. T.; ARAUJO, M. C. U.; CEBALLOS, B. S. O.; LOPES, W. S. Studies of the liposolubility and the ecotoxicity of MC-LR degradation by-products using computational molecular modeling and in-vivo tests with *Chlorella vulgaris* and *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 245, p. 106127, 2022.

ALBUQUERQUE, M. V. C.; CARVALHO, E. K. F.; LIMA, C. A. P.; SOUSA, J. T.; LEITE, V. D.; LOPES, W. S. Removal of microcystin-LR from eutrophic water using solar distillation. **Desalination and Water Treatment**, v. 19, p. 1-12, 2022.

ALBUQUERQUE, M. V. C.; CARTAXO, A. S. B.; SILVA, M. C. C. P. E.; RAMOS, R. O.; SATIRO, J. R.; LOPES, W. S.; LEITE, V. D.; CEBALLOS, B. S. O. Removal of cyanobacteria and cyanotoxins present in waters from eutrophized reservoir by advanced oxidative process (AOPS). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, p. 61234-61248, 2020.

ALBUQUERQUE, M. V. C.; RODRIGUES, R. M. M.; SATIRO, J. R.; LOPES, W. S. Avaliação da fitotoxicidade dos subprodutos formados na degradação de microcistina-LR por processo Fenton. Entre investigações, descobertas, desafios e esperança: Ensinar e Pesquisar Ciências em um Brasil pós Pandemia. 6ed. Campina Grande: **Realize Editora**, 2021, v. 6, p. 926-953.

ALBUQUERQUE, M. V. C.; CARTAXO, A. S. B.; ARAUJO, A. A. Q.; LIMA, R. W. G. C.; DO O, K. D. S.; LOPES, W. S. Remoção de cianotoxinas de água de abastecimento público por adsorção em carvão ativado. In: Tayronne de Almeida Rodrigues, João Leandro Neto, Dennyura Oliveira Galvão. (Org.). Meio Ambiente, Sustentabilidade e Agroecologia 4. 4ed. Ponta Grossa - PR: **Editora Atena**, 2019, v. 4, p. 1-321.

ALBUQUERQUE, M. V. C.; RODRIGUES, R. M. M.; SATIRO, J. R.; BRITO FILHO, A. L. F.; LOPES, W. S. Daphnias spp. como organismos bioindicadores de toxicidade e caracterização ambiental de sistemas aquáticos eutrofizados. In: VI Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciências, Campina Grande. **Anais VI CONAPESC**, 2021.

ALBUQUERQUE, M. V. C.; SILVA, M. C. C. P. E.; CARTAXO, A. S. B.; LEITE, V. D.; LOPES, W. S. Avaliação da ecotoxicidade na degradação de microcistina-LR por processos oxidativos avançados: uma revisão. In: I Congresso Internacional de Meio Ambiente e Sociedade e III Congresso da Diversidade do Semiárido, 2019, Campina Grande. **Anais I CONIMAS e III CONIDIS**, 2019. v. 1. p. 1-12.

ALBUQUERQUE, M. V. C.; MARINHO, P. R. M.; CARTAXO, A. S. B.; LEITE, V. D.; LOPES, W. S. Fotocatálise homogênea (UV/H₂O₂) na degradação de microcistina-LR presentes em água de abastecimento público. In: I Congresso Internacional de Meio Ambiente e Sociedade e III Congresso da Diversidade do Semiárido, 2019, Campina Grande. **Anais I CONIMAS E III CONIDIS**, 2019. v. 3. p. 1-12

ALBUQUERQUE, M. V. C.; DO O, K. D. S.; SOUSA, J. T.; CANTO, C. S. A.; LOPES, W. S. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) na determinação de microcistina- LR. In: IV Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciências, 2019, Campina Grande. **Anais IV CONAPESC**, 2019. v. 1. p. 1-12.

ALBUQUERQUE, M. V. C.; CARTAXO, A. S. B.; SILVA, M. C. C. P. E.; LEITE, V. D.; LOPES, W. S. Bioensaios de toxicidade e organismos bioindicadores como instrumento de caracterização ambiental de sistemas aquáticos. In: **Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, 2019, João Pessoa. Saneamento Ambiental, 2019. v. 1. p. 1-12.

ALBUQUERQUE, M. V. C.; CARTAXO, A. S. B.; SILVA, M. C. C. P. E.; CANTO, C. S. A.; LEITE, V. D.; LOPES, W. S. Ocorrências de microcistinas em águas superficiais: características gerais, histórico, legislação e métodos de análises. In: **Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, 2019, João Pessoa. Saneamento Ambiental, 2019. v. 3. p. 1-12.

ALBUQUERQUE, M. V. C.; CIRNE, J. R. R.; SANTOS, R. B.; NASCIMENTO, J. N.; CANTO, C. S. A.; LOPES, W. S. Remoção de microcistina-LR de água destinada a abastecimento público, utilizando reagente Fenton, seguido de coagulação, sedimentação e filtração. In: **X Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental e Sanitária**, 2019, Recife. Água: abastecimento, tratamento e distribuição, 2019. v. 1. p. 1-12.

ALBUQUERQUE, M. V. C.; SILVA, M. C. C. P. E.; DO O, K. D. S.; LEITE, V. D.; SOUSA, J. T.; LOPES, W. S. Cianobactérias e seus efeitos deletérios: implicações de tratamento e monitoramento em mananciais de abastecimento. In: **X Simpósio Brasileiro de Engenharia Ambiental e Sanitária**, 2019, Recife. Água: abastecimento, tratamento e distribuição, 2019. v. 2. p. 1-12.

ALBUQUERQUE, M. V. C.; SATIRO, J. R.; SILVA, S. F.; BARBOSA, A. S.; LIMA, E. D.; LOPES, W. S. Diagnóstico das variáveis físico-químicas e biológicas como indicadoras da qualidade de água do reservatório Saulo Maia-PB. In: **Congresso Nacional de Saneamento da Assemae**, 2018, Fortaleza. Alternativas de Financiamento para o Saneamento Público, 2018.

INTRODUÇÃO GERAL

A expansão demográfica que as grandes cidades veem enfrentando tem como alicerce para o desenvolvimento sustentável o saneamento básico, que abrange a coleta e tratamento de água, esgoto e resíduos sólidos, além de limpeza urbana e drenagem da água pluvial. A sua implementação é de grande relevância para o crescimento econômico, bem-estar social e qualidade de vida da população (BEDIAKO et al., 2018; DO et al., 2017).

Aliado as urbanizações, as atividades antrópicas através do uso indiscriminado de fertilizantes agrícolas e do lançamento inadequado de águas residuárias sem tratamento, alteram as características tróficas do corpo hídrico pelo excesso de nutrientes ricos em fósforo e nitrogênio presentes nestes efluentes. Entre as consequências do aporte desses nutrientes, tem como principais efeitos, alterações nas características organolépticas da água e a proliferação excessiva de produtores primários tais como, cianobactérias, microalgas e plantas aquáticas, pela capacidade de assimilação. Esta alteração que ocorre no ambiente é parte do processo de eutrofização, que interfere na qualidade da água dos mananciais, especialmente aqueles destinados à abastecimento público (REGO et al., 2019).

Dentre produtores primários, as cianobactérias ganham destaque por sua capacidade de produzir compostos que além de ocasionar alterações no sabor e odor da água potável, podem biossintetizar uma ampla gama de classes químicas de metabólitos secundários como peptídeos, macrolídeos e glicosídeos que causam uma série de bioatividades: antiviral, antifúngica, citotóxica, inibitória de enzimas, antineoplásicas e alelopáticas. Alguns desses metabólitos secundários abrangem uma variedade de cianotoxinas alcalóides e peptídicas que representam ameaças à saúde humana e ambiental em todo o mundo, que podem diferir fortemente em suas estruturas químicas e propriedades toxicológicas. Geralmente são classificados como: hepatotoxinas, neurotoxinas, citotoxinas e dermatotoxinas (CORBEL et al., 2014), que dependendo de suas concentrações, podem tornar a água imprópria para o consumo humano, o que é uma situação bastante delicada do ponto de vista sanitário. As toxinas, bem como outros metabólitos secundários, nem sempre são removidos em sua totalidade pelos sistemas tradicionais de tratamento de água (JACINAVICIUS et al., 2021).

As águas superficiais são captadas e bombeadas para as estações de tratamento de água onde recebem os tratamentos adequados que as caracterizam ao final do processo como água potável (POSTIGO et al., 2018; XU et al., 2018). Ainda assim, a remoção de cianotoxinas da água de abastecimento a partir do tratamento do tipo convencional (comumente empregado) é considerada efetiva quando estas toxinas se encontram na forma intracelular. No entanto, o mesmo tratamento não é satisfatório no caso da cianotoxina encontrar-se na forma dissolvida. A dificuldade de remoção de cianotoxinas dissolvidas pelos sistemas de tratamentos usualmente empregados, tem intensificado a busca por tecnologias operacionais e economicamente viáveis para o efetivo cumprimento da legislação vigente, no que tange à concentração dessa cianotoxina em água de abastecimento.

Neste caso, os processos oxidativos avançados (POA's) constituem uma classe especial de técnicas de oxidação apontadas como propícias, produzindo radicais livres de hidroxilas (\bullet OH), os quais são tradicionalmente considerados como espécies ativas, responsáveis pela reação rápida de moléculas orgânicas. Tais radicais dão início à uma série de reações de degradação que podem culminar em espécies inóculas, tipicamente dióxido de carbono e água (SHARMA et al., 2012), transformam os poluentes em fragmentos, possibilitando até a completa mineralização destes. Dentre as diversas vantagens, estes processos caracterizam-se por serem um tratamento destrutivo, em que o contaminante não é simplesmente transferido de fase, mas degradado através de uma sequência de reações químicas; têm como principais aplicações no tratamento de água e efluentes, remediação de solos e água subterrâneas, desinfecção e remoção de odores. Em particular, o processo oxidativo Fenton consiste na reação de íons de Fe^{2+} com peróxido de hidrogênio para formar espécies ativas (\bullet OH) em meio ácido. Os radicais formados são capazes de degradar diversos compostos orgânicos (BABUPONNUSAMI et al., 2014), porém apresenta restrições de aplicação em condições de elevada concentração do poluente avaliado e há formação de subprodutos de reação, os quais em alguns casos são tóxicos (SOUZA et al., 2014).

Dessa forma, esta pesquisa tem por objetivo identificar, quantificar e avaliar o potencial efeito tóxico de cianotoxinas, e dos subprodutos formados da degradação de microcistina-LR por processo oxidativo avançado Fenton.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEDIAKO, I. A., ZHAO, X., ANTWI, H. A., & MENSAH, C. N. (2018). Urban water supply systems improvement through water technology adoption. **Technology in Society**. <https://doi.org/10.1016/j.techsoc.2018.06.005>.

BABUPONNUSAMI, A.; MUTHUKUMAR, K. A review on Fenton and improvements to the Fenton process for wastewater treatment. **J. Environ. Chem. Eng.**, v.2, p.557-572, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2013.10.011>.

CORBEL, S., MOUGIN, C., BOUAÏCHA, N., 2014. Cyanobacterial toxins: modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. **Chemosphere** 96, 1e15. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.056>.

DO, N., SIMPSON, A., DEUERLEIN, J., & PILLER, O. (2017). Demand Estimation In Water Distribution Systems: Solving Underdetermined Problems Using Genetic Algorithms. **Procedia Engineering**, 186, 193–201. doi:10.1016/j.proeng.2017.03.227.

JACINAVICIUS, F. R., GERALDES, V., CRNKOVIC, C. M., DELBAJE, E., FIORE, M. F., & PINTO, E. (2021). Effect of ultraviolet radiation on the metabolomic profiles of potentially toxic cyanobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa243>

POSTIGO, Cristina et al. Chemical characterization and relative toxicity assessment of disinfection byproduct mixtures in a large drinking water supply network. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], p.18-26, jul. 2018.

REGO, A. H. G; RANGEL-JUNIOR, A. & COSTA, I. A. S. Phytoplankton scenario and microcystin in water during extreme drought in semiarid tropical water supplies, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. 80(1):1-11. 2019.

SHARMA, V. K., TRIANTIS, T. M., ANTONIOU, M. G., HE, X., PELAEZ, M., HAN, C. DIONYSIOU, D. D. (2012). Destruction of microcystins by conventional and advanced oxidation processes: A review. **Separation and Purification Technology**, 91, 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.02.018>

SOUZA, I. D; FAZA, L.P; JUSTO, R. M. POA Processos Oxidativos Avançados. Universidade federal de Juiz de fora. 2014.

XU, H., ZHANG, D., XU, Z., LIU, Y., JIAO, R., & WANG, D. (2018). Study on the effects of organic matter characteristics on the residual aluminum and flocs in coagulation processes. **Journal of Environmental Sciences**, 63, 307–317. doi:10.1016/j.jes.2016.11.020

Capítulo 1

CIANOACTÉRIAS: CARACTERÍSTICAS GERAIS, CIANOTOXINAS, EFEITOS TÓXICOS, LEGISLAÇÃO E TRATAMENTO

1. Eutrofização

Em decorrência do rápido crescimento demográfico mundial (6,4 bilhões em 2004 à 7,8 bilhões em janeiro de 2022), da acelerada urbanização e das diversas atividades antrópicas 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 domésticos, industriais e sólidos descartados no ambiente. Dentre os processos que intensificam essa deterioração, pode-se destacar a eutrofização. Este processo consiste em um rápido enriquecimento artificial dos corpos aquáticos, devido elevadas concentrações de compostos nitrogenados e fosfatados, o que resulta no aumento do processo de produção biológica dos mananciais, incluindo as florações de microalgas, cianobactérias e macrófitas.

O crescimento excessivo das cianobactérias (florações ou blooms), se manifesta nos corpos aquáticos com uma camada de cor verde intensa na água que cresce e forma 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; e, portanto, limitam e até impedem a fotossíntese diminuindo a oxigenação da água nas áreas mais profundas (SINHA et al., 2017). Estas consequências ocasionam alterações do equilíbrio ecológico do ambiente hídrico, tais como a morte dos organismos aeróbios, entre eles microcrústaceos e peixes, dificuldades no tratamento de água e a predominância de organismos anaeróbios associados aos processos de fermentação, putrefação da matéria orgânica que produzem gases de odores desagradáveis que saem da água para atmosfera (LE MOAL et al., 2019).

Considerado como um dos principais problemas ambientais da atualidade, este processo se mostra relevante às questões ambientais tendo em vista a projeção para 2050, onde o número de pessoas afetadas por este fenômeno aumentará para um terço da população mundial (ONU, 2019).

2. Cianobactérias e Cianotoxinas

Consideradas como microrganismos procariontes e fotossintetizantes que surgiram no início da Era Pré-Cambriana, muitas das espécies de cianobactérias foram descritas como algas, por apresentarem pigmentos fotossintéticos, como clorofila e

ficobiliproteínas. A partir do século XIX, em virtude das diferenças morfológicas observadas, em comparação a outras espécies de procariotos e eucariotos, passou-se a usar termos como cianofíceas e/ou algas azuis, para classificar esses microrganismos. Atualmente, pertencem ao Domínio Bacteria e compõe o Filo Cyanobacteria (TORTORA, 2012; KOMÁREK, 2013).

As cianobactérias apresentam morfologia diversificada, e podem ser encontradas em formas filamentosas, colônias ou unicelulares. Reproduzem-se por fissão binária simples ou múltipla e fragmentação de filamentos. Com alta capacidade adaptativa, vivendo nos mais diversos habitats. Algumas espécies de cianobactérias, vivem bem em ambientes considerados extremos, com temperaturas elevadas ou muito baixas, alta salinidade e pH abaixo de 4,0. Considera-se que, devido a estas habilidades de adaptação e por produzirem oxigênio, estes microrganismos desempenharam importante função ecológica no período em que surgiram, visto que as condições ambientais da Terra primitiva eram inóspitas à maioria das formas de vida conhecidas atualmente (SILVA et al., 2016).

Segundo Merel et al. (2013), as cianobactérias conseguem se desenvolver em um curto período de tempo. Os autores, afirmam que as florações de cianobactérias são monodispostas, podendo formar camadas de células na superfície dos reservatórios. Algumas espécies apresentam estruturas especializadas, como akenites, para resistência a baixas temperaturas e falta de umidade e heterocistos, que permitem a fixação de nitrogênio atmosférico. Outras espécies, possuem também vesículas de gás, que são vacúolos proteicos que controlam a posição na coluna da água, conforme a disponibilidade de luz e nutrientes. Esses vacúolos também conferem flutuabilidade para formar filmes ou camadas de até um metro de espessura na superfície da água, o que pode gerar forte odor e má aparência. Esses mecanismos conferem alta vantagem competitiva sobre outros organismos fitoplanctônicos, principalmente em condições eutróficas, permitindo melhor captação de luz solar para fotossíntese e fixação de nutrientes (OREN et al., 2013).

Juntamente a estas vantagens adaptativas, está a capacidade de produção de cianotoxinas (metabólitos secundários). Para Chlipala, Mo e Orjala et al. (2011) e Wang et al. (2017), o grupo dos metabólitos secundários de cianobactérias possuem uma diversidade de moléculas, como ácidos graxos, peptídeos, terpenóides, porfinóides, alcalóides e policetídeos, no entanto não se limitam apenas a estes constituintes, foi

constatado que muitos destes compostos podem atuar como anti-inflamatórios, antimicrobianos, antivirais, anticancerígenos e inibidores da protease.

Dentre os aproximadamente 150 gêneros descritos, 40 estão relacionados com a produção de algum tipo de toxina. Entretanto, à medida que novas pesquisas são feitas tem sido relativamente comum o fato de gêneros descritos como não produtores de cianotoxinas serem relatados como produtores. Deste modo, a princípio, qualquer cianobactéria pode ser considerada como potencialmente produtora de cianotoxinas. Os fatores ambientais também conseguem controlar as florações e a capacidade das cepas individuais de realizar a biossíntese de cianotoxinas, ocasionando uma maior exposição a esses metabolitos nocivos (MA et al., 2021).

Segundo Walls et al. (2018), apesar das cianotoxinas representarem uma ameaça para a qualidade da água e a saúde, os mecanismos que regularam a sua liberação a partir das cianobactérias são poucos conhecidos. Alguns autores sugerem que a liberação das cianotoxinas é um mecanismo de proteção contra herbívoros (KOMÁREK, 2013), mas ainda não se sabe com clareza as funções fisiológicas destas toxinas. Há fortes indícios de correlação entre a formação desta e a sazonalidade, radiação solar, temperatura da superfície da água, pH e porcentagem de saturação de oxigênio (HAIDER et al., 2017). As cianotoxinas, em sua maioria, são liberadas no meio aquático com a morte celular, ocasionando danos na biota aquática, desde intoxicação até a morte de animais e seres humanos (CHORUS et al., 2021).

As florações de cianobactérias em reservatórios destinados à produção de água para consumo humano ocasionam problemas para o abastecimento de água potável como entupimento de filtros, acréscimo da dosagem de reagentes, produção de odores e sabores. A sua presença em ETAs pode causar problemas operacionais em várias etapas de tratamento, tais como dificuldade de coagulação e floculação, baixa eficiência do processo de sedimentação, colmatação dos filtros e aumento da necessidade de produtos para a desinfecção (STAUFFER et al., 2019). No Brasil, algumas ETAs que utilizam a tecnologia da filtração direta descendente apresentam problemas operacionais os quais podem levar à produção de água com qualidade imprópria para consumo humano.

Diante da seriedade da problemática das cianobactérias no cenário atual, inúmeros estudos têm sido desenvolvidos no intuito de fomentar conhecimento relacionados a identificações dos organismos, degradação, tratamento, remoção, toxicidade e efeitos dos

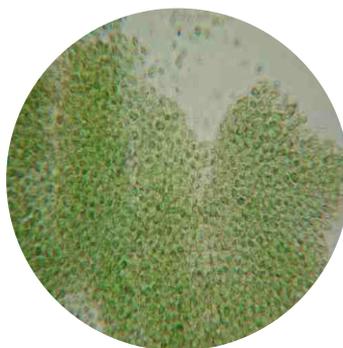
metabólitos sobre os seres humanos e a biota aquática. Todas estas vias adicionais são potencialmente relevantes na exposição de outros organismos, particularmente da biota aquática.

Entre as cianotoxinas mais relevantes encontram-se as microcistinas, nodularina, cilindrospermopsina, as toxinas Lyngbya, anatoxinas, saxitoxinas e a β -N-Metilamino-L-alanina (BMAA) (CHRISTENSEN et al., 2020).

2.1 *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing 1846

Constituídas por colônias arredondadas, irregulares ou lobadas, a *Microcystis aeruginosa* (Figura 1), apresenta uma mucilagem larga, hialina e diluente. As células dessas cianobactérias são esféricas (4,0 -5,5 μm diâmetro) próximas umas das outras e dispostas no centro da colônia, apresentando conteúdo celular verde-escuro, com aerótopos.

Figura 1. Espécie *Microcystis aeruginosa*.



Fonte: Autora (2020).

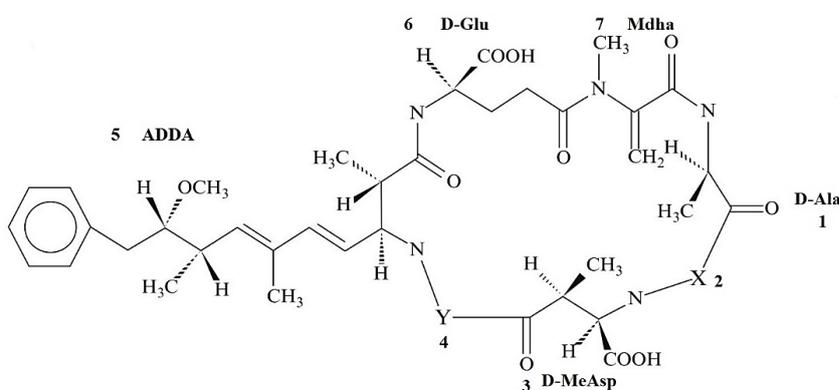
As populações de *M. aeruginosa* ocorrem em sistemas eutrofizados de água doce, lagoas costeiras e estuários. São tolerantes a insolação, no entanto, são sensíveis a mistura na coluna de água e depleção de nitrogênio. No Brasil e no mundo, *Microcystis* está entre os gêneros de cianobactérias formadores de florações mais comuns (SOARES et al., 2013). A sua forma colonial apresenta grande vantagem competitiva contra predação, proteção contra fotooxidação, contaminantes químicos, potenciais algicidas, além de já ter sido registrada como capaz de apresentar um sistema fotossintético mais eficiente e possuir maior afinidade a baixos níveis de fósforo do que o morfotipo unicelular. Porém, apesar da morfologia de *Microcystis aeruginosa* ser uma importante variável a ser

considerada, a formação de suas colônias e seus mecanismos e vantagens ainda não são completamente compreendidos (CHORUS et al., 2021).

2.1.1 Microcistina - LR

A microcistina-LR ($C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$) é um heptapeptídeo cíclico (Figura 2) formado por sete aminoácidos de diferentes massas moleculares, contendo cinco aminoácidos fixos, (-D-Ala1-X2-D-MeAsp3-Y4-Adda5-D-Glu6-Mdha7), sendo D-Alanina (posição 1), ácido D-metil-aspártico (posição 3), Adda (3-amino-9-metoxi-2-6,8-trimetil-10-fenil-4,6-ácido dienóico) (posição 5), Ácido D-glutâmico (posição 6) e N-metildehidroalanina (Mdha) (posição 7), e dois aminoácidos variáveis nas posições 2 (X) e 4 (Y), normalmente L-aminoácidos (BOTES et al., 1984).

Figura 2. Estrutura geral da microcistina – LR.



Fonte: METCALF et al., 2012.

Caracterizadas de acordo com o arranjo dos aminoácidos na molécula, variação em nível de metilação e hidroxilação, sequência de peptídeos e toxicidade, as microcistinas são extremamente estáveis e resistente a agentes químicos, hidrólise ou oxidação em pH próximo de neutro, podendo permanecer ativa mesmo em temperaturas acima de 100 °C (ŠEJNOHOVÁ et al., 2012). Cerca de 80% das microcistinas produzidas armazena-se no meio intracelular, enquanto que a libertação dos restantes 20% ocorre maioritariamente entre o início da fase estacionária do ciclo celular até à morte da célula. A concentração dessas cianotoxinas no meio exterior depende de diversos fatores tais como a degradação (associadas à temperatura e pH, por interação com a luz e de origem biológica) e adsorção das mesmas em partículas presentes no meio (ZHANG et al., 2020).

A primeira identificação química dessa hepatotoxina, foi feita por Bishop et al. (1959), que a isolou de uma cultura de *Microcystis aeruginosa*, daí a origem do nome. No entanto, gêneros como *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Lyngbia*, *Phormidium Planktothrix*, *Aphanocapsa* e *Radiocystis* também são potencialmente produtores de microcistina-LR. O principal modo de ação é sobre os hepatócitos. Esta inibição pode causar inúmeras consequências ao organismo, como por exemplo: lesões no fígado, interferência na divisão celular e potencial estímulo para crescimento de tumores (ETTOUMI et al., 2011).

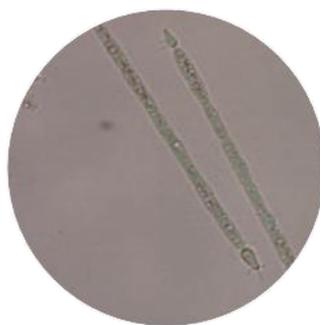
A síntese das microcistinas acontece a partir de um complexo multienzimático, formado por um peptídeo não-ribossomal sintetase (PNRS) e policetídeo sintetase (PCS). Esse complexo é codificado por um grupo de genes de composição e organização variadas, denominados de genes *mcy* (PEARSON et al., 2010). Inibidoras de enzimas que participam do processo de desfosforilação, (retirada de grupos PO_4^{-3}), de fosfoproteínas. Dependendo da dosagem, tempo de exposição e via de contato, os efeitos da microcistina no organismo humano podem agravar o quadro clínico da contaminação. Esta cianotoxina atua bloqueando a ação das proteínas serina/treonina fosfatases 1 e 2A das células hepáticas, o que causa morte por hemorragia em poucas horas após dose aguda. Em mamíferos, a exposição crônica a baixas doses de microcistinas pode promover a carcinogênese, resultando em tumor no fígado (PEGRAM et al., 2008, JI et al., 2011).

Além do fígado, já foi relatado que a microcistina-LR pode acumular-se e causar danos nos rins, coração em embriões de *Carassius auratus* e *Zebra fish* (ZENG et al., 2014; LI et al., 2019). Recentemente, vários estudos têm demonstrado que microcistina-LR pode acumular-se no cérebro de peixes e mamíferos (ZHAO et al., 2020), indicando a neurotoxicidade desencadeada. Um dos primeiros relatos que associaram a intoxicação por microcistina-LR à neurotoxicidade, foi a morte de 50 pacientes de uma unidade de hemodiálise em Caruaru – PE/Brasil, em 1996, através da água contaminada utilizada na hemodiálise, e a intoxicação de 76 outros pacientes com sintomas agudos de neurotoxicidade (por surdez, zumbido, cegueira reversível) (RAMOS et al., 2014).

2.2. *Raphidiopsis raciborskii* (Woloszynska) Aguilera, Berrendero Gómez, Kastovsky, Echenique & Salerno 2018

A espécie *Raphidiopsis raciborskii* (anteriormente *Cylindrospermopsis raciborskii*) (Figura 3) é uma cianobactéria planctônica e filamentosa encontrada em ambientes de água doce que foi descrita, a princípio, em ambiente de clima tropical. Tal espécie há mais de 20 anos vem formando florações também em ambientes temperados, demonstrando sua capacidade de dispersão (e facilidade de adaptação a condições adversas (AGUILERA et al., 2018).

Figura 3. Espécie *Raphidiopsis raciborskii*.



Fonte: Autora (2021).

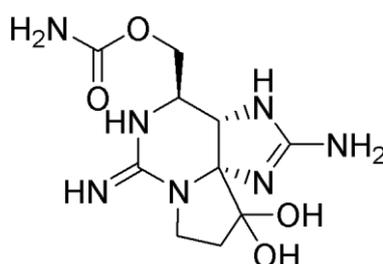
Atuando como neurotoxinas, a *Raphidiopsis raciborskii* é capaz de bloquear os canais de sódio da membrana do axônio, impedindo a propagação do impulso nervoso. Esse grupo conta com cerca de 57 análogos cianotóxicos – podendo ser não-sulfatadas (saxitoxina e neosaxitoxina), com um grupamento sulfato (goniautoxinas) e dois grupamentos sulfato (C-toxinas) (PEARSON et al., 2010) – de toxicidade variada.

A molécula não-sulfatada saxitoxina é umas das mais tóxicas conhecidas, com uma dose letal (DL_{50%}) de 10 mg.kg⁻¹ em bioensaios com camundongos. Em ambientes aquáticos, apesar de serem altamente hidrossolúveis, as STXs produzidas, são persistentes em águas de ambiente tropicais, e tendem a ser contidas no interior das células, sendo liberadas na lise resultante de estresse ou da morte do organismo (CASTRO et al., 2020). As linhagens isoladas são conhecidamente produtoras de cilindrospermopsinas (CYN) e saxitoxinas (STXs), porém cepas isoladas na América do Sul, vêm demonstrado capacidade de produzir apenas STXs e, evolutivamente, aparentam ter suprimido a capacidade de produzir, a cilindrospermopsina (CYN) (VICO et al., 2020).

2.2.1 Saxitoxinas

As saxitoxinas (Figura 4) são alcalóides que foram pela primeira vez isoladas de tecidos de moluscos marinhos, particularmente bivalves, organismos que as acumulam após filtração de água contaminada, geralmente em consequência da ocorrência de um bloom de produtores destas toxinas. Em ecossistemas marinhos, as saxitoxinas são principalmente produzidas pelos dinoflagelados *Pyrodinium bahamense*, *Alexandrium spp.* e *Gymnodinium catenatum* (METCALF e CODD, 2012; MURK et al., 2019; CHRISTENSEN et al., 2020). Dinoflagelados destes gêneros (*Alexandrium*, *Gymnodinium* e *Pyrodinium*) ocorrem principalmente ao largo das costas do Atlântico e do Pacífico (O'NEILL et al., 2016; VISCIANO et al., 2016).

Figura 4. Estrutura molecular da saxitoxina (SXT).



Fonte: METCALF et al., 2012.

O mais recente caso envolvendo blooms de *Gymnodinium catenatum* foi em Portugal, em outubro de 2018 na praia da Caparica (Lisboa), levando à intoxicação e hospitalização de duas pessoas devido ao consumo de mexilhões azuis (*Mytilus spp.*) contaminados com saxitoxinas produzidas por esta espécie de dinoflagelados (CARVALHO et al., 2019). No entanto, as saxitoxinas são também produzidas por algumas cianobactérias de água doce (ŽEGURA et al. 2011; CHRISTENSEN et al., 2020), pertencentes aos gêneros *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Raphidiopsis* e *Lyngbya*, tendo já sido quantificadas saxitoxinas em muitos ecossistemas de água doce um pouco por todo o mundo (Ártico, Nova Zelândia, Canadá e Europa), em concentrações a variaram entre $0,09 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $193 \mu\text{g.L}^{-1}$ (MOREIRA et al., 2021).

Tais cianotoxinas estão entre as neurotoxinas naturais mais potentes, com a capacidade de afetar a geração de impulsos nervosos. O comprometimento da geração de impulsos nervosos leva à supressão da estimulação dos músculos, podendo por exemplo resultar em paralisia respiratória quando os músculos respiratórios são afetados. Quando produzidas por dinoflagelados em ambiente marinho, as saxitoxinas estão associadas a um conjunto de sintomas específicos conhecido por intoxicação por toxinas paralisantes em marisco (do inglês *paralytic shellfish poisoning*; PSP). Apesar desta cianotoxina ter sido amplamente estudada no contexto marinho, ainda existem diversas dúvidas relativamente aos efeitos resultantes da exposição a esta toxina através do contato com e/ou ingestão de água doce (CHRISTENSEN e KHAN, 2020).

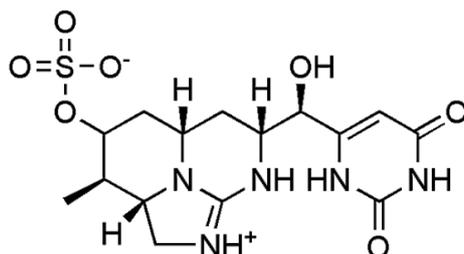
A síndrome PSP resulta da ingestão de produtos alimentares marinhos contaminados e é caracterizada pelos seguintes sintomas: ardor, dormência, cólicas, vômitos, diarreia, paralisia, dificuldade em respirar, transpiração excessiva, salivação e dores de cabeça (VISCIANO et al., 2016; O'NEILL et al., 2016; RUTKOWSKA et al., 2019). Ainda não existe um tratamento eficaz disponível para reverter os efeitos das saxitoxinas, sendo que a única intervenção de apoio existente para casos de intoxicação mais graves consiste na utilização de processos mecânicos de respiração artificial até os tóxicos serem excretados (MURK et al., 2019).

Um elevado número de casos de intoxicação humana por saxitoxinas através do consumo de marisco, cefalópodes e peixes contaminados é reportado todos os anos, especialmente no Japão e América do Sul (VISCIANO et al., 2016; O'NEILL et al., 2016; MURK et al., 2019). Em ambientes de água doce, as saxitoxinas são conhecidas por causar principalmente sintomas de intoxicação, mas também mesmo morte, em gado que ingere água contaminada (MURRAY et al., 2011). A acumulação de saxitoxinas ocorre geralmente nas vísceras de marisco contaminado, mas no polvo comum (*Octopus vulgaris*) e na lula (*Dosidicus gigas*) foram também registadas elevadas concentrações de saxitoxinas (390 até 2680 mg.kg⁻¹), em particular na glândula digestiva destes moluscos (LOPES et al. 2014; CHORUS et al., 2021). Peixes pescados para consumo humano também acumulam saxitoxinas, principalmente no fígado (até 0,6 mg.kg⁻¹) e em menor concentração no tecido muscular (até 0,02 mg.kg⁻¹) (TESTAI et al., 2016).

2.2.2 *Cilindrospermopsina*

Considerada a representante principal das citotoxinas, a cilindropermopsina CYN ($C_{15}H_{21}N_5O_7S$) é um alcalóide tricíclico inibidor da síntese protéica, com um peso molecular de 415. Apresenta natureza zwitteriônica, ou seja, é um íon dipolar, que possui cargas elétricas opostas em diferentes átomos da molécula. Devido a essa propriedade, é altamente solúvel em água. Sua estrutura molecular que consiste em um grupo de guandinina tricíclica combinada com um hidroximetil uracilo (BURATTI et al., 2017).

Figura 5. Estrutura molecular da cilindropermopsina (CYN)



Fonte: METCALF et al., 2012.

O primeiro registro de cilindropermopsina data de 1979, depois de um surto de hepatointerite, em Palm Island na Austrália, atribuído a ocorrência de uma floração da espécie *Raphidiopsis raciborskii* antigamente denominada por *Cylindropermopsis raciborskii*, em um reservatório de abastecimento de água. Por apresentarem efeitos amplos, ocasionando desordens nos rins, trato gastrointestinal, órgãos endócrinos, coração, sistema imune, vascular e muscular (RUTKOWSKA et al., 2019). Esta cianotoxina também pode ser considerada uma hepatotoxina, pois exerce a sua ação no fígado causando a perda de cromossomas e da cadeia dupla de DNA que leva à formação de tumores hepáticos. Geralmente apresentam duas respostas de toxicidade: uma rápida, provavelmente devido à formação de um metabolito tóxico no organismo, e outra mais lenta, resultado da inibição da síntese proteica (BURATTI et al., 2017).

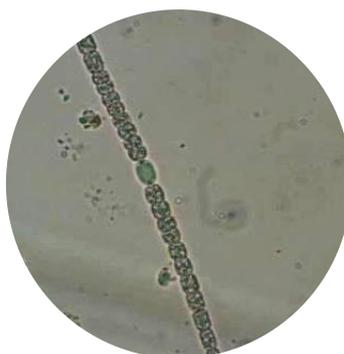
A estabilidade desta substância é bem conhecida, Moreira et al. (2012) e Poniedzialek et al. (2012), através de ensaios de ebulição repetida da água e de exposição a variações de pH entre 4 a 10 durante 2 meses, comprovaram alta estabilidade da CYN a valores extremos de temperatura e pH, quando se encontra em solução. Contudo, em meio de cultura e exposta à radiação solar, ela degrada-se rapidamente. Essas características de estabilidade da CYN no meio conferem um elevado potencial de toxicidade, pois aumenta o risco de exposição da população e dos organismos nos

ambientes aquáticos, onde condições mais favoráveis de temperatura e pH permitem a persistência da CYN por tempo prolongado (DITTMANN et al., 2013).

2.3 *Dolichospermum solitarium* (Rabenhorst ex Bornet & Flahault) P. Wacklin, L. Homann & J. Komárek 2009)

Reconhecidas por habitarem em ambientes meso-eutróficos sendo tolerantes a condições de pouca luz e mistura da coluna de água, *Dolichospermum solitarium* já foi reportada em nas regiões Sul e Sudeste do país, e em reservatórios do semiárido de Pernambuco e Paraíba, e designadas por serem potencialmente produtora de anatoxina e/ou microcistina, além de composto não tóxico como geosmina, que confere gosto e odor desagradável a água (NERY et al., 2019). Esta espécie é caracterizada por apresentar tricomas retos e solitários com um envelope mucilaginoso amplo. Suas células são esféricas a ovais, mais longas que largas (4,5-7,0 µm diâmetro, 5,0-7,5 µm comprimento) com aerótopos. Exibem acinetos cilíndricos (15,0-17,0µm diâmetro, 19,0-28,0 µm comprimento), isolados e distante dos heterócitos esféricos (6,5-10,0 µm), conforme observado na Figura 6 a seguir.

Figura 6. Espécie *Dolichospermum solitarium*.



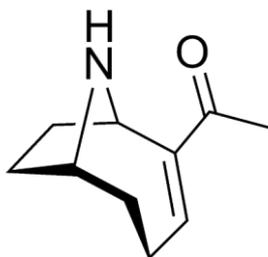
Fonte: Autora (2021).

2.3.1 *Anatoxina -a*

Anatoxina-a $C_{10}H_{15}NO$ (peso molecular de $165.232 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) é uma cianotoxina de ocorrência natural, comumente isolada de cianobactérias (*Dolichospermum spp*, *Oscillatoria spp*, *Aphanizomenon flos-aquae* e *Raphidiopsis spp*). Foi a primeira cianotoxina a ser química e funcionalmente definida, e trata-se de uma amina secundária

(DEVLIN et al., 1977). Estruturalmente é um organofosfato N-hidroxiguanina cíclico com uma fração de éster de fosfato (Figura 7).

Figura 7. Estrutura molecular da anatoxina – a (ATX-A).



Fonte: METCALF et al., 2012.

Considerada um alcaloíde potente, bloqueador de funções neuromusculares pós-sináptico de receptores nicotínicos e colinérgicos, na qual se liga irreversivelmente a receptores de acetilcolina, desencadeando a contração contínua das células musculares. Logo, a anatoxina-a funciona como uma análogo da acetilcolina, porém, não sofre a degradação comum realizada pela enzima acetilcolinesterase. Conseqüentemente, a ligação da anatoxina-a em receptores da acetilcolina provoca exaustão na contração muscular. A DL_{50} (i.p.) em camundongos é de 200 mg.kg^{-1} de peso corpóreo, com tempo de sobrevivência de 1 a 20 minutos. A letalidade aguda pode ocorrer quando animais ingerem por via oral pequena quantidade de água da superfície com florações tóxicas das mesmas (RUTKOWSKA et al., 2019).

3. Legislação: padrões, limites nacionais e monitoramento de cianotoxinas

Em virtude dos inúmeros problemas causados pelas florações de cianobactérias, vários países observaram a necessidade de prevenir, monitorar e controlar a incidência desses microrganismos e suas toxinas em águas (JACINAVICIUS et al., 2021). Em geral, um órgão público é responsável pelo controle da qualidade da água, seus usos e monitoramento ambiental, com o objetivo de identificar possíveis problemas, por exemplo, florações. A partir disto são feitos estudos e criadas comissões de investigação. Dependendo da gravidade da situação, são levadas para órgãos superiores, pois a responsabilidade em garantir os interesses da sociedade é do governo.

Segundo o Conama 357/15, o número de células de cianobactérias máximo permitido é de 50.000 células.mL⁻¹ para a Classe 2. Para a Classe 3 é de 100.000 células.mL⁻¹ e não há limite superior para o número de células para a Classe 4. À Classe 2 é destinado o uso para o abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; à Classe 3 destinada ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; e à Classe 4 é destinada apenas à navegação e à harmonia paisagística e não poderá ser empregada para o abastecimento público.

Devido a relatos de intoxicação e morte de humanos como a “tragédia da hemodiálise, citada anteriormente, proporcionaram maior visibilidade e preocupação de órgãos públicos responsáveis pela manutenção da saúde pública. Como consequência do fato, a Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde, responsável por padronizar a potabilização de águas brasileiras, citou, pela primeira vez, os valores máximos permitidos de cianobactérias e cianotoxinas para água potável.

A atual Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021 (BRASIL, 2021), altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (Tabela 1). Essa portaria ainda determina que se a contagem de células de cianobactérias representar 10% ou mais do fitoplâncton, deve ser realizado monitoramento trimestral de cianobactérias no manancial, no ponto de captação. Quando a contagem de células de cianobactérias exceder 10.000 células.mL⁻¹, o monitoramento em mananciais superficiais de abastecimento de água deve ser semanal. Quando a contagem de células de cianobactérias exceder 20.000 células.mL⁻¹, deve-se realizar análise das cianotoxinas microcistinas, saxitoxinas e cilindrospermopsinas no ponto de captação com frequência no mínimo semanal.

Tabela 1. Valores Máximos Permitidos (VMP) para cianotoxinas em águas para consumo humano.

Cianotoxinas	Unidade	VMP
Microcistinas	µg.L ⁻¹	1,0
Saxitoxinas	µg.L ⁻¹	3,0
Cilindrospermopsinas	µg.L ⁻¹	1,0

Fonte: BRASIL, 2021

Para o monitoramento das cianotoxinas, deve-se considerar que a persistência no ambiente altere com o tipo de toxina. As microcistinas, por exemplo, apresentam degradação mais lenta: estudos demonstraram que foi necessário um período de 30 dias para degradação de 90% da microcistina dissolvida no ambiente. Esta característica é importante porque, apesar de determinado local não conter um número significativo de células de cianobactérias, as toxinas podem estar presentes em concentrações elevadas. Considera-se também que uma mesma cepa de cianobactéria pode produzir mais de um tipo de cianotoxina, com diferentes tempos de permanência no ambiente (CETESB, 2013).

