

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

MARIANA DE ALMEIDA TORRES

**AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA* KÜTZING E  
DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA-LR POR PROCESSO FOTO-  
FENTON**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CURITIBA

2016

MARIANA DE ALMEIDA TORRES

**AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA* KÜTZING E  
DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA-LR POR PROCESSO FOTO-  
FENTON**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental – PPGCTA – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Adriane Martins de Freitas

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Lucia Regina Rocha Martins

CURITIBA

2016

## TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação n°

AVALIAÇÃO DA INATIVAÇÃO DE *Microcystis aeruginosa* KÜTZING POR  
PROCESSO FOTO-FENTON

Por

MARIANA DE ALMEIDA TORRES

Dissertação apresentada às 13 horas do dia 18 de março de 2016, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, na área de concentração Tecnologias e Processos Ambientais, linha de pesquisa Controle e Monitoramento Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

### Banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriane Martins de Freitas (Orientadora)  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

---

Prof. Dr. Cesar Antonio Lenz  
Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR)

---

Prof. Dr. Marcio Barreto Rodrigues  
Prog. de Pós-graduação em Tec. em Processos Químicos e Bioquímicos  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR-PB

Visto da Coordenação:

---

Prof. Dr. Fernando Hermes Passig  
Coordenador do PPGCTA

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa”

*Ao Wagner (amor, melhor amigo e companheiro),  
por me mostrar que eu poderia chegar aonde quisesse.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo que tem me concedido nesta breve passagem. Por sempre me mostrar quais são os melhores caminhos (mesmo que eu não os entenda de pronto), e por auxiliar a evoluir como ser, a cada dia. Agradeço à Deus também por ter colocado em meu caminho pessoas muito especiais, as quais eu gostaria de demonstrar meus mais profundos agradecimentos.

Às minhas queridas orientadoras (irmãs científicas mais velhas, pois por motivos óbvios não estou autorizada a utilizar a palavra “mãe”). Adri, obrigada por sempre acreditar em meu potencial, pela dedicação, preocupação, conselhos e ensinamentos, e por compartilhar comigo as dificuldades e as conquistas. Eu a admiro muito!

À Prof. Lúcia, a qual eu sinto grande admiração desde a graduação, e tive a maravilhosa oportunidade de trabalhar no mestrado. Obrigada por ter adotado mais uma filha Mariana, mesmo que esta mais velha tenha dado tanto trabalho quanto a pequena. Obrigada pelos valiosos ensinamentos, por me mostrar que era mais fácil do que realmente parecia, pelo apoio incondicional, conselhos e preocupações.

Ao Prof. Marcus Liz, por sempre ter as respostas para as minhas perguntas, mesmo elas sendo muito científicas para um almoço no RU. Obrigada por todos os ensinamentos (desde o primeiro estágio da graduação), e principalmente por passar um café mais forte do que gostaria, mesmo que este ainda não fosse suficientemente forte para mim.

À banca avaliadora, por dispor de tempo para avaliar o trabalho e pelas valiosas sugestões.

Agradeço ao laboratório mais feminino e dedicado do mundo: Larisa (amiga predestinada a sempre trabalhar comigo); Rubia (Rubis), Camila (Camis), Vanessa e aos demais colegas do GPTec. Obrigada por toda ajuda e pelos momentos de descontração (que não foram poucos).

Agradeço especialmente à minha amiga Joicy, por me ajudar não só nas horas em que me faltavam conhecimentos químicos e matemáticos, mas também por me ensinar a amar e a cultivar amigos valiosos como ela. Obrigada por toda a ajuda, este trabalho também é seu amigo!

Ao Marlon e à Luciana do laboratório de Limnologia, pelas conversas e cafés compartilhados.

À toda a minha família (os Torres e os Aleixo), pelo amor e apoio. Especialmente à minha mãe Angela, por sempre fazer o possível e o impossível para que tivéssemos bens materiais e imateriais.

Ao meu amor e companheiro Wagner, exemplo de respeito, amor, dedicação e comprometimento. Obrigada por sempre me apoiar em todos os sentidos, por me mostrar as melhores saídas, e por me dar forças para seguir em frente e alcançar meus objetivos, construindo nosso futuro juntos.

À UTFPR, ao CNPq e à CAPES, representando o povo brasileiro. Agradeço os recursos oferecidos para que este trabalho pudesse se realizar. Espero retribuir a altura todo esforço exercido pela parte honesta e trabalhadora da nossa população, que proporcionam recursos para o ensino e a pesquisa no Brasil.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado. Muito obrigada!

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”

*Isaac Newton*

## RESUMO

TORRES, Mariana de Almeida. **Avaliação da Inativação de *Microcystis aeruginosa* Kützing e Degradação de Microcistina-LR por Processo Foto-Fenton**. 109 f. Dissertação (Mestrado acadêmico). Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

Episódios de floração de cianobactérias produtoras de toxinas têm se tornado uma preocupação mundial, apontando a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias de tratamento (capazes de inativar as células e degradar suas toxinas). Neste sentido, os Processos Avançados de Oxidação (AOPs), tais como o processo foto-Fenton, têm se mostrado uma opção atrativa na degradação de cianotoxinas como as microcistinas, no entanto, o seu potencial de inativação de cianobactérias ainda não foi explorado. Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo avaliar a inativação da espécie *Microcystis aeruginosa* e redução da concentração de microcistina-LR (toxina produzida pelas cianobactérias) por meio do processo foto-Fenton, o qual foi conduzido em reator fotoquímico de bancada, com radiação artificial promovida por lâmpada de alta pressão de mercúrio. Inicialmente, a microalga *Desmodesmus subspicatus* foi adotada como modelo experimental para avaliação do processo foto-Fenton mediado pelo complexo Fe-oxalato, sendo testadas os efeitos isolados das variáveis envolvidas no processo (ferro e peróxido de hidrogênio) para posterior avaliação do processo combinado. Em um segundo momento, diferentes condições (no que tange às concentrações de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) do processo foto-Fenton foram estudadas nas células de *M. aeruginosa*. Neste segundo momento, o processo foi aplicado sem mediação por complexos ferro-orgânicos. Em ambos os casos, os efeitos foram avaliados através da redução da concentração celular imediata ao processo (em microscópio óptico e de epifluorescência) e por inibição do crescimento. As análises de MC-LR foram realizadas em um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector DAD. Os ensaios de viabilidade celular apontaram efeitos significativos de  $\text{Fe}^{2+}$  (10 e 15  $\text{mg.L}^{-1}$ ) e de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (50  $\text{mg.L}^{-1}$ ), combinados à radiação, nas células de *D. subspicatus*, ao passo que o processo foto-Fenton mediado por complexo ferroxalato foi capaz de provocar 100% de inibição do crescimento em apenas 30 minutos de reação. No processo aplicado às células de *M. aeruginosa* em diferentes condições, foram constatadas reduções médias na concentração celular de 40% (0,6  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  + 10  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 50% (5  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  + 50  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e 47% (20  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  + 100  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ao passo que os ensaios de viabilidade celular apontaram inviabilização do crescimento após 45 minutos de reação em todas as condições testadas. Adicionalmente, quando avaliadas as condições de 5  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  + 50  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 20  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  + 100  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , reduções expressivas na concentração de MC-LR foram observadas, sendo estas abaixo do limite estabelecido pela OMS.

**Palavras-chave:** Processos Avançados de Oxidação. Foto-Fenton. *Microcystis aeruginosa*. Microcistina-LR.



## ABSTRACT

TORRES, M. A. **Evaluation of *Microcystis aeruginosa* Inactivation and Microcystin-LR Degradation by Photo-Fenton Process**. 2016. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

Cyanobacterial blooms have become a global concern, pointing out the need to develop new treatment technologies capable of inactivating the cells and degrade the cyanobacteria toxins. Advanced Oxidation Processes (AOP), such as photo-Fenton, have shown to be an attractive option in cyanotoxin degradation (as microcystins) although its potential to inactivate cyanobacteria has not been studied. In this context, this work aimed to evaluate the inactivation of *Microcystis aeruginosa* species and microcystin-LR (MC-LR) reduction. The process was conducted in a photochemical reactor with artificial radiation promoted by mercury lamp. Initially, the microalgae *Desmodesmus subspicatus* was adopted as an experimental model to evaluate the isolated effects of the variables involved in photo-Fenton, for further evaluation with the combined process. After this step, different combined conditions of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  were studied in *M. aeruginosa* cells. In both cases, the effects were evaluated by directly cell concentration reduction during the process and growth inhibition. The MC-LR analysis were conducted in a high performance liquid chromatography system with PDA detector. Cell viability assays showed significant effects of  $\text{Fe}^{2+}$  (10 and 15  $\text{mg.L}^{-1}$ ) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (50  $\text{mg.L}^{-1}$ ), combined with radiation, in the cell *D. subspicatus*, while the process mediated by ferrioxalate complex was able to induce 100% inhibition of growth in just 30 minutes of reaction. In the process applied in *M. aeruginosa* cells, cellular concentration reductions of 40% (0.6  $\text{mg.L}^{-1}$  of  $\text{Fe}^{2+}$  and 10  $\text{mg.L}^{-1}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 50% (5  $\text{mg.L}^{-1}$  of  $\text{Fe}^{2+}$  and 50  $\text{mg.L}^{-1}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and 47% (20  $\text{mg.L}^{-1}$  of  $\text{Fe}^{2+}$  and 100  $\text{mg.L}^{-1}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) were observed, while cell viability assays showed the absence of growth after 45 minutes of reaction at all conditions. Additionally, when evaluated the conditions of 5  $\text{mg.L}^{-1}$  of  $\text{Fe}^{2+}$  and 50  $\text{mg.L}^{-1}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  20  $\text{mg.L}^{-1}$  of  $\text{Fe}^{2+}$  and 100  $\text{mg.L}^{-1}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , significant reductions in the MC-LR concentration of were observed, which are below the limit set by WHO.

**Keywords:** Advanced Oxidation Processes. Photo-Fenton. *Microcystis aeruginosa*. Microcystin-LR.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Florações de cianobactérias na Argentina (A), na Austrália (B) e na China (C). .....	19
Figura 2. <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	22
Figura 3. Estrutura geral das microcistinas (A), nodularinas (B) e cilindrospermopsina (C).. .....	24
Figura 4. Estrutura da microcistina-LR. ....	26
Figura 5. Fluxograma representativo das etapas de trabalho .....	38
Figura 6. Frascos lavadores de gás com cultivo da microalga <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	40
Figura 7. Fluxograma representativo dos experimentos realizados para avaliação das variáveis isoladas envolvidas no processo foto-Fenton, em células de <i>D. subspicatus</i> . ....	41
Figura 8. Fotografia do reator fotoquímico de bancada com lâmpada suspensa (A); Representação do reator fotoquímico de bancada com suas dimensões (B). .....	42
Figura 9. Frascos de cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i> em batelada. ....	44
Figura 10. Representação da câmara de Neubauer: dimensões, campos e sentido de contagem (A); Fotomicroscopia da câmara de Neubauer preenchida com células de <i>M. aeruginosa</i> (B). ....	46
Figura 11. Aspecto morfológico da espécie <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	51
Figura 12. Representação gráfica da porcentagem de redução das concentrações celulares de <i>D. subspicatus</i> comparando-se os tempos 0 e 30 minutos (experimentos realizados com 50, 35 e 20 mg.L <sup>-1</sup> de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , com e sem a presença de radiação). ....	53
Figura 13. Representação gráfica da porcentagem de inibição do crescimento de <i>D. subspicatus</i> comparadas ao controle (t=0 minutos), constatadas nos ensaios de viabilidade celular, após 30 minutos de exposição a 50, 35 e 20 mg.L <sup>-1</sup> de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , com e sem a presença de radiação. ....	54
Figura 14. Células de <i>Desmodesmus subspicatus</i> observadas no ensaio de viabilidade após exposição ao peróxido de hidrogênio (35 e 50 mg.L <sup>-1</sup> ) e radiação .....	55
Figura 15. Representação gráfica da porcentagem de redução das concentrações celulares de <i>D. subspicatus</i> comparando-se os tempos 0 e 30 minutos, durante os experimentos realizados com 5, 10 e 15 mg.L <sup>-1</sup> de Ferro-Oxalato, com e sem a presença de radiação. ....	57
Figura 16. Representação gráfica da porcentagem de inibição do crescimento de <i>D. subspicatus</i> comparadas ao controle (t=0 minutos), constatadas nos ensaios de viabilidade celular, após exposição a 5, 10 e 15 mg.L <sup>-1</sup> de Ferro-Oxalato, com e sem a presença de radiação. ....	58
Figura 17. Células de <i>Desmodesmus subspicatus</i> observadas no ensaio de viabilidade após exposição ao ferro (10 e 15 mg.L <sup>-1</sup> ). ....	59
Figura 18. Células de <i>Desmodesmus subspicatus</i> observadas no ensaio de viabilidade após exposição ao ferro e radiação.....	60
Figura 19. Células de <i>Desmodesmus subspicatus</i> observadas no ensaio de viabilidade após exposição à radiação.....	62
Figura 20. Células de <i>Desmodesmus subspicatus</i> saudáveis observadas em microscópio de luz (A); Células de <i>Desmodesmus subspicatus</i> saudáveis observadas em microscópio de epifluorescência (B); Células de <i>Desmodesmus</i>	

<i>subspicatus</i> com alteração na intensidade de emissão em microscópio de epifluorescência, após submetidas ao processo foto-Fenton (C).....	64
Figura 21. Fluxograma explicativo das diferentes condições utilizadas para otimização da extração em fase sólida .....	68
.....	70
Figura 22. Cromatogramas ( $\lambda=238$ nm) das amostras de <i>Clean up</i> (condição 1 e 3), comparadas ao padrão de MC-LR (1 mg.L <sup>-1</sup> ).....	70
Figura 23. Cromatogramas ( $\lambda=238$ nm) das replicatas realizadas para o método de SPE adotado, comparadas ao padrão de MC-LR (1 mg.L <sup>-1</sup> ).....	71
Figura 24. Cromatogramas ( $\lambda=238$ nm) de cultivo de células de <i>M. aeruginosa</i> , com concentração de 1x10 <sup>5</sup> cél.mL <sup>-1</sup> , após Extração em Fase Sólida .....	73
Figura 25. Cromatograma ( $\lambda=238$ nm) da matriz reacional (meio ASM-1 modificado), após submissão a Extração em Fase Sólida.....	74
Figura 26. Curva analítica obtida por regressão linear, correlacionando as áreas dos picos de MC-LR e suas respectivas concentrações.....	76
Figura 27. Morfologia da espécie <i>Microcystis aeruginosa</i> , observada em microscópio de luz (A); em microscópio de epifluorescência (B); em microscópio de epifluorescência (C): Células com emissão padrão (vermelho) e células com fluorescência alterada (azul).. .....	80
Figura 28. Representação gráfica das concentrações celulares de <i>M. aeruginosa</i> durante exposição à agitação magnética (A) e após reinoculação e incubação por 15 dias (B).....	81
Figura 29. Cromatogramas ( $\lambda=238$ nm) obtidos após submeter o cultivo de <i>M. aeruginosa</i> a 0,6 mg.L <sup>-1</sup> de Fe <sup>2+</sup> e 10 mg.L <sup>-1</sup> de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por 90 minutos (triplicata dos experimentos), comparados ao cromatograma do padrão de MC-LR.....	86
Figura 30. Cromatogramas ( $\lambda=238$ nm) obtidos após submeter o cultivo de <i>M. aeruginosa</i> a 5 mg.L <sup>-1</sup> de Fe <sup>2+</sup> e 50 mg.L <sup>-1</sup> de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por 90 minutos (triplicata dos experimentos), comparados ao cromatograma do padrão de MC-LR (1 mg.L <sup>-1</sup> ). .....	88
Figura 31. Cromatogramas ( $\lambda=238$ nm) obtidos após submeter o cultivo de <i>M. aeruginosa</i> a 20 mg.L <sup>-1</sup> de Fe <sup>2+</sup> e 100 mg.L <sup>-1</sup> de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por 90 minutos (triplicata dos experimentos), comparados ao cromatograma do padrão de MC-LR (1 mg.L <sup>-1</sup> ). .....	90
Figura 32. Possíveis efeitos observados em células de <i>M. aeruginosa</i> , após submissão ao processo foto-Fenton (Aumento de 400 vezes).....	91
Figura 33. Agregados de células de <i>M. aeruginosa</i> após 90 minutos de submissão ao processo foto-Fenton (Condições: 5 mg.L <sup>-1</sup> de Fe <sup>2+</sup> e 50 mg.L <sup>-1</sup> de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	92
Figura 34. Cromatogramas ( $\lambda=238$ nm) obtidos após submeter as células de <i>M. aeruginosa</i> ao processo foto-Fenton (0,6 mg.L <sup>-1</sup> de Fe <sup>2+</sup> e 10 mg.L <sup>-1</sup> de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	97

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de monitoramento das análises dos efeitos de diferentes concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (com e sem radiação) nas células de <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	56
Tabela 2. Parâmetros de monitoramento das análises dos efeitos de diferentes concentrações de Fe-Oxalato (com e sem radiação) nas células de <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	61
Tabela 3. Parâmetros de monitoramento do processo foto-Fenton aplicado às células de <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	63
Tabela 4. Resultados obtidos nas análises do padrão de microcistina-LR na determinação do Limite Inferior de Quantificação (LIQ) .....	75
Tabela 5. Resultados obtidos nas análises do padrão de microcistina-LR para determinação da linearidade (curva analítica) .....	76
Tabela 6. Concentrações e valores de precisão e exatidão obtidos na avaliação do método de quantificação de microcistina-LR (intra e inter-dias) .....	78
Tabela 7. Valores de recuperação obtidos em diferentes níveis de concentração de MC-LR .....	79
Tabela 8. Resultados obtidos após submissão das células de <i>Microcystis aeruginosa</i> à radiação e ao pH .....	82
Tabela 9. Parâmetros analisados durante aplicação do processo foto-Fenton (0,6 mg.L <sup>-1</sup> de Fe <sup>2+</sup> e 10 mg.L <sup>-1</sup> de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) em células de <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	84
Tabela 10. Resultados dos parâmetros analisados na aplicação do processo foto-Fenton (5 mg.L <sup>-1</sup> de Fe <sup>2+</sup> e 50 mg.L <sup>-1</sup> de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) em células de <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	87
Tabela 11. Resultados obtidos na aplicação do processo foto-Fenton (20 mg.L <sup>-1</sup> de Fe <sup>2+</sup> e 100 mg.L <sup>-1</sup> de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) em células de <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	89
Tabela 12. Parâmetros avaliados na aplicação prolongada do processo foto-Fenton (0,6 mg.L <sup>-1</sup> de Fe <sup>2+</sup> e 10 mg.L <sup>-1</sup> de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) em células de <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACN	Acetonitrila
AOP	<i>Advanced Oxidation Process</i> (Processos Avançados de Oxidação)
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
M	Concentração Molar
MC-LR	Microcistina-LR
MC-RR	Microcistina-RR
MC-YR	Microcistina-YR
MIB	2-metilisoborneol
MeOH	Metanol
N°	Número
NBR	Norma Brasileira
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida)
TFA	<i>Trifluoroacetic Acid</i> (Ácido Trifluoroacético)
t <sub>r</sub>	Tempo de Retenção
UV	Ultravioleta
Vis	Visível

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
3.1 QUALIDADE E EUTROFIZAÇÃO DE CORPOS D'ÁGUA .....	18
3.2 CIANOBACTÉRIAS .....	20
3.2.1 <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	22
3.3 CIANOTOXINAS .....	23
3.3.1 Microcistinas .....	25
3.4 PREPARO DE AMOSTRA E DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE MICROCISTINA-LR .....	28
3.5 REMOÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS E TRATAMENTO DE CIANOTOXINAS .....	31
3.6 PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO .....	32
3.6.1 Processos Fenton .....	33
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>37</b>
4.1 ESTRATÉGIA DE TRABALHO .....	37
4.2 REAGENTES, INSUMOS E EQUIPAMENTOS .....	38
4.3 LIMPEZA DE VIDRARIA .....	39
4.4 ENSAIOS COM <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	40
4.4.1 Cultivo .....	40
4.4.2 Avaliação das Variáveis Isoladas do Processo Foto-Fenton Mediado por Complexo Ferro-oxalato na Microalga <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	41
4.5 ENSAIOS COM <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	43
4.5.1 Cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	43
4.5.2 Processo Foto-Fenton Aplicado ao Cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	44
4.6 CONTROLE ANALÍTICO .....	46
4.6.1 Determinação da Concentração Celular por Contagem .....	46
4.6.2 Extração em Fase Sólida de Microcistina-LR (MC-LR) .....	47
4.6.3 Avaliação de Microcistina-LR (MC-LR) e Validação de Método Cromatográfico .....	48
4.6.4 Determinação de Peróxido de Hidrogênio .....	49
4.6.5 Determinações de Ferro II e Ferro III .....	49
4.7 ANÁLISES DOS DADOS .....	50
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>51</b>
5.1 ESTUDOS COM A MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	51
5.1.1 Estudo dos Efeitos Isolados das Variáveis Envolvidas no Processo Foto-Fenton em Células de <i>Desmodesmus Subspicatus</i> .....	51
5.1.1.1 Peróxido de Hidrogênio .....	52
5.1.1.2 Ferro ( $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ ) .....	57
5.1.1.3 Agitação Magnética, Radiação e Ácido Oxálico .....	62
5.1.2 Aplicação do Processo Foto-Fenton Mediado por Complexo Ferro-Oxalato nas Células de <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	62
5.2.1 Composição da Matriz Reacional .....	66
5.2.2 Otimização da Extração em Fase Sólida e Condições Cromatográficas para Microcistina-LR .....	67
5.2.3 Validação do Método Cromatográfico para Quantificação de Microcistina-LR .....	71

5.2.3.1 Seletividade.....	72
5.2.3.2 Limite Inferior de Quantificação.....	74
5.2.3.3 Linearidade.....	75
5.2.3.4 Precisão e Exatidão.....	77
5.2.3.4 Recuperação.....	78
5.3 ESTUDO DA APLICAÇÃO DO PROCESSO FOTO-FENTON NO CULTIVO DE <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	79
5.3.1 Visualização de <i>Microcystis aeruginosa</i> em Microscópio de Epifluorescência.....	79
5.3.3 Análise dos Efeitos do pH, Luz e Estresse Mecânico nas Células de <i>M. aeruginosa</i> .....	80
5.3.4 Estudo dos Efeitos do Processo Foto-Fenton nas Células de <i>Microcystis aeruginosa</i> e Concentração de Microcistina-LR.....	82
5.3.4.1 Aplicação Prolongada do Processo Foto-Fenton (0,6 mg.L <sup>-1</sup> de Fe <sup>2+</sup> e 10 mg.L <sup>-1</sup> de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	95
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>100</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As interferências decorrentes das atividades humanas em corpos d'água, a exemplo do acréscimo desenfreado de nutrientes por meio do despejo de águas residuárias, fertilizantes e outros aportes de contaminação, são causas em potencial da eutrofização artificial de sistemas aquáticos. A eutrofização pode levar, dentre outras consequências, ao desenvolvimento excessivo de microalgas e cianobactérias, levando a formação de florações ou *blooms* (ESTEVES, 1998; PÁDUA, 2009). Tal fenômeno se tornou uma preocupação mundial, dada a capacidade das cianobactérias em produzir metabólitos secundários capazes de conferir sabor e odor à água (como MIB e geosmina) e toxicidade para organismos vivos (cianotoxinas) (CARMICHAEL, 1992).

Vários gêneros de cianobactérias são produtores das cianotoxinas denominadas microcistinas, heptapeptídeos cíclicos hepatotóxicos, promotores de tumores hepáticos (exposições crônicas), e capazes de causar morte por hemorragia no fígado em poucas horas (exposições agudas) (AZEVEDO *et al.*, 2002). A principal via de exposição humana às microcistinas é a ingestão de água contaminada, devido à presença de cianobactérias nos reservatórios de água para consumo (SHARMA *et al.*, 2012).

Diversos compostos químicos têm sido utilizados como algicidas, no entanto, seu uso implica na lise das células de cianobactérias, e consequente liberação de toxinas para o ambiente, refletindo no aumento expressivo da toxicidade (CALIJURI *et al.*, 2006).

Com o objetivo de evitar estes episódios, faz-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias efetivas na inativação desses organismos e degradação de suas toxinas. Uma possibilidade é o uso de Processos Avançados de Oxidação (do inglês, AOPs), amplamente relatados na literatura pela sua eficiência na degradação de microcistinas (BANDALA *et al.*, 2004; GAJDEK *et al.*, 2001; FANG *et al.*, 2011), ao passo que estudos do seu potencial de inativação das cianobactérias juntamente com seus metabólitos ainda foram pouco explorados.

Dentre os AOPs, destaque é dado ao processo foto-Fenton, devido a sua eficiência na degradação de diversos compostos recalcitrantes, ao seu menor custo operacional e baixa toxicidade dos reagentes (BAUER E FALLMANN, 1997).



Estudos recentes demonstram a eficiência do processo foto-Fenton na desinfecção de águas e efluentes, provocando a inativação de bactérias entéricas e esporos de fungos por meio do ataque dos radicais gerados ao longo do processo (POLO-LÓPEZ *et al.*, 2010; SCIACCA *et al.*, 2010; SPUHLER *et al.*, 2010; POLO-LÓPEZ *et al.*, 2012; ORTEGA-GÓMEZ *et al.*, 2013; RODRÍGUEZ-CHUECA *et al.*, 2014; ORTEGA-GÓMEZ *et al.*, 2014). No entanto, até o presente momento, não há registros na literatura de estudos do seu potencial na inativação de células de *Microcystis aeruginosa*, bem como na degradação conjunta de suas toxinas.

Visando contribuir com esta necessidade, o presente trabalho tem como objetivo estudar os efeitos do processo foto-Fenton, aplicado às células de *Microcystis aeruginosa*, em diferentes condições experimentais, bem como a degradação de microcistina-LR.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial do processo foto-Fenton na inativação de *Microcystis aeruginosa* e degradação de microcistina-LR.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar o cultivo da microalga *Desmodesmus subspicatus* e utilizá-la como modelo experimental para avaliação dos efeitos isolados e combinados dos reagentes envolvidos no processo foto-Fenton ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e luz (UV-A)), assim como estabelecer a rotina laboratorial para experimentos com células;
- Cultivar a cianobactéria *Microcystis aeruginosa*;
- Validar método cromatográfico para determinação de microcistina-LR em cultivo de células de *Microcystis aeruginosa*;
- Avaliar o potencial do processo foto-Fenton na inativação de *M. aeruginosa* e degradação de microcistina-LR, por meio de condições experimentais distintas quanto às concentrações de ferro e peróxido de hidrogênio.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 QUALIDADE E EUTROFIZAÇÃO DE CORPOS D'ÁGUA

Durante séculos, a água foi considerada um recurso infinito à disposição do homem, por se tratar de um bem público com capacidade de autodepuração e ciclagem. No entanto, o crescimento populacional e a concentração em centros urbanos proporcionaram aumento na quantidade de esgotos lançados em corpos d'água de tal forma que a carga poluidora desses efluentes superou a capacidade de autodepuração desses corpos receptores (PHILIPPI JR, 2005). Estes efluentes lançados aportam, muitas vezes, grande quantidade de matéria orgânica, nutrientes, substâncias inorgânicas e potencialmente tóxicas, o que pode comprometer a qualidade da água e causar ou intensificar a eutrofização destes ecossistemas (BEM, 2013).

A eutrofização é caracterizada pelo aumento excessivo nas concentrações de nutrientes (especialmente nitrogênio e fósforo), advindos de fontes naturais ou antrópicas. No primeiro caso, é um processo natural e ocorre principalmente em ecossistemas aquáticos tropicais, que aportam fontes alóctones de matéria orgânica e nutrientes. No entanto, devido a temperaturas mais elevadas e a dinâmica das reações, que aceleram os processos de produção, respiração e decomposição, a ciclagem destes nutrientes se dá de forma rápida e natural (ESTEVES, 1998).

Já a eutrofização artificial é mais preocupante, uma vez que decorre de atividades antropogênicas tais como descarga de matéria orgânica e nutrientes presentes em efluentes domésticos, industriais e agrícolas, acarretando assim em alterações negativas na qualidade da água (DI BERNARDO, MINILO E DANTAS, 2010). O aumento de nutrientes leva à maior produtividade por parte da comunidade fitoplanctônica (ESTEVES, 1998) o que pode causar alterações no padrão sazonal, uma vez que nestas condições esta comunidade passa a ser dominada por grupos de espécies mais adaptadas ou competitivas, diminuindo a biodiversidade. Em virtude da maior demanda de oxigênio para decomposição da matéria orgânica, a eutrofização artificial também pode levar a alterações nas suas concentrações ao longo da coluna d'água (ANDREOLI E CARNEIRO, 2005).

Além de tais consequências, a maior evidência de que um corpo d'água encontra-se eutrofizado é o surgimento de florações, também conhecidos como *blooms*. O aumento das concentrações de nutrientes proporciona uma rápida resposta na produção primária do ecossistema, caracterizando então o crescimento extensivo da comunidade fitoplanctônica (cianobactérias, diatomáceas, clorofíceas, euglenofíceas, criptofíceas e dinoflagelados) (BRANDÃO *et al.*, 2006). Os problemas associados a florações incluem entupimento de encanamentos por algas filamentosas, aumento da turbidez, desoxigenação de águas superficiais (associados a alterações bioquímicas), mortandade de peixes e invertebrados, aumento dos custos de tratamento da água, alterações na paisagem (formação de espuma e camada esverdeada - Figura 1), além de interferência nas atividades recreativas (WALMSLEY, 2000).



(A)



(B)



(C)

**Figura 1.** Florações de cianobactérias na Argentina (A), na Austrália (B) e na China (C). Fonte: Cyanosite (2014)

Dentre os organismos que fazem parte do fitoplâncton, estudos têm sido voltados às cianobactérias, presentes de forma natural na maioria dos ecossistemas aquáticos superficiais existentes na biosfera, e que são capazes de produzir substâncias que alteram o sabor e odor da água, além de compostos tóxicos, as chamadas cianotoxinas (CARMICHAEL, 1992).

### 3.2 CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias (Reino Eubacteria, Filo Cyanobacteria), também conhecidas por cianofíceas e anteriormente denominadas algas azuis, pertencem a um antigo grupo de organismos existentes no planeta há aproximadamente 3,5 bilhões de anos (CALIJURI *et al.*, 2006). Acredita-se que elas estejam entre os organismos pioneiros na atmosfera primitiva, sendo os primeiros produtores primários a liberarem oxigênio elementar e a colonizar rochas e solos nunca habitados (CHORUS E BARTRAM, 1999).

São organismos procariontes aeróbicos fotoautotróficos, ou seja, requerem apenas água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz para seus processos vitais (CHORUS E BARTRAM, 1999).

A fotossíntese é o principal meio para obtenção de energia, o que lhes confere características semelhantes à de microalgas; contudo, sua organização celular é análoga à das bactérias (bioquímica e estruturalmente) (CALIJURI *et al.*, 2006). Em relação à estrutura da parede celular, as cianobactérias podem ser caracterizadas como gram-negativas. No entanto, diferenciam-se das bactérias gram-negativas por apresentarem a camada de peptidoglicano notadamente mais espessa, capaz de conferir rigidez à parede e proteger da lise celular osmótica (HOLT *et al.*, 1994). Seu principal produto da síntese é o glicogênio (RAVEN, EVERT E EICHHORN, 2007).

No interior de suas células estão localizados os tilacóides, onde se encontra o aparato fotossintético (fotossistemas I e II). Estes tilacóides são compostos por inúmeras camadas de membranas próximas à porção periférica da célula, semelhantes às encontradas em cloroplastos de células vegetais superiores (RAVEN, EVERT E EICHHORN, 2007).

As cianobactérias possuem clorofila, além de pigmentos acessórios, tais como carotenóides e as ficobiliproteínas, que podem conferir às células coloração vermelha (ficoeritrinas) e azul (ficocianinas e aloficocianinas) (CHORUS E BARTRAM, 1999).

