

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ENGENHARIA CIVIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL**

LUCIANA MÜLLER

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DEGRADAÇÃO DE
M. aeruginosa E MICROCISTINA-LR POR AOPs E
NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2017

LUCIANA MÜLLER

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DEGRADAÇÃO DE
M. aeruginosa E MICROCISTINA-LR POR AOPs E
NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Dissertação apresentada a Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR campus Curitiba, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de MESTRE em ENGENHARIA CIVIL, na Área de Concentração de Saneamento e Recursos Hídricos.

Orientador: Prof. Dr. Thomaz Aurélio Pagioro

Co-orientadoras: Prof^a. Dr^a. Adriane Martins de Freitas e Prof^a. Dr^a. Lucia Regina Martins

CURITIBA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M958a Müller, Luciana
2017 Avaliação da toxicidade e degradação de *M. aeruginosa*
e Microcistina-LR, por AOPs e nanopartículas de prata
/ Luciana Müller.-- 2017.
101 f.: il.; 30 cm.

Texto em português, com resumo em inglês.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica
Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia
Civil, Curitiba, 2017.
Inclui bibliografias.

1. Engenharia civil - Dissertações. 2. Cianobactéria.
3. Cianotoxinas. 4. Peróxido de hidrogênio. 5. Fotocatálise.
6. Oxidação. 7. Toxicologia ambiental. I. Pagioro, Thomaz
Aurélio. II. Freitas, Adriane Martins de. III. Martins,
Lúcia Regina Rocha. IV. Universidade Tecnológica Federal
do Paraná - Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil.
V. Título.

CDD: Ed. 22 -- 624

Biblioteca Ecoville da UTFPR, Câmpus Curitiba

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me manter confiante e otimista em todas as adversidades, pela saúde e disposição, pelos problemas e desafios que me fizeram mais forte.

A pessoa que me acolheu em sua casa, Jaciara Santos Franco, querida “Jô”, pela confiança e generosidade.

A todos que estiveram do meu lado, prestando suporte e apoio: familiares, amigos e amigas, colegas de laboratório.

A todas as orações dedicadas a mim. Foram elas que me fortaleceram, me ergueram, me mantiveram confiante.

A família que me acolhe nos últimos tempos, com muito amor e carinho.

A banca de qualificação e a banca de mestrado, por suas valiosas considerações e contribuições, pela disponibilidade e interesse em dispendiar seu tempo em prol deste trabalho.

Ao orientador Dr. Thomaz e coorientadoras Dras. Adriane e Lucia, por todo conhecimento generosamente compartilhado, por me auxiliarem na formulação de perguntas e na busca por respostas.

Aos professores e professoras do PPGEC, pelos conhecimentos compartilhados, disponibilidade e atenção em sanar dúvidas e contribuir com minha formação.

Ao PPGEC, e todos envolvidos na formação de profissionais competentes.

A CAPES, pela bolsa de mestrado.

RESUMO

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

Florações de cianobactérias são facilmente encontradas, devido ao crescente aporte de nutrientes nos corpos de águas naturais e artificiais, ocasionado pelos acelerados processos de eutrofização frutos da ocupação urbana e rural sem a observação de critérios mínimos. *Microcystis aeruginosa* é uma espécie de cianobactéria potencialmente produtora de cianotoxinas, comumente associada a casos de intoxicação em escala mundial. Novas tecnologias para o tratamento de água têm sido implementadas para cumprimento dos padrões de potabilidade exigidos pela legislação. O presente trabalho buscou analisar a produção científica mundial relacionada ao tratamento de água com presença de *M.aeruginosa* e MC-LR, buscando identificar o estado da arte, além de embasar a discussão dos métodos propostos. O presente estudo está dividido em três artigos, no primeiro realizou-se uma análise bibliométrica das pesquisas mundiais relacionadas à cianobactérias, cianotoxinas e o tratamento de água, a partir da base de dados *Scopus*. No segundo artigo buscou-se avaliar a aplicabilidade dos AOPs UV-C e UV-C/H₂O₂ na degradação de *Microcystis aeruginosa* BB005 e MC-LR, e a análise dos efeitos da adição de nanopartículas de Ag, com base em um produto comercial composto por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e nanopartículas de prata (NAg). No terceiro artigo buscou-se avaliar a qualidade da água produzida a partir de ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia magna*. Os resultados indicam que a fotólise e o processo UV-C/H₂O₂ apresentaram resultados satisfatórios, sendo uma alternativa eficiente. Porém, os resultados dos ensaios de ecotoxicidade inferem que estes tratamentos utilizados com a finalidade de degradar *M. aeruginosa* e MC-LR, possuem potencial de geração de subprodutos de degradação tóxicos: os ensaios com *D. magna* demonstraram toxicidade mesmo quando a água submetida a fotólise foi diluída quatro vezes. Com relação ao processo UV-C/H₂O₂ (sem e com adição de NAg), a amostra foi tóxica quando não diluída. Já quando empregada as NAg combinadas a radiação UV-C, esta apresentou toxicidade extremamente alta, afetando a mobilidade de todos os organismos teste em todas as diluições (até 16 x).

Palavras-chave: Cianobactérias. Cianotoxinas. Peróxido de Hidrogênio. Fotocatálise. Processos Avançados de Oxidação. Ecotoxicidade.

ABSTRACT

MÜLLER, L. **Evaluation of toxicity and degradation of *M. aeruginosa* and Microcistin-LR by AOPs and silver nanoparticles.** 2017. 100 p. Dissertation (Master). Postgraduate Program in Civil Engineering, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2017.

Cyanobacterial blooms are easily found, due to the increasing nutrient supply in natural and artificial bodies of water, caused by the accelerated processes of eutrophication, fruits of urban and rural occupation without observing minimum criteria. *Microcystis aeruginosa* is a specie of cyanobacteria that are potentially cyanotoxin-producing, commonly associated with cases of worldwide intoxication. New technologies for water treatment have been implemented to meet the standards of potability required by legislation. The present study looked for analyze the world scientific production related to the treatment of water with presence of *M. aeruginosa* and MC-LR, seeking to identify the state of the art, besides supporting the discussion of the proposed methods. The present study is divided into three articles, the first one was a bibliometric analysis of the world-wide research related to cyanobacteria, cyanotoxins and water treatment, from the *Scopus* database. In the second article evaluated the aplicability of UV-C e UV-C/H₂O₂ AOPs on degradation of *Microcystis aeruginosa* BB005 and MC-LR, and the analysis of effects Ag nanoparticles addition, based on a commercial product composed of hydrogen peroxide (H₂O₂) and silver nanoparticles (NAg). In the trird article evaluated the water quality produced, from acute toxicity tests with *Daphnia magna*. The results indicate that photolysis and the UV-C/H₂O₂ process presents satisfactory results, being an efficient alternative. However, the results of the ecotoxicity assays infer that these treatments used for the purpose of degrading *M. aeruginosa* and MC-LR, have potential to generate toxic degradation byproducts: the *D. magna* assays demonstrated toxicity even when the water submitted to photolysis was diluted four times. Regarding the UV-C/H₂O₂ process (without and with NAg addition), the sample was toxic when undiluted. When NAg was used in combination with UV-C radiation, it showed extremely high toxicity, affecting the mobility of all test organisms at all dilutions (until 16x).

Keywords: Cyanobacteria. Cyanotoxins. Hydrogen peroxide. Photocatalysis. Advanced Oxidation Processes. Ecotoxicity.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
OBJETIVO	15
CAPÍTULO I - CIANOBACTÉRIAS, CIANOTOXINAS E O TRATAMENTO QUÍMICO DA ÁGUA DE ABASTECIMENTO: UMA ANÁLISE BIBLIOMÉTRICA DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA	16
1 INTRODUÇÃO	17
2 MATERIAIS E MÉTODOS	18
2.1 SELEÇÃO DA BASE DE DADOS	19
2.2 PROCESSAMENTO DE DADOS.....	19
2.3 MAPEAMENTO DOS RESULTADOS	20
2.4 DEFINIÇÃO DAS PALAVRAS CHAVES.....	20
3 RESULTADOS	21
3.1 FORMULAÇÃO DO <i>STRING</i> DE BUSCA.....	21
3.2 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS DAS PUBLICAÇÕES	21
3.3 ANÁLISE DAS REFERÊNCIAS QUE FUNDAMENTAM AS PUBLICAÇÕES	28
3.4 ANÁLISE GERAL DAS PUBLICAÇÕES.....	33
3.4.1 <i>Processos Químicos de Tratamento de Água com Microcistina-LR</i>	34
3.4.1.1 Processos Químicos Convencionais	36
3.4.1.1.1 Cloro, Dióxido de Cloro e Permanganato.....	36
3.4.1.2 Degradação Eletroquímica	37
3.4.1.3 Processos Avançados de Oxidação (AOPs).....	38
3.4.1.3.1 Fotólise	38
3.4.1.3.2 Fotocatálise.....	39
3.4.1.3.3 Oxidação com o ar, com peróxido de hidrogênio e ozônio.....	39
3.4.1.4 Sistemas Combinados de Tratamento de Água com Microcistinas	40
3.4.1.4.1 Carvão ativado associado a oxidantes	40
3.4.1.4.2 Sistemas homogêneos associados a oxidantes	40
3.4.1.4.3 Catalisadores heterogêneos associados a oxidantes.....	41
3.4.1.4.4 Catalisadores heterogêneos suportados.....	42
4 CONSIDERAÇÕES DO CAPÍTULO	43
5 REFERÊNCIAS	44
CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DOS AOPS UV-C E UV-C/H₂O₂ NA DEGRADAÇÃO DE <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i> BB005 E MC-LR, E ANÁLISE DOS EFEITOS DA ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA	51
1 INTRODUÇÃO	51
2 METODOLOGIA	53
2.1 MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO DE <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i>	55
2.2 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	56
2.3 VARIÁVEIS DE MONITORAMENTO E CONTROLE ANALÍTICO	58
2.3.1 <i>Densidade Celular (células.mL⁻¹)</i>	58
2.3.2 <i>Viabilidade Celular</i>	59
2.3.3 <i>Microcistina LR (MC-LR)</i>	60
2.3.4 <i>Diâmetro Celular</i>	60
2.3.5 <i>Varredura Espectral</i>	61
2.3.6 <i>Peróxido de Hidrogênio Residual</i>	61
2.4 ESTUDOS CINÉTICOS.....	62

3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1	CURVA DE CRESCIMENTO DA CEPA <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i> BB005	62
3.2	DENSIDADE CELULAR IMEDIATA.....	64
3.3	VIABILIDADE CELULAR.....	66
3.4	MICROCISTINA LR (MC-LR).....	67
3.5	DIÂMETRO CELULAR.....	70
3.6	VARREDURA ESPECTRAL.....	71
3.7	PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO RESIDUAL	79
4	CONSIDERAÇÕES DO CAPÍTULO	81
5	REFERÊNCIAS.....	82

CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA APÓS DEGRADAÇÃO DE		
<i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i> E MC-LR A PARTIR DE TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM		
<i>DAPHNIA MAGNA</i>		
		86
1	INTRODUÇÃO.....	86
2	METODOLOGIA	88
2.1	CULTIVO DE <i>DAPHNIA MAGNA</i>	88
2.2	MÉTODO DE ENSAIO.....	88
2.3	VARREDURA ESPECTRAL.....	89
3	RESULTADOS	90
4	CONSIDERAÇÕES DO CAPÍTULO	94
5	REFERÊNCIAS.....	94
	CONCLUSÃO	97
	REFERÊNCIAS	98

ÍNDICE DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO I

Quadro	01.	Escolha	das	palavras-chave.....	20
Quadro	02.	<i>String</i>		de busca.....	21
Figura 01. Número de publicações por ano, em escala mundial, sobre o tratamento de água com presença de cianobactérias e microcistinas, a partir do <i>string</i> de busca definido.....					
					22
Figura 02. Autores com o maior número de publicações, em escala mundial, a respeito do tratamento de água com presença de cianobactérias e microcistinas, a partir do <i>string</i> de busca definido.....					
					23
Figura 03. Distribuição das publicações por Instituição de origem, a partir do <i>string</i> de busca definido a cerca do tratamento de água com presença de cianobactérias e microcistinas.....					
					24
Figura 04. Distribuição das publicações que englobam a questão do saneamento voltadas ao tratamento de água com presença de cianobactérias e cianotoxinas, por país de origem.....					
					25
Figura 05. Principais autores brasileiros abrangidos por esta pesquisa, a partir do <i>string</i> de busca definido a cerca do tratamento de água com presença de cianobactérias e microcistinas.....					
					26
Figura 06. Instituições brasileiras com maior número de publicações a respeito do tratamento de água com presença de cianobactérias e microcistinas, a partir do <i>string</i> de busca definido.....					
					26
Figura 07. Distribuição geral, a nível mundial, das publicações por tipo de documento.....					
					27
Figura 08. Periódicos com maior número de publicações sobre o tratamento de água com presença de cianobactérias e microcistinas.....					
					28
Figura 09. Desenho tridimensional da rede de citações indicando as direções das conexões, o fluxo de informações entre os autores de trabalhos voltados ao tratamento de água com cianobactérias e microcistinas.....					
					29

Figura 10. Distribuição do número das citações por autor, indicando os autores das principais obras voltadas ao tratamento de água com cianobactérias e microcistinas.....30

Tabela 01. Principais obras citadas pelos autores de trabalhos sobre tratamento de água com presença de cianobactérias e cianotoxinas.....32

CAPÍTULO II

Figura 01. Fluxograma explicativo das etapas deste trabalho e seus respectivos passos metodológicos.....54

Quadro 01. Composição e quantidade das soluções estoques do meio ASM-1 de Gorhan *et al.* (1964) modificado.....56

Figura 02. Sistema adotado para realização dos ensaios. Em A: posicionamento da lâmpada a vapor de mercúrio 125 W; em B: água de estudo; em C: agitador magnético.....57

Figura 03. Em (A) quadrantes maiores da câmara de Neubauer (Fonte: www.celeromics.com). Em (B) quadrantes menores da câmara de Neubauer (aumento de 400x).....59

Figura 04. Ferramenta de medição do diâmetro celular, a partir de imagem capturada em microscópio óptico Zeiss®, e software Zen 2012®61

Figura 05. Aspecto da cepa de *M. aeruginosa* BB005 desde a inoculação até o período de senescência celular. Os dois beckeres correspondem a duplicatas.....63

Figura 06. Curva de crescimento da cepa toxigênica de estudo *Microcystis aeruginosa* BB005 (média das réplicas).....64

Figura 07. Razão entre as concentrações final e inicial (C/C_0) da densidade celular (células.mL^{-1}) imediata de cada tratamento, incluindo as variáveis isoladas.....65

Tabela 01. Número de células dos testes de viabilidade celular de cada tratamento, incluindo as variáveis isoladas. T1: UV-C; T2: UV-C/H₂O₂; T3: UV-C/H₂O₂ +NAg; T4: H₂O₂+NAg; T5: NAg; T6: UV-C/NAg.....66

- Figura 08. Razão entre as concentrações final e inicial (C/C_0) da Microcistina-LR em cada tratamento, incluindo as variáveis isoladas.....68
- Tabela 02. Resultados da concentração de MC-LR (média das réplicas) de todos os tratamentos nos diversos tempos de monitoramento.....69
- Tabela 03. Constante de velocidade de reação da degradação de MC-LR pelos diferentes tratamentos.....70
- Figura 09. *Box chart* do diâmetro celular dos tratamentos T2 (UV-C/H₂O₂) e T3 (UV-C/H₂O₂ +NAg), e das variáveis isoladas T1 (UV-C) e T6 (UV-C/NAg), considerando a média do diâmetro celular de 5 células em cada tempo de monitoramento (0, 30, 60, 90, 120, 150, e 180 minutos).....71
- Figura 10. Imagens capturadas durante a execução dos ensaios, nos respectivos tempos de monitoramento. T1: UV-C; T2: UV-C/H₂O₂; T3: UV-C/H₂O₂ +NAg; T6: UV-C/NAg.....72
- Tabela 03. Comprimento de onda de absorção dos pigmentos de plânctons.....73
- Figura 11. Varredura espectral de 200 a 900 nm do tratamento T1 (UV-C) em cada tempo de monitoramento (0, 30, 60, 90, 120, 150, e 180 minutos).....75
- Figura 12. Varredura espectral de 200 a 900 nm dos tratamentos T2 (UV-C/H₂O₂) em cada tempo de monitoramento (0, 30, 60, 90, 120, 150, e 180 minutos).....76
- Figura 13. Varredura espectral de 200 a 900 nm do tratamento T3 (UV-C/H₂O₂+NAg) em cada tempo de monitoramento (0, 30, 60, 90, 120, 150, e 180 minutos).....77
- Figura 14. Varredura espectral de 200 a 900 nm do tratamento T6 (UV-C/NAg) em cada tempo de monitoramento (0, 30, 60, 90, 120, 150, e 180 minutos).....78
- Figura 15. Espectro de UV-Vis da reação de sintetização de nanopartículas de prata, conduzida com 600 RPM.....79
- Tabela 04. Peróxido de Hidrogênio Residual (mg.L⁻¹) dos tratamentos T2, T3 e T4 em cada tempo de monitoramento.....79
- Figura 16. Razão entre as concentrações final e inicial (C/C_0) do peróxido de hidrogênio residual dos tratamentos T2 (UV-C/H₂O₂), T3 (UV-C/H₂O₂+NAg) e T4 (H₂O₂+NAg) nos

diversos intervalos de monitoramento. Em (A) todas as réplicas, em (B) a média das réplicas.....80

Tabela 05. Constante de velocidade de reação do consumo de H_2O_2 pelos diferentes tratamentos.....81

CAPÍTULO III

Quadro 01. Resultados dos testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna*, dos tratamentos T1: UV-C; T2: UV-C/ H_2O_2 ; T3: UV-C/ H_2O_2 +NAg e T6: UV-C/NAg.....89

Figura 01. Subtração das varreduras espectrais dos tratamentos, da varredura espectral inicial (200 a 900 nm), em cada tempo de monitoramento (30, 60, 90, 120, 150, e 180 minutos). T1: UV-C; T2: UV-C/ H_2O_2 ; T3: UV-C/ H_2O_2 +NAg e T6: UV-C/NAg.....92

ANEXOS

ANEXO A - Carta Controle de sensibilidade de *D. magna* ao dicromato de potássio.....100

ANEXO B - Carta Controle de Sensibilidade $K_2Cr_2O_7$100

INTRODUÇÃO

A ocorrência de acelerados processos de eutrofização é decorrente de impactos antrópicos nos ecossistemas aquáticos, causando um enriquecimento artificial destes ambientes, pelo aumento das concentrações de nutrientes na água, principalmente compostos nitrogenados e fosfatados, o que resulta no aumento dos processos naturais de produção. As principais fontes desse enriquecimento são os esgotos domésticos e industriais nos centros urbanos e das atividades agrícolas nas regiões rurais (FUNASA, 2003).

O nitrogênio e o fósforo podem ser estocados muito eficientemente por cianobactérias, na forma de ficocianina e cianoficina. Além disso, alguns grupos de cianobactérias são capazes de fixar diretamente o N_2 através de células especiais denominadas heterocitos (FALCONER, 2005).

As cianobactérias são organismos que apresentam extraordinária capacidade adaptativa e flexibilidade para aclimação nos mais diversos ambientes, como os terrestres, de água doce, salobra ou marinha, fontes termais, neve e deserto, em decorrência de suas características morfológicas e fisiológicas. Este fato explica a diversificação das cianobactérias em seus diferentes ecotipos e morfotipos. São microrganismos procariotos, que realizam fotossíntese com liberação de oxigênio, fato que as diferencia de outras bactérias fotoautotróficas (KOMÁREK, 2006).

Alguns gêneros podem produzir metabólitos secundários como as cianotoxinas, potencialmente tóxicas aos humanos e animais (BITTENCOURT-OLIVEIRA; MOLICA, 2003).