A Organização Mundial de Saúde também recomenda que as entidades gestoras do sistema de abastecimento público de água desenvolvam planos para garantir a qualidade da água, incorporando metodologias de monitoramento e um plano de contingência para gestão de riscos relativos à presença de cianobactérias. O monitoramento deve ser na tomada de água, em perfil vertical, para acompanhar o deslocamento das cianobactérias pela coluna d'água. Pontos dispersos pelo manancial podem ser interessantes para avaliar potenciais fatores responsáveis pela produção das florações e seu deslocamento em função de ventos e fatores hidrodinâmicos, inspeções de cor e odor, verificação da ocorrência ou não de mortandade de peixes, e outras informações do local que possam ser importantes para a avaliação final. Dessa forma, privilegia-se uma abordagem focada na prevenção, garantindo a proteção da saúde pública. A garantia da qualidade das águas para abastecimento público está intimamente relacionada à proteção da respectiva fonte de água bruta. A gestão das causas de contaminação das águas naturais traduz-se em maior disponibilidade com menor grau de contaminação, implicando num menor esforço no processo de tratamento (CETESB, 2013).

Uma das rotas mais comuns de exposição humana às cianotoxinas é a ingestão de água contaminada e estudos demonstraram que a tecnologia de tratamento de água, predominantemente nas ETAs convencionais, possibilita a remoção de grande parte das células microalgas e cianobactérias, por outro lado, é ineficiente na remoção de cianotoxinas dissolvidas. Dessa forma, torna-se necessária uma tecnologia de tratamento complementar que possa atuar na otimização do processo, como é o caso dos processos oxidativos avançados.

4. Tecnologias avançadas de tratamento de água e remoção de cianotoxinas

4.1 Processos oxidativos avançados (POAs)

Desde o final do século XX os processos oxidativos avançados (POAs) vêm se destacando como tratamentos alternativos, para removerem substâncias recalcitrantes de difícil degradabilidade. Considerados como tecnologias alternativas na degradação de diversos poluentes, altera a estrutura química dos compostos, tornando-as substâncias inofensivas ou inertes, tais como dióxido de carbono e água.

Estes processos, caracterizam-se por serem diferentes sistemas reacionais em que o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) participa como principal agente oxidante. Este radical apresenta elevado poder oxidativo ($\epsilon^0 = 2,8 \text{ V}$) que permite a completa mineralização de inúmeras espécies químicas de grande impacto ambiental, podendo reagir através de três mecanismos distintos: abstração de hidrogênio, transferência de elétrons ou adição radicalar (SIMONSEN et al., 2010; RIZZO, 2011), recorrendo-se a processos homogêneos ou heterogêneos.

Os sistemas heterogêneos são caracterizados pelo uso de catalisadores sólidos, como a fotocatalise heterogênea que utiliza o dióxido de titânio (TiO_2) como catalisador, enquanto os sistemas homogêneos envolvem o uso de oxidantes como ozônio, ferro e peróxido de hidrogênio e caracterizam-se por ocorrerem numa fase única, e mesmo a combinação deles, a exemplo do reagente de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$) como geradores de radicais. Estes processos podem ser gerados na presença ou na ausência de irradiação luminosa, conforme observa-se na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação dos sistemas típicos de processos oxidativos avançados.

Sistemas Homogêneos		Sistemas Heterogêneos	
Com Radiação	Sem Radiação	Com Radiação	Sem Radiação
$\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$	O_3	Feixe de elétrons	Eletrofenton
O_3/UV	$\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (Fenton)	$\text{TiO}_2/\text{O}_2/\text{UV}$	Processos
Foto-Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}/\text{UV}$)	$\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$	$\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{UV}$	eletroquímicos
$\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$	O_3/OH^-		

Fonte: FIOREZE et al., 2014.

De acordo com Kumar et al. (2018), a eficiência e as taxas de oxidação de um processo fotocatalítico, durante a degradação de poluentes orgânicos, depende de vários fatores, tais como: concentração do substrato, quantidade do catalisador, pH da solução, temperatura do meio reacional, tempo e intensidade de irradiação da luz, área superficial do semicondutor, dopagem de íons metálicos e não metálicos, capacidade de dissolução do oxigênio do meio reacional, natureza e estrutura do fotocatalisador.

Os POA's na degradação de poluentes orgânicos apresentam inúmeras vantagens e desvantagens (ANTONOPOULOU et al., 2014; ABBAS e ZAHEER, 2014), tais como:

- 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;
- Apresentam rápidas velocidades de reação, além da oxidação não seletiva, o que permite que vários contaminantes sejam tratados ao mesmo tempo pelo mesmo reagente;
- Caracterizam-se serem um tipo de tratamento destrutivo, ou seja, o contaminante não é simplesmente transferido de fase, mas sim degradado através de uma seqüência de reações químicas;
- 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;

Dentre as condições que limitam sua aplicabilidade, se destacam:

- 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;

4.1.1 Catálise homogênea utilizando reagente Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$)

A reação de oxidação Fenton foi descrita pela primeira vez em 1894 por Henry John Horstman Fenton, o qual observou que o H_2O_2 podia ativar-se na presença de Fe^{2+} para oxidar ácido tartárico, ácido málico e outros compostos orgânicos (FENTON, 1984). Utilizando este reagente muitas moléculas orgânicas poderiam ser facilmente oxidadas sem haver a necessidade de altas temperaturas, pressões elevadas ou equipamentos complexos. Entretanto, somente 40 anos mais tarde, em 1932, Haber e Weiss propuseram o mecanismo de geração de radical hidroxila que ocorre por meio da decomposição catalítica do peróxido de hidrogênio em meio ácido. Ou seja, este processo, é caracterizado por induzir a redução catalítica em soluções aquosas de H_2O_2 e de Fe^{2+} (íons ferrosos) a Fe^{3+} (íons férricos) conforme (Equação 1)



Este processo tem demonstrado algumas vantagens significativas em relação aos demais, já que o ferro é um elemento amplamente disponível e de fácil remoção do meio de reação, visto que precipita com grande facilidade em pH acima de 7. O peróxido de hidrogênio por sua vez, se decompõe formando água, conforme apresentado na Equação 2.



Os íons ferrosos estão presentes como complexos em solução aquosa, em condições de baixo pH, na ausência de ligantes. A reação de oxidação do íon férrico com o 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 o radical hidroxila produzindo água e radical hidroperoxila causando efeito negativo na degradação dos poluentes (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. Valores de pH acima de 3,0 contribuem para a formação de precipitado de $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Em solução alcalina (pH 11), o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio reagem para formar um óxido e um íon de peróxido (BOKARE et al., 2014).

A velocidade de degradação também diminui em pH abaixo de 2,5, apesar das espécies de Fe^{+2} permanecerem solúveis, pois altas concentrações de H^+ podem sequestrar radicais hidroxila (Equação 6).

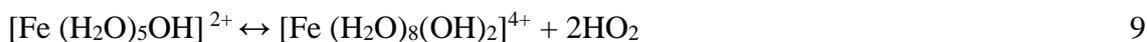
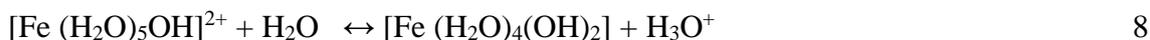
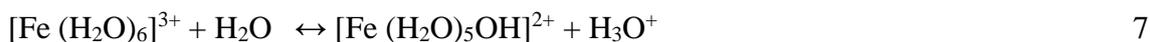


O íon Fe^{3+} formado, conforme mostrado na Equação 1 reage com íons OH^- oriundos da redução do peróxido de hidrogênio e da dissociação da água e formam as espécies hidrolisadas de ferro (III), as quais encontram-se em equilíbrio com o precipitado de hidróxido férrico ($\text{Fe}(\text{OH})_3$), realizando a coagulação. A coagulação, nesse caso, só é efetivada devido à geração dos complexos de hidróxido de ferro, como também à formação de oxi-hidróxidos após o ajuste de pH caso seja necessário, formando ou aumentando o tamanho dos flocos e facilitando a precipitação das partículas.

4.1.2 Mecanismos de reações envolvidas no processo clássico de Fenton

Os mecanismos para degradação de contaminantes orgânicos via processo Fenton podem ser considerados complexos, devido ao grande número de radicais altamente reativos formados, curto tempo de permanência e inúmeros intermediários de reação

(ASGHAR et al., 2015). O processo de coagulação, o qual é fundamentado pela formação de espécies hidrolisadas, conforme as equações de 7 a 11.



Diversas vantagens dos processos de oxidação de Fenton, e que os tornaram tão populares, são: (1) os radicais oxidantes são gerados a pressão e temperatura ambiente, dispensando a utilização de instalações de reatores complexos, (2) a simplicidade do processo, bem como a sua flexibilidade permitem fácil implementação como um sistema individual ou híbrido, (3) facilidade de integração com outros processos já existentes no tratamento de água, como a coagulação, filtração e oxidação biológica, (4) a velocidade elevada com que ocorre a reação entre o ferro e o H_2O_2 provoca a ativação do H_2O_2 e a subsequente geração de $\text{OH}\cdot$, gerando o menor tempo de reação entre todos os POAs (FIOREZE et al., 2014).

A maior desvantagem é atribuída à necessidade do pH ácido para que as espécies de ferro se encontrem dissolvidas. No entanto, a presença da matéria orgânica pode ser capaz de auxiliar em sua solubilidade. Complexos orgânicos de Fe^{3+} são estáveis em pH neutro, tornando capaz de ultrapassar a dependência do pH ácido do processo foto-Fenton tradicional. Complexos fotoativos de Fe^{3+} são formados por grupamentos carboxilatos e policarboxilatos, sendo os mais comumente presentes em matéria orgânica dissolvida (SPUHLER et al., 2010).

Deste modo, pode-se verificar que a utilização do processo Fenton como alternativa para a decomposição de poluentes orgânicos presentes em efluentes líquidos é uma alternativa adequada, uma vez que os mecanismos de reação já são compreendidos e reportados na literatura, além da simplicidade instrumental para a geração das espécies oxidantes deste processo. Contudo, devido ao imenso número de intermediários reativos formados, estudos de subprodutos e toxicidade são ferramentas adequadas para avaliação

da qualidade do afluente tratado, podendo desta maneira decidir a melhor estratégia sobre o descarte no meio ambiente.

5. Subprodutos produzidos da oxidação da cianotoxinas

Uma grande preocupação com o tratamento utilizando processos de oxidação é a formação de subprodutos ou produtos intermediários, que podem resultar numa poluição secundária. 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. A diversidade de fragmentos gerados nos possíveis tratamentos pela via de oxidação, apresentam a não constância de valores de massa, sendo assim, necessários maiores estudos na determinação dos parâmetros que influenciam a formação de um certo subproduto em detrimento de outro numa reação de oxidação.

Logo, com o possível isolamento e purificação dos mesmos para utilização de testes de toxicidade, inibição de proteína para reconhecimento do nível de poluição secundária, por meio dessa via de tratamento, a exemplo das microcistinas, na qual a degradação é influenciada por compostos orgânicos coexistentes e qualidade da água, a mineralização completa se torna inviável, podendo ocorrer a formação de subprodutos resultantes desta oxidação (ZONG et al., 2013). Com a oxidação da molécula de MC-LR, ocorre a formação secundária de diversos compostos, devido aos fragmentos de moléculas ainda presentes, que possuem igual, maior ou não toxicidade do composto original.

Diversos estudos utilizando oxidantes comuns ou POAs (LIU et al., 2016; ALBUQUERQUE, 2017; KARCI et al., 2018; KHADGI et al., 2019; LI et al., 2019; SOARES et al., 2021) já elencaram os possíveis subprodutos gerados nas suas reações de oxidação. Verificou-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 cianotoxinas gerados, além do favorecimento para uma rota de reação em detrimento de outra. 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).

6. Ecotoxicologia como ferramenta integrada de avaliação ambiental

A cronologia das pesquisas ecotoxicológicas no Brasil tem seus primórdios no trabalho de Rocha et al. (1971) descritos no relatório da FESB-CETESB (1971); quando estes autores iniciaram o desenvolvimento de testes de toxicidade, utilizando a tilápia, com um efluente de uma indústria na região do rio Atibaia (SP). Já em termos metodológicos, foi a partir de 1975 que se deu o desenvolvimento e a adaptação de vários métodos de ensaios de toxicidade aguda e crônica, de curta duração, utilizando outros grupos e espécies de organismos, dentre os quais estão presentes as algas, os microcrustáceos e os peixes de águas continentais e marinhas, além de testes com sedimentos, para avaliação da poluição hídrica. Em 1987 à Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, por meio dos trabalhos desenvolvidos pelo GT02 (Grupo de Toxicidade) da Comissão Técnica de Qualidade das Águas, começa a publicar suas primeiras normas relativas a testes ecotoxicológicos com organismos aquáticos.

Há algumas décadas a avaliação dos efluentes *in natura* ou da água já tratada vem sendo descrita e recomendada por métodos padrões de várias entidades internacionais como a Organização Internacional de Normalização (ISO), a Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), a Agência de proteção ambiental dos EUA (USEPA), dentre outras organizações de proteção ambiental. Entre os métodos utilizados estão os ensaios ecotoxicológicos que são bem analisados e em muitos países eles são uma ferramenta padrão para caracterizar a qualidade do efluente (POWER e BOUMPHREY, 2004).

A ecotoxicologia é uma vertente da toxicologia e diferencia-se desta no sentido de que integra os conceitos de ecologia aos estudos de toxicidade, ou seja, é a ciência que estuda os efeitos adversos das substâncias naturais ou sintéticas presente nos efluentes sobre os organismos vivos, quando liberadas no meio ambiente (RAGASSI et al., 2017). Os desafios nas descobertas recentes desta área carecem que se complementem com os conhecimentos de outras esferas, que não somente a toxicologia, assim como da biologia molecular, química, antropologia, matemática e evolução (RODRÍGUEZ-ROMERO et al., 2021). Os testes de toxicidade diferem principalmente quanto ao tempo de exposição do organismo teste ao agente ou substância a ser testada. Os testes de toxicidade aguda, têm por objetivo mensurar a capacidade de determinadas substâncias químicas ou amostras ambientais, de causar efeitos deletérios sobre os organismos teste, durante um

curto período de tempo (24 a 96 h) em relação ao período de vida do organismo. Os resultados são avaliados através da Concentração Letal Mediana (CL_{50}), que corresponde a concentração da substância tóxica responsável por provocar a mortalidade de 50% dos organismos teste; ou através da Concentração Efetiva Mediana (CE_{50}), relacionada a concentração da substância que causa imobilidade a 50% dos organismos teste (BRASIL, 2017).

De acordo com Castro et al. (2020), nos ensaios ecotoxicológicos, os efeitos agudos sobre a sobrevivência ou imobilidade dos organismos-teste são vistos quando esses organismos são submetidos à presença de substâncias em altas concentrações. Já os efeitos crônicos são comumente notados sobre o crescimento, a reprodução, o comportamento, entre outros, pois a dose da substância administrada está em baixas concentrações e em contato por longos períodos, possibilitando assim o surgimento de efeitos sistêmicos específicos sobre o ciclo de vida dos organismos (COSTA et al., 2013). Na ausência desses efeitos, deve-se levar em consideração o acúmulo das substâncias químicas, que podem atingir níveis elevados no organismo, causando efeitos deletérios ao longo do tempo e intoxicação. Nestes testes, os resultados são expressos em Concentração de Efeito Não Observado (CENO), que corresponde a maior concentração da substância tóxica, que não causa efeito deletério estatisticamente significativo na sobrevivência e reprodução dos organismos nas condições de teste; e Concentração de Efeito Observado (CEO) que está relacionada a menor concentração nominal do agente tóxico, que causa efeito deletério (BRASIL, 2017).

6.1 Legislação sobre toxicidade

No Brasil existem poucas leis referentes à toxicidade. Pode-se citar a Resolução CONAMA 430/2011 e a Lei Federal de Recursos Hídricos 9.433/97 como as mais importantes referências legais para controle de toxicidade no País.

A Lei Federal de Recursos Hídricos 9.433/97, que institui a Política Nacional de Recursos Hídricos e cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, descreve em seu Art. 21: “Na fixação dos valores a serem cobrados pelo uso dos recursos hídricos devem ser observados, nos lançamentos de esgotos e demais resíduos líquidos ou gasosos, o volume lançado e seu regime de variação e as características físico-químicas, biológicas e de toxicidade do afluente” (BRASIL, 1997).

A Resolução CONAMA 430/2011 dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes (BRASIL, 2011). Nesta Resolução os seguintes artigos descrevem sobre toxicidade:

- Art. 7º, parágrafo único: “Eventuais interações entre substâncias, especificadas ou não nesta Resolução, não poderão conferir às águas características capazes de causar efeitos letais ou alteração de comportamento, reprodução ou fisiologia da vida”.

- Art. 8º, em seu § 1º “Também deverão ser monitorados os parâmetros para os quais haja suspeita da sua presença ou não conformidade”. No § 3º “A qualidade dos ambientes aquáticos poderá ser avaliada por indicadores biológicos, quando apropriado, utilizando-se organismos e/ou comunidades aquáticas”. E no § 4º “As possíveis interações entre as substâncias e a presença de contaminantes não listados nesta Resolução, passíveis de causar danos aos seres vivos, deverão ser investigadas utilizando-se ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos, ou outros métodos cientificamente reconhecidos”.

- Art. 34º em seus parágrafos 1º e 2º dispõe:

§ 1º O efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de toxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

§ 2º Os critérios de toxicidade previstos no § 1º devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos padronizados, utilizando organismos aquáticos, e realizados no efluente.

A ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) é uma das agências que elabora as normas de testes ecotoxicológicos, padronizando assim esses ensaios com organismos testes a serem utilizados, baseando-se nos conhecimentos adquiridos pelos pesquisadores desta, em relação às agências mais tradicionais, e, adaptando tais ensaios às nossas necessidades. Para avaliar a toxicidade de agentes químicos, é necessário realizar ensaios toxicológicos com organismos representativos de diferentes níveis tróficos. O conhecimento da toxicidade de substâncias tóxicas em diferentes organismos, possibilita estabelecer limites permissíveis destas substâncias para a proteção da vida e avalia o impacto que estes poluentes causam, permitindo estabelecer e avaliar critérios e

padrões de qualidade das águas. Nos estudos dos efeitos agudos de produtos potencialmente tóxicos ao meio ambiente e aos seres humanos, são utilizados organismos-teste como peixes, microcrustáceos e microalgas, por serem sensíveis e representarem diferentes níveis tróficos.

6.2 Níveis tróficos

Uma das limitações encontradas para o emprego de organismos vivos como indicadores de toxicidade é a diferença de sensibilidades apresentada pelos organismos frente aos compostos químicos ou efluentes. Diversos estudos têm mostrado a diferença entre as respostas de toxicidade obtidas para um mesmo composto sobre organismos de espécies diferentes.

Para uma avaliação mais adequada recomenda-se o uso de uma bateria de ensaios que utilizem organismos representantes de diferentes níveis (Figura 8) da cadeia alimentar.

Figura 8. Organismos representantes de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar.



Fonte: adaptado Tortora, 2012.

6.2.1 Microalga *Chlorella vulgaris* como indicador biológico

As microalgas são seres unicelulares ou pluricelulares, apresentando algumas semelhanças com as plantas superiores, exemplos dessas similaridades é a presença de pigmentos fotossintéticos, que tem a capacidade de transformar energia solar em

biomassa, de produzir oxigênio e ter uma função ativa no ciclo de nutrientes, servindo de alimento organismos do zooplâncton e peixes (COSTA et al., 2013).

O uso de microalgas como indicador biológico é importante porque, como produtores primários, elas se situam na base da cadeia alimentar e qualquer alteração na dinâmica de suas em comunidades pode afetar os níveis tróficos superiores do ecossistema. Dentre as vantagens em se utilizar microalgas em testes de toxicidade podemos destacar sua grande sensibilidade às alterações ocorridas no meio ambiente e o seu ciclo de vida relativamente curto, o que possibilita a observação de efeitos tóxicos em várias gerações (RAGASSI et al., 2017).

O efeito de inibição sobre uma população de microalgas, após um intervalo de tempo, é determinado comparando-se o crescimento observado na presença de agente tóxico com o crescimento normal observado em um sistema livre de agente tóxico, o qual é chamado de controle, nestes testes, a temperatura e a luminosidade devem ser rigorosamente controladas porque podem afetar significativamente o crescimento das mesmas (COSTA et al., 2013). A resposta biológica inclui efeitos sinérgicos, antagônicos e aditivos de todos os componentes químicos e físicos que possam afetar a fisiologia e funções bioquímicas da microalga.

Wang e colaboradores (2018), em seu trabalho analisaram os possíveis efeitos alelopáticos dos exsudatos durante três fases de crescimento da cultura de *Microcystis aeruginosa* em três microalgas (*Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris* e *Cyclotella meneghiniana*). Os autores relatam que os crescimentos das três microalgas utilizadas no estudo, foram inibidos ao serem submetidas aos exsudatos provenientes da fase exponencial e estacionária da cultura de *M. aeruginosa*, enquanto que as cepas expostas ao exsudato da fase de declínio aumentaram seu crescimento significativamente.

Em adição, um estudo realizado por Dong et al. (2019), apresentaram que a espécie *Microcystis aeruginosa* pode influenciar a taxa de crescimento, aparência morfológica, formação colonial e os pigmentos fotossintéticos da microalga *Chlorella vulgaris*. No entanto, as microcistinas (MCs) não foram as substâncias ativas neste estudo. O crescimento de *C. vulgaris* também foi afetado pelos filtrados de *M. aeruginosa*, influenciando a densidade inicial da microalga alvo. Todavia, o estresse temporário de *M. aeruginosa* foi favorável ao crescimento de *C. vulgaris*.

Pinheiro et al. (2016) examinaram os efeitos de cianotoxinas (MC-LR e CYN) individualmente e como uma mistura binária, para avaliar a taxa de crescimento de *Chlorella vulgaris*. Em exposições únicas, os resultados demonstraram que MC-LR e CYN tiveram diferentes impactos nas taxas de crescimento de *C. vulgaris* nas maiores concentrações testadas. A utilização da MC-LR individualmente não apresentou efeito tóxico, mesmo em altas concentrações (37 mg. L⁻¹); no entanto, a presença de MC-LR em concentrações muito mais baixas (0,4-16,7 mg. L⁻¹) apresentou um aumento na toxicidade comparada a CYN.

6.2.2 Microcrustáceo *Daphnia magna*

Daphnia magna (Straus, 1820) é classificada taxonomicamente no filo Arthropoda, subfilo Crustacea, classe Branchiopoda, ordem Diplostraca, subordem Cladocera e família Daphnidae, apresentando larga distribuição no hemisfério norte e ocupam uma importante posição nas cadeias alimentares aquáticas (Ruppert e Barnes, 1996). Segundo estes mesmos autores, o nome Branchiopoda caracteriza a classe que possui coxas providas de epípodos achatados que servem como brânquias. Este zooplâncton da ordem Diplostraca mede cerca de 5 a 6 mm, apresenta a cabeça livre e o tronco fechado dentro de uma carapaça bivalve que termina posteriormente em um espinho apical. A extremidade da ponta do tronco, o pós-abdômen, vira-se ventralmente e para frente, apresentando garras e espinhos especiais para limpeza da carapaça. (NBR 12.713/2016).

Considerados consumidores primários em um ecossistema aquático, estes organismos se alimentam de partículas em suspensão e fitoplâncton. A nutrição se dá pela captura das partículas em suspensão através da atração das cargas opostas das partículas e a superfície de um filtro. Este filtro, é composto por cerdas finas dos apêndices do tronco e coleta partículas da corrente hídrica, transferindo-as para o sulco alimentar meio-ventral, e posteriormente para a boca. A excreção é realizada por glândulas, e justamente por isso, são os primeiros seres afetados pelas toxinas produzidas por cianobactérias, sofrem efeitos de bioacumulação, diminuição da filtragem de alimentos, que pode causar mortalidade ou consequências ao longo de gerações. (CASTRO et al., 2020).

O seu desenvolvimento compreende quatro fases: ovo, juvenil, adolescente e adultos, no qual possuem uma expectativa de vida média de 60 dias, podendo reproduzir-se tanto assexuadamente – sob condições ambientais favoráveis, uma fêmea pode dar origem a fêmeas juvenis geneticamente idênticas (reprodução por partenogênese) ou, quando expostas a condições ambientais adversas (diminuição do nível da água, superpopulação, baixas temperaturas, entre outros), as fêmeas podem produzir machos – quanto sexuadamente: na presença de machos, algumas fêmeas produzem ovos sexuais (que sofreram meiose) que podem ser fecundados. Os ovos fecundados não se desenvolvem. Estes ovos são envoltos por uma membrana protetora, formando uma estrutura em forma de “rissol” denominada *ephippium* (ANTUNES E CASTRO, 2017).

O gênero *Daphnia* é a espécie mais empregada em ensaios ecotoxicológicos para uma variada gama de compostos, bem como devido à sua importância ecológica, disponibilidade e facilidade para manejo em laboratório, sendo considerada uma espécie bioindicadora de toxicidade. Os testes com *Daphnia sp.* são normalizados e padronizados internacionalmente pela OECD (Teste n° 202: *Daphnia sp.* Acute Immobilization Test, 2004) e pela ISO (ISO 6341:2012 - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test) e no Brasil pela NBR 12.713 (ABNT, 2016). Diversas pesquisas apontam que as cianotoxinas causam inibição da atividade alimentar, diminuição no crescimento, baixo índice de reprodução, má formação de filhotes, diminuição do tempo de vida, estresse oxidativo e aumento da tolerância às toxinas ao longo de gerações (ORTIZ RODRIGUÉZ et al., 2012).

Investigando as reações fisiológicas mútuas de microcistina – LR produzida por *Microcystis aeruginosa* (PCC7806) em *Daphnia magna*, Savic et al. (2020) testaram as hipóteses: 1) a presença de *D. magna* afetará negativamente o crescimento e aumentará a resposta ao estresse e a produção de metabólitos em *M. aeruginosa*; 2) a presença de *M. aeruginosa* afetará negativamente as respostas fisiológicas e as características de vida em *D. magna*. Os experimentos foram conduzidos em uma câmara de co-cultura especialmente projetada que permitiu a troca dos metabólitos sem contato direto. Um claro impacto mútuo foi evidenciado, uma vez que os metabólitos cianobacterianos reduziram a sobrevivência de *D. magna* e diminuíram a atividade da enzima de estresse oxidativo.

Em um outro estudo realizado por Shahmohamadloo et al. (2019), foram investigadas alterações da reprodução, crescimento e sobrevivência de *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna* e *Hexagenia* cultivadas em laboratórios expostos a microcistinas ligadas a células através de uma série de bioensaios de ciclo de vida. Os organismos foram expostos a um gradiente de concentrações variando de $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ a $300 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistinas. As concentrações letais em *C. dubia* ($\text{CL}_{50} = 5,53 \mu\text{g.L}^{-1}$) e *D. magna* ($\text{LC}_{50} = 85,72 \mu\text{g.L}^{-1}$) expostas a microcistinas estavam entre as mais baixas registradas até o momento, e efeitos reprodutivos foram observados em concentrações tão baixas quanto $2,5 \mu\text{g.L}^{-1}$. O comprimento de *D. magna* foi significativamente afetado em tratamentos com concentrações de microcistina superiores a $2,5 \mu\text{g.L}^{-1}$. Não foi observada letalidade ou comprometimento do crescimento em *Hexagenia*.

Ortiz-Rodriguez et al. (2018) avaliaram os efeitos agudos relacionados ao tempo de exposição da MC-LR em *D. magna* na biotransformação de suas enzimas antioxidantes (glutathione S-transferase, GST e catalase, CAT), subsequente peroxidação lipídica, no lactato e na enzima lactato desidrogenase (LDH). Neonatos de *D. magna* (<3 dias) e adultos jovens (7 dias) foram expostos a concentrações crescentes de MC-LR (1 até $100 \mu\text{g.L}^{-1}$) por 24 e 48 h. Foi verificado que as atividades metabólicas de *D. magna* foram diminuídas em exposições de concentrações mais altas de MC-LR, sugerindo menor capacidade de biotransformar a cianotoxina.

6.3 Fitotoxicidade como bioindicador a *Lactuca sativa*

Os efeitos nocivos provocados por toxinas de cianobactérias sobre as plantas terrestres, têm sido investigados visto a possibilidade de esses organismos entrarem em contato com as cianotoxinas diretamente pela água circundante. Muitos estudos empregam os ensaios de fitotoxicidade em diversos poluentes, devido à rápida absorção destes compostos. As espécies vegetais, apresentam rápida germinação e crescimento das sementes, o que facilita a verificação dos efeitos de determinado contaminante, em um tempo reduzido. Sua principal vantagem é a ampla variedade de parâmetros de toxicidade, como a taxa de germinação, ganho de biomassa, alongamento de raízes e aspectos bioquímicos, além de apresentar baixo custo e possibilidade de serem realizados continuamente (GVOZDENAC et al., 2013).

A alface (*Lactuca sativa*, eudicotiledônea pertencente à família Asteraceae) é a espécie vegetal bastante empregada em testes de fitotoxicidade, sendo uma das mais recomendadas para ensaios com plantas pela Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) no Guidelines for the testing of chemicals (OECD, 2006). A fase germinativa e desenvolvimento da plântula desta planta, é determinada por uma série de eventos fisiológicos, através de funções metabólicas onde a água é a principal via, portanto um contaminante pode interferir de forma decisiva no processo de germinação e no desenvolvimento durante os primeiros dias, que são fundamentais para a sobrevivência da espécie. Logo, a água contaminada compromete a germinação, por apresentar maior sensibilidade, fazendo com que a influência de contaminantes tóxicos seja empregada como precursor de toxicidade (ASAHIDE et al., 2012).

Além disso, a reação da *Lactuca sativa* a este teste é, de maneira geral, representativa para plântulas de outras espécies e traz uma boa estimativa dos efeitos de contaminantes sobre espécies vegetais. A realização do ensaio de alongamento da radícula e hipocótilo possui a vantagem de permitir a avaliação de concentrações de contaminantes tão baixas que não são capazes de inibir a germinação, apenas retardando o desenvolvimento da plântula. Por isso é considerado um indicador subletal, que se apresenta muito sensível para a avaliação da toxicidade de contaminantes em organismos vegetais (YOUNG et al., 2012), a exemplo das microcistinas.

Cao et al. (2018) investigaram os efeitos de toxicidade da microcistina-LR (0, 5, 50, 500, 1000 $\mu\text{g. L}^{-1}$), na germinação, crescimento, resposta oxidativa e bioacumulação da alface *Lactuca sativa*. Os resultados mostraram que a diminuição na germinação da alface induzida apenas pelo cobre, não foi significativamente diferente daquela induzida pela mistura, e a avaliação da toxicidade combinada mostrou um simples efeito aditivo. O crescimento da alface não foi reduzido significativamente apenas pela microcistina-LR, enquanto foi significativamente reduzido apenas pelo cobre e pela mistura quando a concentração de cobre foi superior a 500 $\mu\text{g. L}^{-1}$, apenas em altas concentrações de microcistina-LR (1000 $\mu\text{g. L}^{-1}$), foi verificado a indução o estresse oxidativo em alface.

Avaliando a sensibilidade das sementes de *Lactuca sativa* à exposição de microcistinas, Romanowska-Duda et al. (2016) observaram os números de sementes germinadas e o comprimento das raízes e os hipocótilos medidos no 1, 2 e 3 dias após a semeadura. Os resultados mostraram que as microcistinas não diminuíram significativamente. Os efeitos tóxicos foram exibidos pela diminuição do comprimento

das raízes em todas as sementes germinadas, enquanto o comprimento dos hipocótilos não foi significativamente afetado por eles.

Araújo et al. (2016) determinaram a cinética de bioacumulação e depuração da MC-LR em tecidos foliares de alface e estimaram a ingestão diária total (ToDI) de MC-LR por vegetais contaminados por seres humanos. As sementes de alface foram irrigadas com água contaminada com 5 e 10 $\mu\text{g. L}^{-1}$ de MC-LR por 7 dias (bioacumulação) e, posteriormente, com água não contaminada por 7 dias (depuração). A MC-LR foi acumulada apenas em alface. Após 7 dias de irrigação com água não contaminada, mais de 25% da MC-LR acumulada ainda era retida nos tecidos foliares das plantas tratadas com 10 $\mu\text{g. L}^{-1}$ MC-LR. A ingestão diária total de toxinas por consumidores adultos (60 kg-pc) excedeu o limite de 0,04 $\mu\text{g MC-LR kg-pc}^{-1}$ recomendado pela OMS. A bioacumulação foi linearmente proporcional à concentração de exposição da toxina, aumentando com o tempo. Por outro lado, a depuração do MC-LR foi menos eficiente em concentrações de exposição mais altas.

6.4 Ecotoxicidade aplicada ao tratamento de água com cianotoxinas

Dentre os trabalhos já realizados utilizando ensaios de ecotoxicidade antes e após tratamentos de degradação de microcistina – LR por processos oxidativos avançados, pode-se citar os estudos de Vilela et al. (2012), que investigaram o uso da fotocatalise heterogênea solar (TiO_2) na degradação de MC-LR e observaram a toxicidade aguda e crônica em ratos e através de testes *in vitro* de inibição da proteína fosfatase. Foram necessários 150 minutos de ensaios (pH 3) para reduzir de 10 para 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR. A toxicidade aguda presente na amostra inicial foi removida, porém, testes usando a enzima fosfatase indicaram a formação de subprodutos com efeitos crônicos em mamíferos.

Müller (2017), avaliou a toxicidade e degradação de *Microcystis aeruginosa* e microcistina-LR, por diferentes POAS e nanopartículas de prata. No presente trabalho, os microcrustáceos *D. magna* foram submetidos aos ensaios, no qual apresentaram diferentes graus de toxicidade, quando avaliado o grau de mobilidade dos organismos. A amostra inicial em T_0 (MC-LR=146,7 $\mu\text{g. L}^{-1}$) não apresentou toxicidade aguda para *D. magna*. Com base no fator de diluição – FTd (a menor diluição em que a amostra não apresenta toxicidade) os tratamentos que obtiveram menor FTd foram o T2 (UV-C/ H_2O_2) e o T3 (UV-C/ H_2O_2 + N_{Ag}), com FTd de 2, e porcentagem de imobilidade dos organismos

de 70% e 50%, respectivamente. A toxicidade da água de estudo após o tratamento foi intensificada no T1 (UV-C), onde obteve-se FTd de 8, e porcentagem de imobilidade dos organismos de 30% na amostra sem diluição, 26,6% de imobilidade na amostra diluída na proporção 1:2, e 16,7% de imobilidade na diluição 1:4. No último caso analisado, o tratamento T6 (UV-C/NAg) demonstrou alto grau de toxicidade, causando a imobilidade de 100% dos organismos-teste em todas as diluições analisadas.

Objetivando estudar a degradação fotocatalítica da microcistina-LR (MC-LR), Khadgi e colaboradores (2019), utilizaram nanocompósito (NC) baseado em ferrita de zinco ($ZnFe_2O_4$) modificado com óxido de grafeno (GO) e nanopartículas de prata (NPs) para melhorar suas propriedades fotocatalíticas sob luz visível e assim favorecer a degradação fotocatalítica deste micropoluento. O $ZnFe_2O_4$ -Ag / rGO exibiu desempenho superior em luz visível, permitindo degradação completa do MC-LR dentro de 120 min de tratamento. A análise do carbono orgânico total revelou que apenas 22% do MC-LR foi mineralizada em 120 minutos de tempo de tratamento, indicando a presença de diferentes subprodutos intermediários. O ataque de radicais OH formados durante o processo fotocatalítico resultaram em hidroxilação e subsequente clivagem da ligação dieno. Ainda foi realizado a avaliação da toxicidade com *Daphnia magna* constatando que o processo de degradação reduziu a toxicidade de MC-LR e não foram formados intermediários tóxicos durante o tratamento, o que é muito importante do ponto de vista ecotoxicológico.

Micheletto et al. (2020), avaliaram o processo de foto-Fenton solar em pH quase neutro na degradação da microcistina-LR em condições próximas às encontradas nos episódios de floração, com alta concentração de detritos celulares e matéria orgânica natural (MON). Também foram avaliadas a influência de parâmetros experimentais, como as concentrações de Fe^{2+} e H_2O_2 , matriz de reação, presença de íons sequestradores, bem como a ecotoxicidade antes e após o tratamento. Os ensaios de efeito matricial indicaram que os sequestradores de radicais apresentados no meio, foram responsáveis pela diminuição das taxas de mineralização. No reator foi alcançada redução COD (75%) e MC-LR (70%) após 120 minutos a $pH = 7,8$, $[H_2O_2] / COD = 3.18$ e $[H_2O_2] / [Fe^{2+}] = 10$ para a amostra. Quando as mesmas condições foram aplicadas à amostra RVCE, o processo removeu 77% do DOC e até 99% do MC-LR após 45 minutos de reação. Os bioensaios com *Sinapis alba* mostraram que não houve aumento da ecotoxicidade após o tratamento com foto-Fenton solar. Estes resultados demonstraram o potencial do processo

foto-Fenton solar em pH neutro, como uma etapa adicional no tratamento de matrizes naturais contaminadas com microcistinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, I.; ZAHEER, S. Advanced oxidation process for wastewater treatment: A review. *American International Journal of Research in Science, Technology, Engineering & Mathematics*, v. 3, n. 7, p. 189–191, 2014.

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12.713: Ecotoxicologia aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2016.

AGUILERA, A., GÓMEZ, E. B., KAŠTOVSKÝ, J., ECHENIQUE, R. O., SALERNO, G. L. (2018). The polyphasic analysis of two native *Raphidiopsis* isolates supports the unification of the genera *Raphidiopsis* and *Cylindrospermopsis* (Nostocales, Cyanobacteria). *Phycologia*, 57(2), 130-146.

ALBUQUERQUE, M.V.C. Avaliação da degradação de microcistina-LR no tratamento de água de abastecimento em sistema convencional seguido por processos oxidativo avançado (POA). 2017. 129 p. **Dissertação** (Mestrado). Programa de Pós graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Estadual da Paraíba.

ANTONOPOULOU, M.; EVGENIDOU, E.; LAMBROPOULOU, D.; KONSTANTINOU, I. 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.

ANTUNES, S C; CASTRO, B B. Pulgas-de-água (*Daphnia ssp.*). **Revista de ciência elementar**. 2017.

APHA, A. W. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22 ed. Washington, DC. American Public Health Association. American Water Works Association, Water Pollution control Federation, 2012.

ARAÚJO, F. V. F.; YOK, L.; TEIXEIRA, L. A. C. Remoção de cor em soluções de corantes reativos por oxidação com H₂O₂/UV. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 11-14, 2016.

ASAHIDE, C.A.; MAGRIN, F.; LOUZADA, T.P.O.; SILVA, D.P.B.; COSTA, C.R. Utilização de sementes de alface na avaliação da toxicidade de sais de metais potencialmente tóxicos. **Química ambiental**, v 43.p.102-114, 2012.

BRASIL. Resolução nº 430/ 2011 do CONAMA. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente–CONAMA. Brasília –DF: CONAMA, 13 de maio de 2011.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente Resolução CONAMA nº. 357/2005, 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2005.

BRASIL. Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017 Brasília: Ministério da Saúde, 2021.

BRASIL. Portaria de consolidação de nº de 28 de setembro de 2017 do Ministério da Saúde. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, 2017.

BOKARE, A.D.; CHOI, W. Review Of iron-free Fenton-like Systems for activating H₂O₂ in Advanced oxidation processes. **Journal of Hazardous Materials**, v.275, p.121-135, 2014.

BOTES, D. P.; TUIMAN, A. A.; WESSELS, P. L.; VILJOEN, C. C.; KRUGER, H.; WILLIAMS, D. H.; SANTIKARN, S.; SMITH, R. J. & HAMMOND, S. J. The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic peptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Journal of the Chemical Society**, Perkin Transactions, v. 1: 2311-2318, 1984.

BURATTI, F. M., MANGANELLI, M., VICHI, S., STEFANELLI, M., SCARDALA, S., EMANUELA, T., FUNARI, E. (2017). Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 3, p. 1049–1130.

CAO, Q., STEINMAN, A. D., WAN, X., & XIE, L. (2018). Bioaccumulation of microcystin congeners in soil-plant system and human health risk assessment: A field study from Lake Taihu region of China. **Environmental Pollution**, 240, 44-50. doi:10.1016/j.envpol.2018.04.067

CASTRO, G. B. et al. Is the development of *Daphnia magna* neonates affected by short-term exposure to polyethylene microplastics? **Journal of Environmental Science and Health**, Part A, v. 55, n. 8, p. 935-946, 2020.

CETESB (São Paulo) Manual de cianobactérias planctônicas: legislação, orientações para o monitoramento e aspectos ambientais /CETESB; Maria do Carmo Carvalho ... [et al.]. -- São Paulo: CETESB, 2013.

CHLIPALA, G.E., MO, S. AND ORJALA, J. Chemodiversity in freshwater and terrestrial cyanobacteria - a source for drug discovery. **Curr. Drug Targets** 12(11), 1654-1673.2011.

CHRISTENSEN, V. G., & KHAN, E. (2020). Freshwater neurotoxins and concerns for human, animal, and ecosystem health: A review of anatoxin-a and saxitoxin. **Science of the Total Environment**, 736, 139515. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139515>.

CHORUS, I., FASTNER, J., & WELKER, M. (2021). Cyanobacteria and cyanotoxins in a changing environment: Concepts, controversies, challenges. **Water**, 13(18). <https://doi.org/10.3390/w13182463>.

COSTA S.M; FERRÃO-FILHO A.S; AZEVEDO S.M.F.O. (2013) Effects of saxitoxin- and nonsaxitoxin- producing strains of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* on the fitness of temperate and tropical cladocerans. **Harmful Algae** 28:55–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2013.05.017>

DEVLIN, J.P.; EDWARDS, O.E.; GORHAM, P.R.; HUNTER, N.R.; PIKE, R.K.; STAVRICH, B. Anatoxin-a a toxicalkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44 the. **Can.J.Chem.** 55:1367-1371, 1977.

DITTMANN, E.; WIEGAND, C. Cyanobacterial toxins - occurrence, biosynthesis and impact on human affairs. **Molecular Nutrition Food Research.** v. 50, n. 1, 7- 17, 2006.

DONG, J., CHANG, M., LI, C. et al. Allelopathic effects and potential active substances of *Ceratophyllum demersum* L. on *Chlorella vulgaris*. **Aquatic Ecology.** 53, 651–663 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10452-019-09715-2>

ETTOUMI, A. et al. Bioaccumulation of cyanobacterial toxins in aquatic organisms and its consequences for public health. In: KATTEL, G. (Ed.) Zooplankton and Phytoplankton: Types, **Characteristics and Ecology.** Ed. Nova, 2011. p. 1-34

FENTON, H. J.H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. **Journal of the Chemical Society**, vol. 65, n. 1894, pp. 899-910. doi:10.1039/ct8946500899.

FESB – CETESB. Estudos efetuados na represa de Americana e no trecho do Rio Atibaia, a montante do reservatório. Relatório Técnico. São Paulo. 67p. 1971.

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.

GVOZDENAC, S.; INDIC, D.; VUKOVIC, S. Phytotoxicity of Chlorpyrifos to White Mustard (*Sinapis alba* L.) and Maize (*Zea mays* L.): Potential Indicators of Insecticide Presence in Water. **Pesticides and phytomedicine**, v. 28, n. 4, p. 265-271, 2013.