Quando agregadas, as ficobiliproteínas formam os ficobilissomos, estruturas que também estão localizadas nos tilacóides (HOLT *et al.*, 1994). Ainda, muitas espécies são capazes de formar bainha ou envoltório de mucilagem, composta por

mucopolissacarídeos, cujo objetivo é manter o agregado de células em formas coloniais ou filamentosas (RAVEN, EVERT E EICHHORN, 2007).

A morfologia básica compreende formas unicelulares, coloniais ou multicelulares filamentosas, ao passo que as formas unicelulares podem apresentar-se como esféricas, ovaladas ou cilíndricas (TORTORA, FUNKE E CASE, 2005). A reprodução é dada de forma assexuada, por fissão binária simples (unicelulares), fissão múltipla (formas coloniais) e por fragmentação de filamentos (formas filamentosas) (TORTORA, FUNKE E CASE, 2005; HOLT *et al.*, 1994;).

Alguns gêneros de cianobactérias, tais como *Microcystis sp.* e *Anaeba sp.*, possuem cavidades preenchidas por ar (vacúolos gasosos), que são compostas por cilindros ocos recobertos por proteínas e permitem o controle da flutuação ao longo da coluna d'água, de acordo com as condições de luminosidade e concentrações de nutrientes (USEPA, 2012; TORTORA, FUNKE E CASE, 2005).

Muitos gêneros também possuem heterócitos, células especializadas de maior tamanho, envoltas por paredes celulares espessas que contém enzimas capazes de fixar o nitrogênio (N<sub>2</sub>) e convertê-lo a nitrogênio amoniacal, forma disponível para reações biológicas. Além dos heterócitos, pode haver a formação de acinetos, esporos de resistência revestidos por envoltório espesso (RAVEN, EVERT E EICHHORN, 2007).

Por consequência de tal diversidade, as cianobactérias possuem alta capacidade de adaptação, tornando-as colonizadoras de diversos ambientes, como solos e rochas, e até mesmo nos mais extremos, como por exemplo, nas superfícies de neve em altas altitudes no Alasca (CALIJURI *et al.*, 2006; PINHO, 2014). No entanto, os ecossistemas aquáticos são os habitats de sua maior ocorrência, visto que a maioria das espécies possui seu crescimento ótimo em ambientes dulcícolas, com pH neutro a levemente alcalino e temperatura entre 15 e 30 °C (AZEVEDO, 1998).

Segundo levantamento feito pela FUNASA (Fundação Nacional de Saúde), os gêneros de cianobactérias mais comumente encontradas em ecossistemas brasileiros são *Microcystis sp.*, *Cylindrospermopsis sp.*, *Anabaena spp.* e *Oscillatoria spp.* (BRASIL, 2003).

### 3.2.1 *Microcystis aeruginosa*

Dentre as espécies de cianobactérias, *Microcystis aeruginosa* (Reino Eubacteria, Subreino Negibacteria; Filo Cyanobacteria; Classe Cyanophyceae; Subclasse Oscillatoriothycideae; Ordem Chroococcales; Família Microcystaceae; Gênero Myrocystis) é a mais comum em episódios de floração, ao passo que sua toxicidade já é bem reconhecida e bastante estudada (RUNNEGAR *et al.*, 1983; ALGAE BASE, 2015).

Descritas inicialmente no século XVIII, pensava-se que os organismos pertencentes à espécie *Microcystis aeruginosa* eram microalgas, devido à presença de clorofila que confere coloração verde às células. Unicelulares, pertencentes a ordem Chroococcales, possuem formato esférico, diâmetro médio de 4-5  $\mu\text{m}$  (Figura 2) e sua reprodução se dá por fissão binária. Na natureza, formam agregados amorfos mantidos por mucilagem, de livre flotação na coluna d'água devido à presença de vacúolos gasosos (RUNNEGAR *et al.*, 1983; HOLT *et al.*, 1994).

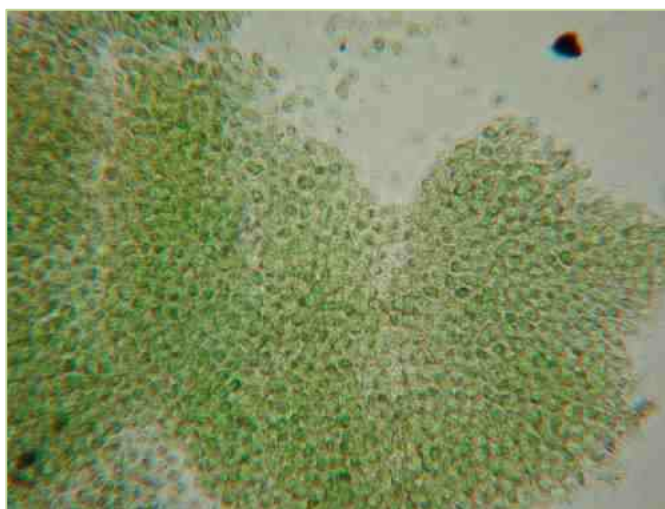


Figura 2. *Microcystis aeruginosa* (Aumento de 100 X). Fonte: Cyanosite (2014)

### 3.3 CIANOTOXINAS

Vários gêneros de cianobactérias formadoras de floração se mostraram capazes de produzir metabólitos secundários com potencial tóxico, conhecidos como cianotoxinas. Embora os fatores que determinam a produção desses metabólitos não estejam totalmente esclarecidos, atribuiu-se a produção como mecanismo de defesa contra herbivoria (CARMICHAEL, 1992) ou ainda com a finalidade de conferir vantagens competitivas (alelopatia) frente à outras cianobactérias e microalgas, o que explicaria a predominância de espécies produtoras de toxina em episódios de floração (OGA, CAMARGO E BATISTUZZO, 2008).

As cianotoxinas são classificadas de acordo com sua forma estrutural ou efeito tóxico nos organismos. Em relação ao efeito tóxico, são divididas em neurotoxinas, que interferem na transmissão neuromuscular (anatoxinas e saxitoxinas); dermatotoxinas (que causam danos à pele); e hepatotoxinas, que induzem danos ao fígado (microcistinas e nodularinas) (BRASIL, 2003).

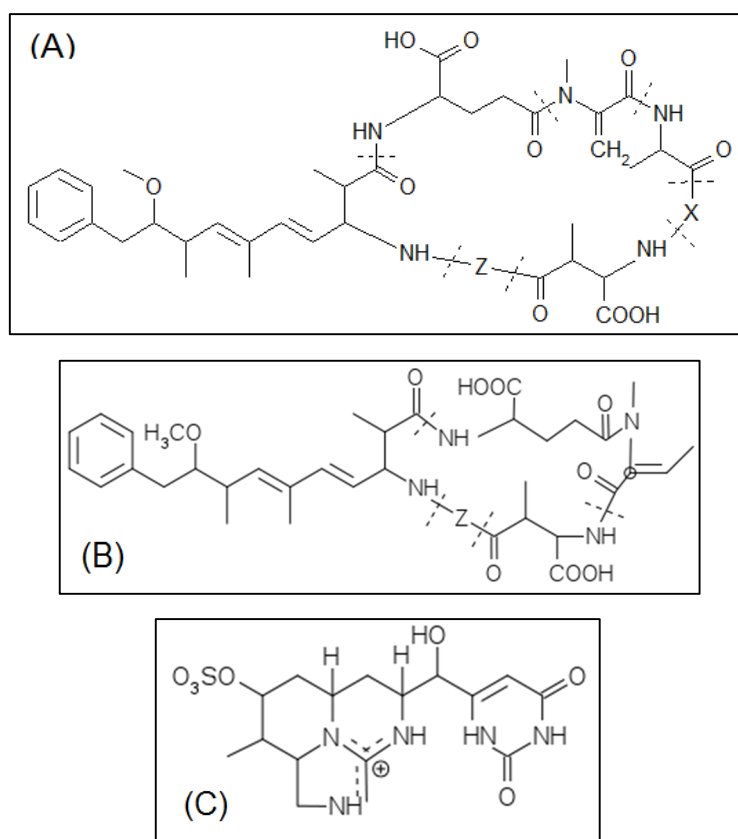
As neurotoxinas atuam especificamente no sistema nervoso, mesmo em baixas concentrações. Algumas destas toxinas foram classificadas como alcalóides ou organofosforados que interferem na transmissão dos impulsos nervosos, provocando morte por parada respiratória. Os gêneros produtores de neurotoxinas incluem *Anabaena sp.*, *Aphanizomenon sp.*, *Oscillatoria sp.* e *Trichodesmium sp.*, sendo produzidas as toxinas anatoxina-a, saxitoxinas, neosaxitoxinas, homoanatoxina-a e anatoxina-a (s) (AZEVEDO, 1998).

Já as dermatotoxinas são lipopolissacarídeos que podem ser produzidos por todos os gêneros de cianobactérias, e causar irritação através de contato dermal. Os sintomas observados ao entrar em contato com dermatotoxinas podem ser vermelhidão e lesões na pele, irritação nos olhos e urticária. Os danos causados pelas dermatotoxinas são considerados mais brandos do que os causados pelas neuro e hepatotoxinas (CALIJURI *et al.*, 2006).

Os episódios mais comuns envolvendo intoxicação por cianotoxinas são causados pelas hepatotoxinas, que possuem ação mais lenta e podem causar a morte em decorrência de choque hipovolêmico ou hemorragia intra-hepática. Alguns gêneros de cianobactérias identificadas como produtoras de hepatotoxinas são: *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Nodularia*, *Cylindrospermopsis*,



*Planktotrix*, *Radiocystis* e *Arthrospira* (MOLICA E AZEVEDO, 2009). As principais hepatotoxinas caracterizadas até o momento são os heptapeptídeos cíclicos (microcistinas), os pentapeptídeos (nodularinas) e o alcalóide hepatotóxico cilindrospermopsina (Figura 3) (BRANDÃO *et al.*, 2006).



**Figura 3.** Estrutura geral das microcistinas (A), nodularinas (B) e cilindrospermopsina (C). As letras X e Z representam as porções variáveis das moléculas. Fonte: Adaptado de Chorus e Bartram (1999) e Merel *et al.* (2013)

A intoxicação por cianotoxinas pode se dar pela ingestão direta da toxina, por células presentes na água, ou de forma indireta, por meio do consumo de animais que ingeriram as toxinas e as bioacumularam. Uma vez que estas toxinas são conhecidas por bioacumular em vertebrados e invertebrados aquáticos, existe um grande potencial destes efeitos tóxicos serem biomagnificados ao longo da cadeia trófica (CHORUS E BARTRAM, 1999).

Em 1978, na Austrália, ovelhas, cães e cavalos ingeriram água de um lago eutrofizado, sendo este o primeiro relato de morte de animais causada por

cianotoxinas. O primeiro caso de intoxicação humana foi reportado em 1946 em Portugal, em que o consumo de um molusco bivalve resultou 100 vítimas devido a ingestão de cianotoxinas (OGA, CAMARGO E BATISTUZZO, 2008).

No Brasil, o maior caso de intoxicação por cianotoxinas ocorreu na cidade de Caruaru, em Pernambuco. Em 1996, cerca de 100 pacientes que recebiam hemodiálise em uma clínica desenvolveram insuficiência hepática aguda, e em dezembro daquele ano já haviam sido registrados 52 óbitos devido à agora chamada Síndrome de Caruaru. Com conhecimento prévio da ocorrência de florações de cianobactérias em mananciais de abastecimento da região nordeste, Azevedo, Carmichael e colaboradores testaram a hipótese de a síndrome ter sido provocada por hepatotoxinas. Os estudos apontaram presença de microcistinas no carvão ativado do sistema de tratamento da clínica, assim como nas amostras de sangue e fígado dos pacientes (AZEVEDO *et al.*, 2002).

A ocorrência de cianotoxinas, como microcistinas, nodularina e cilindrospermopsina já foi reportada na maioria dos continentes, como Europa, África, Oceania e América do Norte (MEREL *et al.*, 2013).

Segundo Andreoli e Carneiro (2005), no estado do Paraná, os mananciais mais afetados pela presença de espécies produtoras de hepatotoxinas são os de abastecimento da região metropolitana de Curitiba. O monitoramento realizado entre os anos de 2001 e 2004 indicaram concentrações de microcistinas acima de 10 mg L<sup>-1</sup> na represa do rio Iraí (ANDREOLI E CARNEIRO, 2005).

### 3.3.1 Microcistinas

As microcistinas são as cianotoxinas mais comumente encontradas nos episódios de floração, e têm sido extensivamente abordadas na comunidade científica devido à sua toxicidade. Constituem uma família de toxinas produzidas principalmente pela espécie *Microcystis aeruginosa*, mas também por outras espécies dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria* e *Nostoc* (DAWSON, 1998).

Estas toxinas tiveram suas nomenclaturas propostas inicialmente por Carmichael e colaboradores (CARMICHAEL *et al.*, 1988). São heptapeptídeos

monocíclicos e sua estrutura é representada por ciclo-(D-Ala<sup>1</sup>-X<sup>2</sup>-D-MeAsp<sup>3</sup>-Z<sup>4</sup>-Adda<sup>5</sup>-D-Glu<sup>6</sup>-Mdha<sup>7</sup>), onde X e Z são L aminoácidos variáveis, tais como: leucina (L), arginina (R), tirosina (Y), triptofano (W) e fenilamina na porção variável X da molécula; e arginina (R), alanina (A) e metionina (M) na posição Z. D-MeAsp é o D-eritro-β- Ácido Metilaspártico, Adda é Ácido-(2S, 3S, 8S, 9S)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienóico, D-Glu é γ-ácido glutâmico e Mdha é N-metildeidroalamina. Os nomes dados às diferentes moléculas de microcistina estão relacionados com os aminoácidos variáveis nas posições X e Z da molécula. Usando esta regra, é possível reconhecer que a microcistina-LR (MC-LR) possui leucina e arginina em sua estrutura e a microcistina-RR contém duas argininas (CARMICHAEL *et al.*, 1988).

Como compostos orgânicos sintetizados naturalmente, as microcistinas são conhecidas por sua estabilidade e alta solubilidade em água. Devido às suas características químicas, podem permanecer intactas por vários dias em ecossistemas aquáticos. Foram identificados até o momento mais de 80 análogos de microcistina, sendo a microcistina-LR (Figura 4) a variante mais comumente encontrada em episódios de floração, assim como a mais tóxica (ANTONIOU *et al.*, 2005).

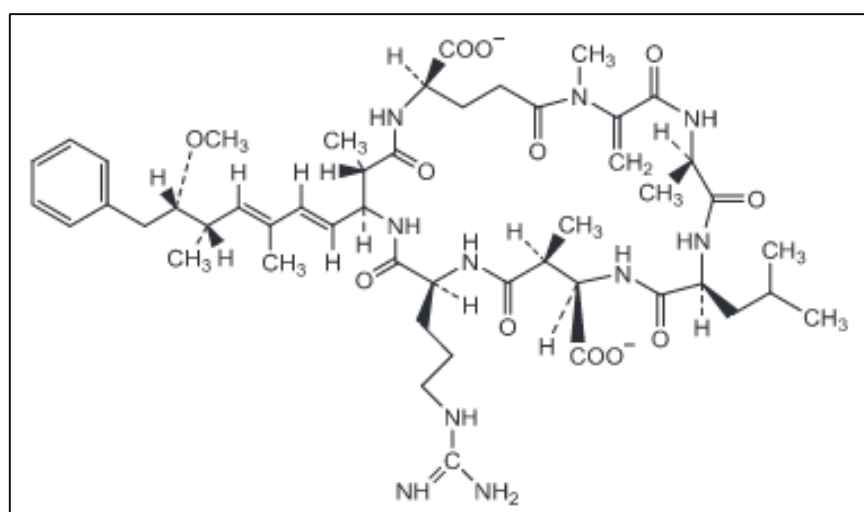


Figura 4. Estrutura da microcistina-LR. Fonte: Adaptado de Pinho *et al.* (2015)

Estudos bioquímicos e histológicos demonstraram que a MC-LR apontou maior toxicidade para camundongos quando comparada à MC-RR e MC-YR, sendo estas as variantes de microcistinas predominantes em ambientes eutrofizados (OGA, CAMARGO E BATISTUZZO, 2008).

No Brasil, a portaria GM/MS n. 2.914 preconiza o valor máximo permitido de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  de microcistinas totais em água potável, tomando como base o valor estabelecido pela Organização Mundial da Saúde para MC-LR (WHO, 1998; BRASIL, 2011).

Uma vez que as microcistinas possuem habilidade limitada em atravessar membranas na ausência de um transporte ativo, sua entrada nos hepatócitos se dá por meio dos transportadores de ácidos biliares, causando inibição das enzimas fosfatases 1 e 2A, com consequente hiperfosforilação das proteínas e desorganização do citoesqueleto. Esta desorganização leva à retração dos hepatócitos, o que, por sua vez, acarreta na retração dos capilares e aumento dos espaços intercelulares, ao passo que o sangue passa a fluir por estes espaços formados, o que é capaz de provocar lesões teciduais e hemorragia hepática (CHORUS E BARTRAM, 1999; CALIJURI *et al.*, 2006).

Além da desorganização do citoesqueleto, essas hepatotoxinas também podem provocar peroxidação lipídica, perda de integridade da membrana, fragmentação de DNA, apoptose e dilaceração celular. Evidências sugerem também que as microcistinas são fortes promotores de tumores (OGA, CAMARGO E BATISTUZZO, 2008).

Plantas aquáticas e terrestres também podem sofrer efeitos ao serem expostas à microcistinas, uma vez que nelas também há a presença das fosfatases 1 e 2A. Bittencourt-Oliveira *et al.* (2014) compilaram vários relatos de redução de biomassa em plantas aquáticas expostas a estas toxinas, assim como redução na produção das fosfatases, estresse oxidativo, redução na atividade fotossintética e até apoptose celular em plantas terrestres.

Outro aspecto relacionado à contaminação de plantas com microcistinas está ligado à sua capacidade de bioacumulação nestes organismos, e possível biomagnificação na cadeia trófica. Deste modo, plantas irrigadas com água contaminada se tornam mais uma preocupação em relação à saúde pública, revelando outra fonte de exposição às toxinas (BITTENCOURT-OLIVEIRA *et al.*, 2014).

### 3.4 PREPARO DE AMOSTRA E DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE MICROCISTINA-LR

A fim de minimizar os riscos à saúde humana frente à exposição de microcistinas, métodos sensíveis e confiáveis para sua determinação são necessários, capazes de detectar estes compostos em baixas concentrações e diferentes matrizes. A preocupação com estes riscos tem levado ao desenvolvimento de várias técnicas para detecção e quantificação dessas toxinas, tais como o ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), ensaios de inibição da enzima fosfatase e cromatografia líquida de fase reversa (com detector de arranjo de diodos ou acoplada à espectrometria de massas) (MCELHINEY E LAWTON, 2005). Tais métodos vieram em substituição aos bioensaios com ratos, cujo objetivo era diagnosticar a toxicidade de amostras (“*screening method*”) (MCELHINEY E LAWTON, 2005). Atualmente, méritos legais e éticos limitam o emprego deste método (PINHO, 2014).

O valor máximo estipulado pela OMS, sua alta toxicidade e as baixas concentrações em amostras reais demandam o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis para determinação destas toxinas (ANTONIOU *et al.*, 2005).

As baixas concentrações das cianotoxinas (microgramas ou nanogramas por litro), também tornam necessárias etapas de preparo de amostra, uma vez que a maioria dos métodos analíticos não são suficientemente sensíveis a ponto de detectar concentrações-traço (MCELHINEY E LAWTON, 2005). Uma série de metodologias podem ser empregadas na pré-concentração de amostras aquosas para determinação de cianotoxinas, tais como extração líquido-líquido, microextração em fase sólida e extração em fase sólida (SPE). O SPE pode ser utilizado não só para pré-concentração, como para eliminação de impurezas das amostras (*clean-up*) (PINHO, 2014). Por este motivo, grande parte dos estudos que quantificam a cianotoxina microcistina-LR tem recorrido ao SPE como etapa de preparo de amostras, especialmente em amostras com matrizes complexas (Quadro 1).

Preparo de Amostra por Método de Extração em Fase Sólida (SPE)					
Cartucho	Condicionamento	Vazão da Amostra (mL.min <sup>-1</sup> )	Clean up	Eluente	Autor
C18	10 mL ACN + 10 mL H <sub>2</sub> O	5	H <sub>2</sub> O	ACN	Momani <i>et al.</i> (2008)
C18	10 mL MeOH + 10 mL H <sub>2</sub> O	<10	-	MeOH	Reilly e Codd (2007)
HLB	MeOH em Ácido Acético (0,1 M)	-	MeOH:H <sub>2</sub> O (30:70) em Ácido Acético (0,1 M)	MeOH	Yuan, Carmichael e Hilborn (2006)
HLB	10 mL MeOH 10% + 10 mL MeOH 20%	5	MeOH:H <sub>2</sub> O (10:90) + MeOH:H <sub>2</sub> O (20:80)	MeOH (80%)	Miao <i>et al.</i> (2010)
C18	10 mL MeOH + 10 mL MeOH 20%	1	MeOH:H <sub>2</sub> O (10:90)	MeOH, clorofórmio e hexano	Ramanan, Tang e Velayudhan (2000)
C18	10 mL MeOH	-	MeOH:H <sub>2</sub> O (20:80)	MeOH	Pinho (2014)

**Quadro 1. Metodologias de SPE utilizadas para preparo de amostra de microcistina-LR.**  
**Legenda:** (-) Não informado

Embora os ensaios bioquímicos (que incluem o teste imunoenzimático ELISA e o da enzima fosfatase) sejam sensíveis, rápidos e adequados para o monitoramento em larga escala, estes estão pré-dispostos a resultados falso positivos (ANTONIOU *et al.*, 2005).

Já através da cromatografia líquida, limites de quantificação relativamente baixos podem ser obtidos e subprodutos de degradação avaliados (PINHO, 2014). Devido a isto, vários métodos de detecção da toxina foram desenvolvidos por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Quadro 2). Análises utilizando cromatografia líquida de fase reversa com detector DAD são as mais comumente adotadas para identificação e quantificação de microcistinas.

Métodos de Quantificação de Microcistinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)								
Equipamento	Matriz	F.E	Volume de Injeção (µL)	F.M	Vazão F.M (mL.min <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	LD (µg L <sup>-1</sup> )	Autor
HPLC-UV	Meio reacional de AOP	Coluna C18 (300 x 3.9 mm d.i.)	20	Acetato de amônio 10mM e Acetonitrila (65:35%) (Eluição Isocrática)	1	-	0,2	Momani <i>et al.</i> (2008)
HPLC- UV	Meio reacional de AOP	Coluna C18 (250 x 4.6 mm d.i.)	10	Acetonitrila e Solução tampão Fosfato de sódio 0,1% (35%:65%) (Eluição Isocrática)	1	25	-	Lian <i>et al.</i> (2014)
HPLC-DAD	Meio reacional de AOP	Coluna C18 (150 x 2,1 mm d.i., 3,5µm)	-	Ácido Trifluoroacético 0,1% e Acetonitrila (35%:65%) (Eluição Isocrática)	0,3	-	-	Miao <i>et al.</i> (2010)
HPLC (detector de Espectrometria de Massas <i>Ion Trap</i> )	Biológica (plasma e bile de peixe)	C18 (100 x 2,1 mm d.i.)	10	0,05% Ácido Fórmico em Acetonitrila e 0,05% Ácido Fórmico em Água Ultra-pura (Eluição Gradiente)	0,2	40	6	Li <i>et al.</i> (2014)
HPLC-DAD	Meio reacional de AOP	C18 (25 cm x 4.6 mm d. i, 5µm)	20	MeOH: H <sub>2</sub> O, ambos acidificados com TFA 0,1%	0,9	45	200	Pinho (2014)
HPLC-DAD	Meio reacional de AOP	C18 (150 mm x 4.6 mm d. i,)	20	TFA 0,05% e MeOH (35:65)	0,6	40	0,13	Fang <i>et al.</i> (2011)
HPLC-DAD	Extrato concentrado de cianobactérias	C18 (15 cm x 3.9 mm d. i, 5µm)	25	ACN: H <sub>2</sub> O, ambos acidificados com TFA 0,1%	-	40	1	Pichardo e Pflugmacher (2011)

**Quadro 2. Métodos de Cromatografia Líquida utilizados para quantificação de microcistinas. Legenda: (-) Não informado; F.E: Fase estacionária; F.M: Fase móvel; (λ) Comprimento de onda; (d.i): Diâmetro interno; LD: Limite de detecção.**

### 3.5 REMOÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS E TRATAMENTO DE CIANOTOXINAS

Processos de tratamento de água devem ser capazes de proteger os consumidores contra exposições às cianotoxinas. Assim sendo, os tratamentos aplicados em Estações de Tratamento de Água (ETAs) devem remover as cianobactérias sem prejudicar a integridade celular, removendo assim as toxinas intracelulares. Todavia, devem remover também as toxinas já liberadas na água (extracelulares) (MEREL *et al.*, 2013).

Algicidas adotados para manejo e controle de florações em reservatórios são capazes de provocar a lise celular, liberando, assim, as toxinas intracelulares (CHORUS E BARTRAM, 1999). O sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) vem sendo extensivamente usado na gestão da qualidade de água há mais de 100 anos, e, além de provocar o acúmulo do metal nos ecossistemas aquáticos, provoca o aumento das concentrações de toxinas dissolvidas na água (CHORUS E BARTRAM, 1999; ANTONIOU *et al.*, 2005).

Etapas de pré-oxidação (com uso de agentes oxidantes tais como cloro e permanganato de potássio) têm sido aplicadas em plantas de tratamento de água, a fim de aumentar a biodegradabilidade de matéria orgânica recalcitrante, além de outros contaminantes. No entanto, esta etapa pode acarretar em danos à parede celular, liberando as toxinas intracelulares. Além do aumento da toxicidade, a liberação do material intracelular pode aumentar concentrações de carbono dissolvido, o que por sua vez pode impactar na etapa de coagulação, além de favorecer a formação de subprodutos de desinfecção, com potencial mais tóxico para mamíferos do que a toxina em si (ANTONIOU *et al.*, 2005; USEPA, 2012; MEREL *et al.*, 2013).

A portaria GM/MS n. 2.914 determina que se o número de cianobactérias exceder  $20.000 \text{ células.mL}^{-1}$ , monitoramentos semanais deverão ser realizados e é vetado o uso de algicidas para o controle do crescimento de cianobactérias, ou qualquer tipo de intervenção que provoque a ruptura da célula e consequente liberação da toxina (BRASIL, 2011).

Processos convencionais de tratamento de água, tais como coagulação, floculação, sedimentação, flotação por ar dissolvido e filtração se mostram efetivos na remoção das cianobactérias e consequentemente na remoção de toxinas



intracelulares (USEPA, 2012). No entanto, não são capazes de remover eficientemente as toxinas já liberadas para o meio extracelular (AZEVEDO, 1998).

Deste modo, se faz necessário o desenvolvimento de novas técnicas de tratamento, capazes de inativar as células e degradar suas toxinas. Na última década, diversos estudos relatam o uso de processos convencionais ou avançados de oxidação de cianotoxinas. Dentre os agentes convencionais utilizados, destacam-se ozônio, permanganato (RODRÍGUEZ *et al.*, 2007) e peróxido de hidrogênio (FAN *et al.*, 2013). Quanto aos Processos Avançados de Oxidação (AOPs), têm sido estudados processos de fotocatalise (LAWTON *et al.*, 1999), sistema UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e processos Fenton (SHARMA *et al.*, 2012).

Em contrapartida, poucos estudos têm relacionado a remoção de cianobactérias e degradação de suas toxinas em um mesmo processo. Barrington, Reichwaldt e Ghadouani (2013), testaram o uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como algicida e agente oxidante de microcistinas em uma lagoa de estabilização. Neste estudo, concluiu-se que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é um poderoso algicida, capaz de reduzir significativamente as concentrações de clorofila-a e microcistinas rapidamente.

Pinho e colaboradores (2015) avaliaram o efeito da fotocatalise heterogênea (utilizando TiO<sub>2</sub>) na lise de *Microcystis aeruginosa* e degradação de microcistina-LR (intra e extracelular). Do mesmo modo, resultados satisfatórios de redução da concentração de células e de MC-LR foram obtidos.

Vários estudos reportaram a capacidade do processo foto-Fenton em inativar microrganismos, como bactérias e esporos de fungos (POLO-LÓPEZ *et al.*, 2010; SCIACCA *et al.*, 2010; SPUHLER *et al.*, 2010; POLO-LÓPEZ *et al.*, 2012; ORTEGA-GÓMEZ *et al.*, 2013; RODRÍGUEZ-CHUECA *et al.*, 2014; ORTEGA-GÓMEZ *et al.*, 2014). No entanto, estudos da sua aplicação para inativação de cianobactérias conjugada à degradação de suas toxinas ainda não foram reportados.

### 3.6 PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO

Os Processos Avançados de Oxidação (AOPs) têm se mostrado uma opção atrativa como ferramenta ambiental na degradação de micropoluentes, uma vez que

são processos menos onerosos, possibilitam a degradação dos contaminantes (e não apenas sua transferência de fase) através de reagentes com baixa toxicidade. Todos têm em comum a formação de radicais fortemente oxidantes, em sua maioria radicais hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), capazes de reagir indiscriminadamente com ampla classe de compostos orgânicos e inorgânicos.

Os AOPs podem ser classificados de acordo com os diferentes métodos que originam os radicais, sendo divididos processos homogêneos e heterogêneos, assistidos ou não por radiação (Quadro 3).

Sistemas Homogêneos		Sistemas Heterogêneos	
Com Irradiação	Sem Irradiação	Com Irradiação	Sem Irradiação
UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	O <sub>3</sub>	TiO <sub>2</sub> /UV	Eletrofenton
UV/O <sub>3</sub>	<i>Like</i> -Fenton (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Fe <sup>2+</sup> +m <sup>n+</sup> )	TiO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV	Fe <sup>0</sup>
<i>Like</i> -Fenton (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Fe <sup>2+</sup> +UV)	Fenton (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Fe <sup>2+</sup> )	Fotoeletrocatalise	Processos eletroquímicos
Foto-Fenton (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Fe <sup>2+</sup> /UV)	Sono-Fenton	<i>Like</i> Fenton com Fe imobilizado	<i>Like</i> Fenton com Fe imobilizado

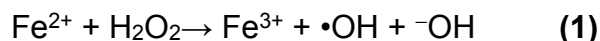
**Quadro 3. Sistemas de Tratamentos por Processos Avançados de Oxidação. Fonte: Adaptado de Babuponnusami e Muthukumar (2014)**

Dentre os AOPs, a comunidade científica tem se voltado fortemente para os processos Fenton, amplamente estudados devido ao seu alto potencial de degradação, baixo custo e baixa toxicidade dos reagentes, assim como a simplicidade operacional (SOUZA, 2008).

### 3.6.1 Processos Fenton

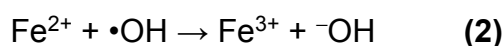
H. J. H. Fenton (1894, *apud* BABUPONNUSAMI E MUTHUKUMAR, 2014) reportou a ativação do peróxido de hidrogênio por sais de ferro para oxidação de ácido tartárico. Esta reação, hoje conhecida como reação de Fenton, é caracterizada pela geração de radicais hidroxila, capazes de oxidar compostos orgânicos e

inorgânicos, que são originados da decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , catalisada por  $\text{Fe}^{2+}$  em meio ácido (Equação 1) (BABUPONNUSAMI E MUTHUKUMAR, 2014).

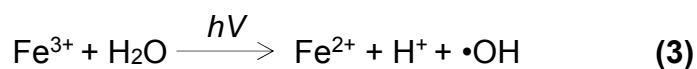


Os íons ferrosos estão presentes como complexos em solução aquosa, em condições de baixo pH, na ausência de ligantes. Os radicais hidroxila formados são os principais agentes reativos no processo de degradação de poluentes orgânicos por oxidação. A posição na série de potencial de oxidação do radical hidroxila é inferior apenas ao flúor (TEIXEIRA *et al.*, 2004).