O tipo mais comum de intoxicação envolvendo cianobactérias é ocasionado por hepatotoxinas, que apresentam uma ação mais lenta, podendo causar morte num intervalo de poucas horas a poucos dias. As espécies já identificadas como produtoras dessas hepatotoxinas estão incluídas nos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc* e *Cylindrospermopsis* (CARMICHAEL, 1994). Dentre as hepatotoxinas, segundo suas estruturas químicas, as microcistinas são heptapeptídeos cíclicos e as nodularinas são pentapeptídeos (FUNASA, 2003). A primeira hepatotoxina identificada procedeu-se da espécie *Microcystis aeruginosa* (BISHOP *et al.*, 1959).

A ocorrência de cianobactérias, inclusive de *M. aeruginosa*, tem sido dominante em períodos de florações do fitoplâncton no Brasil, seja em ambientes de reservatórios, lagoas costeiras, lagos de inundação e lagos naturais (HUSZAR; SILVA, 1999). As toxinas desta

espécie são denominadas microcistinas (MCs), e podem ocorrer vários tipos de mudanças na molécula que modificam seu grau de toxicidade, podendo ser encontradas no ambiente sob três níveis: alta toxicidade, moderada toxicidade e baixa toxicidade (HARADA *et al.*, 1988).

Devido a sua estrutura peptídica cíclica, as MCs são muito estáveis e resistentes a hidrólise química e oxidação, em pH próximo da neutralidade. Além disso, tanto as MCs como as nodularinas mantêm sua toxicidade mesmo após a fervura. Em condições naturais, no escuro, as MCs podem persistir por meses ou anos. A uma temperatura próxima dos 40°C e condições de pH alto ou baixo, foram observadas hidrólises lentas, sendo necessário aproximadamente 10 semanas em pH 1 e mais de 12 semanas em pH 9 para a degradação de cerca de 90% da concentração total das MCs (HARADA *et al.*, 1996).

No Brasil, a presença de microalgas e cianobactérias em mananciais é um grave problema enfrentado nas Estações de Tratamento de Água. O Tratamento por Ciclo Completo (tratamento convencional) pode comprometer a qualidade da água produzida, devido à ineficiência da remoção de metabólitos secundários (KURIAMA, 2012).

A Portaria N° 2.914 de 2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), determina que a água potável deve estar de acordo com o padrão de cianobactérias e cianotoxinas. Quanto ao monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas determina que água potável não poderá exceder o limite de 1,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Microcistinas, e 3,0 μg equivalente STX.L⁻¹ de Saxitoxinas, sendo que os referidos valores devem representar as contribuições da fração intracelular e extracelular da amostra analisada. Ainda, de acordo com a portaria, quando for detectada a presença de gêneros potencialmente produtores de cilindrospermopsinas no monitoramento recomenda-se a análise dessas cianotoxinas, observando o valor máximo aceitável de 1,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$, e quando for detectada a presença de gêneros de cianobactérias potencialmente produtores de anatoxina-a(s) recomenda-se a análise da presença desta cianotoxina.

Existem vários casos relatados na literatura de contaminações por cianotoxinas no Brasil, mas na sua maioria não houve comprovação. Um caso comprovado aconteceu em Caruaru (Pernambuco) no ano de 1996, onde pacientes de uma clínica de hemodiálise apresentaram sintomas de grave hepatotoxicose. Cerca de 60 pessoas vieram a falecer até 10 meses após o início dos sintomas (AZEVEDO *et al.*, 2002). Essa foi a primeira epidemia causada por MCs, apresentando casos de aguda neurotoxicidade e subaguda hepatotoxicidade (POURIA *et al.*, 1998).

Como as MCs são bastante estáveis, o tratamento convencional no país é incompleto para a remoção das mesmas, principalmente no que se refere à fração da cianotoxina

dissolvida. Métodos de controle de cianobactérias como o uso de algicidas químicos caíram em desuso, pois causam a lise celular e a consequente liberação da toxina intracelular para o meio extracelular.

Neste contexto, estudos de otimização dos métodos de tratamento de água, visando atingir os padrões de potabilidade estabelecidos por legislação específica se fazem necessários.

Nas últimas décadas, os processos avançados oxidativos (*advanced oxidation process*-AOPs) têm sido desenvolvidos e aplicados para o tratamento de poluentes recalcitrantes e emergentes (RODRÍGUEZ *et al.*, 2007). Em comparação com outros AOPs, como Fenton, ozônio, UV/O₃, UV/TiO₂, etc., o processo combinado UV/H₂O₂ pode ser considerado mais prático em virtude de envolver a dissociação de peróxido de hidrogênio em uma única etapa formando dois radicais hidroxilas (OH), os quais podem oxidar uma grande variedade de poluentes orgânicos recalcitrantes na água. Durante as últimas décadas, pesquisadores têm relatado aplicações bem sucedidas na combinação do sistema UV/H₂O₂ para corantes e intermediários farmacêuticos ou tratamentos químicos tóxicos (SHU; CHANG; FAN, 2004).

De outro lado, ao longo das últimas décadas, várias pesquisas foram realizadas com a utilização de íons metálicos na desinfecção de água (FENG *et al.*, 2000). A prata apresenta propriedades antimicrobianas para um largo espectro de microrganismos, incluindo bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos (PANÁCEK, 2006). Além disso, Brito e Rangel (2008) citaram que a prata é um metal nobre utilizado como catalisador heterogêneo na oxidação em meio aquoso.

Tendo em vista as vantagens do método de tratamento UV/H₂O₂, e o potencial bactericida e catalítico da prata, neste estudo buscou-se avaliar os efeitos da adição do nanocomposto de prata (N_{Ag}) ao processo UV/H₂O₂, no tratamento da água contaminada com *M. aeruginosa* BB005 e MC-LR. Concomitantemente e para contribuir com o objetivo de estudo analisaram-se os efeitos isolados, e a ecotoxicidade da água pós tratamento a partir de testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna*.

O presente trabalho foi organizado em três capítulos com o objetivo de seccionar cronologicamente os estudos e facilitar o entendimento do leitor. No primeiro capítulo buscou-se compreender o estado da arte das pesquisas relacionadas ao tratamento químico de água com presença de cianobactérias e cianotoxinas, partindo de uma análise bibliométrica, com posterior análise mais aprofundada dos trabalhos mais citados, bem como da interpretação das informações resultantes. O segundo capítulo aborda a parte experimental do

trabalho, onde os métodos de tratamento de estudo são testados e avaliados quanto a sua efetividade de degradação de *M. aeruginosa* e MC-LR. O terceiro e último capítulo foi reservado para as análises de ecotoxicidade da água, após passar pelos tratamentos químicos de estudo.

OBJETIVO

Avaliar a aplicabilidade dos processos avançados de oxidação UV-C e UV-C/H₂O₂ na degradação de *Microcystis aeruginosa* BB005 e Microcistina-LR, e os efeitos da adição de nanopartículas de prata (NAg), em escala de bancada.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar a curva de crescimento de *Microcystis aeruginosa* BB005.
- Implementar e testar os métodos analíticos utilizados para determinação da efetividade dos tratamentos e monitoramento dos ensaios.
- Avaliar a aplicabilidade dos processos avançados de oxidação UV-C e UV-C/H₂O₂ na degradação de *Microcystis aeruginosa* BB005 e MC-LR.
- Avaliar os efeitos da adição de nanopartículas de prata – NAg aos processos estudados.
- Avaliar a ecotoxicidade da água pós-tratamento a partir de ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia magna*.

Capítulo I - CIANOBACTÉRIAS, CIANOTOXINAS E O TRATAMENTO QUÍMICO DA ÁGUA DE ABASTECIMENTO: UMA ANÁLISE BIBLIOMÉTRICA DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Resumo: A bibliometria fornece dados quantitativos que auxiliam a analisar a produção científica de forma objetiva. No presente estudo, analisaram-se mediante técnicas bibliométricas, as variáveis associadas ao uso da literatura quanto ao tipo de documento citado, periódicos mais utilizados, procedência geográfica e institucional dos autores e da bibliografia utilizada, além da análise das citações e das redes de relações estabelecidas mundialmente, referentes às pesquisas mundiais sobre cianobactérias, cianotoxinas e a problemática envolvendo o tratamento de água. Através da análise dos dados bibliométricos de 1255 trabalhos publicados entre 1980 e junho de 2017 verificou-se que o número de publicações vem crescendo exponencialmente a partir da década de 1990. Pesquisadores pertencentes à *Chinese Academy of Sciences* (China) lideram o número de publicações, seguidos do *Australian Water Quality Center* (Austrália) e da *Universidade do Porto* (Portugal). Em relação ao país de origem dos autores das publicações analisadas, a China apresenta a maior frequência de ocorrência, com 219 publicações, seguida dos Estados Unidos, Austrália, Alemanha, Reino Unido, Polônia e Brasil (em sétimo lugar). Dos 76 países que possuem publicações referentes ao tema em estudo, o Brasil ocupa o sétimo lugar, com destaque para a USP, com 11% das publicações, e a UFRJ, com 8%, revelando que a temática é bastante difundida e seu estudo não é limitado apenas a universidades mais antigas e de renome. Quanto à distribuição das publicações por tipo de documento, os artigos em periódicos lideram largamente o *ranking* com 79% das publicações. Os cinco periódicos de maior destaque foram o *Toxicon*, *Water Research*, *Environmental Science and Technology*, *Environmental Toxicology*, e *Chemosphere*. A partir do número de publicações por ano, observou-se um sensível decréscimo nos últimos anos, sendo que 2013 foi o ano com o maior número de publicações desde 1980, com 94 publicações.

Palavras-chaves: Bibliometria. Produção Científica. Cianobactérias. Água de Abastecimento.

1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias, também chamadas de "algas azuis" (Cyanophyceae) compreendem um grupo de microrganismos procariontes unicelulares ou multicelulares que realizam fotossíntese aeróbia e possuem clorofila (CASTENHOLZ; WATERBURY, 1989). Apesar de sua fundamental importância na produção primária da cadeia trófica, da contribuição de espécies na fixação de nitrogênio para o solo, do seu potencial para produção de alimentos e geração de energia, as cianobactérias podem desencadear uma série de problemas. Cepas toxigênicas têm sido encontradas tanto em sistemas de águas interiores quanto em águas costeiras, no Brasil e no mundo. Em se tratando de água de abastecimento, o crescimento excessivo de cianobactérias em reservatórios de água gera problemas práticos graves (CHORUS; BARTRAN, 1999).

As cianotoxinas representam um desafio para o tratamento de água potável, uma vez que envolve a remoção de substâncias orgânicas na forma solúvel e insolúvel. Há dois tipos de processos aplicados ao tratamento de água. Os processos de separação, onde geralmente são empregadas barreiras físicas, e os processos de conversão, que são de natureza química, onde a substância passa a assumir forma química diferente. Embora os processos de conversão sejam caracterizados por destruir a substância de interesse, haverá a formação de subprodutos da reação. Processos de conversão ideais são aqueles que produzem produtos de reação inócuos (HRUDEY *et al.*, 1999).

De acordo com os mecanismos de toxicidade, os efeitos das cianotoxinas variam de hepatotóxicas, neurotóxicas e dermatotóxicas à inibição geral da síntese de proteínas. De acordo com a estrutura química, dividem-se em três grandes grupos: peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos (LPS). Como o próprio nome sugere, as hepatotoxinas atacam diretamente o fígado. As Microcistinas (MCs) compõem a classe mais frequentemente encontrada ao nível global. Os efeitos observados variam de agudos a crônicos, dependendo da dose ingerida. Bioensaios em ratos demonstraram que estas de cianotoxinas (toxinas que atingem o fígado) causam a morte por hemorragia hepática dentro de algumas horas com doses agudas. Efeitos crônicos estão relacionados ao surgimento de tumores (SIVONEN; JONES, 1999).

A partir da década de 1990, cianobactérias e cianotoxinas passaram a ganhar destaque no cenário mundial, devido aos crescentes casos de intoxicação envolvendo animais e humanos.

Neste sentido, as análises da tendência das pesquisas acadêmicas sobre o tema tem sido premente e tem se tornado viável a partir das análises bibliométricas.

A bibliometria é um métodos quantitativo, a partir do qual é possível identificar a proeminência da pesquisa mundial em determinado assunto, bem como as relações entre os grupos de pesquisas e relações de coautoria, a partir da análise de determinada base de dados.

A diferença essencial entre a tradicional bibliografia e a bibliometria é que esta utiliza mais métodos quantitativos do que discursivos. A abordagem bibliométrica consiste na aplicação de métodos quantitativos, através de técnicas estatísticas e matemáticas, na busca por uma avaliação objetiva da produção científica (NICHOLAS e RITCHIE, 1978).

A bibliometria abrange todos os estudos que procuram quantificar os processos da comunicação escrita, aplicando métodos numéricos específicos. Para Araújo (2006), a área mais importante da bibliometria é a análise de citações. A análise de citações é uma técnica bibliométrica que investiga as relações entre os documentos citantes e os documentos citados considerados como unidades de análise, no todo ou em suas diversas partes: autor, título, origem geográfica, ano e idioma de publicação (BRAGA, 1973).

O início de um estudo bibliométrico se desenvolve a partir da inserção de um conjunto de palavras-chave e da distinção de áreas de estudo em uma determinada base de dados. As informações geradas possibilitam a obtenção de correlações entre diversas características das citações e publicações (MAIA; IAROSINSKI, 2015).

O objetivo deste trabalho foi obter o perfil das publicações, através da análise bibliométrica da produção científica mundial a partir da base de dados *Scopus*. Identificaram-se autores mais produtivos e mais citados, a elite de pesquisa, o tipo de documento e periódicos com maior número de publicações, a procedência geográfica e institucional dos autores e da bibliografia utilizada. Além disso, efetuaram-se a análise das citações e das *networks* estabelecidas mundialmente, referentes às pesquisas sobre cianobactérias, cianotoxinas e métodos de tratamento de água para retirada das mesmas. Em um segundo momento avaliaram-se os métodos de tratamento empregados, com destaque para os tratamentos químicos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Com a finalidade de obter-se um perfil das publicações, foram geradas as seguintes análises descritivas de frequência: distribuição das publicações dos artigos por ano e por autor, classificação das publicações por instituição de origem dos autores, distribuição das publicações por país de origem dos autores e distribuição das publicações por periódico.

A base metodológica deste estudo foi a pesquisa bibliográfica apoiada na bibliometria, em que as principais etapas consistiam na:

- a) Escolha da base de dados;
- b) Definição das palavras-chave e formulação do *string* (arranjo conveniente das palavras-chave com os operadores de lógicos *AND*, e *OR*) de busca;
- c) Análise das características das publicações;
- d) Análise das referências que fundamentam as publicações;
- e) Análise das principais publicações;
- f) Análise bibliográfica complementar (bases diversas).

2.1 SELEÇÃO DA BASE DE DADOS

A base de dados escolhida para esta pesquisa foi a *Scopus*, em função de sua abrangência e por ser considerada a maior base de dados de pesquisa de resumos e citações da literatura científica mundial.

2.2 PROCESSAMENTO DE DADOS

Há diversos softwares comerciais e gratuitos de processamento de dados. Neste trabalho optou-se pela utilização de um software livre, o Bibexcel.

Embora o Bibexcel não tenha uma interface intuitiva, é um software versátil. Dentre as várias possibilidades, permite a construção de uma linha do tempo relacionando o nível de citação entre autores e o respectivo ano no qual isso ocorreu. Essa informação, atrelada com os trabalhos de cada autor, faz com que seja possível mapear um trabalho/idéia/ inovação feita por um desses autores, desde sua primeira publicação até os dias mais recentes (RUAS e PEREIRA, 2014).

Uma outra possibilidade deste *software*, e que foi aplicada neste estudo, é explorar o fluxo de interação e integração de conhecimentos da comunidade científica, através da análise das citações. Segundo Ruas e Pereira (2014), saber como trabalhos de um mesmo autor estão

relacionados com as referências de outros trabalhos contemporâneos é uma informação interessante. A partir da informação do resumo, no Bibexcel foi possível relacionar como trabalhos altamente referenciados propiciam que novas idéias surjam.

2.3 MAPEAMENTO DOS RESULTADOS

A interpretação dos padrões extraídos e processados no Bibexcel se deu através do *software* Pajek, que dispõe de ferramentas estatísticas e de visualização que permitem fazer uma precisa análise dos resultados.

O Pajek é um programa focado apenas na visualização de dados bibliométricos, ou seja, não foi possível realizar o processamento de dados ou construir qualquer tipo de mapa com ele, apenas visualizar. É uma ferramenta largamente utilizada na comunidade científica, tanto que na grande maioria dos programas de análise bibliométrica existe a opção de exportar os dados para serem utilizados pelo Pajek (BATAGELJ e MRVAR, 2008).

2.4 DEFINIÇÃO DAS PALAVRAS CHAVES

A definição das palavras-chave foi determinada a partir dos temas de referência (que envolvem as cianobactérias, as toxinas produzidas por esta classe de microrganismos, as cianotoxinas, e a problemática envolvendo o tratamento da água de abastecimento público) dos termos em inglês e dos termos similares ou sinônimos (Quadro 01), que buscou relacionar a ocorrência de cianobactérias e cianotoxinas e os problemas relacionados ao abastecimento de água.

Temas de referência	Termos em inglês	Similares ou sinônimos de interesse
Cianobactéria	Cyanobacteria	"Cyanobacterial", "Cyanophyceae" OR "Cyanobacterial blooms", "Blue-green algae", "Harmful Cyanobacteria", "Photosynthetic Prokaryotes", "Microcystis aeruginosa".
Cianotoxinas	Cyanotoxins	"Hepatotoxins", "Microcistins", "Microcistin-LR".
Tratamento de água	Water treatment	"Water treatment", "Water supply", "Sanitation", "Water Purification".

Quadro 01. Escolha das palavras-chave. Fonte: Autoria própria (2017).

3 RESULTADOS

3.1 FORMULAÇÃO DO *STRING* DE BUSCA

O grupo de palavras-chave determinado deu origem ao *string* de busca, utilizado como ferramenta de investigação na base de dados *Scopus* (Quadro 02). Um *string* de busca é o arranjo conveniente das palavras-chave encontradas com os operadores de lógicos *AND*, e *OR*, como pode-se observar logo abaixo.

((“*Cyanobacteria*” OR “*Cyanobacterial*” OR “*Cyanophyceae*” OR “*Cyanobacterial blooms*” OR “*Blue-green algae*” OR “*Photosynthetic Prokaryotes*” OR “*Harmful Cyanobacteria*” OR “*Microcystis aeruginosa*”) AND (“*Hepatotoxins*” OR “*Microcistins*” OR “*Microcistin-LR*”) AND (“*Water treatment*” OR “*Water supply*” OR “*Sanitation*” OR “*Water Purification*”)).

Quadro 02. *String* de busca. Fonte: Autoria própria (2017).

Aplicadas as devidas limitações em relação às áreas de pesquisa, a busca inicial resultou em 1255 documentos publicados entre 1980 e Junho de 2017, um número bastante significativo e que expressa a dimensão da preocupação com o assunto em escala mundial.

3.2 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS DAS PUBLICAÇÕES

Do total geral de publicações avaliadas, 77,9% correspondem a artigos de periódicos, 13,2% são artigos de revisão, 4,1% são artigos publicados em congressos, 4,1% foram livros ou capítulos de livros, enquanto que as demais se referem a editoriais, cartas e *short survey*.

A Figura 01 compreende as 1255 publicações selecionadas, indicando um grande crescimento do número de publicações nas últimas duas décadas, no que se refere aos temas de referência desta pesquisa. Observou-se que no ano de 1996 as publicações mais que dobraram com relação ao ano anterior (destaque da figura). Tal fato pode ser correlacionado ao maior caso comprovado de intoxicação humana por Microcistinas, que aconteceu em Caruaru (Pernambuco) no ano de 1996, sendo que a partir deste ano estabeleceu-se um novo patamar de crescimento, sugerindo maior interesse pelo tema. Fato este que apresentou reflexo imediato nas legislações mundiais.

A tendência mostra que 2013 foi o ano com o maior número de publicações desde 1980, com 93 publicações.