HAIDER, A. A., HAIFAA, M. J. Effect of physicochemical factors on cyanobacteria biodiversity in some agricultural soil of Al-Diwaniyah City during spring period. – **JGPT** 2(9): 43-52, 2017.

JACINAVICIUS, F. R. et al. Effect of ultraviolet radiation on the metabolomic profiles of potentially toxic cyanobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 97, n. 1, p. f1aa243, 2021.

JI, Y., LU, G., CHEN, G., HUANG, B., ZHANG, X., SHEN, K. & WU, S. Microcystin-LR Induces Apoptosis via NF- κ B /iNOS. **Pathway in INS-1 Cells, Int. J. Mol. Sci.**, v. 12(7), 4722-4734. 2011.

KARCI, A., WURTZLER, E. M., DE LA CRUZ, A. A., WENDELL, D., & DIONYSIOU, D. D. (2018). Solar photo-Fenton treatment of microcystin-LR in aqueous environment: Transformation products and toxicity in different water matrices. **Journal of Hazardous Materials**, 349, 282–292. doi:10.1016/j.jhazmat.2017.12.07.

KHADGI, N., & UPRETI, A. R. (2019). Photocatalytic degradation of Microcystin-LR by visible light active and magnetic, ZnFe₂O₄-Ag/rGO nanocomposite and toxicity assessment of the intermediates. **Chemosphere**. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.01.046

KOMÁREK, J. Modern classification of cyanobacteria. In: SHARMA, N. K.; RAI, A. K.; STAL, L. J. (Ed.) *Cyanobacteria: An Economic Perspective*. **Wiley-Blackwell**, 2013. p. 21-39.

KUMAR V, NANDA M, KUMAR S, CHAUHAN PK 2018. The effects of ultraviolet radiation on growth, biomass, lipid accumulation and biodiesel properties of microalgae. *Energy sources. part A*:787-793.

LE MOAL, M., GASCUEL-ODOUX, C., MÉNESGUEN, A., SOUCHON, Y., ÉTRILLARD, C., LEVAIN, A., PINAY, G. Eutrophication: A new wine in an old bottle? **Science of The Total Environment**, 651, 1–11. 2019. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.09.139.

LI W., H. GUO, L. WANG, D. ZHANG, X. WU, L. LI, Y. QIU, L. YANG, D. LI, R. TANG. Waterborne microcystin-LR exposure induced chronic inflammatory response via MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway in male zebrafish, **Science of the Total Environment** (2019).

LIU, J., YE, J., OU, H., & LIN, J. (2016). Effectiveness and intermediates of microcystin-LR degradation by UV/H₂O₂ via 265 nm ultraviolet light-emitting diodes. **Environmental Science and Pollution Research**, 24(5), 4676–4684. doi: 10.1007/s11356-016-8148-1.

LOPES, V. M., BAPTISTA, M., REPOLHO, T., ROSA, R., & COSTA, P. R. (2014). Uptake, transfer and elimination kinetics of paralytic shellfish toxins in common octopus (*Octopus vulgaris*). **Aquatic Toxicology**, 146, 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.011>.

MA, Y., LIU, H., DU, X., SHI, Z., LIU, X., WANG, R., ZHANG, S., TIAN, Z., SHI, L., GUO, H., & ZHANG, H. (2021). Advances in the toxicology research of microcystins based on Omics approaches. **Environment International**, 154, 106661. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106661>.

MEREL, S., WALKER, D., CHICANA, R., SNYDER, S., BAURÈS, E., & THOMAS, O. (2013). State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. **Environment International**, 59, 303–327. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.013>.

METCALF, J.S.; CODD, G.A. Cyanotoxins. In *Freshwater Benthic Environments*. In: WHITTON, B.A. (Org.) *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*, New York: **Springer**, p.1-13, 2012.

MICHELETTO, J, TORRES, M.A, DE PAULA, V.C.S; CERUTTI, C. V; PAGIORO T. A; CASS, Q.B; MARTINS D. L. R. R; MARCUS, V. L. C e ADRIANE, M. F. Solar photo-Fenton at neutral pH applied to microcystin-LR degradation: Fe²⁺, H₂O₂ and reactional matrix effects. **Royal Society of Chemistry**. 2020.

MOREIRA, C.; AZEVEDO, J.; ANTUNES, A.; VASCONCELOS, V. Cylindrospermopsin: occurrence, methods of detection and toxicology. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 114, p. 605-620, 2012.

MÜLLER, L. Avaliação da toxicidade e degradação de *M. aeruginosa* e Microcistina-LR, por AOPs e nanopartículas de prata. 2017. 100 f. **Dissertação** (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2017.

MURK, A. J., NICOLAS, J., SMULDERS, F. J. M., BÜRCK, C., & GERSSEN, A. (2019). Marine biotoxins: types of poisoning, underlying mechanisms of action and risk management programmes. In Chemical hazards in foods of animal origin, ECVPH. **Food safety assurance**, Vol. 7, pp. 207–239. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-877-3_09.

MURRAY, S. A., MIHALI, T. K., & NEILAN, B. A. (2011). Extraordinary conservation, gene loss, and positive selection in the evolution of an ancient neurotoxin. **Molecular Biology and Evolution**, 28(3), 1173–1182. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq295>.

NERY, J.F; NERY, G.K; MEDEIROS, S.S; BRASILEIRO, W.F. Cianobactérias no semiárido – Guia ilustrado. INSA, 112 p, 2019.

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.

OREN, A. Cyanobacteria: biology, ecology and evolution. In: SHARMA, N. K.; RAI, A.K.; STAL, L. J. (Ed.) Cyanobacteria: An Economic Perspective. Wiley-Blackwell, 2013. p. 3-20.

ORTIZ-RODRÍGUEZ, R., DAO, T.S., Wiegand, C. (2012). Transgenerational effects of microcystin-LR on *Daphnia magna*. **Journal of Experimental Biology**, 215(16), 2795-2805.

PEARSON, L.; MIHALI, T.; MOFFITT, M.; KELLMANN, R.; NEILAN, B. On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. **Marine Drugs**, v. 8, n. 5, p. 1650–1680, 2010.

PEGRAM, R. A.; HUMPAGE, A. R.; NEILAN, B. A.; RUNNEGAR, M. T.; NICHOLS, T.; THACKER, R. W.; PFLUGMACHER, S.; ETHERIDGE, S. M. & LOVE, A. H. Cyanotoxins Workgroup Report. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 619: 317-381.2008.

PINHEIRO, C., AZEVEDO, J., CAMPOS, A., LOUREIRO, S., & VASCONCELOS, V. (2012). Absence of negative allelopathic effects of cylindrospermopsin and microcystin-LR on selected marine and freshwater phytoplankton species. **Hydrobiologia**, 705(1), 27–42. doi:10.1007/s10750-012-1372-x.

PONIEDZIALEK, B., RZYMSKI, P., KOKOCIŃSKI, M., Cylindrospermopsin: water-linked potential threat to human health in Europe. **Environmental toxicology and pharmacology**, 34, 651-660. 2012.

POWER, E.A.; BOUMPHREY, R.S. Ecotoxicology, International Trends in Bioassay Use for Effluent Management, 13, 377–398, 2004.

RAGASSI, B; PINHEIRO, J. H. P. A; JÚNIOR, O.P. S. Ecotoxicidade de agrotóxicos para algas de água doce. **Revista Científica ANAP Brasil**. v.10, n. 19. p. 1-12, 2017.

RAMOS, C.P.S; PINHEIRO, I.O.P; SILVA, E.M. Estudo da presença da toxina microcistina na água de reservatório de Mundaú (Garanhuns-PE) pelas metodologias ELISA e CLAE. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, 2014; 73(2):169-77.

RODRÍGUEZ-ROMERO, A.; VIGURI, J. R.; CALOSI, P. Acquiring an evolutionary perspective in marine ecotoxicology to tackle emerging concerns in a rapidly changing ocean. **Science of The Total Environment**, v. 764, p. 142816, 2021.

ROMANOWSKA-DUDA B., M. GRZESIK, J. T. MANKIEWICZ & M. ZALEWSKI. Bioindication of microcystins toxicity by germinating seeds. **Environmental Toxicology**, v. 243, p. 1-10, 2016. doi: 10.2495/ETOX060241.

RUTKOWSKA M, PŁOTKA-WASYLKA J, MAJCHRZAK T, WOJNOWSKI W, MAZUR- MARZEC H, NAMIEŚNIK J (2019). Recent trends in determination of neurotoxins in aquatic environmental samples. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 112:112-122.

SAVIC, B. G., BORMANS, M., EDWARDS, C., LAWTON, L., BRIAND, E., & WIEGAND, C. Cross talk: Two way allelopathic interactions between toxic *Microcystis* and *Daphnia*. **Harmful Algae**, 94, 2020. 101803. doi:10.1016/j.hal.2020.101803.

SHAHMOHAMADLOO, R. S., POIRIER, D. G., ORTIZ ALMIRALL, X., BHAVSAR, S. P., & SIBLEY, P. K. (2019). Assessing the toxicity of cell-bound microcystins on freshwater pelagic and benthic invertebrates. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 109945. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.109945.

ŠEJNOHOVÁ, L.; MARŠÁLEK, B. Microcystis. In: WHITTON, B.A. (Org.) Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time, New York: **Springer**, p.1-13, 2012.

SILVA, A. G. Avaliação do pH de oxidação do processo Fenton na remoção de microcistina-LR de água de abastecimento. **Dissertação de mestrado**. Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental - Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Campina Grande. 2016.105p.

SINHA, E., MICHALAK, A. M., & BALAJI, V. Eutrophication will increase during the 21st century as a result of precipitation changes. **Science**, 357(6349), 405–408. 2017. doi:10.1126/science.aan2409.

SIMONSEN, M. E.; MUFF, J.; BENNEDSEN, L. R.; KOWALSKI, K. P.; SØGAARD, E. G. Photocatalytic bleaching of p-nitrosodimethylaniline and a comparison to the performance of other AOP technologies. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 216, p. 244-249, 2010.

SOARES, J. K. N. C.; ALBUQUERQUE, M. V. C.; LEITE, V. D.; SOUSA, J. T.; LOPES, W. S. Identificação e efeitos toxicológicos dos subprodutos gerados na degradação de microcistina-LR por processos oxidativos avançados. **Revista Ibero-americana de Ciências Ambientais**, v. 12, p. 301-313, 2022.

SPUHLER, D.; RENGIFO-HERRERA, J. A.; PULGARIN, C. The effect of Fe²⁺, Fe³⁺, H₂O₂ and the photo-Fenton reagent at near neutral pH on the solar disinfection (SODIS)

at low temperatures of water containing *Escherichia coli*. **Applied Catalysis B: Environmental**. V. 96, p. 126–141, 2010.

STAUFFER, B. A., BOWERS, H. A., BUCKLEY, E., DAVIS, T. W., JOHNGEN, T. H., KUDELA, R., MCMANUS, M. A., PURCELL, H., SMITH, G. J., WOUDE, A. VANDER, & TAMBURRI, M. N. Considerations in harmful algal bloom research and monitoring: Perspectives from a consensus-building workshop and technology testing. **Frontiers in Marine Science**., 2019. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00399>.

TESTAI, E., SCARDALA, S., VICHI, S., BURATTI, F. M., & FUNARI, E. (2016). Risk to human health associated with the environmental occurrence of cyanobacterial neurotoxic alkaloids anatoxins and saxitoxins. **Critical Reviews in Toxicology** 46(5), 385–419. <https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1137865>.

TORTORA, G. J. et al. Microbiologia. 10^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

YOUNG, B.; RIERA, N.; BEILY, M.; BRES, P.; CRESPO, D.; RONCO, A. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 182-186, 2012.

VILELA, W.F.D., MINILLO, A., ROCHA, O., VIEIRA, E.M., AZEVEDO, E.B., 2012. Degradation of [D-Leu] -Microcystin-LR by solar heterogeneous photocatalysis (TiO₂). **Sol. Energy** 86, 2746–2752. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2012.06.012>.

VISCIANO, P., SCHIRONE, M., BERTI, M., MILANDRI, A., TOFALO, R., & SUZZI, G. (2016). Marine Biotoxins: Occurrence, Toxicity, Regulatory Limits and Reference Methods. **Frontiers in Microbiology**, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.0105>.

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**, 610-611, 786–795. 2018. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.08.149.

WANG L.C, ZI JM, XU RB, HILT S, HOU XL, CHANG XX. 2017. Allelopathic effects of *Microcystis aeruginosa* on green algae and a diatom: evidence from exudates addition and co-culturing. **Harmful Algae** 61: 56–62.

WANG, H.; HO, L.; LEWIS, M. D.; BROOKES, J. D.; NEWCOMBE, G. Discriminating and assessing adsorption and biodegradation removal mechanisms during granular activated carbon filtration of microcystin toxins. **Water Research**, v. 41, p. 4262 – 4270, 2007.

WANG, W.-L., WU, Q.-Y., HUANG, N., XU, Z.-B., LEE, M.-Y., HU, H.-Y., Potential risks from UV/H₂O₂ oxidation and UV photocatalysis: A review of toxic, assimilable, and sensory unpleasant transformation products, **Water Research** (2018), doi: 10.1016/j.watres.2018.05.005.

ZENG, C.; SUN, H.; XIE, P.; WANG, J.H.; ZHANG, G.R.; CHEN, N.; YAN, W.; LI, G.Y. The role of apoptosis in MCLR-induced developmental toxicity in zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v 149, p. 25-32. 2014.

ZHAO, C., ZHANG, F., LIU, W., ZHANG, X., Microcystin-LR promotes zebrafish (*Danio rerio*) oocyte (in vivo) maturation by activating ERK1/2-MPF signaling pathways, and cAMP is involved in this process, **Environmental Pollution** (2020).

ZHANG, L., DONG, H., LI, H., LI, B., ZHAO, G., CAI, H., DONG, J., 2020. Novel signal-on immunosensors for rapid and sensitive detection of Microcystin-LR. **Microchemical Journal**. 167, 106295. <http://doi:10.1016/j.microc.2021.106295>.

ZONG W, SUN F, SUN X (2013) Oxidation by-products formation of microcystin-LR exposed to UV/H₂O₂: toward the generative mechanism and biological toxicity. **Water Res** 47:3211– 3219.

Capítulo 2

EFEITOS ALELOPÁTICOS DE CIANOTOXINAS SOBRE AS RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE *Chlorella vulgaris*

RESUMO

Contribuindo para a avaliação de possíveis alterações fisiológicas de microalgas submetida a diferentes concentrações e tipos de cianotoxinas, este estudo investigou os efeitos inibitórios de cianotoxinas sobre o crescimento, densidade, biomassa e ecotoxicidade de *Chlorella vulgaris*. Observou-se a exposição de *Chlorella vulgaris* à extratos brutos de cianobactérias produtora de microcistina-LR (MC-LR), saxitoxina (SXT), anatoxina-a (ATX-A) e cilindrospermopsina (CYN) com concentrações iniciais de 5,0; 2,05; 0,61 e 1,42 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Os experimentos foram realizados sob condições controladas em sala climatizada (23 °C), com amostras acondicionadas em frascos erlenmeyers, sob agitação constante com auxílio de mesa de agitação orbital a 175 rpm, taxa luminosa (40 $\mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo 12:12 (claro/escuro). O período total de duração dos ensaios foi de 96h e o monitoramento do crescimento e inibição celular ocorreu em 24h, 48h, 72h e 96h com a retirada de uma alíquota de 1,0 mL para contagem do número de células e ao final de 96 h foi feita a determinação do conteúdo de clorofila-a e avaliação da ecotoxicidade, sob metodologia adotada da NBR 12.648/2018. Os ensaios expostos às menores concentrações de ATX-A (0.61 $\mu\text{g.L}^{-1}$) promoveram maiores efeitos inibitórios sobre o crescimento, densidade, biomassa e ecotoxicidade da espécie-alvo de *Chlorella vulgaris*. No entanto, as maiores concentrações dos exsudatos MC-LR (5.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$) utilizadas, acarretaram também em reduções expressivas no crescimento da referida microalga. As cianotoxinas saxitoxina (SXT) e cilindrospermopsina (CYN), não apresentaram toxicidade. A utilização de concentrações diversas e muitas vezes acima do que é normalmente encontrado nos ambientes aquáticos, ocasionou maiores dificuldades na comparação de resultados. O uso de extratos ou filtrados em cultivos das linhagens-alvo simularam mais fielmente o que ocorre no ambiente aquático, mas dificultou a identificação da (s) substância (s) que promove (m) as respostas alelopáticas. Sugere-se que mais estudos sejam realizados a fim de entender o potencial alelopático desses metabólicos, visto que, as respostas bioquímicas desencadeadas por esses aleloquímicos pode mudar de acordo com a espécie cultivada, condições de cultivo e quantidade de toxina disponível.

Palavras chave: Alelopatia; Cianobactérias; Microalgas; Ecotoxicidade.

ABSTRACT

Contributing to the evaluation of possible physiological changes in microalgae subjected to different concentrations and types of cyanotoxins, this study investigated the inhibitory effects of cyanotoxins on the growth, density, biomass and ecotoxicity of *Chlorella vulgaris*. *Chlorella vulgaris* was exposed to crude extracts of cyanobacteria that produce microcystin-LR (MC-LR), saxitoxin (SXT), anatoxin-a (ATX-A) and cylindrospermopsin (CYN) with initial concentrations of 5.0; 2.05; 0.61 and 1.42 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectively. The experiments were carried out under controlled conditions in an acclimatized room (23 °C), with samples placed in Erlenmeyer flasks, under constant agitation with the aid of an orbital shaking table at 175 rpm, light rate ($40 \mu\text{mol m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and photoperiod 12:12 (light/dark). The total duration of the assays was 96h and the monitoring of cell growth and inhibition occurred at 24h, 48h, 72h and 96h with the withdrawal of a 1.0 mL aliquot for counting the number of cells and at the end of 96 h the determination of the chlorophyll-a content and evaluation of ecotoxicity were carried out, under the methodology adopted from NBR 12.648/2018. Assays exposed to the lowest concentrations of ATX-A ($0.61 \mu\text{g.L}^{-1}$) promoted greater inhibitory effects on growth, density, biomass and ecotoxicity of the target species of *Chlorella vulgaris*. However, the higher concentrations of MC-LR exudates ($5.0 \mu\text{g.L}^{-1}$) used also resulted in significant reductions in the growth of the referred microalgae. The cyanotoxins saxitoxin (SXT) and cylindrospermopsin (CYN) showed no toxicity. The use of different concentrations, often above what is normally found in aquatic environments, caused greater difficulties in comparing results. The use of extracts or filtrates in cultures of the target strains more faithfully simulated what occurs in the aquatic environment, but made it difficult to identify the substance(s) that promote (m) the allelopathic responses. It is suggested that further studies be carried out in order to understand the allelopathic potential of these metabolites, since the biochemical responses triggered by these allelochemicals can change according to the cultivated species, cultivation conditions and amount of toxin available.

Keywords: Allelopathy; Cyanobacteria; Microalgae; Ecotoxicity.

1. INTRODUÇÃO

A estrutura das comunidades fitoplanctônicas podem ser influenciadas por interações químicas entre diferentes espécies, um processo conhecido como alelopatia pelo qual os organismos sintetizam e liberam compostos bioativos chamados aleloquímicos no ambiente circundante para influenciar positiva ou negativamente o crescimento de espécies vizinhas (RICE, 1984).

A alelopatia desempenha papéis importantes na comunicação intra-espécies, competição de recursos e interferência, sucessão ecológica e formação de florações. Estudos já relataram sobre os efeitos alelopáticos (fisiológicos e bioquímicos) de cianotoxinas, em especial as microcistinas em diferentes organismos fotoautotróficos (WANG et al., 2017). A fitotoxicidade desses metabólitos induz diferentes respostas fisiológicas para os produtores aquáticos. No caso das microalgas, os estudos demonstram efeitos inibitórios no crescimento, volume celular, teor de clorofila e estresse oxidativo, uma vez que as cianotoxinas têm demonstrado afetar a atividade de enzimas antioxidantes como a SOD, CAT, APx, GPx (BITTENCOURT et al., 2015; WANG et al., 2017).

Com base nas informações supracitadas, este estudo visa contribuir para a investigação de possíveis respostas fisiológicas da clorófitica *Chlorella vulgaris* submetida a diferentes tipos de cianotoxinas, sendo a microcistina – LR, saxitoxina, cilindrospermopsina e anatoxina –a, investigando quais destas causam efeito inibitório sobre o crescimento, densidade, biomassa e ecotoxicidade da espécie-alvo. A presença dessas cianotoxinas tem sido frequentemente observada nos ecossistemas aquáticos e o potencial alelopático desses metabólicos em concentrações normalmente encontradas na natureza são poucos estudados.

Diante ao exposto, o presente estudo buscou responder a seguinte hipótese:

H1: Somente maiores concentrações de cianotoxinas exercerão efeitos negativos sobre alguns indicadores do estado fisiológico (densidade celular, inibição de crescimento, clorofila-a e ecotoxicidade) de *Chlorella vulgaris*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Química e Sanitária Ambiental (LAQUISA), localizado na Estação Experimental de Tratamento Biológico de Esgotos Sanitários (EXTRABES) pertencente a Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

2.1 Cepas de Cianobactérias

Foram selecionadas quatro cepas de cianobactérias produtoras de cianotoxinas: *Microcystis aeruginosa*, produtora de microcistina-LR (MC-LR/Word Data Center Microorganisms 835), *Raphidiopsis raciborskii* produtora de saxitoxina (SXT- ITEP-A1), gentilmente cedida pela Prof. Dra. Sandra Azevedo do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ; *Dolichospermum solitarium* produtora de anatoxina-a (ATX-A/CIAN05) e *Raphidiopsis raciborskii* produtora de cilindrospermopsina (CYN-/CIAR01), esta fornecida pelo Laboratório de Ecologia Aquática (Leaq) da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB. De acordo com a literatura, tais espécies tem a capacidade de produzir compostos alelopáticos e tóxicos que propiciam respostas estimulatórias ou nulas em organismos-alvo.

As espécies foram mantidas na sala de cultivo de cianobactérias, as cepas estoques foram produzidas em quantidades satisfatórias para a execução dos ensaios, em meio ASM-1 estéril (GORHAM, et al. 1964), a 22°C e 310 μmol fóton $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, em fotoperíodo de 12:12 horas (claro/escuro).

2.2 Extração das cianotoxinas

A soma das frações extracelulares e intracelulares, para a extração das toxinas, foram realizadas três séries de congelamento e descongelamento das amostras em temperatura -4°C, com o objetivo de provocar a lise celular e consequente liberação da toxina intracelular para o meio extracelular (BROOKE et al., 2006; WANG et al., 2007). Em seguida, a quantificação da microcistina-LR na suspensão de células lisadas foi realizada por (CLAE-EM) com método validado por Albuquerque (2017), empregando um cromatógrafo UHPLC 3000 e um espectrômetro de massas LCQ Fleet Ion Trap

(ambos da Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). As configurações utilizadas para CLAE-EM e as figuras de mérito da validação do método são apresentados na Tabela 1 (anexo). As análises de saxitoxina, anatoxina-a e cilindrospermopsina foram determinadas pelo método Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), utilizando kits em placas Abraxis, Inc (Warminster, Pa), com auxílio de um leitor de microplacas ASYS A-5301 (ASYS Hitech GmbH Eugendorf, Áustria).

2.3 Cepa da microalga e organismo teste *Chlorella vulgaris*

A cepa da microalga *Chlorella vulgaris* foi fornecida pelo Laboratório de Saneamento Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, e os inóculos algais foram produzidos em condições estéreis, conforme recomendação da ABNT (NBR 12.648/2018). Utilizou-se frascos erlenmeyers com volume de 2 litros, estes mantidos em sala climatizada (24 °C) com fotoperíodo de 12 h sob iluminação de intensidade luminosa fornecidas por lâmpadas fluorescentes de 40W. Após 7 dias de cultivo (fim da fase exponencial), a densidade celular foi quantificada através da contagem de células. O organismo – alvo selecionado para este estudo foi esta microalga por ter uma distribuição cosmopolita e ser resistente a variações ambientais, bem como por possuir um rápido crescimento e que, muitas vezes a torna dominante no fitoplâncton dulcícola.

2.4 Curva de crescimento de *Chlorella vulgaris*

Para o estabelecimento da curva de crescimento de *Chlorella vulgaris*, foram realizados três ensaios com três réplicas cada. Em erlenmeyers contendo 150 mL de meio de cultura, adicionou-se o 15 mL do inóculo da microalga na fase exponencial (apresentando aproximadamente $3.000 \text{ cel. mL}^{-1}$), sob temperatura controlada de 22 ± 1 °C, pH entre 7,5 e 8,5, salinidade 36 ± 1 e fotoperíodo de 12 h de claro e 12 h de escuro e agitação manual 2 vezes ao dia.

A densidade celular foi obtida a cada 5 dias, durante 30 dias de cultivo em meio de cultura MBB, sendo esta observada e calculada pelo método de determinação de contagem direta, realizada com auxílio de microscópio óptico modelo COLEMAN, em câmara de Neubauer. A determinação da densidade celular seguiu o que está preconizado por Tavares e Rocha (2003), aplicando-se a Equação 1.

$$C \text{ (células/mL)} = \text{contagem total} \times 10^4 / n^\circ \text{ de blocos contados.}$$

2.5 Delineamento Experimental

2.5.1 *Chlorella vulgaris* x Cianotoxinas

Os efeitos inibitórios sobre o crescimento, densidade, biomassa e ecotoxicidade sobre a *Chlorella vulgaris* foram desenvolvidos através de experimentos de alelopatia.

Três dias antes do início dos ensaios, foi realizado um inóculo em meio líquido para pré-cultura. Após esse período, foi feita a contagem celular da microalga em câmara de Neubauer e inoculada a densidade celular de 10^5 células. mL^{-1} nos erlenmeyers com o extrato lisado das cianobactérias, na proporção 1:1. Todos os erlenmeyers e meios com nutrientes foram previamente autoclavados e os procedimentos foram feitos em câmara de fluxo laminar. Os ensaios ocorreram nas seguintes condições: em sala climatizada (23 °C), os frascos erlenmeyers foram colocados em agitação constante utilizando a mesa de agitação orbital Tecnal, (modelo TE-141) a 175 rpm e taxa luminosa ($310 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) medida através de luxímetro (Homis) e fotoperíodo 12:12 (claro e escuro) controlados. Todas amostras e controles foram feitos em triplicata (ABNT, 2018).

O período total de duração dos ensaios foi de 96h e o monitoramento do crescimento e inibição celular ocorreu em 24h, 48 h, 72 h e 96 h, com a retirada de uma alíquota de 1,0 mL para contagem do número de células e ao final de 96 h foi feita a determinação do conteúdo de clorofila-a, realizado pelo método de Jones (1979).

Com a densidade celular e o conteúdo de clorofila-a obtidos em cada ensaio, foram calculadas as médias e desvios padrão nos diferentes períodos de exposição as cianotoxinas. A partir desses resultados, foram calculadas as taxas de crescimento diário. A porcentagem de inibição do crescimento de *Chlorella vulgaris* foi calculada a partir da taxa de crescimento celular e de incremento de clorofila-a pela seguinte fórmula (ASTM 1218, 1992):

$$I = (k_1 - k_2) \cdot 100 / k_1$$

Sendo:

- I a porcentagem de inibição (%)
- k_1 a taxa de crescimento (duplicação/dia) do controle
- k_2 a taxa de crescimento (duplicação/dia) da amostra

2.5.2 Teste de toxicidade crônica utilizando *Chlorella vulgaris*

A metodologia adotada para o teste de toxicidade crônica seguiu as recomendações da NBR 12.648/2018 (Tabela 1), que consiste na exposição da *Chlorella vulgaris* às amostras de cultivo lisado das cianotoxinas, durante um período de 96 horas.

Tabela 1. Resumo dos requisitos para o ensaio de toxicidade com *Chlorella vulgaris*.

Requisitos	Espécie de organismo-teste
Organismo-teste	<i>Chlorella vulgaris</i>
Ensaio	Estático
Período de exposição	96h
Água de diluição	Meio de cultivo MMB
Inóculo	Cultivo em fase exponencial de crescimento
Número mínimo de réplicas por solução-teste	Três
Temperatura	23 a 25 °C
Iluminação	Contínua (4500lux)
Velocidade de agitação	100r/min a 175 r/min
Métodos	Contagem celular Conteúdo de Clorofila-a
Efeito observado	Inibição da multiplicação das células
Expressão dos resultados	CL ₅₀ CEO/CENO
Avaliação dos resultados	Teste de Dunnet

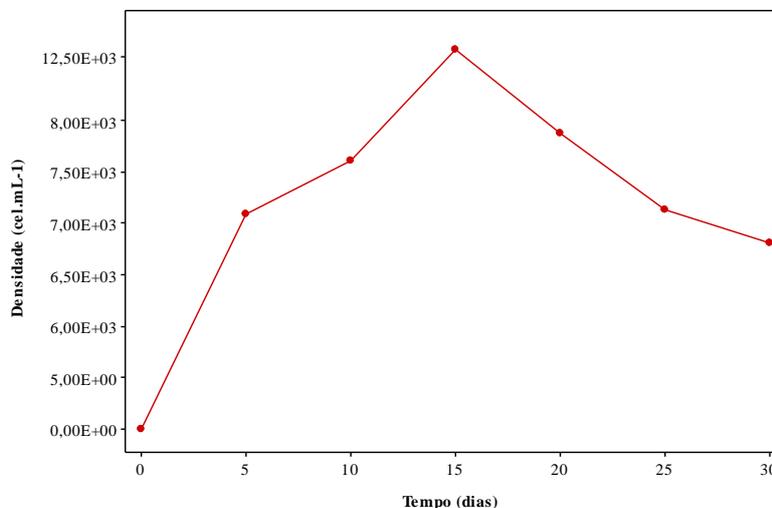
Fonte: NBR 12.648/2018.

O efeito tóxico foi determinado comparando a inibição do crescimento destas com a solução controle, sob as mesmas condições de ensaio. A validade dos testes para este ensaio de ecotoxicidade foi condicionada as seguintes premissas: o coeficiente de variação de cinco amostras controle, com tempo de exposição igual a 96 horas, não pode exceder a 40%; e a densidade celular nos frascos de controle deve aumentar por um fator de no mínimo 16 ($1,16 \times 10^5$ cel. mL⁻¹). Os resultados foram tratados estatisticamente com intervalo de confiança de 95% e expressos em CE₅₀96h - concentração efetiva média que causa um efeito crônico a 50% dos organismos após 96h de exposição, bem como pelo teste de Dunnet avaliados pelo software Estatistic.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Curva de Crescimento da *Chlorella vulgaris*

Figura 1. Curva de Crescimento da espécie microalgal *Chlorella vulgaris*.



Ao analisar a curva de crescimento da *Chlorella vulgaris*, verificou-se que ela apresentou fase Lag com duração aproximada de 1 dia, período em que ocorreu pouca divisão celular pois estas se encontravam em estado de latência, decorrente da mudança do inóculo do cultivo. Nessa fase, a população algácea passa por um período de intensa atividade metabólica, síntese de enzimas e de moléculas variadas. A partir de 5 dias de crescimento foi registrado o início da fase exponencial um incremento de 44% atingindo densidade celular de $7,23 \times 10^3$ cél.mL⁻¹. Os nutrientes são assimilados e transformados dentro da célula, sendo incorporados em ácidos nucleicos e proteínas, promovendo o crescimento da biomassa (SILVA et al., 2022).

Entre o 14° e 15° dia, a cultura apresentou as maiores densidades registradas com valores celulares médios de $12,53 \times 10^3$ cél.mL⁻¹ e valor médio de pH 7,8 iniciando assim a fase estacionária do seu crescimento. Após 16° dia, com pH crescente, identificou que a cultura se encontrava em fase de declínio, com densidade de $8,00 \times 10^3$ cél.mL⁻¹. Entre 25 e 30 dias, foram identificados os maiores valores de pH, respectivamente 8,6 e 9,2 (fase de declínio), estes associados a limitação de nutrientes e o acúmulo de metabólitos nocivos às células.

3.2 Validação dos resultados obtidos no ensaio de sensibilidade de *Chlorella vulgaris*

Os resultados preliminares dos ensaios ecotoxicológicos de *Chlorella vulgaris* após 24, 48, 72 e 96 h de exposição ao sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram obtidos pela densidade celular e após 96 h pelo conteúdo de clorofila-a. A partir dos resultados de densidade celular, foram calculadas as médias das taxas de crescimento e a porcentagem de inibição, apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Médias das taxas de crescimento (duplicações/dia) e inibição (%) de *Chlorella vulgaris* após a exposição de Sulfato de zinco heptahidratado obtidas pela densidade celular e após 96h pelo conteúdo de clorofila – a.

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Contagem de células ($\text{cel} \cdot \text{mL}^{-1}$)								Clorofila – a	
	24 h		48 h		72 h		96 h		96 h	
	TC (dupl/dia)	I (%)	TC (dupl/dia)	I (%)	TC (dupl/dia)	I (%)	TC (dupl/dia)	I (%)	TC (Cla- a/dia)	I (%)
Controle	3,12	-	2,64	-	2,35	-	2,24	-	2,31	-
0,5	2,72	9	2,45	8	2,44	-6	2,25	0	2,12	0
1,0	2,31	21	2,53	5	2,39	-4	2,31	-3	2,21	-2
2,5	2,83	10	2,44	6	2,41	-5	2,14	0	1,34	-3
5	1,55	51	2,10	21	0,00	100	0,00	100	0,01	99,9
5,5	1,69	35	1,89	32	0,00	100	0,00	100	0,01	99,9
10	1,09	50	0,21	80	0,00	100	0,00	100	0,00	100

TC: taxa de crescimento I: inibição *valores negativos significam estímulo ao crescimento.

Como pode ser observado, o sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) interferiu no crescimento de *Chlorella vulgaris*. A taxa de crescimento da microalga após 24 h e 48 h de exposição ao composto foi menor em todas as concentrações-teste, em relação ao grupo controle. Após 72 h de exposição, houve um estímulo ao crescimento da microalga, em relação ao grupo controle em concentrações mais baixas da substância 0,5, 1,0 e 2,5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e inibição total em concentrações maiores, 5, 5,5 e 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. As concentrações de 0,5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 1,0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 2,5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de sulfato de zinco heptahidratado

(ZnSO₄.7H₂O) causaram inibições entre 5 % e 21 % do crescimento celular de *Chlorella vulgaris* após 24 h e 48 h de exposição e estimulou o crescimento após 72 h. Entre estes períodos a concentração de 10 mg.L⁻¹ causou entre 50 % e 80 % de inibição.

A partir destes resultados, uma concentração de 0,5 mg.L⁻¹ da substância, foi estabelecida como a menor concentração a ser testada, para se obter uma inibição próxima a 10%. Como a concentração de 2,5 mg.L⁻¹ não chegou a inibir 90 % do crescimento da microalga, foi escolhido 10 mg.L⁻¹ como a maior concentração a ser testada. A inibição total do crescimento celular ocorreu após as 72h a partir da concentração de 5 mg.L⁻¹, portanto, foi a concentração estabelecida como a maior concentração-teste para o ensaio definitivo. Para que fossem obtidas inibições entre 10 % e 90 % do crescimento da microalga, outras concentrações foram estabelecidas, utilizando um fator 2 de diluição, resultando nas concentrações-teste de 0,5, 1, 2,5, 5,0 mg.L⁻¹ de cianotoxinas.

Os resultados obtidos pelo conteúdo de clorofila-a reforçou a necessidade de avaliar uma concentração entre 0,5 e 5 mg.L⁻¹ para que as concentrações causassem entre 10% e 90% de inibição. Com o aumento da concentração de sulfato de zinco heptahidratado, a porcentagem de inibição da microalga aumentou, em relação ao controle. Nas menores concentração testadas, entre 0,5 e 2,5 mg.L⁻¹, a substância apresentou estímulos do crescimento celular e do incremento de clorofila-a. Na maior concentração testada, 10 mg.L⁻¹ a inibição e crescimento celular e 100 % do incremento de clorofila-a. As concentrações médias estabelecidas para os ensaios definitivos foram, portanto, 0,5, 2,5, 5, 10 mg.L⁻¹. As concentrações obtidas das cianotoxinas foram: 5; 2,05; 0,61 e 1,42 µg.L⁻¹ para MC-LR, SXT, ATX-A e CYN, respectivamente.

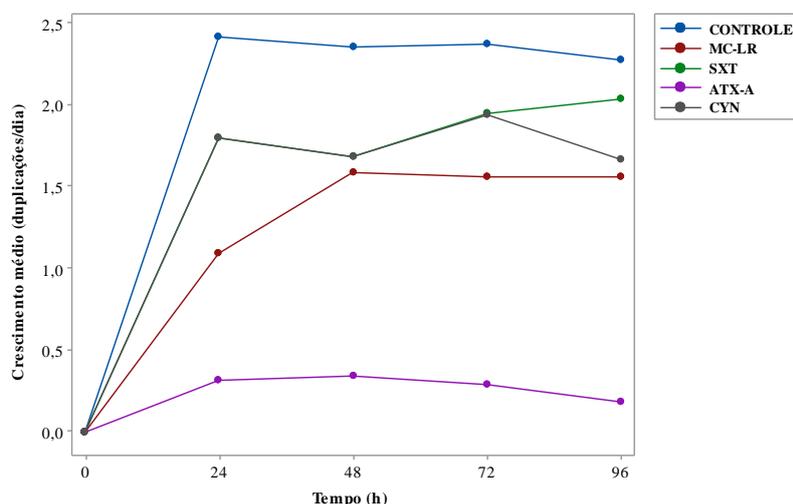
3.3 Ensaio definitivos

As espécies de fitoplâncton expostas a cianotoxina podem responder de forma heterogênea quanto ao estímulo ou inibição do crescimento, quando submetidas aos extratos brutos de cianotoxinas. Dependendo da sensibilidade do organismo-alvo utilizado, o efeito provocado pelo aleloquímico pode ser estimulador, inibidor ou nulo ao crescimento.

3.3.1 Crescimento médio da *Chlorella vulgaris* a exposição de cianotoxinas

Com concentrações iniciais obtidas de 5,0; 2,05; 0,61 e 1,42 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para MC-LR, SXT, ATX-A e CYN, respectivamente. A inibição pela densidade celular através do crescimento médio de *Chlorella vulgaris* após 24, 48, 72 e 96h de exposição das cianotoxinas, apresentaram variações conforme observado na Figura 2.

Figura 2. Crescimento médio (duplicações/dia) de *Chlorella vulgaris* após 24, 48, 72 e 96h de exposição as cianotoxinas, avaliado pela densidade celular (cel.mL^{-1}).



Os extratos lisados de cianotoxinas testadas provocaram efeitos diferenciados em *Chlorella vulgaris*, influenciando em sua densidade populacional. A taxa média de crescimento do grupo controle foi de 2,35 duplicações/dia (Figura 2). Analisando os dados obtidos, as taxas médias de crescimento celular de *Chlorella vulgaris* foram influenciadas pela presença das cianotoxinas, sendo menores em relação ao grupo controle. Na presença da anatoxina-a (ATX-A) por exemplo, a taxa média de crescimento celular da microalga diminuiu significativamente. Houve em média, apenas 0,31 duplicação/dia em 24 e 48 h, 0,29 duplicação/dia em 72 h e 0,18 duplicação/dia em 96 h de exposição pelo método de determinação da densidade celular. Ou seja, os maiores efeitos inibitórios, se tornaram evidentes 72h após a adição do extrato, logo a resposta frente às substâncias aleloquímicas não foi imediata.

A presença de microcistina – LR com concentração inicial de $5\mu\text{g.L}^{-1}$, também influenciou no crescimento microalgal. El-Sheekh, Khairy e El-Shenody (2010), relatam respostas semelhantes ao que foi obtido neste trabalho, foi registrado um período médio

de três dias para que filtrados de *Microcystis* contendo MC provocasse efeitos alelopáticos em suas linhagens-alvo. Os autores testaram extratos brutos de *M. aeruginosa* em quatro espécies de microalgas (*Scenedesmus obliquus*, *Oscillatoria angustissima*, *Anabaena sp.* e *Chlorella vulgaris*) e observaram que o efeito inibitório, proveniente do extrato bruto de MCs, foi mais potencializado nas maiores concentrações (25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$) testadas. Segundo Schagerl et al. (2002), a presença de MCs não afeta inicialmente o crescimento de algumas linhagens de algas, mas em pouco tempo a resposta se torna evidente. Fato este também observado neste estudo, em que nas primeiras 24h de exposição a *Chlorella vulgaris* o crescimento médio foi menor que após as 48, 72 e 96h.

No entanto, a presença de saxitoxina (SXT) apresentou em todos os tempos analisados as maiores taxas de crescimento algal em relação as outras cianotoxinas. Bittencourt-Oliveira et al. (2016) sugeriram que a toxicidade pode depender da concentração de STX. Em estudo realizado por Campos et al. (2013), foi possível observar que a *C. vulgaris* foi resistente a exposição de cilindrospermopsina (CYN) e microcistina-LR (MC-LR) purificada em altas concentrações, aumentando o crescimento nas concentrações de 5,0, 18,4 e 179,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Essas concentrações são maiores que as encontradas em condições ambientais, cerca de 1-10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Em contrapartida, Pinheiro et al. (2013) expuseram que CYN inibiu o crescimento de *C. vulgaris* em 8,5 e 16,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$, mas MC-LR a 37,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ estimulou o crescimento da microalga após o sétimo dia de experimento.

3.3.2 Clorofila –a

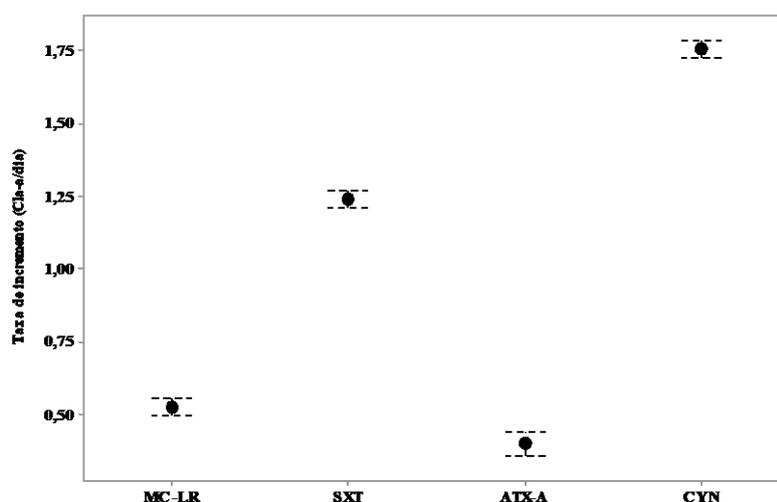
Durante o complexo processo fotossintético, as microalgas assimilam além de CO_2 e H_2O , diversos componentes necessários à sua fisiologia. Nas reações luminosas, a clorofila e outros pigmentos absorvem energia luminosa, empregada na fotólise da água para produção de O_2 , H^+ e elétrons. Os elétrons fluem nas membranas tilacóides do cloroplasto através de uma série de carregadores, incluindo citocromos e quinonas, e são utilizados na redução de NADP em NADPH. Enquanto os prótons são bombeados do lúmen do tilacóide para o estroma do cloroplasto pelas ATP sintases, gerando uma força propulsora para estas enzimas sintetizarem ATP, a partir de ADP e P_i . Desta forma, na

presença de luz e água, são produzidos ATP e NADPH, liberando O₂ simultaneamente (HU et al., 2008).