Na ausência de substrato, o radical hidroxila oxidará uma segunda molécula de íon ferroso (TEIXEIRA *et al.*, 2004), ocasionando o término da cadeia (NEYENS E BAEYENS, 2003) (Equação 2).



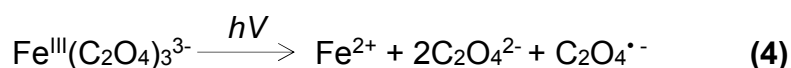
Ademais, descobriu-se que através da adição de radiação UV/Vis a reação de Fenton poderia tornar-se ainda mais eficiente (RUPPERT, BAUER E HEISLER, 1993). O processo que combina o  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e radiação é chamado de foto-Fenton, no qual ocorre a foto-redução dos íons férricos formados na reação de Fenton, formando-se mais um radical hidroxila e fechando-se um ciclo catalítico, enquanto  $\text{H}_2\text{O}_2$  estiver presente no meio (Equação 3). A regeneração dos íons ferrosos juntamente com a geração de um radical hidroxila adicional, possibilitam o aumento da eficiência do sistema (BAUER E FULLMANN, 1997).



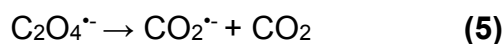
A maior desvantagem relacionada à aplicação dos processos Fenton é atribuída à necessidade do pH ácido para que as espécies de ferro se encontrem dissolvidas. No entanto, a presença da matéria orgânica pode ser capaz de auxiliar em sua solubilidade. Complexos orgânicos de  $\text{Fe}^{3+}$  são estáveis em pH neutro, tornando capaz de ultrapassar a dependência do pH ácido do processo foto-Fenton tradicional. Complexos fotoativos de  $\text{Fe}^{3+}$  são formados por grupamentos

carboxilatos e policarboxilatos, sendo estes os mais comumente presentes em matéria orgânica dissolvida (SPUHLER *et al.*, 2010).

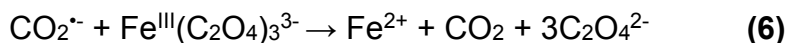
Outra forma de superar este inconveniente é o emprego desses processos mediados por complexos ferro-orgânicos, como ferroxalato. O rendimento quântico da produção de  $\text{Fe}^{2+}$  é aumentada consideravelmente quando o  $\text{Fe}^{3+}$  é complexado com carboxilatos, como o oxalato (Equação 4) (HISLOP E BOLTON, 1999).



Os ânions radicais  $\text{C}_2\text{O}_4^{\bullet-}$  são rapidamente decompostos, formando dióxido de carbono e  $\text{CO}_2^{\bullet-}$  (Equação 5):

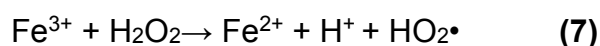


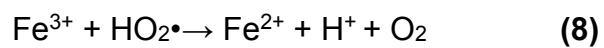
O  $\text{CO}_2^{\bullet-}$ , por sua vez, é capaz de produzir  $\text{Fe}^{2+}$ , por meio da reação 6 (HISLOP E BOLTON, 1999), o que pode aumentar ainda mais a eficiência do processo foto-Fenton na presença destes complexos.



Complexos de ferroxalato, quando aplicados ao processo foto-Fenton, aceleram a produção de  $\text{Fe}^{2+}$  e conseqüentemente a produção de radicais hidroxila. Ainda, estes complexos impedem a precipitação do ferro em pH neutro, além de estender a banda de absorção para região do visível, atingindo-se maiores eficiências quando do uso de radiação solar (DOUMIC *et al.*, 2015).

No entanto, quando na ausência de complexos ferrorgânicos (tais como ferroxalato), o peróxido de hidrogênio pode reagir com os íons férricos por meio de reações secundárias. Na literatura, é comum referir-se a estas reações como *like-Fenton* (PIGNATELLO *et al.*, 2006), que geram radicais menos energéticos (como o radical hidroperoxila) com potencial de degradação, além da regeneração do  $\text{Fe}^{2+}$  (equações 7 e 8) (AGUIAR *et al.*, 2007).





Para Pignatello e coautores (2006), de um ponto de vista mecanístico, a diferenciação da forma de ferro na reação é irrelevante (independentemente de qual forma esteja inicialmente presente), uma vez que ambos  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  fazem parte da cadeia de reação que compõe o processo Fenton.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ESTRATÉGIA DE TRABALHO

A fim de cumprir os objetivos propostos, este trabalho se deu em duas etapas distintas (Figura 5). Em um primeiro momento, adotou-se a microalga *Desmodesmus subspicatus* como organismo-modelo, com o objetivo de ajustar as condições experimentais do processo foto-Fenton, visando a sua aplicação em um sistema biológico (por meio de ensaios preliminares), estabelecendo a rotina laboratorial com um organismo fotossintetizante de fácil cultivo, sensível e livre de riscos à saúde associados à sua manipulação. Nesta etapa foram inicialmente avaliados os efeitos isolados das variáveis envolvidas no processo foto-Fenton (ferro, peróxido de hidrogênio e luz), para posterior aplicação do processo de forma combinada.

Na segunda etapa foi estabelecido o cultivo da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, e posterior validação do método cromatográfico para determinação de microcistina-LR. Em seguida, o processo foto-Fenton foi avaliado nas células das cianobactérias, em três condições distintas quanto às concentrações de ferro e de peróxido de hidrogênio, e os efeitos foram avaliados através da redução do número de células viáveis durante o período reacional, ensaio de viabilidade celular pós-reação e redução da concentração de microcistina-LR.

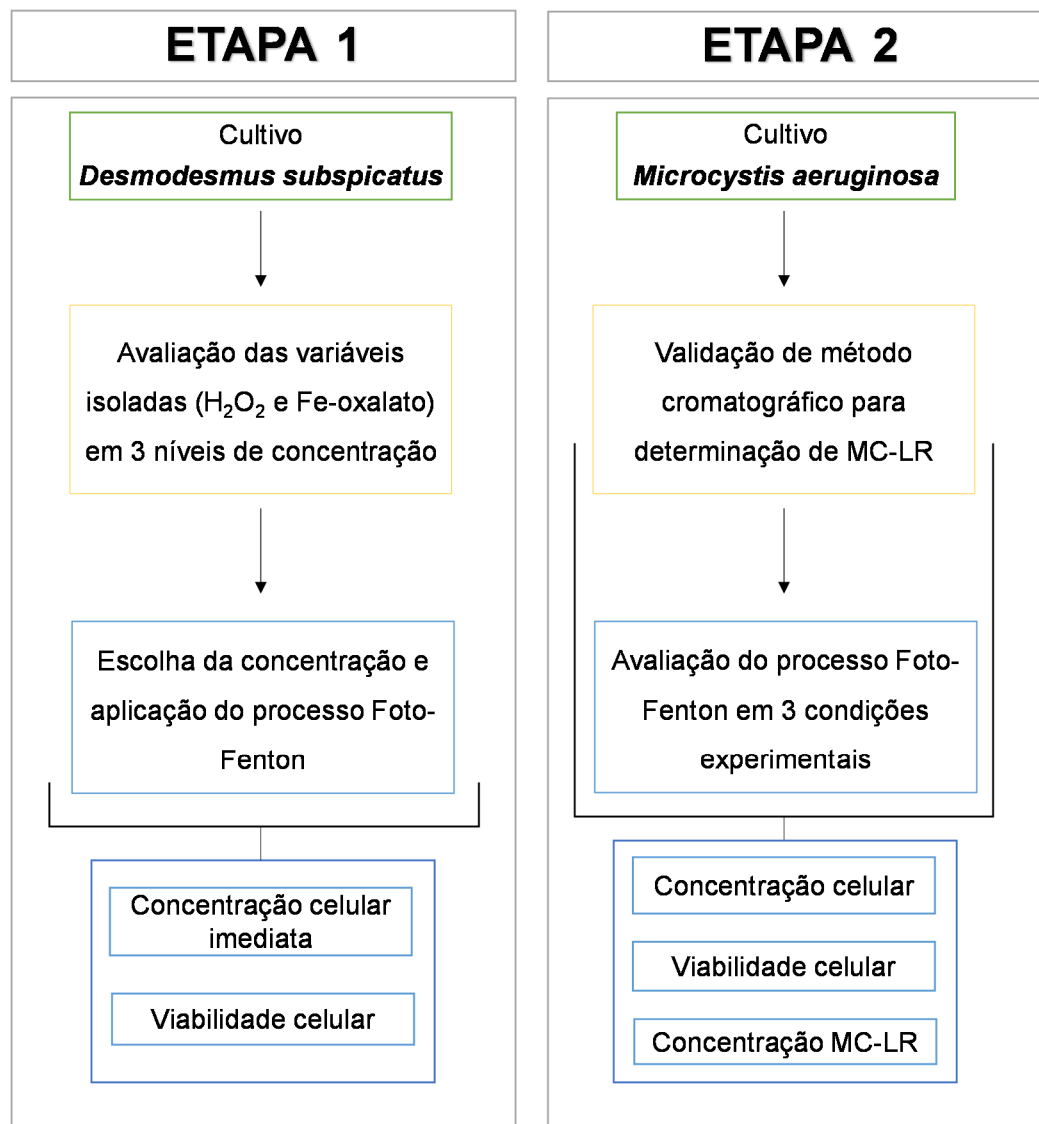


Figura 5. Fluxograma representativo das etapas de trabalho

#### 4.2 REAGENTES, INSUMOS E EQUIPAMENTOS

No processo foto-Fenton, foram utilizadas soluções aquosas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  preparadas a partir da solução estoque de 30% m/v (Peróxidos do Brasil), soluções aquosas de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Vetec) e solução de catalase bovina (Sigma-Aldrich). Todos os demais sais, ácidos e bases utilizados foram de grau analítico.

Os monitoramentos de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}_{\text{Total}}$  e peróxido de hidrogênio foram efetuados com o auxílio de espectrofotômetro UV-Vis Varian (modelo Cary 50). As medições de turbidez foram realizadas com turbidímetro portátil marca Hanna®,

modelo HI 93703. As pesagens foram realizadas em balança analítica (Bel Engineering®) com precisão de 0,1 mg. As análises de microscopia foram realizadas em microscópio óptico (Zeiss®, modelo Primo Star) e microscópios de epifluorescência Olympus® BX51 e Leica ® DMLS. Também foram utilizados luxímetro digital Minipa® (modelo MLM-1011) e pHmetro Digimed.

Todos os solventes utilizados para as análises cromatográficas (acetonitrila, metanol e ácido trifluoroacético) foram de grau cromatográfico de pureza, e água ultrapura proveniente de sistema ultrapurificador Mega Purity® (modelo Mega Up).

As análises cromatográficas foram realizadas em sistema de cromatografia líquida modelo HPLC Prominence (Shimadzu) equipado com bomba quaternária LC-20AT, degaseificador DGU-20A, forno CTO-20A, detector UV (DAD) SPD-M20A e controladora CBM-20A. As análises foram realizadas em coluna X-Terra® (Waters; 150 x 30 mm d. i., 3,5µm), com coluna guarda Phenomenex C18.

#### 4.3 LIMPEZA DE VIDRARIA

Todas as vidrarias e materiais utilizados para os cultivos e nos experimentos do processo foto-Fenton foram mantidas em banho ácido por 24 h (HCl ou HNO<sub>3</sub> 10% v/v), enxaguadas 6 vezes com água destilada e 3 vezes com água obtida de sistema de osmose reversa Water Quality®. As vidrarias utilizadas para cromatografia também foram mantidas em banho ácido, e posteriormente enxaguadas 6 vezes com água destilada, 6 vezes com água de osmose reversa, 6 vezes com água ultrapura e 3 vezes com metanol (grau HPLC).

Os materiais que entraram em contato com as células de *Microcystis aeruginosa* foram mantidos por 24 h em banho de hipoclorito de sódio comercial (1% v/v), enxaguados 4 vezes com água destilada e posteriormente submetidos ao banho ácido.



#### 4.4 ENSAIOS COM *Desmodesmus subspicatus*

##### 4.4.1 Cultivo

A microalga *Desmodesmus subspicatus* foi cultivada conforme metodologia estabelecida pela norma brasileira NBR 12648/2011 (ABNT, 2011).

O cultivo foi mantido em sala apropriada, com monitoramento de temperatura (aproximadamente 30°C) e intensidade luminosa (4500 lux), no laboratório de Limnologia (UTFPR) (Figura 6). O inóculo foi gentilmente cedido pelo Instituto Ambiental do Paraná, e o cultivo foi realizado em frascos lavadores de gás sob aeração constante, em meio CHU estéril (Anexo A). As microalgas foram inoculadas no intervalo de 3 a 5 dias, em meio líquido e sólido, com o objetivo de assegurar a manutenção do cultivo.

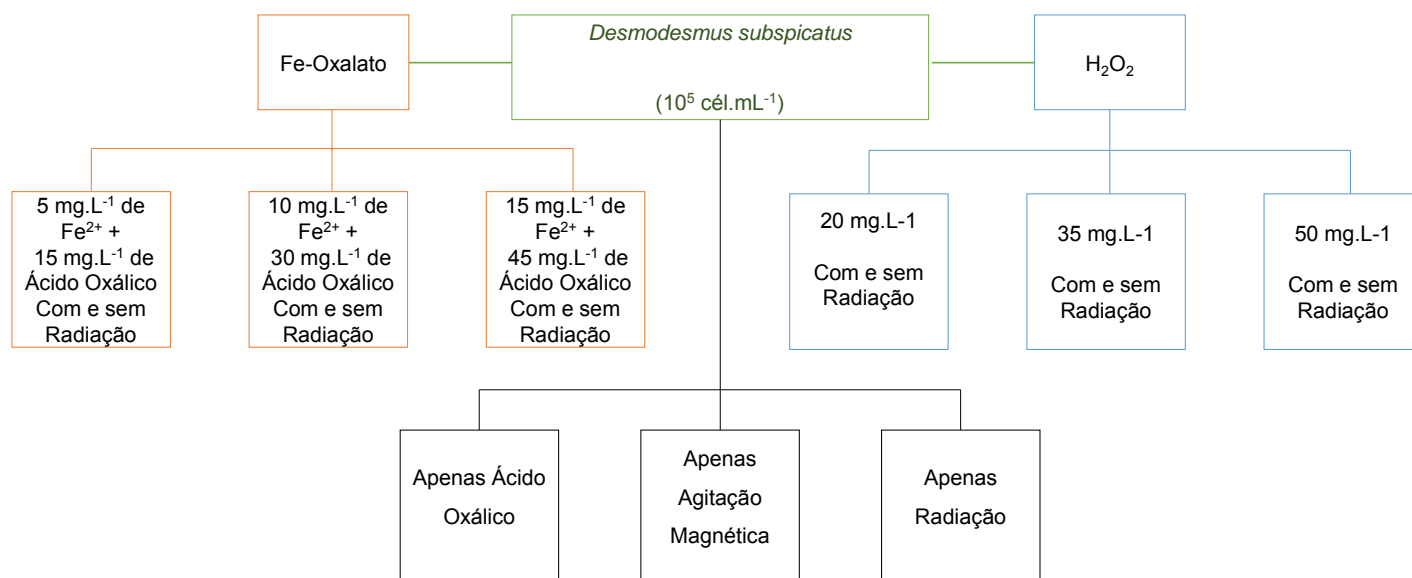


Figura 6. Frascos lavadores de gás com cultivo da microalga *Desmodesmus subspicatus*  
Fonte: A autora.

#### 4.4.2 Avaliação das Variáveis Isoladas e do Processo Foto-Fenton Mediado por Complexo Ferro-oxalato na Microalga *Desmodesmus subspicatus*

A fim de avaliar o efeito das variáveis (ferro, peróxido de hidrogênio, luz e agitação magnética) do processo foto-Fenton em um organismo unicelular fotossintetizante, utilizou-se como organismo-modelo a microalga *Desmodesmus subspicatus*. Para isto, foram utilizados três níveis de concentrações de  $\text{Fe}^{2+}$  (5, 10 e 15  $\text{mg.L}^{-1}$ ) e de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (20, 35 e 50  $\text{mg.L}^{-1}$ ). As concentrações de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram testadas isoladamente, com e sem a presença de radiação.

Os ensaios realizados com adição de ferro foram mediados por complexos ferro-orgânicos, através do emprego de ácido oxálico (proporção de 1:3 p/p). Ao avaliar-se o efeito de cada concentração de ferro e peróxido de hidrogênio, com e sem a presença da radiação, assim como o efeito isolado do ácido oxálico, da radiação e da agitação magnética, totalizaram-se 15 experimentos (Figura 7).



**Figura 7. Fluxograma representativo dos experimentos realizados para avaliação das variáveis isoladas envolvidas no processo foto-Fenton, em células de *D. subspicatus*.**

Todos os ensaios foram realizados em suspensão celular com concentração inicial de  $1 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>, medidos em câmara de Neubauer, e pH próximo de 7,0. Em câmara de fluxo laminar, uma alíquota do frasco de cultivo foi retirada para

verificação da concentração celular no microscópio de óptico (400 vezes de aumento). Uma vez verificada a concentração celular, uma alíquota foi retirada do frasco para preparo da suspensão em solução salina (NaCl 0,9%), por meio de diluição direta.

Nos ensaios em que foram avaliados os efeitos das diferentes concentrações de ferro, as soluções de sulfato ferroso e ácido oxálico foram adicionadas juntamente com a suspensão de células e solução salina em balão volumétrico, para posteriormente serem transferidas para o reator. Nos ensaios em que o efeito do peróxido de hidrogênio foi avaliado, a diluição do  $H_2O_2$  foi feita diretamente no reator.

Os experimentos tiveram duração de 30 minutos, sendo retiradas alíquotas para análises das concentrações de ferro, peróxido de hidrogênio, concentração celular imediata e viabilidade celular (reinoculação de parte da amostra em meio de cultivo e verificação do crescimento celular após 4 dias).

Os ensaios foram conduzidos em reator fotoquímico convencional de bancada de vidro, com 500 mL de capacidade (Figura 8), e a radiação foi promovida por lâmpada a vapor de mercúrio de 125 W de alta pressão, com remoção do bulbo original e inserida no reator por meio de um bulbo de vidro (Pyrex). A luminosidade foi medida com auxílio de luxímetro digital, posicionado ao lado do reator, a fim de manter a mesma faixa de intensidade luminosa em todos os experimentos.

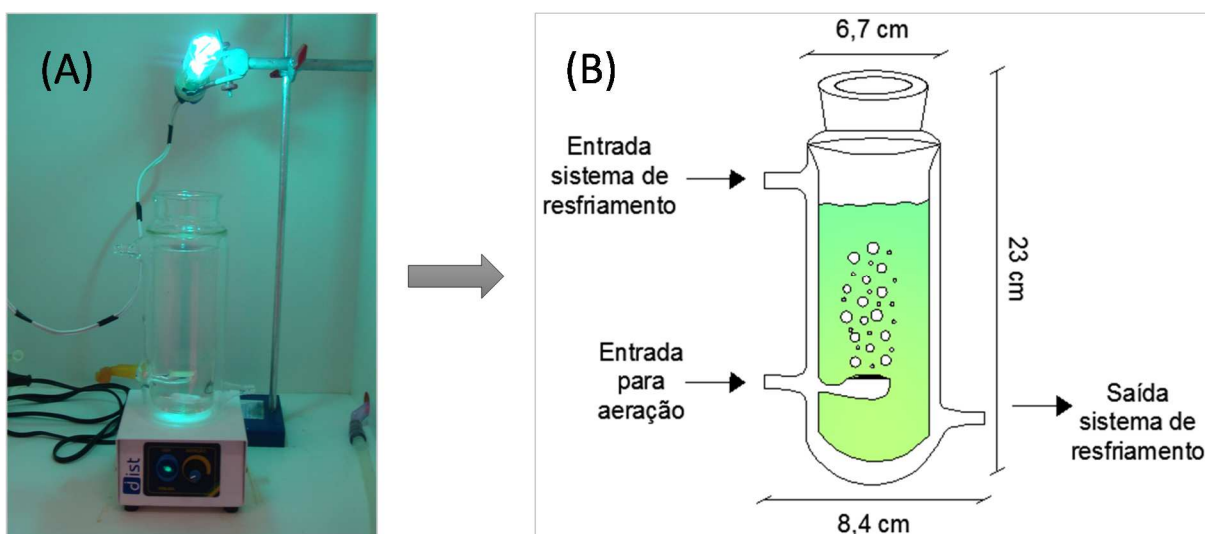


Figura 8. Fotografia do reator fotoquímico de bancada com lâmpada suspensa (A); Representação do reator fotoquímico de bancada com suas dimensões (B). Fonte: A autora

Nas amostras retiradas para contagem celular imediata e para reinoculação, o peróxido de hidrogênio foi neutralizado com adição de suspensão de catalase 4%. Lugol fraco (Iodo de Gram 2%) foi adicionado nas amostras para contagem celular imediata (após abatimento do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), para posterior análise em microscópio óptico (Zeiss®).

A viabilidade das células foi avaliada em placa de 12 poços, através da reinoculação das alíquotas em meio CHU, em triplicata. Em cada poço, foram adicionados 2,7 mL de meio de cultivo e 0,3 mL de amostra (inóculo de 10%). As placas foram mantidas sob agitação de 15 rpm em mesa agitadora Fanem® (modelo 255-B) e luminosidade constante (4500 lux). Após 4 dias a concentração celular e morfologia das células foi analisada com auxílio de microscópio óptico.

Uma vez esclarecidos os efeitos isolados das variáveis nas células de *D. subspicatus*, o processo foto-Fenton foi aplicado com a concentração de menor efeito observado ou nulo, a fim de verificar o potencial do processo (efeito sinérgico) na inviabilização das células.

O processo foto-Fenton foi avaliado por 135 minutos, e a determinação da concentração celular imediata foi realizada em microscópio de epifluorescência Zeiss® (amostras não fixadas). Já os ensaios de viabilidade celular foram realizados em Erlenmeyers de 100 mL, contendo 45 mL de meio de cultivo CHU estéril e 5 mL de amostra, mantidos sob agitação e luminosidade constantes por 4 dias. Após este período a concentração celular foi verificada em microscópio de epifluorescência Leica®.

#### 4.5 ENSAIOS COM *Microcystis aeruginosa*

##### 4.5.1 Cultivo de *Microcystis aeruginosa*

A cianobactéria *Microcystis aeruginosa* utilizada para os estudos de inativação por processo foto-Fenton, foi proveniente de inóculo da cepa BB005, isolada de florações tóxicas do reservatório de Barra Bonita (São Paulo) e

gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Armando Augusto H. Vieira (Departamento de Botânica, Universidade Federal de São Carlos).

O cultivo foi realizado no Laboratório de Limnologia (UTFPR), em meio líquido ASM-1 modificado (GORHAM *et al.*, 1964) (Figura 9), cuja composição é apresentada no Anexo B. As condições de cultivo foram baseadas em Soares, Magalhães e Azevedo (2004) e Jiang *et al.* (2008), as quais consistiram em fotoperíodo (14 h claro e 10 h escuro), com luminosidade de  $2400 \pm 100$  lux, e temperatura mantida entre 23 e 30°C. Os frascos foram inoculados (inóculo de 10%) e após a inoculação permaneceram sobre bancada, sendo agitados manualmente uma vez ao dia.



**Figura 9. Frascos de cultivo de *Microcystis aeruginosa* em batelada. Fonte: A autora.**

A abertura, inoculação e manuseio dos frascos foram realizados em câmara de fluxo laminar vertical com descontaminação por lâmpada germicida. Do mesmo modo, o manuseio durante todos os experimentos foi realizado em locais de acesso restrito e mediante o uso de EPI's (tais como jaleco e luvas), a fim de assegurar a segurança do analista e demais usuários do laboratório.

#### 4.5.2 Processo Foto-Fenton Aplicado ao Cultivo de *Microcystis aeruginosa*

Com objetivo de avaliar o processo oxidativo nas células de *Microcystis aeruginosa*, optou-se por estudar diferentes condições no que se refere às

concentrações de ferro (na forma de sulfato ferroso) e de peróxido de hidrogênio, atentando-se às diferentes proporções entre  $\text{Fe}^{2+}:\text{H}_2\text{O}_2$ :

- Condição 1: 0,6  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  e 10  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Proporção  $\text{Fe}^{2+}:\text{H}_2\text{O}_2= 0,06$ );
- Condição 2: 5  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  e 50  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Proporção  $\text{Fe}^{2+}:\text{H}_2\text{O}_2 = 0,1$ ); e
- Condição 3: 20  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  e 100  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Proporção  $\text{Fe}^{2+}:\text{H}_2\text{O}_2= 0,2$ ).

Os experimentos (realizados em triplicata) se deram no mesmo reator fotoquímico de bancada descrito no item 4.4.2 (Figura 8), sendo a agitação promovida por agitador magnético.

Nestes ensaios, a radiação também foi proporcionada por lâmpada a vapor de mercúrio de 125 W (de alta pressão) envolvida em bulbo de vidro (Pyrex), no entanto a mesma foi mantida a aproximadamente 10 cm da parte superior do reator (Figura 8B, previamente apresentada).

A idade do cultivo de cianobactérias utilizado para os ensaios foi padronizada por meio de inoculação 15 dias antecessores aos experimentos (inóculo de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células. $\text{mL}^{-1}$ ).

Em câmara de fluxo laminar, uma alíquota do cultivo foi retirada do frasco para verificação da concentração celular, com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio óptico (400 vezes de aumento). Uma vez conhecida a concentração, retirou-se uma alíquota para diluição na matriz, visando obter concentração celular de  $1 \times 10^5$  células. $\text{mL}^{-1}$  para realização dos ensaios. Após a diluição em balão volumétrico, a concentração celular foi confirmada e então a suspensão celular foi transferida para o reator, onde foram adicionados os reagentes (sulfato ferroso e peróxido de hidrogênio), sob agitação. Foram retiradas alíquotas para análises de ferro, peróxido de hidrogênio, concentração celular imediata e viabilidade celular pós-reação, e monitorados pH, temperatura e luminosidade no início e após 45 e 90 minutos, sendo então finalizada a reação através de ajuste de pH (aproximadamente 6) e adição de enzima catalase 4%.

A viabilidade das cianobactérias submetidas ao processo foto-Fenton também foi avaliada por meio da inoculação de 2 mL das amostras em tubos de

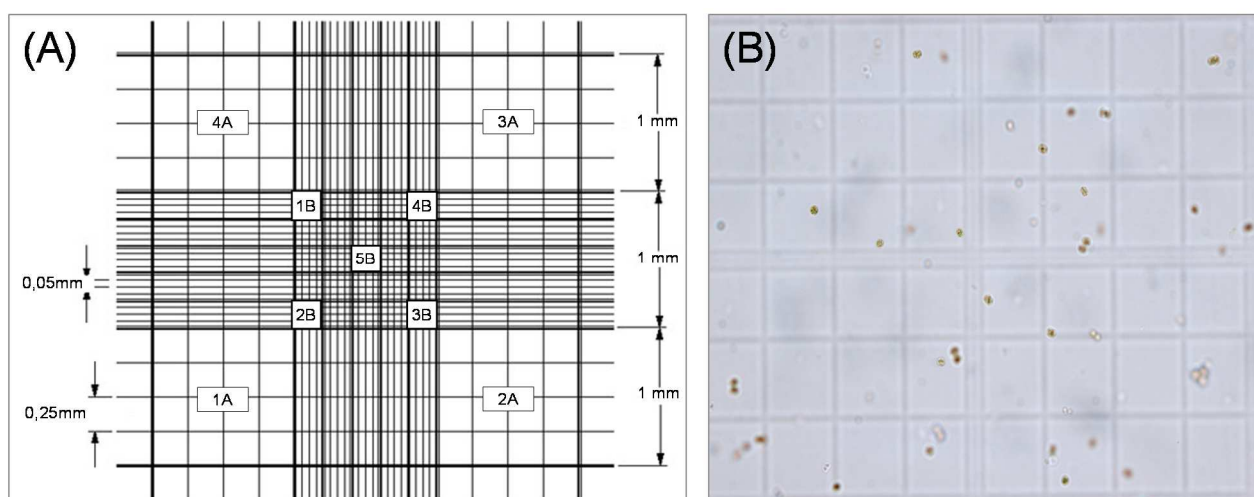
ensaio (50 mL de capacidade), que continham 18 mL de meio ASM-1 estéril (inóculo de 20% v/v). Os tubos foram incubados em câmara de germinação por 15 dias (22 °C, fotoperíodo de 14 h claro e 10 h escuro). Após os 15 dias, o crescimento e morfologia celular foram verificados em microscópio de epifluorescência.

Ao final do processo, alíquotas também foram retiradas para extração em fase sólida e posterior quantificação de microcistina-LR por cromatografia líquida de alta eficiência.

## 4.6 CONTROLE ANALÍTICO

### 4.6.1 Determinação da Concentração Celular por Contagem

As determinações da concentração celular, tanto de *D. subspicatus* como de *M. aeruginosa*, foram realizadas por meio de contagem em câmara de Neubauer (0,1 mm de profundidade) (Figura 10), utilizando as equações (10) e (11) para sua quantificação (MADIGAN *et al.*, 2010).



**Figura 10.** Representação da câmara de Neubauer: dimensões, campos e sentido de contagem (A); Fotomicroscopia da câmara de Neubauer preenchida com células de *M. aeruginosa* (Aumento de 400 vezes) (B). Fontes: Adaptado de Silveira (2012) (A); A autora (B).

$$\text{Concentração celular (células. mL}^{-1}\text{)} = X_A \times 10^4 \quad (10)$$

$$\text{Concentração celular (células.mL}^{-1}\text{)} = X_B \times 0,16 \times 10^6 \quad (11)$$

Onde:

- $X_A$  = média das contagens de células dos campos representados pela letra A;
- $X_B$  = média das contagens de células dos campos representados pela letra B

A escolha da equação a ser adotada foi condicionada à concentração celular. Em concentrações celulares entre  $10^4$  e  $10^5$  cél.mL<sup>-1</sup>, utilizou-se a equação (10). Em concentrações acima de  $10^5$  cél.mL<sup>-1</sup>, adotou-se a equação (11).

#### 4.6.2 Extração em Fase Sólida de Microcistina-LR (MC-LR)

Anteriormente a etapa de pré-concentração, as amostras foram submetidas a 3 ciclos de congelamento/descongelamento, com o objetivo de provocar a lise celular e consequente liberação da toxina intracelular.

Para o pré-tratamento das amostras, foram utilizados cartuchos de extração em fase sólida contendo fase estacionária octadecilsílica (1000 mg, Applied Separations®), em sistema *Manifold* (Agilent®) com controle de vácuo (bomba Logen Scientific®). Os cartuchos foram condicionados com metanol (10 mL) e água ultrapura (10 mL), seguido da aplicação da amostra, eluição em metanol (10 mL) e regeneração com acetonitrila (10 mL). A alíquota correspondente à eluição foi evaporada sob fluxo de ar comprimido, redissolvida em 500 µL de água ultrapura e homogeneizada por agitação em Vortex. A solução obtida foi transferida para *vials* e 50 µL injetados no sistema cromatográfico.



#### 4.6.3 Avaliação de Microcistina-LR (MC-LR) e Validação de Método Cromatográfico

As análises foram realizadas no sistema cromatográfico previamente descrito no item 4.2, com coluna C18 X-Terra® (Waters; 150 x 30 mm d. i., 3,5µm), precedida de coluna guarda com fase estacionária C18 (Phenomenex®). A fase móvel foi composta por solução de ácido trifluoacético 0,05% (A) e acetonitrila ou metanol (B), mantida em 0,3 mL.min<sup>-1</sup>. Os cromatogramas foram monitorados no intervalo de 190 a 450 nm, a coluna mantida a 25 °C e o volume de injeção foi de 50 µL.

As separações cromatográficas ocorreram por meio de dois métodos distintos:

- **Método A:** Condicionamento inicial a 35% de solvente B, de 35 a 50% de B em 15 minutos, de 50 a 100% de B em 10 minutos, 100% de B por 10 minutos. Retorno do gradiente em 5 minutos e o condicionamento da coluna por 30 minutos.
- **Método B:** 50% de B por 50 min; 55 a 100% de B em 2 min, mantendo-se em 100% por 20 min e retorno para 50% em 2 min.