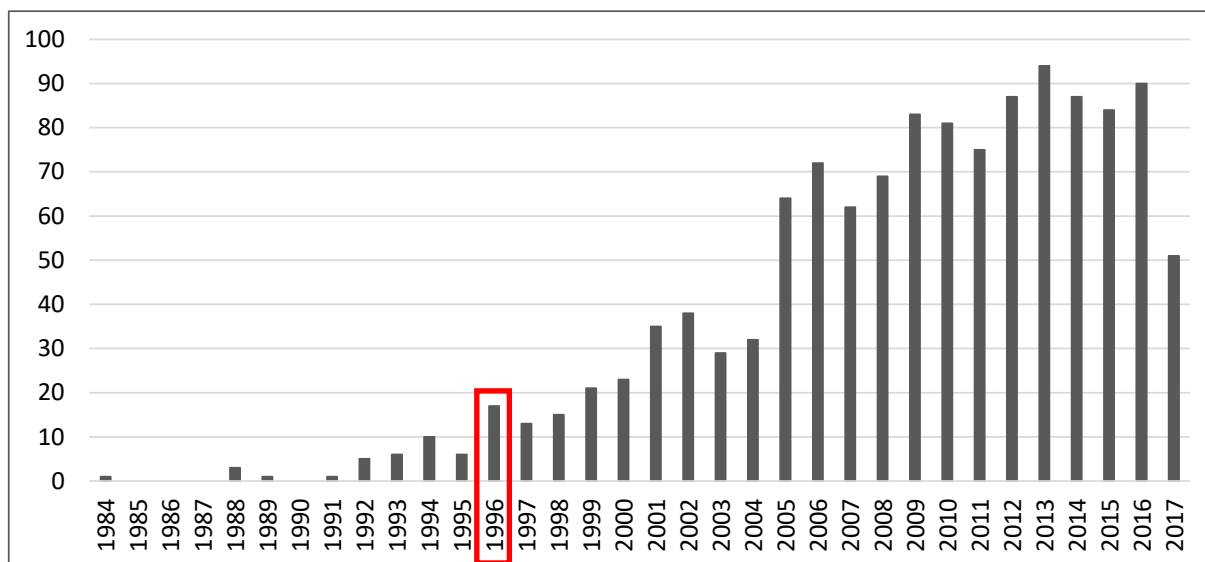


Figura 01. Número de publicações por ano, em escala mundial, sobre o tratamento de água com presença de cianobactérias e microcistinas, a partir do *string* de busca definido.

Fonte: *Scopus* (2017).

A amostra total foi constituída por 152 autores, sendo que estes têm no mínimo quatro publicações cada. Os vinte autores que mais se destacaram neste período em número de publicações estão representados na Figura 02.

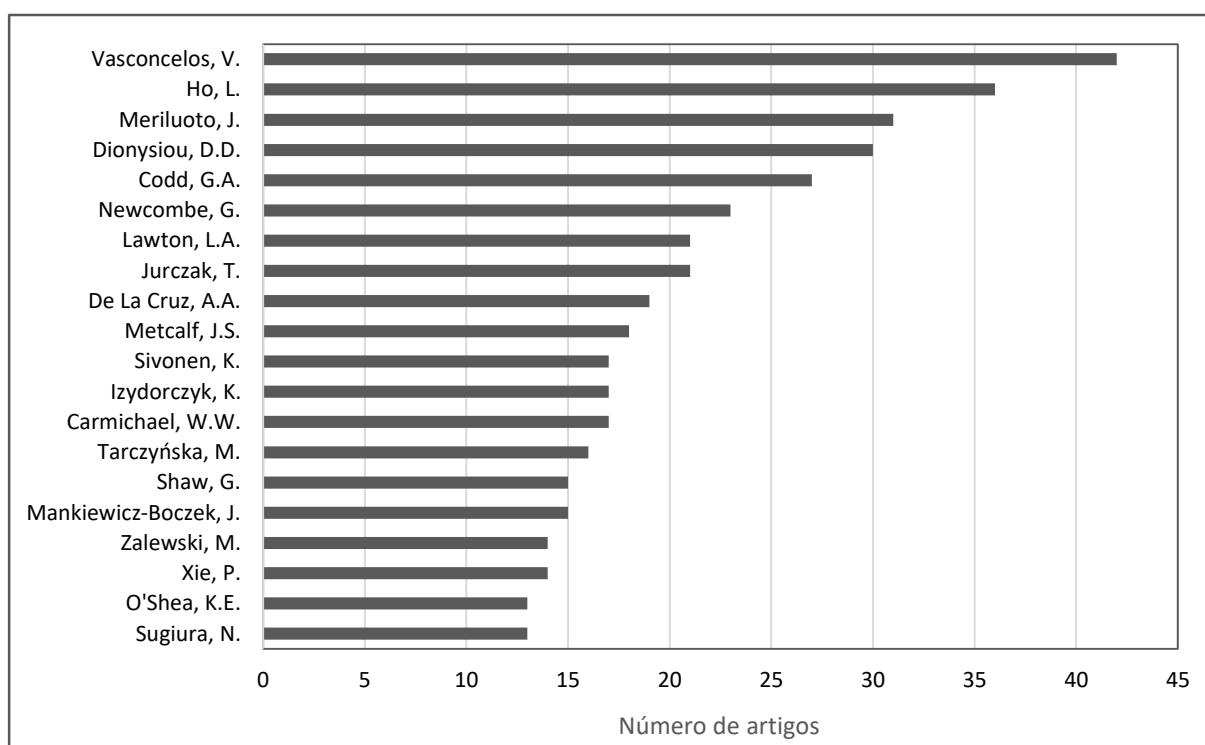


Figura 02. Autores com o maior número de publicações, em escala mundial, a respeito do tratamento de água com presença de cianobactérias e microcistinas, a partir do *string* de busca definido.

Fonte: *Scopus* (2017).

Os autores que publicaram sobre o tema pertencem a 160 instituições de ensino de diferentes origens. As 15 mais importantes, que juntas correspondem a 36% do total das publicações mundiais, encontram-se representadas na Figura 03, com destaque para o *Chinese Academy of Sciences* (primeira e quarta posição da lista de classificação do Scopus), com 103 publicações, o *Australian Water Quality Centre* da Austrália, com 57 publicações, e para a *Universidade do Porto* de Portugal, com 47 publicações.

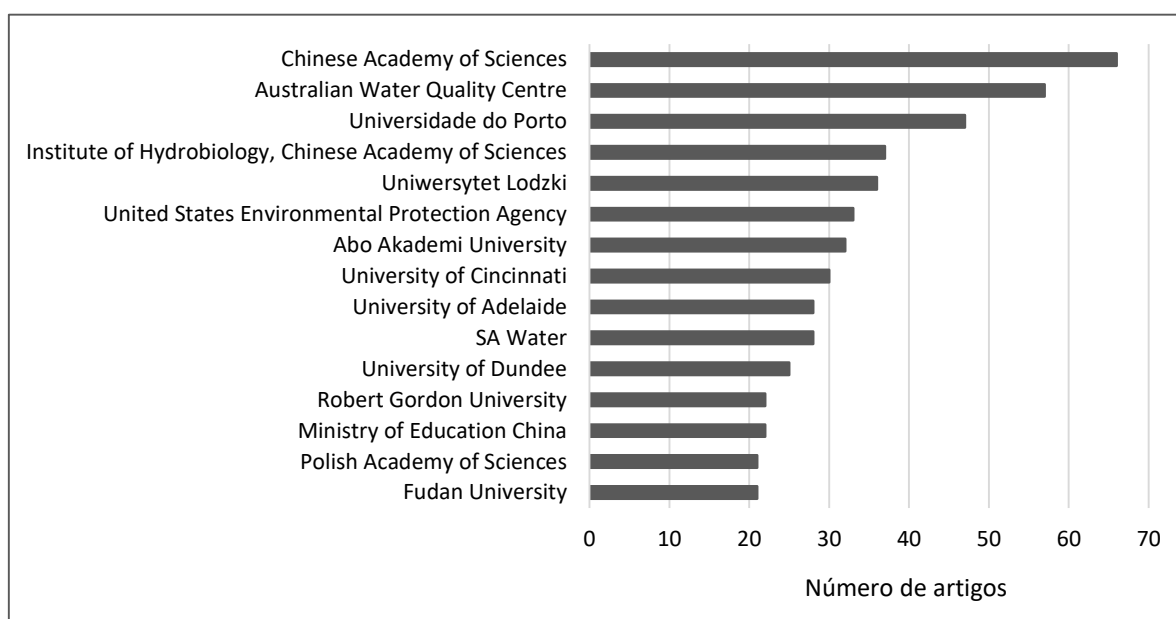


Figura 03. Distribuição das publicações por Instituição de origem, a partir do *string* de busca definido a cerca do tratamento de água com presença de cianobactérias e microcistinas. Fonte: *Scopus* (2017).

Em relação ao país de origem dos autores, a China apresenta a maior frequência de ocorrência, com 219 publicações, seguida dos Estados Unidos, Austrália, Alemanha, Reino Unido, Polônia e Brasil (em sétimo lugar). A Figura 04 ilustra a relação dos 15 principais países de origem dos autores em termos de número de publicações, pertinentes ao tema desta pesquisa, que englobam a questão do saneamento voltada ao tratamento de água com presença de cianobactérias e cianotoxinas, em especial as microcistinas.

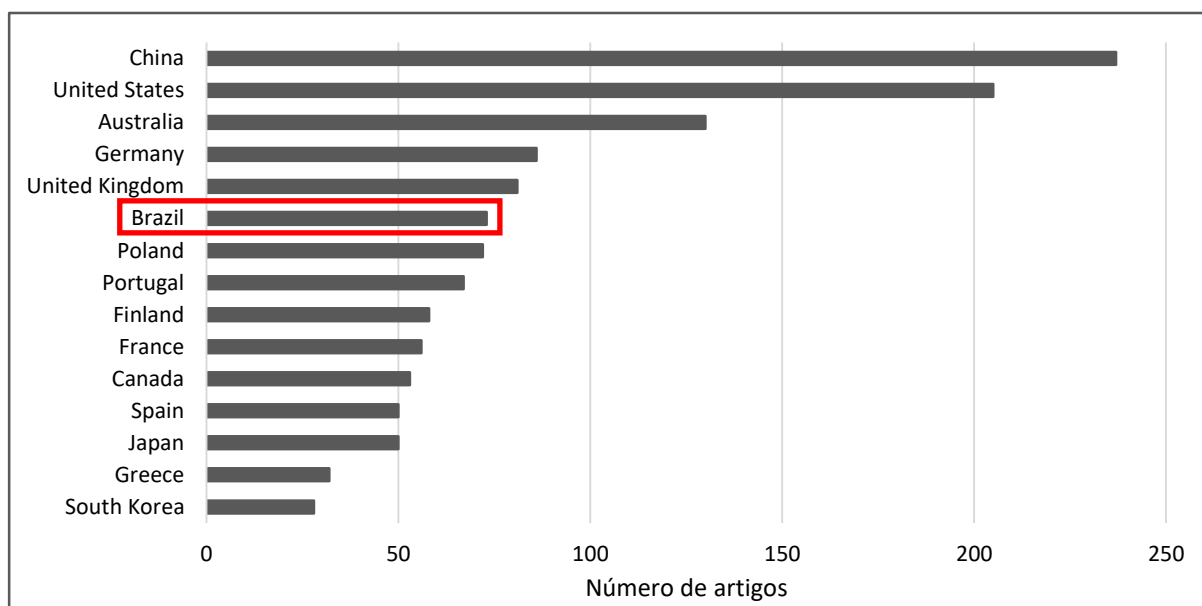


Figura 04. Distribuição das publicações que englobam a questão do saneamento voltadas ao tratamento de água com presença de cianobactérias e cianotoxinas, por país de origem. Fonte: *Scopus* (2017).

Dos 76 países que possuem publicações referentes ao tema em estudo, o Brasil ocupa lugar de destaque - 7º lugar, com 73 publicações neste período. Os principais autores brasileiros são Sandra M. F. O. Azevedo, do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Odete M. Rocha, do Departamento de Ecologia e Biologia Evolucionária da Universidade Federal de São Carlos, Ernani Pinto, da Escola de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – USP. A Figura 05 ilustra a relação dos 15 principais autores brasileiros em termos de número de publicações considerados por esta pesquisa.

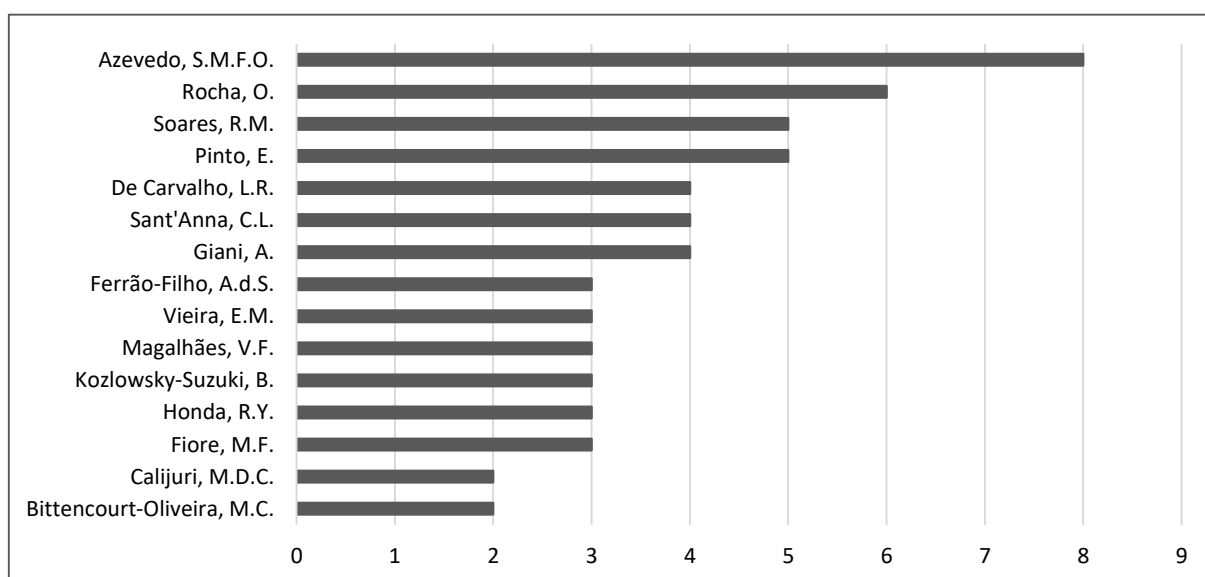


Figura 05. Principais autores brasileiros abrangidos por esta pesquisa, a partir do *string* de busca definido a cerca do tratamento de água com presença de cianobactérias e microcistinas. Fonte: *Scopus* (2017).

As 10 principais instituições brasileiras que produziram ciência focada em cianobactérias e cianotoxinas estão apresentadas na figura 06. A Universidade de São Paulo – USP lidera o *ranking*, com 11% do total de publicações para o tema, seguida pela Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, com 8%.

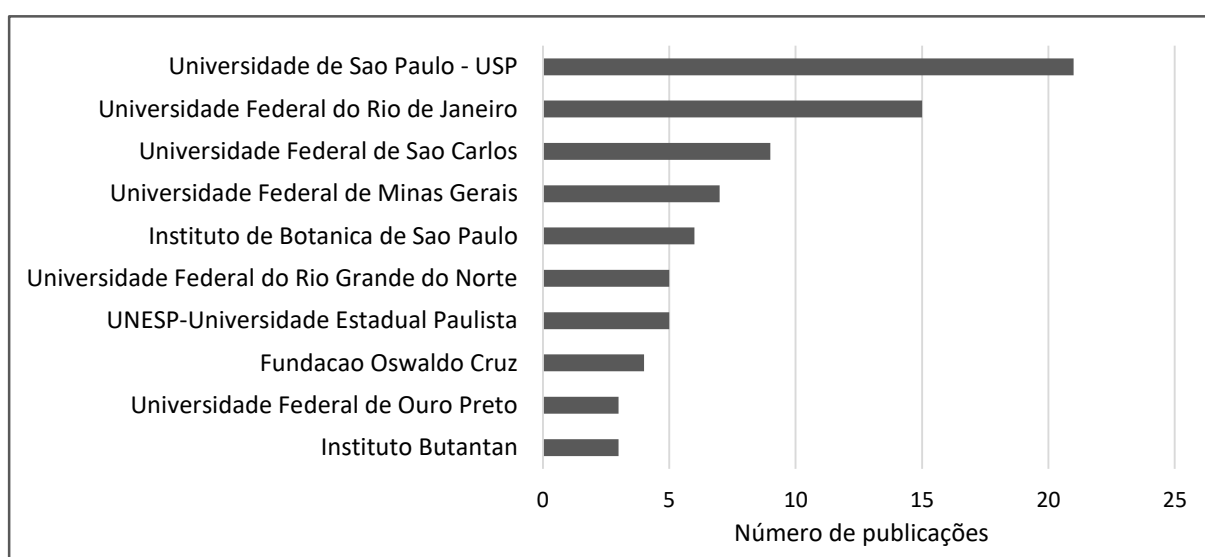


Figura 06. Instituições brasileiras com maior número de publicações a respeito do tratamento de água com presença de cianobactérias e microcistinas, a partir do *string* de busca definido. Fonte: *Scopus* (2017).

A distribuição das publicações por tipo de documento é apresentada na Figura 07, sendo que os artigos em periódicos lideram largamente o *ranking* com 79% (o que representa 978 artigos), seguidos de revisões, com 13%, de *papers* em congressos (3%), capítulo de livros (3%), livros (1%), e as demais categorias (*short survey*, editorial, carta) com 1%.

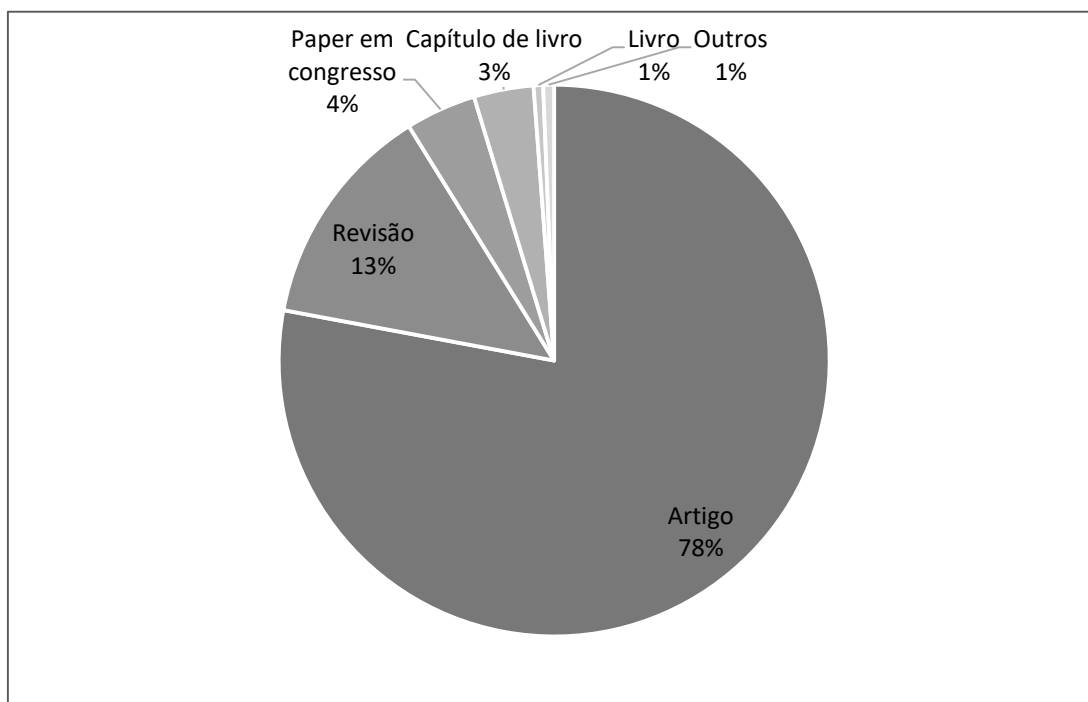


Figura 07. Distribuição geral, a nível mundial, das publicações por tipo de documento.
Fonte: *Scopus* (2017).