O nitrogênio é o principal constituinte de proteínas, hormônios, moléculas de transferência de energia, clorofila e enzimas envolvidas na fotossíntese. É responsável por 1-10% de biomassa seca e sua disponibilidade afeta a fotossíntese de microalgas (JIA e YUAN, 2016). Quando o nitrogênio é fornecido em uma forma oxidada, como nitrato (NO₃⁻) ou nitrito (NO₂⁻), este é reduzido até amônia antes de ser incorporado em moléculas orgânicas (YANG et al., 2000). Algumas microalgas são específicas quanto aos aminoácidos que são capazes de transportar, contudo, as espécies do gênero *Chlorella* são geralmente mais versáteis quanto as suas capacidades de transporte de aminoácidos. O amônio parece ser a fonte ideal de nitrogênio para a célula, podendo ser utilizado imediatamente para a síntese de aminoácidos. Contudo, se a concentração de amônio for muito alta, ela pode ser tóxica e resultar em crescimento reduzido. O efeito de maior impacto em microalgas é a lise celular imediata (SILVA et al., 2022).

Objetivando avaliar a interferência das cianotoxinas no processo fotossintetizante microalgáceo, a taxa de incremento de clorofila-a (Cla-a/dia) após 96h de exposição de *Chlorella vulgaris* as cianotoxinas foi verificada, conforme observa-se na Figura 3.

Figura 3. Taxa de incremento (Cla-a/dia) após 96h de exposição de *Chlorella vulgaris* as cianotoxinas.

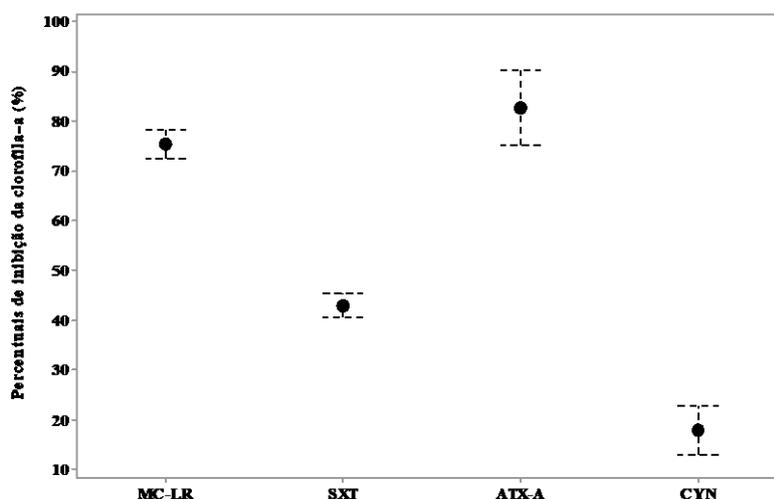


As amostras avaliadas no estudo, apresentaram valores menores em relação ao grupo controle de 2,35 duplicações/dia. Os efluentes das amostras com saxitoxina (SXT)

e cilindropermopsina (CYN) apresentaram as maiores taxas de incremento (Cl-a/dia) com valores entre 1,27 e 1,76 (Figura 3). Estudos apontam que a *Chlorella vulgaris* parece ser resistente a outros organismos fitoplanctônicos além de cianobactérias, tais como diatomáceas e dinoflagelados (VILAR et al., 2020).

Das exposições das cianotoxinas a *Chlorella vulgaris*, as microcistina-LR (MC-LR) e anatoxina-a (ATX-A) apresentaram menores duplicações/dia (Figura 3), resultados estes diretamente proporcionais a porcentagem de inibição de clorofila – a, que representou valores de percentuais maiores que 50% para estes mesmos tipos de cianotoxinas, conforme observado na Figura 4.

Figura 4. Percentuais de inibição da clorofila-a no de crescimento de *Chlorella vulgaris* a exposição a diferentes cianotoxinas.



As menores inibições de crescimento algal entre as cianotoxinas foram de 43 e 16% para SXT e CYN, respectivamente. Todavia, a anatoxina –a (ATX-A) apresentou maior inibição de crescimento da microalga em relação as demais, com média de 82 % (Figura 4) e incremento de clorofila-a com médias de 0,41 (Cl-a/dia) (Figura 3).

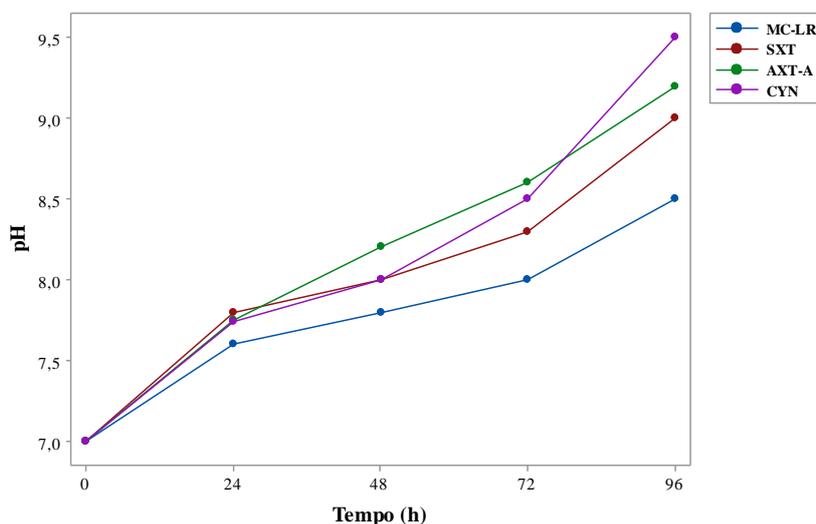
Estudos já relataram que a cianotoxina anatoxina-a parece ser excretada naturalmente para o meio, e não quando há lise celular, como é característico das demais cianotoxinas. Durante os cultivos, em determinados períodos de crescimento, as maiores concentrações de anatoxina-a são encontradas no meio de cultura. Esta característica tem

um importante papel ecológico, uma vez que os organismos aquáticos seriam expostos a esta toxina mesmo sem consumir as células de cianobactérias (VILAR et al., 2020).

3.3.3 pH

O pH é um parâmetro importante no processo fotossintético, pois a clorofila é sensível ao pH, enzimas, temperatura, luz e oxigênio, os quais terão maior ou menor influência na sua degradação de acordo com a atividade de água no meio. Os íons de hidrogênio têm a capacidade de remover facilmente o átomo de magnésio central e substituí-lo por hidrogênio, transformando irreversivelmente clorofila em feofitina (SILVA et al., 2022). A seguir, estão apresentados os valores de pH durante o monitoramento sistemas com *Chlorella vulgaris* na presença de diferentes cianotoxinas (Figura 5).

Figura 5. Valores de pH durante o monitoramento sistemas com *Chlorella vulgaris* na presença de diferentes cianotoxinas.



As análises do pH para as amostras avaliadas apresentaram pH inicial de 7 e apontou aumento significativo ao longo do monitoramento. Este resultado é um indicativo de que houve atividade fotossintética por parte das algas. O aumento do pH pode ser explicado, pois, a fixação do dióxido de carbono presente no meio efluente, por meio da fotossíntese das microalgas, proporciona uma maior dissociação de carbonato e bicarbonato. A dissociação faz com que a acidez carbônica seja removida do meio,

ocorrendo, assim, a liberação de íons hidroxila (OH^-) acarretando um aumento do pH (MOTA e VON SPERLING, 2009; LI et al., 2016).

Esses resultados também certificam para explicação de que, a alcalinidade é resultante da presença de hidróxidos (OH^-), carbonatos (CO_3^{2-}) e bicarbonatos (HCO_3^-), sendo estas espécies químicas, função do pH do meio (LIBÂNIO, 2016). Diante disso, quando o pH se apresenta na faixa entre 4,4 a 8,3 ocorre uma predominância da alcalinidade apenas a bicarbonatos; enquanto que, em pH entre 8,3 e 9,4 a alcalinidade predominante é referente a presença de bicarbonatos e carbonatos; e quando o pH se encontra acima de 9,4 a alcalinidade é devido a presença de hidróxidos e carbonatos.

3.4 Ecotoxicidade de *Chlorella vulgaris*

A partir dos resultados de densidade celular e do conteúdo de clorofila-a foram calculadas a porcentagem de inibição de crescimento da microalga, apresentadas na Tabela 3, após 96h de exposição as cianotoxinas.

Tabela 3. Médias de inibição de crescimento de *Chlorella vulgaris* após 96h de exposição das cianotoxinas.

Cianotoxinas	Inibição de crescimento (%)	Teste Dunnet	Resultado
MC-LR	55,84	< 0,01	T
SAX	26,14	NS	NT
ATX-A	63,22	< 0,01	T
CYN	13,22	NS	NT

*NS: Não significativo; T: Tóxico; NT: Não tóxico

Microcystis e *Anabaena (Dolichospermum)* estão entre os gêneros de cianobactérias mais tóxicos e frequentemente sucedem-se durante a proliferação de algas nocivas (CHIA et al., 2018). Neste estudo, as espécies *Microcystis aeruginosa* e *Dolichospermum solitarium* produtoras de MC-LR e ATX-A respectivamente, apresentaram concentrações iniciais de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,61 \mu\text{g.L}^{-1}$ capazes de ocasionar efeitos tóxicos sobre a espécie de *Chlorella vulgaris* conforme observados na Tabela 3.

Em estudo realizado por Dong et al. (2019), indicaram que a espécie *Microcystis aeruginosa* pode influenciar a taxa de crescimento, aparência morfológica, formação

colonial e os pigmentos fotossintéticos da microalga *Chlorella vulgaris*. Foi verificado que a morfologia e o crescimento de *C. vulgaris* foram afetados pelos filtrados de *M. aeruginosa*, influenciando a densidade inicial da microalga alvo.

Os efeitos individuais e combinados de microcistina-LR e anatoxina sobre as cianobactérias *Microcystis spp.*, e *Anabaena variabilis* (também conhecida como *Trichormus variabilis*), e a clorofícea *Selenastrum capricornutum* foram investigados por Chia et al. (2019), o estudo demonstrou que MC-LR e ATX podem seletivamente promover e inibir o crescimento e desempenho de algas verdes. Os níveis intracelulares de microcistina em *Microcystis spp* aumentaram significativamente após a exposição para MC-LR + ATX ocasionando um aumento sinérgico no crescimento de *Selenastrum capricornutum*. O efeito combinado dessas cianotoxinas pode ser mais intenso do que seus efeitos individuais em algumas cepas. Isso sugere que a liberação de múltiplas cianotoxinas em ecossistemas aquáticos, após as florações pode influenciar a sucessão de comunidades planctônicas.

As amostras com a presença das cianotoxinas saxitoxina (SXT) e cilindrospermopsina (CYN), não apresentaram toxicidade (Tabela 3). *Chlorella vulgaris* é produtora de substância alelopática chamada clorelina, substância essa, capaz de inibir o crescimento de outros organismos fitoplanctônicos (SONG et al., 2012). No entanto, não possuímos dados suficientes para afirmar que o motivo da inibição de *R. raciborskii* foi ocasionada pela presença desse composto químico.

Consoante a isso, objetivando caracterizar os efeitos alelopáticos das cianotoxinas MC e CYN sobre a alga verde *Parachlorella kessleri*, Pereira et al. (2018) realizaram ensaios em condições controladas de laboratório com extratos de células de cianobactérias de *Microcystis aeruginosa* e *Chrysochloris ovalisporum*, produtores de MC-LR e CYN respectivamente, em concentrações de 55 e 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os dados obtidos, indicaram que a taxa de crescimento e fotossintética os pigmentos não foram afetados pela exposição aos extratos tóxicos de cianobactérias em relação ao controle. No entanto, a taxa de crescimento e teor de pigmentos fotossintéticos mudaram durante os 14 dias de cultivo de *P. kessleri*, em ambos grupos (controle e tratamento), o que pode refletir as condições de cultivo e a curva de crescimento de *P. kessleri*. Com isto, foi também possível verificar que a concentração de nutrientes do meio de cultura da microalga, influencia no crescimento taxa da microalga.

4. CONCLUSÃO

Com base nas respostas fisiológicas de *Chlorella vulgaris*, submetidas aos diferentes tipos e concentrações de cianotoxinas, conclui-se que os ensaios expostos às menores concentrações de ATX-A ($0.61 \mu\text{g.L}^{-1}$) promoveram maiores efeitos inibitórios sobre o crescimento, densidade, biomassa e ecotoxicidade da espécie-alvo de *Chlorella vulgaris*. No entanto, as maiores concentrações dos exsudatos MC-LR ($5.0 \mu\text{g.L}^{-1}$) utilizadas, acarretaram também em reduções expressivas no crescimento da referida alga.

Vários fatores contribuem para que não haja uma uniformidade de respostas sobre a alelopatia de cianotoxinas: O uso das toxinas purificadas permite conhecer as respostas dos organismos-alvo provocadas exclusivamente por essas substâncias, porém não se aproximam da dinâmica dos ecossistemas aquáticos, pois nesses ambientes as substâncias não se encontram isoladas. Por outro lado, o uso de extratos ou filtrados em cultivos das linhagens-alvo simulam mais fielmente o que ocorre no ambiente aquático, mas dificulta a identificação da (s) substância (s) que promove (m) as respostas alelopáticas. Não há também uma uniformidade de tempo de exposição aos aleloquímicos.

A utilização de concentrações diversas e muitas vezes acima do que é normalmente encontrado nos ambientes aquáticos, pode ocasionar maiores dificuldades na comparação de resultados. Além disso, existe uma diversidade de organismos-alvo pertencentes a diferentes grupos taxonômicos, sendo que algumas vezes a mesma espécie responde de maneiras diferentes frente às substâncias alelopáticas, como foi o caso deste estudo. A forma como a toxina é utilizada nos experimentos também é variável, e resulta em diferentes extrapolações para o ambiente aquático.

Portanto, mesmo com vários estudos abordando a alelopatia de cianotoxinas, ainda não há um consenso na comunidade científica. Se faz necessário realizar mais trabalhos sobre o tema, principalmente utilizando concentrações normalmente encontradas na natureza e que não descartem a participação de outras substâncias, além das cianotoxinas, produzidas pelas cianobactérias, visto que, as respostas bioquímicas desencadeadas por esses aleloquímicos pode mudar de acordo com a espécie cultivada, condições de cultivo e quantidade de toxina disponível.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12.648: **Ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda - método de ensaio com *Chlorella vulgaris***. Rio de Janeiro, 2018.

ALBUQUERQUE, M.V.C. Avaliação da degradação de microcistina-LR no tratamento de água de abastecimento em sistema convencional seguido por processos oxidativo avançado (POA). 2017. 129 p. **Dissertação** (Mestrado). Programa de Pós graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental). Programa de Pós graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Estadual da Paraíba- UEPB.

BITTENCOURT- OLIVEIRA, M C. et al. Allelopathic interactions between microcystin-producing and non-microcystin-producing cyanobacteria and green microalgae: implications for microcystins production. **Journal of applied phycology**, v. 1, n. 27, p. 275-284, 2015.

BITTENCOURT-OLIVEIRA M.D.C; CHIA; M.A, CAMARGO-SANTOS D, DIAS C.T.S. The effect of saxitoxin and non-saxitoxin extracts of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) on cyanobacteria and green microalgae. **J Appl Phycol** 28: 241–250, 2016.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C et al. Effects of toxic and non-toxic crude extracts on different *Microcystis* species (Cyanobacteria). **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 21, p. 2596-2600, 2013.

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.

CAMPOS, A. et al. Effects on growth, antioxidant enzyme activity and levels of extracellular proteins in the green alga *Chlorella vulgaris* exposed to crude cyanobacterial extracts and pure microcystin and cylindrospermopsin. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 94, p. 45-53, 2013.

CHIA, M. A., JANKOWIAK, J. G., KRAMER, B. J., GOLESKI, J. A., HUANG, I.-S., ZIMBA, P. V.GOBLE, C. J. Succession and toxicity of *Microcystis* and *Anabaena* (*Dolichospermum*) blooms are controlled by nutrient-dependent allelopathic interactions. **Harmful Algae**, 74, 67–77, 2018. [http:// doi:10.1016/j.hal.2018.03.00](http://doi:10.1016/j.hal.2018.03.00)

CHIA, M., KRAMER, B., JANKOWIAK, J., BITTENCOURT-OLIVEIRA, M., & GOBLE, C. (2019). The Individual and Combined Effects of the Cyanotoxins, Anatoxin-a and Microcystin-LR, on the Growth, Toxin Production, and Nitrogen Fixation of Prokaryotic and Eukaryotic Algae. **Toxins**, 11(1), 43. doi:10.3390/toxins11010043.

DONG, J., LI, C., CHANG, M., DAI, D., LIU, S., QUAN, B. GAO, Y. (2019). Effects of toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on the morphology of green alga *Chlorella vulgaris*. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 55, 7. doi:10.1051/limn/2019006

EL-SHEEKH, M. M.; KHAIRY, H. M.; EL-SHENODY, R. A. (2010). Allelopathic effects of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on the growth and photosynthetic pigments of some algal species. **Allelopathy Journal**. N. 26. Vol. 2. p. 275 – 290.

GORHAM, P.R., MCLACHLAN, J., HAMMER, U.T., KIM, W.K., 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lynbg). **Verein. Limnol.** 15, 796-804.

HU, W. H.; SONG, X. S.; SHI, K.; XIA, X. J.; ZHOU, Y. H.; YU, J. Q. Changes in electron transport, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes in chloroplasts and mitochondria of cucumber leaves as influenced by chilling. **Photosynthetica**, v.46, p.581-588, 2008.

JIA H.; YUAN Q. Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and microalgae-bacteria consortia. **Cogent Environ Science**, v. 2 p.1–15, 2016.

JONES, J. G. Aguide to methods in freshwatus, London, **Freshwater Biological Association**, n.39, 112p, 1979.

LI, X., XU, L., ZHOU, W., ZHAO, Q., WANG, Y., 2016. Chronic exposure to microcystin-LR affected mitochondrial DNA maintenance and caused pathological changes of lung tissue in mice. **Environ. Pollut.** 210, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.001>.

LIBÂNIO, M. Fundamentos de qualidade e tratamento de água. Campinas. SP: Editora Átomo, 4ª ed., 550p, 2016.

MOTA, F. S. B.; VON SPERLING, M. (Org.). Nutrientes de Esgoto Sanitário: utilização e remoção. Rio de Janeiro: **ABES**, 428p. ,2009.

PEREIRA, A. L., SANTOS, C., AZEVEDO, J., MARTINS, T. P., CASTELO-BRANCO, R., RAMOS, V. CAMPOS, A. (2018). Effects of two toxic cyanobacterial crude extracts containing microcystin-LR and cylindrospermopsin on the growth and photosynthetic capacity of the microalga *Parachlorella kessleri*. **Algal Research**, 34, 198–208. doi:10.1016/j.algal.2018.07.016

PINHEIRO, C. et al. Absence of negative allelopathic effects of cylindrospermopsin and microcystin-LR on selected marine and freshwater phytoplankton species. **Hydrobiologia**, v. 705, n. 1, p. 27-42, 2013.

RICE, E.L. Allelopathy. Academic Press, New York, 1984.

SCHAGERL, M.; UNTERRIEDER, I.; ANGELER, D. G. (2002). Allelopathy among Cyanoprokaryota and other algae originating from lake Neusiedlersee (Austria). **Internatiotal Review of Hydrobiology**. N. 87. p. 365 – 374.

SILVA, M. C. C. P. E; LEITE, V. D.; ALBUQUERQUE, M. V. C.; CARTAXO, A. S. B. ; RAMOS, R. O. ; DANTAS, G. D. ; LOPES, W. S. . Remoção de nitrogênio amoniacal de lixiviado de aterro sanitário por *Chlorella sp.* em sistemas alimentados em batelada. **Revista Dae**, v. 70, p. 107-122, 2022. <https://doi.org/10.36659/dae.2022.039>

SONG, L; QIN, J.G; SU, S.; XU, J.; CLARKE, S.; SHAN, Y. Micronutrient Requirements for Growth and Hydrocarbon Production in the Oli Producing Green Alga *Botryococcus braunii* (Chlorophyta). **Plos One**, v. 7, n.7, p 1-9, 2012.

TAVARES, L. H. S.; ROCHA. O. Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para Alimentação de Organismos Aquáticos, São Carlos, Rima,105p. , 2003.

VILAR, M.C.P., MOLICA, R.J.R. Changes in pH and dissolved inorganic carbon in water affect the growth, saxitoxins production and toxicity of the cyanobacterium *Raphidiopsis raciborskii* ITEP-A1. **Harmful Algae**, 2020. 97: 101870.

WANG, H.; HO, L.; LEWIS, M. D.; BROOKES, J. D.; NEWCOMBE, G. Discriminating and assessing adsorption and biodegradation removal mechanisms during granular activated carbon filtration of microcystin toxins. **Water Research**, v. 41, p. 4262 – 4270, 2007.

WANG, L.C; ZI, J.M; XU, R.B; HIL, S; HOU, X.L; CHANG, X.X. Allelopathic effects of *Microcystis aeruginosa* on green algae and a diatom: evidence from exudates addition and co-culturing. **Harmful Algae** 61: 56–62, 2017.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 87-102, 2000.

ANEXOS

Tabela 1. Descrição das configurações da CLAE-EM

Parâmetros	Descrição
Cromatógrafo	
Pré coluna	ULTRA C18 (3 x 2.1 mm)
Coluna	KINETEX C18 (2.6 µm x 100 mm x 2.1 mm)
Gradiente de concentração da Fase móvel	50%/50% H ₂ O/ acetonitrila + 1% (v/v) ácido fórmico (modo isocrático)
Tempo de análise	5 minutos
Volume de injeção da amostra	100 µL
Espectômetro de massas	
Gás	Nitrogênio
Temperatura capilar	350 °C
Detector voltagem	5 kV
Interface	Electrospray ionization (ESI) – modo positivo
Íons monitorados	MC-LR: m/z = 995,5560 (M+1)
Tempo de acumulação de íons no octapolo	Microcistina-LR: 100 milisegundos
Validação do método	
Linearidade	R ² 0.998 para MC-LR 0.1 to 50 µg.L ⁻¹
Precisão dentro da corrida (CV %)	4.95
Precisão(recuperação)	98%
Limite de detecção	0.038 µg.L ⁻¹
Limite de quantificação	0.13 µg.L ⁻¹

Fonte: Albuquerque (2017).

Tabela 2. Crescimento médio (duplicações/dia) de *Chlorella vulgaris* após 24, 48, 72 e 96h de exposição as cianotoxinas avaliado pela densidade celular (cel.mL⁻¹).

Exposição	Ensaio	Controle	Cianotoxinas			
			MC-LR	SAX	ATX-A	CYN
24h	1	2,07	0,83	2,11	0,35	1,73
	2	2,72	1,21	1,73	0,21	2,11
	3	2,44	1,23	1,58	0,38	1,58
	Média	2,41	1,09	1,80	0,31	1,80
	DP	0,26	0,26	0,31	0,10	0,27
48h	1	2,83	1,51	2,14	0,41	1,71
	2	2,24	1,24	1,71	0,24	2,14
	3	1,98	1,99	1,19	0,39	1,19
	Média	2,35	1,58	1,68	0,34	1,68
	DP	0,43	0,34	0,46	0,07	0,47
72h	1	2,17	1,59	2,11	0,39	1,75
	2	2,54	1,58	1,75	0,28	2,11
	3	2,40	1,51	1,99	0,21	1,98
	Média	2,37	1,56	1,95	0,29	1,94
	DP	0,18	0,03	0,16	0,10	0,18
96h	1	2,29	1,59	2,03	0,22	1,73
	2	2,28	1,53	2,03	0,13	2,03
	3	2,25	1,56	2,03	0,19	1,23
	Média	2,27	1,56	2,03	0,18	1,66
	DP	0,02	0,06	0,0	0,02	0,40

*DP= desvio padrão;

Tabela 3. Taxa de incremento (Cl-a/dia) e inibição (%) de clorofila – a ($\mu\text{g.L}^{-1}$) após 96h de exposição de *Chlorella vulgaris* as cianotoxinas.

Ensaio	MC-LR		SAX		ATX -A		CYN	
	TI (Cl-a/dia)	I (%)	TI (Cl-a/dia)	I (%)	TI (Cl-a/dia)	I (%)	TI (Cl-a/dia)	I (%)
1	0,51	78	1,31	43	0,42	80	1,79	18
2	0,57	74	1,30	42	0,33	86	1,82	18
3	0,62	76	1,21	44	0,48	80	1,69	12
Média	0,56	76	1,27	43	0,41	82	1,76	16
DP	0,05	2	0,05	1	0,07	3,46	0,06	3,46

TI = Taxa de incremento; I = Inibição; DP = Desvio Padrão

Capítulo 3

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DA ESPÉCIE *Daphnia magna* NA EXPOSIÇÃO À DIFERENTES CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS

RESUMO

O estudo avaliou a toxicidade aguda da espécie *Daphnia magna* a exposição de diferentes cianobactérias e distintas concentrações de cianotoxinas. Os testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna* foram realizados de acordo com as normas ABNT 12.713/2016, observando a concentração responsável por causar 50% de imobilidade (CE_{50}), calculada pelo o método estatístico de Probitos. Considerando a interferência negativa das cianobactérias sobre o zooplâncton, e a exposição dos cladóceros às toxinas intracelulares e extracelulares em ambientes aquáticos, os resultados demonstraram que os neonatos de *Daphnia* apresentaram uma alta taxa de herbivoria. Os efeitos de imobilidade/mortalidade foram específicos para cada cepa de cianobactéria. Comparando a sobrevivência dos cladóceros expostos aos cultivos brutos e lisados contendo microcistina-LR (MC-LR), saxitoxina (STX), anatoxina-a (ATX-A) e cilindrospermopsina (CYN) foram obtidos resultados relevantes a diferentes respostas dos organismos a elevadas concentrações ($5 \mu\text{g.L}^{-1}$) para MC-LR pura, e baixas concentrações ($0,61 \mu\text{g.L}^{-1}$) de ATX-A. As hipóteses de que a sensibilidade da espécie *Daphnia magna* expostas a linhagens de cianobactérias tóxicas é maior em espécies coloniais, e que a taxa de imobilidade populacional dos cladóceros aumenta à exposição de concentrações maiores de cianotoxinas, foram refutadas. Numa concentração inicial $2,05 \mu\text{g.L}^{-1}$ de SXT, os movimentos de *Daphnia magna* foram paralisados temporariamente quando expostas a cianobactéria neurotóxica *Raphidiopsis raciborskii*. No entanto, quando foram expostas a meio livre das menores diluições, houve alta taxa de recuperação da atividade motora, uma vez apenas cerca de 20 à 25% dos indivíduos apresentaram imobilidade. Relacionando os resultados ao que ocorre no ambiente aquático natural, ao decorrer de uma floração, as espécies de *Daphnia* estão expostas a toxinas intracelulares e extracelulares, com isso, pode haver uma variação na sensibilidade desses animais no início e final das florações, que poderá afetar a estrutura da comunidade zooplanctônica e interferir ao longo da cadeia trófica.

Palavras chaves: Metabólitos secundários; Cladóceros; Microcrustáceos; Ecotoxicidade.

ABSTRACT

The study evaluated the acute toxicity of *Daphnia magna* to exposure under different cyanobacteria and cyanotoxin differences. Acute toxicity tests with *Daphnia magna* were performed in accordance with ABNT 2016 standards, observing the concentration responsible for causing 12.70% of 12.7 immobility (EC_{50}), using the Probitos statistical method. Considering an interference of cyanobacteria on zooplankton from cyanobacteria transmitted on zooplankton and extracellular transmitted intracellular, the direct results that *Daphnia* neonates showed a high rate of cellular transmission, the results that showed a high rate of *Daphnia* infection. Immobility/mortality effects were specific for each cyanobacterial strain. Comparing the survival of cladocerans exposed to crude cultures and lysates containing microcystin-LR (MC-LR), saxitoxin (STX), anatoxin-a (ATX-A) and cylindrospermopsin (CYN) results were obtained relevant to different responses of organisms. Elevated see ($5 \text{ g } \mu\text{g.L}^{-1}$) to entrap ($0.61 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$) of ATX-A. The hypotheses that increased sensitivity of *Daphnia magna* species exposed to lineages of toxic bacteria is higher in colonial species, and that the rate of population immobility of cladocerans to exposure to higher levels of toxic cyanotoxins were refuted. In an initial concentration $2,05 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ *Daphnia magna* movements were paralyzed, neurotoxic when exposed to cyanobacteria, neurotoxic when exposed to psychically exposed *Raphiopsis raciborskii*. However, when a medium free from the dilutions was discovered, there was a high rate of recovery of motor activity, once only about 20 to 25% of similar immobility components. Plant species may have a relationship with these natural sensitivities, in the course of *Daphnias*, which occur in the natural extracellular environment, in the course of *Daphnias*, which may have a relationship with these animal sensitivities at the beginning and end of blooms, which may occur. The structure of the zooplankton community and interfere along the food chain.

Keywords: Secondary metabolites; Cladocera; Microcrustaceans; Ecotoxicity.

1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias estão distribuídas em todo o mundo e suas florações são preocupantes em ecossistemas aquáticos, uma vez que ocasiona efeitos adversos em plantas e animais aquáticos (KIM et al., 2019). Geralmente, estes microorganismos reduzem a qualidade dos ecossistemas aquáticos e a eficiência do fluxo de energia dos produtores para os herbívoros, pois possuem baixo valor nutricional e geram toxinas (LYU et al., 2019).

As toxinas produzidas por cianobactérias, podem exercer ação deletéria sobre o zooplâncton herbívoro, com consequências na sobrevivência (SARNELLE et al., 2010), reprodução e taxa de crescimento populacional destes organismos. Contudo, os padrões de ações de cianobactérias e cianotoxinas sobre o zooplâncton herbívoro são controversos. Alguns autores relatam, além de efeitos negativos, os efeitos neutros e positivos no zooplâncton (FERRÃO-FILHO et al., 2019; SARNELLE et al., 2010; ZAGATTO et al., 2012).

Possíveis vantagens adaptativas da produção de toxinas têm sido apontadas por Holland e Kinnear (2013) e Omidi, Esterhuizen-Londt e Pflugmacher (2018) os quais discutem a importância desses metabólitos para o sucesso competitivo, através de efeitos alelopáticos, toxicidade e persistência; e/ou “facilitadores fisiológicos”, no aprimoramento de atividades metabólicas, tais como eficiência fotossintética. Além da produção de metabólitos bioativos, a elevada versatilidade em atributos morfológicos como a formação de grandes filamentos e colônias, favorece a resistência à predação (GER et al., 2016; RANGEL et al., 2020). Em geral, juntamente a fatores abióticos, tais atributos são apontados por favorecer a dominância de cianobactérias. Por sua vez, tais fenômenos podem exercer mudanças não apenas na qualidade da água, mas sobretudo na estrutura e funcionamento desses ecossistemas, gerando perda de biodiversidade, afetando diretamente a comunidade de consumidores (AMORIM et al., 2019; 2020) e limitando o fluxo de energia nas teias tróficas aquáticas.

Apesar de serem grandes filtradores, dafnídeos tendem a ter capacidade reduzida na seleção das partículas que ingerem, sendo diretamente afetados por flutuações do fitoplâncton que levam a variações quali-quantitativas na dieta desses animais (KOUSSOROPLIS et al., 2017; FERRÃO-FILHO et al., 2019). A evolução rápida desses

consumidores em resposta à eutrofização e consequente ocorrência de florações nocivas pode ter implicações a nível ecossistêmico (CHISLOCK et al., 2019) como a supressão do desacoplamento trófico em virtude da dominância de cianobactérias no fitoplâncton.

Os efeitos tóxicos de cianobactérias e seus metabólitos produzidos em fauna aquática, incluindo microinvertebrados, zooplâncton e peixes, têm sido alvo de vários estudos (FERRÃO-FILHO e KOZLOWSKY-SUZUKI, 2011; ZANCHETT e OLIVEIRA-FILHO, 2013). Especial atenção tem sido dada aos peptídeos cíclicos - hepatotóxicos microcistinas, alcalóides neurotóxicos - análogos de anatoxina-a (ATX-A) e saxitoxina (STX), e cilindrospermopsina (CYN) - alcalóide guanidino tricíclico citotóxico (KOUSSOROPLIS et al., 2017; FERRÃO-FILHO et al., 2019).

Considerando a interferência negativa das cianobactérias sobre o zooplâncton, e a exposição dos cladóceros às toxinas intracelulares e extracelulares nos ambientes aquáticos, verificamos a premente necessidade de avaliar os efeitos adversos de cianobactérias produtoras de cianotoxinas em *Daphnia* sob essas duas vias de exposição, contribuindo para o conhecimento da sensibilidade desses animais, bem como, para o entendimento do papel dessas toxinas nos ecossistemas aquáticos.

Neste contexto, este estudo avaliou a toxicidade aguda da espécie *Daphnia magna* a exposição extra e intracelular de diferentes cianobactérias e distintas concentrações de cianotoxinas. Os valores da Concentração Letal a 50% da população (CL₅₀) reforçarão o uso destes organismos em ensaios ecotoxicológicos e conhecer sua relação com ambientes eutrofizados. Para tanto, foram levantadas as seguintes hipóteses:

- (I) *Daphnia magna* apresenta maior sensibilidade quando submetidas à exposição através da ingestão de células intactas de cianobactérias.
- (II) A sensibilidade da espécie *Daphnia magna* expostas a linhagens cianobactérias tóxicas é maior em espécies coloniais.
- (III) A taxa de imobilidade populacional dos cladóceros *Daphnia magna* aumenta à exposição de concentrações maiores de cianotoxinas.
- (IV) Os movimentos de *Daphnia magna* são paralisados temporariamente quando expostas a cianobactéria neurotóxica saxitoxina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Química e Sanitária Ambiental (LAQUISA), localizado na Estação Experimental de Tratamento Biológico de Esgotos Sanitários (EXTRABES) pertencente a Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

2.1 Cepas de Cianobactérias

Na sala de cultivo de cianobactérias, as cepas estoques foram mantidas em quantidades satisfatórias para a execução dos ensaios, em meio ASM-1 estéril (GORHAM, et al. 1964), pH 7,4, a 22°C e $\sim 310 \mu\text{mol fóton m}^{-2}\text{s}^{-1}$, em fotoperíodo (lâmpadas fluorescentes General Electric 40 watts) de 12:12 horas (claro/escuro).

Foram selecionadas quatro cepas de cianobactérias produtoras de cianotoxinas: *Microcystis aeruginosa*, produtora de microcistina-LR (MC-LR/Word Data Center Microorganisms 835), *Raphidiopsis raciborskii* produtora de saxitoxina (SXT- ITEP-A1), cedida pela Prof. Dra. Sandra Azevedo do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ; *Dolichospermum solitarium* produtora de anatoxina-a (ATX-A/CIAN05) e *Raphidiopsis raciborskii* produtora de cilindrospermopsina (CYN-/CIAR01), esta fornecida pelo Laboratório de Ecologia Aquática (Leaq) da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB. De acordo com a literatura, tais espécies tem a capacidade de produzir compostos alelopáticos e tóxicos que propiciam respostas estimulatórias ou nulas em organismos-alvo.

2.2 Preparação do extrato bruto de cianobactérias e extração das cianotoxinas

As linhagens de cianobactérias foram cultivadas em sistema fechado aerado em erlenmeyers de 2 L nas condições descritas acima e na fase exponencial de seu crescimento, foram retiradas alíquotas para realização dos ensaios e quantificação das cianotoxinas. Foi considerada a cianotoxina total, ou seja, a soma das frações extracelulares e intracelulares. Para a extração das toxinas, foram realizadas três séries de congelamento e descongelamento das amostras em temperatura -4°C, com o objetivo de provocar a lise celular e consequente liberação da toxina intracelular para o meio

extracelular (BROOKE et al., 2006; WANG et al., 2007). Em seguida, a quantificação da microcistina-LR na suspensão de células lisadas foi realizada por (CLAE-EM) com método validado por Albuquerque (2017), empregando um cromatógrafo UHPLC 3000 e um espectrômetro de massas LCQ Fleet Ion Trap (ambos da Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). As configurações utilizadas para CLAE-EM da validação do método são apresentados na Tabela 1 (anexo). As análises de saxitoxina, anatoxina-a e cilindrospermopsina foram determinadas pelo método Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), utilizando kits em placas Abraxis, Inc (Warminster, Pa), seguindo as instruções do fabricante, com auxílio de um leitor de microplacas ASYS A-5301 (ASYS Hitech GmbH Eugendorf, Áustria). As concentrações obtidas das cianotoxinas foram: 5,0; 2,05; 0,61 e 1,42 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para MC-LR, SXT, ATX-A e CYN, respectivamente.

2.3 Cultivo do microcrustáceo *Daphnia Magna*, Straus, 1820.

O cultivo do microcrustáceo *Daphnia Magna* produzido, está seguindo as prescrições da ABNT NBR 12.713/2016. Os organismos foram mantidos em béqueres de vidro de 2 litros cada, e armazenados em câmara incubadora (tipo DBO), com temperatura controlada à $18 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz. Em cada recipiente foram mantidos até 30 indivíduos, exclusivamente fêmeas, (por serem geneticamente idênticas), preenchido com volume aproximado de 1.500 mL de meio de cultura M4 (NBR 12.713/2016), apresentando dureza total $\text{CaCO}_3.\text{L}^{-1}$ entre 115 a 225 mg e pH entre 7,6 e 8,0.

Os recipientes recebem manutenção três vezes por semana, para observação de possível ocorrência de efípios, realização da troca do meio de cultura, eliminação das carapaças, retirada dos filhotes e alimentação, esta realizada diariamente com a suspensão da microalga *Chlorella vulgaris*. Foram fornecidos cerca de 0,25mL por organismo contido em cada recipiente, seguindo as recomendações da CETESB (1991). Na troca do meio, somente os indivíduos adultos foram transferidos para o novo recipiente, enquanto que os filhotes foram descartados em um recipiente com hipoclorito de sódio (NaClO) ou reservados para a utilização nos ensaios. Mensalmente, a sensibilidade do organismo-teste foi avaliada por meio de ensaio com dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), a partir de uma solução-estoque preparada de 10 mg.L^{-1} , adicionados volumes conforme tabela 1 (NBR 12.713/2016).

Tabela 1. Preparo das diluições teste a partir da solução-estoque de dicromato de potássio.

Identificação	Identificação Duplicata	Concentração da solução-estoque mg.L ⁻¹	Volume solução-estoque mL	Volume da água de diluição mL	Volume final mL
C1	C2	Controle	---	50	50
1	2	0,4	2	48	50
3	4	0,85	4,25	45,75	50
5	6	1	5	45	50
7	8	1,4	7	43	50
9	10	1,7	8,5	41,3	50

Fonte: Autora (2022).

2.4 Teste de toxicidade aguda utilizando *Daphnia magna*

O teste de toxicidade aguda utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna* seguiu a metodologia e recomendações da NBR 12.713/2016. Na Tabela 2, encontram-se os requisitos utilizados para a realização do teste.

Tabela 2. Resumo dos requisitos para o ensaio toxicidade aguda com *Daphnia magna*.

Requisitos	Espécie de organismo-teste
Organismo-teste	<i>Daphnia magna</i>
Idade	6h a 24h
Ensaio	Estático
Período de exposição	48h
Água de diluição	Água natural ou água reconstituída
Volume mínimo da solução-teste/recipiente	10 mL (2mL/organismo)
Número mínimo de organismos-teste	10
Número mínimo de réplicas por solução-teste	Duas
Temperatura	20 °C
Fotoperíodo	Escuro ou 12h a 16h de luz
Alimentação	Nenhuma
Efeito observado	Morte/Imobilidade
Expressão do resultado	CE ₅₀ , FT ou tóxico e não tóxico
Avaliação dos resultados	Método estatístico de Probitos

^a Não aplicável para resultados qualitativos e em FT.

Fonte: NBR 12.713/2016.

O método consistiu na exposição dos neonatos do gênero *Daphnia* à amostra durante um período de 48h. Os organismos neonatos (de 2 a 24h) foram transferidos para 20 mL das soluções-teste e da solução controle, em recipientes plásticos de 50 mL. Após, foram incubados por 48h a 20°C (\pm 2°C), sem luz, sem renovação da solução e sem alimentação. Ao final deste período, o número de organismos imóveis/mortos nas amostras e no controle foram registrados. Um teste preliminar foi realizado para estabelecer o intervalo de soluções teste a ser utilizado no ensaio definitivo. Ao final do ensaio, foi determinada a menor solução teste que causa imobilidade a 100% dos organismos e a maior na qual não se observa imobilidade. Os ensaios foram considerados válidos quando a porcentagem de organismos imóveis/mortos no controle não ultrapassou 10% após 48h.

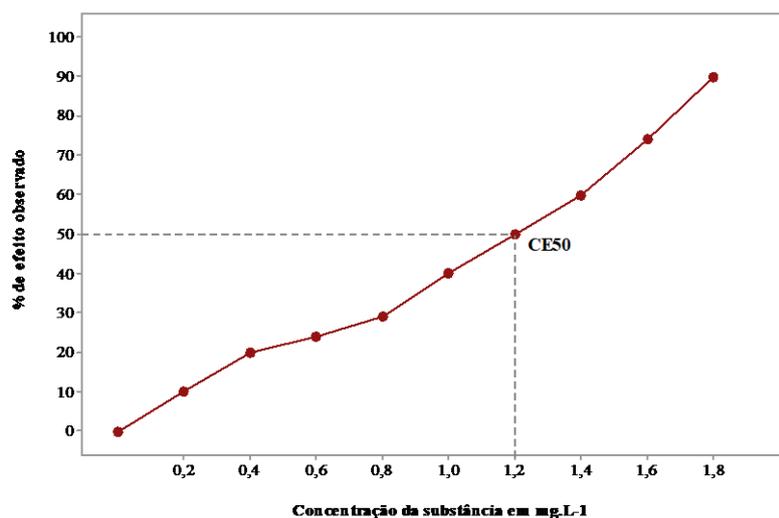
Para a realização dos testes de toxicidade aguda, 20 neonatos com idade entre 2 e 24 horas de idade foram expostos em diferentes concentrações do cultivo bruto – fase exponencial (células intactas) e cultivo lisado de cianobactérias. Os testes foram conduzidos com quatro réplicas, com 5 neonatos cada para cada diluição do ensaio realizado e mantidos por 48h a 20°C. Durante os testes, os organismos não foram alimentados. Após o período de exposição, o número de indivíduos imóveis foi quantificado, observando o número de organismos que não apresentaram mobilidade. Para exposição das espécies de *Daphnia* em cianobactérias produtoras de neurotoxinas, considerou-se também o organismo imóvel aquele flutuante na superfície, mesmo que apresentasse apenas movimento de suas antenas. Logo, observou-se a concentração responsável por causar 50% de imobilidade (CE₅₀), calculada utilizando o método estatístico de Probitos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação do ensaio de sensibilidade de *Daphnia magna* para validação dos resultados

Os ensaios de sensibilidade utilizando dicromato de potássio, foram realizados para avaliar a sensibilidade dos organismos quando expostos à substância de referência. A qualidade da água de cultivo e de diluição também foi avaliada indiretamente pelos resultados obtidos na Figura 1 pela avaliação de sensibilidade, utilizando dicromato de potássio.