Os cromatogramas foram analisados em 238 nm (comprimento de onda máximo da MC-LR) com auxílio do *software* LC Solution (LabSolution, Shimadzu).

A validação do método cromatográfico seguiu o guia da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para validação de métodos bioanalíticos (RE n° 899 de 2003). Foram avaliadas a seletividade, linearidade, precisão, exatidão e recuperação. Para a validação, foram utilizadas soluções de padrão certificado da toxina (Enzo Life Sciences, 95% pureza), preparadas na matriz experimental a partir de soluções estoque de 10 e 1 mg.L<sup>-1</sup>.

#### 4.6.4 Determinação de Peróxido de Hidrogênio

Os níveis de peróxido de hidrogênio residual utilizado no processo foto-Fenton foram avaliados com o reagente Allper® (Peróxidos do Brasil®), através de metodologia espectrofotométrica fundamentada na reação com titânio, adaptada de Schick e colaboradores (SCHICK *et al.*, 1997).

Este método baseia-se na reação entre o titânio e peróxido de hidrogênio, levando à formação de complexo de coloração amarelada, que absorve em 395 nm. Duas curvas analíticas (faixas de concentração de 10 a 50 mg.L<sup>-1</sup> ( $r = 0,9997$ ) e de 0,1 a 10 mg.L<sup>-1</sup> ( $r = 0,9997$ ) foram elaboradas com solução padrão de peróxido de hidrogênio (Peróxidos do Brasil®, 35% v/v).

Para as análises, foram adicionadas 6 gotas do reagente Allper®, para 6 mL de amostra filtrada com auxílio de seringa e *holder* contendo membrana de Nylon (0,45 micrometros). As amostras eram imediatamente lidas em espectrofotômetro após o término das reações. Diluições das amostras foram realizadas quando ultrapassado o limite máximo de quantificação, e o valores corrigidos com o fator de diluição.

#### 4.6.5 Determinações de Ferro II e Ferro III

As espécies Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> foram determinadas através de método baseado na reação de complexação entre Fe<sup>2+</sup> e o-fenantrolina (APHA, 1995).

O teor de Fe<sup>2+</sup> foi obtido por complexação direta com 0,3 mL de solução de o-fenantrolina (marca Vetec®, 10 g.L<sup>-1</sup>). Para as análises de ferro total, foram adicionados 0,2 mL de solução de hidroquinona (marca Vetec®, 12,5 g.L<sup>-1</sup>) para redução das espécies férricas, e posterior complexação com o-fenantrolina. Os complexos formados com o-fenantrolina levam à coloração alaranjada, monitorada em espectrofotômetro (508 nm).

Para a determinação das concentrações, foi elaborada curva analítica com sulfato ferroso amoniacal (Vetec®), com faixa de 0,1 a 4 mg.L<sup>-1</sup> ( $r = 0,9998$ ). Quando ultrapassado o limite de quantificação máximo, as amostras foram diluídas e a

concentração foi corrigida com o fator de diluição.

#### 4.7 ANÁLISES DOS DADOS

Os dados de contagem celular nos experimentos realizados com *D. subspicatus* foram analisados pelo teste *t Student* (95% de confiança), utilizando-se o *software* Statistica® versão 10 (Statsoft). Os demais resultados de concentração celular foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio do teste de Tukey, com auxílio do programa BioEstat 5.0 (95% de confiança).

Os gráficos foram confeccionados a partir de planilhas de dados utilizando os programas Excel® (Microsoft) e Origin Pro 8® (OriginLab Corporation).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 ESTUDOS COM A MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*

#### 5.1.1 Estudo dos Efeitos Isolados das Variáveis Envolvidas no Processo Foto-Fenton em Células de *Desmodesmus Subspicatus*

Inicialmente, os efeitos isolados das variáveis envolvidas no processo foto-Fenton (concentrações de peróxido de hidrogênio, ferro, radiação e agitação) foram avaliados nas células de *D. subspicatus* (Figura 11) diluídas em solução salina (0,9% p/v) em pH próximo da neutralidade, de modo a impedir a lise celular através da regulação da pressão osmótica (TORTORA, FUNKE E CASE, 2005).

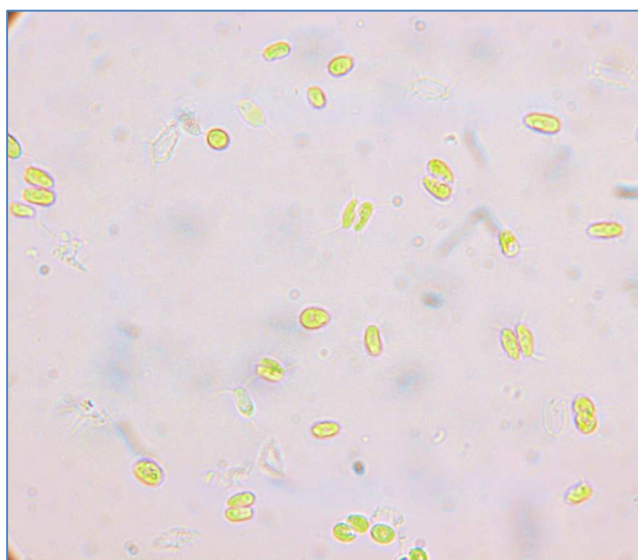


Figura 11. Aspecto morfológico da espécie *Desmodesmus subspicatus* (Aumento de 400 vezes)

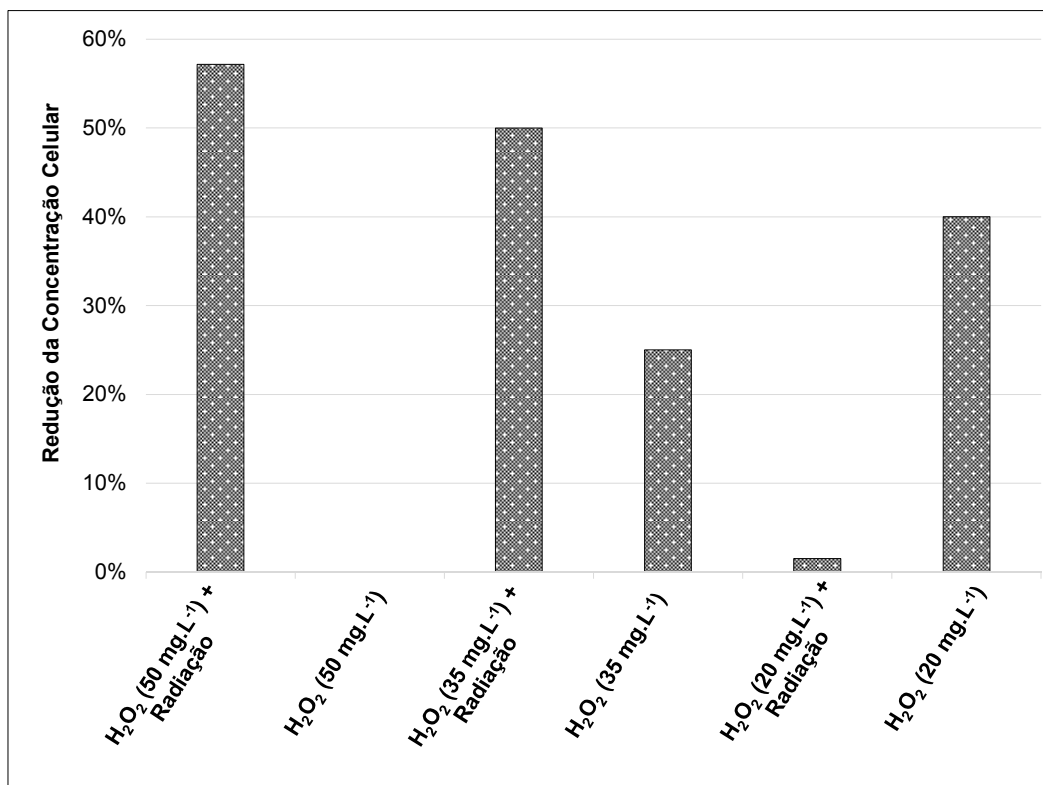
A principal finalidade desta primeira etapa foi ajustar condições experimentais (concentração dos reagentes, tempo de reação) em um modelo celular e estabelecer

a rotina experimental necessária ao cultivo e manuseio de um microrganismo fotossintetizante, sem incorrer nos riscos biológicos inerentes à cianobactérias.

As concentrações de ferro e de peróxido de hidrogênio foram baseadas em estudos nos quais o processo foto-Fenton foi aplicado em outros procariotos, devido à escassez de trabalhos aplicando-se o processo em microalgas ou cianobactérias (RODRÍGUEZ-CHUECA *et al.*, 2014; ORTEGA-GÓMEZ *et al.*, 2013; ORTEGA-GÓMEZ *et al.*, 2014). Foram escolhidos três níveis de concentração para as variáveis (5, 10 e 15 mg.L<sup>-1</sup> de ferro e 20, 35 e 50 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), estudadas de forma isolada, assim como o efeito sinérgico dos reagentes adicionados à radiação promovida pela lâmpada.

#### 5.1.1.1 Peróxido de Hidrogênio

Ao avaliar-se os efeitos das diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20, 35 e 50 mg.L<sup>-1</sup>) com ou sem a presença de radiação, não foram verificadas reduções significativas nas concentrações de células em relação ao controle (tempo 0) durante todos os experimentos (teste *t Student*, 95% de confiança), exceto naquele em que foram testados 50 mg L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e radiação. Neste caso, as concentrações celulares ficaram abaixo do limite de quantificação da câmara de Neubauer (<10<sup>4</sup> células.mL<sup>-1</sup>) e observou-se uma redução de 58% (Figura 12). No ensaio contendo 35 mg.L<sup>-1</sup> e radiação é possível verificar redução de aproximadamente 50%, no entanto o teste *t Student* indicou que as médias do controle e da amostra submetida à 35 mg.L<sup>-1</sup> e radiação são estatisticamente iguais (p=0,06, amostras independentes).



**Figura 12.** Representação gráfica da porcentagem de redução das concentrações celulares de *D. subspicatus* comparando-se os tempos 0 e 30 minutos (experimentos realizados com 50, 35 e 20 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com e sem a presença de radiação).

Do mesmo modo, o ensaio de viabilidade celular indicou crescimento de células em todas as amostras após 4 dias de incubação, exceto na amostra correspondente ao tempo 30 minutos cujo experimento continha 50 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e radiação, onde não foi constatado crescimento celular (Figura 13). Este resultado indica que, apesar das concentrações terem sido reduzidas a abaixo do limite de detecção da câmara de Neubauer (experimento com 50 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e radiação), ainda haviam células capazes de realizar a divisão celular, exceto após a exposição por 30 minutos em tal condição.

Inibição do crescimento significativa também foi constatada nos ensaios com 35 mg.L<sup>-1</sup> e radiação e 20 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sem radiação, onde o crescimento foi menor na amostra correspondente ao tempo 30 minutos, quando comparada ao controle (t=0 minutos). Uma vez que não houve inibições no crescimento nos experimentos com 20 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e radiação, e 35 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (sem radiação), a inibição no crescimento no experimento com apenas 20 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se mostrou um resultado incoerente.

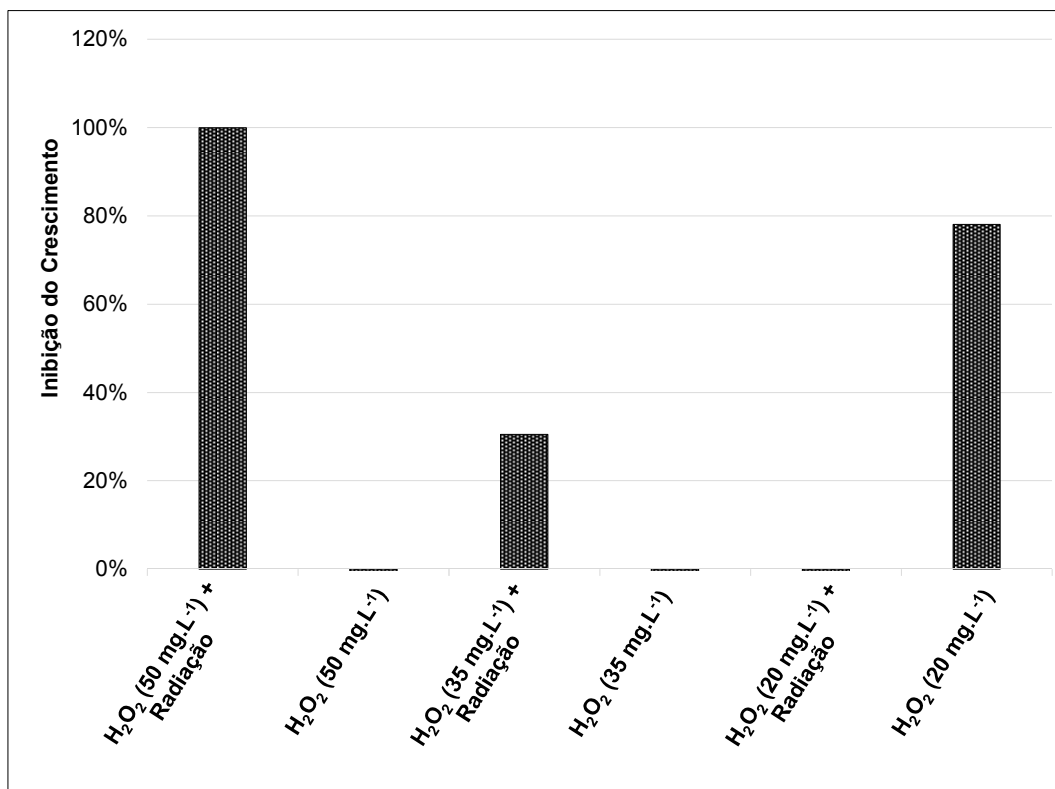
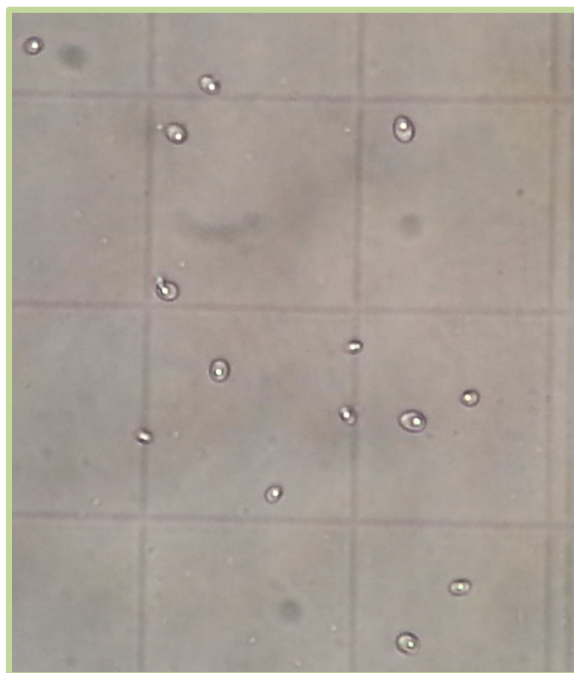


Figura 13. Representação gráfica da porcentagem de inibição do crescimento de *D. subspicatus* comparadas ao controle (t=0 minutos), constatadas nos ensaios de viabilidade celular, após 30 minutos de exposição a 50, 35 e 20 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com e sem a presença de radiação.

Polo-López e colaboradores (2012) destacaram o potencial do processo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV-Vis na inativação de microrganismos. Apesar do mecanismo ainda não ser esclarecido, há evidências do efeito sinérgico entre o peróxido de hidrogênio e radiação ultravioleta-visível (100-700 nm), capaz de inativar microrganismos. Os autores reportaram a inativação de esporos do fungo *Fusarium solani* através da radiação solar e adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na concentração de 10 mg.L<sup>-1</sup> em suspensão de 10<sup>3</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Similarmente, Ortega-Gómez *et al.* (2013) apontaram a eficiência da radiação UV-Visível combinada ao peróxido de hidrogênio (10, 20 e 50 mg.L<sup>-1</sup>) na inativação da bactéria *Enterococcus faecalis*. Tais resultados, quando comparados aos obtidos no experimento em que avaliou-se os efeitos do peróxido de hidrogênio e da radiação em *D. subspicatus*, corroboram com as evidências do potencial oxidativo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> combinado à radiação.

Ainda que o ensaio de viabilidade tenha indicado crescimento de células em quase todas as amostras, foram encontradas células com morfologia alterada em relação à coloração (Figura 14), nas amostras provenientes dos ensaios com 35 e

50 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (com e sem a presença de radiação). A aparente despigmentação observada em alguns campos pode ser indicativo de alteração provocada pela oxidação de fotossistemas.



**Figura 14. Células de *Desmodesmus subspicatus* observadas no ensaio de viabilidade após exposição ao peróxido de hidrogênio (35 e 50 mg.L<sup>-1</sup>) e radiação (Aumento de 400 vezes)**

Quanto às medições de turbidez, não foram constatadas alterações significativas durante todos os experimentos, bem como para as análises de peróxido de hidrogênio, que não foi significativamente consumido em nenhum dos ensaios realizados (Tabela 1).



**Tabela 1. Parâmetros de monitoramento das análises dos efeitos de diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (com e sem radiação) nas células de *Desmodosmus subspicatus***

<b>50 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Radiação</b>					
<b>Tempo (min)</b>	<b>Concentração Celular (10.000 cél.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Viabilidade Celular (10.000 cél.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Turbidez (NTU)</b>	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Luminosidade (x100 Lux)</b>
0	0,87 (±0,2) *	65,70 (±4,59) *	6,76	51,24	450
15	0,25 (±0,0)	10,40 (±3,45)	6,27	49,97	360
30	0,37 (±0,5)	<LQ	5,41	48,70	415
<b>50 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>					
0	16,30 (±5,30) *	121,10(±10,65) *	6,73	54,81	
15	15,00 (±7,07)	46,40 (±40,07)	6,51	49,52	N.A
30	18,10 (±0,17)	108,00 (±40,09)	7,40	48,55	
<b>35 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Radiação</b>					
0	9,50 (±2,12) *	198,00 (±15,50) *	2,96	35,18	430
7	7,88 (±3,36)	105,00 (±84,60)	2,63	33,77	590
15	8,75 (±2,12)	190,00 (±22,50)	2,61	34,41	612
30	4,00 (±0,00)	137,00 (±15,00)	2,46	31,91	600
<b>35 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>					
0	8,50 (±0,70) *	11,50 (±3,60) *	2,61	32,23	
7	4,75 (±0,00)	16,80 (±7,69)	2,79	34,10	N.A
15	3,63 (±1,94)	23,00 (±2,57)	3,56	35,22	
30	6,38 (±3,01)	51,60 (±21,30)	2,80	35,69	
<b>20 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Radiação</b>					
0	8,38 (±0,88) *	7,29 (±2,6) *	2,14	19,95	430
7	8,88 (±1,94)	239,00(±49,10)	2,13	19,71	540
15	9,88 (±2,65)	31,20 (±3,17)	2,58	19,71	560
30	8,25 (±1,76)	275,00 (±90,50)	2,01	19,34	470
<b>20 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>					
0	8,50 (±3,18) *	56,10 (±15,30) *	2,10	19,44	
7	7,75 (±3,54)	33,50 (±4,98)	2,05	19,58	N.A
15	6,38 (±2,65)	29,30 (±14,00)	2,02	19,20	
30	5,63 (±1,24)	12,30 (±1,34)	2,07	19,33	

**Legenda:** (N.A) representa parâmetro não aplicável; (<LQ) representam concentrações abaixo do limite de quantificação do método; LQ = 1x10<sup>4</sup> cél.mL<sup>-1</sup>; (\*) amostras controle

### 5.1.1.2 Ferro ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ )

As diferentes concentrações de ferro (na forma de sulfato ferroso, complexadas com ácido oxálico), testadas com ou sem a presença de radiação nas células de *Desmodemus subspicatus*, também não indicaram reduções significativas na densidade celular, ao longo dos experimentos (teste *t Student*, 95% de confiança) (Figura 15).

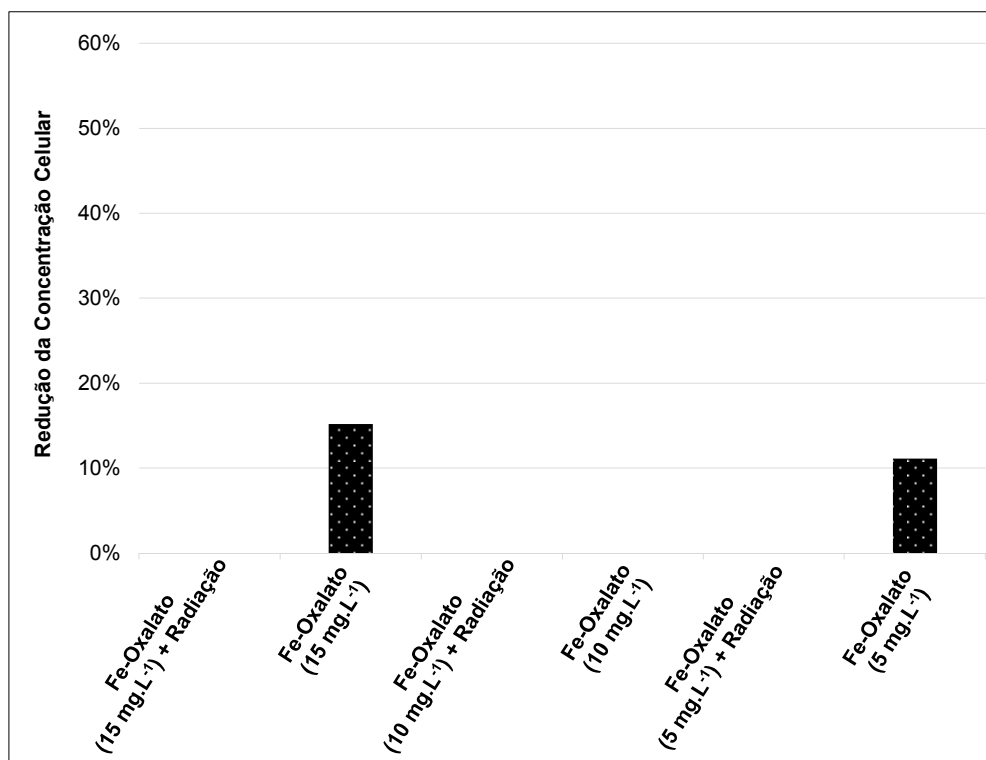
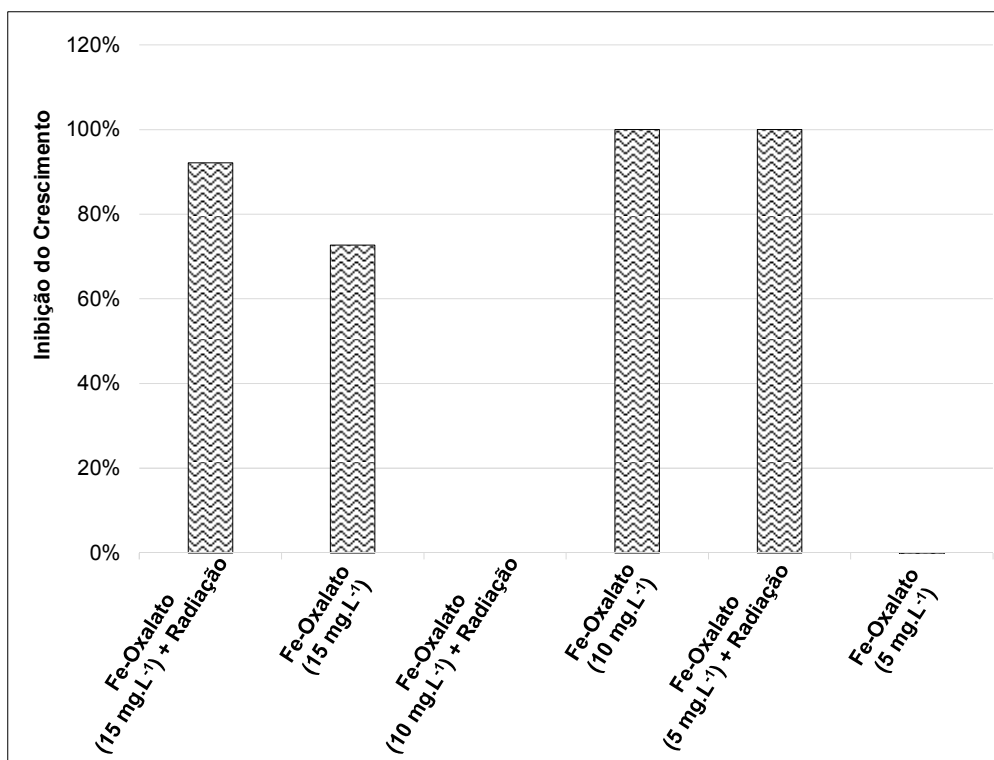


Figura 15. Representação gráfica da porcentagem de redução das concentrações celulares de *D. subspicatus* comparando-se os tempos 0 e 30 minutos, durante os experimentos realizados com 5, 10 e 15 mg.L<sup>-1</sup> de Ferro-Oxalato, com e sem a presença de radiação.

Os ensaios de viabilidade apontaram crescimento celular em todas as alíquotas retiradas dos experimentos contendo 15 e 5 mg.L<sup>-1</sup> com a presença de radiação, e na amostra contendo apenas 15 mg.L<sup>-1</sup> de Fe-oxalato. No entanto, este crescimento foi significativamente maior na amostra controle (t=0 minutos), quando comparada ao t=30 minutos, apontando forte inibição (ANOVA, 95% de confiança) (Figura 16).

Os ensaios nos quais foram avaliados os efeitos do ferro nas concentrações de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ , com e sem a presença de radiação, indicaram crescimento nos controles ( $t=0 \text{ min}$ ), todavia as alíquotas correspondentes a 30 minutos reacionais apresentaram crescimento abaixo do limite de quantificação, fato no qual pode ser um indicativo que tal concentração de ferro é capaz de afetar a capacidade de divisão celular, impedindo seu crescimento.

Por fim, a concentração de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  de Fe-Oxalato (na ausência de radiação), apontou crescimento para todas as amostras reinoculadas.



**Figura 16.** Representação gráfica da porcentagem de inibição do crescimento de *D. subspicatus* comparadas ao controle ( $t=0$  minutos), constatadas nos ensaios de viabilidade celular, após exposição a 5, 10 e  $15 \text{ mg.L}^{-1}$  de Ferro-Oxalato, com e sem a presença de radiação.

Ainda que tenha sido verificado crescimento, foram constatados, nos ensaios de viabilidade em que as concentrações de 10 e  $15 \text{ mg.L}^{-1}$  foram empregadas (com e sem radiação) alterações na morfologia de algumas células da microalga (Figura 17). Quando comparadas a células saudáveis, foi possível notar aparente

desestruturação da membrana, alterações no interior das células e tamanho (maior do que o convencional).

Alguns autores atribuíram o efeito do  $\text{Fe}^{2+}$  em células de *E. coli* à sua facilidade em difundir para o meio intracelular. Ao elevar-se as concentrações de  $\text{Fe}^{2+}$ , a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) pode ser elevada por meio da reação de Fenton intracelular, aumentando os danos causados às células (SPUHLER *et al.*, 2010; ORTEGA-GÓMEZ *et al.*, 2013; RODRÍGUEZ-CHUECA *et al.*, 2014; ORTEGA-GÓMEZ *et al.*, 2014). Spuhler e colaboradores (2010) ainda sugeriram que o  $\text{Fe}^{3+}$  é capaz de adsorver à parede celular, levando à formação de complexos  $\text{Fe}^{3+}$ -bactéria.

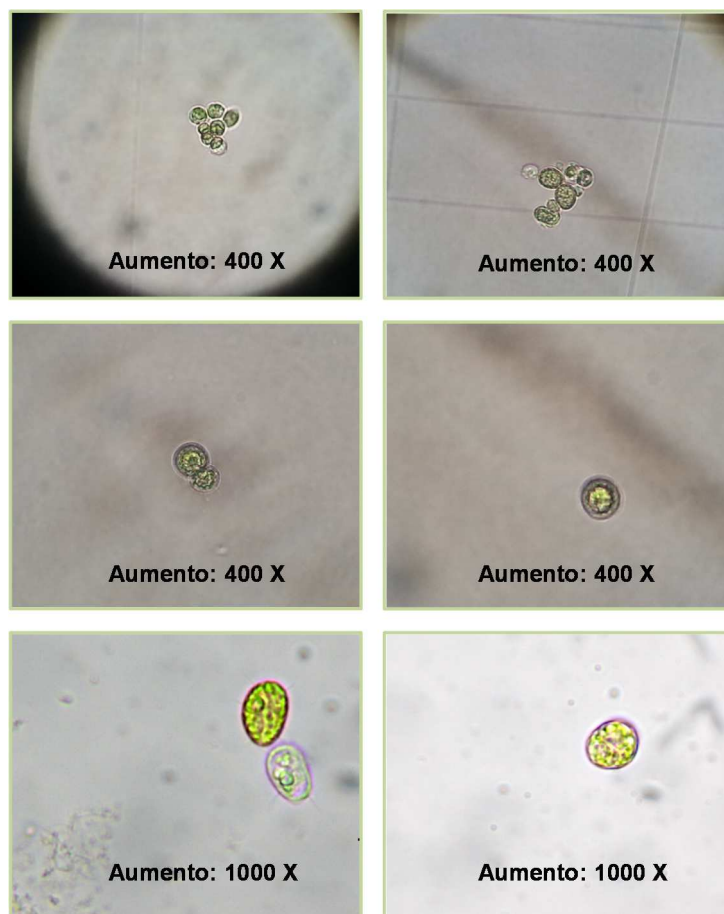


Figura 17. Células de *Desmodesmus subspicatus* observadas no ensaio de viabilidade após exposição ao ferro (10 e 15 mg.L<sup>-1</sup>).

Mais uma vez, nos experimentos em que houve a presença de radiação, observou-se um efeito de branqueamento nas células de *D. subspicatus* (Figura 18).

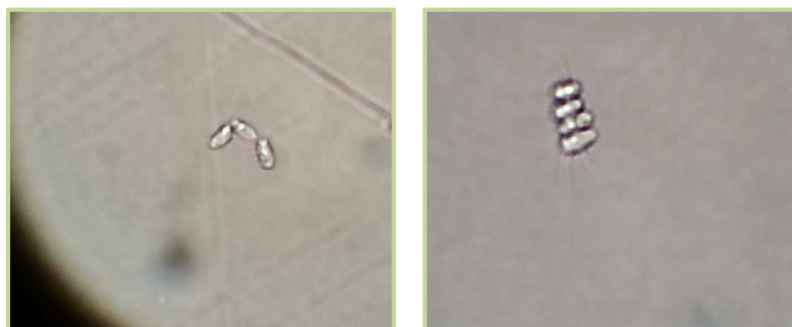


Figura 18. Células de *Desmodesmus subspicatus* observadas no ensaio de viabilidade após exposição ao ferro e radiação (Aumento de 400 vezes).

Quanto ao controle analítico, verificou-se que a proporção entre ferro e ácido oxálico utilizada (1:3) foi satisfatória para manter a espécie  $Fe^{2+}$  dissolvida. Conforme destacado por Pignatello e colaboradores, o complexo ferro-orgânico mais estável se dá pela ligação de três íons oxalatos e um férrico (PIGNATELLO *et al.*, 2006). No entanto, nos ensaios em que a radiação esteve presente foi constatada a precipitação do ferro, muito provavelmente associada à fotodegradação dos complexos ferro-orgânicos, ocasionando a precipitação na forma de óxidos devido ao pH neutro. Os dados de monitoramento da turbidez corroboram com tais resultados, indicando aumento da mesma conforme procedeu-se os experimentos na presença de radiação (Tabela 2).