Os 978 artigos acima indicados estão distribuídos entre 160 periódicos distintos, interligados ao tema da presente pesquisa. Figura 08 apresenta a distribuição das publicações entre os 10 principais periódicos, sendo os de maior destaque o *Toxicon*, com 79 artigos, seguido pelo *Water Research*, com 69 artigos, *Environmental Science and Technology*, com 44, *Environmental Toxicology*, com 33 artigos, *Chemosphere*, com 32 artigos, e o *Harmful algae* com 31 artigos, *Journal Of Hazardous Materials*, com 27 artigos, *Water Science And Technology*, com 16 artigos, *Chemical Engineering Journal*, 15 artigos, e o *Toxins*, também com 15 artigos.

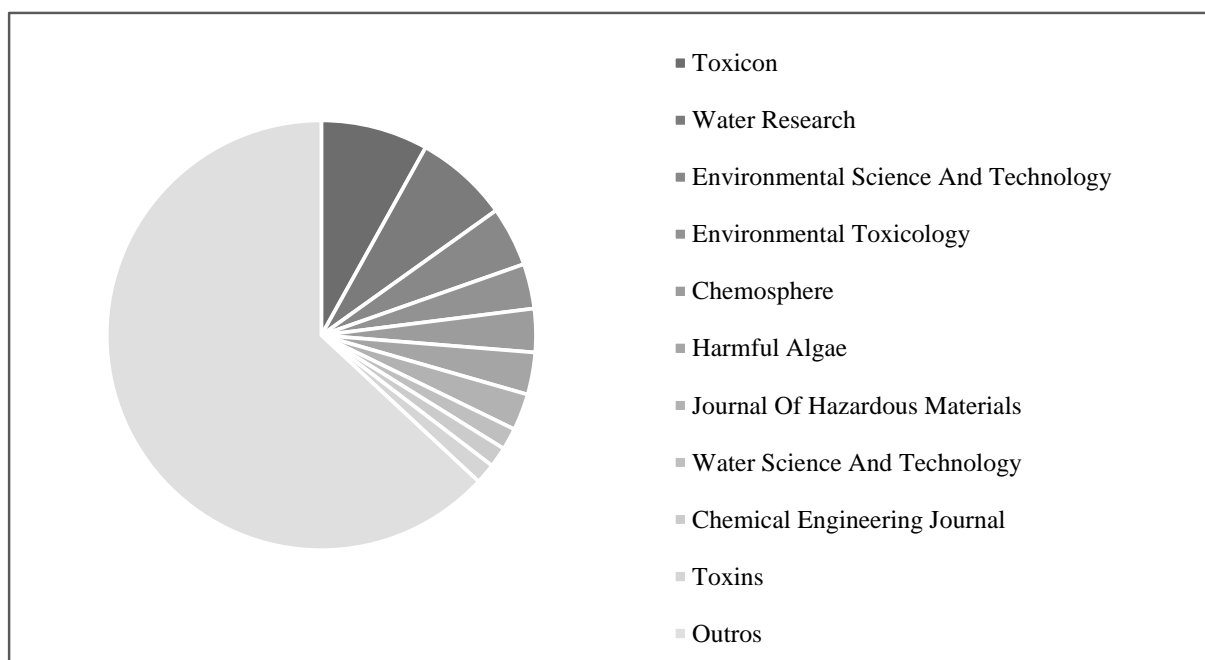


Figura 08. Periódicos com maior número de publicações sobre o tratamento de água com presença de cianobactérias e microcistinas.

Fonte: *Scopus* (2017).

3.3 ANÁLISE DAS REFERÊNCIAS QUE FUNDAMENTAM AS PUBLICAÇÕES

A base de dados exportada para o *software BibExcel*, identificou uma rede de citações cujo objetivo é distinguir os principais autores que fundamentam as pesquisas, dos demais autores citados nesta análise bibliométrica.

Há um fluxo de interação e integração de conhecimentos da comunidade produtora, na medida em que o conhecimento se constrói por etapas a partir de trabalhos anteriores, e na medida em que este se constitui em fundamento para trabalhos posteriores, desta maneira, as citações podem ser interpretadas como manifestações sobre o conhecimento que foi recebido e digerido (ZIMAN, 1969; MORAVCSIK, 1981).

As citações contribuem para o desenvolvimento da ciência, provêm o necessário reconhecimento de um cientista por seus colegas, estabelecem os direitos de propriedade e prioridade da contribuição científica de um autor, constituem importantes fontes de informação, ajudam a julgar os hábitos de uso da informação e mostram a literatura que é indispensável para o trabalho dos cientistas (PRICE, 1974).

Dentro da bibliometria, particularmente a análise de citações permite a identificação e descrição de uma série de padrões na produção do conhecimento científico. Com os dados retirados das citações pode-se descobrir: autores mais citados, autores mais

produtivos, elite de pesquisa, frente de pesquisa, fator de impacto dos autores, procedência geográfica e/ou institucional dos autores mais influentes em um determinado campo de pesquisa; tipo de documento mais utilizado, idade média da literatura utilizada, obsolescência da literatura, procedência geográfica e/ou institucional da bibliografia utilizada; periódicos mais citados, “core” de periódicos que compõem um campo (ARAÚJO, 2006).

Os autores que possuem ao menos uma obra citada mais de quinze vezes compõem a rede de citações representada na figura 09. O tamanho do círculo que compõe os vértices da rede é proporcional ao número de citações. Os autores das obras mais citadas encontram-se destacadas no centro da rede, onde ocorre o maior número de interligações.

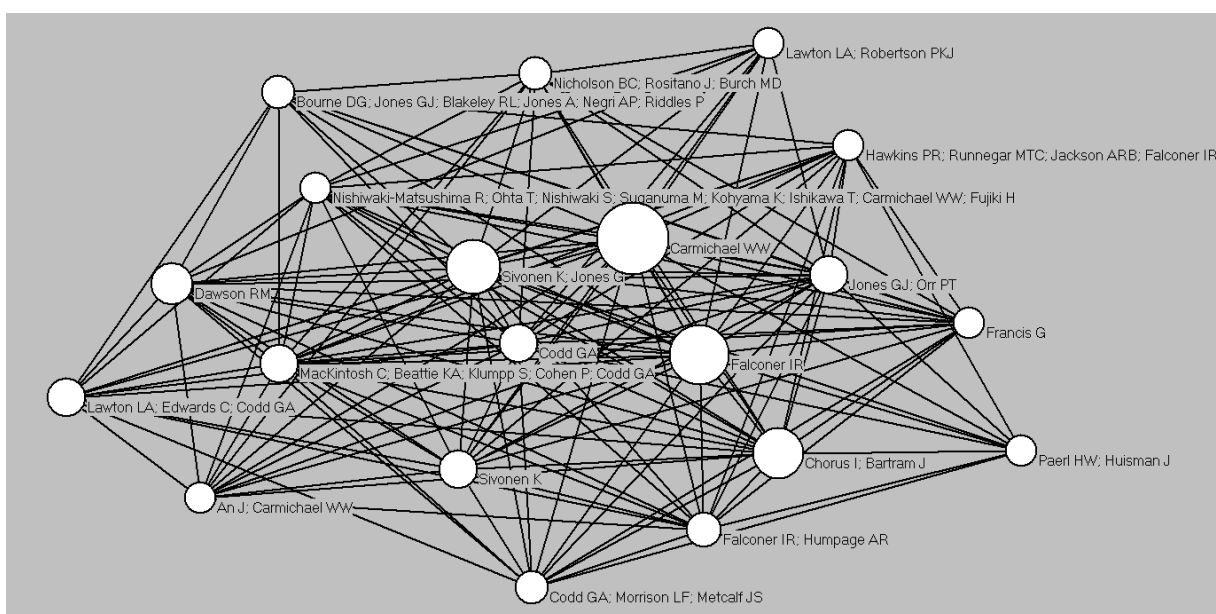


Figura 09. Desenho tridimensional da rede de citações indicando as direções das conexões, o fluxo de informações entre os autores de trabalhos voltados ao tratamento de água com cianobactérias e microcistinas.

Fonte: Autoria própria.

Buscou-se identificar padrões entre as citações através da análise de *cluster*. A análise de *cluster* é um processo de partição de uma população heterogênea em vários subgrupos mais homogêneos (DONI, 2004). Segundo Halkidi (2001), esta análise é uma das técnicas mais utilizadas no processo de mineração de dados para descoberta de agrupamentos e identificação de importantes distribuições e padrões para entendimento dos dados. No agrupamento, não há classes pré-definidas, os elementos são agrupados de acordo com a semelhança (DONI, 2004). Porém, após a aplicação deste método, o software empregado não constatou a formação de diferentes agrupamentos para os resultados do presente trabalho.

Na figura 10 estão presentes os vinte autores das obras mais citadas, a partir da análise das citações. A partir desta análise é possível identificar as obras mais citadas, inferindo-se desta forma seu grau de importância e pioneirismo para a comunidade acadêmica.

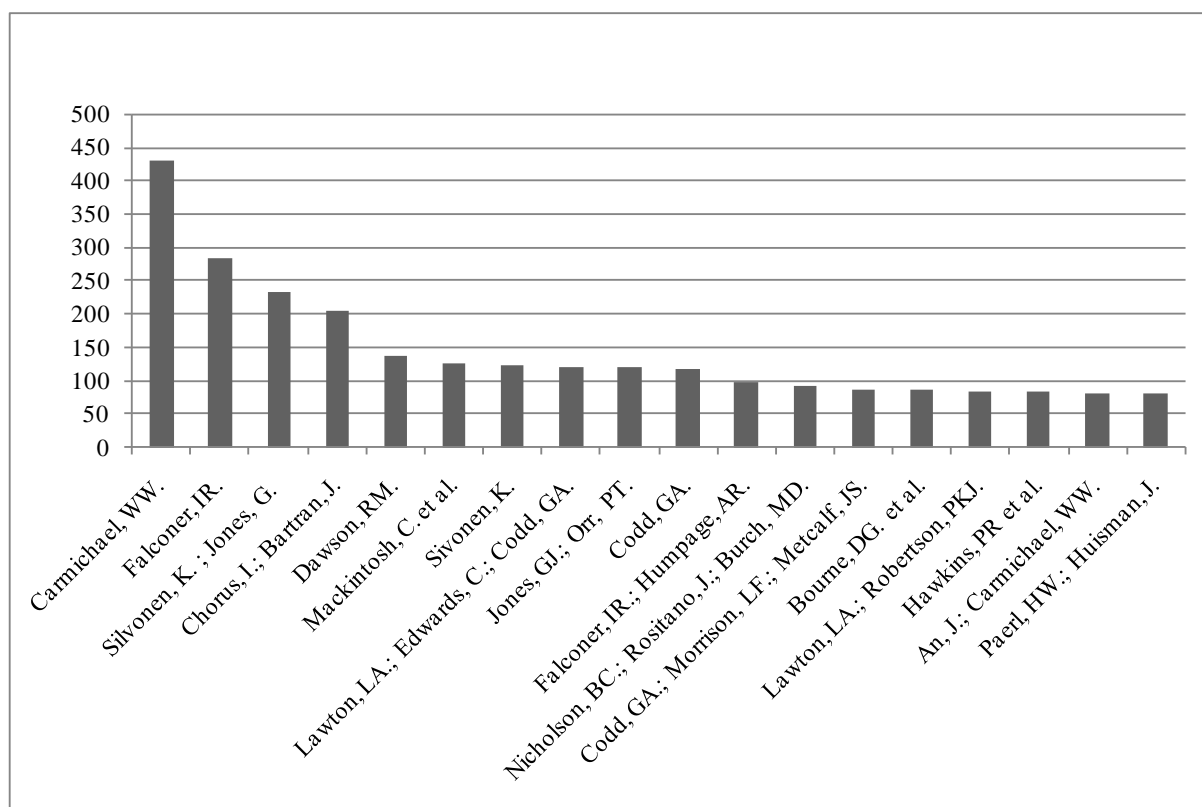


Figura 10. Distribuição do número das citações por autor, indicando os autores das principais obras voltadas ao tratamento de água com cianobactérias e microcistinas.
Fonte: Autoria própria (2017).

O destaque incide sobre Wayne W. Carmichael, citado 430 vezes nos trabalhos abrangidos por esta pesquisa. O autor americano, da *Wright State University* (Dayton, Ohio – Estados Unidos), é pioneiro no assunto, e em um de seus trabalhos mais citados, o review intitulado “*Cyanobacteria secondary metabolites – The cyanotoxins*”, de 1992, o autor faz uma avaliação das informações disponíveis sobre metabólitos secundários, especialmente das “biotoxinas” de cianobactéria. O autor agrupa as toxinas de cianobactérias em duas categorias principais, Neurotoxinas e Hepatotoxinas (por sua vez classificadas como Microcistinas e Nodularinas), baseadas em bioensaios realizados em ratos e invertebrados aquáticos para classificar seu mecanismo de ação. O autor analisa as variantes de Microcistinas, caracterizando as diferenças estruturais da molécula que lhe conferem maior ou menor

toxicidade. Além disso, em “*The cyanotoxins*” (1997) tem relevantes contribuições sobre a detecção produção e regulação genética de cianotoxinas, avaliação de riscos associados à Microcistinas e Nodularinas como promotoras de tumores no fígado, informações relativas ao monitoramento, controle e gerenciamento de florações de cianobactéria.

Nesta mesma linha, Ian R. Falconer, citado 283 vezes nesta busca, da *University of Adelaide* (Adelaide - Austrália), em um de seus principais artigos “*Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria*”, de 1991, o autor chama atenção para casos de mortes de animais devido o contato e ingestão de água de reservatórios de abastecimento. O estudo demonstrou que o consumo oral de baixas concentrações de *Microcystis* por ratos, causa progressivas lesões hepáticas com invasão de leucócitos e morte dos hepatócitos, além de estimular o crescimento de tumores.

O livro intitulado “*Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*”, publicado em 1999 pela Organização Mundial da Saúde, reúne autores renomados do mundo todo e é uma das obras mais completas relativas ao tema, distribuída em 13 capítulos.

O livro surgiu para suprir a necessidade da falta de uma literatura abrangente no campo de cianotoxinas, no momento, trazendo de informações básicas a orientações práticas aos interessados, o que acabou por nortear os estudos posteriores, o que justifica sua grande repercussão científica. Ele fornece embasamento para a compreensão do comportamento de cianobactérias e a sua produção de toxinas em condições ambientais, analisa as evidências em relação aos impactos à saúde, principalmente para que os especialistas em saúde pública elaborem orientações ou para a academia identificar e abordar as necessidades de pesquisa. Fornece orientações sobre práticas de segurança no planejamento e gestão da água de abastecimento e de resorts de recreação e lazer, informações sobre prevenção do crescimento de cianobactérias e sua remoção no tratamento de água. Dispõe de orientações sobre a concepção e implementação de programas de acompanhamento e informações sobre métodos laboratoriais para monitoramento de cianobactérias, suas toxinas e as condições para obter seu crescimento em massa. A obra como um todo além de capítulos em separado estão entre os trabalhos mais citados desta pesquisa, como é possível observar na Tabela 01. Os demais autores presentes no gráfico 8, possuem trabalhos citados na obra.

Tabela 01. Principais obras citadas pelos autores de trabalhos sobre tratamento de água com presença de cianobactérias e cianotoxinas

Autor	Principais obras
Carmichael, W.W.	- <i>Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins</i> . Journal of applied bacteriology, 1992. - <i>The cyanotoxins</i> . Advances in botanical research, 1997.
Falconer, I.R.	- <i>Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria</i> . Environmental toxicology and water quality, 1991. - <i>An overview of problems caused by toxic blue-green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water</i> . Environmental Toxicology, 1999.
Silvonen, K.; Jones, G.	- <i>Cyanobacterial toxins</i> . In Chorus, Bartran editors. <i>Toxic cyanobacteria in water</i> : WHO, 1999.
Chorus, I; Bartran, J. (editors)	- <i>Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management</i> . Spon Press, 1999.
Hawkins, P. R. et al.	- <i>Isolation and toxicity of <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> from an ornamental lake</i> . Toxicon, 1997. - <i>Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir</i> . Appl. Environ. Microbiol., 1985.
Falconer, I. R. e Humpage, A.R.	- <i>Tumour promotion by cyanobacterial toxins</i> . Phycologia, 1996.
Ohtani, I., et al.	- <i>Cylindrospermopsin, a potent hepatotoxin from the blue-green alga <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i></i> . J. Amer. Chem. Soc., 1992.
Dawson, R. M.	- <i>The toxicology of microcystins</i> . Toxicon, 1998.
Codd, G.A.	- <i>Cyanobacterial poisoning hazard in British freshwaters</i> . Vet. Rec., 1983.
Sivonen, K.	- <i>Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by <i>Oscillatoria agardhii</i> strains</i> . App. Environ. Microbiol., 1990. - <i>Cyanobacterial toxins and toxin production</i> . Phycologia, 1996. - <i>Toxic Cyanobacteria in Finnish Fresh Waters and the Baltic Sea</i> . Reports from Department of Microbiology, 1990.
MacKintosh, C. et al.	- <i>Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants</i> . Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett., 1990.
Lawton, L. et al.	- <i>Determination of cyanobacteria in the laboratory</i> . In Chorus, Bartran editors. <i>Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management</i> . London: Spon Press, 1999.
Paerl, H. W., Huisman, J.	- <i>Blooms like it hot</i> . Science-New York Then Washington, 2008. - <i>Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms</i> . Environmental Microbiology Reports, 2009.
Jones, G.J	- <i>Limnological study of cyanobacterial dominance in three South-East Queensland reservoirs</i> . In: R.R.D. Davis [Ed.] <i>Managing Algal Blooms: Outcomes from the CSIRO Blue-Green Algal Research Program</i> . CSIRO Land and Water, 1997.
Humpage, A. R.; Falconer, I. R.	- <i>Microcystin-LR and liver tumour promotion: effect on cytokinesis, ploidy, and apoptosis in cultured hepatocytes</i> . Env. Toxicol. Water Qual., 1999.
Banker, R. et al.	- <i>Identification of cylindrospermopsin in <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel</i> . Journal of Phycology, 1997.
Chorus, I.	- <i>Die Blaualgen ("Cyanobakterien") - eine Berliner Besonderheit welcher Zusammenhang besteht zwischen dem Massenhaften Auftreten von Blaualgen und der Nutzung von Badegewässern?</i> In: <i>Nachhaltigkeit im Wasserwesen in der Mitte Europas</i> , 1998.
Byth, S.	- <i>Palm Island mystery disease</i> . Med. J. Aust., 1980.

3.4 ANÁLISE GERAL DAS PUBLICAÇÕES

A partir da análise geral das publicações, foi possível verificar a diversidade da evolução dos métodos de tratamento de água, estes através de mecanismos físicos, químicos, biológicos ou combinados, para degradação e remoção tanto de células de cianobactérias, quanto de cianotoxinas dispersos de forma livre da água. Albuquerque Junior (2006) salienta que o maior desafio tem sido desenvolver um método que alie eficiência a baixos custos operacionais e fácil manipulação para os sistemas de tratamento de água.

O tratamento biológico de água contaminada com cianotoxinas vem sendo explorado a partir do emprego de diversas metodologias, como em filtros lentos de areia biologicamente ativadas, biorreatores de leito fluidizado, além de estudos de cepas bacterianas, plantas aquáticas e substâncias bioativas de plantas capazes de degradar diversas variantes de MCs.

Estudos referentes à remoção de biomassa de cianobactérias e microalgas começaram a ser publicados ainda na década de 1970. A eficiência do tratamento físico-químico, dentro do qual se encaixa o chamado “tratamento convencional”, que compreende as etapas de coagulação, floculação, sedimentação e filtração, teve sua eficácia questionada para o tratamento de água com cianobactérias e suas toxinas, principalmente no que tange a retirada das frações dissolvidas de toxinas do meio. Ainda em 1976, Hoffman propôs a utilização da adsorção em carvão ativado em pó (CAP), revelando resultados promissores para a época. Keijola *et al.* (1988), por sua vez, apresentaram a adsorção em carvão ativado granular (CAG) como um método efetivo na remoção de hepatotoxinas e neurotoxinas. Falconer *et al.* (1989) e Himberg *et al.* (1989), também avaliaram a remoção de toxinas por CAP e CAG. Os resultados de ambos os trabalhos sugerem que o carvão ativado seria capaz de remover cianotoxinas sozinho ou de forma combinada com o tratamento convencional.