Figura 1. Avaliação da CE₅₀ sobre a sensibilidade de *Daphnia Magna* a dicromato de potássio.



Como é possível observar através da Figura 1, o valor da CE₅₀ obtido foi de aproximadamente 1,20 mg.L⁻¹ de dicromato de potássio, comparando esse valor com os limites estabelecidos pela NBR 12.713 (ABNT, 2016), esse valor esteve na faixa de 0,6 mg.L⁻¹ e 2,1 mg.L⁻¹ de dicromato de potássio, viabilizando a metodologia utilizada e assim podendo utilizar os organismos cultivados nos ensaios de ecotoxicidade.

3.2 Toxicidade aguda utilizando *Daphnia magna* a exposição extracelular de cianotoxinas

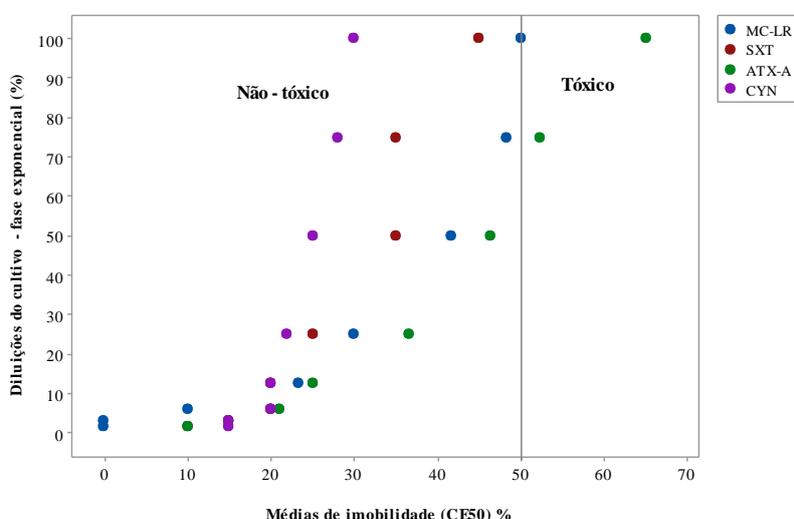
Após verificada a sensibilidade dos organismos, o efeito de imobilidade do organismo teste após 48h de exposição foi observado. Inicialmente, em diluições seriadas (100; 75; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 %) foi avaliado a toxicidade de *Daphnia magna* para *Microcystis aeruginosa*, *Raphidiopsis raciborskii* (SXT), *Dolichospermum solitarium* e *Raphidiopsis raciborskii* (CYN), após a fase de crescimento exponencial dos cultivos.

A finalidade deste ensaio foi avaliar o efeito tóxico da cepa cultivada em laboratório, mesmo sem a liberação total da cianotoxina, uma vez que esta cianobactéria encontra-se em abundância em águas superficiais eutrofizadas destinadas a abastecimento público, recreação e outras finalidades, o que pode propiciar a bioacumulação e possivelmente transferência das cianotoxinas através da cadeia alimentar, ou seja, além

da possibilidade de contaminação humana através da água de abastecimento, há também o risco de contaminação através da cadeia alimentar aquática.

Observou-se que, para os ensaios realizados com o cultivo 100% puro de *Microcystis aeruginosa* e *Dolichospermum solitarium* houve imobilidade/mortalidade de 50% e 65 % dos neonatos, respectivamente. Enquanto para baixas diluições (3,12% e 1,56%), a espécie produtora de microcistina - LR mostrou-se não tóxica as *Daphnia magna*. Dos 20 neonatos expostos em cada teste, dois apresentaram imobilidade na concentração (6,25%), considerado o resultado como “não tóxico” uma vez que a porcentagem de imobilidade na amostra não foi superior a 10%. Na Figura 2 estão apresentados os resultados dos ensaios de toxicidade após 48 h de exposição.

Figura 2. Percentual de imobilidade em *Daphnia magna* após 48h de exposição a diferentes diluições e tipos de cianobactérias e cianotoxinas extracelular.



Sabe-se que análises de toxicidade aguda de extratos de *Microcystis aeruginosa* em *Daphnia magna* podem apresentar diferentes efeitos tóxicos, pois estes resultados dependem da cepa testada. Esta espécie colonial, produtora de MC-LR apresenta maior hidrofiliabilidade. Moléculas hidrofílicas apresentam pouca capacidade de ultrapassar membranas lipídicas, necessitando de um mecanismo de transporte para penetrar na membrana plasmática de células animais (HE et al., 2015). Assim, a presença de aminoácidos com diferentes polaridades nas moléculas de microcistinas presentes, resultou em diferentes graus de toxicidade, favorecendo assim menor adequação

nutricional, diminuição da atividade de filtração, inibição de enzimas digestivas, bioacumulação e estresse oxidativo (ORTIZRODRIGUÉZ; WIEGAND, 2010).

Diversos estudos já encontraram forte evidência de que a presença de microcistinas em cianobactérias influencia em seu volume celular. Em um estudo realizado por Kurmayer et al. (2003), observando a relação entre tamanho da colônia, teor de microcistina e proporção de genótipos produtores de cianotoxinas no lago Wannsee, foi comprovado que maiores colônias tinham maior teor de microcistinas por célula e maior proporção de genótipos produtores de cianotoxinas. A produção da microcistina no lago foi influenciada principalmente pela abundância de grandes colônias. Minillo et al. (2000) estudaram concentrações de microcistinas nas formas coloniais de *M. aeruginosa* em florações no Estuário da Lagoa dos Patos no Rio Grande do Sul e constataram também que diferentes formas coloniais de *M. aeruginosa* são indicadoras dos níveis intracelulares de toxinas nos eventos de florações.

Gan et al. (2012) mostraram que a adição de microcistinas, em concentrações compatíveis com as do ambiente, levou a um aumento no tamanho das colônias de *Microcystis*, assim como da síntese de exopolissacarídeos, apoiando a ideia de que a fração extracelular desta molécula esteja relacionada ao tamanho de colônia.

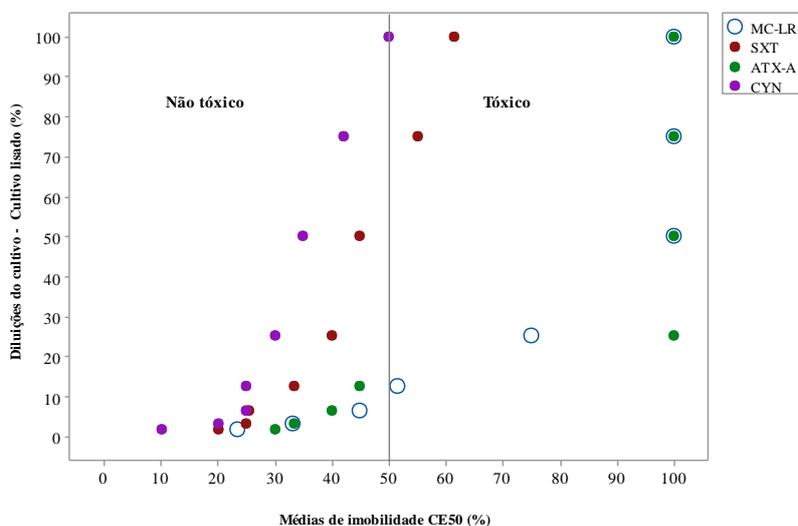
No que se refere as espécies *Raphidiopsis raciborskii* (SXT) e *Raphidiopsis raciborskii* (CYN) quando foram expostas a *Daphnias*, apresentaram as menores porcentagens de sensibilidade, em relação as demais. A imobilidade/mortalidade foi menor que 50% em todas as diluições testadas. Sabe-se que nos sistemas naturais, a concentração de toxinas dissolvidas é relativamente baixa, portanto, é mais provável que os organismos aquáticos estejam expostos a concentrações relativamente baixas de toxinas dissolvidas, exceto quando ocorre a senescência de florações (DAO et al., 2010).

3.3 Toxicidade aguda utilizando *Daphnia magna* a exposição intracelular de cianotoxinas

Nos resultados dos ensaios de toxicidade em *D. magna* para o cultivo lisado após 48 h de exposição aos neonatos, foi verificado que nas amostras com concentrações de 100, 75, e 50% de MC-LR, houve 100% de imobilidade/mortalidade dos indivíduos. Estes resultados mostram que após a liberação da cianotoxina (MC-LR) pelo processo de lise

celular, houve aumento da concentração da cianotoxina (o que era esperado), e consequentemente aumento do efeito tóxico em *Daphnia magna*. Este aumento provocou uma toxicidade 50% maior. Na Figura 3 estão apresentados os resultados dos ensaios de toxicidade em *D. magna* para o cultivo lisado após 48 h de exposição.

Figura 3. Percentual de imobilidade (CE₅₀) em *Daphnia magna* após 48h de exposição a diferentes diluições tipos de cianotoxinas intracelular.



Microcistinas, são encontradas intracelularmente em aproximadamente 95% do tempo durante a floração e tendem a permanecer contidas na célula (intracelular), até que haja lise celular no final desse evento e a microcistina seja liberada para a água (extracelular) (USEPA,2015). Isso implica que durante a floração, as cianotoxinas estão concentradas em maior quantidade no interior da célula e que animais ao ingerir as mesmas, podem ser expostos a uma dose significativamente maior de microcistina (BURATTI et al., 2017). Portanto, a exposição as microcistinas intracelulares, através da ingestão de células, têm sido consideradas a via de exposição de maior preocupação (VESTERKVIST et al., 2012).

Segundo revelam Ferrão-Filho, Herrera e Echeverri (2014), a bioacumulação de microcistinas em animais aquáticos ocorre através de duas principais rotas: o consumo das células bacterianas durante as florações e a ingestão de água contaminada pelas toxinas dissolvidas. Utilizando três espécies de cladóceros: *Moina micrura*, *Daphnia laevis* e *Daphnia similis*, os quais foram expostos por 96 horas a extratos aquosos de matéria liofilizada de florações em diferentes concentrações. Os resultados mostraram que a captação de microcistinas pelos zooplânctons foi diretamente proporcional à

concentração dos extratos aquosos, mostrando, portanto, que a ingestão de água contaminada a partir da dissolução da toxina é também um fator determinante para bioacumulação.

Os extratos de cianobactérias afetam organismos do gênero *Daphnia* tanto em exposições agudas, quanto crônicas. Quando as concentrações são subletais, como foi o caso das diluições 50, 25 e 12,5%, pode ocorrer diminuição no crescimento, baixo índice de reprodução, má formação de filhotes, diminuição do tempo de vida, estresse oxidativo e aumento da tolerância às toxinas ao longo de gerações (DAO et al., 2010; ORTIZRODRIGUÉZ et al., 2012).

Kosiba et al. (2018) em seu estudo buscaram responder a hipótese do efeito das microcistinas dissolvidas, se seria mais evidente em reservatórios e lagoas artificiais do que em águas naturais. No estudo, as concentrações de microcistinas dissolvidas nas águas estudadas variaram amplamente de 0,07 a 0,81 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os autores mostraram que as lagoas artificiais estavam sujeitas a florações de algas nocivas mais frequentes e duradouras. Os zooplânctons presentes em lagoas artificiais foram expostos as concentrações significativamente mais altas de microcistinas dissolvidas do que as dos lagos naturais de oxbow. Usando uma regressão do modelo linear geral (GLM), o estudo ainda identificou uma relação significativa entre microcistinas dissolvidas e a densidade e a biomassa de determinados grupos zooplanctônicos (ciliados, rotíferos, cladóceros, copépodes), sendo estas significativamente menores nas lagoas artificiais do que nos lagos naturais.

Comparando a sobrevivência de *Brachionus calyciflorus* Pallas (Rotífera) e *Daphnia pulex* Leyding (Cladocera) expostos a microcistina pura (MC-LR), anatoxina-a (ANTX) e cinco extratos obtidos de cianobactérias *Microcystis*, *Planktothrix* e *Dolichospermus spp*, Pawlik-Skowrońska e colaboradores (2019), obtiveram resultados relevantes a diferentes respostas dos organismos a altas concentrações de MC-LR pura, ANTX e extratos complexos de cianobactérias. A toxicidade dos extratos para os invertebrados foi maior que a exercida pelas cianotoxinas puras e dependia da composição dos metabólitos das cianobactérias. Isso sugere fortemente que os oligopéptidos não ribossômicos, além das MCs, tiveram uma contribuição essencial para a toxicidade observada.

Estes mesmos autores, em 2021 compararam os efeitos tóxicos causados pelo hexapeptídeo cíclico anabaenopeptina-B (AN-B), e os heptapeptídeos: microcistina-LR (MC-LR) e MC-LF, bem como uma mistura binária de AN-B com MC-LR na velocidade de natação de *Daphnias*. Os resultados mostraram que AN-B exerceu considerável inibição da velocidade de natação e frequência de saltos de *D. magna* semelhante ao MC-LR e MC-LF. A mistura de AN-B e MC-LR causou efeitos tóxicos mais fortes. O valor muito mais baixo EC_{50} da mistura AN-B e MC-LR ($0,95 \pm 0,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$) do que os oligopeptídeos individuais AN-B ($6,3 \pm 0,63 \mu\text{g.mL}^{-1}$), MC-LR ($4,0 \pm 0,27 \mu\text{g.mL}^{-1}$), MC-LF ($3,9 \pm 0,20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) causou inibição da velocidade de natação, o que explica que a toxicidade é mais forte de extratos de cianobactérias brutos complexos para dafnídeos, do que microcistinas individuais.

Ainda ressaltando a essas informações, Savic e colaboradores (2021), expuseram as concentrações de cianobactérias livre de células de *Microcystis aeruginosa* para representar maiores e menores concentrações ecologicamente relevantes de cianobactérias e seus metabólitos objetivando avaliar se a concentração e impacto negativo dependente do tempo, sobrevivência, digestão de marcação de expressão gênica e metabolismo, resposta ao estresse oxidativo, ciclo celular e muda, em *Daphnia magna*. Como consequência de todas essas respostas e presumivelmente de alterações moleculares e fisiológicas, a sobrevivência de *D. magna* foi prejudicada ao longo do tempo, de forma dependente da concentração. Os autores, confirmaram que além da microcistina-LR, outros metabólitos contribuem para o impacto negativo na sobrevivência de *D. magna* e na resposta ao estresse.

Com concentração inicial de $0,61 \mu\text{g.L}^{-1}$, a exposição da espécie *Dolichospermum solitarium* produtora de anatoxina-a (ATX-A) em *Daphnia* ocasionou 100% de imobilidade/mortalidade para as diluições de 100, 75, 50% e 25% de células lisadas (Figura 3), confirmando o alto potencial tóxico dessa cianotoxina. As anatoxinas-a são alcalóides de baixo peso molecular, que atuam como bloqueadores neuromusculares pós-sinápticos, imitando o efeito da acetilcolina ao se ligarem aos seus receptores na placa motora, causando a despolarização da membrana e impedindo a transmissão neuromuscular. O mecanismo de ação de cada neurotoxina é diferente, mas todas atuam sobre o processo de propagação do impulso nervoso, promovendo a morte de animais por parada respiratória em poucos minutos, após injeção intraperitoneal (Ferrão – Filho et al., 2020).

Estudos como de Bownik et al. (2019) confirmam também essa hipótese. Avaliando a aplicabilidade da análise de vídeo digital para determinação de respostas comportamentais e fisiológicas precoces dos efeitos causados pela neurotoxina anatoxina-a (ATX-A) em uma ampla faixa de sua concentração (0,5–50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em *Daphnia magna*, estes autores observaram a velocidade de natação (VN), frequência cardíaca (FC), consumo de oxigênio (CO), atividade do membro torácico (AMT) e garra abdominal de movimento (GAM). O estudo experimental mostrou uma diminuição dependente da concentração e do tempo de VN, CO, AMT e GAM. A VN foi inibida logo após 10s da exposição de *Daphnia magna* a ATX-A. Por outro lado, a estimulação de AMT foi observada nas concentrações mais baixas (0,5 e 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de ATX-A após 2 h e 24 h de exposição.

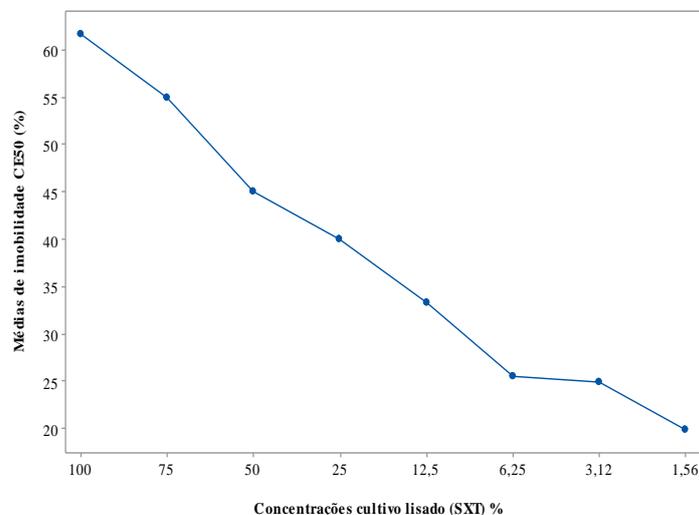
A cepa *Raphidiopsis raciborskii* produtora de cilindropermopsina (CYN/CIAR01), com concentração de toxina (1,42 $\mu\text{g.L}^{-1}$) no estudo, demonstrou-se menos tóxica em relação as cepas testadas (Figura 3). Foi observado imobilidade (CE_{50}) de 50% apenas no extrato lisado puro o que sugere espécies de baixa herbivoria. Reis (2018) demonstrou que espécies de *Daphnia* que apresentam uma alta herbivoria, são menos tolerantes a exposição à cilindropermopsina, apresentando efeitos negativos no seu ciclo de vida. Enquanto clones com baixa herbivoria, são mais tolerantes e parecem coexistir com *R. raciborskii* em condições em que não ocorram dominância dessa cianobactéria.

Sabe-se também, que os efeitos positivos na sobrevivência e das espécies podem ser devido a um conjunto de fatores, tais como suas características bioquímicas e capacidade de interferir mecanicamente no processo de filtração de partículas e menor digestibilidade (SCHWARZENBERGER et al., 2021).

A saxitoxina (SXT) atua bloqueando os canais de sódio, prevenindo a propagação do impulso nervoso e, conseqüentemente, ocasionando paralisação da segunda antena, responsável pela movimentação dos cladóceros (FERRÃO-FILHO & KOZLOWSKYSUZUKI, 2011). No presente estudo, numa concentração inicial 2,05 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de SXT houve 60% de imobilidade/mortalidade dos cladóceros, no entanto quando foram expostos a meio livre das menores diluições (3,12 e 1,56 %) houve alta taxa de recuperação da atividade motora, uma vez que apenas 20 e 25% dos organismos expostos a essa toxina, apresentaram imobilidade (Figura 4). Contudo, em alguns organismos não

foi possível observar a recuperação completa, apenas a movimentação de uma das antenas. Na Figura 4 estão apresentadas as médias de imobilidade de *Daphnia magna* expostas a diferentes diluições de saxitoxina.

Figura 4. Percentual de imobilidade (CE₅₀) em *Daphnia magna* após 48h de exposição a diferentes concentrações de saxitoxina.



Ferrão – Filho e colaboradores (2020), avaliaram os efeitos da cepa neurotóxica da cianobactéria *Raphidiopsis raciborskii* (CYRF-01) sobre a atividade de natação e parâmetros fisiológicos de *Daphnia similis*, como movimentos das antenas, membros, garra pós-abdominal e frequência cardíaca. Os resultados mostraram efeito rápido da cepa CYRF em todos os parâmetros. Os animais começaram a ser imobilizados nos primeiros 30 minutos de exposição e apresentaram paralisia completa após 2 h em 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de saxitoxina e após 24 h nas demais concentrações. As antenas pararam de se mover após 2-3 h a 250-500 $\mu\text{g.L}^{-1}$, explicando a paralisia da atividade de natação em *Daphnia*. Os movimentos torácicos, pós abdominal e frequência cardíaca foram significativamente inibidos após 30 min em todas as concentrações, mantendo-se em níveis mais baixos do que controle através do experimento.

4. CONCLUSÃO

Comparando a sobrevivência de *Daphnia magna* expostas a cianobactérias produtoras de cianotoxinas microcistina-LR (MC-LR), saxitoxina (STX), anatoxina-a (ATX-A) e cilindrospermopsina (CYN), conclui-se que os resultados foram relevantes a

diferentes respostas dos organismos a altas concentrações de MC-LR pura, e baixas concentrações de ATX-A, bem como aos extratos complexos das cianobactérias.

Os resultados opõem-se a hipótese de que a absorção de cianotoxinas em *Daphnias* através da ingestão de células intactas de cianobactérias é contribui na sua imobilidade. Os cladóceros foram mais sensíveis sob concentrações letais e subletais de células lisadas de *Microcystis aeruginosa* e *Dolichospermum solitarium*. O presente estudo ainda demonstrou que neonatos de *Daphnia magna* apresentaram uma alta taxa de herbivoria, ou seja, mesmo se alimentando em proporções e concentrações distintas de cianobactérias e cianotoxinas, os efeitos de imobilidade/mortalidade foram específicos para cada cepa de cianobactéria. A espécie filamentosa *Dolichospermum solitarium* (ATX-A) com concentração de $0,61 \mu\text{g.L}^{-1}$, em quase todas as diluições observadas, apresentou maiores porcentagens de imobilidade. Logo, as hipóteses de que a sensibilidade da espécie *Daphnia magna* expostas as linhagens de cianobactérias tóxicas, é maior em espécies coloniais, e que a taxa de imobilidade populacional dos cladóceros aumenta à exposição de concentrações maiores de cianotoxinas, foram refutadas.

Com concentração inicial $2,05 \mu\text{g.L}^{-1}$ de SXT, os movimentos de *Daphnia magna* foram paralisados temporariamente quando expostas a cianobactéria neurotóxica *Raphidiopsis raciborskii*. No entanto, quando foram expostas a meio livre das menores diluições, houve alta taxa de recuperação da atividade motora, uma vez que apenas 20 e 25% dos indivíduos apresentaram imobilidade.

Assim, relacionando os resultados ao que ocorre no ambiente aquático natural, ao decorrer de uma floração as espécies de *Daphnias* estão expostas a toxinas intracelulares e extracelulares. Com isso, pode haver uma variação na sensibilidade desses animais no início e final das florações, que poderá afetar a estrutura da comunidade zooplanctônica e interferir ao longo da cadeia trófica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. Associação brasileira de Normas Técnicas. NBR 12.713: Ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2016.

ALBUQUERQUE, M.V.C. Avaliação da degradação de microcistina-LR no tratamento de água de abastecimento em sistema convencional seguido por processos oxidativo

avançado (POA). 2017. 129 p. **Dissertação** (Mestrado). Programa de Pós graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Estadual da Paraíba.

AMORIM, C.A., DANTAS, E.W., MOURA, A.N. 2020. Modeling cyanobacterial blooms in tropical reservoirs: The role of physicochemical variables and trophic interactions. **Science of The Total Environment**, 140659.

AMORIM, C.A.; VALENÇA, C.R; MOURA-FALCÃO, R.H; MOURA, A.N. (2019) Seasonal variations of morpho-functional phytoplankton groups influence the top-down control of a cladoceran in a tropical hypereutrophic lake. **Aquat Ecol** 53(3): 453–464. doi.org/10.1007/s10452-019-09701-8.

BOWNIK, A., & PAWLIK-SKOWROŃSKA, B. (2019). Early indicators of behavioral and physiological disturbances in *Daphnia magna* (Cladocera) induced by cyanobacterial neurotoxin anatoxin-a. **Science of The Total Environment**, 133913. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.133

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.

BURATTI, F.M; MANGANELLI, M; VICHI, S; STEFANELLI, M. (2017) Cyanotoxins: producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. **Arch Toxicol** 91(3): 1049–1130. doi.org/10.1007/s00204-016-1913-6.

CETESB. COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Relatório de Qualidade das Águas. Interiores do Estado de São Paulo. 1991. SÃO PAULO

CHISLOCK, M.F., KAUL, K.A., DURHAM, K.A., SARNELLE, O., WILSON, A.E. 2019. Eutrophication mediates rapid clonal evolution in *Daphnia pulicaria*. **Freshw. Biol.** 64: 1275 – 1283. doi.org/10.1111/fwb.13303

DAO, T. S., DO-HONG, L.C., & WIEGAND, C., 2010. Chronic effects of cyanobacterial toxins on *Daphnia magna* and their offspring. **Toxicon**. 55(7), 1244–1254. doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.01.014.

FERRÃO-FILHO, A. S.; HERRERA, N. A.; ECHEVERRI, L. F. Microcystin accumulation in cladocerans: First evidence of MC uptake from aqueous extracts of a natural bloom sample. **Toxicon**, v. 87, n. 1, p. 26–31, 2014.

FERRÃO-FILHO, A.S; KOZLOWSKY-SUZUKI, B (2011). Cyanotoxins: Bioaccumulation and effects on aquatic animals. **Mar Drugs** 9: 2729–2772. doi.org/10.3390/md9122729

FERRÃO-FILHO, A. DA S., & DA SILVA, D. A. C. (2020). Saxitoxin-producing *Raphidiopsis raciborskii* (cyanobacteria) inhibits swimming and physiological parameters in *Daphnia similis*. **Science of The Total Environment**, 135751. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.1357.

FERRÃO-FILHO, A.S; DIAS, T.M; PEREIRA, U.J; SANTOS, J.A; KOZLOWSKY-SUZUKI, B. (2019) Nutritional and toxicity constraints of phytoplankton from a

- Brazilian reservoir to the fitness of cladoceran species. **Environ Sci Pollut R** 26(13): 12881–12893. doi.org/10.1007/s11356-019-04851-6.
- GAN, N., XIAO, Y., ZHU, L., WU, Z., LIU, J., HU, C., SONG, L. 2012. The role of microcystins in maintaining colonies of bloom-forming *Microcystis* spp. **Environmental Microbiology**, 14(3): 730 – 742.
- GER, K.A; URRUTIA-CORDERO P; FROST, P.C; HANSSON, L.A; SARNELLE O, WILSON, A.E; LÜRLING M (2016). The interaction between cyanobacteria and zooplankton in a more eutrophic world. **Harmful Algae** 54: 128–144. doi.org/10.1016/j.hal.2015.12.005.
- GORHAM, P.R., MCLACHLAN, J., HAMMER, U.T., KIM, W.K., 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lynbg). **Verein. Limnol.** 15, 796-804.
- HE, X; CRUZ, A.A; HISKIA, A; KALOUDIS, T; O'SHEA K, DIONYSIOU DD. Destruction of cyanotoxin microcystins by UV-254 nm based direct photolysis and advanced oxidation processes (AOPs): Influence of variable amino acids on the degradation kinetics and reaction mechanisms. 2015. **Water Research**, doi: 10.1016/j.watres.2015.02.011.
- HOLLAND, A.; KINNEAR, S. (2013) Interpreting the Possible Ecological Role (s) of Cyanotoxins: Compounds for Competitive Advantage and/or Physiological Aide? **Mar Drugs** 11: 2239–2258.
- KIM, M.S., LEE, C., 2019. Ozonation of microcystins: Kinetics and toxicity decrease. **Environ. Sci. Technol.** 53, 6427-6435. https://doi.org/10.1021/acs.est.8b06645.
- KOSIBA, J., KRZTOŃ, W., & WILK-WOŹNIAK, E., 2018. Effect of Microcystins on Proto- and Metazooplankton Is More Evident in Artificial Than in Natural Waterbodies. **Microbial Ecology**. 75(2), 293–302. doi:10.1007/s00248-017-1058-z.
- KOUSSOROPLIS, A. M., SCHWARZENBERGER, A., WACKER, A. (2017). Diet quality determines lipase gene expression and lipase/esterase activity in *Daphnia pulex*. **Biology open**, 6(2), 210-216.
- KURMAYER, R.; CHRISTIANSEN, G.; CHORUS, I. The Abundance of Microcystin Producing Genotypes Correlates Positively with Colony Size in *Microcystis* sp. and Determinates Its Microcystin Net Production in Lake Wannsee. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 787-795, 2003.
- LYU, K., GU, L., BANGPING, L., YICHUN, L., CHANGCAN, W., GUAN, H., YANG, Z. 2019. Stress-responsive expression of a glutathione S-transferase (δ) gene in waterflea *Daphnia magna* challenged by microcystin-producing and microcystin-free *Microcystis aeruginosa*. **Harmful Algae**, 56: 1 – 8.
- MINILLO, A.; FERREIRA, A. H. F.; YOGUI, G. T. & YUNES, J. S. Concentração de microcistinas e toxicidade nas formas coloniais de *Microcystis aeruginosa* de florações no estuário da Lagoa dos Patos, RS. In: E.L.G. Espindola, C. M. R. B. & Paschoal, O. R., M.B.C. Bohrer & A.L. Oliveira Neto (Ed.). **Ecotoxicologia - Perspectivas para o Século XXI**. RIMA Editora, São Carlos, pp. 521-533, 2000.

OMIDI, A., ESTERHUIZEN-LONDT, M. PFLUGMACHER, S. 2018. Still challenging: the ecological function of the cyanobacterial toxin microcystin – What we know so far. **Toxin Reviews**, 37(2): 87-105.

ORTIZ-RODRÍGUEZ, R., DAO, T.S., WIEGAND, C., 2012. Transgenerational effects of microcystin-LR on *Daphnia magna*. **J. Exp. Biol.** 215, 2795–2805. doi.org/10.1242/jeb.069211.

ORTIZ-RODRÍGUEZ, R., & WIEGAND, C. (2010). Age related acute effects of microcystin-LR on *Daphnia magna* biotransformation and oxidative stress. **Toxicol.** 56(8), 1342–1349. doi:10.1016/j.toxicol.2010.07.020.

PAWLIK-SKOWROŃSKA, B., TOPOROWSKA, M., & MAZUR-MARZEC, H. (2019). Effects of secondary metabolites produced by different cyanobacterial populations on the freshwater zooplankters *Brachionus calyciflorus* and *Daphnia pulex*. **Environmental Science and Pollution Research**. doi:10.1007/s11356-019-04543-1

PAWLIK-SKOWROŃSKA, B., & BOWNIK, A. (2021). Cyanobacterial anabaenopeptin-B, microcystins and their mixture cause toxic effects on the behavior of the freshwater crustacean *Daphnia magna* (Cladocera). **Toxicol.** 198, 1–11. doi:10.1016/j.toxicol.2021.04.023.

RANGEL, L. M., SILVA, L. H., FAASSEN, E. J., LÜRLING, M., GER, K. A. (2020). Copepod Prey Selection and Grazing Efficiency Mediated by Chemical and Morphological Defensive Traits of Cyanobacteria. **Toxins**, 12(7), 465. doi:10.3390/toxins12070465.

REIS, G. C. Efeitos da cianobactéria neurotóxica *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska, 1912) sobre parâmetros reprodutivos e comportamento alimentar de *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). 2018. 65 f. **Dissertação** (Mestrado em Biodiversidade e Saúde) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

SARNELLE, O.; GUSTAFSSON, S.; HANSSON, L. A. Effects of cyanobacteria on fitness components of the herbivore. **Journal of Plankton Research**, [s.l.], v. 32, no 4, p. 471–477, 2010. ISSN: 01427873, DOI: 10.1093/plankt/fbp151.

SAVIC, B. G., BORMANS, M., EDWARDS, C., LAWTON, L., BRIAND, E., & WIEGAND, C. Cross talk: Two way allelopathic interactions between toxic *Microcystis* and *Daphnia*. **Harmful Algae**, 94, 2020. 101803. doi:10.1016/j.hal.2020.101803

SAVIC, G.B; COLINET, H; BORMANS, M; EDWARDS, C; LINDA, A; LAWTON, B.; WIEGAND, C. Cell free *Microcystis aeruginosa* spent medium affects *Daphnia magna* survival and stress response. **Toxicol.** 195 (2021) 37–47. 10.1016/j.toxicol.2021.03.009

SCHWARZENBERGER, A., & MARTIN-CREUZBURG, D. (2021). *Daphnia's* Adaptive Molecular Responses to the Cyanobacterial Neurotoxin Anatoxin- α Are Maternally Transferred. **Toxins**, 13(5), 326. doi:10.3390/toxins13050326.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA-821-R-02-1. 5th Edition. Washington. U.S.A, 2015.

VESTERKVIST, P.S.M; MISIOREK, J.O; SPOOF LEM, Toivola DM, Meriluoto JAO. 2012. Comparative cellular toxicity of hydrophilic and hydrophobic microcystins on Caco-2 Cells. **Toxins**, 4, 1008-1023.

ZAGATTO, P.A.; BURATINI S.A.; ARAGÃO M., FERRÃO FILHO; A.S. 2012. Neurotoxicity of two *Cylindrospermopsis raciborskii* strains to mice, *Daphnia* and fish. **Environ Toxicol Chem** 31: 857 – 862. <https://doi.org/10.1002/etc.1759>.

ZANCHETT G, OLIVEIRA-FILHO EC, 2013. Cyanobacteria and cyanotoxins: from impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. **Toxins (Basel)** 5 (10), 1896–1917.

ANEXOS

Tabela 1. Descrição das configurações da CLAE-EM

Parâmetros	Descrição
Cromatógrafo	
Pré coluna	ULTRA C18 (3 x 2.1 mm)
Coluna	KINETEX C18 (2.6 µm x 100 mm x 2.1 mm)
Gradiente de concentração da Fase móvel	50%/50% H ₂ O/ acetonitrila + 1% (v/v) ácido fórmico (modo isocrático)
Tempo de análise	5 minutos
Volume de injeção da amostra	100 µL
Espectômetro de massas	
Gás	Nitrogênio
Temperatura capilar	350 °C
Detector voltagem	5 kV
Interface	Electrospray ionization (ESI) – modo positivo
Íons monitorados	MC-LR: m/z = 995,5560 (M+1)
Tempo de acumulação de íons no octapolo	Microcistina-LR: 100 milisegundos
Validação do método	
Linearidade	R ² 0.998 para MC-LR 0.1 to 50 µg.L ⁻¹
Precisão dentro da corrida (CV %)	4.95
Precisão(recuperação)	98%
Limite de detecção	0.038 µg.L ⁻¹
Limite de quantificação	0.13 µg.L ⁻¹

Fonte: Albuquerque (2017).

Tabela 2. Valores de CE₅₀ obtidos nos ensaios de ecotoxicidade em *D. magna* para os extratos brutos das cianobactérias.

Porcentagem (%)	<i>Microcystis aeruginosa</i> (MC-LR)	<i>Raphidiopsis raciborskii</i> (SXT)	<i>Dolicospermum solitarium</i> (ATX-A)	<i>Raphidiopsis raciborskii</i> (CYN)
100	50	45	65	30
75	48,3	35	52,2	28
50	41,6	35	46,3	25
25	30	25	36,5	22
12,5	23,3	20	25	20
6,25	10	20	21	20
3,12	0	15	15	15
1,56	0	10	10	15

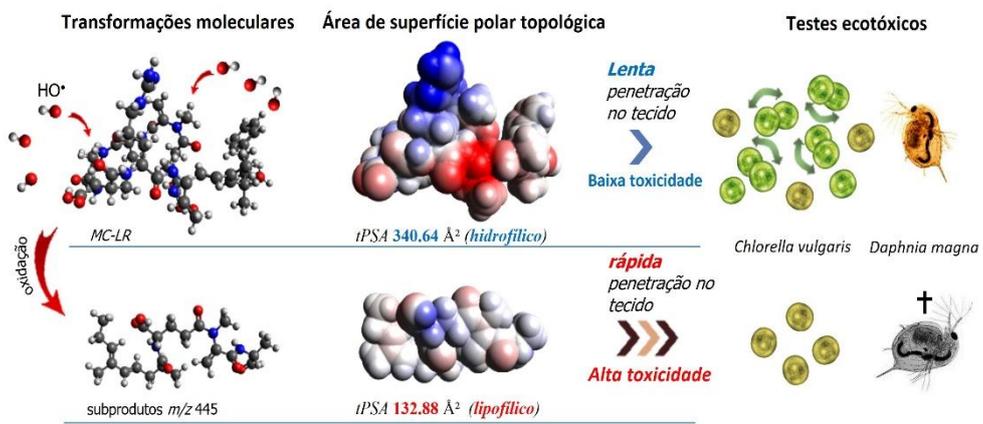
Tabela 3. Valores de CE₅₀ obtidos nos ensaios de ecotoxicidade em *D. magna* para os extratos lisados das cianobactérias.

Porcentagem (%)	<i>Microcystis aeruginosa</i> (MC-LR)	<i>Raphidiopsis raciborskii</i> (SXT)	<i>Dolicospermum solitarium</i> (ATX-A)	<i>Raphidiopsis raciborskii</i> (CYN)
100	100	61,6	100	50
75	100	55	100	42
50	100	45	100	35
25	75	40	100	30
12,5	51,6	33,3	45	25
6,25	45	25,5	40	25
3,12	33,3	25	33,3	20
1,56	33,3	20	30	10

Capítulo 4

**ESTUDOS DA LIPOSSOLUBILIDADE E DA ECOTOXICIDADE DE
SUBPRODUTOS DA DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA-LR UTILIZANDO
MODELAGEM MOLECULAR COMPUTACIONAL E TESTES *IN VIVO* COM
Chlorella vulgaris e *Daphnia magna***

RESUMO GRÁFICO



RESUMO

Modelagem molecular computacional, espectrometria de massa e testes *in vivo* com *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) e *Daphnia magna* (*D. magna*) foram utilizados para investigar a lipossolubilidade e ecotoxicidade dos subprodutos da degradação de MC-LR gerados após oxidação por radicais OH• no processo Fenton. A exposição de MC-LR (5 µg.L⁻¹) às condições de oxidação mais severas (Fe²⁺ 20 mM e H₂O₂ 60 mM) resultou em uma redução na concentração de toxina de 96% (0,16 µg.L⁻¹), no entanto, com a formação de muitos subprodutos. O subproduto de m/z 445 foi o mais resistente à degradação e reteve uma estrutura tóxica de ligações dieno presentes no aminoácido Adda. A modelagem computacional revelou que m/z 445 (tPSA = 132,88 Å²; KOW = 2,02) é mais lipossolúvel que MC-LR (tPSA = 340,64 Å²; KOW = 0,68), evidenciando um processo de transporte mais fácil desse subproduto. Diante disso, os testes de toxicidade utilizando *C. vulgaris* e *D. magna* indicaram maior toxicidade do subproduto m/z 445 em relação ao MC-LR. Quanto a conversão de MC-LR em subprodutos foi de 77%, a inibição do crescimento de *C. vulgaris* e a imobilidade de *D. magna* foram, respectivamente, 6,14 e 0%, com 96% de conversão; a inibição do crescimento e a imobilidade foram 100% para ambas as espécies.

Palavras – chave: MC-LR, Oxidação; Radicais OH-; subprodutos tóxicos; subprodutos lipossolúveis.

ABSTRACT

Computational molecular modelling, mass spectrometry and in-vivo tests with *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) and *Daphnia magna* (*D. magna*) were used to investigate the liposolubility and ecotoxicity of MC-LR degradation by-products generated after oxidation by OH• radicals in Fenton process. Exposure of MC-LR (5 µg.L⁻¹) to the most severe oxidation conditions (Fe²⁺ 20 mM and H₂O₂ 60 mM) resulted in a reduction in the toxin concentration of 96% (0.16 µg.L⁻¹), however, with the formation of many by-products. The by-product of m/z 445 was the most resistant to degradation and retained a toxic structure of diene bonds present in the Adda amino acid. Computational modeling revealed that m/z 445 (tPSA = 132.88 Å²; KOW = 2.02) is more fat-soluble than MC-LR (tPSA = 340.64 Å²; KOW = 0.68), evidencing an easier transport process of this by-product. Given this, toxicity tests using *C. vulgaris* and *D. magna* indicated greater toxicity of the by-product m/z 445 compared to MC-LR. When the conversion of MC-LR to by-products was 77%, the growth inhibition of *C. vulgaris* and the *D. magna* immobility were, respectively, 6.14 and 0%, with 96% conversion; growth inhibition and the immobility were both 100% for both species

Keywords: MC-LR; Oxidation; OH radicals; Toxic by-products; Fat-soluble by products.

1. INTRODUÇÃO

O florescimento de cianobactérias em águas superficiais atraiu considerável atenção devido aos prejuízos que esses organismos têm causado ao ambiente ecológico e a saúde humana (WANG et al., 2018; SU et al., 2020; LIANG et al., 2020). Mais da metade desses florescimentos estão associados à formação de metabólitos tóxicos nos quais as microcistinas (MCs) são as principais cianotoxinas (LIANG et al., 2020). Dentre essas toxinas, a *Microcistina-Leucina Arginina* (MC-LR) é uma dos congêneres mais comuns e também uma das variantes com maior potencial tóxico (SU et al., 2020). Está bem estabelecido que a MC-LR pode causar danos graves a biota aquática (PARK et al., 2016; DAO et al., 2010), a órgãos de animais e seres humanos (SUM et al., 2010; BULC ROZMAN et al., 2017) sendo também classificada como um carcinógeno potencial (SU et al., 2020; PAN et al., 2020; ZHANG et al., 2021).

Já foi bem documentado que os tratamentos convencionais de águas (por exemplo, coagulação, floculação, sedimentação e filtração) podem apenas eliminar microalgas prejudiciais, mas são ineficientes para remover microcistinas liberadas pelas cianobactérias (LIANG et al., 2020). Nesse sentido, processos de oxidação avançados, como por exemplo, decomposição ultravioleta, ozonização, catálise com TiO_2 , Fenton, dentre outros) foram empregados para eliminar MCs em águas de forma eficiente, no entanto, esses processos podem levar a formação de subprodutos e derivados de MC mais prejudiciais que a própria toxina (LOPES et al., 2017; MA et al., 2012; SHARMA et al., 2012; KARCI et al., 2018; MORÓN-LÓPEZ et al., 2019). Dentre estes processos de oxidação, o Fenton é bastante recorrente devido à sua compatibilidade ambiental (usando H_2O_2 e ferro / ferro férrico (Fe^{2+} / Fe^{3+}) como oxidante e catalisador) e também pela eficiência de oxidação que é obtido pela rápida formação de radicais $\text{OH}\cdot$ (LOPES et al., 2017; BELLO et al., 2019; LIANG et al., 2020).

Diversos estudos já documentaram que a degradação de MC-LR por processo Fenton está associada a formação de subprodutos de oxidação que preservam maior parte das estruturas moleculares da toxina (PARK et al., 2016; KARCI et al., 2018; PARK et al., 2017; PARK et al., 2018). A não toxicidade desses subprodutos está principalmente associada a clivagem da ligação dieno na cadeia Adda ([[(2S,3S,8S,9S) -3-amino-9-metoxi-2, ácido 6,8-trimetil-10-fenildeca-4E,6E-di-enóico]]), que é essencial para a

expressão da toxicidade de MC-LR. Desse modo, a clivagem dessa ligação é desejada no processo de oxidação, sendo a principal via para a inativação dos efeitos tóxicos de MC-LR (PARK et al., 2018; PARK et al., 2017).