Schmitz, Dal Magro e Colla (2012) salientaram a alta capacidade de microalgas, especialmente da microalga *Spirulina patensis*, na bioabsorção de metais tais como cromo, zinco e chumbo, reduzindo assim as concentrações destes metais em soluções aquosas e em efluentes. Além da bioabsorção (interações físico-químicas dos metais aos componentes da parede celular, dada pelo rápido contato do organismo com o metal), a exposição prolongada ao metal (horas ou dias) pode provocar a bioacumulação, que é a difusão do metal para o interior da célula por meio de mecanismos complexos de transporte passivo e ativo, dependentes de uma série de fatores (KAPLAN, 2013).

Tais referências podem clarificar as reduções nas concentrações do ferro ao longo dos experimentos de exposição da *D. subspicatus* ao metal (além da sua precipitação), assim como os efeitos na morfologia das células e a inibição do crescimento (ensaio de viabilidade celular), uma vez que metais podem provocar efeitos tóxicos quando presentes no meio intracelular, dada as concentrações de exposição relativamente altas (ordem de miligramas por litro).

Tabela 2. Parâmetros de monitoramento das análises dos efeitos de diferentes concentrações de Fe-Oxalato (com e sem radiação) nas células de *Desmodesmus subspicatus*

<b>Ferro-Oxalato (15 mg/L) + Radiação</b>						
Tempo (min)	Concentração Celular (10.000 cél.mL <sup>-1</sup> )	Viabilidade Celular (10.000 cél.mL <sup>-1</sup> )	Turbidez (NTU)	Fe <sup>Total</sup> Dissolvido (mg.L <sup>-1</sup> )	Fe <sup>2+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	Luminosidade (x100 Lux)
0	7,50 (±3,18) *	26,90 (±10,07) *	2,17	14,74	12,63	540
7	9,50 (±3,18)	5,25 (±2,25)	2,32	14,89	14,26	550
15	6,63 (±1,24)	1,63 (±0,45)	2,37	14,67	14,96	610
30	8,50 (±0,70)	2,13 (±1,02)	4,41	13,72	14,13	650
<b>Ferro-Oxalato (15 mg.L<sup>-1</sup>)</b>						
0	9,88 (±0,88) *	27,00 (±15,70) *	2,08	14,23	13,29	
7	5,50 (±2,83)	13,00 (±1,75)	2,25	13,93	13,15	N.A
15	9,13 (±0,84)	4,79 (±0,87)	2,19	14,21	13,01	
30	8,38 (±0,53)	7,38 (±1,63)	2,25	14,38	14,22	
<b>Ferro-Oxalato (10 mg.L<sup>-1</sup>) + Radiação</b>						
0	7,88 (±0,84) *	3,54 (±1,23) *	1,91	11,32	8,71	510
7	7,50 (±0,00)	1,00 (±0,00)	22,70	4,64	3,99	680
15	5,75 (±1,41)	2,63 (±0,12)	23,70	3,60	3,21	700
30	9,25 (±1,06)	2,13 (±1,77)	34,90	1,69	2,20	760
<b>Ferro-Oxalato (10 mg.L<sup>-1</sup>)</b>						
0	10,5 (±0,07) *	115,00 (±24,20) *	9,23	10,06	9,37	
15	11,30 (±2,47)	<LQ	8,63	10,31	9,26	N.A
30	13,00 (±5,30)	<LQ	8,95	10,63	9,85	
<b>Ferro-Oxalato (5 mg.L<sup>-1</sup>) + Radiação</b>						
0	5,63 (±0,17) *	15,50 (±6,03) *	2,20	6,32	2,92	500
7	6,00 (±1,77)	1,67 (±0,31)	17,00	1,68	0,72	530
15	4,88 (±1,24)	1,75 (±0,33)	18,20	1,25	0,44	530
30	7,00 (±0,70)	1,33 (±1,12)	19,50	<LQ	<LQ	450
<b>Ferro-Oxalato (5 mg.L<sup>-1</sup>)</b>						
0	6,75 (±1,41) *	17,70 (±4,02) *	2,30	6,86	5,02	
7	5,13 (±1,24)	20,30 (±1,56)	2,19	5,55	4,98	N.A
15	7,00 (±1,41)	85,60 (±4,81)	2,12	5,50	5,09	
30	6,00 (±0,70)	52,50 (±29,30)	2,07	5,55	4,87	

Legenda: (N.A) representa parâmetro não aplicável; (<LQ) representam concentrações abaixo do limite de quantificação do método; LQ (Concentração Celular) =  $1 \times 10^4$  cél.mL<sup>-1</sup>; LQ (Ferro) = 0,1 mg.L<sup>-1</sup>

### 5.1.1.3 Agitação Magnética, Radiação e Ácido Oxálico

A avaliação da agitação magnética, da radiação e do ácido oxálico isolados não apontaram efeitos deletérios às células de *D. subspicatus*, no que se refere à redução da concentração e crescimento celular. Cabe ressaltar que o ácido oxálico foi testado na maior concentração ( $45 \text{ mg.L}^{-1}$ ) durante os experimentos com o ferro.

Observou-se, no entanto, que as células submetidas à radiação se mostraram empalidecidas quando inoculadas no meio de cultivo (ensaio de viabilidade), assim como em todos os outros ensaios de viabilidade em que as microalgas foram sujeitadas à radiação e ferro ou peróxido de hidrogênio (Figura 19).



**Figura 19. Células de *Desmodesmus subspicatus* observadas no ensaio de viabilidade após exposição à radiação (Aumento de 400 vezes).**

### 5.1.2 Aplicação do Processo Foto-Fenton Mediado por Complexo Ferro-Oxalato nas Células de *Desmodesmus subspicatus*

A escolha das concentrações de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  a serem combinadas no processo foto-Fenton foram condicionadas ao menor efeito ou efeito nulo observado sobre as células de *Desmodesmus subspicatus*, a fim de estudar o potencial dos efeitos sinérgicos das variáveis no processo foto-Fenton. Uma vez que nenhuma variável isolada foi capaz de reduzir as concentrações celulares (exceto a concentração de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença de radiação), a escolha da

condição a ser aplicada foi baseada nos resultados dos ensaios de crescimento celular (viabilidade).

Considerando que a única concentração de  $\text{Fe}^{2+}$  com efeito nulo no crescimento celular da microalga foi de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  (na ausência de radiação), optou-se por adotar tal concentração, combinada com a menor concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $20 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Uma vez escolhida a condição, o processo foto-Fenton foi aplicado por 135 minutos (Tabela 3).

**Tabela 3. Parâmetros de monitoramento do processo foto-Fenton aplicado às células de *Desmodesmus subspicatus***

Parâmetro	Tempo (min)			
	0	30	90	135
Concentração Celular ( $100.000 \text{ cél.mL}^{-1}$ )	$1,34 \pm 0,08$	$1,79 \pm 0,51$	$1,19 \pm 0,12$	$1,30 \pm 0,21$
Turbidez (NTU)	8,5	30,0	31,3	32,0
Peróxido de Hidrogênio ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	17,76	11,45	7,78	7,05
Fe Total Dissolvido ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	3,52	0,17	0,12	0,27
Fe <sup>2+</sup> ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	0,53	<LQ	<LQ	0,15
Luminosidade ( $\times 100 \text{ Lux}$ )	900	920	790	870
Viabilidade Celular ( $1 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$ )	$1,06 \pm 0,32$	0,0	0,0	0,0
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	27	30	35	32

Legenda: (<LQ) representam concentrações abaixo do limite de quantificação do método; LQ =  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$

Ao aplicar-se o foto-Fenton nas células da microalga não foi possível constatar reduções significativas na concentração celular imediata ao processo. No entanto, as análises em microscópio de epifluorescência apontaram redução na intensidade de emissão das células, quando comparadas a células saudáveis (Figura 20), já a partir de 90 minutos de submissão ao processo.

Uma vez que a emissão de células fotossintetizantes é atribuída à clorofila, e que os fotossistemas estão intimamente conectados a outras vias metabólicas importantes, alterações na fluorescência pode ser um indicativo que danos oxidativos podem ter ocorrido em seus fotossistemas, que por sua vez podem desencadear em outros danos nas células, reduzindo sua capacidade de crescimento (viabilidade).



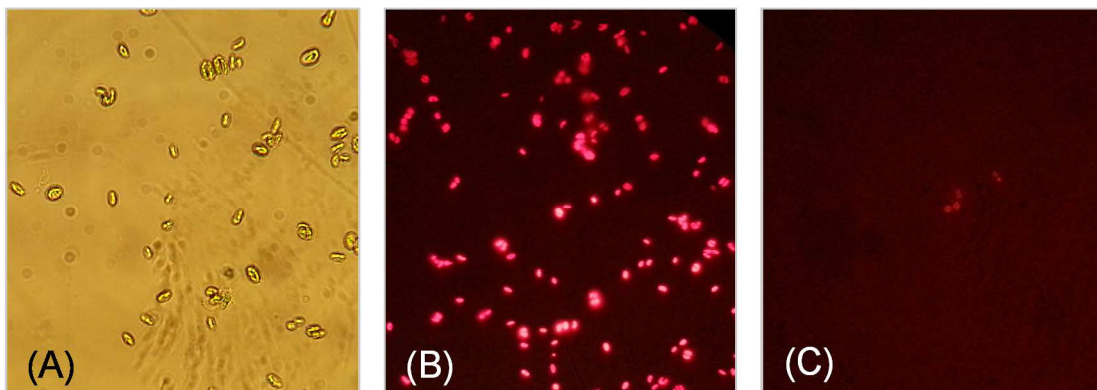


Figura 20. Células de *Desmodesmus subspicatus* saudáveis observadas em microscópio de luz (A); Células de *Desmodesmus subspicatus* saudáveis observadas em microscópio de epifluorescência (B); Células de *Desmodesmus subspicatus* com alteração na intensidade de emissão em microscópio de epifluorescência, após submetidas ao processo foto-Fenton (C). (Aumento de 400 vezes).

Quanto ao ensaio de viabilidade celular, foi constatado crescimento apenas na amostra controle, não tendo sido observado crescimento de células nas amostras coletadas em 30, 90 e 135 minutos de reação. Estes resultados podem ser um indicativo de que a partir de 30 minutos de reação a capacidade de crescimento das células foi afetada, e condizem com os possíveis danos causados aos fotossistemas (indicados pelas análises em microscópio de epifluorescência).

No que diz respeito ao monitoramento das concentrações de peróxido de hidrogênio, a redução da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ficou na ordem de 60%, permanecendo aproximadamente  $7,05 \text{ mg.L}^{-1}$  residuais (Tabela 3).

Ao longo do processo a concentração de ferro total dissolvido foi bastante reduzida, na ordem de 92% em 135 minutos. Da mesma forma, a reação foi iniciada com  $0,53 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ , de modo que em 30 e 90 minutos as concentrações se apresentaram abaixo do limite de quantificação, demonstrando que todo ferro dissolvido encontrava-se na forma de  $\text{Fe}^{3+}$ . Contudo, em 135 minutos de reação, houve um aumento acentuado nas concentrações de ferro total dissolvido e  $\text{Fe}^{2+}$ .

Polo-López *et al.* (2012) estudaram os efeitos do processo foto-Fenton solar nos esporos do fungo *Fusarium solani*, através da combinação de radiação solar,  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Os experimentos foram realizados com concentração inicial de  $10^3 \text{ UFC mL}^{-1}$ , que foram reduzidas apenas após 4 horas de exposição, de modo que após este período o limite de detecção foi atingido. Ao aplicar-se o processo foto-Fenton nas células de *D. subspicatus*, reduções nas

concentrações celulares não foram observadas em 135 minutos de reação. Estes resultados podem ser indicativos de que maiores eficiências de redução na concentração celular podem ser atingidas em maiores tempos de reação, dada a baixa concentração de reagentes adotada.

No estudo de Steriti e colaboradores (2014), a reação de Fenton foi aplicada a células da microalga *Chlorella vulgaris*, no entanto o objetivo era avaliar a eficiência do processo no rompimento das células como forma de extração dos lipídios, visando a produção de biocombustíveis. Ao aplicar 3,79 g.L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub> e 204,08 g.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a extração dos lipídios foi duas vezes maior quando comparada aos métodos convencionais de extração, após 3 minutos de exposição aos reagentes, apontando a eficiência do processo no rompimento das células. Cabe destacar, neste estudo, a alta concentração de reagentes adotada.

Segundo Soares e colaboradores, o decaimento no consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> combinado à redução das concentrações de ferro dissolvido, durante a reação, são indicativos da baixa velocidade das reações de degradação, associada à formação de complexos de ferro com a matéria orgânica dissolvida. Tais complexos reduzem significativamente a fotorredução do Fe<sup>3+</sup> para Fe<sup>2+</sup>, levando à redução do consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A baixa velocidade de reação indica que estes complexos de ferro com matéria orgânica são bastante estáveis e possuem baixa foto-atividade. No entanto, após um período de baixa produção de radicais hidroxila, pode-se observar leve aumento nas concentrações de ferro dissolvido e aumento no consumo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indicando que os complexos de ferro e matéria orgânica foram degradados (SOARES *et al.*, 2015). Tais comportamentos nas concentrações de ferro e peróxido de hidrogênio foram observados neste experimento.

Cho *et al.* (2004), ao aplicar o processo foto-Fenton mediado por Fe-Oxalato em células de *E. coli* (concentrações de 5,5 mg.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>3+</sup>, 68 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 450 mg.L<sup>-1</sup> de ácido oxálico), reduziram concentrações médias de 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> para abaixo do limite de detecção em 75 minutos. Os autores ressaltaram os radicais C<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>•-</sup>, CO<sub>2</sub><sup>•-</sup> e O<sub>2</sub><sup>•-</sup> com potencial de inativação das células no processo mediado por Fe-Oxalato.

De forma análoga, Ortega-Gómez *et al.* (2013) testaram o efeito do processo foto-Fenton em *Enterococcus faecalis*, utilizando reator do tipo Cilíndrico Parabólico Composto (CPC) e 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> como concentração inicial de células, 50 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 20 mg.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>, em diferentes matrizes. O limite de detecção para a

concentração de células foi atingido em todas as matrizes testadas (solução salina, efluente secundário sintético e água ultrapura com padrão de matéria orgânica) após 50 minutos de reação. Adicionalmente, quando testada a inativação das bactérias em solução salina, o peróxido de hidrogênio foi totalmente consumido em 80 minutos de reação.

Dado que as concentrações dos reagentes aplicadas no estudo de Ortega-Gómez *et al.* (2013) foram significativamente maiores do que as do presente estudo, e que maiores eficiências foram obtidas e menor tempo, sugere-se que em condições mais brandas dos reagentes, maiores tempos de reação podem ser requeridos a fim de proporcionar maiores eficiências de inativação de *Desmodesmus subspicatus* e, conseqüentemente, maior consumo de peróxido de hidrogênio e ferro. No entanto, deve-se obviamente levar em consideração a complexidade de cada um dos organismos avaliados em ambos os estudos, assim como a diferença das matrizes reacionais

De modo geral, os resultados obtidos com o modelo experimental adotado demonstraram que o ácido oxálico não contribuiu de forma significativa para a conservação do ferro na forma dissolvida. Do mesmo modo, os ensaios com a presença da radiação apontaram forte efeito sobre as células da microalga. Isto posto, estes fatores foram considerados para os estudos com as células de *Microcystis aeruginosa*.

## 5.2 ESTUDOS COM A CIANOBACTÉRIA *Microcystis aeruginosa*

### 5.2.1 Composição da Matriz Reacional

Anteriormente à validação do método cromatográfico para determinação de MC-LR e à realização dos ensaios com *M. aeruginosa*, teve-se a preocupação em escolher uma matriz reacional que simulasse uma amostra de água real (quanto às concentrações de nitrogênio e fósforo, e pH próximo à neutralidade), e que, no entanto, possuísse composição conhecida e não influenciasse a viabilidade das células. Deste modo, optou-se por modificar as concentrações dos sais presentes no

meio de cultivo ASM-1 (Anexo B), baseando-se nas concentrações de nitrogênio em forma de íons nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e fósforo na forma de ortofosfato ( $\text{PO}_4^-$ ).

As concentrações adotadas foram  $23 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NO}_3^-$  (correspondentes a  $8 \text{ mg.L}^{-1}$  de nitrogênio - Solução A do meio ASM-1) e  $3 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  de  $\text{PO}_4^{3-}$  (Solução B do meio ASM-1) baseadas em estudos desenvolvidos nos reservatórios de água do Rio Verde e Rio Iraí, localizados no estado do Paraná (Brasil) (LAGOS, 2009; CERUTTI, 2015). As demais soluções que compõe o meio ASM-1 (C e D) foram adicionadas na mesma concentração utilizada para o cultivo das cianobactérias, e o pH manteve próximo à neutralidade.

### 5.2.2 Otimização da Extração em Fase Sólida e Condições Cromatográficas para Microcistina-LR

A otimização do método de extração em fase sólida para determinação de microcistina-LR foi realizada em amostras de cultivo de *Microcystis aeruginosa* com concentração aproximada de  $2 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$ , diluídas na matriz reacional (meio ASM-1 modificado), a fim de se obter a concentração de  $1 \times 10^5 \text{ cél.mL}^{-1}$ . Após a diluição, as amostras foram submetidas a 3 ciclos de congelamento e descongelamento, com o objetivo de provocar a ruptura das células e consequente liberação da toxina intracelular para o meio extracelular, resultando, desta forma, na determinação de microcistina-LR total.

As etapas da extração consistiram na ambientação do cartucho de octadecilsílica e aplicação de 180 mL de amostra, seguida das etapas de *clean-up* e secagem do cartucho por 10 min (quando presentes), e eluição e limpeza do cartucho.

As alíquotas denominadas “*clean-up*” são referentes às coletadas na aplicação de 10 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O (20:80) para eluição de impurezas e/ou interferentes. Já as alíquotas denominadas “*eluato*”, são da aplicação de 10 mL de MeOH para eluição do analito de interesse.

O fator de pré-concentração obtido para otimização das condições cromatográficas e do SPE foi de 360 vezes, e foram testadas a presença ou não das

etapas de *clean-up* e secagem do cartucho. A figura 21 elucida as diferentes condições testadas no processo de otimização da extração em fase sólida.

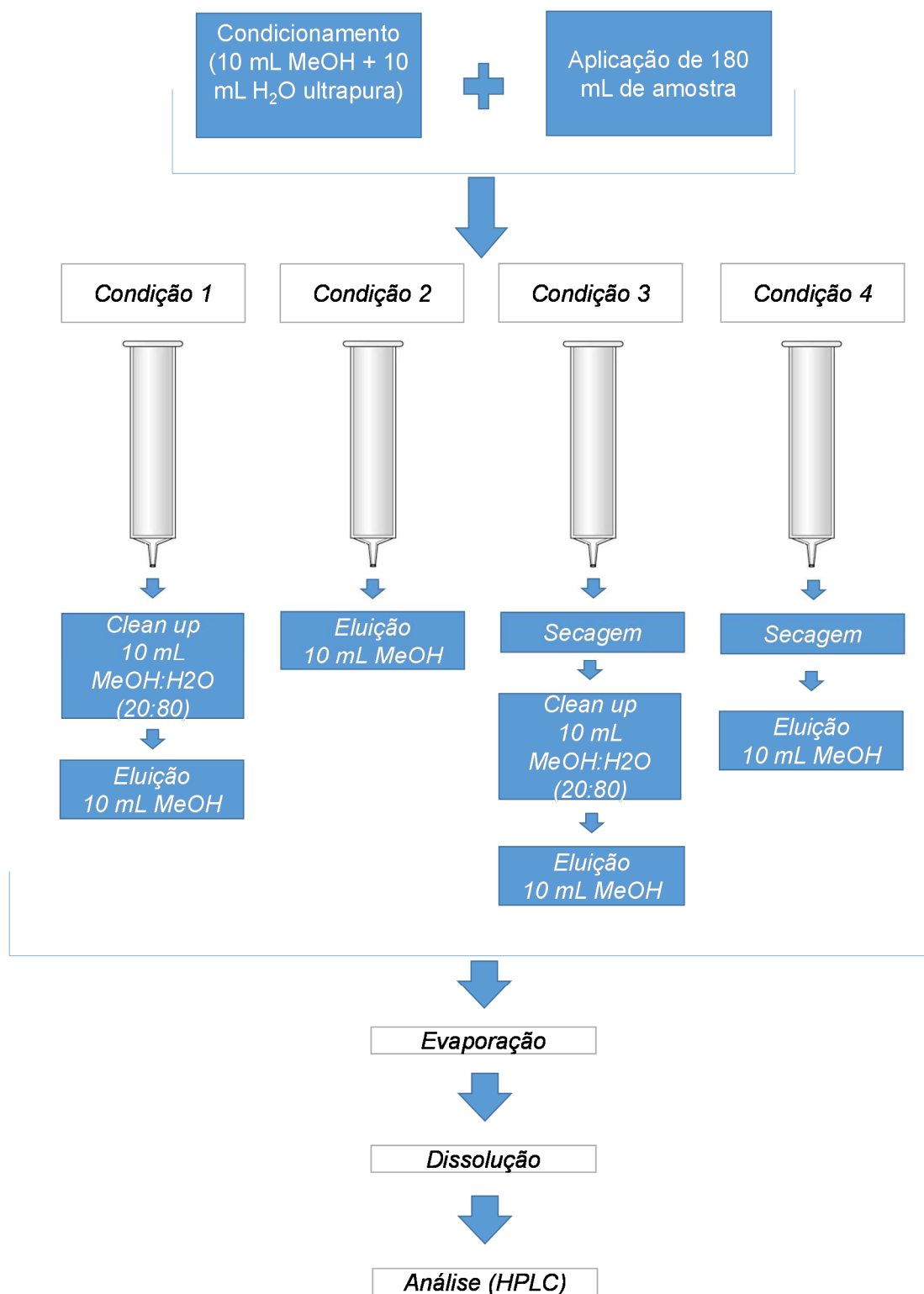


Figura 21. Fluxograma explicativo das diferentes condições utilizadas para otimização da extração em fase sólida

A fim de melhorar a resolução dos picos de MC-LR nos cromatogramas, foram testadas diferentes condições de separação (alterações na inclinação da rampa do gradiente ( $\Delta\%$ ACN/minuto) e do modificador orgânico) (Quadro 4).

Condição Cromatográfica	Modificador Orgânico (Solvente B)	Gradiente
1°	ACN	Inicial: 30% de B; 30 a 50% de B em 15 min ( $\Delta\%$ ACN/minuto=1,33); de 50 a 100% (em 40 min), mantendo-se em 100% por 10 min e retorno para 30% em 5 min
2°	ACN	Inicial: 35% de B; 35 a 50% de B em 15 min ( $\Delta\%$ ACN/minuto=1,0); de 50 a 100% (em 15 min), mantendo-se em 100% por 10 min e retorno para 35% em 5 min
3°	ACN	Inicial: 35% de B; 35 a 50% de B em 20 min ( $\Delta\%$ ACN/minuto=0,75); de 50 a 100% (em 10 min), mantendo-se em 100% por 10 min e retorno para 35% em 5 min
4°	ACN	Inicial: 35% de B; 35 a 50% de B em 30 min ( $\Delta\%$ ACN/minuto=0,5); de 50 a 100% (em 10 min), mantendo-se em 100% por 10 min e retorno para 35% em 5 min
5°	MeOH	Inicial: 45% de B; 45 a 70% de B em 50 min ( $\Delta\%$ MeOH/minuto=0,5); de 70 a 100% (em 10 min), mantendo-se em 100% por 10 min e retorno para 45% em 5 min

**Quadro 4. Condições cromatográficas testadas na separação de MC-LR na etapa de otimização da extração em fase sólida**

Os cromatogramas das alíquotas referentes ao *clean-up* e eluição do cartucho foram comparados com o cromatograma e o espectro de absorção UV do padrão de MC-LR (1 mg.L<sup>-1</sup>, preparada em H<sub>2</sub>O ultrapura), nas mesmas condições cromatográficas.

Os cromatogramas dos eluatos (utilizando-se a primeira condição cromatográfica indicada no Quadro 4) nas diferentes condições de SPE, apontaram a presença do pico de microcistina-LR, quando comparados com o cromatograma e perfil espectral UV do padrão da toxina.

Os cromatogramas das amostras de *clean-up* apontaram que esta etapa poderia ser descartada, uma vez que não colaborou para limpeza dos cromatogramas no que se refere à interferentes e impurezas, e ainda demonstrou eluição de parte do analito de interesse (Figura 22). Do mesmo modo, a etapa de secagem do cartucho não indicou melhorias de limpeza ou recuperação

significativas, demonstrando ser desnecessária no processo de pré-concentração das amostras.

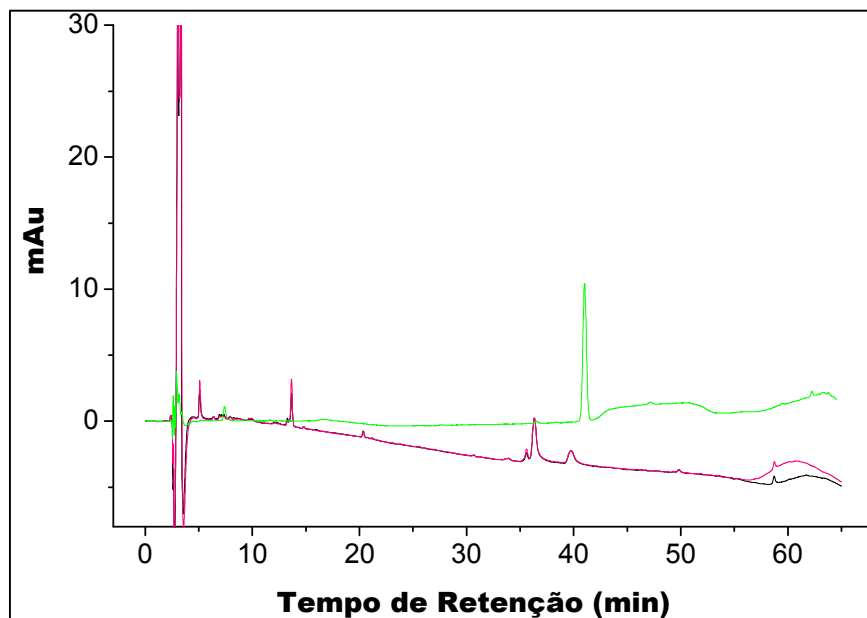


Figura 22. Cromatogramas ( $\lambda=238$  nm) das amostras de *Clean up* (condição 1 e 3), comparadas ao padrão de MC-LR ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Legenda: (—) Condição 1; (—) Condição 3; (—) Padrão de MC-LR ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

Desta forma, a condição escolhida como ótima dentre as testadas foi a condição 2 (Figura 21). No entanto, uma má resolução dos picos no  $t_r$  da MC-LR foi observada. A fim de melhorar esta resolução, foram testadas novas condições de separação (indicadas no Quadro 4), na amostra referente ao eluato da condição escolhida.

Embora a separação dos analitos tenha sido aprimorada com as alterações realizadas no método utilizando a ACN como solvente orgânico, a separação do pico de MC-LR não foi completa. Decidiu-se então avaliar a mudança de seletividade do solvente, substituindo-se o modificador orgânico para MeOH.

Após as alterações na seletividade da fase móvel, separação satisfatória dos picos foi observada. Deste modo, a condição cromatográfica considerada otimizada foi a número 5 (Quadro 4). Uma vez estabelecidas as condições ótimas de extração em fase sólida e separação cromatográfica, foram realizadas duplicatas da mesma condição (A e B, Figura 23), a fim de confirmar a reprodutibilidade dos resultados.

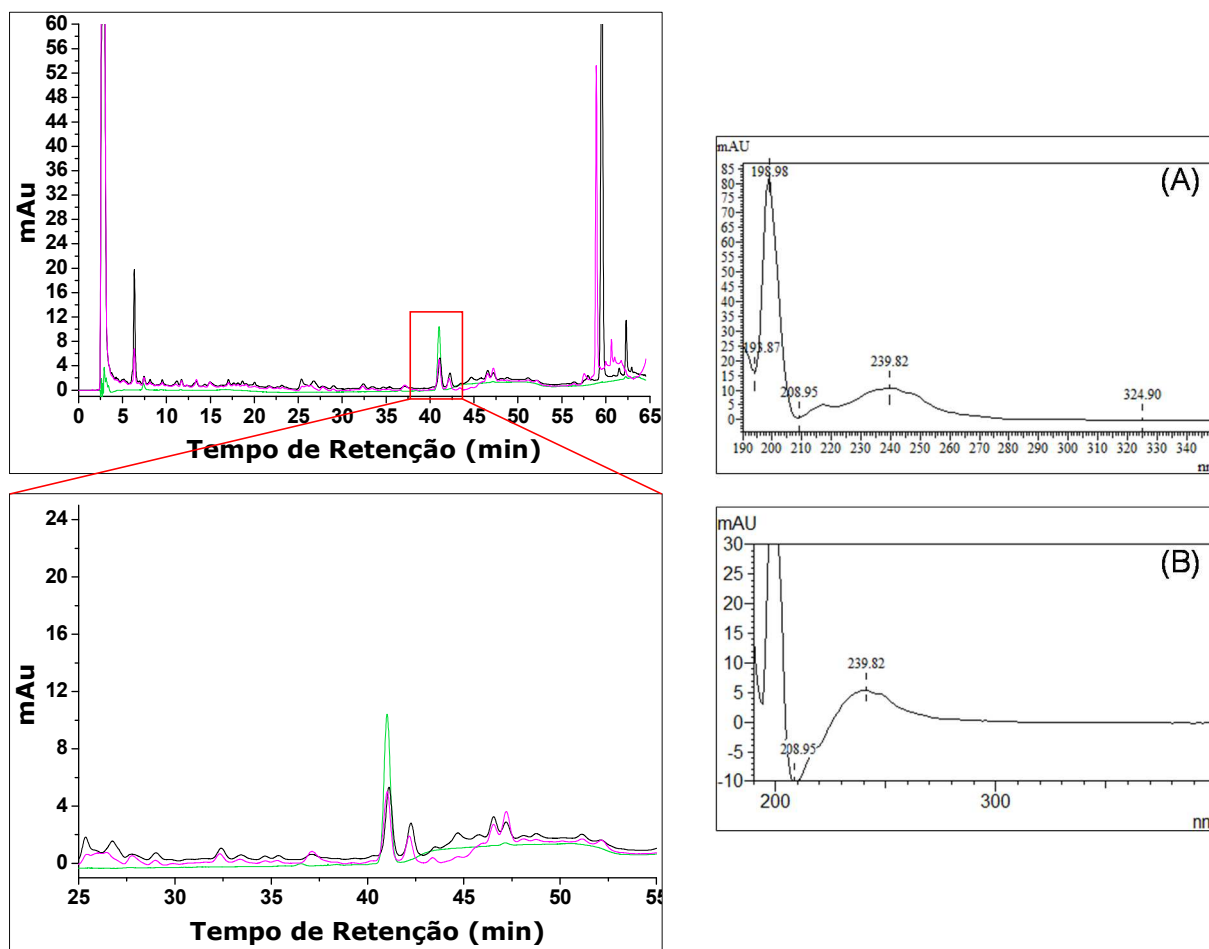


Figura 23. Cromatogramas ( $\lambda=238$  nm) das replicatas realizadas para o método de SPE adotado, comparadas ao padrão de MC-LR ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Ao lado direito, os espectros de absorção UV do padrão de MC-LR (A) e do pico com  $T_r=41$  minutos da amostra de cultivo após pré-concentração. Legenda: (—) Replicata A; (—) Replicata B; (—) Padrão de MC-LR ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

### 5.2.3 Validação do Método Cromatográfico para Quantificação de Microcistina-LR

Posteriormente à otimização das condições cromatográficas e da Extração em Fase Sólida, partiu-se para a validação do método cromatográfico da MC-LR, tomando-se como base as diretrizes da resolução n° 899 da ANVISA (2003) para métodos bioanalíticos.

Segundo esta resolução, a validação garante que os métodos analíticos atendem às exigências de ferramentas analíticas, por meio de dados experimentais. Deste modo, o método deve possuir seletividade, linearidade, precisão, limites de



detecção e quantificação, exatidão e intervalos de concentração adequados às análises a serem realizadas.