A partir da segunda metade da década de 1990, ocorreram avanços na pesquisa da remoção de MCs por CAP e CAG, pois se inseriu a estes estudos a relação da porosidade do material precursor, o modo de ativação dos carvões, a presença de matéria orgânica dissolvida, o pH e sua influência na capacidade de adsorção dos mesmos para as cianotoxinas, sendo que, desta forma, melhores resultados foram alcançados.

Métodos físicos de tratamento de água para retirada de cianobactérias e cianotoxinas, como a osmose reversa e membranas de microfiltração (MF), nanofiltração (NF) e ultrafiltração (UF), tem sido investigadas por diversos pesquisadores, demonstrando que é

uma alternativa eficiente para a remoção tanto de células quanto de vários análogos de microcistinas. O fator limitante destas tecnologias ainda está relacionado ao seu alto custo.

Os tratamentos combinados vêm ganhando espaço no cenário mundial. Jurczak *et al.* (2005) relataram a eliminação de MCs em um caso prático, da água de abastecimento da cidade de Lodz (Polônia), a partir “Sulejow Reservoir”, utilizando-se de pré-oxidação, coagulação, filtração por areia, ozonização e cloração. O tratamento usado mostrou-se efetivo em 2002 e 2003. Como estratégia de gestão, a empresa responsável adotou a mistura de águas superficiais e subterrâneas para redução dos teores de MCs. Dixon *et al.* (2011) utilizaram uma abordagem de múltiplas barreiras incorporando coagulação, CAP e UF. A coagulação foi usada para remover as células e a toxina intracelular, enquanto o CAP foi utilizado para a adsorção da toxina extracelular e, finalmente, a UF foi usada para retirada dos flocos.

Camacho *et al.* (2015) avaliaram o processo coagulação/floculação/flotação por ar dissolvido/nanofiltração, utilizando sementes de *Moringa oleífera* como coagulante natural, para remoção de *Microcystis protocystis* e MC-LR. Resultados satisfatórios foram alcançados para remoção das células de *M. protocystis*, cor e turbidez, mas somente o processo associado a nanofiltração removeu completamente a toxina dissolvida, $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistina-LR.

Devido à infinidade de técnicas identificadas e a grande diversidade de cianotoxinas identificadas atualmente, optou-se por restringir a análise das publicações, voltando-se para os métodos químicos de tratamento de água aplicados de maneira singular ou combinados, para degradação e remoção de cianotoxinas da água, focando principalmente nos casos práticos para remoção de MC-LR.

3.4.1 Processos Químicos de Tratamento de Água com Microcistina-LR

Métodos alternativos a estas técnicas já bem estabelecidas (coagulação, floculação, sedimentação, filtração, adsorção em carvão ativado, flotação por ar dissolvido), que envolvem a oxidação de poluentes com reagentes como o ar ou o oxigênio em fase aquosa, tais como a oxidação supercrítica, a oxidação eletroquímica e o uso de permanganato de potássio, cloro, peróxido de hidrogênio ou ozônio, tem sido estudadas recentemente. Dentre estas técnicas, os processos avançados de oxidação (AOPs) aparecem como os mais promissores para aplicação em água e solos contaminados, por promoverem a degradação total de uma grande variedade de poluentes, e poderem levar à formação de contaminantes

menos poluentes (compostos orgânicos oxigenados e ácidos de baixo peso molecular) (PERA-TITUS, *et al.* 2004).

Há uma variedade de agentes oxidantes que são frequentemente empregados para o tratamento de água. Os principais são: radical hidroxila, ozônio, peróxido de hidrogênio, radical perhidroxila, permanganato, ácido hipocloroso, cloro, dióxido de cloro. A maioria destes reagentes reage facilmente com ligações insaturadas, tais como aqueles incluídos na porção ADDA da microcistina. Este grupo é comumente utilizado como um cromóforo para análise da toxina (de absorção UV 238 nm). Se ele é modificado a toxina parece desaparecer. No entanto, não fornecem informações sobre os subprodutos que são geradas e os perigos potenciais que podem ser apresentados por estes materiais (LAWTON; ROBERTSON, 1999).

Na década de 1990 alguns autores passaram a adotar uma etapa de pré-oxidação utilizando cloro ou ozônio (PETRUSEVSKI; VAN BREEMEN; ALAERTS, 1996; LAGE FILHO; FERREIRA FILHO, 1997).

Diante desta preocupação, pesquisas mais recentes tem se preocupado com os subprodutos de degradação de MCs. Rodríguez *et al.* (2008) avaliaram a toxicidade de produtos da oxidação (cloro e permanganato de potássio) de MC-LR e RR, a partir de ensaios de inibição da proteína fosfatase. Os resultados revelaram que a inibição desta proteína surgiu apenas a partir da MC intacta, enquanto que os produtos de oxidação não foram tóxicos.

Ying *et al.* (2008) caracterizaram os subprodutos da oxidação de MC-RR por cloro, através de espectrometria UV, COT e LC-MS. Os subprodutos de reação foram classificados como compostos orgânicos voláteis, e os principais produtos de oxidação foram identificados como dihidroxi isômeros de MC-RR.

Merel *et al.* (2009) identificaram quatro novos subprodutos da oxidação de MC-LR com cloro assim como os seus isômeros: monoclora-microcistina, monoclora-di-hidroxi-microcistina, diclorodihidroxi-microcistina e tricloro-hidroxi-microcistina, através de espectrometria de massas LTQ-Orbitrap.

Zong *et al.* (2015) avaliaram a toxicidade residual de amostras de água submetidas a cloração. MC-LR e MC-RR foram rapidamente transformadas em vários subprodutos e a toxicidade das amostras de água diminuíram gradualmente com o tempo de contato. Embora os subprodutos de desinfecção tenham demonstrado menor toxicidade biológica do que as MCs de estudo, os autores alertam que o risco é real e não deve ser negligenciado.

Liao *et al.* (2015) avaliaram a formação de 5 subprodutos da desinfecção a partir da cloração de água com presença de *Microcystis aeruginosa* e da diatomácea *Cyclotella*

meneghiniana. Os subprodutos monitorados incluíram triclorometano (TCM), tricloronitrometano (TCNM), dicloroacetona (DCAN), 1,1- dicloropropano (1,1-DCP) e 1,1,1-tricloropropano (1,1,1-TCP). O potencial de formação de TCM e TCNM foi melhorado com o aumento do tempo de reação e da dosagem de cloro, enquanto que a DCAN, 1,1-DCP e 1,1,1-TCP aumentou em primeiro lugar e, em seguida, diminuiu com o tempo de reação contínua. Segundo o estudo, a formação dos subprodutos pode ocorrer a partir de componentes de *M. aeruginosa*, da suspensão de células \approx matéria orgânica intracelular > matéria orgânica extracelular > detritos celulares, sendo a matéria orgânica intracelular a principal precursora.

Yan *et al.* (2016) analisaram detalhadamente a degradação de cilindrospermopsina (CYN) por ozônio, através da cromatografia líquida de alta performance (UHPLC) e espectrometria de massa “quadrupole time-of-flight” (QTOF MS), que revelou que CYN é facilmente degradada por ozônio com pelo menos 36 subprodutos de transformação. Avaliaram-se a citotoxicidade de CYN e a mistura dos seus produtos de ozonização através de células de hepatoma humano (HepG2). No entanto, os produtos de ozonização de CYN não exibiram citotoxicidade mensurável às células humanas, indicando que o ozônio é um método eficaz e prático para redução de CYN no tratamento de água sem a formação de produtos de transformação abertamente tóxicos.

3.4.1.1 Processos Químicos Convencionais

3.4.1.1.1 Cloro, Dióxido de Cloro e Permanganato

O cloro tem sido usado como reagente de purificação de água desde o início do século 20 nos Estados Unidos, substituindo a filtração de areia como o método de desinfecção (LAWTON e ROBERTSON, 1999). MCs e nodularinas podem ser rapidamente destruídas por cloro, hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio, no último caso exigindo dosagens superiores. O pH mostrou-se um fator relevante, pois a remoção de toxinas foi drasticamente reduzida em pHs maiores que 8 (NICHOLSON, ROSITANO e BURCH, 1994). Tsuji *et al.* (1997) demonstraram por seus estudos alta eficiência da cloração com hipoclorito de sódio na decomposição de MC-LR e MC-RR. Porém, os autores advertem que a pré-oxidação das células com cloro deve ser evitada pois causa lise celular e produz trihalometanos durante o processo de tratamento de água.

Valores de pH usualmente praticáveis necessitam de um maior tempo de contato com a molécula de MC, além disso, concentrações apropriadas de cloro residual livre devem ser garantidas. A remoção de MCs por cloração foi mais eficiente em pH 6 com uma concentração residual de cloro entre 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹ (HRUDEY *et al.*, 1999). Corrobora com estes dados, os resultados de Xagorarakis *et al.* (2006) e Acero *et al.* (2008), onde foram avaliados os efeitos da variação do pH, demonstrando que a oxidação de MC-LR com cloro depende do pH. No estudo de Xagorarakis *et al.* (2006) melhores remoções ocorreram com pH 6, e remoções mais lentas em pH 9. Acero *et al.* (2008) também verificou que altas concentrações de amônia consomem cloro, impedindo a eliminação de MC-LR. Já durante a oxidação com permanganato, a oxidação de MC-LR não é afetada pelo pH e pelo teor de amônia.

Ho *et al.* (2006) estudaram a remoção de análogos de MCs diante da sua exposição ao cloro, observando-se a remoção com demanda de cloro acima de 25 mg.L⁻¹ na seguinte ordem: MC-YR>MC-RR > MC-LR > MC-LA.

Diversos autores mostraram que a utilização de dióxido de cloro e cloroaminas na remoção de cianotoxinas da água, não são eficazes (NICHOLSON; ROSITANO; BURCH, 1994; HART, FAWELL e CROLL, 1998).

O permanganato é um forte agente oxidante capaz de destruir compostos orgânicos e microrganismos, a sua aplicação em larga escala começou na década de 1960 nos Estados Unidos e na Europa (LAWTON; ROBERTSON, 1999). Rositano *et al.* (1998) demonstraram que uma solução de 1 mg dm⁻³ de permanganato de potássio removeu 95% de uma solução de 200 µg dm⁻³ de MC-LR em 30 minutos. Em comparação a oxidação com uso de cloro e permanganato de potássio demonstrou uma remoção mais rápida de MC.

Ho *et al.* (2009) avaliaram a pré-oxidação com permanganato de potássio para remoção de geosmina e saxitoxinas produzida por uma cepa de cianobactéria da espécie *Anabaena circinalis*, indicando ser esta tecnologia uma boa alternativa, pois não libera geosmina e saxitoxina intracelular para o meio.

3.4.1.2 Degradação Eletroquímica

Mais recentemente a degradação eletroquímica de cianotoxinas tem sido avaliada a partir de diferentes sistemas. Liang *et al.* (2008) estudaram a degradação de MC-LR usando Ti/RuO₂, os resultados mostraram que a eficácia da remoção de MC-LR total aumenta em

menores densidades celulares e em maiores intensidades de corrente. Remoções de MC-LR superiores a 98% foram atingidas tanto em águas naturais quanto em água potável. Zhang *et al.* (2009) avaliaram a degradação eletroquímica de MC-RR usando eletrodo de boro dopado com diamante, os resultados demonstraram que a remoção eficiente de MC-RR ocorreu apenas na presença de cloreto de sódio, que atuou como mediador redox, outro fator determinante também foi a densidade de corrente aplicada.

Jeon *et al.* (2015) avaliaram a degradação eletroquímica de *Microcystis ichthyoblabe* e MC-LR, porém, neste caso a eficiência de remoção foi insensível a variações da densidade celular, concentração inicial de MC-LR e condutividade, dependendo fortemente da suspensão algal. Garcia *et al.* (2015) avaliaram o processo de fotoeletrooxidação na degradação MCs. Os resultados mostram que a potência da radiação UV e da corrente elétrica estão diretamente associados com a degradação de toxinas. O sistema proposto é eficiente na remoção de MCs, onde a redução chegou a 99%.

3.4.1.3 Processos Avançados de Oxidação (AOPs)

Vários processos de produção de radical hidroxila têm sido estudados e dentre os principais estão a fotólise, a fotocatalise e a oxidação com o ar, com peróxido de hidrogênio e ozônio, além dos sistemas combinados constituídos de oxidantes, adsorventes e catalisadores.

3.4.1.3.1 Fotólise

A oxidação fotolítica tem sido reportada por muitos pesquisadores, através de uma série de métodos. Para levar à fotodegradação, é necessário que o composto absorva a luz no mesmo comprimento de onda emitido pela fonte de luz. Se este não for o caso a clivagem fotolítica pode ser atingida com um agente sensibilizador que absorve a luz e inicia a reação de decomposição (LAWTON; ROBERTSON, 1999).

Hudder *et al.* (2007) avaliaram o tratamento de água contendo MC-LR por irradiação ultra-som. Tanto a toxina quanto os produtos de reação da toxina tratada foram avaliados quanto aos efeitos tóxicos em ratos. Os dados indicaram que a irradiação ultra-sônica de MC-LR reduz eficazmente a hepatotoxicidade em ratos e pode ser um método útil para a desintoxicação de água potável.

3.4.1.3.2 Fotocatálise

Vilela *et al.* (2012) investigaram o uso da fotocatálise heterogênea solar (TiO_2) na degradação de MC-LR. Testes de toxicidade aguda e crônica foram quantificadas em ratos e através de testes *in vitro* de inibição da proteína fosfatase. Foram necessários 150 minutos de ensaios (pH 3) para reduzir de 10 para $1\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR, a toxicidade aguda presente na amostra inicial foi removida, porém, testes usando a enzima fosfatase indicaram a formação de subprodutos com efeitos crônicos em mamíferos.

Lawton *et al.* (2003) avaliaram a degradação de variantes de MCs por fotocatálise com TiO_2 e radiação UV. Três das quatro MCs utilizadas no estudo contêm leucina na posição dois com o aminoácido presente na posição 4 conferindo alterações na hidrofobicidade da molécula global, o que reflete na adsorção da molécula por TiO_2 no escuro. Aproximadamente metade da MC-LR foi adsorvida à superfície do TiO_2 antes da iluminação UV, sob pH 4. No entanto, a extensão da adsorção aumentou para mais de 90% para as duas variantes de microcistina que continham um aminoácido hidrofóbico na posição 4 (MC-LF e MC-LW). Em contraste, a MC-RR, mais polar, uma variante que contém arginina em ambas as posições variáveis demonstrou adsorção quase nula em todos os pHs avaliados. Estes resultados influenciaram diretamente na eficiência do processo com adição de radiação UV.

3.4.1.3.3 Oxidação com o ar, com peróxido de hidrogênio e ozônio

Alguns estudos mostraram que a demanda de ozônio está intimamente ligada a presença de compostos orgânicos. O estudo de Hart e Stott (1993) e Carlile (1994) demonstraram que menores doses de ozônio foram necessárias para a degradação de MCs na água tratada comparada com água bruta. Carlson (1993), Bose; Boijayanta; Reckhow (1994) e Andrews; Huck (1994) ainda mostraram que a concentração e a natureza da matéria orgânica natural, o pH e a concentração de carbonato na água também estão associados a demanda de ozônio.

O aumento da degradação de MCs esta associado a altas doses de ozônio bem como do tempo de contato entre a toxina e este oxidante, porém devem ser observados que altas doses podem acarretar doses significativas de ozônio residual em solução (ROSITANO, 1996).

Nicholson e Pieronne (1998) mostraram uma eficiência de remoção de MCs acima de 99% utilizando uma dose de ozônio, $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ por 5 segundos de contato. Anos mais tarde Rositano *et al.* (2001) estudaram a ozonização de quatro águas tratadas com qualidades muito diferentes contaminadas artificialmente com MC-LR, MC-LA e anatoxina-a, atingindo 100% de degradação das MCs, porém a anatoxina-a foi muito resistente ao ozônio. Desta forma a água contaminada com esta toxina necessitaria de um tratamento a mais, tal como carvão ativado granulado.

Lawton; Robertson (1999) advertem que o ozônio é um gás instável, com alto potencial de oxidação e é utilizado para o tratamento de água por dispersão do gás no meio aquoso. Embora amplamente utilizado para o tratamento de água potável, é um reagente dispendioso e por vezes imprevisível.

3.4.1.4 Sistemas Combinados de Tratamento de Água com Microcistinas

3.4.1.4.1 Carvão ativado associado a oxidantes

Hoeger, Dietrich e Hitzfeld (2002) investigaram o efeito da ozonização na remoção de toxinas de cianobactérias durante uma sequência de tratamento envolvendo um reator de batelada em escala de laboratório, com subsequente etapa de filtração em areia e carvão ativado. A alta concentração de carbono orgânico total na água bruta utilizada levou à redução da eficiência da oxidação e destruição de toxina livre. Além disso, a ozonização de águas brutas contendo alta densidade de células de cianobactérias resultou na lise das células e liberação de toxina intracelular.

Em 2002, Newcombe *et al.* avaliaram a ozonização e adsorção em carvão ativado quimicamente a base de madeira e biodegradação na remoção de MCs presentes em diferentes águas brutas. Ambas as MCs (MC-LR e MC-LA) apresentaram o mesmo comportamento de degradação por ozonização, sendo destruídas por doses de ozônio de $0,5$ e 1 mg.L^{-1} após 5 minutos. A análise da toxicidade dos subprodutos da ozonização por bioensaios, revelou que os subprodutos de ambas toxinas não foram tóxicos.

3.4.1.4.2 Sistemas homogêneos associados a oxidantes

Liu *et al.* (2010) analisaram o efeito da radiação UV (254 nm) seguida de ozonização para remoção de MC-LR. Os produtos de decomposição da toxina foram analisados por UHPLC (Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance), e a redução de toxicidade

através de estudos da inibição da proteína fosfatase. Os resultados indicaram que o processo UV/O₃, em comparação com os efeitos isolados (somente UV e O₃) diminuiu efetivamente a concentração e a toxicidade da MC-LR a 100 µg. L⁻¹ após 5 min de irradiação UV e consequente ozonização a 0,2 mg. L⁻¹ por 5 min, enquanto foi necessária dosagem de 0,5 mg. L⁻¹ de ozônio para os níveis inferiores a 0,1 µg. L⁻¹.

Qiao *et al.* (2005) investigaram a degradação da MC-RR por um sistema catalítico combinado, composto por UV/H₂O₂. A eficiência de degradação de MC-RR não aumentou linearmente com o aumento da intensidade da luz UV e dosagem do peróxido de hidrogênio. Comparado com o tratamento usando individualmente a radiação de UV e peróxido de hidrogênio, o sistema combinado UV/H₂O₂ melhorou significativamente a eficiência de remoção daquela toxina de água devido ao efeito sinérgico entre o modo de oxidação por radiação UV e peróxido de hidrogênio.

He *et al.* (2011) avaliaram a degradação de MC-LR por processo UV-C/H₂O₂, investigou-se a influência da radiação UV, da dose de oxidante, concentração de MC-LR, além da presença de matéria orgânica natural, pH e alcalinidade, sobre a degradação. O H₂O₂ reage como um iniciador ou inibidor, dependendo da concentração. Nas condições de estudo (UV de 0,27 mW/cm² e 1 µM de MC-LR), a concentração ótima de H₂O₂ foi de 882 mM.

Água filtrada de um sistema hidráulico foi enriquecida com MC-LR e tratada com radiação UV (254 nm) e ozonização (UV/O₃). Os resultados da comparação dos três processos (O₃, UV e UV+O₃), indicaram que o processo UV/O₃ pode efetivamente diminuir tanto a concentração quanto a toxicidade da MC-LR ao nível de 100 µg.L⁻¹, após 5 min de irradiação UV e consequente ozonização por 5 min a 0,2 mg.L⁻¹ (abaixo de 1µg.L⁻¹), enquanto que uma dose de 0,5 mg.L⁻¹ de ozônio foi necessária para reduzir o nível abaixo de 0,1 µg.L⁻¹.