Em adição, outro fator determinante para o potencial tóxico de MCs e subprodutos são suas superfícies de distribuição de carga molecular, que definem se as substâncias serão lipofílicas ou hidrofílicas. Esses aspectos estão diretamente ligados aos processos de absorção e distribuição dessas substâncias nos tecidos dos organismos, sendo constatado que congêneres de MCs mais lipofílicos possuem cinética de penetrabilidade e transporte superiores aos dos hidrofílicos (MERILUOTO et al., 1990; TESTAI et al., 2016).

Diante do exposto, o presente estudo utilizou espectrometria de massas, testes de toxicidade *in vivo* e modelagem computacional molecular para investigar a toxicidade de subprodutos de MC-LR, quando oxidada por processo Fenton. Este estudo buscou elucidar as diferenças de lipossolubilidade entre MC-LR e um de seus subprodutos por análise de distribuição superficial de cargas, a fim de demonstrar o porquê de subprodutos exibirem efeitos tóxicos mais pronunciados que a própria toxina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção da microcistina – LR e Água de estudo

A microcistina-LR utilizada neste estudo foi obtida a partir da cepa da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (Word Data Center Microorganisms 835). Foi considerada a MC-LR total - a soma das frações extracelulares e intracelulares. Para isso, as amostras de cultivo da cianobactéria foram submetidas a três ciclos de congelamento/descongelamento, com o objetivo de provocar a lise celular e consequente liberação da toxina intracelular para o meio extracelular (BROOKE et al., 2006; WANG et al., 2007).

Nos ensaios de degradação foi utilizada como matriz a água deionizada acrescida do extrato semipurificado da microcistina-LR. A adição do extrato foi calculada para uma concentração final de MC-LR de 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$, que equivale a uma situação extrema de contaminação de águas naturais pela presença de cianotoxinas.

2.2 Experimentos de degradação utilizando a MC-LR

Os experimentos de oxidação foram realizados em equipamento de *Jar test*. O processo oxidativo aplicado Fenton foi realizado em etapas sequenciais de coagulação, floculação, sedimentação e filtração (filtro de laboratório 4.45 μm). O volume de reação foi 2L, com tempo de oxidação de 10 min, pH 7,5 e 400 rpm de agitação. O tempo de floculação foi 10 min, à 40 rpm e pH 8.5. O tempo de sedimentação foi de 10 min. A razão molar de Fe^{2+} : H_2O_2 utilizada foi 1:3, em alinhamento as condições otimizadas de Fenton descritas na literatura (Ramos et al., 2020). Cada condição de oxidação foi nomeada como um tratamento foi de T1 a T5, com as dosagens de ferro Fe^{2+} (mM) T1 = 5.0; T2 = 5.5; T3 = 10; T4 = 15 e T5 = 20. Para ajuste do pH de cada etapa foi empregado HCl e NaOH à 0.1N. A concentração de MC-LR foi avaliada em cada etapa do tratamento. Análises complementares de Cor e Turbidez também foram realizadas pelos métodos espectrofotométrico (2120C) e nefelométrico (2130B), respectivamente (APHA, 2017).

2.3 Procedimentos analíticos

As quantificações da concentração de microcistina-LR foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM), empregando um cromatógrafo UHPLC 3000 e um espectrômetro de massas LCQ Fleet Ion Trap (ambos da Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). As configurações utilizadas para CLAE-EM e as Figuras de mérito da validação do método são apresentados na **Tabela S1** do material suplementar.

Os produtos de degradação de microcistina-LR foram separados das amostras por microextração em fase sólida (SPME), empregando um coletor de vácuo modelo TR-004012 (Teknokroma, Barcelona, Espanha) equipado com colunas C18 (500 mg / 6 mL; Cromatógrafo vertical, Bangkok, Tailândia). A filtração e redispersão de todas as amostras foram realizadas a uma vazão de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e o metanol foi empregado como eluente na redispersão. As amostras foram concentradas em uma razão 12:1.

Nessa etapa de identificação dos produtos de degradação de microcistina-LR, os extratos de SPME foram submetidos à espectrometria de massa de infusão direta (DIMS) e os espectros obtidos por varredura no modo “FULL MS2”, utilizando o espectrômetro

LCQ Fleet Ion Trap (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Foi empregado a ionização por eletrospray de modo positivo (ESI) como detecção de m/z entre 0 – 1000. Os parâmetros empregados foram volume de injeção 100 μL , temperatura do vaporizador 350 ° C e a voltagem de spray 5 kV, com spray estabilizado por fluxo de nitrogênio. Os dados espectrais foram analisados com o software Xcalibur (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

2.4 Modelagem Computacional

A modelagem molecular computacional foi empregada para calcular as propriedades inerentes a distribuição de carga da molécula de MC-LR e seu principal produto de oxidação. Os softwares utilizados foram o *ChemDraw 19.1* e o *Avogrado 1.0*. A partir da ferramenta *ChemDraw 19.1*, foram elucidadas as estruturas moleculares e calculadas as razões m/z dos fragmentos de MC-LR, com base nos dados obtidas nos espectros de massas. Os arquivos 2D das moléculas obtidas a partir do *ChemDraw 19.1* foram exportados e suas estruturas moléculas 3D foram geradas e as conformações espaciais otimizadas a partir do *Avogrado 1.0*. As curvas de distribuição de carga das superfícies moleculares foram geradas pelo seguinte input de dados para o software: Surface type: Van der Waals; Surface color intensity indicator: Eletrostatic Potencial; Resolution Surface: High (0.1 Ångstroms).

Os parâmetros avaliados na modelagem computacional foram a área de superfície polar da molécula (tPSA), que é uma importante medida para a previsão das propriedades de transporte de compostos em células; a refratividade molar (CMR), que é uma medida da polarizabilidade total de um mol de uma substância; o coeficiente de partição n -octanol/água (KOW), que é um indicador de afinidade de um composto a solventes lipofílicos/hidrofílicos; a solubilidade em água (LogS) e o volume molar.

2.5 Bioensaios de Toxicidade

A metodologia adotada para o teste de toxicidade crônica seguiu os procedimentos descritos pela NBR 12.264/2018, que consiste na exposição da *Chlorella vulgaris* às amostras contendo MC-LR ou os subprodutos de oxidação. Nestes ensaios foram investigados tanto a toxicidade do cultivo lisado de MC-LR, quanto a toxicidade dos

subprodutos gerados após a oxidação. A métrica para mensurar a toxicidade foi o percentual de inibição de crescimento, com volume amostral de 1mL e contagem das células realizada com auxílio de microscópio óptico, em câmara de Neubauer. Nos testes que avaliaram a toxicidade do cultivo lisado de MC-LR, a contagem de células foi realizada após 96hs e os resultados expressos $CE_{50}96h$. Nos testes que avaliaram a toxicidade dos subprodutos gerados após a oxidação de MC-LR, o monitoramento do crescimento e inibição celular foi realizado em 24, 48, 72 e 96 h de exposição. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os dados tratados estatisticamente com intervalo de confiança de 95%. O teste de Dunnet também foi aplicado. Ao final dos ensaios também foi realizada a determinação do conteúdo de clorofila-a pelo método de Jones (1979).

O teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna* seguiu os procedimentos descritos na NBR 12.713/2016. O método consiste na exposição dos neonatos do gênero *Daphnia magna* às amostras durante um período de 48h. Os organismos neonatos (de 2 a 24h) foram transferidos para 20 mL das soluções-teste e da solução controle, em recipientes plásticos de 50 mL. Em seguida, foram incubados por 48h a 20°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), sem luz, sem renovação da solução e sem alimentação. Ao final deste período, o número de organismos imóveis/mortos nas amostras e no controle foram registrados. Os ensaios foram considerados válidos quando a porcentagem de organismos imóveis/mortos no controle não ultrapassou 10% após 48h. Neste estudo, o fator de toxicidade foi determinado através da observação direta da mobilidade dos organismos na série de soluções-teste, e o resultado expresso por um número inteiro. Considerou-se o resultado como "tóxico" quando a porcentagem de imobilidade na amostra foi significativamente maior que no controle, ou "não tóxico" quando não constatada diferença significativa.

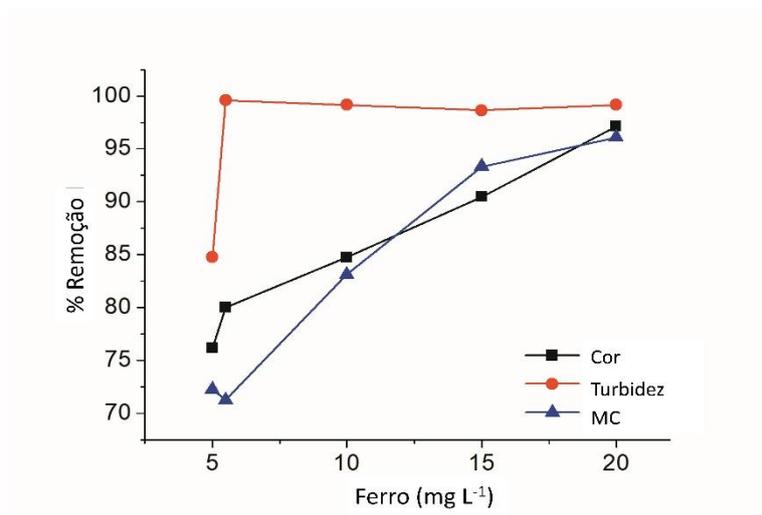
Antes dos bioensaios definitivos, os microcrustáceos foram submetidos à toxicidade aguda com dicromato de potássio como substância de referência, a fim de garantir que a sensibilidade dos organismos empregados atendam às normas internacionais e para confirmar a validade do ensaio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Processo Oxidativo Avançado – Fenton

A caracterização da água de estudo, apresentou alcalinidade $53 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$, dureza $40 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ e pH em torno 7.6. Também observou-se cor verdadeira, turbidez e concentração de MC-LR foi 105 Hz, 23 NTU e $5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Essas características físico-químicas se assemelham aquelas encontradas em águas naturais com elevados níveis de contaminação por cianotoxinas (THEES et al., 2018). Os dados de remoção percentual da cor, turbidez e concentração de MC-LR ao final dos tratamentos de T1-T5 são apresentados na **Figura 1**.

Figura 1. Remoção de cor, turbidez e MC-LR durante as etapas de oxidação, decantação e filtração.



Foi constatado que uma dosagem de ferro acima de $5,5 \text{ mg.L}^{-1}$ resulta em uma remoção eficiente da turbidez (acima de 99%) após a etapa de filtração. Além disso, o aumento na concentração de ferro acima de $5,5 \text{ mg.L}^{-1}$, não resultou melhorias em termos de remoção de turbidez. Contudo, esse aumento foi indispensável para otimizar as remoções de cor verdadeira e MC-LR. Neste sentido, fica constatado a contribuição do processo oxidativo na degradação de grupos cromóforos geradores de cor, bem como, na oxidação da MC-LR. Todavia, conforme dados de cor verdadeira, turbidez e concentração de MC-LR para as etapas de oxidação, decantação e filtração, (ver **Tabela S2** do material suplementar), o material oxidado que provoca cor só é removido de modo eficiente após a etapa de filtração, na qual as partículas coaguladas que não sedimentaram foram retidas pelo filtro.

Um teste de hipótese *t* entre os dados de remoção de MC-LR nas etapas de oxidação e decantação demonstrou que não há diferença significativa (0,05 de

significância, GL 4, $t_{\text{crítico}} = 2.77$, $t_{\text{calculado}} = 0.426$) entre os resultados destas duas etapas. Do mesmo modo, também não existe diferença significativa entre os resultados de remoção de MC-LR entre as etapas de oxidação e filtração (0,05 de significância, GL 4, $t_{\text{crítico}} = 2.77$, $t_{\text{calculado}} = 1.52$). Este achado indica que, conforme esperado, a MC-LR encontra-se dissolvida na água de estudo, sendo degradada apenas na etapa de oxidação, de modo que as etapas de decantação e filtração não contribuem para a remoção de MC-LR. Em alinhamento a essa constatação, já foi discutido que métodos convencionais de tratamento de água envolvendo coagulação, decantação e filtração não são adequados no tratamento dessas toxinas (FAN et al., 2013; MAGHSOUDI et al., 2015).

Em adição, esses resultados também corroboram para explicação de que o processo de oxidação promovido por Fenton é cessado na etapa de coagulação. Isso ocorre em função da elevação do pH do meio reacional (para 8.5), que desloca o equilíbrio iônico da matriz em estudo, fazendo com que o Fe^{2+} permaneça na forma oxidada (Fe^{3+}) (RAMOS et al., 2020). Este fenômeno inibe o ciclo da reação Fenton para formação de novos radicais OH (SUM et al., 2005; LI et al., 2015).

3.2 Subprodutos de oxidação

A **Figura 2** apresenta os espectros de massa obtidos após o processo de filtração, para os tratamentos oxidativos de T2 a T5. T1 não foi discutido nessa etapa por não apresentar diferença significativa com T2 em relação a degradação de MC-LR. De maneira geral, as razões m/z 69; 135, 159; 213, 286, 374, 445, 553, 558, 682, 778, 866 e 995 estiveram presentes nos efluentes dos quatro tratamentos, em diferentes intensidades.

A identificação das espécies químicas correspondentes a estes fragmentos foi baseada principalmente na estrutura molecular da MC-LR, (**Figura S1** material suplementar). Trata-se de um heptapeptídeo cíclico constituído das sub-estruturas Adda ([[(2S,3S,8S,9S)-3 amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4(E),6(E)-ácido dióico), D-glu (D-ácido glutâmico), Mdha (N-metil-desidroalanina), D-ala (D-alanina), L-Leu (L-Leucina), D-MeAsp (D-ácido eritro- β -metaplástico), L-Arg (L-arginina) (MAYUMI et al., 2016). A **Tabela 1** apresenta as estruturas correspondentes aos fragmentos registrados nos espectros de massas, que corroboram com as informações já descritas na literatura específica (MILES et al., 2013; FANG et al., 2014).

Figura 2. Espectros (m/z) dos subprodutos obtidos após degradação de MC-LR por Fenton.

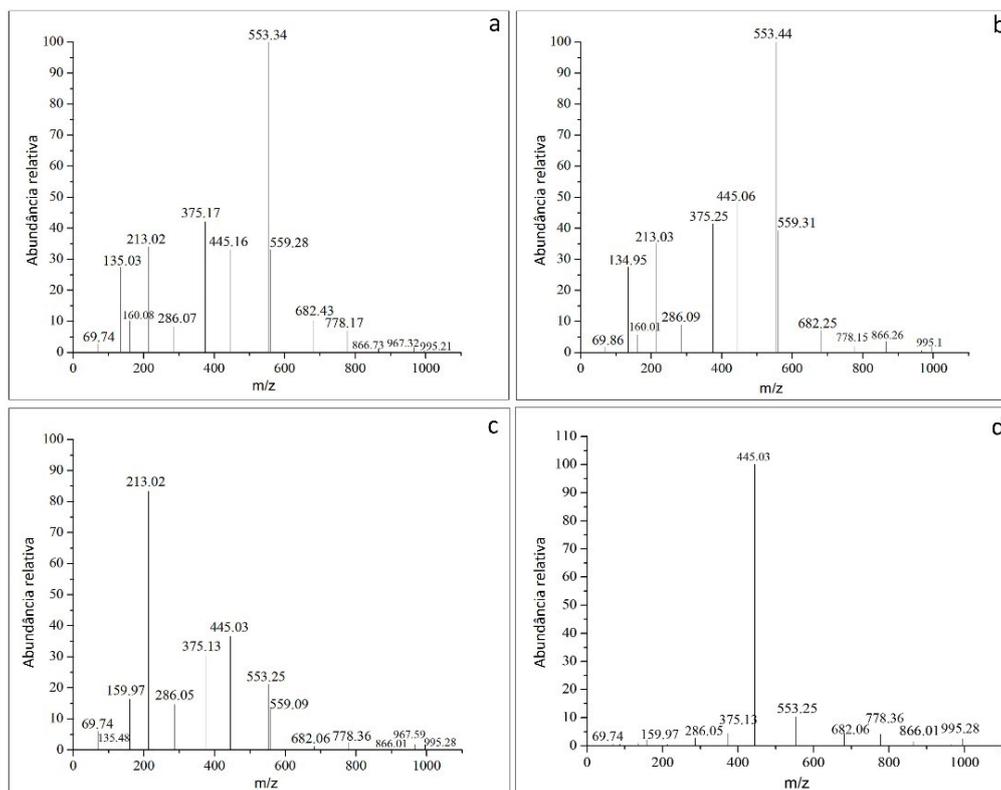


Tabela 1. Principais fragmentos identificados nos efluentes de oxidação MC-LR e seus compostos moleculares.

m/z	Fragmentos de MC-LR
69	D-Ala
135	(2-metoxi-etil) benzeno derivado do grupo Adda
213	D-Glu + Mdha
286	L-Arg + D-MeAsp
375	Adda + D-Glu + Mdha removendo m/z 135
445	Adda + D-Glu + Mdha + D-Ala removendo m/z 135
553	Mdha + D-Ala + L-Leu + D-MeAsp + L-Arg
559	Adda + L-Arg + D-MeAsp + L-Leu removendo m/z 135
682	L-Arg + Adda + D-Glu + Mdha
778	D-Glu + Mdha + D-Ala + L-Leu + D-MeAsp + L-Arg + 3-amino-2-metilbutano derivado do grupo Adda
866	L-Arg + Adda + D-Glu + Mdha + A-Ala + L-Leu
995	MC-LR

As fórmulas químicas e as estruturas moleculares de todos os fragmentos foram identificadas e estão apresentadas na **Tabela S3** do material suplementar.

A molécula da MC-LR, que corresponde a m/z 955, apareceu com uma baixa abundância relativa nos espectros de massas referentes aos quatro tratamentos. Conforme dados da **Figura 1**, T2 (Fe^{2+} em 5.5 mg.L^{-1}) já resultou na degradação de 70% da MC-LR presente no meio reacional, o que justifica uma maior abundância dos subprodutos em relação a MC-LR. De maneira geral, o processo de oxidação resultou na desnaturação da estrutura cíclica da MC-LR, que compreende as ligações entre Adda+D-Glu+Mdha+D-Ala+L-Leu+D-MeAsp+L-Arg. Esta observação foi evidenciada pela presença das estruturas fragmentadas da m/z 69 até a m/z 682, que são derivadas da quebra de ligações peptídicas da MC-LR. Conforme descrito por Fang et al. (2014), a m/z 135, (2-metoxietil) benzeno, é derivada de Adda, por meio da clivagem da ligação entre os carbonos 8 e 9. A identificação do fragmento m/z 135 permitiu explicar a presença dos fragmentos m/z 375, 445 e 559, que estão relacionados a retirada de (2-metoxietil) benzeno da molécula de MC-LR.

Foi constatado no presente estudo que o fragmento m/z 778 corresponde a estrutura cíclica da MC-LR, com a presença de 3-amino-2-metilbutano, que deriva de Adda pela quebra da dupla ligação entre os carbonos 4 e 5. A quebra dessa ligação é direcionada pela densidade eletrônica da dupla ligação entre os carbonos vicinais, que sofrem reação de abstração de elétrons por parte dos radicais OH (RAMOS et al., 2020).

Conforme dados apresentados nos espectros de massas da **Figura 2** e dados complementares da **Tabela S3**, os fragmentos mais abundantes identificados nos efluentes tratados apresentaram peso molecular abaixo de 668 g.mol^{-1} . Outra importante observação é que todos os fragmentos com peso molecular abaixo de 668 g.mol^{-1} apresentaram a estrutura cíclica de MC-LR degradada. Também pode ser constatado que, à medida que a intensidade do tratamento Fenton aumentou, ocorreu uma diminuição da abundância do fragmento m/z 553 e o aumento na abundância do fragmento 445. Este fenômeno pode ser explicado pois a m/z 445 compreende uma parte da estrutura de Adda, que é uma molécula resistente a degradação (MILES et al., 2013). Nesse sentido, ao passo que o potencial de oxidação do meio vai aumentando (aumento da concentração de reagente Fenton), os demais fragmentos vão sendo oxidados mais rapidamente que m/z 445, o que causa o aumento da abundância relativa desse fragmento. Por outro lado, o aumento na abundância do fragmento 213 (D-Glu + Mdha) está associada a degradação

dos fragmentos 375, 559, 682, 778 e 886, que compreendem as moléculas D-Glu e Mdha em sua estrutura.

Vale ressaltar que tanto os fragmentos m/z 213 quanto 445 compreendem D-Glu e Mdha, e esses fragmentos resistiram aos tratamentos com elevadas concentrações do agente de oxidação. A m/z 445, subproduto mais abundante no efluente de T5, é mais lipossolúvel que a molécula de MC-LR. Isso ocorre em função da perda de um dos agrupamentos COOH, oriundo de D-MeAsp (D-ácido eritro- β -metaplástico), que é responsável por garantir o aspecto hidrofílico da molécula de MC-LR (TESTAI et al., 2016).

3.3 Modelagem molecular computacional de MC-LR e subprodutos produzidos

Para fundamentar a inferência da maior lipossolubilidade da m/z 445 em relação a MC-LR, procedeu-se com um estudo de modelagem computacional, para determinar densidades de cargas superficiais de ambas as moléculas. A **Figura 3** apresenta as estruturas moleculares 3D e as superfícies de distribuição de carga de MC-LR e de seu subproduto de oxidação m/z 445. Os demais resultados da modelagem computacional são apresentados na **Tabela 2**.

Figura 3. Área de superfície polar topológica obtida por modelagem computacional. (a) – molécula 3D de subproduto m/z 445; (b) – molécula 3D de MC-LR; (c) – área de superfície polar topológica do subproduto m/z 445; (d) – área de superfície polar topológica de MC-LR.

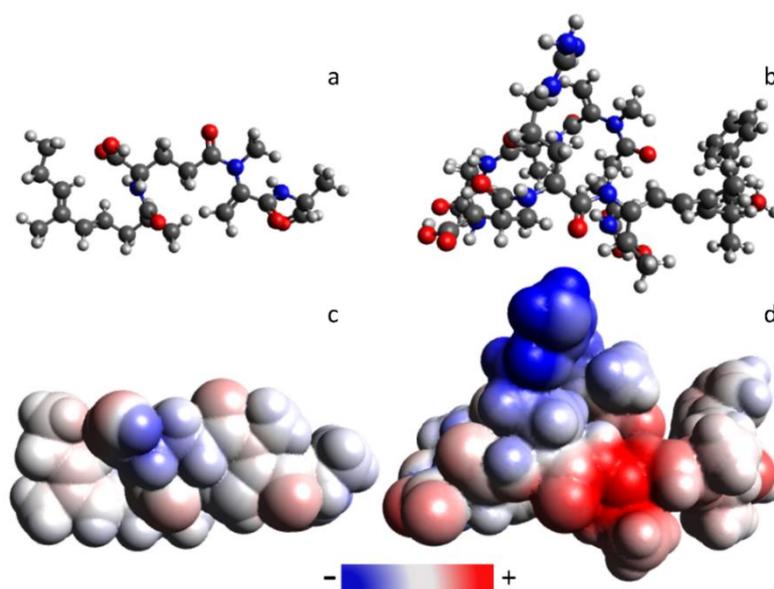


Tabela 2. Propriedades moleculares de MC-LR e subproduto m/z 445 obtidos por modelagem computacional.

Parâmetros	MC-LR	Subprodutos m/z 445
tPSA (Ångstroms ²)	340.64	132.88
KOW	0.679	2.025
LogS	-8.27	-3.591
CMR	26.896	12.343
Molar volume (cm ³)	766.0 (\pm 7)	399.4 (\pm 4)

*tPSA- área de superfície polar topológica; KOW- coeficiente de partição para n-octanol/água; LogS- solubilidade em água; CMR – Refratividade Molar.

Os resultados da modelagem confirmaram a maior lipossolubilidade do subproduto m/z 445 em relação a MC-LR, sendo constatado que MC-LR é cerca de 3x mais polar que o referido subproduto, em termos de tPSA. Essa característica polar de MC-LR pode ser visualmente identificada pela ilustração da superfície polar da molécula (**Figura 3-c e d**), que possui distribuição de cargas positivas/negativas muito mais intensas que no subproduto m/z 445. A característica lipossolúvel do subproduto m/z 445 também foi confirmada em termos KOW, que nesse subproduto foi de 2.025, cerca de três vezes maior que o de MC-LR. Essas informações foram corroboradas pelos dados de Refratividade Molar (CMR), que indicaram que a molécula de MC-LR é duas vezes mais polarizável que o subproduto m/z 445. Além disso, Shishido et al. (2019) verificaram que os tempos de retenção cromatográfica das microcistinas foram adequadamente correlacionados com os valores de tPSA obtidos por cálculo teórico, mostrando que este parâmetro é capaz de descrever as características de afinidade polar dessa toxina.

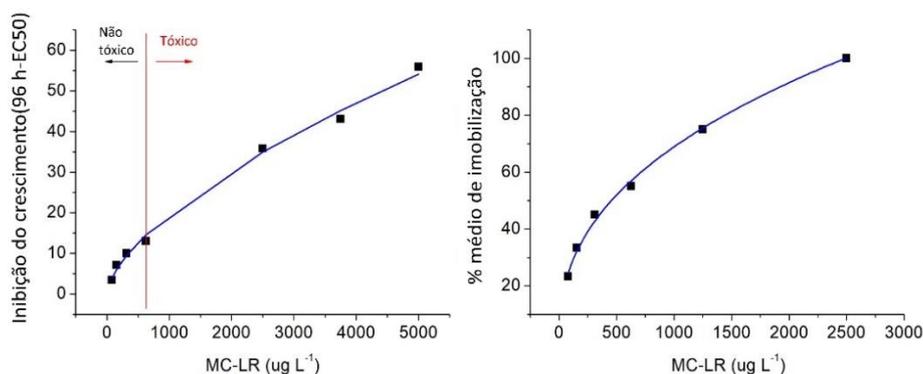
Os dados de modelagem molecular computacional para os outros subprodutos são apresentados na **Tabela S3** (material suplementar). Com base nos dados de KOW, os subprodutos 135, 375, 445 e 559 têm maior lipossolubilidade do que MC-LR. No entanto, os subprodutos 886, 778, 682, 553, 286, 213 e 69 são mais hidrofílicos do que MC-LR. Outro achado importante, baseado nos dados da **Figura 2**, é que os subprodutos mais hidrofílicos foram mais facilmente degradados do que os lipossolúveis.

3.4 Testes de ecotoxicidade

3.4.1 Ecotoxicidade de microcistina – LR em *Chlorella vulgaris*

Na etapa inicial dos testes de toxicidade foram avaliadas oito diluições de extrato bruto lisado de *Microcystis aeruginosa*, com concentração inicial de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$. A relação entre o percentual de inibição do crescimento e a concentração de MC-LR segue uma função matemática de potência, conforme apresentado na curva da **Figura 4-a**. A **Tabela S4** apresenta dados complementares desses resultados. Foi constatado que *Chlorella vulgaris* não sofreu efeitos tóxicos significativos quando expostos ao extrato lisado com concentração de MC-LR abaixo de $0,652 \mu\text{g.L}^{-1}$. A **Figura 4-b** também apresenta o resultado da imobilidade de *Daphnia magna* em função da concentração de MC-LR no meio de exposição, que serão discutidos na sessão 3.1.3.

Figura 4. Inibição do crescimento de *Chlorella vulgaris* em função da concentração de MC-LR no meio de exposição (a) e imobilidade de *Daphnia magna* em função da concentração de MC-LR no meio de exposição (b).



O modelo matemático que expressa a relação entre a inibição do crescimento de *Chlorella vulgaris* (CE_{5096h} %) e a concentração de MC-LR ($\mu\text{g.L}^{-1}$) é apresentada na Equação 1. O referido modelo apresentou R^2 de 0.99 e o teste de significância da regressão resultou em um F-Fisher de regressão (1049) significativamente maior que o F crítico (5.98) (ver ANOVA de regressão na **Tabela S5**).

$$CE_{5096h} \%_{(C.vulgaris)} = \frac{[MC - LR]^{0.6317}}{4} \quad \text{Eq.1}$$

Em que, $CE_{5096h} \%_{(C.vulgaris)}$ é a taxa de inibição percentual do crescimento de *Chlorella vulgaris*; $[MC - LR]$ é a concentração de MC-LR no extrato lisado. Com base nesse modelo, é possível prever a taxa de inibição de *Chlorella vulgaris* quando exposta a MC-LR presente na água de estudo ($5 \mu\text{g.L}^{-1}$), que resultaria em CE_{5096h} de apenas

0,69%. Neste sentido, o resultado do teste de toxicidade seria não tóxico (com resultado não significativo para o teste de Dunnet).

Pontua-se que as concentrações de MC-LR que provocaram toxicidade crônica em *Chlorella vulgaris* ($[MC-LR] > 0,625 \mu\text{g.L}^{-1}$) levam à ocorrência de alterações metabólicas que retardaram o mecanismo de divisão celular. Este fenômeno está relacionado a inibição das proteínas fosfatases, que participam ativamente do processo de fotossíntese (BABICA et al., 2006). Wang et al., (2017) analisaram os possíveis efeitos alelopáticos dos exsudatos durante três fases de crescimento da cultura de *Microcystis aeruginosa* em três microalgas (*Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella pyrenoidosa* e *Cyclotella meneghiniana*). Esses autores relatam que os crescimentos das três algas foram inibidos ao serem submetidas aos exsudatos provenientes da fase exponencial e estacionária da cultura de *Microcystis aeruginosa*.

3.4.2 Ecotoxicidade dos subprodutos de degradação de MC-LR em *Chlorella vulgaris*

Uma vez constatado que em concentrações menores de MC-LR na água de estudo, não causam efeitos tóxicos crônicos em *Chlorella vulgaris*, procedeu-se os ensaios de degradação MC-LR afim de avaliar os efeitos toxicológicos dos subprodutos de oxidação de MC-LR. Os ensaios avaliaram os efluentes dos cinco tratamentos (T1-T5). Os tempos de exposição de *Chlorella vulgaris* aos efluentes dos tratamentos foram 24, 48, 72 e 96 horas. Além dos dados de crescimento médio de *Chlorella vulgaris*, também foi avaliado a taxa crescimento celular (duplicações/dia) e a inibição (%) da clorofila após 96h de exposição. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados são apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Crescimento médio de *Chlorella vulgaris* após 24, 48, 72 e 96h de exposição aos subprodutos de oxidação de MC-LR e dados de inibição de clorofila após 96h de exposição.

Tempo de Exposição	Controle	T1	T2	T3	T4	T5
Crescimento médio (duplicações/dia) cel.mL⁻¹						
24h	2.35 (±0.22)	2.00 (±0.19)	1.80 (±0.27)	1.38 (±0.17)	0.40 (±0.37)	0.17 (±0.05)
48h	2.35 (±0.22)	2.01 (±0.21)	1.68 (±0.47)	1.38 (±1.27)	0.52 (±0.20)	0.17 (±0.02)
72h	2.35 (±0.22)	1.99 (±0.19)	1.94 (±0.18)	1.19 (±0.19)	0.29 (±0.06)	0.07 (±0.06)
96h	2.35 (±0.22)	1.93 (±0.17)	1.66 (±0.40)	1.14 (±0.06)	0.29 (±0,10)	0.00 (±0.00)

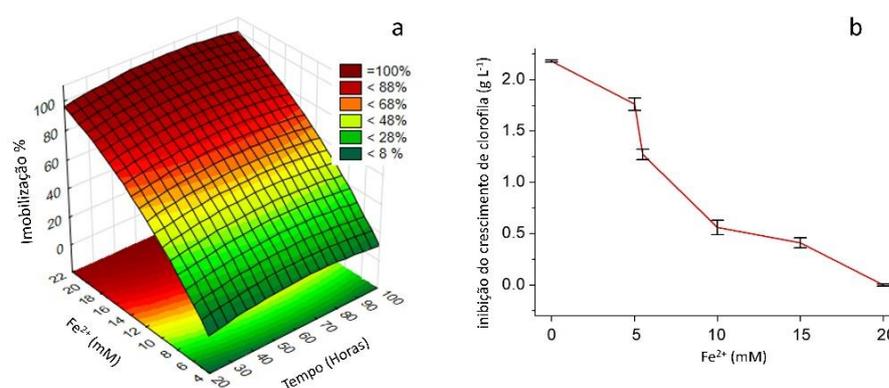
Inibição (%) e ecotoxicidade após 96h de exposição						
Inibição de crescimento (%)	-	2,03	6,14	9,41	13,22	31,03
Teste de Dunnet	-	NS	NS	NS	NS	< 0,01
Ecotoxicidade	-	NT	NT	NT	NT	T

Taxa de incremento (Cl-a/dia) e inibição (%) de clorofila - a ($\mu\text{g.L}^{-1}$) após 96h						
Cl-a/dia	2.18 (± 0.2)	1.76 (± 0.06)	1.27 (± 0.05)	0.56 (± 0.05)	0.41 (± 0.07)	0 (± 0.00)
Inibição (%)	0%	16	43	76	82	100

*NS: Não significado (at 95%); T: Tóxico; NT: Não tóxico.

A taxa média de crescimento do grupo controle foi de 2,35 duplicações/dia. Após todos os tratamentos, as taxas médias de crescimento celular foram menores em relação ao grupo controle (**Tabela 3**). Esse achado aponta para uma possível ação de subprodutos de oxidação agindo como inibidores do crescimento celular de *Chlorella vulgaris*. Tais inferências podem ser levantadas tanto para os dados de crescimento médio *Chlorella vulgaris* quanto nos dados de clorofila. Para T5 houve em média 0,17 duplicação/dia em 24 e 48 h, 0,07 duplicação/dia em 72 h e não houve crescimento em 96 h de exposição. Além disso, os resultados do teste de Dunnet apontaram que as condições existentes no efluente de T5 causaram toxicidade para *Chlorella vulgaris*. Em adição, dos efluentes analisados, a porcentagem de inibição de clorofila – a foi maior que 50% no pós tratamento T3, T4 e T5, conforme dados da **Tabela 3**. A superfície de resposta correspondente ao modelo de regressão é apresentada na **Figura 5**, que também apresenta a curva de inibição de clorofila após 96 horas de exposição os efluentes de T1 a T5.

Figura 5. Superfície de resposta de inibição do crescimento de *Chlorella vulgaris* e curva de inibição de clorofila após 96 horas de exposição



Uma ANOVA (**Tabela S5**) foi realizada fim de quantificar as influências do tempo exposição e do tipo de tratamento nos efeitos tóxicos causados pelos subprodutos de MC-LR à *Chlorella vulgaris*. De acordo com os dados da ANOVA (**Tabela S5**) e da superfície de resposta (**Figura 5**), a um nível de confiança de 95%, o tempo de exposição aos subprodutos de MC-LR não exerceu influência significativa na inibição do crescimento de *Chlorella vulgaris*. Esse resultado indica que o dano causado pela exposição aos subprodutos ocorre principalmente nas primeiras 24 horas. Neste sentido, a exposição continuada -das 24 às 96 horas- não intensificou os efeitos tóxicos de MC-LR sobre *Chlorella vulgaris*. Todavia, os dados demonstraram que o tratamento ao qual MC-LR foi submetido exerceu influência significativa na inibição de crescimento de *Chlorella vulgaris*. A medida que a concentração dos reagentes Fenton aumentaram (de T1 para T5), o que levou a conversão de MC-LR no subproduto de m/z 454, o percentual de inibição do crescimento *Chlorella vulgaris* aumentou expressivamente.

3.4.3 Ecotoxicidade de microcistina-LR em *Daphnia magna*

Na etapa inicial dos testes de toxicidade com *D. magna* foram avaliadas oito diluições de extrato bruto lisado de *Microcystis aeruginosa*, com concentração inicial de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$. A relação entre o percentual de imobilidade de *Daphnia magna* e a concentração de MC-LR segue uma função matemática de potência, conforme apresentado na **Figura 4-b**. Os dados complementares desse ensaio são apresentados na **Tabela S6**.

Todas as diluições obtidas a partir do cultivo lisado de MC-LR mostraram-se tóxicas para *Daphnia magna*, uma vez que todos os percentuais de imobilidade foram superiores a 10%. Para concentrações de MC-LR acima de $2.5 \mu\text{g.L}^{-1}$, o percentual de imobilidade foi de 100%.

O modelo matemático que expressa a relação entre o percentual de imobilidade de *Daphnia magna* em função da concentração de MC-LR ($\mu\text{g.L}^{-1}$) até $2.5 \mu\text{g.L}^{-1}$ é apresentada na Equação 2. O referido modelo resultou em R^2 de 0.99 e o teste de significância da regressão em F-Fisher (1555) significativamente maior que o F crítico (6.60) (ver ANOVA de regressão na Tabela S7).

$$I\%_{(D. magna)} = 4.1[MC - LR]^{0.408} \quad \text{Eq.2}$$

Em que, $I\%_{(D. magna)}$ é a imobilidade percentual de *Daphnia magna*; [MC – LR] é a concentração de MC-LR no extrato lisado. Com base nesse modelo, é possível prever a imobilidade percentual de *D. magna* quando exposta a MC-LR presente na água de estudo ($5 \mu\text{L}^{-1}$), que resultaria em $I\%_{(D. magna)}$ de apenas 7,9%. Neste sentido, o resultado do teste de toxicidade seria não tóxico (mobilidade inferior a 10%).

Sabe-se que, os extratos de cianobactérias afetam organismos do gênero *Daphnia* tanto em exposições agudas, quanto crônicas. Segundo Ferrão-Filho et al. (2014), a captação de microcistinas pelos zooplâncton foram diretamente proporcionais à concentração da toxina nos extratos aquosos, mostrando, portanto, que a ingestão de água contaminada a partir da dissolução da toxina é também um fator determinante para bioacumulação. Em adição, quando as concentrações são subletais, como foi o caso da MC-LR presente na água de estudo ($I\% < 10\%$), pode ocorrer diminuição no crescimento, baixo índice de reprodução, má formação de filhotes, diminuição do tempo de vida, estresse oxidativo e aumento da tolerância às toxinas ao longo de gerações (DAO et al., 2010; ORTIZ-RODRIGUÉZ et al., 2012).

Kosiba et al. (2018) expuseram zooplâncton presentes em lagoas artificiais à microcistinas dissolvidas. Usando uma regressão do modelo linear geral (GLM), o estudo ainda identificou uma relação entre MC-LR dissolvidas e a densidade metazooplankton (ciliados, rotíferos, cladoceros, copépodes), com F de Fisher de calibração (19.5) ligeiramente maior que o F crítico ($\cong 4.001$). Apesar de apresentar os dados da análise estatística, o estudo não apresentou o gráfico da curva com os dados de densidade metazooplankton em função da concentração de MC-LR.

3.4.4 Ecotoxicidade dos subprodutos formados de MC-LR em *Daphnia magna*

Os resultados dos ensaios de toxicidade de MC-LR para *D. magna* são apresentados **Tabela 4**, que também apresenta os resultados dos ensaios para determinar fator de diluição em que a amostra não apresenta toxicidade para *D. magna*, empregando os efluentes de T3, T4 e T5.

Tabela 4. Resultados dos testes de toxicidade após 48 h de exposição de *D. magna* aos subprodutos da oxidação do MC-LR.

Tratamento	Média de imobilidade	Imobilidade (%)	Toxicidade
0	0/20 (\pm 0.0)	0	NT
T1	0/20 (\pm 0.0)	0	NT
T2	0/20 (\pm 0.0)	0	NT
T3	7,6/20 (\pm 3.0)	38,33333	T
T4	12,6/20 (\pm 2.5)	63,33333	T
T5	20/20 (\pm 0.0)	100	T
T3 diluição (FTd 3)			
75%	3/20 (\pm 0.50)	15	T
50%	2/20 (\pm 0.58)	10	T
25%	0/20 (\pm 0.0)	0	NT
12.5%	0/20 (\pm 0.0)	0	NT
6.25%	0/20 (\pm 0.0)	0	NT
T4 diluição (FTd 4)			
75%	6/20 (\pm 0.00)	30	T
50%	4/20 (\pm 0.00)	20	T
25%	2/20 (\pm 1.00)	10	NT
12.5%	1/20 (\pm 0.50)	5	NT
6.25%	1/20 (\pm 0.50)	5	NT
T5 diluição (FTd 8)			
75%	10/20 (\pm 0.58)	50	T
50%	5/20 (\pm 0.50)	25	T
25%	3/20 (\pm 0.50)	15	T
12.5%	2/20 (\pm 0.58)	10	NT
6.25%	2/20 (\pm 0.58)	10	NT

* FTd = Fator de diluição; T: Tóxico; NT: Não Tóxico.

Os efeitos dos subprodutos de oxidação presentes nos efluentes dos tratamentos T1 e T2 não apresentaram toxicidade aguda para *D. magna*. Todavia, os subprodutos presentes em T3, T4 e T5 apresentaram toxicidade significativa para *D. magna*. Em T5, por exemplo, o número de indivíduos imóveis correspondeu a 100% (20/20 indivíduos) para todos os ensaios. Observou-se que o efluente de T3 necessitou de FTd = 3 para tornar-se não tóxico para *D. magna*, seguido por T4 com FTd = 4 e T5 FTd = 8. Apesar do aumento da concentração de reagente Fenton ser progressiva de T3 para T5, foi constatada uma disparidade entre os níveis tóxicos provocados pelos subprodutos presentes nos efluentes de cada tratamento. Essa constatação está alinhada com os resultados obtidos na etapa de caracterização dos subprodutos de oxidação, onde observou-se que a presença do subproduto *m/z* 445 é significativamente mais pronunciada no efluente de T5 que nos demais tratamentos.

3.5 Relação entre a formação dos subprodutos e os testes de toxicidade.

Conforme discutido na sessão anterior, o aumento na concentração do reagente Fenton esteve associada degradação de MC-LR e formação do subproduto de m/z 445. Os dados de modelagem computacional para as moléculas revelaram uma expressiva lipossolubilidade do fragmento m/z 445 ($tPSA = 132.88 \text{ \AA}^2$) em relação MC-LR ($tPSA = 340.64 \text{ \AA}^2$), demonstrando que a cianotoxina é muito mais lipofílica que o principal subproduto obtido nesse estudo. Outros estudos haviam constatado que MC-LR é altamente hidrofílica e não pode penetrar nas membranas celulares por transporte passivo (TESTAI et al., 2016). Nesse sentido, os parâmetros cinéticos e efeitos tóxicos de MC-LR são significativamente diferentes de congêneres e subprodutos mais lipofílicos (DÍEZ-QUIJADA et al., 2018).