#### 5.2.3.1 Especificidade

De acordo com a RE n° 899 da ANVISA, especificidade é a capacidade do método bioanalítico em discriminar e quantificar o analito de interesse na matriz biológica em meio a interferências, tais como metabólitos, impurezas, compostos de degradação ou interferentes da matriz.

Para a avaliação da especificidade, a resolução recomenda a análise de amostras da matriz biológica de seis indivíduos (ANVISA, 2003). Uma vez que se trata de cultivo de cianobactérias, este não possui alta variabilidade entre os frascos cultivados nas mesmas condições controladas. Desta forma, foram utilizadas quatro matrizes biológicas (4 frascos de cultivo de *Microcystis aeruginosa*), inoculadas e cultivadas nas mesmas condições.

A partir da matriz, foram realizadas diluições na matriz reacional (meio ASM-1 modificado) com concentração  $1 \times 10^5$  cél.mL<sup>-1</sup>, (concentração esta utilizada para os experimentos do processo foto-Fenton nas cianobactérias). As alíquotas (de 150 mL cada) foram mantidas sob baixa temperatura (-20°C), até realizar-se a Extração em Fase Sólida, seguida da análise cromatográfica.

A condição adotada para o SPE foi a previamente descrita no item 5.2.2, e as condições cromatográficas (novamente otimizadas) consistiram em eluição isocrática 50% de MeOH (B) com gradiente de limpeza (50% de B por 50 min; 55 a 100% de B em 2 min, mantendo-se em 100% por 20 min e retorno para 50% em 2 min). Os cromatogramas obtidos da análise de seletividade estão expostos na figura 24.

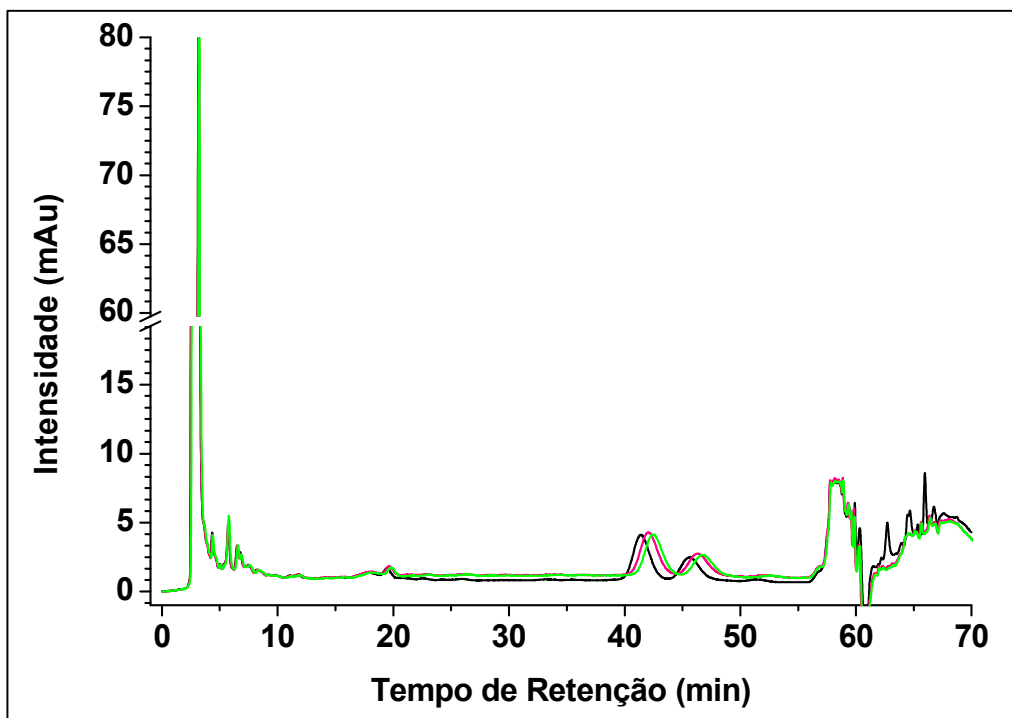


Figura 24. Cromatogramas ( $\lambda=238$  nm) de cultivo de células de *M. aeruginosa*, com concentração de  $1 \times 10^5$  cél.mL<sup>-1</sup>, após Extração em Fase Sólida: Replicata 1 (—), 2 (—) e 3 (—).  $t_r$  MC-LR = 44 minutos.

Determinada a seletividade, foi realizada análise de uma amostra branco a fim de observar a presença de possíveis interferentes no tempo de retenção do analito, conforme preconiza a RE n° 899 da ANVISA.

A amostra branco para análises de interferentes consistiu apenas na matriz reacional (meio ASM-1 modificado), igualmente submetida aos ciclos de congelamento e descongelamento e ao SPE, do mesmo modo às demais amostras contendo a toxina.

Os cromatogramas (Figura 25) não apontaram presença de picos com intensidade significativa no tempo de retenção da microcistina-LR, indicando, desta forma, que a matriz biológica não possui interferentes.

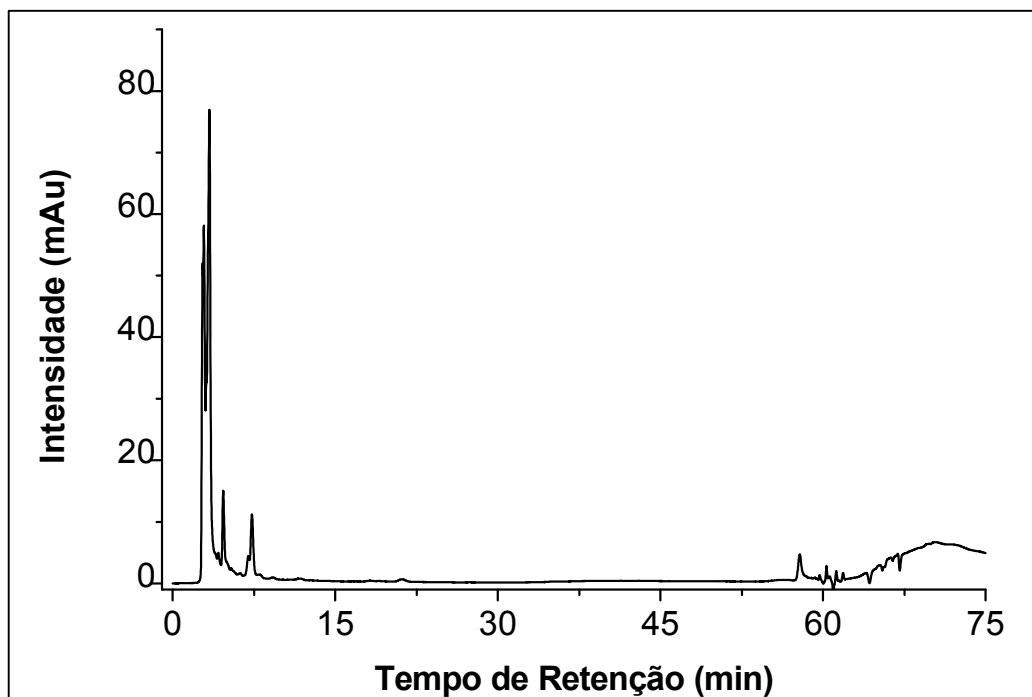


Figura 25. Cromatograma ( $\lambda=238$  nm) da matriz reacional (meio ASM-1 modificado), após submissão a Extração em Fase Sólida

#### 5.2.3.2 Limite Inferior de Quantificação

Para determinação do Limite Inferior de Quantificação (LIQ) foram realizadas diluições decrescentes do padrão de MC-LR, na matriz reacional, e analisadas nas condições cromatográficas otimizadas. No presente estudo, as análises de diluições do padrão foram realizadas em triplicata até que o LIQ fosse estabelecido (conforme diretrizes da ANVISA). Uma vez estabelecida a concentração limite para quantificação, a análise foi realizada em quintuplicata (Tabela 4).

**Tabela 4. Resultados obtidos nas análises do padrão de microcistina-LR na determinação do Limite Inferior de Quantificação (LIQ)**

Concentração Teórica (mg.L <sup>-1</sup> )	t <sub>r</sub> (min)	Área (Au)	Concentração Experimental (mg.L <sup>-1</sup> )	Média	Desvio Padrão	CV (Precisão)	Exatidão
0,1	46,64	26790	0,093	0,090	0,0027	3%	90%
	44,51	25545	0,089				
	43,99	25121	0,088				
0,07	46,26	14530	0,055	0,058	0,0028	5%	83%
	46,85	15814	0,059				
	46,94	16234	0,061				
0,05	43,5	10059	0,041	0,041	0,0017	4%	82%
	43,5	10517	0,043				
	43,5	9435	0,039				
0,03	43,45	7729	0,034	0,035	0,0015	4%	117%
	44,64	8073	0,035				
	45,14	7940	0,035				
	45,15	7457	0,033				
	44,89	8763	0,037				

**Legenda:** t<sub>r</sub> - Tempo de retenção; CV - Coeficiente de variação

Dada a exatidão da concentração de 0,03 mg.L<sup>-1</sup>, tal valor foi estabelecido como limite inferior de quantificação de MC-LR. Limites de quantificação registrados na literatura em análises por HPLC-DAD variam de 0,7 µg.L<sup>-1</sup>, a 0,5 mg.L<sup>-1</sup> (RODRÍGUEZ *et al.*, 2007; ANDRADE, 2009; MARTINS, 2010; CASSINI *et al.*, 2013; PINHO, 2014). Deste modo, vê-se que a sensibilidade do método analítico está condicionada aos equipamentos e insumos disponíveis para pesquisa. No entanto, constata-se que o LIQ obtido na validação do método da presente pesquisa mostrou-se sensível, quando comparado a tais valores.

#### 5.2.3.3 Linearidade

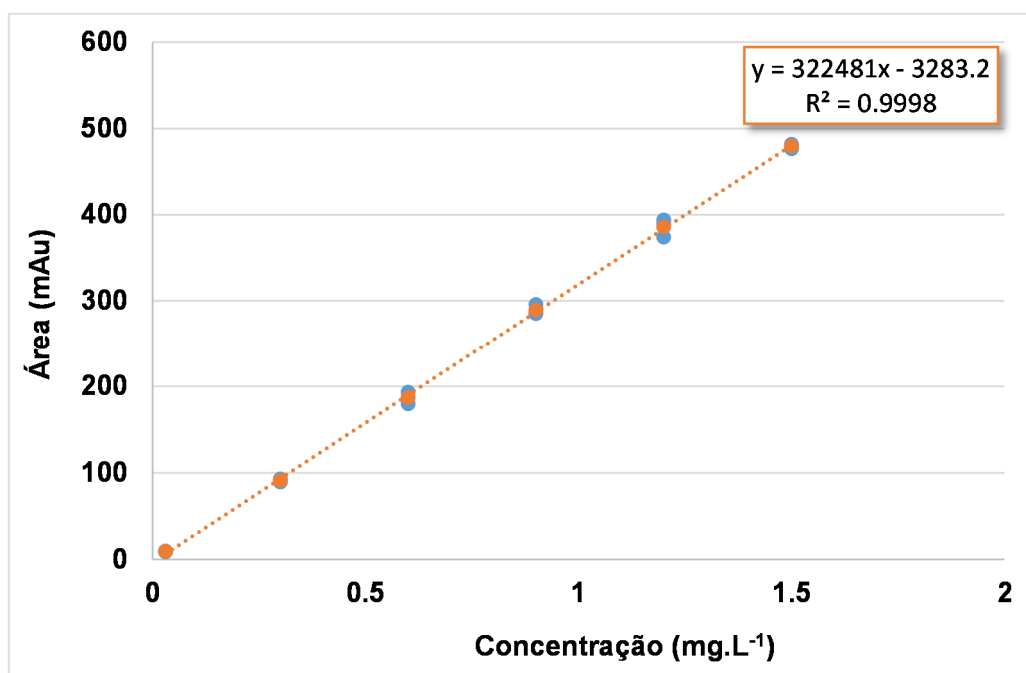
A curva analítica de MC-LR para análise da linearidade foi composta por seis concentrações, que variou do LIQ até 50% acima da concentração esperada na amostra (0,03, 0,30, 0,60, 0,90, 1,20 e 1,50 mg.L<sup>-1</sup>). Os valores de variação

estabelecidos pela resolução (coeficiente de variação inferior a 20% para o LIQ e 15% para as demais concentrações) foram respeitados.

Através do método de regressão linear foi possível obter a equação que estabelece a correlação entre as áreas dos picos cromatográficos e as concentrações de microcistina-LR (Figura 26), o qual apontou coeficiente de correlação de 0,9998. Tal valor se mostrou satisfatório, dado que a RE n° 899 preconiza o valor mínimo de 0,98. Os dados obtidos nas análises de linearidade são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5. Resultados obtidos nas análises do padrão de microcistina-LR para determinação da linearidade (curva analítica)**

Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Média das Áreas dos Picos de MC-LR	Coefficiente de Variação
0,03	9133,0	5%
0,3	91185,0	2%
0,6	186691,0	4%
0,9	289021,7	2%
1,2	385763,3	3%
1,5	479346,0	1%



**Figura 26. Curva analítica obtida por regressão linear, correlacionando as áreas dos picos de MC-LR e suas respectivas concentrações**

#### 5.2.3.4 Precisão e Exatidão

A precisão e a exatidão do método analítico foram avaliadas por meio de controles de qualidade, que consistiram em soluções de microcistina-LR de 3 concentrações distintas (controles de baixa, média e alta concentração) em triplicata, e em 3 dias não consecutivos (exatidão intra e inter-corridas).

Seguindo a resolução da ANVISA, a precisão foi determinada por meio do coeficiente de variação (desvio padrão dos valores dividido pela média), não se admitindo valores maiores que 15%. Já a exatidão foi expressa por meio da média das concentrações experimentais obtidas dividida pela concentração teórica.

As concentrações dos controles de qualidade foram escolhidas em concordância com o estabelecido pela resolução:

- Controle de baixa concentração (CQB): menor ou igual a 3 vezes o LIQ;
- Controle de média concentração (CQM): média entre CQB e CQA;
- Controle de alta concentração (CQA): 75 a 90% da maior concentração da curva analítica.

Deste modo, adotaram-se as concentrações de 0,1, 0,7 e 1,3 mg.L<sup>-1</sup> para o CQB, CQM e CQA, respectivamente. Na Tabela 6 é possível analisar os resultados já convertidos em concentração por meio da equação de regressão linear, a qual demonstra precisão do método entre 2 e 15% e exatidão entre 88 e 131%, valores em concordância com os propostos pela resolução da ANVISA para métodos bioanalíticos.

Tabela 6. Concentrações e valores de precisão e exatidão obtidos na avaliação do método de quantificação de microcistina-LR (intra e inter-dias)

Controles (Concentração Teórica – mg.L <sup>-1</sup> )	Concentrações Experimentais			Média	Desvio Padrão	CV	Exatidão
	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3				
<b>1° Dia (n=3)</b>							
1,3	1,29	1,32	1,36	1,32	0,035	3%	102%
0,7	0,67	0,68	0,69	0,68	0,011	2%	97%
0,1	0,11	0,10	0,11	0,10	0,006	6%	103%
<b>2° Dia (n=3)</b>							
1,3	1,14	1,22	1,29	1,22	0,073	6%	94%
0,7	0,61	0,60	0,64	0,62	0,020	3%	88%
0,1	0,10	0,10	0,10	0,10	0,002	2%	102%
<b>3° Dia (n=3)</b>							
1,3	1,43	1,49	1,41	1,44	0,039	3%	111%
0,7	0,76	0,63	0,80	0,73	0,090	12%	104%
0,1	0,111	0,151	0,132	0,13	0,020	15%	131%

Legenda: CV - Coeficiente de variação

#### 5.2.3.4 Recuperação

A eficiência do método de extração (recuperação) foi avaliada através de 3 concentrações (baixa, média e alta), levando-se em consideração a faixa linear do método. Foram adotadas as mesmas concentrações dos controles de qualidade utilizados para avaliação da precisão e exatidão (0,1, 0,7 e 1,3 mg.L<sup>-1</sup>), avaliadas em duplicata.

O procedimento consistiu no preparo das soluções aquosas da toxina, preparadas a partir de soluções-estoque de MC-LR em metanol (evaporado em linha de ar comprimido, a fim de evitar interferências nas análises). Procedeu-se então com o de Extração em Fase Sólida, e posterior análise. Os valores de concentração (Tabela 7) foram expressos através da relação entre o valor experimental e o valor nominal de concentração.

Tabela 7. Valores de recuperação obtidos em diferentes níveis de concentração de MC-LR

Ensaio de Recuperação						
Concentração Teórica (mg.L <sup>-1</sup> )	Replicata	Concentração Real (mg.L <sup>-1</sup> )	Média	Desvio Padrão	CV	Recuperação
0,1	1	0,070	0.075	0.008	10%	75%
	2	0,081				
0,7	1	0,595	0.622	0.038	6%	89%
	2	0,649				
1,3	1	1,193	1.246	0.075	6%	96%
	2	1,299				

Legenda: CV - Coeficiente de variação

Embora valores próximos a 100% sejam desejáveis, a resolução n° 899 da ANVISA não estabelece um valor mínimo de recuperação, e sim que esta seja precisa e exata. Ainda de acordo com o guia, a precisão deve variar em até 20%. Isto posto, é possível concluir que os valores de recuperação obtidos no método de quantificação de MC-LR são satisfatórios.

### 5.3 ESTUDO DA APLICAÇÃO DO PROCESSO FOTO-FENTON NO CULTIVO DE *Microcystis aeruginosa*

#### 5.3.1 Visualização de *Microcystis aeruginosa* em Microscópio de Epifluorescência

As contagens e visualizações das células (anterior e posteriormente aos experimentos) foram realizadas em microscópio óptico e de epifluorescência, com objetivo de observar quaisquer alterações no comprimento de onda de emissão (alteração na coloração), assim como em sua morfologia. Devido aos pigmentos presentes nos fotossistemas, as células de *M. aeruginosa* (Figura 27A), quando submetidas à excitação em microscópio de epifluorescência, emitem no comprimento de onda correspondente à cor vermelha (HOLT *et al.*, 1994) (Figura 27B). Portanto, alterações causadas nos fotossistemas podem acarretar em mudanças na fluorescência (CAMPBELL *et al.*, 1998) (Figura 27C). Deste modo, tais



análises podem servir como mais um parâmetro na determinação da viabilidade celular.

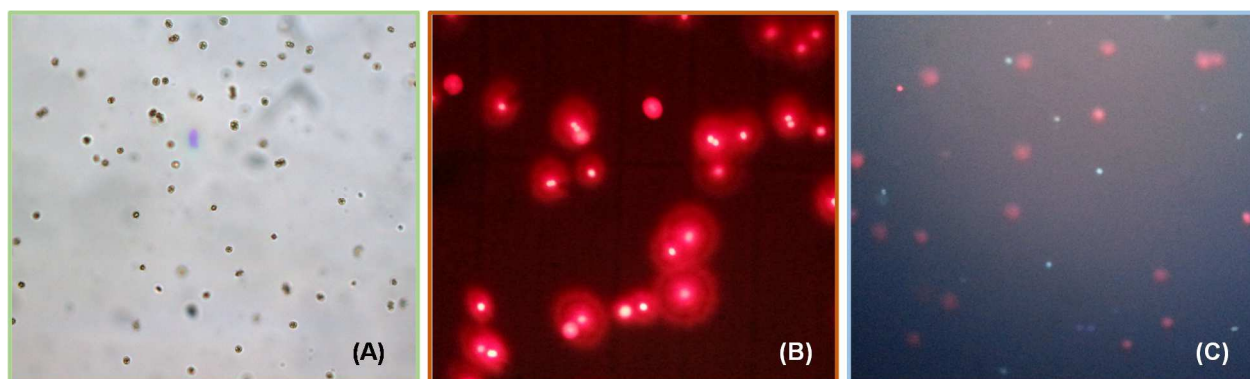


Figura 27. Morfologia da espécie *Microcystis aeruginosa*, observada em microscópio de luz (A); em microscópio de epifluorescência (B); em microscópio de epifluorescência (C): Células com emissão padrão (vermelho) e células com fluorescência alterada (azul). Aumento de 400 vezes.

### 5.3.3 Análise dos Efeitos do pH, Luz e Estresse Mecânico nas Células de *M. aeruginosa*

Previamente aos experimentos do processo foto-Fenton, possíveis efeitos nas células por estresse mecânico foram estudados. O propósito foi verificar se a agitação magnética para homogeneização causaria, por si só, algum dano ou efeito nas células. Suspensão celular (concentração de  $1 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>, diluídas na matriz reacional) foi submetida à agitação (com auxílio de agitador magnético) por 90 minutos. Alíquotas (5 mL) foram retiradas no início, em 30 e 90 minutos para contagem celular e inoculação (ensaio de viabilidade celular). Uma amostra controle (sem qualquer agitação) também foi avaliada.

Os resultados de concentração, submetidos à análise de variância (95% de confiança), apontaram que a fonte de homogeneização não foi capaz de causar qualquer diminuição na concentração celular durante a exposição (Figura 28A). Do mesmo modo, o crescimento celular após inoculação e 15 dias de incubação foi constatado em todas as alíquotas coletadas (Figura 28B), apontando que a agitação

magnética não proporcionou qualquer estresse mecânico ou efeito danoso sobre as células das cianobactérias em estudo.

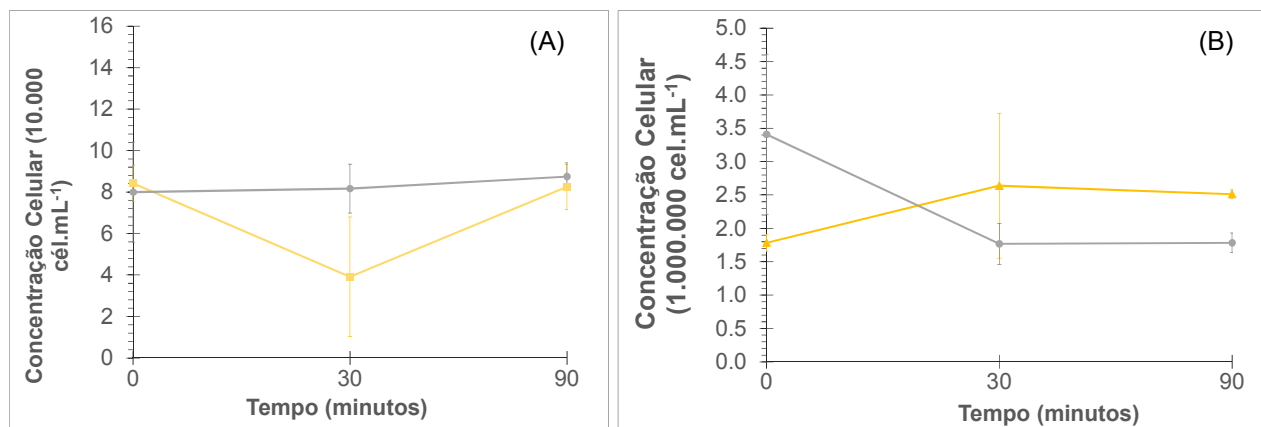


Figura 28. Representação gráfica das concentrações celulares de *M. aeruginosa* durante exposição à agitação magnética (A) e após reinoculação e incubação por 15 dias (B). Legenda: (■) Agitação Magnética; (●) Controle.

Do mesmo modo, foram realizados experimentos a fim de verificar se o baixo pH (ocasionado pela adição do sulfato ferroso) e a luz, também causariam quaisquer efeitos deletérios nas células. Assim como na avaliação do estresse mecânico, cultivo de células com concentração inicial de  $1 \times 10^5$  cél.mL<sup>-1</sup> foram submetidas a pH 3,7 (pH correspondente aquele observado após adição da maior concentração de sulfato ferroso), e a uma lâmpada a vapor de mercúrio de alta pressão (a mesma utilizada nos experimentos do processo foto-Fenton). Estes ensaios foram conduzidos por 90 minutos, e alíquotas (5 mL) foram retiradas em 0 e 90 minutos para determinação da concentração celular e viabilidade; pH e luminosidade também foram monitorados durante tais ensaios.

Cabe salientar que devido aos resultados obtidos no modelo experimental, a lâmpada foi suspensa a 10 cm do reator, e não inserida na solução como nos estudos com a *D. subspicatus*, dado o forte efeito observado nos ensaios com a microalga.

Os resultados de concentração celular e viabilidade obtidos (Tabela 8), submetidos à análise de variância, não demonstraram reduções estatisticamente significativas (em 90 minutos) nas concentrações celulares e no crescimento celular após inoculação, quando comparadas ao controle (tempo 0 minutos). Nota-se, desta

forma, que possíveis efeitos do processo foto-Fenton nas células não estão atrelados a variáveis como pH ou a radiação.

**Tabela 8. Resultados obtidos após submissão das células de *Microcystis aeruginosa* à radiação e ao pH**

Parâmetros	Exposição à Radiação		Exposição à Baixo pH	
	Tempo (min)			
	0	90	0	90
pH	6,5	6,26	3,7	3,9
Temperatura (°C)	24	23	25	26
Luminosidade (x 100 Lux)	415	420	-	-
Concentração Celular (x 100.000 cél.mL <sup>-1</sup> )	1,43*	1,30	1,63*	1,41
Viabilidade Celular (x 100.000 cél.mL <sup>-1</sup> )	6,7 ± 2,12*	2,96 ± 0,61	5,6 ± 0,28*	3,36 ± 0,04

**Legenda:** n=1; (\*) amostras controle. **Nota:** Amostras controle referem-se às coletadas anteriormente à adição dos reagentes; as amostras referentes ao tempo 0 minutos foram aquelas coletadas logo após a adição dos reagentes.

#### 5.3.4 Estudo dos Efeitos do Processo Foto-Fenton nas Células de *Microcystis aeruginosa* e Concentração de Microcistina-LR

O estudo do processo foto-Fenton aplicado às células de *Microcystis aeruginosa* foi desenvolvido por meio do teste de três condições distintas, no que se refere às concentrações de ferro e peróxido de hidrogênio.

Foram testadas as seguintes condições: 0,6 mg.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> e 10 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 5 mg.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> e 50 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 20 mg.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>; e 100 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As condições foram baseadas em estudos desenvolvidos por Ortega-Gómez e colaboradores e por Spuhler e colaboradores (SPUHLER *et al.*, 2010; ORTEGA-GÓMEZ *et al.*, 2014), nos quais aplicou-se o processo foto-Fenton em bactérias entéricas, visando estudar o potencial do processo na desinfecção de água. Dada a lacuna de estudos prévios do processo em células fotossintetizantes, tais trabalhos foram utilizados como base para realização do processo no presente estudo.

Nas condições mais branda e mais extrema, as razões de Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adotadas foram de 0,06 e 0,2, adotada de estudos prévios, citados anteriormente. Já

na condição intermediária a proporção foi de 0,1, adotada como mediana entre as condições baseadas nos estudos supracitados.

Na escolha de tais concentrações atentou-se para as razões entre o ferro e o peróxido de hidrogênio ( $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ ). Ao aplicar-se o foto-Fenton em microorganismos, revela-se a preocupação em utilizar concentrações de ferro e peróxido de hidrogênio capazes de promover o processo, no entanto sem causar efeitos isolados sobre as células ou a toxina, justificando assim o efeito sinérgico da reação.

Embora a literatura clássica sobre os processos Fenton ressalte que razões entre  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  menores que 1 podem incorrer em menores eficiências do processo (NEYENS E BAEYENS, 2003), na maioria dos casos, tais estudos partem de concentrações do composto de interesse ou carga orgânica conhecidos. No entanto, a aplicação do processo em microrganismos pode acarretar no uso de condições distintas quando comparadas a aplicação do processo em compostos químicos dissolvidos, dada a diferença de complexidade destas matrizes, e dos possíveis efeitos isolados das variáveis no microrganismos.

Cabe salientar que nos ensaios com as cianobactérias o processo foto-Fenton foi conduzido sem a mediação de complexos ferro-orgânicos (ácido oxálico), uma vez que os resultados obtidos no modelo experimental com as células de *D. subspicatus* não demonstraram contribuição significativa na manutenção do ferro na forma dissolvida.

Ao submeter as cianobactérias ao processo foto-Fenton nas condições de 0,6  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  e 10  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi constatada redução média na concentração celular de  $1,3 \times 10^5$  para  $8,28 \times 10^4$   $\text{cél.mL}^{-1}$  (aproximadamente 40%) (Tabela 9).

Por sua vez, o ensaio de viabilidade celular (inoculação e verificação do crescimento celular) apontou crescimento apenas nas amostras controle, fato no qual pode ser indicativo de que processo oxidativo foi capaz de inviabilizar as células, impedindo seu crescimento, já a partir de 45 minutos de reação.

**Tabela 9. Parâmetros analisados durante aplicação do processo foto-Fenton (0,6 mg.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> e 10 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em células de *Microcystis aeruginosa***

Parâmetro	Tempo (min)		
	0	45	90
pH	6,24 ± 0,03	6,07 ± 0,03	6,03 ± 0,05
Temperatura (°C)	25 ± 1	28 ± 1	31 ± 2
Luminosidade (x100 Lux)	450 ± 25	460 ± 30	440 ± 20
Concentração Celular (10.000 cél.mL <sup>-1</sup> )	13,80 ± 1,61*	11,30 ± 2,10	8,28 ± 1,16
Peróxido de Hidrogênio (mg.L <sup>-1</sup> )	8,67 ± 0,57	7,17 ± 0,13	6,56 ± 0,10
Fe <sub>Total</sub> Dissolvido (mg.L <sup>-1</sup> )	0,37 ± 0,17	0,12 ± 0,02	<LQ
Fe <sup>2+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	0,13 ± 0,11	<LQ	<LQ
Viabilidade Celular (1.10 <sup>6</sup> cél.mL <sup>-1</sup> )	2,30 ± 0,07*	0,00	0,00

**Legenda:** (<LQ) representam concentrações abaixo do limite de quantificação do método; n=3; (\*) amostras controle. **Nota:** Amostras controle referem-se às coletadas anteriormente à adição dos reagentes; as amostras referentes ao tempo 0 minutos foram aquelas coletadas logo após a adição dos reagentes.

Nestas condições, o pH manteve-se estável durante o período de reação (entre 6,24 e 6,03), assim como a intensidade luminosa. A temperatura não excedeu 31 °C, evitando inativação térmica das células.

Durante o processo, em tais condições, as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram reduzidas a uma média de 24% (de 8,67 para 6,56 mg.L<sup>-1</sup>). As concentrações de Fe<sub>Total</sub> dissolvido indicam que no início da reação, dos 0,6 mg.L<sup>-1</sup> adicionados, apenas 0,37 mg.L<sup>-1</sup> encontraram-se dissolvidos, sendo destes 0,13 mg.L<sup>-1</sup> na forma de Fe<sup>2+</sup> e 0,24 mg.L<sup>-1</sup> na forma de Fe<sup>3+</sup>. Em 45 minutos de reação, foram quantificadas apenas concentrações de Fe<sup>3+</sup> (0,12 mg.L<sup>-1</sup>), uma vez que os resultados das análises de Fe<sup>2+</sup> apresentaram-se abaixo do limite de quantificação. Por fim, em 90 minutos de reação, não foram encontrados níveis quantificáveis de ferro dissolvido (Fe<sup>2+</sup> ou Fe<sup>3+</sup>).

Tais reduções nas concentrações de ferro podem estar associadas à perda por precipitação (devido ao pH próximo à neutralidade), à complexação com a matéria orgânica, e até mesmo à interações químicas com a parede celular das cianobactérias. Dado que a matriz em que a reação ocorre é rica em íons, células suspensas, e matéria orgânica dissolvida (conteúdo celular proveniente do rompimento das células), inúmeras interações com o ferro dissolvido podem ocorrer, interferindo na cinética da reação e na disponibilidade do ferro.

Embora as concentrações de Fe<sup>2+</sup> terem se mostrado abaixo do limite de quantificação em 45 minutos de reação, foram constatadas reduções na

concentração celular após este período. Tal resultado pode ser indicativo de que outros processos foram capazes de contribuir na produção de radicais oxidantes. Uma vez que o ferro esteve presente na forma de  $\text{Fe}^{3+}$ , a produção de radicais pode ter sido em decorrência do processo *like*-Fenton (decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença de  $\text{Fe}^{3+}$ ). No entanto, este processo se dá de forma mais lenta quando comparada com o processo foto-Fenton tradicional, o que corrobora para o baixo consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (PIGNATELLO *et al.*, 2006).