Huo *et al.*, (2015) investigaram o efeito do H₂O₂ sobre a integridade celular de *Microcystis aeruginosa*, e sobre a liberação e degradação de MCs expostas ao espectro de luz solar fornecida por lâmpada de vapor de mercúrio de alta pressão. Mais de 99% das células *M. aeruginosa* foram rompidas ou danificadas em 3 h para todos os tratamentos, e a liberação de MCs para a amostra foi estreitamente correlacionada com a perda da integridade da célula.

3.4.1.4.3 Catalisadores heterogêneos associados a oxidantes

He *et al.* (2015) investigaram a degradação das variantes comuns de MCs em água, MC-LR, MC-RR, MC-YR e MC-LA, por processos baseados em UV 254 nm, somente UV, UV/H₂O₂, UV/S₂O₈²⁻ e UV/HSO₅⁻. Observou-se que a fotólise direta de MCs é limitada,

enquanto que a adição de um oxidante melhora significativamente a eficiência da degradação. A remoção de MC-LR por processo UV/H₂O₂ aparentou ser mais rápida devido à presença do radical hidroxila.

Tecnologias avançadas de oxidação à base de sulfato (SR-AOTs) associadas a fotólise, termólise e mecanismos de transferência de elétrons foram avaliadas para a degradação do MC-LR por Antoniou, Armah e Dionysiou (2010). A geração de radicais sulfato se deu pela ativação de oxidantes persulfato (PS) e peroximonossulfato (PMS) por meio de cátions de metais de transição eletrofílicos (Ag⁺ e Co²⁺, respectivamente), radiação (UV 300 λ <math><400</math> nm) e / ou de calor (T=30°C). Quando comparados ao reagente de Fenton e H₂O₂ juntamente com o calor e radiação, com base nas condições de pH ótimas para cada sistema, a ordem de eficácia foi Co²⁺ / PMS > Fe²⁺ / H₂O₂ » Ag⁺ / PS.

Wang *et al.* (2014) utilizaram bentonita com nanopartículas de Fe/Pd suportadas para remover MC-LR, 96,86% da MC-LR foi removido usando o sistema, enquanto apenas 81,76% e 10,06% de MC-LR foram removidos usando nanopartículas de Fe/Pd e bentonita após 3 h, respectivamente.

Feng *et al.* (2006) estudaram a degradação fotocatalítica de MC-LR utilizando película fina de nanopartículas de TiO₂, com irradiação UVA de baixa intensidade, a análise demonstrou que a degradação da toxina foi influenciada pelo pH, concentração inicial e intensidade da radiação UV, 95% de 20 µg.L⁻¹ MC-LR foi decomposta em 120 minutos sob iluminação UV a 400 mW/cm² em pH 4, sendo esta a melhor condição.

Choi *et al.* (2007) avaliaram a atividade fotocatalítica de mesoporos de nitrogênio dopados com TiO₂ (N-TiO₂) para destruição de MC-LR. Mesmo sob luz UV, MC-LR foi decomposta 3-4 vezes mais rápida usando N-TiO₂ do que apenas TiO₂.

3.4.1.4.4 Catalisadores heterogêneos suportados

Lee *et al.* (2004) exploraram o potencial do carvão ativado revestido com TiO₂, as funções combinadas da elevada área superficial do carvão ativado somada as propriedades do TiO₂ mostraram efeito sinérgico sobre a degradação de MC-LR, onde ela foi degradada em produtos não tóxicos e CO₂ muito rapidamente.

Pestana *et al.* (2015) avaliaram o potencial de esferas de vidro ocas revestidas com TiO₂, empregadas na degradação fotocatalítica de onze variantes de MCs e nodularinas em água. Verificou-se que as toxinas foram decompostas com êxito em todos os casos em 5 minutos ou menos.

4 CONSIDERAÇÕES DO CAPÍTULO

A metodologia empregada para a análise bibliométrica permitiu traçar um perfil das publicações relacionadas ao tema desta pesquisa. A partir desta abordagem, é possível notar que o Brasil ocupa lugar de destaque, pois autores de universidades brasileiras encontram-se entre os mais produtivos. Embora a abordagem aplicada se refira a dados quantitativos, os periódicos em que os trabalhos científicos encontram-se publicados são de renome internacional e contam com um corpo editorial de altíssimo nível, possibilitando inferir alta qualidade a estes estudos.

Além disso, a metodologia empregada neste trabalho, sobretudo a análise das citações, possibilitou uma maior familiaridade com os autores mais citados e suas principais obras, identificadas como parte essencial de uma boa fundamentação teórica.

A análise geral das publicações permitiu estabelecer um panorama da evolução das técnicas e tecnologias de tratamento desenvolvidos ao longo dos anos na área, suas mudanças e constantes aprimoramentos, até chegar ao cenário atual. Muitas são as tecnologias aplicadas para a remoção de diferentes variantes de cianotoxinas, tanto dissolvidas quanto no interior das células, em etapas de pré-tratamento, sequencialmente com etapas do tratamento convencional ou no pós-tratamento. A gravidade dos riscos associados à presença de cianobactérias em reservatórios de abastecimento de água é um problema real, reconhecido amplamente pela comunidade acadêmica internacional, fato este que se nota pelo montante de publicações e repercussão dos trabalhos.

Um fator a ser considerado é a escala dos estudos e a reprodutibilidade dos mesmos em escala real, tendo em vista que muitos apesar de muito eficientes ainda são onerosos e por esse motivo, inviáveis (como a oxidação por O_3). Outros métodos se destacam pela eficiência e pelo baixo custo, porém os resultados são mais demorados (filtros de areia biologicamente ativados).

A associação de diferentes tecnologias para um eficiente tratamento da água tem sido relatada, e parece ser o melhor caminho para o alcance de resultados positivos e praticáveis. A incorporação de etapas ao tratamento convencional, onde seja possível utilizar a estrutura física já implantada é uma alternativa que merece atenção especial.

5 REFERÊNCIAS

ACERO, J. L. *et al.* Oxidation of microcystin-LR with chlorine and permanganate during drinking water treatment. **Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA**, v. 57, n. 6, p. 371-380, 2008.

ALBUQUERQUE JUNIOR, E. C. **Produção e Caracterização de Carvão Ativado Para Remoção de Microcistinas**. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2006.

ARAÚJO, C. A. Bibliometria: evolução histórica e questões atuais. **Em Questão**, Porto Alegre, v. 12, n. 1, p. 11-32, 2006.

BANKER, R. *et al.* Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (Cyanophyceae) isolated from Lake Kinneret, Israel. **Journal of Phycology**, v. 33, n. 4, p. 613-616, 1997.

BATAGELJ, V.; MRVAR, A. Pajek Wiki, 2008. Disponível em: <<http://mrvar.fdv.uni-lj.si/pajek/>>. Acesso em: 03 mar. 2016.

BRAGA, G. M. Relações bibliométricas entre a Frente de Pesquisa (Research Front) e Revisões da Literatura: estudo aplicado à Ciência da Informação. **Ciência da Informação**, Rio de Janeiro, 2 (1): 9 -26, 1973.

BYTH, S. Palm Island mystery disease. **The Medical Journal of Australia**, v. 2, n. 1, p. 40, 42, 1980.

CAMACHO, F. P. *et al.* Coagulation/flocculation/flotation/nanofiltration processes using *Moringa Oleifera* as coagulant of Eutrophized river. **Chemical Engineering Transactions**, V. 43, 2015.

CASTENHOLZ, R.W.; WATERBURY, J.B. In: STALEY, BRYANT, PFENNIG and HOLT, editors. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol. 3, Williams & Wilkins, Baltimore, 1710-1727, 1989.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. **Journal of applied bacteriology**, v. 72, n. 6, p. 445-459, 1992.

CARMICHAEL, W. W. The cyanotoxins. **Advances in botanical research**, v. 27, p. 211-257, 1997.

CHORUS, I. Die blualgen ('Cyanobakterien')—eine Berliner Besonderheit welcher Zusammenhang zwischen dem Massenhaften Auftreten von Blualgen und der Nutzung von Badegewässern. In: **Nachhaltigkeit in Wasserweswn in der Mitte Europas, Symposium Berlin (D)**. 1998. p. b29.

CHORUS, I.; BARTRAN, J. (Editors). **Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: Spon Press, 1999.

CODD, G.A. Cyanobacterial poisoning hazard in British fresh waters. **Vet.Rec.**, 113, 223-224, 1983.

DIXON, M. B. *et al.* A coagulation–powdered activated carbon–ultrafiltration–Multiple barrier approach for removing toxins from two Australian cyanobacterial blooms. **Journal of hazardous materials**, v. 186, n. 2, p. 1553-1559, 2011.

DONI, M. V. **Análise de cluster: métodos hierárquicos e de particionamento**. Monografia. Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2004.

FALCONER, I. R.; RUNNEGAR, M. T. C.; BUCKLEY, T.; HUYN, V. L.; BRADSHAW, P. Using activated carbon to remove toxicity from drinking water containing cyanobacteria blooms. **Journal American of Water Works Association**, v.81, p.102-105, 1989.

FALCONER, I. R. An overview of problems caused by toxic blue–green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water. **Environmental Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 5-12, 1999.

FALCONER, I. R. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. **Environmental toxicology and water quality**, v. 6, n. 2, p. 177-184, 1991.

FALCONER, I.R.; HUMPAGE, A.R. Tumour promotion by cyanobacterial toxins. **Phycologia**, 35 (6 supplement), 74-79, 1996.

GARCIA, A. C. A. *et al.* Degradation of cyanotoxins (microcystin) in drinking water using photoelectrooxidation. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 2, p. 45-49, 2015.

HART, J.; FAWELL, J. K.; CROLL, B. The fate of both intra- and extracellular toxins during drinking water treatment. **Water Supply**, v.16, n. 112, p.611-616, 1998.

HAWKINS, P.R., CHANDRASENA, N.R., JONES, G.J., HUMPAGE, A.R. AND FALCONER, I.R. Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. **Toxicon**, 35, 341-346, 1997.

HAWKINS, P. R. *et al.* Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1292-1295, 1985.

HALKIDI, M.; BATISTAKIS, Y.; VAZIRGIANNIS, M. On clustering validation techniques. **Journal of intelligent information systems**, v. 17, n. 2, p. 107-145, 2001.

HIMBERG, K.; KEIJOLA, A. M.; HIISVIRTA, L.; PYYSAALO, H.; SIVONEN, K. The effect of water treatment processes on the removal of hepatotoxins from *Microcystis* and *Oscillatoria* cyanobacteria: A laboratory study. **Water Research**, v.23, n.8, p.979-984, 1989.

HRUDEY, S.; BURCH, M.; DRIKAS M.; GREGORY, R. Remedial measures. In Chorus, Bartran editors. **Toxic cyanobacteria in water**: London: Spon Press, 1999.

HUDDER, Alice *et al.* Toxicogenomic evaluation of microcystin-LR treated with ultrasonic irradiation. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 220, n. 3, p. 357-364, 2007.

HUMPAGE, A.R, FALCONER, I.R. Microcystin-LR and liver tumour promotion: effects on cytokinesis, ploidy, and apoptosis in cultured hepatocytes. **Env.Toxicol. Water Qual.**, 14(1), In Press, 1999.

HO, L. *et al.* Chlorination of Four Microcystin Variants: MCLA is the most difficult microcystin variant to treat. **Water-melbourne then artarmon**, v. 33, n. 1, p. 65, 2006.

HO, L. *et al.* Optimising water treatment practices for the removal of *Anabaena circinalis* and its associated metabolites, geosmin and saxitoxins. **Journal of water and health**, v. 7, n. 4, p. 544-556, 2009.

HOFFMAN, J. R. H. Removal of Microcystis toxins in water purification process. **Water S. A.**, v. 2, p. 58-60, 1976.

JEON, B.S. *et al.* The removal of Microcystis ichthyoblabe cells and its hepatotoxin microcystin-LR during electrooxidation process using Pt/Ti electrodes. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 50, n. 6, p. 563-570, 2015.

JURCZAK, T. *et al.* Elimination of microcystins by water treatment processes - examples from Sulejow Reservoir, Poland. **Water research**, v. 39, n. 11, p. 2394-2406, 2005.

JONES, G. J. Limnological study of cyanobacterial dominance in three South-East Queensland reservoirs. **Managing Algal Blooms: Outcomes from the CSIRO Blue-Green Algal Research Program. CSIRO Land and Water, Canberra, Australia**, p. 51-66, 1997.

LAGE FILHO, F. A., FERREIRA FILHO, S. S. Estudo piloto de tratabilidade de águas eutrofizadas: efeitos da pré-oxidação com cloro livre no processo de filtração. In: **Anais do 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 1997.

LAWTON, L.; MARSALEK, B.; PADISÁK, J.; CHORUS, I. Determination of cyanobacteria in the laboratory. In Chorus, Bartran editors. **Toxic cyanobacteria in water**: London: Spon Press, 1999.

LAWTON, L. A; ROBERTSON, P. K J. Physico-chemical treatment methods for the removal of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) from potable waters. **Chemical Society Reviews**, v. 28, n. 4, p. 217-224, 1999.

LIANG, W. *et al.* Electrochemical degradation of cyanobacterial toxin microcystin-LR using Ti/RuO₂ electrodes in a continuous tubular reactor. **Environmental Engineering Science**, v. 25, n. 5, p. 635-642, 2008.

LIAO, X. *et al.* Evaluation of disinfection by-product formation potential (DBPFP) during chlorination of two algae species—Blue-green *Microcystis aeruginosa* and diatom *Cyclotella meneghiniana*. **Science of the Total Environment**, v. 532, p. 540-547, 2015.

MACKINTOSH, C., *et al.* Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. **Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.**, 264(2), 187-192, 1990.

MAIA, A. T. ; IAROZINSKI NETO, A. Análise Bibliométrica Sobre a Organização e Gestão de Empresas da Construção Civil. **Revista Engenharia e Construção Civil**, v. 2, p. 38-55, 2015.

MEREL, S.*et al.* Ms identification of microcystin-LR chlorination by-products. **Chemosphere**, v. 74, n. 6, p. 832-839, 2009.

MORAVCSIK, M. J. Measures of scientific growth. *Research Policy*, 2:266-75, 1973. p. 273-4. apud FERREZ, H.; Dodd. **Análise da literatura periódica brasileira na área de História**. Rio de Janeiro, UFRJ/ECO/IBICT, 1981. 168p.

NICHOLAS, D.; RITCHIE, M. **Literature and bibliometrics**. London: Clive Bingley, 1978.

NICHOLSON, B.; ROSITANO, J.; BURCH, M. Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine. **Water Res.**, v.28, p.1297-1303, 1994.

OHTANI, I., MOORE, R.E. e RUNNEGAR, M.T.C. Cylindrospermopsin, a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. **J. Amer. Chem. Soc.**, 114, 7941-7942, 1992.

PAERL, H.W.; HUISMAN, J. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, n. 1, p. 27-37, 2009.

PAERL, H.W.; HUISMAN, J. Blooms like it hot. **Science - New York Then Washington**, v. 320, n. 5872, p. 57, 2008.

PERA-TITUS, M. *et al.* Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: a general review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 47, n. 4, p. 219-256, 2004.

PETRUSEVSKI, N. A.; VAN BREEMEN, N. A.; ALAERTS, G. J. Effect of permanganate pre-treatment and coagulation with dual coagulants on algal removal in direct filtration. **Journal Water SRT-Aqua**, v.45, n.S, p.316-326 1996.

PRICE, D. J. de S. Society's need in scientific and technical information. **Ciência da Informação**, Rio de Janeiro, 3 (2): 97-103, 1974.

RODRÍGUEZ, E. M. *et al.* Oxidation of MC-LR and-RR with chlorine and potassium permanganate: toxicity of the reaction products. **Water Research**, v. 42, n. 6, p. 1744-1752, 2008.

ROSITANO, J.; NICHOLSON, B.; PIERONNE, P. Destruction of cyanobacterial toxins by ozone. **Ozone Sei Eng.**, v.20, p.223-238, 1998.

RUAS, T. L.; PEREIRA, L. Como construir indicadores de Ciência, Tecnologia e Inovação utilizando Web of Science, Derwent World Patent Index, Bibexcel e Pajek? **Perspectivas em Ciência da Informação**, v. 19, n. 3, p. 52-81, 2014.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In Chorus, Bartran editors. **Toxic cyanobacteria in water**: London: Spon Press, 1999.

SIVONEN, K. Cyanobacterial toxins and toxin production. **Phycologia**, 35 (6 Supplement), 12-24, 1996.

SIVONEN, K. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. **App. Environ. Microbiol.**, 56, 2658-2666, 1990.

SIVONEN, K. Toxic Cyanobacteria in Finnish Fresh Waters and the Baltic Sea. **Reports from Department of Microbiology**, 39, University of Helsinki, Hakapaino, Helsinki, 1990, 87 p.

TSUJI, Kiyomi *et al.* Stability of microcystins from cyanobacteria—IV. Effect of chlorination on decomposition. **Toxicon**, v. 35, n. 7, p. 1033-1041, 1997.

VILELA, W. F. D. *et al.* Degradation of [D-Leu]-Microcystin-LR by solar heterogeneous photocatalysis (TiO²). **Solar Energy**, v. 86, n. 9, p. 2746-2752, 2012.

XAGORARAKI, I. *et al.* Inactivation kinetics of the cyanobacterial toxin microcystin-LR by free chlorine. **Journal of Environmental Engineering**, v. 132, n. 7, p. 818-823, 2006.

YAN, S. *et al.* Ozonation of cylindrospermopsin (cyanotoxin): degradation mechanisms and cytotoxicity assessments. **Environmental science & technology**, 2016.

YING, J. I. *et al.* Degradation of microcystin-RR in water by chlorine dioxide. **Journal of China University of Mining and Technology**, v. 18, n. 4, p. 623-628, 2008.

ZIMAN, J. M. Information, communication, knowledge. **Nature**, 224: 318-24, 1969.

ZHANG, C.; FU, D.; GU, Z. Degradation of microcystin-RR using boron-doped diamond electrode. **Journal of hazardous materials**, v. 172, n. 2, p. 847-853, 2009.

ZONG, W. *et al.* Microcystin-associated disinfection by-products: The real and non-negligible risk to drinking water subject to chlorination. **Chemical Engineering Journal**, v. 279, p. 498-506, 2015.

Capítulo II - AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DOS AOPs UV-C E UV-C/H₂O₂ NA DEGRADAÇÃO DE *Microcystis aeruginosa* BB005 E MC-LR, E ANÁLISE DOS EFEITOS DA ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Resumo: *Microcystis aeruginosa* é uma espécie de cianobactéria potencialmente produtora de cianotoxinas, comumente associada a casos de intoxicação em escala mundial. Novas tecnologias para o tratamento de água têm sido estudadas para cumprimento de padrões de potabilidade da água a níveis exigidos pela legislação. Neste trabalho, buscou-se analisar a aplicabilidade dos processos avançados de oxidação UV-C e UV/H₂O₂, bem como avaliar os efeitos da adição de nanopartículas de prata (NAg), a partir de um produto comercial composto por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e nanopartículas de prata (NAg), na degradação de *M. aeruginosa* BB005 e MC-LR. Para fins de monitoramento dos ensaios, as variáveis de controle analítico utilizadas foram em um primeiro momento: peróxido de hidrogênio residual, densidade celular imediata, viabilidade celular e concentração de MC-LR; para complementar o estudo, em um segundo momento analisaram-se o diâmetro celular e o comportamento espectral. Os resultados das análises de MC-LR indicam efeito sinérgico entre radiação UV-C e peróxido de hidrogênio, os tratamentos T2 (UV-C/H₂O₂) e T3 (UV-C/H₂O₂+NAg) degradaram nos primeiros 30 minutos de reação 90,9% e 92,4% da MC-LR, respectivamente, não apresentando diferenças significativas entre as médias dos três ensaios (nível de significância de 5%), logo, a presença das nanopartículas de prata não interferiram na otimização do processo em se tratando da degradação de MC-LR. O T1 (apenas UV-C) degradou 85,4% da MC-LR em 30 minutos de reação e 100% em t≤180 minutos. Os processos estudados inviabilizaram totalmente as células de *M. aeruginosa* em 5 minutos de ensaio (menor tempo monitorado), e apresentaram diferentes cronologias de rompimento celular imediato. A varredura espectral demonstrou diminuição dos picos relativos à clorofila-a e às ficobilinas.