Também já foi constatado que os processos de absorção, distribuição de tecido e excreção ocorrem em taxas cinéticas de três a quatro vezes mais rápidas para congêneres lipofílicos de MC-LR (MERILUOTO et al., 1990; TESTAI et al., 2016). Um exemplo já estudado foi a MC-LF, cianotoxina mais lipofílica, que produziu uma redução maior na atividade da proteína fosfatase (PP) do que outros congêneres hidrofílicos (MC-LR e MC-LW), quando aplicados em células neuronais (FEURSTEIN et al., 2010). Isso sugere que MCs lipofílicas são transportadas de forma mais eficiente para a célula e, assim, atinge as concentrações intracelulares inibidoras de PP mais rapidamente do que MC-LR e MC-LW, que são mais hidrofílicas (FEURSTEIN et al., 2010; BULC ROZMAN et al., 2017). Consoante a isso, já foi explicado que variações na estrutura dos MCs alteram sua permeabilidade de membrana (VESTERKVIST et al., 2012), levando a ocorrência de efeitos citotóxicos mais pronunciados do que aqueles de MC-LR em células CaCo-2 intestinais humanas, humanos hepatócitos, células renais embrionárias transfretadas com OATP (FISCHER et al., 2010), e também células cerebrais totais murinas primárias (FEURSTEIN et al., 2009).

Em complementação a essas informações, outros estudos observaram que a presença de subprodutos da oxidação MC-LR não mostrou qualquer atividade tóxica ou inibição da proteína fosfatase após a quebra da ligação dieno da cadeia Adda (FOTIOU et al., 2013; PARK et al., 2017). Isso ocorre, pois a clivagem dessa ligação dieno alivia a toxicidade de MC-LR, uma vez que a referida ligação dupla conjugada no grupo Adda é a responsável pelo efeito tóxico de MC-LR (WELKER e STEINBERG, 1999). Todavia, a ligação dieno de Adda permanece intacta no subproduto de m/z 445 (ver **Tabela S3** do material suplementar).

Em alinhamento a estas informações, os testes de toxicidade indicaram um aumento da taxa de inibição de crescimento de *Chlorella vulgaris* e o aumento na taxa de imobilidade de *D. magna*, quando expostos a efluentes contendo predominantemente o subproduto de m/z 445. Estes achados apontam que o subproduto de m/z 445, oriundo da oxidação de MC-LR, apresenta efeitos mais tóxicos para *Chlorella vulgaris* e *D. magna* que a própria MC-LR. Conforme dados obtidos a partir da modelagem computacional e os fundamentos já relatados em outros estudos, essa maior toxicidade pode estar associada a maior lipossolubilidade do subproduto de oxidação.

Esta tese é sustentada tanto pelos resultados dos ensaios de toxicidade quanto pelos resultados obtidos nas análises de DIMS. As análises demonstraram que a solução controle ($5 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR) não apresentou efeitos tóxicos para a espécie *Chlorella vulgaris* e *D. magna*. Todavia, ao passo que MC-LR foi sendo degradada em condições mais agressivas de oxidação, o subproduto m/z 445 tornou-se o mais abundante no efluente produzido, o que levou a ocorrência de efeitos tóxicos mais severos para *Chlorella vulgaris* e *D. magna*. Isso também é corroborado pela presença da ligação dieno de ADDA com m/z 445, que confere potencial tóxico a esse subproduto.

Vale salientar que testes de degradação de MC-LR já foram realizadas empregando menores dosagens do reagente Fenton (Fe^{2+} 0.9 mM e H_2O_2 0.34 mM), que provocou uma oxidação menos pronunciada da cianotoxina, acarretando na formação de subprodutos com moléculas maiores (m/z 1029.5, 1011.5, 835.5, 795.4 e 783.4) que as encontradas no presente estudo (PARK et al., 2016). A aplicação de outros processos de oxidação como ozonização e fotocatalise heterogênea também resultaram na formação de subprodutos com moléculas maiores ou de m/z próxima à da MC-LR (ZHANG et al., 2012; CHANG et al., 2015). De modo geral, testes de toxicidade para os referidos subprodutos demonstraram que eles não afetam de modo significativo o metabolismo de *Chlorella vulgaris* e *D. magna*, resultando em efeitos não tóxicos (PARK et al., 2016; DAO et al., 2010). Todavia, essas condições brandas de oxidação para MC-LR não levaram a mudanças pronunciadas na topologia de superfície polar, uma vez que a molécula mantém predominantemente sua estrutura original. Essa observação, associada a desnaturação da ligação dieno de ADDA, explica a baixa toxicidade relatada nos estudos citados.

4. CONCLUSÃO

Constatou-se que etapas de coagulação, decantação e filtração não contribuíram para remoção de MC-LR, após oxidação por ação de radicais OH advindos do processo Fenton. A oxidação da toxina desencadeou a formação de subprodutos de oxidação, dos quais o fragmento de m/z 445 foi o mais abundante e persistente à degradação, mantendo a estrutura molecular de ligações dieno, que conferem toxicidade de ADDA. A intensidade de cargas superficiais da molécula do subproduto de m/z 445 (tPSA = 132.88 Å) mostrou-se três vezes menor que a de MC-LR (tPSA = 340.64 Å), revelando que o subproduto é significativamente mais lipossolúvel que a toxina, com coeficiente de partição (n-octanol/água) três vezes maior que o de MC-LR. Testes de ecotoxicidade com *Chlorella vulgaris* e *Daphnia magna* revelaram que um meio contendo predominantemente m/z 445 é potencialmente mais tóxico que o meio com MC-LR. Os resultados corroboraram com a discussão de que congêneres e subprodutos mais lipossolúveis possuem cinética de assimilação superior à de espécies de MCs hidrofílicas- como é o caso da MC-LR, tornando-se potencialmente mais tóxicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abnt. Associação brasileira de Normas Técnicas. NBR 12.648: Ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda - método de ensaio com *Chlorella vulgaris*. Rio de Janeiro, 2016.
- Abnt. Associação brasileira de Normas Técnicas. NBR 12.713: Ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2016.
- APHA, A. W. Standard methods for the examination of water and wastewater. 23 nd. Washington, DC. American Public Health Association. American Water Works Association, Water Pollution control Federation, 2017.
- Bello, M. M., Aziz Abdul Raman, A., & Asghar, A., 2019. A review on approaches for addressing the limitations of Fenton oxidation for recalcitrant wastewater treatment. *Process Safety and Environmental Protection*. 126, 119-140. <http://doi:10.1016/j.psep.2019.03.028>.
- Bulc Rozman, K., Jurič, D. M., & Šuput, D., 2017. Selective cytotoxicity of microcystins LR, LW and LF in rat astrocytes. *Toxicology Letters*. 265, 1–8. <http://doi:10.1016/j.toxlet.2016.11.008>.

- Chang, J., Chen, Z., Wang, Z., Kang, J., Chen, Q., Yuan, L., & Shen, J., 2015. Oxidation of microcystin-LR in water by ozone combined with UV radiation: The removal and degradation pathway. *Chemical Engineering Journal*. 276, 97–105. <http://doi:10.1016/j.cej.2015.04.070>.
- Dao, T. S., Do-Hong, L.-C., & Wiegand, C., 2010. Chronic effects of cyanobacterial toxins on *Daphnia magna* and their offspring. *Toxicol.* 55(7), 1244–1254. <http://doi.org/10.1016/j.toxicol.2010.01.014>.
- Díez-Quijada, L., Prieto, A. I., Guzmán-Guillén, R., Jos, A., & Cameán, A. M., 2018. Occurrence and toxicity of microcystin congeners other than MC-LR and MC-RR: A review. 125, 106-135. *Food and Chemical Toxicology*. <http://doi:10.1016/j.fct.2018.12.042>.
- Fang, Y., Zhang, Y., Ma, W., Johnson, D. M., & Huang, Y., 2014. Degradation of Microcystin-LR in water: Hydrolysis of peptide bonds catalyzed by maghemite under visible light. *Applied Catalysis B: Environmental*, 160-161, 597–605. <http://doi:10.1016/j.apcatb.2014.05.016>.
- Ferrão-Filho, A. S., Herrera, N. A., Echeverri, L. F., 2014. Microcystin accumulation in cladocerans: First evidence of MC uptake from aqueous extracts of a natural bloom sample. *Toxicol.* 87(1), 26–31. <http://doi.org/10.1016/j.toxicol.2014.05.015>.
- Feurstein, D., Kleinteich, J., Heussner, A. H., Stemmer, K., & Dietrich, D. R., 2010. Investigation of Microcystin Congener-Dependent Uptake into Primary Murine Neurons. *Environmental Health Perspectives*, 118(10), 1370–1375. <http://doi:10.1289/ehp.0901289>.
- Fischer, A., Hoeger, S. J., Stemmer, K., Feurstein, D. J., Knobeloch, D., Nussler, A., & Dietrich, D. R., 2010. The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs) in the toxicity of different microcystin congeners *in vitro*: A comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK293 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 245(1), 9–20. <http://doi:10.1016/j.taap.2010.02.006>.
- Godoy, A. A., Oliveira, Á. C. de, Silva, J. G. M., Azevedo, C. C. de J., Domingues, I., Nogueira, A. J. A., & Kummrow, F. (2019). Single and mixture toxicity of four pharmaceuticals of environmental concern to aquatic organisms, including a behavioral assessment. *Chemosphere*. 235, 373–382. <http://doi:10.1016/j.chemosphere.2019.06.200>.
- Jones, J. G. (1979). *A Guide to Methods for Estimating Microbial Numbers and Biomass in Fresh Water*. Ambleside: Freshwater Biological Association Scientific Publication (39).
- Karci, A., Wurtzler, E. M., de la Cruz, A. A., Wendell, D., & Dionysiou, D. D., 2018. Solar photo-Fenton treatment of microcystin-LR in aqueous environment: Transformation products and toxicity in different water matrices. *Journal of Hazardous Materials*. 349, 282–292. <http://doi:10.1016/j.jhazmat.2017.12.071>.

- Kosiba, J., Krztoń, W., & Wilk-Woźniak, E., 2017. Effect of Microcystins on Proto- and Metazooplankton Is More Evident in Artificial Than in Natural Waterbodies. *Microbial Ecology*. 75(2), 293–302. <http://doi:10.1007/s00248-017-1058-z>.
- Li, H., Li, Y., Xiang, L., Huang, Q., Qiu, J., Zhang, H., Sivaiah, M.V, Baron, F., Barrault, J., Petit, S., Valange, S., 2015. Heterogeneous photo-Fenton decolorization of Orange II over Al-pillared Fe-smectite: Response surface approach, degradation pathway, and toxicity evaluation. *J. Hazard. Mater.* 287, 32-41. <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.01.023>.
- Liang, D., Li, N., An, J., Ma, J., Wu, Y., & Liu, H., 2020. Fenton-based technologies as efficient advanced oxidation processes for microcystin-LR degradation. *Science of The Total Environment*. 753, 141809. <http://doi:10.1016/j.scitotenv.2020.1418>.
- Lopes, W. S., Buriti, J. S., Cebalos, B. S. O., Sousa, J. T., Leite, V. D., & Vieira, F. F., 2017. Removal of Microcystin-LR from Drinking Water Using a System Involving Oxidation and Adsorption. *Water, Air, & Soil Pollution*. 228(9), 333. <http://doi:10.1007/s11270-017-3504-4>.
- Ma, M., Liu, R., Liu, H., Qu, J., & Jefferson, W., 2012. Effects and mechanisms of pre-chlorination on *Microcystis aeruginosa* removal by alum coagulation: Significance of the released intracellular organic matter. *Separation and Purification Technology*, 86, 19–25. <http://doi:10.1016/j.seppur.2011.10.015>.
- Maghsoudi, E., Prévost, M., Vo Duy, S., Sauvé, S., & Dorner, S., 2015. Adsorption characteristics of multiple microcystins and cylindrospermopsin on sediment: Implications for toxin monitoring and drinking water treatment. *Toxicon*. 103, 48–54. <http://doi:10.1016/j.toxicon.2015.06.007>.
- Mayumi, T., Kato, H., Imanishi, S., Kawasaki, Y., Hasegawa, M., & Harada, K. 2006. Structural Characterization of Microcystins by LC/MS/MS under Ion Trap Conditions. *The Journal of Antibiotics*. 59(11), 710–719. <http://doi:10.1038/ja.2006.95>.
- Meriluoto, J., Gueimonde, M., Haskard, C. A., Spoof, L., Sjövall, O., & Salminen, S. 2005. Removal of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by human probiotics. *Toxicon*, 46(1), 111–114. <http://doi:10.1016/j.toxicon.2005.03.013>.
- Miles, C. O., Sandvik, M., Nonga, H. E., Rundberget, T., Wilkins, A. L., Rise, F., & Ballot, A., 2013. Identification of microcystins in a Lake Victoria cyanobacterial bloom using LC–MS with thiol derivatization. *Toxicon*, 70, 21–31. <http://doi:10.1016/j.toxicon.2013.03.016>.
- Morón-López, J., Nieto-Reyes, L., Senán-Salinas, J., Molina, S., & El-Shehawy, R., 2019 . Recycled desalination membranes as a support material for biofilm development: A new approach for microcystin removal during water treatment. *Science of The Total Environment*. 647, 785–793. <http://doi:10.1016/j.scitotenv.2018.07.435>.
- Ortiz-Rodriguez, R., Dao, T. S., & Wiegand, C., (2012). Transgenerational effects of microcystin-LR on *Daphnia magna*. *Journal of experimental biology*. 215, 2795-2805. <http://doi.org/10.1242/jeb.069211>.

- Pan, C., Zhang, L., Meng, X., Qin, H., Xiang, Z., Gong, W., Han, X., 2020. Chronic Exposure to Microcystin-LR Increases the Risk of Prostate Cancer and Induces Malignant Transformation of Human Prostate Epithelial Cells. *Chemosphere*. 263, 128295. <http://doi:10.1016/j.chemosphere.2020.12>.
- Park, J.-A., Jung, S.-M., Yi, I.-G., Choi, J.-W., Kim, S.-B., & Lee, S.-H., 2017. Adsorption of microcystin-LR on mesoporous carbons and its potential use in drinking water source. *Chemosphere*. 177, 15–23. <http://doi:10.1016/j.chemosphere.2017.02>.
- Park, J.-A., Yang, B., Kim, J.-H., Choi, J.-W., Park, H.-D., & Lee, S.-H., 2018. 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*. 348, 125–134. <http://doi:10.1016/j.cej.2018.04.190>.
- Park, J.-A., Yang, B., Park, C., Choi, J.-W., van Genuchten, C. M., & Lee, S.-H., 2017. Oxidation of microcystin-LR by the Fenton process: Kinetics, degradation intermediates, water quality and toxicity assessment. *Chemical Engineering Journal*, 309, 339–348. <http://doi:10.1016/j.cej.2016.10.083>.
- Ramos, R. O., Albuquerque, M. V. C., Lopes, W. S., Sousa, J. T., & Leite, V. D. 2020. Degradation of indigo carmine by photo-Fenton, Fenton, H₂O₂/UV-C and direct UV-C: Comparison of pathways, products and kinetics. *Journal of Water Process Engineering*, 37, 101535. <http://doi:10.1016/j.jwpe.2020.101535>.
- Sharma, V. K., Triantis, T. M., Antoniou, M. G., He, X., Pelaez, M., Han, C., Dionysiou, D. D., 2012. Destruction of microcystins by conventional and advanced oxidation processes: A review. *Separation and Purification Technology*. 91, 3–17. <http://doi:10.1016/j.seppur.2012.02.018>.
- Shishido, T. K., Jokela, J., Humisto, A., Suurnäkki, S., Wahlsten, M., Alvarenga, D. O., Fewer, D. P., 2019. The Biosynthesis of Rare Homo-Amino Acid Containing Variants of Microcystin by a Benthic Cyanobacterium. *Marine Drugs*. 17(5), 271. <http://doi:10.3390/md17050271>.
- Su, R. C., Lad, A., Breidenbach, J. D., Kleinhenz, A. L., Modyanov, N., Malhotra, D., Kennedy, D. J., 2020. Assessment of diagnostic biomarkers of liver injury in the setting of microcystin-LR (MC-LR) hepatotoxicity. *Chemosphere*. 257, 127111. <http://doi:10.1016/j.chemosphere.2020.127111>.
- Sum, O.S.N., Feng, J., Hub, X., Yue, P.L., 2005. Photo-assisted Fenton mineralization of an azo dye acid black 1 using a modified laponite clay-based Fe nanocomposite as a heterogeneous catalyst. *Top. Catal.* 33, 233-242. <http://doi.org/10.1007/s11244-005-2532-2>.
- Testai, E., Buratti, F. M., Funari, E., Manganelli, M., Vichi, S., Arnich, N., Sialehaamo, A., 2016. Review and analysis of occurrence, exposure and toxicity of cyanobacteria toxins in food. *EFSA Supporting Publications*, 13(2). <http://doi:10.2903/sp.efsa.2016.en-998>.

- Thees, A., Atari, E., Birbeck, J., Westrick, J. A., & Huntley, J. F., 2018. Isolation and characterization of Lake Erie bacteria that degrade the cyanobacterial microcystin toxin MC-LR. *Journal of Great Lakes Research*. 45(1). <http://doi:10.1016/j.jglr.2018.10.013>.
- Vesterkvist, P., Misiorek, J., Spoof, L., Toivola, D., & Meriluoto, J., 2012. Comparative Cellular Toxicity of Hydrophilic and Hydrophobic Microcystins on Caco-2 Cells. *Toxins*, 4(11), 1008–1023. <http://doi:10.3390/toxins4111008>.
- Wang L.C, Zi, J.M, Xu, R.B, Hilt S, Hou X.L, Chang, X.X. 2017. Allelopathic effects of *Microcystis aeruginosa* on green algae and a diatom: evidence from exudates addition and co-culturing. *Harmful Algae*. 61, 56–62. <http://doi.org/10.1016/j.hal.2016.11.010>.
- Wang, J., & Bai, Z., 2017. Fe-based catalysts for heterogeneous catalytic ozonation of emerging contaminants in water and wastewater. *Chemical Engineering Journal*, 312, 79–98. <http://doi:10.1016/j.cej.2016.11.118>.
- Zhang, H., Huang, Q., Ke, Z., Yang, L., Wang, X., & Yu, Z., 2012. Degradation of microcystin-LR in water by glow discharge plasma oxidation at the gas–solution interface and its safety evaluation. *Water Research*. 46(19), 6554–6562. <http://doi:10.1016/j.watres.2012.09.041>.
- Zhang, L., Dong, H., Li, H., Li, B., Zhao, G., Cai, H., Dong, J., 2021. Novel signal-on immunosensors for rapid and sensitive detection of Microcystin-LR. *Microchemical Journal*. 167, 106295. <http://doi:10.1016/j.microc.2021.106295>.
- Zhang, S., Du, X., Liu, H., Losiewicz, M. D., Chen, X., Ma, Y., Zhang, H., 2021. The latest advances in the reproductive toxicity of microcystin-LR. *Environmental Research*. 192, 110254. <http://doi:10.1016/j.envres.2020.110254>.

MATERIAL SUPLEMENTAR

TABELAS

Tabela S1

Tabela S1. Descrição das configurações da CLAE-EM

Parâmetros	Descrição
Cromatógrafo	
Pré coluna	ULTRA C18 (3 x 2.1 mm)
Coluna	KINETEX C18 (2.6 µm x 100 mm x 2.1 mm)
Gradiente de concentração da Fase móvel	50%/50% H ₂ O/ acetonitrila + 1% (v/v) ácido fórmico (modo isocrático)
Tempo de análise	5 minutos
Volume de injeção da amostra	100 µL
Espectômetro de massas	
Gás	Nitrogênio
Temperatura capilar	350 °C
Detector voltagem	5 kV
Interface	Electrospray ionization (ESI) – modo positivo
Íons monitorados	MC-LR: m/z = 995,5560 (M+1)
Tempo de acumulação de íons no octapolo	Microcistina-LR: 100 milissegundos
Validação do método	
Linearidade	R ² 0.998 para MC-LR 0.1 to 50 µg.L ⁻¹
Precisão dentro da corrida (CV %)	4.95
Precisão(recuperação)	98%
Limite de detecção	0.038 µg.L ⁻¹
Limite de quantificação	0.13 µg.L ⁻¹

Fonte: Albuquerque (2017).

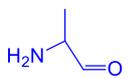
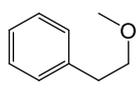
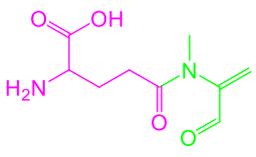
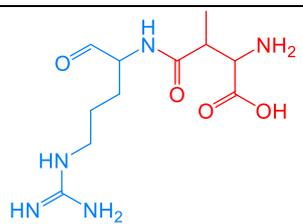
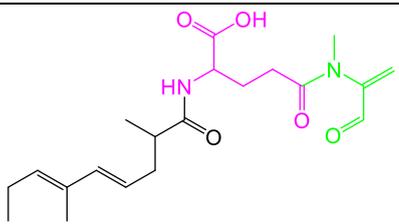
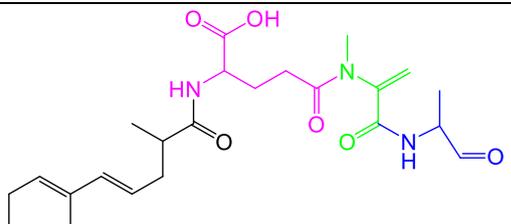
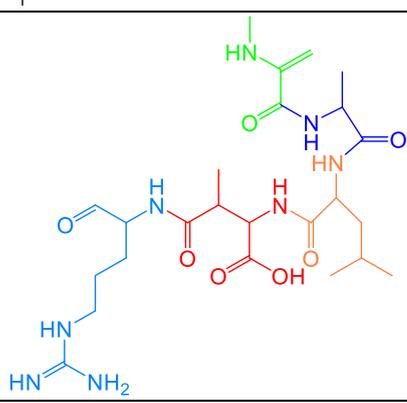
Tabela S2

Tabela S2. Concentrações de cor verdadeira, turbidez e MC-LR obtidas nas etapas de oxidação, decantação e filtração.

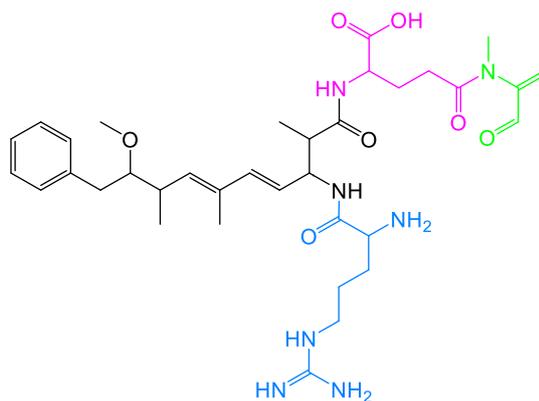
Oxidação					
	Ferro (mg.L⁻¹)	H₂O₂ (mg.L⁻¹)	Cor (Hz)	Turbidez (NTU)	MC-LR (µg.L⁻¹)
T1	5,00	15,00	145,00	131,60	1,13
T2	5,50	16,50	166,00	152,00	2,26
T3	10,00	30,00	287,00	390,00	0,76
T4	15,00	45,00	321,00	793,00	0,47
T5	20,00	60,00	456,00	825,00	0,27
Decantação					
T1	5,00	15,00	64,00	64,00	1,71
T2	5,50	16,50	79,00	29,00	1,02
T3	10,00	30,00	105,00	31,20	0,93
T4	15,00	45,00	176,00	32,50	0,26
T5	20,00	60,00	297,00	35,00	0,31
Filtração					
T1	5,00	17,28	25,00	3,50	1,11
T2	5,50	6,77	21,00	0,09	1,15
T3	10,00	2,87	16,00	0,19	0,68
T4	15,00	0,29	10,00	0,31	0,27
T5	20,00	0,14	3,00	0,19	0,16

Tabela S3

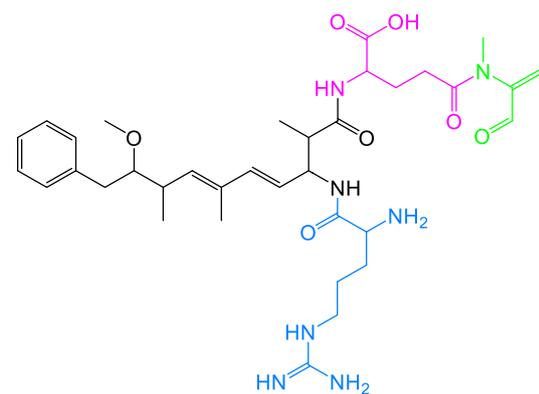
Tabela S3. Fórmulas químicas e estruturas moleculares dos subprodutos de oxidação de MC-LR por Fenton.

<i>m/z</i>	Fórmula química	Peso molecular	Estrutura molecular
69	C ₃ H ₇ NO	73.05	
135	C ₉ H ₁₂ O	136.19	
213	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₄	214.22	
286	C ₁₁ H ₂₁ N ₅ O ₄	278.22	
375	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₅	378.47	
445	C ₂₃ H ₃₅ N ₃ O ₆	449.55	
553	C ₂₄ H ₄₂ N ₈ O ₇	554.65	

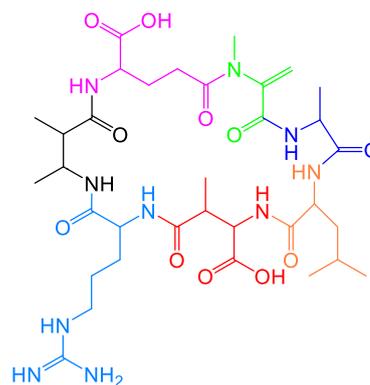
559 $C_{29}H_{46}N_4O_7$ 562.71



682 $C_{35}H_{53}N_7O_7$ 683.65



778 $C_{34}H_{56}N_{10}O_{11}$ 780.68



886 $C_{44}H_{69}N_9O_9$ 868.09

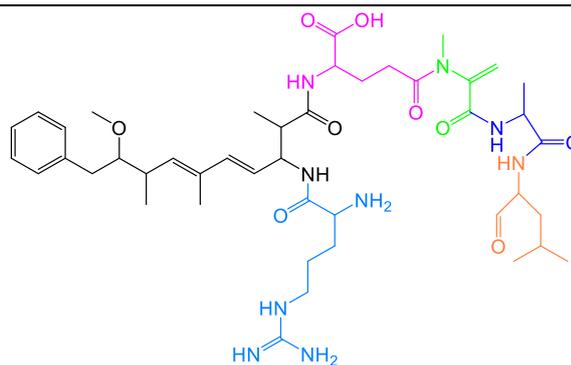


Tabela S4.

Tabela S4. Inibição do crescimento de *Chlorella vulgaris* na exposição ao extrato bruto lisado de *Microcystis aeruginosa*.

Extrato bruto MC-LR ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Inibição de crescimento (%)	Teste de Dunnet	Toxicidade
5000	55,84	< 0,01	T
3750	43,05	< 0,01	T
2500	35,80	< 0,01	T
625	13,04	NS	NT
312,5	10,06	NS	NT
156	7,12	NS	NT
78	3,45	NS	NT

*NS: Não significativo; T: Tóxico; NT: Não tóxico.

Tabela S5

Tabela S5. Dados de ANOVA de modelo de regressão de inibição do crescimento de *Chlorella vulgaris* em função da concentração de MC-LR.

Fontes	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Estimativa de variação (Quadrado médio)
Regressão	2537,598	1,000	2537,598
Erro residual	12,087	5,000	2,417
Total	2549,685	20,000	2540,015
$MS_{\text{Reg}}/MS_{\text{res}}$ R^2	1049,728 0,99	$F_{\text{crítico}}(1/6) = 5.98$	

Tabela S6.

Tabela S6. Resultados dos testes de toxicidade de MC-LR em *D. magna* após 48h de exposição.

Extrato bruto MC-LR ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Indivíduos estáticos/indivíduos expostos	% média de imobilidade	Teste de toxicidade
Controle	0.0/20 (+ 0.0)	0.00	NT
5000	20/20 (+ 0.0)	100.00	T
3750	20/20 (+ 0.0)	100.00	T
2500	20/20 (+ 0.0)	100.00	T
1250	15/20 (+ 0.0)	75.00	T
625	11/20 (+ 0.0)	55.00	T
312,5	9/20 (+ 1.0)	45.00	NT
156	7/20 (+ 0.6)	33.33	NT
78	5/20 (+ 0.6)	23.33	NT

* T: Tóxico; NT: Não-tóxico.

Tabela S7

Tabela S7. Dados ANOVA do modelo de regressão de imobilidade de *Daphnia magna* em função da concentração de MC-LR à exposição de 48h.

Fontes	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Estimativa de variação (Quadrado médio)
Regressão	3996,784	1,000	3996,784
Erro residual	10,279	4,000	2,570
Total	4007,063	20,000	3999,354
$MS_{\text{Reg}}/MS_{\text{res}}$	1555,351	$F_{\text{critical}}(1/5) = 6.60$	
R^2	0,99		

Tabela S8

Tabela S8. Valores obtidos da ANOVA avaliando a influência do tempo de exposição e tipo de tratamento nos efeitos tóxicos causados pelos subprodutos de MC-LR à *Chlorella vulgaris*.

Médias/Intercaladas	Efeito	Std.Erro	t (22)	p	Coef.
Tempo (H)(L)	3.82000	5.163034	0.73988	0.467198	1.91000
Tempo (H)(Q)	4.30222	4.553368	0.94484	0.355001	2.15111
Fe ²⁺ (mM)(L)	73.11556	5.163034	14.16136	0.000000	36.55778
Fe ²⁺ (mM)(Q)	6.46897	4.577282	1.41328	0.171568	3.23448

(L) efeitos em termos lineares; (Q) efeitos em termos quadráticos; R-sqr=.90287; 3(2⁻⁰) planejamento fatorial completo. 3 blocos. 27 corridas; MS Residual=119.9561.

FIGURAS

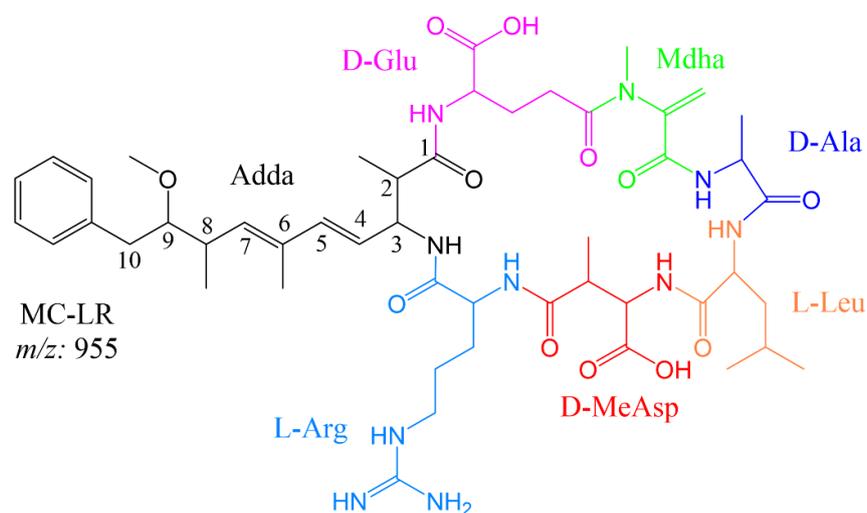


Figura S1 – MC-LR e suas sub-estruturas. Adda ([$(2S,3S,8S,9S)$]-3 amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetil-deca-4(E),6(E)-ácido dienóico), D-glu (D-ácido glutâmico), Mdha (N-metil-decatrolanina), D-ala (D-alanina), L-Leu (L-Leucina), D-MeAsp (D-ácido eritro- β -metaplástico), L-Arg (L-arginina).

Capítulo 5

EFEITOS FITOTÓXICOS DE CIANOTOXINAS E SEUS SOBPRODUTOS DE DEGRADAÇÃO SOBRE AS ESTRUTURAS MORFOLÓGICAS DE *Lactuca sativa L.*

RESUMO

Avaliou-se a fitotoxicidade dos extratos lisados de cianotoxinas sobre a germinação, crescimento do hipocótilo, alongamento radicular e desenvolvimento inicial das plântulas de sementes de alface (*L. sativa*), bem como os subprodutos de MC-LR obtidos após o processo oxidativo Fenton. Para tanto, concentrações de 5,0; 2,05; 0,61 e 1,42 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, para MC-LR, SXT, ATX-A e CYN respectivamente foram obtidas e avaliadas em uma série de diluições para verificação de seus efeitos, obedecendo a metodologia de Sobrero e Ronco (2004) modificadas por Young et al. (2012). Os experimentos de oxidação Fenton foram realizados em equipamento de *Jar test*. O volume de reação foi 2L, com tempo de oxidação de 10 min, pH 7,5 e 400 rpm de agitação. O tempo de floculação foi 10 min, à 40 rpm e pH 8.5. O tempo de sedimentação foi de 10 min. A razão molar de Fe^{2+} : H_2O_2 utilizada foi 1:3. Cada condição de oxidação foi nomeada como um tratamento indo de T1 a T5, com as dosagens de ferro Fe^{2+} (mM) T1 = 5.0; T2 = 5.5; T3 = 10; T4 = 15 e T5 = 20. Considerando as evidências dos efeitos fitotóxicos das cianotoxinas para vegetais superiores, este estudo confirmou que a anatoxina-a, cilindrospermopsina e microcistinas estimularam o sistema antioxidante, inibiu os méritos morfológicos de germinação, radículas, hipocótilo e plântulas. As alterações de efeitos fitotóxicos variaram consideravelmente, tanto nas amostras de cianotoxinas, quanto entre os tratamentos Fenton realizados. A hipótese apresentada foi refutada, uma vez que os extratos lisados das linhagens de cianotoxinas provocaram menos efeitos tóxicos, do que os subprodutos obtidos de sua degradação de MC-LR. Mecanismos moleculares para a absorção não foram elucidados para as cianotoxinas. Uma melhor compreensão desses mecanismos é essencial para ações para melhorar a gestão da proliferação de cianobactérias nocivas, como o desenvolvimento de abordagens eficientes em utilizar plantas que podem acumular cianotoxinas com finalidade fitorremediadora.

Palavras-chave: Cianobactérias; Fitotoxicidade; POAS; Fenton.

ABSTRACT

The phytotoxicity of cyanotoxin lysed extracts on germination, hypocotyl growth, root elongation and early development of lettuce seed seedlings (*L. sativa*), as well as the MC-LR by-products obtained after the Fenton oxidative process, were evaluated in this study. Therefore, concentrations of 5.0; 2.05; 0.61 and 1.42 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, for MC-LR, SXT, ATX-A and CYN respectively, were obtained and evaluated in a series of dilutions to verify their effects, were verification 2004 resolution. modified by Young et al., (2012). Fenton use experiments were performed on test equipment. The reaction reaction was 2L, 2L pH, 2L control and 400 rpm with a speed of 50 min. The flocculation time was 10 min, at 40 rpm and pH 8.5. The settling time was 10 min. The molar ratio of Fe^{2+} : H_2O_2 used was 1:3. Each T2 = 5.5; T3 = 10; T4 = 15 and T5 = 20. Considering the evidence of the phytotoxic effects of cyanotoxins for higher plants, this study confirmed that anatoxin-a, cylindrospermopsin and microcystins stimulated the antioxidant system, inhibited the morphological merits of germination, rootlets, hypocotyl and seedlings. The variations in phytotoxic effects varied considerably, both in the cyanotoxin samples and between the Fenton treatments performed. The presented hypothesis was refuted, since the lysed extracts of the cyanotoxin strains caused less toxic effects than the by-products obtained from their MC-LR degradation. Molecular mechanisms for uptake have not been elucidated for cyanotoxins. A better understanding of these mechanisms is essential for actions to improve the management of the proliferation of harmful cyanobacteria, such as the development of efficient approaches to use plants that can accumulate cyanotoxins for phytoremediation purposes.

Keywords: Cyanobacteria; Phytotoxicity; AOPs; Fenton.

1. INTRODUÇÃO

As cianobactérias são microrganismos fotoautotróficos anaeróbios primitivos, amplamente distribuídos, principalmente em água doce (BURATTI et al., 2017). Sendo fotossintéticas, desempenham um importante papel como produtores primários. Em condições ambientais favoráveis, combinadas com a disponibilidade de nutrientes auxiliam em sua proliferação e a formação de florações, ocasionando graves efeitos ambientais e de saúde (MACHADO et al., 2017; BITTENCOURT- OLIVEIRA et al., 2016).

Certos isolados de cianobactérias pertencentes a espécies específicas, podem produzir uma gama altamente tóxica de metabólitos secundários conhecidos como cianotoxinas. O verdadeiro propósito destas toxinas ainda confunde os estudiosos e limitam a segurança dos recursos hídricos que são usados para consumo humano, recreação, e produção de alimentos (tanto frutos do mar quanto produção agrícola). (CIRÉS et al., 2017; ZANCHETT et al., 2013).

Estudos recentes, têm destacado a importância de compreender a sua presença em terras agrícolas desde uma fração da água doce global potencialmente contaminada e utilizada para práticas agrícolas (LEE et al., 2021). O principal portal de liberação cianotoxinas ao solo é usar água contaminada para fins agrícolas como fertilizantes (MOHAMED et al., 2022). A persistência destes micropoluentes em terras agrícolas pode levar a sérias preocupações devido à sua estabilidade relativa (CORBEL et al., 2014a, 2014b; KLITZKE et al., 2010), o que pode ocasionar efeitos adversos no rendimento das culturas, na qualidade do produto e o acúmulo das mesmas ao longo das cadeias alimentares. Da mesma forma, as colheitas irrigadas com água contaminada podem acumular na cultura plantas em níveis potencialmente prejudiciais para os seres humanos (LEE et al., 2017, 2021).

Dois fatores aumentam ainda mais a biodisponibilidade de cianotoxinas no solo. A introdução de cianotoxinas em terras agrícolas via água de irrigação contaminada (CAO et al., 2018a, 2018b, 2018c; BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2016; DROBAC et al., 2017; LEE et al., 2017) e a menor adsorção de cianotoxinas no solo. Vários estudos relataram a absorção de cianotoxinas pela raiz da planta e a existência em brotos e folhas

(CAMPOS et al., 2021; LEVIZOU et al., 2020; NOWRUZI et al., 2021). Acumulação de cianotoxinas em plantas pode levar à fitotoxicidade mecanismos diferentes, que incluem estresse oxidativo aumentado, inibição de germinação de sementes e crescimento e desenvolvimento de plântulas, inibição da atividade de enzimas reguladoras da planta, danificando os tecidos das plantas e, eventualmente, perecimento das mesmas (MACHADO et al., 2017).

No contexto global dessa problemática surge o desenvolvimento de estratégias e tecnologias simples e de baixo custo para desintoxicar e/ou degradar cianotoxinas. Embora os processos convencionais de tratamento de água, possam remover eficientemente cianobactérias e baixos níveis de várias cianotoxinas, eles não promovem a sua degradação completa. Nas últimas duas décadas, a eficiência relativamente baixa desses métodos deu lugar ao uso de processos oxidativos avançados (POAs), os quais têm apresentado grande eficiência no tratamento de águas eutrofizadas e conseqüentemente na degradação de cianotoxinas e na redução da toxicidade. Todavia, muitos destes processos, avaliam a eficiência de tratamento apenas quanto à redução da concentração do composto, não considerando a toxicidade final dos subprodutos formados.

Nesta premissa, os objetivos deste estudo foram: a) avaliar os efeitos tóxicos dos extratos lisados de linhagens de cianobactérias produtoras de MC-LR, SXT, ATX-A e CYN sobre a germinação de sementes de alface (*L. sativa*), crescimento do hipocótilo, alongamento radicular e desenvolvimento inicial das plântulas. b) verificar a fitotoxicidade dos subprodutos de MC-LR obtidos após o processo oxidativo Fenton.

A hipótese apresentada nesta pesquisa é que os extratos lisados das linhagens de cianotoxinas provocariam mais efeitos nocivos do que os subprodutos obtidos de sua degradação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Química e Sanitária Ambiental (LAQUISA), localizado na Estação Experimental de Tratamento Biológico de Esgotos Sanitários (EXTRABES) pertencente a Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

2.1 Cepas de Cianobactérias

Espécies de cianobactérias produtoras de cianotoxinas foram utilizadas: *Microcystis aeruginosa*, produtora de microcistina-LR (MC-LR/Word Data Center Microorganisms 835), *Raphidiopsis raciborskii* produtora de saxitoxina (SXT/ITEP-A1), gentilmente cedida pela Prof. Dra. Sandra Azevedo do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ; *Dolichospermum solitarium* produtora de anatoxina-a (ATX-A/CIAN05) e *Raphidiopsis raciborskii* produtora de cilindrospermopsina (CYN/CIAR01), esta cedida pelo Laboratório de Ecologia Aquática – LEAQ/UEPB.

Na sala de cultivo de cianobactérias, as cepas estoques foram mantidas em quantidades satisfatórias para a execução dos ensaios, em meio ASM-1 estéril (GORHAM, et al. 1964), pH 7,4, a 22°C e $\sim 310 \mu\text{mol fóton m}^{-2}\text{s}^{-1}$, em fotoperíodo (lâmpadas fluorescentes General Eletric 40 watts) de 12:12 horas (claro/escuro).

2.2 Preparação do extrato bruto de cianobactérias e extração das cianotoxinas

As linhagens de cianobactérias foram cultivadas em sistema fechado aerado em erlenmeyers de 2 L nas condições descritas acima e na fase exponencial de seu crescimento, foram retiradas alíquotas para realização dos ensaios e quantificação das cianotoxinas. Foi considerada a cianotoxina total, ou seja, a soma das frações extracelulares e intracelulares. Para a extração das toxinas, foram realizadas três séries de congelamento e descongelamento das amostras em temperatura -4°C, com o objetivo de provocar a lise celular e consequente liberação da toxina intracelular para o meio extracelular (BROOKE et al., 2006; WANG et al., 2007). Em seguida, a quantificação da microcistina-LR na suspensão de células lisadas foi realizada por (CLAE-EM) por

método validado por Albuquerque (2017), empregando um cromatógrafo UHPLC 3000 e um espectrômetro de massas LCQ Fleet Ion Trap (ambos da Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). As configurações utilizadas para CLAE-EM e as figuras de mérito da validação do método são apresentados na Tabela 1 (anexo). As análises de saxitoxina, anatoxina-a e cilindrospermopsina foram determinadas pelo método Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), utilizando kits em placas Abraxis, Inc (Warminster, Pa), seguindo as instruções do fabricante, com auxílio de um leitor de microplacas ASYS A-5301 (ASYS Hitech GmbH Eugendorf, Áustria). Ao fim, obteve-se concentrações de 5,0; 2,05; 0,61 e 1,42 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para MC-LR, SXT, ATX-A e CYN respectivamente.

2.3 Delineamento Experimental

2.3.1 Teste de fitotoxicidade utilizando as sementes de alface (*Lactuca sativa L.*)

A metodologia adotada para o teste de fitotoxicidade seguiu as recomendações de Sobrero e Ronco (2004) modificadas por Young et al., (2012), conforme descrição na (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo dos requisitos para o ensaio de fitotoxicidade.

Requisitos	Espécie
Organismo-teste	<i>Lactuca sativa L.</i>
Ensaio	Estático
Período de exposição	120h
Água de diluição	água reconstituída
Volume mínimo da solução-teste/recipiente	4 mL
Número de organismos por recipiente-teste	20
Número mínimo de réplicas por solução-teste	Três
Temperatura	22 °C
Fotoperíodo	Escuro
Efeito observado	Inibição na germinação Inibição no alongamento da radícula e hipocótilo.
Expressão do resultado	CE ₅₀ ou CL ₅₀ 0% inibição
Avaliação dos resultados	Análise de variância (ANOVA) e teste de Dunnett (p< 0,05).