Outra possibilidade é a contribuição do processo UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , caracterizado pela clivagem homolítica do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em radicais hidroxilas, na presença de radiação UV-C (comprimentos de onda inferiores a 280 nm) (SHARMA *et al.*, 2012). Apesar de utilizado bulbo de vidro para envolver a lâmpada, uma pequena porção da radiação UV-C é capaz de ultrapassar o vidro, havendo a possibilidade de promoção do processo de forma moderada.

Após aplicação do processo foto-Fenton por 90 minutos, as amostras foram submetidas aos ciclos de congelamento e descongelamento, extração em fase sólida e injeção em sistema cromatográfico, nas mesmas condições otimizadas para a amostra do cultivo (Item 5.2.2). As concentrações de MC-LR, antes e após a aplicação dos processos reacionais, foram determinadas através das áreas dos picos referentes ao seu tempo de retenção da toxina.

Cabe salientar a mudança no  $t_r$  verificada no pico da toxina, de 41 para 32,1 minutos. Tal alteração pode ser advinda de várias causas, tais como mudanças no ambiente químico, como também relacionada a alterações na composição da fase móvel, embora tenham sido utilizados solventes provenientes do mesmo fabricante.

Em relação às análises cromatográficas para determinação de microcistina-LR, das amostras submetidas à  $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 29), foi possível observar redução de 24% ( $\pm 10\%$ ) nas concentrações da toxina. De  $3,58 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  presentes no cultivo de cianobactérias na concentração celular estudada, houve redução média para  $2,74 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  ( $\pm 0,35 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Cabe ressaltar que as concentrações antes e após o tratamento para esta condição, encontram-se acima do valor máximo permitido pela OMS de  $1 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ .

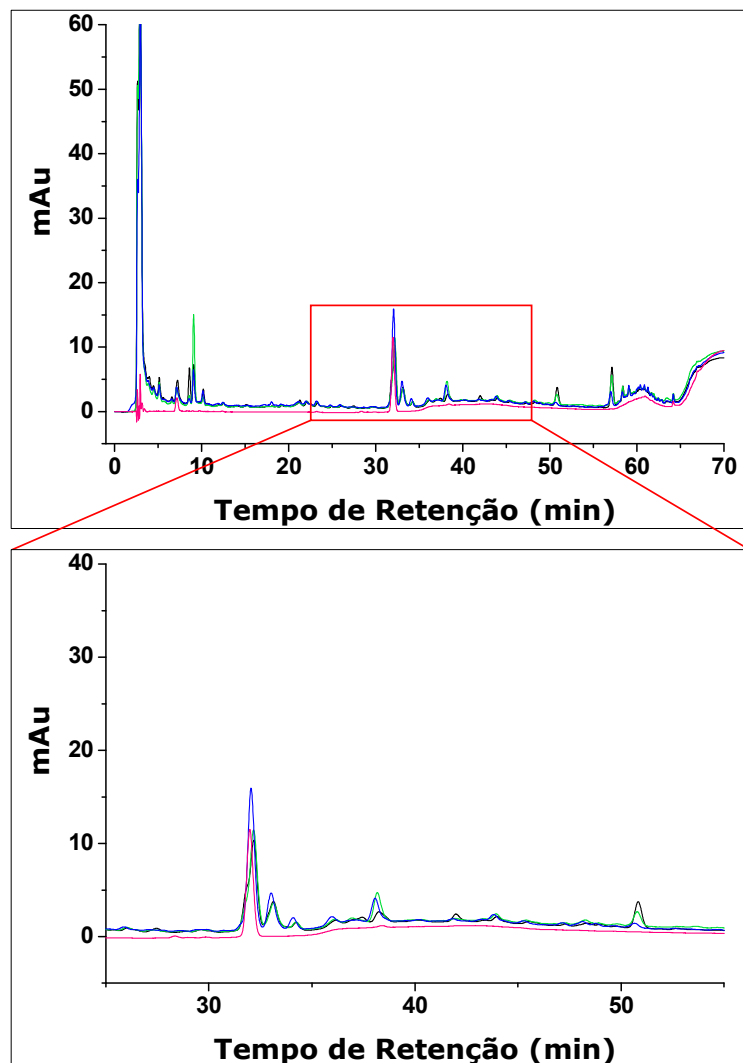


Figura 29. Cromatogramas ( $\lambda=238$  nm) obtidos após submeter o cultivo de *M. aeruginosa* a  $0,6$   $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $10$   $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 90 minutos (triplicata dos experimentos), comparados ao cromatograma do padrão de MC-LR. Legenda: (—) Replicata 1; (—) Replicata 2; (—) Replicata 3; (—) Padrão de MC-LR ( $1$   $\text{mg.L}^{-1}$ ). Eluição gradiente: 45% de B; 45 a 70% de B em 50 min; de 70 a 100% ( $t=10$  min), mantendo-se em 100% por 10 min e retorno para 45% em 5 min (Fase Móvel MeOH (B): $\text{H}_2\text{O}$  0,05% TFA).

Já os resultados do processo foto-Fenton utilizando-se  $5$   $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $50$   $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  apontaram redução média de  $51 \pm 18\%$  na concentração celular imediata (de  $1,36 \times 10^5$  para  $6,72 \times 10^4$   $\text{cél.mL}^{-1}$ ), de modo que o ensaio de viabilidade celular não apontou crescimento de células nos tempos 45 e 90 minutos, apenas nas amostras controle (Tabela 10).

**Tabela 10. Resultados dos parâmetros analisados na aplicação do processo foto-Fenton (5 mg.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> e 50 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em células de *Microcystis aeruginosa***

Parâmetro	Tempo (min)		
	0	45	90
pH	3,76 ± 0,06	3,75 ± 0,02	3,72 ± 0,02
Temperatura (°C)	27 ± 0	29 ± 0	32 ± 0
Luminosidade (x100) (Lux)	440 ± 15	450 ± 10	450 ± 15
Concentração Celular (10.000 cél.mL <sup>-1</sup> )	13,60 ± 1,38*	5,61 ± 2,09	6,72 ± 2,63
Peróxido de Hidrogênio (mg.L <sup>-1</sup> )	44,28 ± 0,53	39,86 ± 0,44	36,82 ± 0,20
Fe <sub>Total</sub> Dissolvido (mg.L <sup>-1</sup> )	3,21 ± 0,29	1,72 ± 0,26	0,67 ± 0,19
Fe <sup>2+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	1,70 ± 0,16	0,65 ± 0,15	0,17 ± 0,11
Viabilidade Celular (1.000.000 cél.mL <sup>-1</sup> )	2,25 ± 0,12*	0,00	0,00

**Legenda:** (<LQ) representam concentrações abaixo do limite de quantificação do método; n= 3; (\*) amostras controle. **Nota:** Amostras controle referem-se às coletadas anteriormente à adição dos reagentes; as amostras referentes ao tempo 0 minutos foram aquelas coletadas logo após a adição dos reagentes.

O pH inicial dos ensaios (anteriormente à adição de FeSO<sub>4</sub>) foi de 6,75 (± 0,15). Após a adição do ferro, houve diminuição para aproximadamente 3,7. Por sua vez, o monitoramento do ferro apontou que logo no início da reação as concentrações já se apresentaram na ordem de 3,21 mg.L<sup>-1</sup> de Fe<sub>Total</sub> (média de 1,70 mg.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> e 1,51 mg.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>3+</sup>) de modo que ao fim do processo o Fe<sub>Total</sub> caiu em 79% e o Fe<sup>2+</sup> em 90% (em relação as concentrações iniciais). Nestas condições, o peróxido de hidrogênio foi consumido em 17% (de 44,28 para 36,82 mg.L<sup>-1</sup>).

Conforme destacado por Neyens e Baeyens (2003), em pH inicial acima de 3,0 complexos de ferro dissolvidos são precipitados na forma de hidróxidos, que são menos reativos. Desta forma, o consumo de peróxido de hidrogênio será reduzido consideravelmente. Ademais, a formação de hidróxidos de ferro desloca o equilíbrio da água, provocando queda drástica do pH. No entanto, mesmo após a queda do pH, espécies precipitadas não se redissolvem facilmente (PIGNATELLO *et al.*, 2006). Nos experimentos realizados nesta condição, a precipitação do ferro foi visível no reator.

Ao aplicar o processo foto-Fenton na inativação de *Enterococcus faecalis* utilizando 10 mg.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> e 20 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Ortega-Gómez e colaboradores (2014) obtiveram consumos de ambos os reagentes próximos a 100%, em 50 minutos de reação. Cabe salientar a diferença na proporção dos reagentes, quando comparada à utilizada na condição intermediária nas células de *M. aeruginosa* do



presente estudo, o que pode proporcionar diferentes eficiências de inativação das células, no consumo dos reagentes, e em menores tempos.

As análises de determinação de MC-LR na condição de  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  indicaram pico com o  $t_r$  da toxina apenas na replicata 3, no entanto dada a sua baixa intensidade, não foi possível integrá-lo. Desta forma, observa-se que após submissão do processo por 90 minutos, as concentrações de MC-LR estavam abaixo do limite de quantificação do método, sugerindo que a toxina existente na amostra de cultivo foi amplamente degradada (Figura 30).

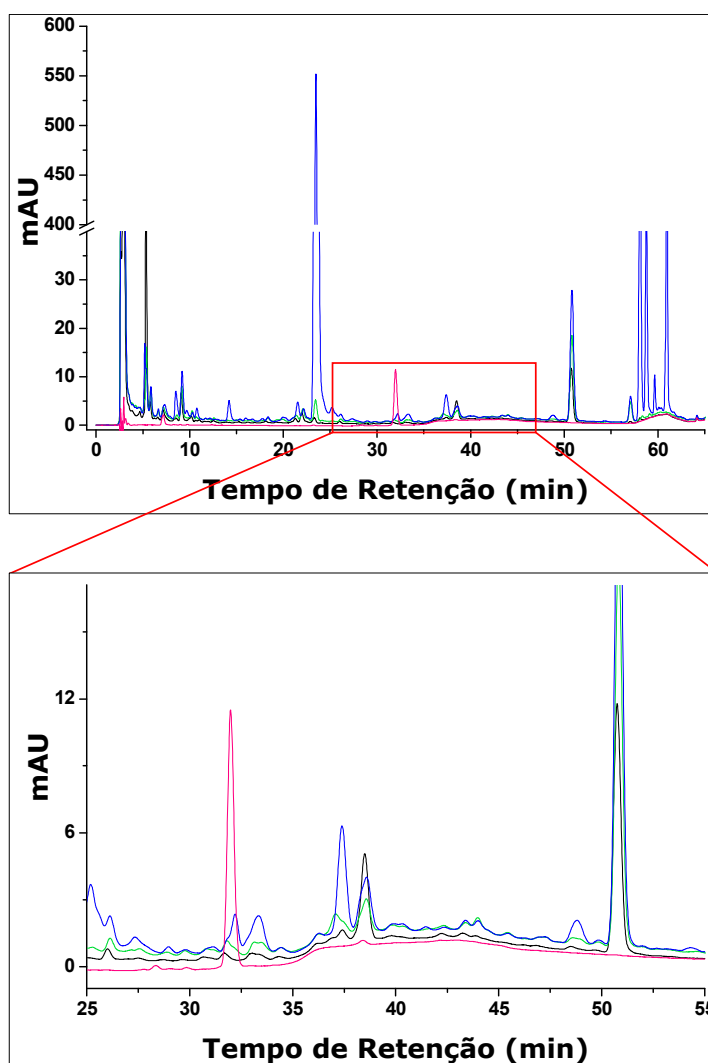


Figura 30. Cromatogramas ( $\lambda=238 \text{ nm}$ ) obtidos após submeter o cultivo de *M. aeruginosa* a  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 90 minutos (triplicata dos experimentos), comparados ao cromatograma do padrão de MC-LR ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Legenda: (—) Replicata 1; (—) Replicata 2; (—) Replicata 3; (—) Padrão de MC-LR ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Eluição gradiente: 45% de B; 45 a 70% de B em 50 min; de 70 a 100% ( $t=10 \text{ min}$ ), mantendo-se em 100% por 10 min e retorno para 45% em 5 min (Fase Móvel MeOH (B): $\text{H}_2\text{O}$  0,05% TFA).

Nos experimentos em que as células de *Microcystis aeruginosa* foram submetidas a 20 mg.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> e 100 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentração celular foi reduzida de 1,29x10<sup>5</sup> para 6,89x10<sup>4</sup> cél.mL<sup>-1</sup> (47%) (Tabela 11). Do mesmo modo aos outros experimentos, o ensaio de viabilidade apontou crescimento apenas nas amostras referentes a tempo inicial de reação (onde ainda não haviam sido adicionados os reagentes), em todas as replicatas, indicando possíveis danos às células após este período e impedindo seu crescimento.

**Tabela 11. Resultados obtidos na aplicação do processo foto-Fenton (20 mg.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> e 100 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em células de *Microcystis aeruginosa***

Parâmetro	Tempo (min)		
	0	45	90
pH	3,22 ± 0,03	3,13 ± 0,04	3,09 ± 0,00
Temperatura (°C)	28 ± 1	29 ± 1	32 ± 1
Luminosidade (x100) (Lux)	450 ± 20	450 ± 20	470 ± 15
Concentração Celular (10.000 cél.mL <sup>-1</sup> )	12,90 ± 1,24*	6,97 ± 0,66	6,89 ± 1,24
Peróxido de Hidrogênio (mg.L <sup>-1</sup> )	84,39 ± 1,39	74,55 ± 1,22	69,00 ± 1,44
Fe <sub>Total</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	10,09 ± 0,85	3,15 ± 2,21	2,38 ± 0,90
Fe <sup>2+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	2,09 ± 0,28	0,76 ± 0,33	0,28 ± 0,14
Viabilidade Celular (1.000.000 cél.mL <sup>-1</sup> )	1,26 ± 0,10*	0,00	0,00

**Legenda:** (<LQ) representam concentrações abaixo do limite de quantificação do método; n= 3; (\*) amostras controle. **Nota:** Amostras controle referem-se às coletadas anteriormente à adição dos reagentes; as amostras referentes ao tempo 0 minutos foram aquelas coletadas logo após a adição dos reagentes.

Ao final dos 90 minutos as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram reduzidas a 69,00 (± 1,44) (aproximadamente 18%). O monitoramento das concentrações de Fe<sub>Total</sub> indicaram que dos 20 mg.L<sup>-1</sup> adicionados, aproximadamente 10 mg.L<sup>-1</sup> estavam dissolvidas no tempo referente a 0 minutos, ao passo que aos 90 minutos apenas 2,38 mg.L<sup>-1</sup> (± 0,90) encontravam-se dissolvidos. As concentrações de Fe<sup>2+</sup> apontaram que quase a totalidade do ferro dissolvido encontrava-se na forma de Fe<sup>3+</sup>, especialmente a partir de 45 minutos de reação (2,39 mg.L<sup>-1</sup>).

Assim como nos ensaios em que foi avaliada a condição intermediária, o pH inicial esteve próximo a neutralidade (6,7 ± 0,01) e após a adição do sulfato ferroso caiu para 3,22 (± 0,03), chegando a 3,09 (± 0,0) em 90 minutos do processo foto-Fenton. Tal redução é correlata à formação e precipitação de hidróxidos de ferro,

conforme discutido anteriormente. Mais uma vez a precipitação das espécies de ferro foi visível no reator durante a reação.

Nas análises cromatográficas da toxina, entre as replicatas dos experimentos com  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , apenas uma indicou a presença do pico com  $t_r$  referente à MC-LR com intensidade suficiente para integração de área (Figura 31). Para este pico, a redução foi de  $3,58 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  para  $0,98 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  (valor inferior ao  $1 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  estabelecido pela Organização Mundial da Saúde), representando redução em relação ao pico correspondente à amostra inicial em 93%. Para as outras duas replicatas deste mesmo experimento, as concentrações mostraram-se abaixo do limite de quantificação do método cromatográfico.

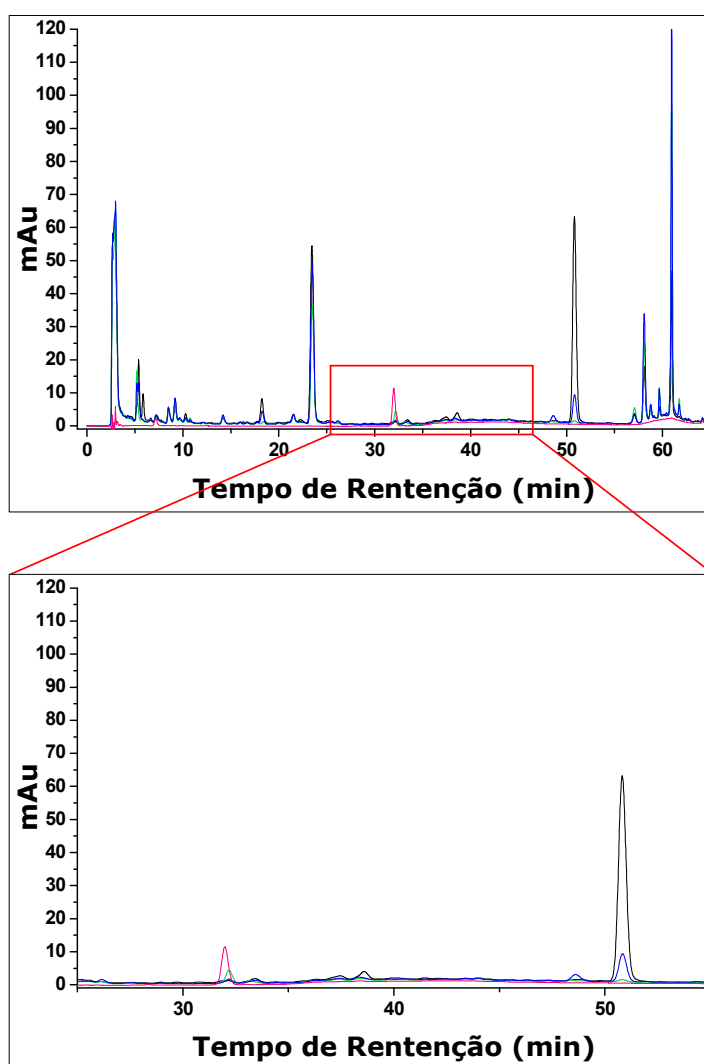


Figura 31. Cromatogramas ( $\lambda=238 \text{ nm}$ ) obtidos após submeter o cultivo de *M. aeruginosa* a  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 90 minutos (triplicata dos experimentos), comparados ao cromatograma do padrão de MC-LR ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Legenda: (—) Replicata 1; (—) Replicata 2; (—) Replicata 3; (—) Padrão de MC-LR ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Eluição gradiente: 45% de B; 45 a 70% de B em 50 min; de 70 a 100% ( $t=10 \text{ min}$ ), mantendo-se em 100% por 10 min e retorno para 45% em 5 min (Fase Móvel MeOH (B):H<sub>2</sub>O 0,05% TFA).

Efeitos nas células de *M. aeruginosa* foram constatados após o processo foto-Fenton (Figuras 32). Em todas as condições avaliadas, a parede de células apresentou-se aparentemente mais espessa e com sólidos agregados a elas. O campo de visualização no microscópio indicou alta concentração de sólidos, muito provavelmente devido à suspensão de catalase (utilizada para consumir o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual nas amostras) e aos *debris* de células lisadas.

Adicionalmente, na condição intermediária (5 mg.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> e 50 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e mais extrema (20 mg.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> e 100 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi possível notar a formação de agregados celulares (Figura 33), muito semelhantes aos formados por bainha de mucilagem em algumas cepas de *Microcystis aeruginosa* (HOLT, 1994). Cabe ressaltar que a cepa cultivada para os experimentos não apresentou agregados celulares anteriormente ao processo foto-Fenton.

Verificou-se ainda que a presença dos agregados causou aumento do coeficiente de variação nas contagens de células entre os quadrantes da câmara de Neubauer, havendo a possibilidade de interferência nos resultados de concentração celular ao longo do processo.

Cabe destacar ainda que não foram constatadas alterações na fluorescência das células durante ou após o tratamento, indicando que a fluorescência imediata das células não foi afetada. No entanto, o ensaio de viabilidade celular apontou ausência de crescimento celular após reinoculação das amostras, o que pode ser indicativo da ocorrência de danos oxidativos que não afetam diretamente os fotossistemas.

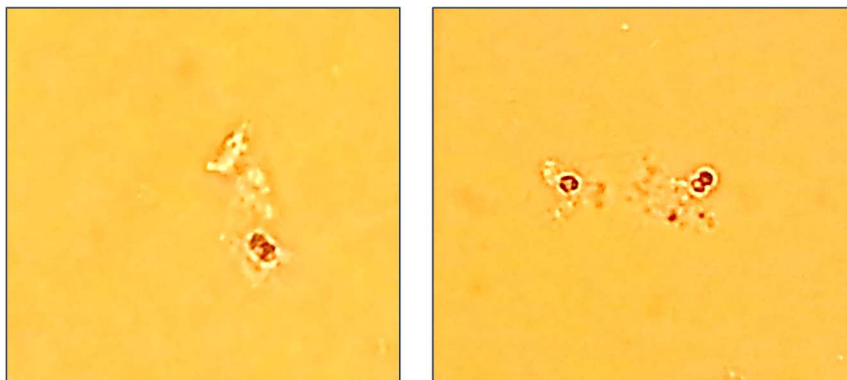


Figura 32. Possíveis efeitos observados em células de *M. aeruginosa*, após submissão ao processo foto-Fenton (Aumento de 400 vezes).

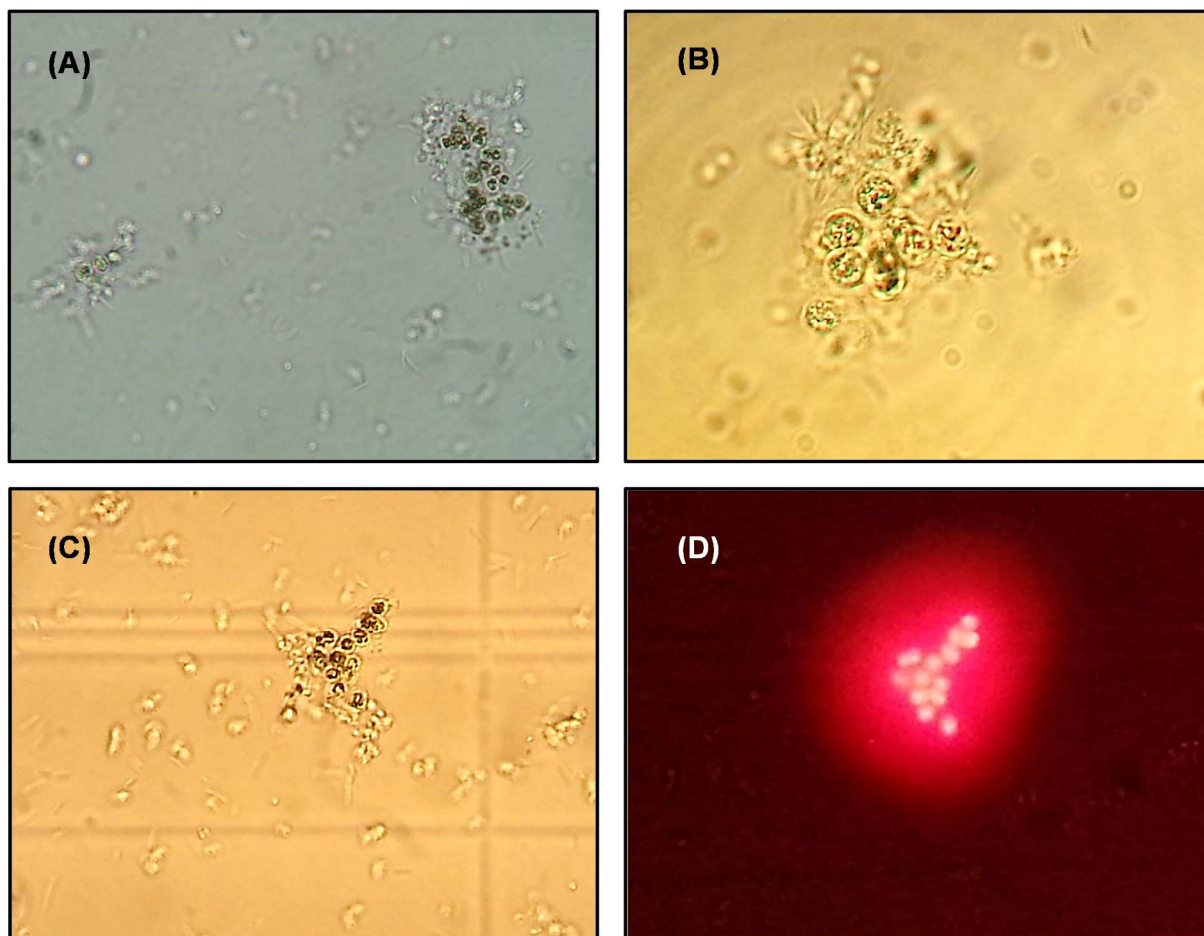


Figura 33. Agregados de células de *M. aeruginosa* após 90 minutos de submissão ao processo foto-Fenton (Condições: 5 mg.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> e 50 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; e 20 mg.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> e 100 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em aumento de 400 vezes (A e C), em aumento de 1000 vezes (B) e visto em microscópio de epifluorescência (D).

Estes efeitos podem estar relacionados com a capacidade do Fe<sup>3+</sup> em adsorver na parede celular de bactérias. Spuhler e colaboradores sugeriram a capacidade do Fe<sup>3+</sup> ser adsorvido na superfície de *Escherichia coli*, formando complexos Fe<sup>3+</sup>-bactéria. Ressaltaram ainda que a parede celular das bactérias possui superfícies altamente reativas capazes de ligarem-se ao ferro. Além das proteínas ligantes na membrana externa, outras proteínas e seus grupos carboxílicos existentes são propensos a ter afinidade pelo Fe<sup>3+</sup>, contribuindo para formação desses complexos (SPUHLER *et al.*, 2010).

Coral e colaboradores (2013), ao investigar o efeito da ozonização na integridade celular de *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae*, observaram rápida e completa perda de viabilidade celular em ambas as espécies, após exposições ao ozônio em concentrações acima de 0,2 mg.L<sup>-1</sup>. No entanto, reduções de 32 e 41% nas

concentrações celulares só foram observadas quando as dosagens de ozônio foram de 2 e 4 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Ainda, os autores ressaltaram que, assim como outros agentes oxidantes, o ozônio ataca primeiramente a parede celular e glicoproteínas, glicolípídeos e certos aminoácidos da membrana plasmática. Entretanto, devido ao alto potencial oxidativo e pelo fato do ozônio atacar posteriormente o material genético, a lise celular não é o primeiro mecanismo de inativação.

Ao estudar o processo de fotocatalise heterogênea com óxido de titânio (TiO<sub>2</sub>), em reator piloto solar (CPC), Pinho e colaboradores (2015) obtiveram resultados satisfatórios na redução da concentração celular de *M. aeruginosa*. Em 55 minutos de exposição a 20 mg.L<sup>-1</sup> de catalisador, a concentração de células caiu de 1x10<sup>6</sup> cél.mL<sup>-1</sup> para abaixo do limite de quantificação (1x10<sup>4</sup> cél.mL<sup>-1</sup>). Tal estudo exemplifica aplicação de AOP's na inativação de *M. aeruginosa*, no entanto, possui o inconveniente da geração de resíduos contendo partículas de titânio.

Utilizando as mesmas concentrações de 0,6 mg.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> e 10 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em processo foto-Fenton solar, em reator Cilíndrico Parabólico Composto, Spuhler *et al.* (2010) reduziram em 100% as concentrações de *Escherichia coli* suspensas em água mineral, em 180 minutos de reação. No entanto, cabe salientar que em 90 minutos de reação, as concentrações ainda se encontravam acima de 1x10<sup>4</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. O tempo de reação avaliado neste estudo se mostrou muito superior ao utilizado com as células de *M. aeruginosa*, nas mesmas concentrações de Fe<sup>2+</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, assinalando que eficiências maiores de inativação podem ser alcançadas em reações mais prolongadas. Os autores ainda ressaltaram que em tais condições, a geração de radicais hidroxila e de ROS pode ocorrer simultaneamente no meio intracelular ou próximo às células. Ainda, a presença de peróxido de hidrogênio no meio extracelular pode aumentar a permeabilidade da membrana, facilitando assim a difusão do Fe<sup>2+</sup> e aderência do Fe<sup>3+</sup> às células (SPUHLER *et al.*, 2010).

Os resultados de redução expressiva das concentrações de MC-LR nas condições intermediária e mais extrema do processo foto-Fenton sinalizam a eficiência na degradação da toxina, no entanto a sua eficiência quanto à toxicidade só pode ser atestada mediante à realização de bioensaios, dada a possibilidade de formação de subprodutos de degradação.

Embora não tenham sido mais observados os picos da toxina, as concentrações celulares caíram apenas em aproximadamente 50% após o tratamento, em ambas as condições. Este fator sugere a possibilidade de degradação da toxina a nível intracelular. Neste sentido, vários autores evidenciaram a probabilidade de ocorrência do processo Fenton e foto-Fenton no meio intracelular, devido à facilidade do  $\text{Fe}^{2+}$  em permear pela membrana catalisando a produção de EROs (SPUHLER *et al.*, 2010; ORTEGA-GÓMEZ *et al.*, 2013; POLO-LÓPEZ *et al.*, 2014; RODRÍGUEZ-CHUECA *et al.*, 2014; ORTEGA-GÓMEZ *et al.*, 2014).

Dada a ausência de estudos em que o processo foto-Fenton foi aplicado em células de *M. aeruginosa*, visando a inativação das células e degradação da toxina, comparações dos resultados de redução de área dos picos cromatográficos de MC-LR foram feitas em sua maioria a partir de trabalhos de degradação da toxina em solução ou extrato celulares.

Antoniou *et al.* (2008) estudaram a degradação de MC-LR através de fotocatalise heterogênea com  $\text{TiO}_2$  imobilizado em reator fotoquímico de bancada (concentração estimada do catalisador de  $1,68 \text{ mg.cm}^3$ ), avaliando-se através de cromatografia líquida de alta eficiência. Em 30 minutos de reação, a concentração da toxina reduziu de  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  para abaixo do limite de detecção do método. Análises utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas apontaram que a maioria dos subprodutos de degradação aparecerem em apenas 2 minutos de degradação, e atingiram seu máximo entre 10 e 15 minutos de reação.

Por sua vez, Bandala e colaboradores (2004), ao estudar o processo foto-Fenton na degradação de MC-LR em água ultrapura, obtiveram 100% de redução da concentração da toxina em 35 minutos de reação, utilizando baixas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{Fe}^{2+}$  ( $17 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $13 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente).

Rositano *et al.* (2001) compararam o efeito da ozonização em MC-LR purificada e em extrato de cultivo de *M. aeruginosa*. Para a toxina purificada ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ , dissolvida em água ultrapura), apenas  $0,22 \text{ mg.L}^{-1}$  e 15 segundos foram suficientes para degradá-la completamente. Ao investigar a eficiência do processo no extrato de cianobactérias, concluiu que  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{O}_3$  foram necessários para degradação de  $222 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  de MC-LR presentes no extrato, em tempo inferior a 5 minutos.

De modo geral o processo foto-Fenton, nas três condições testadas por 90 minutos, demonstrou resultados satisfatórios na inativação da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, embora as concentrações celulares não tenham sido completamente reduzidas. Quanto às concentrações de MC-LR, reduções significativas foram constatadas nas condições estudadas, exceto na condição mais branda (0,6 mg.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> e 10 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Desta forma, o processo foi avaliado novamente nesta condição, prolongando-se a reação por mais tempo.