Palavras-chaves: Processos Avançados de Oxidação. Cianotoxinas. Viabilidade Celular. Varredura espectral.

1 INTRODUÇÃO

A eficácia dos tratamentos convencionais de água envolvendo etapas de coagulação, floculação, sedimentação, filtração e desinfecção com cloro na remoção de toxinas de cianobactérias da água para abastecimento público, vêm sendo questionadas pela academia a vários anos. Alguns pesquisadores relatam que estes processos não podem remover estas toxinas. Diante disso, diversos processos têm sido desenvolvidos na tentativa de remover as células intactas de cianobactérias potencialmente tóxicas, assim como as toxinas dissolvidas

na água, buscando acima de tudo um acordo entre seus custos e a sua fácil manipulação (ALBUQUERQUE JUNIOR, 2006).

Etapas de pré-tratamento de água em mananciais com elevadas concentrações de fitoplâncton, como a pré-cloração que é uma prática comumente realizada no Brasil, visando à inativação de microalgas e cianobactérias, podem promover a formação de subprodutos organohalogenados potencialmente cancerígenos (KURODA, 2006).

Em relação aos oxidantes de forma geral, é importante destacar que a seleção do ponto de aplicação (pré ou pós-oxidação) tem impactos sobre a efetividade de remoção de toxinas intra e extracelular. A pré-oxidação pode causar a lise celular, liberando as toxinas para água. Assim, o uso de oxidantes antes da remoção das células sadias deve ser analisado com muita precaução (ALBUQUERQUE JUNIOR, 2006).

Os Processos Avançados de Oxidação (AOPs) têm demonstrado grande potencial de aplicação na degradação de poluentes orgânicos e inorgânicos. Estes processos têm em comum a formação de radicais fortemente oxidantes, em sua maioria, radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$), amplamente reativos. Os AOPs apresentam uma gama diversificada de métodos, englobando processos homogêneos com irradiação ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, O_3/UV , $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3/\text{UV}$, US, $\text{H}_2\text{O}_2/\text{US}$, UV/US , $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}/\text{UV}$ – foto-Fenton) e sem irradiação ($\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, O_3/OH , $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ - Fenton), além de processos heterogêneos, que são os que contam com presença de catalisadores semicondutores (TiO_2 , ZnO , Fe_2O_3 , SiO_2 , Al_2O_3 , ZnS , CdS , entre outros), associados ou não a irradiação UV.

De encontro a isso, o crescente desenvolvimento da nanotecnologia tem despertado interesse de pesquisadores no âmbito das aplicações dos nanomateriais em questões relacionadas ao meio ambiente. Em tratamento de águas, os nanomateriais têm demonstrado forte potencial para revolucionar processos convencionais de tratamento de água (ZARPELON *et al.*, 2013).

As propriedades bactericidas da prata já eram utilizadas há 6.000 anos pelos sumérios que armazenavam água em recipientes de prata e assim mantinham-na fresca por mais tempo e também colocavam moedas de prata nos recipientes com leite para evitar que estragassem. Durante as grandes epidemias, as pessoas que utilizavam talheres de prata tinham mais chances de sobreviver e as crianças pequenas mantinham a imunidade, além disso, os ferimentos eram tratados com prata para acelerar a cura (CHEN, 2008).

Li *et al.* (2008) revisaram o potencial de aplicação de nanomateriais para desinfecção da água e controle microbiológico. Vários nanomateriais naturais e artificiais demonstraram

fortes propriedades antimicrobianas através de diversos mecanismos. As nanopartículas de prata - NAg são um exemplo destas propriedades, e causam comprometimento do envólucro da célula bacteriana e interrupção de transdução de energia. As nanopartículas de prata apresentam elevada atividade inibitória contra uma ampla faixa de microrganismos como bactérias, fungos e vírus (PANACÉK *et al.*, 2006), e passam a desempenhar um importante papel nas aplicações relacionadas a desinfecção e purificação de água, por seu baixo custo, eficácia, durabilidade e liberação controlada de íons prata (FENG *et al.*, 2000).

Há alguns anos vem sendo estudado o efeito fotocatalítico da prata adicionada ao dióxido de titânio (TiO₂), para a degradação de contaminantes e como agente antimicrobiano.

Bansal *et al.* (2007) estudaram os efeitos da prata na degradação fotocatalítica de ácido húmico. O TiO₂ carregado com 1% prata melhorou a taxa de mineralização e a degradação do ácido húmico - quando utilizado somente TiO₂ houve 90% de mineralização após 60 min, e utilizando 1,0% de Ag este nível de degradação foi possível dentro de 40 min.

Com o desenvolvimento da nanociência e o controle sobre as dimensões nanométricas das emulsões de prata, o uso da prata nas aplicações industriais e domésticas passou a se tornar viável. Na escala nanométrica vale-se da enorme relação área superficial/volume e não na quantidade de prata utilizada, além das interessantes propriedades advindas dos materiais quando se opera nessa escala. Assim, a capacidade bactericida da prata foi potencializada, pois se conseguiu uma maior superfície ativa. Um grama de prata, reduzida a escala nano, tem uma superfície de contato de centenas de metros quadrados (CHEN, 2008).

Tendo em vista as vantagens dos processos avançados de oxidação UV-C e UV-C/H₂O₂, e também o grande potencial bactericida e fotocatalítico de nanopartículas de prata, neste trabalho buscou-se analisar a aplicabilidade dos processos UV-C e UV/H₂O₂, bem como avaliar os efeitos da adição de nanopartículas de prata (NAg) a estes processos, a partir de um produto comercial composto por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e nanopartículas de prata (NAg), na degradação de *M. aeruginosa* BB005 e MC-LR.

2 METODOLOGIA

O presente estudo utilizará como base a pesquisa experimental. Segundo Gil (2002), a pesquisa experimental consiste em determinar um objeto de estudo, selecionar as variáveis

que seriam capazes de influenciá-lo, definir as formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz no objeto.

O objeto de estudo foi a cepa toxigênica de *Microcystis aeruginosa* BB005. As variáveis aplicadas foram H₂O₂, irradiação UV, e o composto comercial de H₂O₂ associado a nanopartículas de prata (NAg). As formas de controle e observação dos efeitos que as variáveis produziram no objeto se deram a partir dos métodos analíticos de viabilidade celular, densidade celular, MC-LR, H₂O₂ residual, e complementarmente varredura espectral e diâmetro celular.

Na Figura 01 estão descritos os passos metodológicos utilizadas para realização de cada etapa de estudo, conforme descritas no fluxograma abaixo.

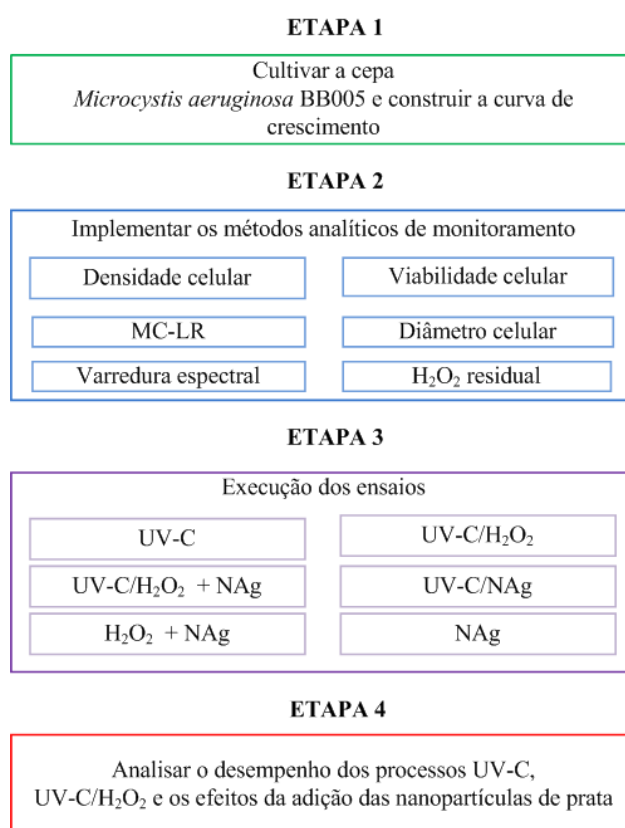


Figura 01. Fluxograma explicativo das etapas deste trabalho e seus respectivos passos metodológicos.

Como pode-se observar na etapa 3, a cepa de estudo foi submetida a seis tratamentos distintos. São eles:

- Tratamento 1: somente radiação UV-C
- Tratamento 2: UV-C/H₂O₂
- Tratamento 3: UV-C/ H₂O₂ + NAg

- Tratamento 4: H₂O₂ + NAg
- Tratamento 5: NAg
- Tratamento 6: UV-C/NAg

2.1 Meio de Cultura e Condições de Cultivo de *Microcystis aeruginosa*

A cepa de cianobactéria toxigênica *Microcystis aeruginosa* BB005 (produtora de MC-LR) utilizada para este estudo, foi isolada de uma floração tóxica do reservatório de Barra Bonita (São Paulo) e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Armando Augusto H. Vieira (Departamento de Botânica, Universidade Federal de São Carlos).

O cultivo foi realizado no Laboratório de Limnologia, Ecologia e Cromatografia (LLiEC-UTFPR), em meio líquido ASM-1 modificado (GORHAM *et al.*, 1964) cuja composição é apresentada no Quadro 01, com pH corrigido para pH 7.4 ± 0.2 (pHmetro portátil Digimed), com adição de hidróxido de sódio, sob temperatura entre 20 e 30°C, e fotoperíodo 14 h / 10 h claro/escuro.

A concentração da solução B adicionada ao meio de cultura foi aumentada, como segue no Quadro 01, devido a respostas morfológicas em resposta a limitação de nutrientes. As pesagens foram realizadas em balança analítica (Bel Engineering®) com precisão de 0,1 mg.

Nitrogênio e fósforo são os elementos que compõem a maior parte das células das cianobactérias. No meio ASM-1 estão presentes em maior concentração, e devido ao fato da disponibilidade desses elementos serem fatores limitantes para a proliferação desses organismos são denominados macronutrientes. Já os elementos traços (oligoelementos) compõem pequena quantidade da matéria viva em massa, porém são essenciais para manutenção da vida.

A inoculação para manutenção dos cultivos foi realizada em câmara de fluxo laminar vertical com lâmpada germicida, utilizando-se 10% de inóculo na fase estacionária da curva de crescimento. Após a inoculação os frascos permaneceram sobre a bancada, sob irradiação artificial fornecida por lâmpadas fluorescentes, sendo periodicamente agitados (pelo menos 2 vezes por semana) manualmente com movimentos circulares. A inoculação para determinação da curva de crescimento partiu de inóculo na fase exponencial (10^5 a 10^6 células.mL⁻¹).

Composição	Concentração (g/100 mL)	Quantidade total a ser usada em 1L de meio
Solução A NaNO ₃ MgSO ₄ .7H ₂ O MgCl ₂ .6H ₂ O CaCl ₂ .2H ₂ O	0,850 0,245 0,205 0,145	20 mL
Solução B KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O H ₃ BO ₃ MnCl ₂ .4H ₂ O	0,870 1,78 2,48 1,39	5 mL
Solução C FeCl ₃ .6H ₂ O ZnCl ₂ CoCl ₂ .2H ₂ O CuCl ₂ .2H ₂ O	1,08 0,335 0,0019 0,0014	0,1 mL
Solução D Na ₂ EDTA	1,86	0,4 mL

Quadro 01. Composição e quantidade das soluções estoques do meio ASM-1 de Gorhan *et al.* (1964) modificado.

2.2 Condições experimentais

Os ensaios foram conduzidos em bancada, em um sistema composto por lâmpada a vapor de mercúrio de alta pressão de 125 W, com bulbo de quartzo, inserido em uma caixa de madeira, de modo a isolar o operador do sistema da radiação UV-C (Figura 02). A água a ser tratada foi inserida em Becker de vidro com capacidade de 1000 mL, preenchido com pelo menos 500 mL da água de estudo, a qual foi submetida a agitação magnética constante. Os controles consistiram de condições similares, porém os ensaios foram realizados no escuro para verificar/comprovar a influência da irradiação no processo.

A densidade celular de cianobactérias utilizada para os ensaios foi padronizada em 1×10^6 células.mL⁻¹, considerando a concentração de células normalmente encontrada em florações. Para a realização dos ensaios, foi necessário diluir o inóculo em meio ASM-1 (pH ajustado para $7,4 \pm 0,2$), o qual foi utilizado para compor a água de estudo, considerando os sais dissolvidos normalmente encontrados em águas naturais. Para se chegar a concentração celular inicial dos ensaios, retirou-se uma alíquota do frasco de cultivo (de concentração próxima a 1×10^7 células.mL⁻¹), e diluiu-se para preparo da água de estudo. Para verificação da concentração celular utilizou-se microscópio óptico (Zeiss®) com auxílio de câmara de

Neubauer.

De posse do volume da água de estudo necessário para o ensaio (Becker de 1000 mL de capacidade preenchido com 500 mL), a concentração celular foi confirmada em câmara de Neubauer, e em seguida foi submetida a agitação magnética efetuando-se a dosagem da solução do tratamento correspondente, seguida do acionamento da lâmpada, quando necessário.

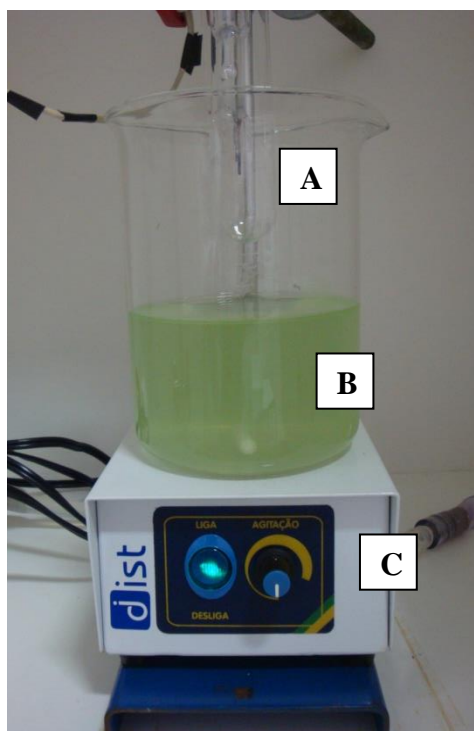


Figura 02. Sistema adotado para realização dos ensaios. Em A: posicionamento da lâmpada a vapor de mercúrio 125 W; em B: água de estudo; em C: agitador magnético.

O composto de peróxido de hidrogênio com adição de prata (NNXC R20), bem como a solução de nanocomposto de prata – NAg (NNXC R03) para análise do efeito isolado, utilizados para os ensaios foram cedidos pela empresa Nanox Intelligent Materials®. A solução de peróxido de hidrogênio - H₂O₂ foi preparada a partir da solução estoque de 30% m/v, obtida junto à empresa Peróxidos do Brasil®. A mensuração da concentração do peróxido de hidrogênio foi efetuado com o auxílio de espectrofotômetro UV-Vis Varian (modelo Cary 50).

Os ensaios tiveram duração de 180 minutos, sendo retiradas alíquotas para análises das concentrações de peróxido de hidrogênio residual, concentração celular imediata e viabilidade celular no tempo 0 (tempo inicial), após 30 minutos, 60 min, 120 min, 150 min, e 180 minutos

de reação. Nas amostras destinadas às análises de viabilidade, contagem celular imediata e MC-LR, adicionou-se solução de catalase bovina (Sigma-Aldrich) a 0,5% m/v, para neutralização do peróxido de hidrogênio.

A água de estudo foi submetida a diferentes tratamentos, o que permitiu avaliar o desempenho de cada variável separadamente na degradação celular de *M. aeruginosa* BB005 e degradação de MC-LR, além de identificar os possíveis efeitos sinérgicos destas variáveis analisadas.

A escolha da concentração do composto de estudo (R020) partiu da premissa de se utilizar a concentração recomendada comercialmente, de 100 mg.L^{-1} de peróxido de hidrogênio, e verificar as consequências da exposição celular da cepa de estudo quando submetidas a esta concentração. Segundo informações do fabricante, logo que a solução R020 utilizada para este trabalho foi fabricada, era composta por peróxido de hidrogênio 35% e de 640 mg.L^{-1} de íons de prata, porém, quando armazenada por determinado tempo, o peróxido de hidrogênio vai se degradando, e devido a este fato, para fins de dosagem do produto, a concentração do mesmo era analisada em um curto período de tempo antes da realização dos ensaios, sendo a concentração da prata dependente da dosagem de peróxido.

2.3 Variáveis De Monitoramento e Controle Analítico

2.3.1 Densidade Celular (células.mL^{-1})

A determinação da densidade celular da cepa *M. aeruginosa* BB005, foi realizada por meio de contagem em câmara de Neubauer (0,1 mm de profundidade) (Figura 03). Foram feitas contagens nos dois lados da câmara, e, caso houvesse diferença maior que 10% entre os lados, era realizada uma nova contagem.

Para construção da curva de crescimento, as contagens foram realizadas de uma a duas vezes por semana, até a fase estacionária da curva, e novamente na fase de declínio e senescência celular a intervalos maiores.

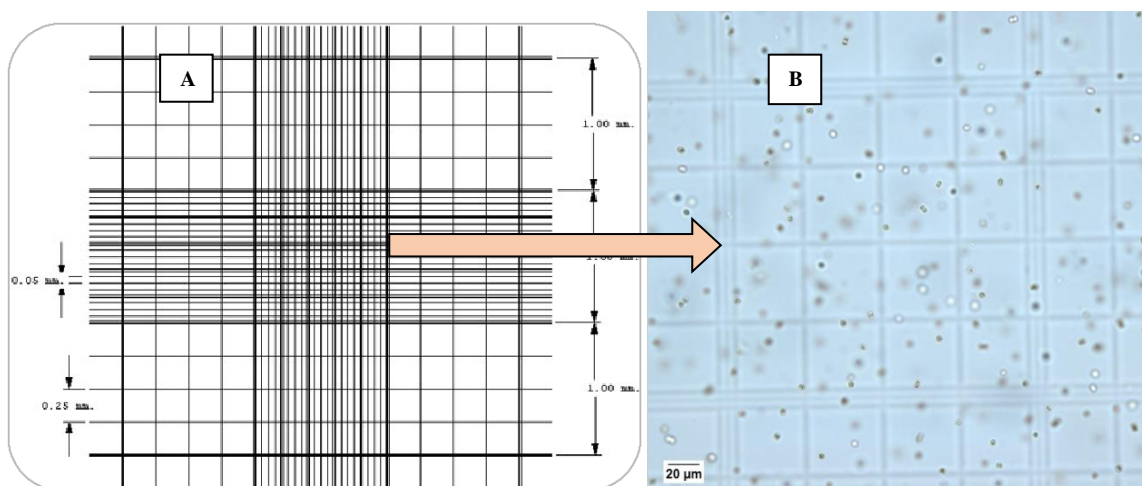


Figura 03. Em (A) quadrantes maiores da câmara de Neubauer (Fonte: www.celeromics.com). Em (B) quadrantes menores da câmara de Neubauer (aumento de 400x).
Fonte: Autoria própria.

Na Figura 03 (B) pode-se observar um quadrante pequeno, utilizado para contar as densidades celulares mais altas, neste caso utiliza-se a equação 1. Os quadrantes médios são utilizados para densidades celulares menores, os resultados são submetidos à equação 2. A letra Q indica o quadrado contado. Para fins de minimização de erros, excluem-se as células presentes em cima das linhas superior e do lado direito. Imagens foram capturadas através de câmera acoplada ao microscópio óptico utilizando-se do software Zen 2012®.

$$\text{Densidade celular (células.mL}^{-1}\text{)} = \frac{(Q1+Q2+Q3+Q4+Q5)}{5} \cdot 1600000 \quad (1)$$

$$\text{Densidade celular (células.mL}^{-1}\text{)} = \frac{(Q1+Q2+Q3+Q4)}{4} \cdot 10000 \quad (2)$$

2.3.2 Viabilidade Celular

A determinação da viabilidade celular consiste da reinoculação de uma alíquota da amostra em meio de cultivo e verificação do crescimento celular após incubação. A finalidade deste parâmetro foi avaliar a capacidade das células se multiplicarem após serem expostas a um processo ou tratamento.