Fonte: Sobrero e Ronco (2004) modificadas por Young et al., (2012).

Para realização dos testes de fitotoxicidade, foram utilizadas amostras comerciais de sementes de alface variedade Boston branca (Isla Pak), sem defensivos agrícolas, e taxa de germinação do lote de 98%. Para os ensaios, utilizou-se placas de Petri de 10 cm de diâmetro. Em cada placa foi adicionado um papel filtro qualitativo (marca Unifil, 80 g/m²) e nele adicionados 4 mL de amostra com diluições seriadas (100 à 1,56%) o cultivo lisado de cianobactérias produtoras de MC-LR, SXT, ATX-A e CYN, bem como os efluentes obtidos da degradação de MC-LR por processo Fenton. Em seguida, 20 sementes de alface foram distribuídas de forma equidistantes sobre o papel filtro de forma homogênea. O ensaio foi realizado em triplicata, as placas então foram cobertas com filme plástico, a fim de manter a umidade, e incubadas no escuro em câmara de germinação tipo DBO (marca SOLAB), a uma temperatura constante de 22 ± 2 °C, durante 120 horas. Um controle positivo composto por solução de ZnSO₄ 0,05 N e um controle negativo por água destilada foram preparados nas mesmas condições.

Após o período de incubação, foi verificado o número de sementes germinadas em cada placa, bem como a medição do comprimento das radículas (cm) do hipocótilo de cada uma das plântulas, com auxílio de uma régua. Com estes resultados, foram avaliados o índice de germinação (IG), utilizando as recomendações de Garcia et al. (2009) e o índice de crescimento relativo (ICR) para cada amostra. Foram consideradas para efeito de medida as sementes que apresentaram crescimento radicular maior ou igual a 5 mm. Os dados provenientes das medições, foram utilizados para os cálculos de índice de germinação (IG), conforme equação abaixo:

$$IG \% = \frac{\text{Número de sementes germinadas}}{\text{Número total de sementes}} \times 100$$

O cálculo de inibição de crescimento radicular foi realizado utilizando-se a Equação 2.

$$\% ICR = \frac{(CR_{c(-)} - CR_a)}{(CR_{c(-)})} \times 100$$

Onde:

% ICR: porcentagem de inibição do crescimento radicular (%);

CR_{c (-)}: crescimento radicular no controle negativo (cm);

CR_a: crescimento radicular na amostra (cm).

Os valores obtidos a partir do cálculo do ICR foram utilizados para classificar os efeitos sobre crescimento radicular, considerando os seguintes parâmetros observados na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação dos efeitos fitotóxicos.

Classificação	ICR
Inibição no alongamento de raiz	< 0,8
Sem efeito	>/ 0,8 ou </ 1,2
Estimulação no alongamento de raiz	> 1,2
Classificação	IG (%)
Inibição de germinação	< 90

Fonte: YOUNG et al., 2012

Para a validação do controle negativo de cada ensaio, foram utilizadas as amostras que apresentaram uma taxa de germinação acima de 90% e coeficiente de variação (CV%) baixo, sendo inferior a 30% para crescimento da radícula e hipocótilo (YOUNG et al., 2012). O coeficiente de variação foi calculado para o crescimento da radícula e para a altura do hipocótilo de cada ensaio, através da divisão do desvio padrão pela média, conforme indicado na equação 3.

$$CV [\%] = (\sigma/X) \times 100 \quad 3$$

Onde:

σ = desvio padrão do crescimento da radícula ou hipocótilo (mm);

X = média do crescimento da radícula ou hipocótilo (mm).

2.3.2 Experimentos de degradação Fenton utilizando a MC-LR

A metodologia utilizada para realização dos experimentos de oxidação utilizando reagente Fenton estão apresentados no capítulo 4 desta Tese.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Validação dos controles para os ensaios

A fitotoxicidade das amostras foi analisada em relação à taxa de germinação, crescimento da radícula e hipocótilo das sementes de *Lactuca sativa*. Para o controle negativo, considerou-se as amostras de água pura com taxa de germinação acima de 90% e coeficiente de variação (CV%) inferior ou igual 30% para crescimento da radícula e hipocótilo, como proposto na metodologia elaborada por Young et al. (2012) e Sobrero e Ronco (2004). A Tabela 3 abaixo apresenta os valores de taxa de germinação e CV para água pura dos respectivos ensaios executados.

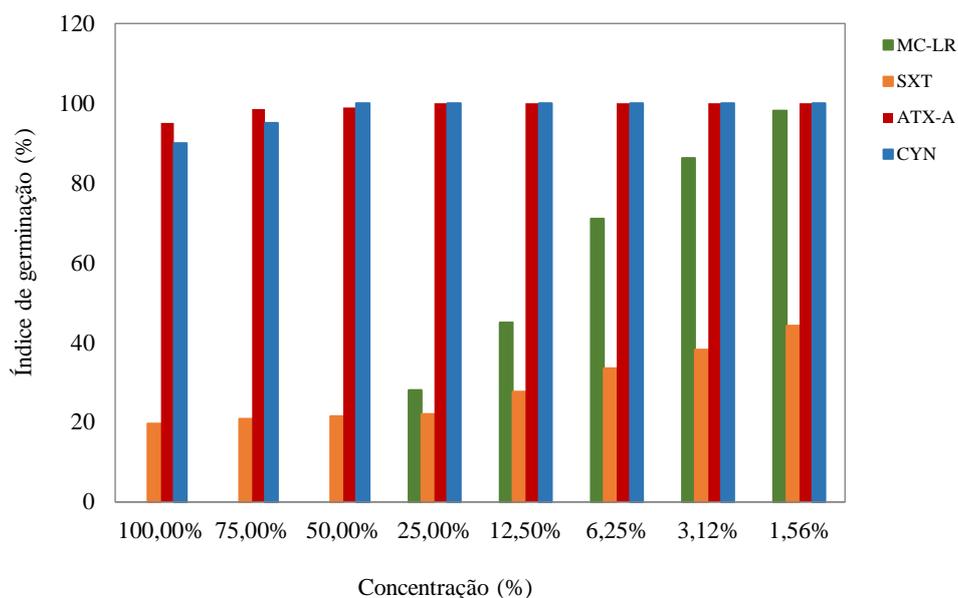
Tabela 3. Taxa de germinação e coeficiente de variação (CV%) do controle negativo.

Taxa de germinação (%)			CV do crescimento da radícula (%)			CV de crescimento do hipocótilo (%)		
Ensaio			Ensaio			Ensaio		
1	2	3	1	2	3	1	2	3
100%	100%	100%	30%	23%	22%	19%	18%	17%

3.2 Índice de germinação (%)

As atividades potenciais dos compostos presentes nas cianobactérias são variadas e pode estar presente dentro (intracelular) e fora da célula (extracelular), através do transporte e/ou lise da célula ou de seu filamento. Aqueles compostos bioativos que têm atividade em sistemas biológicos, podem estar presentes como compostos puros ou como componente de extratos. Sendo assim, considerado um teste estático de toxicidade aguda, através do qual podem ser avaliados os efeitos fitotóxicos que a presença de determinadas substâncias pode vir a ocasionar durante o processo de germinação das sementes e no desenvolvimento das mudas durante os primeiros dias de crescimento. Na Figura 1 estão apresentados os índices de germinação de semente de *Lactuca sativa* de expostas a cianotoxinas presentes em extratos brutos de cianobactérias.

Figura 1. Índice de germinação de semente de *Lactuca sativa* de expostas a cianotoxinas presentes em extratos brutos de cianobactérias.



Os resultados apontaram valores significativos que indicaram efeitos fitotóxicos em relação à taxa de germinação das amostras com diluições seriadas de MC-LR, SXT, ATX-A e CYN. Os índices de germinação em concentrações maiores, permaneceram acima de 90%, oscilando entre 92 e 100% (Figura 1) em ATX-A e CYN, valores que também foram observados no controle negativo com água pura.

Tendo em vista que os resultados nas taxas de germinação não apontam um efeito inibitório das amostras, a variação observada pode ser explicada pela própria variabilidade de germinação natural intrínseca à espécie ou ainda, pela qualidade das sementes utilizadas. De acordo com Sobrero e Ronco (2004), existem amostras com concentração tão baixas de compostos com efeitos tóxicos que não são suficientes para inibir a germinação, fato este expresso nas concentrações de ATX-A e CYN com concentrações iniciais de 0,61 e 1,42 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Porém, podem atrasar ou inibir o processo de alongamento da radícula e hipocótilo.

Nas amostras com a presença de SXT observou-se as menores inibições de sua germinação, que variou entre 44 a 19%. Em amostras com a presença da cianotoxina MC-LR foi observado índices de germinação maior que 50% apenas nas concentrações de 6,25; 3,12 e 1,56 %, resultando também no alto poder tóxico da espécie *Microcystis aeruginosa*.

3.3 Inibição da radícula e do hipocótilo (%)

Uma expressiva variabilidade dos resultados em relação à inibição do alongamento das radículas e hipocótilos, foi observada. Os valores médios de coeficiente de variação encontrados neste estudo foram baseados na classificação de Schmildt et al. (2017), observados na Tabela 1 (anexo). A partir da classificação proposta, foi possível verificar que todos os valores de CV obtidos neste trabalho foram considerados muito altos, sendo superiores a 16% para a altura do hipocótilo e superiores a 9% para o comprimento da radícula. A alta variabilidade desses resultados também é confirmada pelo alto CV obtido nas amostras com água pura.

Tabela 4. Coeficiente de variação (%) dos ensaios em relação ao crescimento da radícula e hipocótilo.

Variável	MC-LR	SXT	ATX-A	CYN
Comprimento da radícula	40	10	34	12
Altura do hipocótilo	17	32	52	49

Os valores de inibição encontrados em cada ensaio podem ser observados nas Figuras 2 e 3, para crescimento do hipocótilo e alongamento da radícula, respectivamente. Apesar da variabilidade, os dados apontam o desenvolvimento do hipocótilo como um fator mais sensível à exposição das amostras em comparação ao crescimento das radículas.

Figura 2. Inibição de crescimento do hipocótilo de *Lactuca sativa* à exposição de diferentes cianotoxinas.

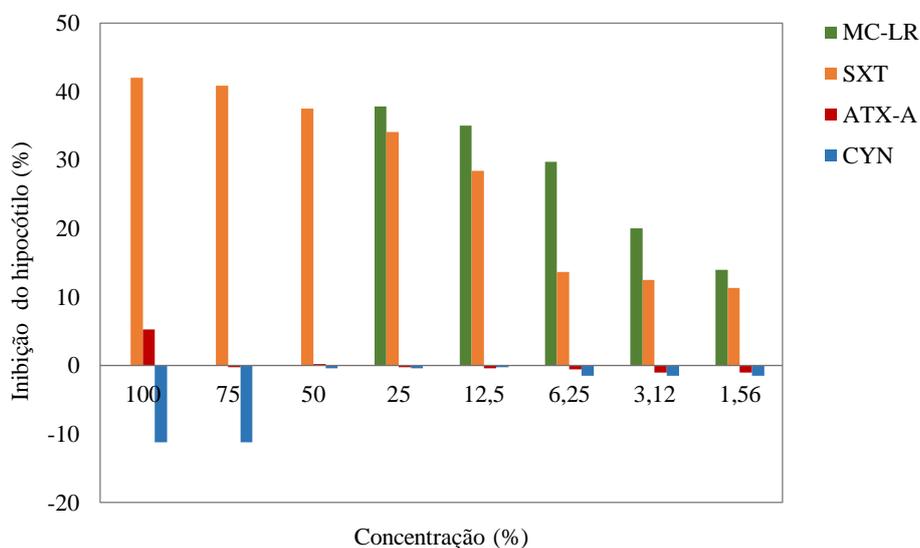
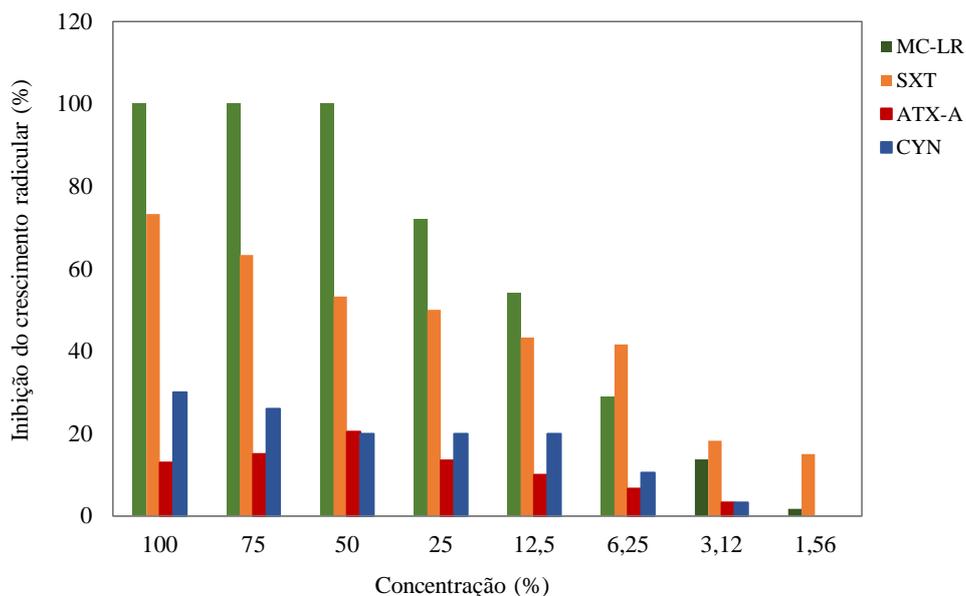


Figura 3. Inibição de crescimento radicular de *Lactuca sativa* à exposição de diferentes cianotoxinas.



Como esperado, a inibição do alongamento da radícula para cianotoxinas com as concentrações mais altas, foram maiores para MC-LR e SXT. Como não houve germinação, consequentemente a exposição de sementes sem diluições, a 75 e 50 % de MC-LR, foram isentas de crescimento radicular (Figura 3), assim como para o crescimento do hipocótilo (Figura 2). Nas amostras com menores diluições de SXT, os valores de inibição de crescimento do hipocótilo e radicular foram elevados, o passo que para o hipocótilo, o valor máximo chega a 42% (Figura 2) e para o crescimento radicular 78% (Figura 3).

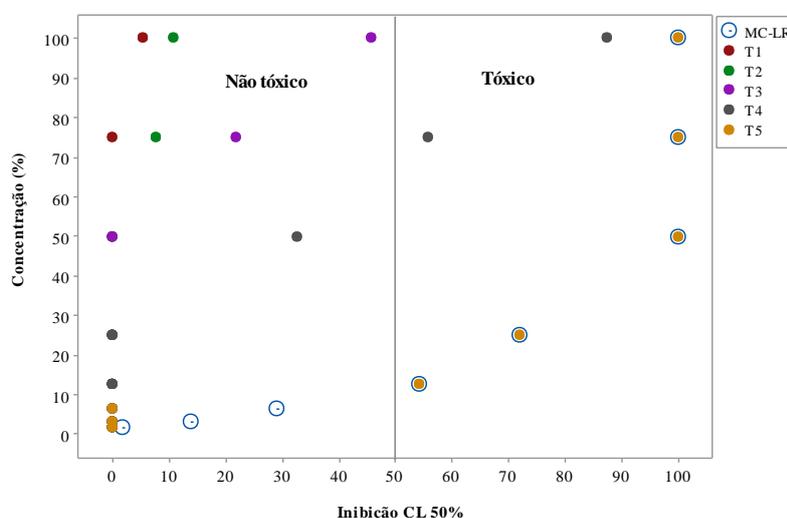
Já os menores valores de inibição do alongamento da radícula para diluições testadas, foram observados para as cianotoxinas ATX-A e CYN quando a menor inibição da radícula atinge 3,3 % e 3,4% à 3,12 % de concentração das amostras, sendo também a menor inibição do hipocótilo, correspondendo a valores -1,03% e -1,53% respectivamente, conforme verificado na Figura 2. Uma inibição negativa significa um desenvolvimento da plântula superior ao controle negativo (água pura), possivelmente devido à nutrientes e matéria orgânica presentes nos cultivos de *Dolichospermum solitarium* e *Raphidiopsis raciborskii* que favoreceram seu crescimento. Os picos de inibição com valores negativos obtidos, também podem ser interpretados como um reflexo da baixa sensibilidade do teste às amostras.

3.4 Avaliação da fitotoxicidade dos subprodutos formados na degradação de microcistina-LR por processo Fenton

Os resultados dos ensaios físico-químicos e de degradação de MC-LR por processo Fenton estão apresentados no capítulo 4. A seguir serão apresentados apenas a avaliação da fitotoxicidade dos subprodutos formados na degradação dessa cianotoxina.

Os dados dos ensaios de fitotoxicidade aguda para o organismo *Lactuca sativa*, com *Microcystis aeruginosa* e o efluente Fenton foram expressos em termos de comparação percentual com relação ao grupo controle. O ensaio de germinação apresentado na Figura 4 evidenciou toxicidade aguda tanto nas amostras de *Microcystis aeruginosa* quanto nas amostras submetidas ao processo Fenton.

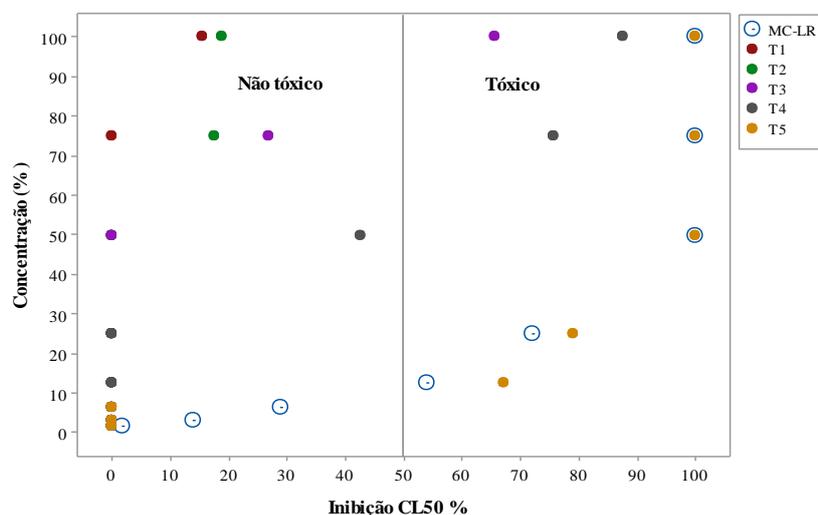
Figura 4. Percentual de inibição de germinação em *L. sativa* exposta a diferentes concentrações de *Microcystis aeruginosa* e efluente Fenton (EF) tratado (valores após a linha direita representam resposta positiva para toxicidade em comparação ao controle).



Nas sementes expostas a *Microcystis aeruginosa* observou-se que em quase todas as concentrações de exposição inibiram a germinação. As sementes quando expostas a uma concentração 50, 75 e 100 % de *Microcystis aeruginosa*, uma inibição de 100% na germinação foi observada, denotando a elevada toxicidade da cepa de cianobactéria (Figura 4). Observando a fitotoxicidade no pós tratamento Fenton, os efluentes obtidos no T5 e T4, com concentração de 75 e 100 % apresentou toxicidade aguda, com inibição também de 100% de germinação. Das oito diluições testadas no T5, cinco apresentaram toxicidade, expressando o potencial tóxico dos subprodutos de reação.

A presença de toxicidade aguda nas amostras *Microcystis aeruginosa* e o efluente Fenton também foi constatada com a avaliação do crescimento radicular, como pode ser observado na Figura 5.

Figura 5. Percentual de inibição do crescimento radicular em *L. sativa* exposta a diferentes concentrações de *Microcystis aeruginosa* e efluente Fenton (T) tratado (valores após a linha a direita representam resposta positiva para toxicidade em comparação ao controle).



Observando os dados advindos da Figura 5, o crescimento radicular das sementes expostas a *Microcystis aeruginosa* foram influenciados conforme concentração avaliada. Das oito concentrações testadas, cinco concentrações apresentaram inibição CL50%. Sabe-se que o crescimento radicular pode estar relacionado ao bloqueio da ação de citocina e auxina, fitormônios que influenciam em processos de desenvolvimento, como ativação de genes, taxas de expansão e divisão celular (RAVEN et al., 2014). Além da microcistina-LR, outra possível fonte de toxicidade é o lipolissacarídeo, presente na parede celular de *M. aeruginosa*, sendo um provável desregulador osmótico (BEST et al., 2013).

Foi verificado ainda, que apenas a exposição das sementes nos efluentes dos T1 e T2 não apresentaram inibição de crescimento radicular. Das oito diluições observadas do T5, cinco apresentaram toxicidade (Figura 5). Em *Lactuca sativa* foram observados efeitos sobre o crescimento radicular, uma vez que o ICR dos tratamentos de 3 a 5 ficou dentro da faixa considerada com efeito (ICR < 0,8) (YOUNG et al., 2012). Segundo Salvatore et al. (2008), a inibição do crescimento radicular depende de alguns fatores,

como: tipo de amostra, concentração e espécies testadas. Esses fatos, também explicam a presença de efeitos inibitórios do extrato bruto sobre as radículas de *Lactuca sativa* L.

Os mecanismos de absorção e metabolização de microcistina-LR, presente no extrato bruto, tem como principal atuação o gene *mlrA* (microcistinase), que é uma metaloprotease, considerado a enzima mais importante do mecanismo de metabolização de microcistina, pois a estrutura cíclica promove estabilidade contra outras proteases e outros fatores químicos. Porém, sabe-se que as enzimas glutathione S-transferase e glutathione peroxidase funcionam como agentes de desintoxicação e defesa contra xenobióticos. Desta maneira, infere-se que a microcistina-LR ou outros subprodutos presentes no extrato podem ser oxidados por estas enzimas, sendo metabolizados pelas plântulas (BOURNE et al., 2001).

Em complementação a essas informações, estudos como realizados por Freitas et al. (2015) que avaliaram os efeitos de concentrações ambientalmente relevantes (1, 10 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$) de MC-LR, CYN e uma mistura MC-LR / CYN no crescimento de *Lactuca sativa* e observaram em quase todos os tratamentos um aumento no peso fresco da raiz. No entanto, verificou-se ainda que, o peso fresco das folhas diminuiu significativamente nas plantas expostas a 100 concentrações de $\mu\text{g. L}^{-1}$ de cada toxina e da sua mistura. Os resultados sugerem que a *Lactuca sativa* em estágios não iniciais de desenvolvimento são capazes de lidar com concentrações mais baixas de MC-LR, CYN e da mistura MC-LR/CYN, porém concentrações mais altas (100 $\mu\text{g. L}^{-1}$) podem afetar o rendimento da alface e a qualidade nutricional do mesmo.

Levizou et al. (2020) investigaram o efeito da água de irrigação rica em microcistinas (MCs) em alface de diferentes estágios de desenvolvimento, desde a germinação das sementes até a colheita em tamanho comercial da planta. Foram avaliados quatro grupos de *L. sativa* que receberam água enriquecida de MCs (1,81 $\mu\text{g. L}^{-1}$), obtidas do reservatório de Karla, na Grécia central: 1) a partir de sementes, 2) o cotilédone, 3) duas folhas verdadeiras e 4) quatro estágios de folhas verdadeiras. Ocorreu um acúmulo considerável de MCs em vários tecidos vegetais. Quanto mais cedo as plantas de alface começaram a receber água rica em MCs, mais MCs acumularam nas raízes e folhas. Os cotilédones apresentaram concentrações de MCs duplicadas em comparação com os respectivos tecidos do grupo 4 folhas. Além disso, as raízes acumularam quantidades significativamente maiores de MCs do que as folhas do mesmo grupo de plantas.

Um estudo de campo de 120 dias foi realizado por Cao^a et al. (2018) e observaram a bioacumulação de congêneres de microcistina (MC) em um sistema solo-planta, bem como o risco à saúde humana ao consumir plantas comestíveis irrigadas com água contaminada por MCs. A água do lago apresentava florações de cianobactérias naturais. As maiores concentrações de MCs detectadas nos solos, raízes e folhas de alface foram 24,8 (MC-LR 10,1, MC-RR 10,5, MC-YR 4,2) $\mu\text{.kg}^{-1}$, 424 (MC-LR 168, MC-RR 194, MC-YR 61,5) $\mu\text{.kg}^{-1}$ e 183 (MC-LR 78,0, MC-RR 76,8, MC-YR 28,1) $\mu\text{.kg}^{-1}$, respectivamente). Os resultados obtidos com os indicadores de crescimento sugerem que a bioacumulação de MCs em plantas comestíveis não está necessariamente associada a efeitos fitotóxicos.

Ainda no tocante aos resultados obtidos neste estudo em relação cianotoxina avaliada com a literatura, foram parecidos com o de Llana-Ruiz-Cabello e colaboradores (2019), que investigaram a suscetibilidade de espinafre e alface, sobre diferentes concentrações de microcistinas (MC) e cilindrospermopsina (CYN), individualmente e em mistura que cultivaram dois vegetais em hidroponia, sob condições controladas, por 21 dias em meio nutriente dopado com MC, CYN a 10 e 50 $\mu\text{g. L}^{-1}$, e em mistura CYN / MC a 5 + 5 $\mu\text{g. L}^{-1}$ e 25 + 25 $\mu\text{g. L}^{-1}$. O estudo revelou inibição do crescimento da parte aérea (folhas) em ambas as espécies quando tratadas com 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de mistura MC, CYN e CYN / MC. A cianotoxina MC mostrou ser mais prejudicial ao crescimento das plantas do que o CYN. Além disso, o crescimento das folhas de espinafre foi inibido pelas misturas de 5 + 5 e 25 + 25 $\mu\text{g. L}^{-1}$ CYN / MC, enquanto o crescimento das folhas de alface foi inibido apenas pela mistura de 25 + 25 $\mu\text{g. L}^{-1}$ CYN / MC. As plantas expostas à mistura CYN / MC apresentaram acúmulo diferencial de CYN e MC.

No que se refere ao crescimento médio das plântulas, houve variação de acordo com o percentual de amostra utilizado, onde soluções menos concentradas possibilitaram um maior desenvolvimento das mesmas, aproximando-se ao valor obtido para a amostra controle. Após o tratamento Fenton, observou-se uma redução na toxicidade de microcistina – LR para os tratamentos T1 e T2 (Tabela 5).

Na Tabela 5 encontram-se os valores médios de crescimento das plântulas de *L. sativa* expostas a concentrações crescentes do cultivo lisado de *Microcystis aeruginosa* antes e após o tratamento Fenton.

Tabela 5. Crescimento médio das plântulas de *Lactuca sativa* expostas a diferentes concentrações de *Microcystis aeruginosa* e efluente Fenton.

Amostra	% amostra	Crescimento médio das plântulas (cm)
Controle negativo	0,00	5,07
<i>Microcystis aeruginosa</i> (MC-LR)	1,56	3,45
	3,12	2,63
	6,25	2,04
	12,5	1,92
	25,0	1,82
	50,0	1,51
	75,0	1,01
	100	0,71
Efluente Fenton	T1	3,21
	T2	4,42
	T3	0,0
	T4	0,0
	T5	0,0

Comparando-se o crescimento médio das plântulas obtidos quando expostas a 100 % da amostra para o cultivo lisado de *Microcystis aeruginosa* e tratado, foi verificado um aumento no crescimento da plântula de 77,8% e 83,9 % expostas aos efluentes Fenton do T1 e T2, respectivamente. Estes resultados indicam que o tratamento oxidativo Fenton aplicado a microcistina-LR apresentam limitações quanto à eliminação de compostos fitotóxicos. Os subprodutos produzidos dos demais tratamentos (T3, T4 e T5) provocaram efeitos tóxicos, inibindo o crescimento das plântulas.

4. CONCLUSÃO

Considerando as evidências dos efeitos fitotóxicos das cianotoxinas para vegetais superiores, este estudo confirmou que a anatoxina-a, cilindrospermopsina e microcistinas

estimularam o sistema antioxidante, inibiu os méritos morfológicos de germinação, radículas, hipocótilo e plântulas. As alterações de efeitos fitotóxicos variaram consideravelmente, tanto nas amostras de cianotoxinas, quanto entre os tratamentos Fenton realizados. A hipótese apresentada nesta pesquisa foi refutada, uma vez que os extratos lisados das linhagens de cianotoxinas provocaram menos efeitos tóxicos, do que os subprodutos obtidos de sua degradação de MC-LR.

Fatores como concentração e tempo de exposição de cianotoxinas, estrutura e formas químicas de cianotoxinas, fontes de padrões de cianotoxinas e características dos sistemas hidropônicos e subprodutos pós tratamento oxidativo são fontes potenciais de variabilidade que podem afetar a fitotoxicidade e a capacidade de bioacumulação de cianotoxinas, logo deverão ser observados em próximos estudos.

Mecanismos moleculares para a absorção não foram elucidados para as cianotoxinas e pós tratamento. Uma melhor compreensão desses mecanismos é também essencial para ações em melhorar a gestão da proliferação de cianobactérias nocivas, como o desenvolvimento de abordagens eficientes em utilizar plantas que podem acumular cianotoxinas com finalidade fitorremediadora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, M.V.C. Avaliação da degradação de microcistina-LR no tratamento de água de abastecimento em sistema convencional seguido por processos oxidativo avançado (POA). 2017. 129 p. **Dissertação** (Mestrado). Programa de Pós graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Estadual da Paraíba.

BEST, J. H. Effects of Microcystis cells, cell extracts and lipopolysaccharide on drinking and liver function in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. **Aquatic Toxicology**. v. 64 p. 419-426. 2013.

BURATTI, F.M.; MANGANELLI, M.; VICHI, S.; STEFANELLI, M.; SCARDALA, S.; TESTAI, E.; FUNARI, E. Cyanotoxins: Producing organisms, occurrence, toxicity, mechanism of action and human health toxicological risk evaluation. **Arch. Toxicol.** 2017, 91, 1049–1130.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. DO C.; CORDEIRO-ARAÚJO, M.K.; CHIA, M.A., ARRUDA-NETO, J.D. DE T.; OLIVEIRA, E. T. DE, SANTOS, F. DOS, 2016. Lettuce irrigated with contaminated water: photosynthetic effects, antioxidative response and bioaccumulation of microcystin congeners. **Ecotoxicology. Environ. Saf.** 128, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.014>.

BOURNE, D. G., JONES, G. J., BLAKELEY, R. L., JONES, A., NEGRI, A. P., & RIDDLES, P. (2001). Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. **Applied and Environmental Microbiology**, 62(11), 4086–4094.

CAMPOS, A.; MAHDI REDOUANE, E.; FREITAS, M.; AMARAL, S.; AZEVEDO, T., LOSS, L.; MATHÉ, C.; MOHAMED, Z.A.; OUDRA, B., VASCONCELOS, V., BARCELÓ, J., 2021. Impacts of Microcystins on Morphological and Physiological Parameters of Agricultural Plants: **A Review**. <https://doi.org/10.3390/plants10040639>.

CAO^a, Q.; STEINMAN, A.D.; WAN, X., XIE, L., 2018a. Bioaccumulation of microcystin congeners in soil-plant system and human health risk assessment: a field study from Lake Taihu region of China. **Environ. Pollut.** 240, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.067>.

CAO^b, Q.; STEINMAN, A.D.; WAN, X., XIE, L., 2018b. Combined toxicity of microcystin-LR and copper on lettuce (*Lactuca sativa L.*). **Chemosphere** 206, 474–482. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.051>.

CAO^c, Q.; REDISKE, R.R.; YAO, L.; XIE, L., 2018c. Effect of microcystins on root growth, oxidative response, and exudation of rice (*Oryza sativa*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 149, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.020>.

CIRÉS, S.; CASERO, M.C.; QUESADA, A., 2017. Toxicity at the edge of life: a review on cyanobacterial toxins from extreme environments. **Mar. Drugs** 15 (7), 1–18. <https://doi.org/10.3390/md15070233>

CORBEL, S.; BOUAÏCHA, N.; MOUGIN, C., 2014a. Dynamics of the toxic cyanobacterial microcystin-leucine-arginine peptide in agricultural soil. **Environ. Chem. Lett.** 12 (4), 535–541. <https://doi.org/10.1007/s10311-014-0482-2>.

CORBEL, S., MOUGIN, C., BOUAÏCHA, N., 2014b. Cyanobacterial toxins: modes of actions, fate in aquatic and soil ecosystems, phytotoxicity and bioaccumulation in agricultural crops. **Chemosphere** 96, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.056>

DROBAC, D., TOKODI, N., SIMEUNOVIĆ, J., BALTIĆ, V., STANIĆ, D., SVIRĀCEV, Z., 2013. Human exposure to cyanotoxins and their effects on health. **Arh. Hig. Rad. Toksikol.** 64 (2), 305–316. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-64-2013-2320>.

FREITAS, M., CAMPOS, A., AZEVEDO, J., BARREIRO, A., PLANCHON, S., RENAUT, J., & VASCONCELOS, V. (2015). Lettuce (*Lactuca sativa L.*) leaf-proteome profiles after exposure to cylindrospermopsin and a microcystin-LR/cylindrospermopsin mixture: A concentration-dependent response. **Phytochemistry**, 110, 91–103. [doi:10.1016/j.phytochem.2014.12.004](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.12.004).

GARCIA, J. C., SIMIONATO, J. I., ALMEIDA, V. DE C., PALÁCIO, S. M., ROSSI, F. L., SCHNEIDER, M. V., & SOUZA, N. E. DE. (2009). Evolutionary follow-up of the photocatalytic degradation of real textile effluents in TiO₂ and TiO₂/H₂O₂ systems and their toxic effects on *Lactuca sativa* seedlings. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 20(9), 1589–1597. [doi: 10.1590/s0103-50532009000900005](https://doi.org/10.1590/s0103-50532009000900005).

KLITZKE, S., APELT, S., WEILER, C., FASTNER, J., CHORUS, I., 2010. Retention and degradation of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in sediments - The role of sediment preconditioning and DOM composition. **Toxicon**. 55 (5), 999–1007. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.036>.

LLANA-RUIZ-CABELLO, M., JOS, A., CAMEÁN, A., OLIVEIRA, F., BARREIRO, A., MACHADO, J., ... FREITAS, M. (2019). Analysis of the Use of Cylindrospermopsin and/or Microcystin-Contaminated Water in the Growth, Mineral Content, and Contamination of *Spinacia oleracea* and *Lactuca sativa*. **Toxins**, 11(11), 624. doi:10.3390/toxins11110624

LEE, S.; JIANG, X.; MANUBOLU, M.; RIEDL, K.; LUDSIN, S.A.; MARTIN, J.F.; LEE, J., 2017. Fresh produce and their soils accumulate cyanotoxins from irrigation water: implications for public health and food security. **Food Res. Int.** 102 (September), 234–245. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.079>.

LEE, S.; KIM, J.; LEE, J. 2021. Colonization of toxic cyanobacteria on the surface and inside of leafy green: a hidden source of cyanotoxin production and exposure. **Food Microbiol.** 94, 103655. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103655>

LEVIZOU, E.; PAPADIMITRIOU, T.; PAPAVALASILEIOU, E.; PAPADIMITRIOU, N.; KORMAS, K.A., 2020. Root vegetables bioaccumulate microcystins-LR in a developmental stage-dependent manner under realistic exposure scenario: the case of carrot and radish. **Water Manag Agric.** 240 <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106274>

MACHADO, J.; CAMPOS, A.; VASCONCELOS, V.; FREITAS, M., 2017. Effects of microcystin-LR and cylindrospermopsin on plant-soil systems: a review of their relevance for agricultural plant quality and public health. **Environ. Res.** 153, 191–204. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.09.015>. September 2016.

MOHAMED, Z., BAKR, A., CAMPOS, A., VASCONCELOS, V., NASR, S.A.-M., 2022. Growth inhibition and microcystin accumulation in bush bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plant irrigated with water containing toxic *Chroococcus minutus*. **Agric. Water Manag.** 261, 107381. <https://doi.org/10.1016/J.AGWAT.2021.107381>.

NOWRUZI, B., BOUAÏCHA, N., METCALF, J.S., PORZANI, S.J., KONUR, O., 2021. Plantcyanobacteria interactions: beneficial and harmful effects of cyanobacterial bioactive compounds on soil-plant systems and subsequent risk to animal and human health. **Phytochemistry** 192. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112959>.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. *Biologia Vegetal*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 2014. 876 p.

SALVATORE, M. D. et al. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. **Chemosphere**. v. 73 p. 1461-1464. 2008.

SCHMILDT, E. R. et al. Coeficiente de variação como medida da precisão em experimentos de alface. **Revista Agro@ambiente On-line**, [S. l], v. 11, n. 4, p.290-295, 2017. doi:<http://dx.doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v11i4.4412>.

SOBRERO, M. S.; RONCO, A. Ensayo de Toxicidad aguda con semillas de lechuga. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad del Agua: **Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. Ottawa, IDRC, p. 71-79. 2004.

YOUNG, B.; RIERA, N.; BEILY, M.; BRES, P.; CRESPO, D.; RONCO, A. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 182-186, 2012. doi: [10.1016/j.ecoenv.2011.09.019](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.09.019)

ZANCHETT, G.; OLIVEIRA-FILHO, E.C., 2013. Cyanobacteria and cyanotoxins: from impacts on aquatic ecosystems and human health to anticarcinogenic effects. **Toxins**. 5 (10), 1896–1917. <https://doi.org/10.3390/toxins5101896>.

ANEXOS

Tabela 1. Descrição das configurações da CLAE-EM.

Parâmetros	Descrição
Cromatógrafo	
Pré coluna	ULTRA C18 (3 x 2.1 mm)
Coluna	KINETEX C18 (2.6 µm x 100 mm x 2.1 mm)
Gradiente de concentração da Fase móvel	50%/50% H ₂ O/ acetonitrila + 1% (v/v) ácido fórmico (modo isocrático)
Tempo de análise	5 minutos
Volume de injeção da amostra	100 µL
Espectômetro de massas	
Gás	Nitrogênio
Temperatura capilar	350 °C
Detector voltagem	5 kV
Interface	Electrospray ionization (ESI) – modo positivo
Íons monitorados	MC-LR: m/z = 995,5560 (M+1)
Tempo de acumulação de íons no octapolo	Microcistina-LR: 100 milissegundos
Validação do método	
Linearidade	R ² 0.998 para MC-LR 0.1 to 50 µg.L ⁻¹
Precisão dentro da corrida (CV %)	4.95
Precisão(recuperação)	98%
Limite de detecção	0.038 µg.L ⁻¹
Limite de quantificação	0.13 µg.L ⁻¹

Fonte: Albuquerque (2017).

Quadro 1. Faixas de classificação dos valores de CV (%) propostas por Schmildt et al. (2017).

Variável	Baixo	Médio	Alto	Muito Alto
AH	$CV \leq 5,00$	$5,00 < CV \leq 5,60$	$5,60 < CV \leq 10,90$	$CV > 10,90$
CR	$CV \leq 10,80$	$10 < CV \leq 21,48$	$21,48 < CV \leq 26,82$	$CV > 26,82$

Nota: (AH) altura do hipocótilo; (CR) comprimento da radícula.

CONCLUSÃO GERAL

A partir dos resultados apresentados, pôde-se concluir que:

- O processo Fenton empregado em escala de bancada, proporcionou alterações nos parâmetros físico-químicos e biológicos, tornando a qualidade de água tratada compatível com os limites estabelecidos pela Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021. A melhor dosagem do reagente Fenton para a água em estudo, foi de 20 mM de (FeSO₄.7H₂O) e 60mM de (H₂O₂) que contribuiu para redução em 99 % de turbidez e 99,9% de cor verdadeira e 96% de MC-LR. Estes resultados evidenciam o ótimo potencial de oxidação apresentado pelo processo de Fenton;
- Os dados de modelagem molecular computacional para os subprodutos de degradação identificados, apresentaram subprodutos lipofílicos e hidrofílicos sendo este mais facilmente degradados, enquanto os subprodutos mais lipossolúveis possuem cinética de assimilação superior, tornando-se potencialmente mais tóxicos;
- Nos dados advindos dos ensaios de toxicidade crônica empregando a microalga *Chlorella vulgaris*, foi observado que com o aumento da concentração do reagente Fenton, a porcentagem de inibição da microalga aumentou em relação ao controle, confirmando os efeitos crônicos causados pela amostra. Para toxicidade aguda em *D. magna*, após 48 horas de exposição, o efluente Fenton do último tratamento realizado foi considerado levemente tóxico para as *Daphnias* com CE₅₀ correspondente a 36,91;
- Observando o crescimento médio das plântulas de *Lactuca sativa*, houve variação de acordo com o percentual de amostra utilizado, onde soluções menos concentradas possibilitaram um maior desenvolvimento das mesmas, aproximando-se ao valor obtido para a amostra controle. Após o tratamento Fenton, observou-se uma redução na toxicidade de microcistina – LR para os tratamentos T1 e T2.

Comparando-se o crescimento médio das plântulas, obtidos quando expostas a 100 % da amostra para o cultivo lisado de *Microcystis aeruginosa* e tratado, estes

resultados indicam que o tratamento oxidativo Fenton aplicado a microcistina-LR apresentam restrições quanto à eliminação de compostos fitotóxicos;

- Apesar da não realização do processo Fenton para degradação das demais cianotoxinas, o estudo toxicológico e oxidativo promoveu a determinação de efeitos deletérios destes micropoluentes orgânicos, possibilitando a verificação das características ecotoxicológicas, mecanismos de ação sobre organismos vivos, definição de diretrizes para controle da qualidade dos efluentes eutrofizados. Os resultados demonstraram que os metabólitos secundários produzidos por diferentes cianobactérias, trazem uma série de impactos a toda cadeia trófica.

Dessa forma, frente ao aumento expressivo de corpos hídricos eutrofizados, o estudo dos efeitos alelopáticos e ecotoxicidade ocasionados por cianotoxinas e tratamento para remoção das mesmas, se torna cada vez mais significativo.

RECOMENDAÇÕES

Diante do trabalho desenvolvido, considera-se que ainda existem aspectos pertinentes a avaliação dos efeitos tóxicos de cianotoxinas e os subprodutos formados de sua degradação por processos oxidativos avançados, que merecem ser investigados, portanto recomendam-se:

- Examinar os possíveis efeitos alelopáticos entre as cianobactérias, realizando através de cultivos mistos com células intactas;
- Avaliar efeitos crônicos de diferentes concentrações de microcistina-LR, saxitoxina, anatoxina-a e cilindrospermospina, sobre os parâmetros mobilidade, fecundidade, idade da primeira reprodução e sobrevivência de *Daphnia magna*.
- Também é aconselhável a utilização de outros ensaios de toxicidade, que apresentem maior sensibilidade às amostras de água, como por exemplo a utilização de peixes objetivando resultados mais precisos, e favorecer uma melhor avaliação da bioacumulação destes micropoluentes orgânicos;
- Realizar ensaios de degradação Fenton para saxitoxinas, anatoxina-a e cilindrospermospina, tal como identificar e avaliar a ecotoxicidade dos subprodutos intermediários gerados por modelagem molecular computacional;
- Aumentar o número de repetições dos ensaios de fitotoxicidade, de modo a se reduzir os coeficientes de variação e assegurar maior precisão dos resultados.