#### 5.3.4.1 Aplicação Prolongada do Processo Foto-Fenton (0,6 mg.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> e 10 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

O estudo prolongado do processo foto-Fenton, a fim de estudar o efeito nas concentrações de MC-LR, foi realizado nas mesmas condições descritas no item 4.5.2, por 240 minutos (Tabela 12).

**Tabela 12. Parâmetros avaliados na aplicação prolongada do processo foto-Fenton (0,6 mg.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup> e 10 mg.L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em células de *Microcystis aeruginosa***

Parâmetro	Tempo (min)				
	0	45	90	180	240
pH	6,27	5,40	5,80	5,80	5,74
Temperatura (°C)	25	25	25	25	26
Luminosidade (100 Lux)	400	440	440	400	440
Concentração Celular (10.000 cél.mL <sup>-1</sup> )	14,0*	11,3	8,28	11,5	6,25
Peróxido de Hidrogênio (mg.L <sup>-1</sup> )	10,11	8,38	7,71	6,46	6,80
Fe <sub>Total</sub> Dissolvido(mg.L <sup>-1</sup> )	0,47	0,15	0,47	0,17	<LQ
Fe <sup>2+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	0,21	<LQ	0,29	<LQ	<LQ
Viabilidade Celular (1.000.000 cél.mL <sup>-1</sup> )	2,08*	0,00	0,00	0,00	0,00
Concentração MC-LR (µg.L <sup>-1</sup> )	3,96	3,64	2,34	2,83	2,64

**Legenda:** (<LQ) representam concentrações abaixo do limite de quantificação do método; n=1; (\*) amostras controle. **Nota:** Amostras controle referem-se às coletadas anteriormente à adição dos reagentes; as amostras referentes ao tempo 0 minutos foram aquelas coletadas logo após a adição dos reagentes.

Em 240 minutos de reação, o processo foto-Fenton foi capaz de reduzir a concentração celular em 55% comparando-se à concentração celular inicial (de 1,4x10<sup>5</sup> para 6,25x10<sup>5</sup> cél.mL<sup>-1</sup>). Do mesmo modo ao observado nos experimentos



anteriores, foi observada possível perda de viabilidade celular já em 45 minutos de reação (ensaio de viabilidade celular).

O monitoramento das espécies de ferro apontou que, dos 0,6 mg.L<sup>-1</sup> adicionados, 0,47 mg.L<sup>-1</sup> encontravam-se dissolvidos no início da reação, sendo 0,21 mg.L<sup>-1</sup> na forma de Fe<sup>2+</sup> e o restante como Fe<sup>3+</sup>. Em 45 minutos, não foi possível quantificar espécies ferrosas, e foi constatada baixa concentração de espécies férricas. Contudo, em 90 minutos as concentrações de espécies de ferro elevaram-se novamente. Esta dinâmica observada nas concentrações de ferro pode ser associada formação de complexos com compostos dissolvidos, formados ao longo da reação. Quando tais compostos sofrem a ação dos radicais formados ao longo do processo, fazem com que o ferro seja redissolvido (conforme discutido previamente no item 5.1.2). Nestas condições, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi consumido em 33%, restando 6,80 mg.L<sup>-1</sup> residuais.

As análises cromatográficas (Figura 34) demonstraram que as concentrações de microcistina-LR foram reduzidas em 33% após 240 minutos de reação, comparando-se à concentração inicial do cultivo (redução de 3,96 para 2,64 µg.L<sup>-1</sup>). No entanto, uma queda em 41% em relação a concentração inicial foi observada em 90 minutos de reação (2,34 µg.L<sup>-1</sup>), que em 180 minutos voltou a subir (2,83 µg.L<sup>-1</sup>). Esta oscilação nas concentrações da toxina (entre 90 e 180 minutos) podem estar associadas a eficiência do processo de extração em fase sólida, da etapa de liberação da toxina por congelamento e descongelamento, e à possível interação da toxina com a biomassa de células lisadas.

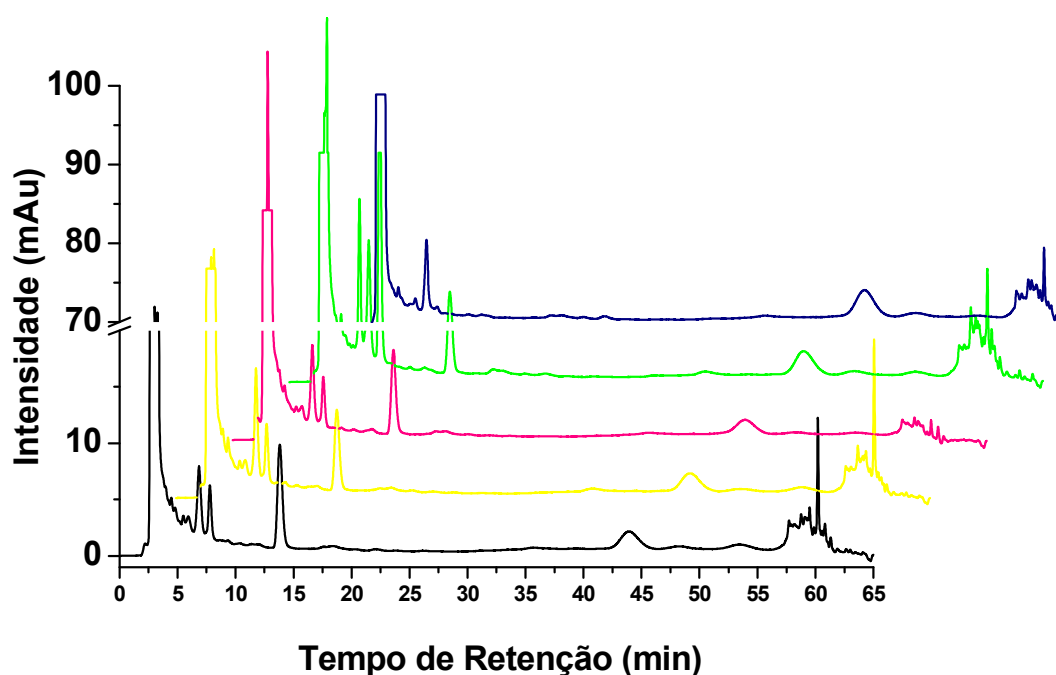


Figura 34. Cromatogramas ( $\lambda=238$  nm) obtidos após submeter as células de *M. aeruginosa* ao processo foto-Fenton ( $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) por  $t=0$  minutos (—);  $t=45$  minutos (—);  $t=90$  minutos (—);  $t=180$  minutos (—); e  $t=240$  minutos de reação (—).  $t_r$  MC-LR = 44 minutos. Método cromatográfico: 50% de B por 50 min; 55 a 100% de B em 2 min, mantendo-se em 100% por 20 min e retorno para 50% em 2 min (Fase Móvel MeOH (B): $\text{H}_2\text{O}$  0,05% TFA).

Pinho e colaboradores (2015) estudaram a oxidação de *M. aeruginosa* por fotocatalise heterogênea com  $\text{TiO}_2$ , com determinações de MC-LR intra e extracelular durante o tratamento. Em 25 minutos de reação, os autores observaram que a toxina se encontrava majoritariamente no ambiente intracelular. Após 55 minutos de reação, observou-se incremento acentuado nas concentrações extracelulares de MC-LR.

Huo *et al.* (2015) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  combinado à uma lâmpada a vapor de mercúrio de alta pressão (semelhante a utilizada no presente estudo) também em células de *Microcystis aeruginosa*, suspensas em meio ASM filtrado e não filtrado. Os autores monitoraram a densidade de células, a formação de radicais hidroxila (por meio de correlação matemática com o composto-sonda ácido p-clorobenzóico), níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e de microcistinas. Os resultados demonstraram que todas as concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  testadas (10, 20, 40 e  $60 \text{ mg.L}^{-1}$ ) mantiveram-se praticamente constantes em 3,5 horas de tratamento, e

que as concentrações celulares só começaram a reduzir após 120 minutos de exposição, para todas as concentrações de oxidante testadas. Até este período, as células permaneceram intactas. As concentrações de radicais hidroxila ficaram entre  $1,54$  e  $5,76 \times 10^{-15}$  M para os sistemas avaliados, valores estes muito inferiores dos usualmente encontrados em AOP's convencionais (entre  $10^{-10}$  e  $10^{-12}$  M).

Uma informação importante levantada pelos autores foi a de que a produção de radicais hidroxila foi ligeiramente maior nos experimentos com meio ASM não filtrado. Análises de espectroscopia de raio X apontaram que os elementos mais abundantes no meio não filtrado são oxigênio e ferro. Desta forma, os autores correlacionaram a maior formação dos radicais neste meio devido à decomposição do peróxido de hidrogênio em menor escala através do processo foto-Fenton, uma vez que estavam presentes o ferro, o peróxido de hidrogênio e radiação (UV-A e UV-B).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao avaliar as variáveis isoladas do processo foto-Fenton nas células de *D. subspicatus* (adotadas como modelo experimental), efeitos significativos de  $\text{Fe}^{2+}$  (complexado com ácido oxálico) e do  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram observados nas maiores concentrações avaliadas, e especialmente na presença de radiação.

Ao aplicar-se o foto-Fenton nas microalgas, não foram observadas reduções nas concentrações celulares ao longo da reação, no entanto este se mostrou capaz de inativar as células em apenas 30 minutos. Adicionalmente, alterações na fluorescência das células foram observadas imediatamente ao processo, apontando possíveis efeitos oxidativos nos fotossistemas.

O método cromatográfico desenvolvido e validado para determinação de microcistina-LR em cultivo de *Microcystis aeruginosa* apresentou excelente seletividade, linearidade, precisão e exatidão, demonstrando ser adequado para a determinação da toxina produzida pelas células.

Já o processo foto-Fenton aplicado às células de *Microcystis aeruginosa*, nas diferentes condições estudadas, não foi capaz de reduzir completamente as concentrações celulares imediatamente após os experimentos, no entanto, foi capaz de afetá-las a ponto de inviabilizar seu crescimento em apenas 45 minutos. Nestes casos, os efeitos causados às células não foram capazes de alterar sua fluorescência, indicando que os possíveis danos oxidativos não afetam diretamente os fotossistemas das cianobactérias, diferentemente das microalgas.

O efeito do processo na redução da concentração de MC-LR foi positivo, especialmente nas condições intermediária e mais extrema estudadas. Estes resultados levantaram a hipótese de degradação da toxina no meio intracelular, uma vez que as concentrações celulares não foram totalmente reduzidas ao longo do processo.

De modo geral, o presente estudo demonstrou que o processo foto-Fenton possui potencial para a inativação de microalgas e cianobactérias. Contudo, estudos de protótipos aplicáveis do processo poderiam ser estudadas em maiores escalas, com uso de radiação solar como fonte de energia e de forma combinada às outras etapas do processo de tratamento de água.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, A.; FERRAZ, A.; CONTRERAS, D.; RODRÍGUEZ, J. Mecanismo e Aplicações da Reação de Fenton Assistida por Compostos Fenólicos Redutores de Ferro. **Química Nova**, V. 30, p. 623-628, 2007.

ANDRADE, F. M. Determinação de Cianotoxinas em Amostras de Florações de Cianobactérias Coletadas em Pesque-Pagues e Pisciculturas Situadas na Região do Alto Mogi. Mestre em Ciências (Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2009.

ANTONIOU, M. G.; CRUZ, A. A.; DIONYSIOU, D. D. Cyanotoxins: New Generation of Water Contaminants. **Journal of Environmental Engineering**. V. 131, p. 1239-1243, 2005.

ANTONIOU, M. G.; SHOEMAKER, J. A.; CRUZ, A. A.; DIONYSIOU, D. D. LC/MS/MS structure elucidation of reaction intermediates formed during the TiO<sub>2</sub> photocatalysis of microcystin-LR. **Toxicon**. V. 51, p. 1103–1118, 2008.

ANDREOLI, C. V.; CARNEIRO, C. **Gestão Integrada de Mananciais de Abastecimento Eutrofizados**. 1ª Edição. Curitiba: Sanepar, 2005.

APHA-AWWA-WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 19th ed., American Public Health Association: Washington DC, 1995.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12.648: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae), 2011.

AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human Intoxication by Microcystins During Renal Dialysis Treatment in Caruaru – Brazil. **Toxicology**. V. 181-182, p. 441-446, 2002.

AZEVEDO, S. M. F. O. Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. **Medicina Online**. V. 1, n. 3, p. 1-22, 1998.

BABUPONNUSAMI, A.; MUTHUKUMAR, K. A review of Fenton and improvents to the Fenton processes for wastewater treatment. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. V. 2, p. 86-94, 2014.

BANDALA, E. R.; MARTÍNEZ, D.; MARTÍNEZ, E.; DIONYSIOU, D. D. Degradation of microcystin-LR toxin by Fenton and Photo-Fenton processes. **Toxicon**. V. 43, p. 829–832, 2004.

BARRINGTON, D. J.; REICHWALDT, E. S.; GHADOUANI, A. The Use of Hydrogen Peroxide to Remove Cyanobacteria and Microcystins from Waste Stabilization Ponds and Hipereutrophic Systems. **Ecological Engineering**. V. 50. p. 86-94, 2013.

BAUER, R.; FULLMANN, H. The Photo-Fenton – A cheap and efficient wastewater treatment method. **Research on Chemical Intermediates**. V. 23, n. 4, p. 341-354, 1997.

BEM, C. C.; BRAGA, M. C. B.; AZEVEDO, J. C. R. Avaliação do estado trófico de um lago urbano raso. **Rega**. V. 10, p. 41-50, 2013.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; HEREMAN, T. C.; CORDEIRO-ARAÚJO, M. K.; MACEDO-SILVA, I.; DIAS, C. T.; SASAKI, F. F. C.; MOURA, A. N. Phytotoxicity associated to microcystins: a review. **Brazilian Journal of Biology**. V. 74, n. 4, p. 753-760, 2014.

BRANDÃO, L. H.; DOMINGOS, P.; HERDY, J. S. Fatores Ambientais para a Floração de Cianobactérias. **Saúde & Ambiente em Revista**. V.1, n. 2, p. 40-50, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde - FUNASA. **Portaria n. 1469, de 29 de dezembro de 2000**. Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **PORTARIA GM/MS n. 2.914**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília, 12 de dezembro de 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE no 899**. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. 29 de maio de 2003.

CALIJURI, M. C.; ALVES, M. S. A.; SANTOS, A. C. A. S. **Cianobactérias e Cianotoxinas em Águas Continentais**. 1ª Edição. São Carlos: Editora Rima, 2006.

CAMPBELL, D.; H., VAUGHAN; CLARKE, A. K.; GUSTAFSSON, P.; ÖQUIST, G. Chlorophyll Fluorescence Analysis of Cyanobacterial Photosynthesis and Acclimation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. V. 62, p. 667–683, 1998.

CARMICHAEL, W. W.; BEASLEY, V. R.; BUNNER, D. L.; ELOFF, J. N.; FALCONER, I. R.; GORHAM, P. R.; HARADA, K.-I.; YU, M.-J.; KRISHNAMURTHY, T.; MOORE, R. E.; RINEHART, K. L.; RUNNEGAR, M. T. C.; SKULBERG, O. M.; WATANABE, M. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**. V. 26, p. 971-973, 1988.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria Secondary Metabolites - The Cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**. V. 72, p. 445-459, 1992.

CASSINI, S. T. A.; ANTUNES, P. W. P.; KELLER, R. Validação de Método Analítico Livre de Acetonitrila para Análise de Microcistinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Química Nova**. V. 36, p. 1208-1213, 2013.

CERUTTI, V. E. Variação Espaço-Temporal dos Macroinvertebrados Bentônicos e Nectônicos no Reservatório do Rio Verde, Paraná, Brasil. Mestre em Ciências - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management**. E & FN Spon, New York, 1999.

CHO, M.; LEE, Y.; CHUNG, H.; JEYONG, Y. Inactivation of *Escherichia coli* by Photochemical Reaction of Ferrioxalate at Slightly Acidic and Near-Neutral pHs. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 70, p. 1129–1134, 2004.

CORAL, L. A.; ZAMYADI, A.; BARBEAU, B.; BASSETI, F. J.; LAPOLLI, F. R.; PRÉVOST, M. Oxidation of *Microcystis aeruginosa* and *Anaeba flos-aquae* by ozone: Impacts on cell integrity and chlorination by-product formation. **Water Research**. V. 47, p. 2983-2994, 2013.

**Algae Base**. Disponível em: <http://www.algaebase.org/>. Acesso em dezembro de 2015.

**Cyanosite: For Research on Cyanobacteria**. Disponível em: <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/>. Acesso em julho de 2014.

DAWSON, R. M. The Toxicology of Microcystins. **Toxicon**. V. 36, p. 953-962, 1998.

DI BERNARDO, L.; MINILLO, A.; DANTAS, A. D. B. **Florações de Algas e Cianobactérias: Suas influências na Qualidade da Água e nas Tecnologias de Tratamento**. São Carlos: LDiBE, 2010. 536 p.

DOUMIC, L. I.; SOARES, P. A.; AYUDE, M. A.; CASSANELLO, M.; BOAVENTURA, R. A. R.; VILAR, V. J. P. Enhancement of a solar photo-Fenton reaction by using ferrioxalate complexes for the treatment of a synthetic cotton-textile dyeing wastewater. **Chemical Engineering Journal**. V. 277, p. 86–96, 2015.

ESTEVEES, F. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 1998. 315 p.

FAN, J.; HO, L.; HOBSON, P.; BROOKES, J. Evaluating the Effectiveness of Copper Sulphate, Chlorine, Potassium Permanganate, Hydrogen Peroxide and Ozone on Cyanobacterial Cell Integrity. **Water Research**. V. 47. p. 5153-5164, 2013.

FANG, Y-F.; CHEN, D-X.; HUANG, Y-P.; YANG, J.; CHEN, G-W. Heterogeneous Fenton Photodegradation of Microcystin-LR with Visible Light Irradiation. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**. V. 39, p. 540–543, 2011.

GAJDEK, P.; LECHOWSKI, Z.; BOCHNIA, T.; KEPCZYŃSKI, M. Decomposition of Microcystin-LR by Fenton Oxidation. **Toxicon**. V. 39, p. 1575-1578, 2001.

GORHAM, P. R.; MCLACHLAN, J.; HAMMER, U.T.; KIM, W.K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.). **Internat. Verein. Theor. Angew. Limnol**. V. 15, p. 796–804, 1964.

HISLOP, K. A.; BOLTON, J. R. The Photochemical Generation of Hydroxyl Radicals in the UV-vis/Ferrioxalate/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> System. **Environmental Science and Technology**. V. 33, p. 3119-3126, 1999.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1994.

HUO, X.; CHANG, D.; TSENG, J.; BURCH, M. D.; LIN, T. Exposure of *Microcystis aeruginosa* to Hydrogen Peroxide under Light: Kinetic Modeling of Cell Rupture and



Simultaneous Microcystin Degradation. **Environmental Science and Technology**. V. 49, p. 5502–5510, 2015.

JIANG, Y.; JI, B.; WONG, R. N. S.; WONG, M. H. Statistical study on the effects of environmental factors on the growth and microcystins production of bloom-forming cyanobacterium—*Microcystis aeruginosa*. **Harmful Algae**. V. 7, p. 127-136, 2008.

KAPLAN, D. In: **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, Second Edition**. Blackwell Publishing Ltd: 2013.

LAGOS, P. E. D. FITOPLÂNTON NO RESERVATÓRIO IRAI, PR COM ÊNFASE EM CIANOBACTÉRIAS: VARIAÇÃO SAZONAL EM RELAÇÃO ÀS VARIÁVEIS AMBIENTAIS. Dissertação (Mestre em Ecologia) - Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

LAWTON, L. A.; ROBERTSON, P. K. J.; CORNISH, B. J. P. A.; JASPARS, M. Detoxification of Microcystins (Cyanobacterial Hepatotoxins) Using TiO<sub>2</sub> Photocatalytic Oxidation. **Environmental Science and Technology**. V. 33, p. 771-775, 1999.

LI, W.; XIE, P.; CHEN, J.; HE, J.; GUO, X.; YU, D.; CHEN, L. Quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of microcystin-RR and its glutathione and cysteine conjugates in fish plasma and bile. **Journal of Chromatography B**. V. 963, p. 113–118, 2014.

LIAN, L.; CAO, X.; WU, Y.; SUN, D.; LOU, D. A green synthesis of magnetic bentonite material and its application for removal of microcystin-LR in water. **Applied Surface Science**. V. 289, p. 245-251, 2014.

MADIGAN, M. T; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010

MARTINS, C. F. Avaliação da Presença de Microcistina-LR por HPLC-PDA em Amostras de Mananciais da Região da Grande Vitória. Mestre em Engenharia Ambiental – Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental. Universidade do Espírito Santo. Vitória, 2010.

MCELHINEY, J.; LAWTON, L. A. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. **Toxicology and Applied Pharmacology**. V. 203, p. 219–230, 2005.

MEREL, S.; WALKER, D.; CHICANA, R.; SNYDER, S.; BAURÈS, E.; THOMAS, O. State of Knowledge and Concerns on Cyanobacterial Blooms and Cyanotoxins. **Environment International**. V. 59, p. 303-327, 2013.

MIAO, H-F.; QIN, F.; TAO, G-J.; TAO, W-Y; RUAN, W-Q. Detoxification and degradation of microcystin-LR and -RR by ozonation. **Chemosphere**. V. 79, p. 355–361, 2010.

MOLICA, R.; AZEVEDO, S. Ecofisiologia de Cianobactérias Produtoras de Cianotoxinas. **Oecologia Brasiliensis**. V. 13, p. 229-246, 2009.

MOMANI, F.; SMITH, D. W.; EL-DIN, M. G. Degradation of cyanobacteria toxin by advanced oxidation processes. **Journal of Hazardous Materials**. V. 150, p. 238–249, 2008.

NEYENS, E., BAEYENS, J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. **Journal of Hazardous Materials**. V. B98, p. 33-50, 2003.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A. C.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008.

ORTEGA-GÓMEZ, E.; ESTEBAN GARCÍA, B.; BALLESTEROS MARTÍN, M. M.; FERNÁNDEZ IBÁÑEZ, P.; SÁNCHEZ PÉREZ, J. A. Inactivation of *Enterococcus faecalis* in simulated wastewater treatment plant effluent by solar photo-Fenton at initial neutral pH. **Catalysis Today**. V. 209, p. 195–200, 2013.

ORTEGA-GÓMEZ, E.; ESTEBAN GARCÍA, B.; BALLESTEROS MARTÍN, M. M.; FERNÁNDEZ IBÁÑEZ, P.; SÁNCHEZ PÉREZ, J. A. Inactivation of natural enteric bacteria in real municipal wastewater by solar photo-Fenton at neutral pH. **Water Research**. V. 63, p. 316-324, 2014.

PÁDUA, V. L. **Remoção de Microorganismos Emergentes e Microcontaminantes Orgânicos no Tratamento de Água para Consumo Humano**. Rio de Janeiro: ABES, 2009.

PHILIPPI JR, A. **Saneamento, saúde e ambiente**. Barueri: Manole, 2005.

PICHARDO, S.; PFLUGMACHER, S. Study of the Antioxidant Response of Several Bean Variants to Irrigation with Water Containing MC-LR and Cyanobacterial Crude Extract. **Environmental Toxicology**. DOI 10.1002/tox. p. 300-306, 2011.

PIGNATELLO, J. J.; OLIVEROS, E.; MACKAY, A. Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton Reaction and Related Chemistry. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**. V 36, p. 1–84, 2006.

PINHO, L. X. Photocatalytic Degradation of Cyanobacteria and Cyanotoxins using Suspended and Immobilized TiO<sub>2</sub>. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica). Universidade do Porto. Cidade do Porto, 2014.

PINHO, L. X.; AZEVEDO, J.; BRITO, A.; SANTOS, A.; TAMAGNINI, P.; VÍTOR J.P. VILAR, V. J. P.; VASCONCELOS, V. M.; BOAVENTURA, R. A.R. Effect of TiO<sub>2</sub> photocatalysis on the destruction of *Microcystis aeruginosa* cells and degradation of cyanotoxins microcystin-LR and cylindrospermopsin. **Chemical Engineering Journal**. V. 268, p. 144-152, 2015.

POLO-LÓPEZ, M. I.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, I.; OLLER I.; FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ, P. Solar disinfection of fungal spores in water aided by low concentrations of hydrogen peroxide. **Photochemical & Photobiological Sciences**. V. 10, p. 381–388, 2010.

POLO-LÓPEZ, M. I.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, I.; VELEGRAKI, T.; KATSONI, A.; OLLERA, I.; MANTZAVINOS, D.; FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ, P. Mild solar photo-Fenton: An effective tool for the removal of *Fusarium* from simulated municipal effluents. **Applied Catalysis B: Environmental**. V. 111–112, p. 545–554, 2012.

RAMANAN, S.; TANG, J.; VELAYUDHAN, A. Isolation and preparative purification of microcystin variants. **Journal of Chromatography A**. V. 883, p. 103–112, 2000.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2007.

REILLY, M.; CODD, G. A. **Laboratory analysis of microcystins in samples from environmental waters**. Universidade de Dundee, 2007.

RUPPERT, G.; BAUER, R.; HEISLER, G. The photo-Fenton reaction - an effective photochemical wastewater treatment process. **J. Photochem Photobiol. A: Chem.** V. 73, p. 75-18, 1993.

RODRÍGUEZ-CHUECA, J.; POLO-LÓPEZ, M. I.; MOSTEO, R.; ORMAD, M. P.; FERNÁNDEZ-IBÁÑEZ, P. Disinfection of real and simulated urban wastewater effluents using a mild solar photo-Fenton. **Applied Catalysis B: Environmental**. V 150– 151, p. 619– 629, 2014.

RODRÍGUEZ, E.; ONSTAD, G. D.; KULL, T. P. J.; METCALF, J. S.; ACERO, J. L.; GUNTEN, U. Oxidative elimination of cyanotoxins: Comparison of ozone, chlorine, chlorine dioxide and permanganate. **Water Research**. V. 41, p. 3381-3393, 2007.

RODRÍGUEZ, E.; MAJADO, M. E.; MERILUOTO, J.; ACERO, J. L. Oxidation of microcystins by permanganate: Reaction kinetics and implications for water treatment. **Water Research**. V. 41, p. 102-110, 2007.

ROSITANO, J.; NEWCOMBE, G.; NICHOLSON, B.; SZTAJNBOK, P. Ozonation of Nom and Algal Toxins in Four Treated Waters. **Water Research**. V. 35, p. 23-32, 2001.

RUNNEGAR, M. T. C.; FALCONER, I. R.; JACKSON, A. R. B.; MCLNNES, A. Toxin Production by *Microcystis aeruginosa* Cultures. **Toxicon**. V .3, p.377-380, 1983.

SCHICK, R.; STRASSER, I.; HANS-HENNING, S. Fluorometric Determination of Low Concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Water: Comparison with Two Other Methods and Application to Environmental Samples and Drinking-Water Treatment. **Water Research**. V. 31, p. 1371-1378, 1997.

SCHMITZ, R.; DAL MAGRO, C.; COLLA, L. M. Aplicações Ambientais de Microalgas. **CIATEC – UPF**. V. 4, p. 48-60, 2012.

SCIACCA, F.; RENGIFO-HERRERA, J. A.; WÉTHÉ, J.; PULGARIN, C. Dramatic enhancement of solar disinfection (SODIS) of wild *Salmonella* sp. in PET bottles by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition on natural water of Burkina Faso containing dissolved iron. **Chemosphere**. V. 78, p. 1186–1191, 2010.

SILVEIRA, A. L. Avaliação do efeito inibitório de extratos hidroalcoólicos de macrófitas aquáticas sobre o crescimento de *Microcystis aeruginosa* Kützing. 2012. 114 f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

SHARMA, V. K.; TRIANTIS, T. M.; ANTONIOU, M. G.; HE, X.; PELAEZ, M.; HAN, C.; SONG, W.; O'SHEA, K. E.; CRUZ, A. A.; KALOUDIS, T; HISKIA, A; DIONYSIOU, D.

D. Destruction of microcystins by conventional and advanced oxidation processes: A review. **Separation and Purification Technology**. V. 91, p. 3–17, 2012.

**SHIMADZU APPLICATION NEWS**. Disponível em: <http://www2.shimadzu.com/applications/lc/L248.pdf>. Acesso em Outubro de 2014.

SOARES, R. M.; MAGALHÃES, V. F.; AZEVEDO, S. M. F. O. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 70, p. 1-10, 2004.

SOARES, P. A.; BATALHA, M.; SOUZA, S. M. A. G. U.; BOAVENTURA, R. A. R.; VILAR, V. J. P. Enhancement of a solar photo-Fenton reaction with ferric-organic ligands for the treatment of acrylic-textile dyeing wastewater. **Journal of Environmental Management**. V. 152, p. 120-131, 2015.

SOUZA, K. V. D.; PERALTA-ZAMORA, P.; FARIA ZAWADZKI, S. Imobilização de Ferro (II) em matriz de alginato e sua utilização na degradação de corantes têxteis por processo Fenton. **Química Nova**. V. 31, p. 1145-1149, 2008.

SPUHLER, D.; RENGIFO-HERRERA, J. A.; PULGARIN, C. The effect of Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the photo-Fenton reagent at near neutral pH on the solar disinfection (SODIS) at low temperatures of water containing *Escherichia coli* K12. **Applied Catalysis B: Environmental**. V. 96, p. 126–141, 2010.

STERITI, A.; ROSSI, R.; CONCAS, A.; CAO, G. A novel cell disruption technique to enhance lipid extraction from Microalgae. **Bioresource Technology**. V. 164, p. 70–77, 2014.

TEIXEIRA, C. P. D. A. B.; JARDIM, W. F. **Processos Oxidativos Avançados: Conceitos Teóricos**. Caderno Temático. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo: V. 3, 2004. 83 f.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2005.

USEPA. Cyanobacteria and Cyanotoxins: Information for Drinking Water Systems. **United States Environmental Protection Agency**. Office of Water: 2012.

WALMSLEY, R. D. A Review and Discussion Document. Perspectives on Eutrophication of Surface Waters: Policy/Research Needs in South Africa. **Water Research Commission**. Project K8/360. 2000.

WHO: World Health Organization. **Guidelines for drinking-water quality: Health criteria and other supporting information**. V. 1: World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1998.

YUAN, M.; CARMICHAEL, W. W.; HILBORN, E. D. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. **Toxicon**. V. 48, p. 627–640, 2006.

## ANEXO A

**Meio de cultura CHU utilizado para cultivo de *Desmodemus subspicatus***

Tabela A1 – Composição do meio de cultivo CHU

Solução Estoque para Preparo do Meio CHU	Composição da Solução Estoque	Concentração do Sal na Solução Estoque (g.L <sup>-1</sup> )	Concentração do Sal no meio CHU (mg.L <sup>-1</sup> )
1	NaNO <sub>3</sub>	25	250
2	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	3	25
3	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8	75
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8	75
5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	18	175
6	NaCl	3	25
7	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .2H <sub>2</sub> O	50	50
	KOH	31	31
8	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5	4.98
9	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11	11,42
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,088	0,00882
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,014	0,00144
	MoO <sub>3</sub>	0,007	0,00071
10	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,016	0,00157
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,005	0,00049

Fonte: ABNT NBR 12648/2011

## ANEXO B

**Meio de cultura ASM-1 utilizado para cultivo de *Microcystis aeruginosa***

Tabela B1 – Composição do meio de cultivo ASM-1

Solução Estoque para Preparo do Meio ASM-1	Composição da Solução Estoque	Concentração do Sal na Solução Estoque (g.L <sup>-1</sup> )	Concentração do Sal no meio ASM-1 (mg.L <sup>-1</sup> )
Solução A	NaNO <sub>3</sub>	8,5	170
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,45	49
	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,05	41
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,45	29
Solução B	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,7	43,5
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	7,06	35,3
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	28,4	2,84
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	13,9	1,39
Solução C	FeCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	9,14	0,9140
	ZnCl <sub>2</sub>	3,35	0,3350
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,19	0,0190
	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,014	0,0014
Solução D	EDTA Tritriplex	18,6	7,44

Fonte: Adaptado de Silveira (2012).