A viabilidade das células foi testada em tubos de ensaio com capacidade de 40 mL, com 18 mL de meio ASM-1, através da reinoculação de alíquota de 2 mL (inóculo de 10%). Este procedimento foi realizado em triplicata. Os tubos de ensaio foram agitados manualmente uma vez ao dia. Após 14 dias de inoculação a concentração celular e morfologia das células

foram analisadas com auxílio de microscópio óptico.

2.3.3 Microcistina LR (MC-LR)

As análises cromatográficas foram realizadas em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (*Hight Performance Liquid Chromatography*) modelo 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. Para as análises cromatográficas, foram utilizados solventes com graus de pureza HPLC, A água ultrapura foi proveniente de sistema ultrapurificador Mega Purity® (modelo Mega Up).

Para fins de quantificação, considerou-se a MC-LR total, ou seja, a soma das frações extracelulares e intracelulares. Para isso, as amostras foram submetidas a três ciclos de congelamento/descongelamento, com o objetivo de provocar a lise celular e consequente liberação da toxina intracelular para o meio extracelular.

Para extração da MC-LR para posterior injeção em sistema cromatográfico, foram utilizados cartuchos de extração em fase sólida contendo fase estacionária octadecilsílica (1000 mg, Applied Separations®), em sistema Manifold (Agilent®) conectado a bomba a vácuo (Logen Scientific®). Primeiramente efetuou-se o condicionamento do cartucho em 10 mL de metanol e de água ultrapura. Em seguida, aplicou-se a amostra no cartucho, sendo posteriormente realizado um *clean up* com 10 mL de água ultrapura. A última etapa consistiu da eluição da MC-LR em 10 mL de metanol.

O eluato resultante da etapa anterior foi submetido a evaporação sob fluxo de ar comprimido. Após evaporação total, a MC-LR foi redissolvida em 500 µL de água ultrapura com auxílio de um Vortex. A solução obtida foi transferida para inserts suportados em *vials*. Após estes procedimentos procedeu-se da injeção de pequena alíquota (50 µL) no sistema cromatográfico.

2.3.4 Diâmetro Celular

As medidas celulares foram realizadas em amostras controles e nos diferentes tratamentos, sob microscópio óptico binocular Zeiss Axioskop-2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com contraste de fase. Imagens foram capturadas através de câmera acoplada ao microscópio óptico utilizando-se do software Zen 2012®. Logo após, utilizou-se da ferramenta “*circle*”, e delimitou-se manualmente a área da célula de interesse (Figura 04).

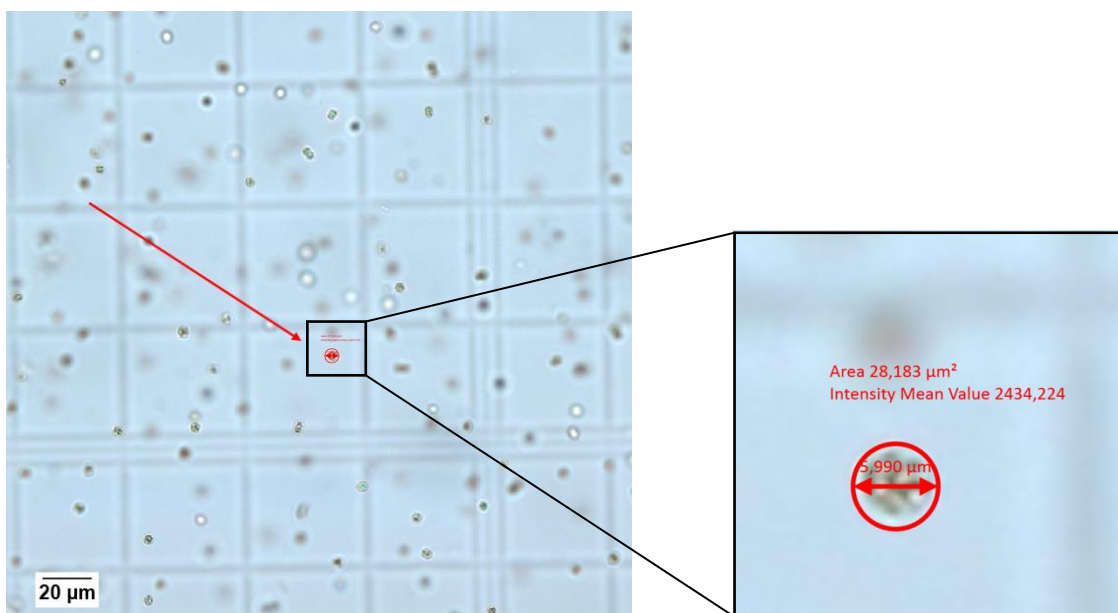


Figura 04. Ferramenta de medição do diâmetro celular, a partir de imagem capturada em microscópio óptico Zeiss®, e software Zen 2012®.

Registraram-se o diâmetro celular de cinco células de cada amostra, nos tempos de monitoramento de 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. O objetivo desta análise foi identificar alguma possível variação nos volumes celulares devido à exposição aos diferentes tratamentos, o que poderia refletir no tamanho das células. Esta análise se refere apenas a uma informação complementar ao estudo.

2.3.5 Varredura Espectral

A varredura espectral teve o objetivo de avaliar os comportamentos espectrais das amostras submetidas aos distintos tratamentos, durante a execução dos ensaios.

O critério de seleção das amostras para esta análise complementar, se deu em relação a variação da coloração, visivelmente a olho nu. Durante a execução dos ensaios retirou-se uma alíquota de 4 mL destas amostras, nos tempos de monitoramento determinados, as quais foram submetidas a leitura em espectrofotômetro UV-Vis (Shimatzu®). Adotou-se a faixa espectral de 200 a 900 nm, caminho óptico de 1 cm.

2.3.6 Peróxido de Hidrogênio Residual

A concentração de peróxido de hidrogênio antes do início dos ensaios e durante a realização dos mesmos foi avaliada, com o objetivo de quantificar o consumo do peróxido

para degradação das células e de MC-LR, durante a execução dos tratamentos. A determinação ocorreu com adição do reagente Allper® (Peróxidos do Brasil®), através de metodologia espectrofotométrica fundamentada na reação entre o titânio e peróxido de hidrogênio, levando à formação de complexo de coloração amarelada, que absorve em 395 nm (SCHICK *et al.*, 1997).

Elaborou-se uma curva analítica na faixa de concentração de 0,7 a 8 mg.L⁻¹ ($r = 0,999$) com solução padrão de peróxido de hidrogênio (Peróxidos do Brasil®, 35% v/v), adicionando-se uma gota do reagente Allper® para cada mililitro de amostra.

As amostras foram imediatamente submetidas à leitura de absorbância (395 nm) em espectrofotômetro UV-Vis (Shimatzu®) durante a realização dos ensaios. Quando ultrapassado o limite máximo de quantificação estabelecido pela curva de concentração, efetuaram-se diluições das amostras com adição de água purificada por sistema de osmose reversa.

2.4 Estudos Cinéticos

Um método gráfico foi aplicado para identificar a velocidade da reação de degradação de MC-LR e do H₂O₂ residual. A constante de velocidade da reação (k) foi obtida através das ferramentas de análise “*linear fit*” e “*exponential fit*” (ajuste linear e exponencial) do *software* OringinPro® 9.0.

Os coeficientes de inclinação das curvas foram obtidos através dos gráficos de concentração (MC-LR ou H₂O₂) *versus* tempo de reação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Curva de Crescimento da cepa *Microcystis aeruginosa* BB005

O acompanhamento da multiplicação celular foi realizado em duplicata, como está ilustrado na Figura 05. O inóculo inicial foi composto de $9,6 \times 10^4$ células por mililitro de meio de cultura ASM-1. Embora as réplicas tenham sido submetidas às mesmas condições de cultivo, foi possível observar uma sensível diferença entre as réplicas. Para fins de construção

da curva de crescimento celular (Figura 06), considerou-se a média entre as contagens dos dois cultivos.

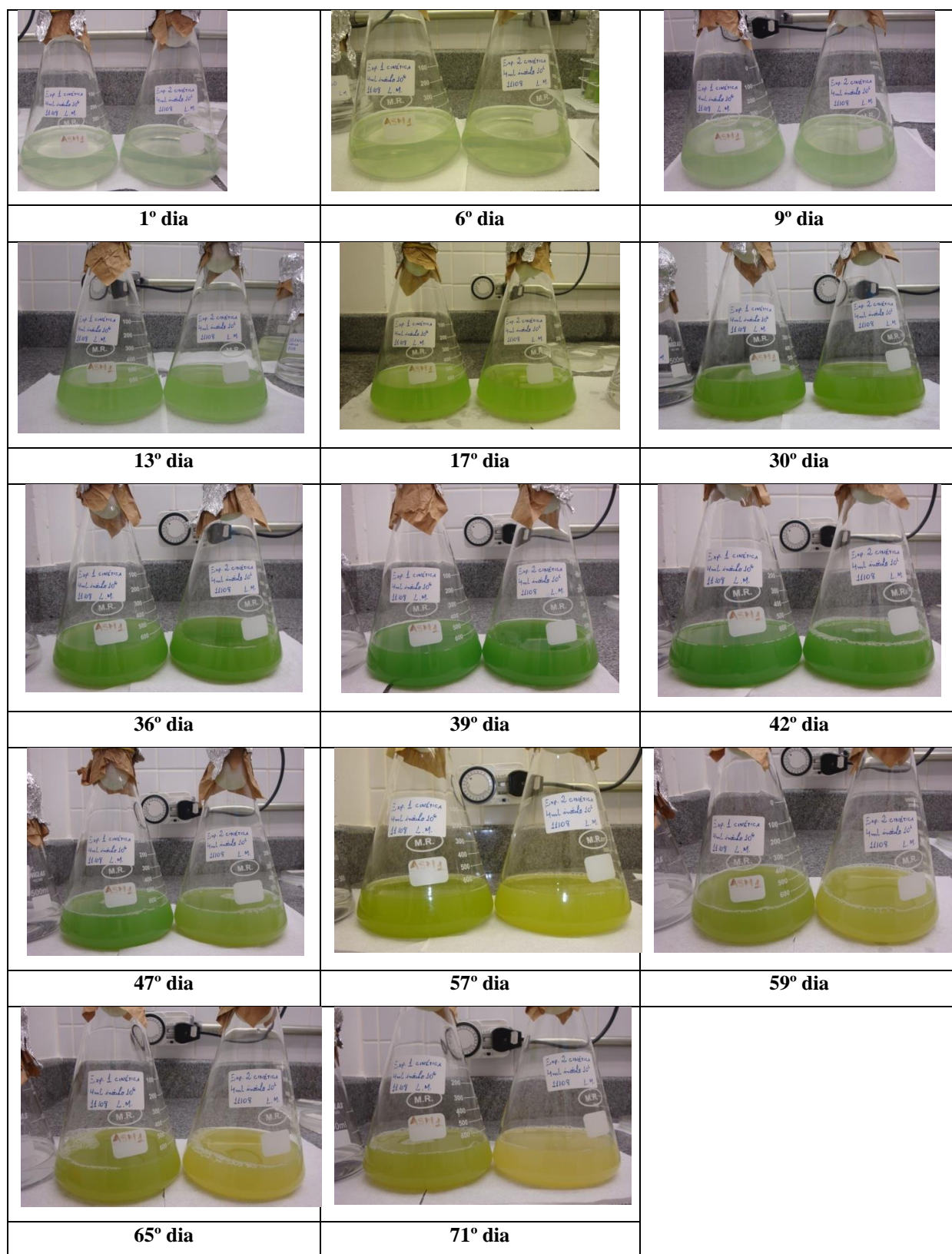


Figura 05. Aspecto da cepa de *M. aeruginosa* BB005 desde a inoculação até o período de senescência celular. Os dois beckeres correspondem a duplicatas.

A partir do monitoramento da densidade celular no transcorrer do tempo, pode-se observar (Figura 06) que houve um incremento na densidade celular atingindo valores máximos de $1,5 \times 10^6$ células por mililitro. Após o período de quarenta e três dias a cepa entrou em fase de senescência celular.

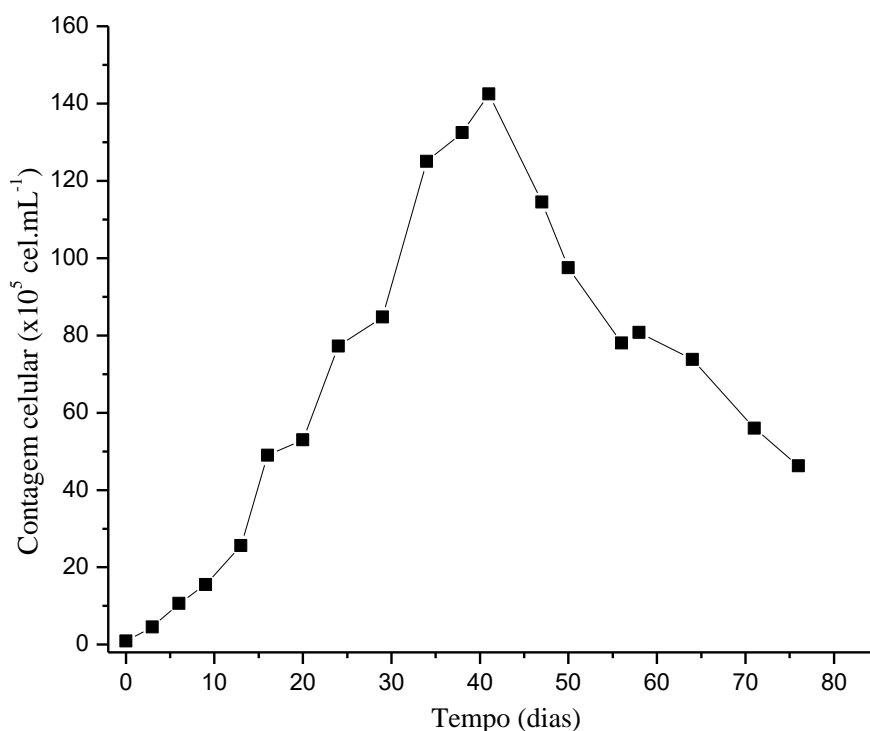


Figura 06. Curva de crescimento da cepa toxigênica de estudo *Microcystis aeruginosa* BB005 (média das réplicas).

Conhecer a curva de crescimento foi importante para se determinar com quantos dias de antecedência seria necessário repicar o cultivo para a realização dos ensaios, e desta forma padronizar as condições de realização dos ensaios. Verificou-se que partindo-se da concentração inicial indicada (aproximadamente $1,0 \times 10^5$ células.mL $^{-1}$), foram necessários aproximadamente 30 dias para o inóculo atingir $1,0 \times 10^6$ células.mL $^{-1}$.

3.2 Densidade celular imediata

A contagem celular nos consecutivos tempos de monitoramento permitiu analisar o efeito de cada tratamento na ruptura celular, a partir do número de células, bem como notar

mudanças morfológicas causadas pelas condições de ensaio em análise. Os ensaios dos tratamentos 1, 2 e 3 foram realizados em triplicata, e os demais – controles – em duplicata.

A partir dos dados dispostos na Figura 07, é possível identificar os efeitos do tratamento 1 na integridade celular, onde a água de estudo foi exposta somente a radiação UV-C, também chamada de fotólise. Este tratamento foi o que causou ruptura celular mais rapidamente, onde obteve-se, já no primeiro tempo de monitoramento (30 min), 68% de redução da densidade celular. As células foram rompidas chegando a apenas 5×10^4 células.mL⁻¹ em 180 minutos, o que representa 2% do número inicial de células.

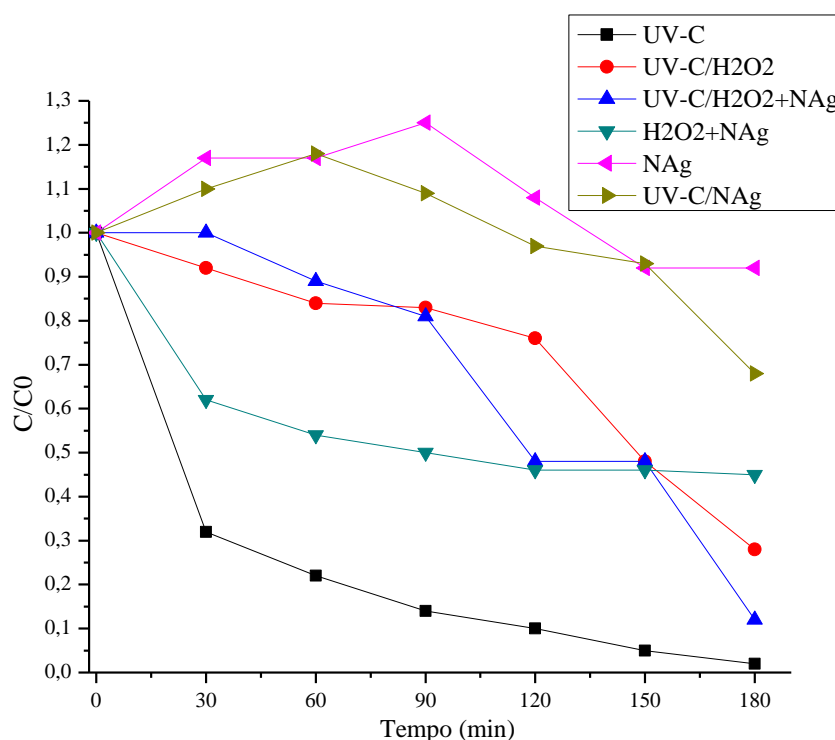


Figura 07. Razão entre as concentrações final e inicial (C/C_0) da densidade celular (células.mL⁻¹) imediata de cada tratamento, incluindo as variáveis isoladas.

Os tratamentos 2 (UV-C/H₂O₂) e 3 (UV-C/H₂O₂+NAg) apresentaram comportamento similar, apresentando sensível decaimento nos primeiros 90 minutos de ensaio, e maior rompimento nos demais tempos, chegando a 28% ($6,4 \times 10^5$ células.mL⁻¹) e 12% ($2,7 \times 10^5$ células.mL⁻¹) do número inicial de células ($2,3 \times 10^6$ células.mL⁻¹), respectivamente, em 180 minutos.

Huo *et al.*, (2015) investigaram o efeito do peróxido de hidrogênio sobre a integridade celular de *Microcystis aeruginosa*, e sobre a liberação e degradação de MCs expostas ao espectro de luz solar (lâmpada de 400W). Segundo estes autores mais de 99% das células *M. aeruginosa* foram rompidas ou danificadas em 3 h para todos os tratamentos, e a liberação de

Sakai *et al.* (2007) avaliaram os efeitos da luz UV de baixa e média pressão para *M. aeruginosa*, e concluíram que a radiação UV causa redução celular pela diminuição da atividade fotossintética.

Feng *et al.* (2000) analisaram o efeito de nanopartículas de prata em duas bactérias, *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva). Os íons de prata afetam a permeabilidade da membrana, transformando o DNA numa forma condensada e impedindo sua replicação, além de agir na inativação de proteínas.

Kim *et al.* (2008) relataram que a inativação de bactérias e vírus por íons de prata pode ser melhorada na presença de irradiação UV-A e do espectro visível (> 400 nm), os íons de prata juntamente com a irradiação causam danos críticos às células através da complexação de íons de prata com grupos tiol (-SH) em proteínas estruturais ou enzimáticas dos microrganismos e sua posterior destruição fotoquímica.

Zarpelon (2013) demonstrou em seu estudo a ação inibitória de filmes finos obtidos a partir de soluções de polieletrólitos fracos decorados com nanopartículas de prata e reticulados com glutaraldeído, contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, sendo que o tratamento do efluente com o filme foi mais efetivo contra a segunda bactéria, reduzindo em torno de 90% dos coliformes totais presentes na amostra inicial.

3.4 Microcistina LR (MC-LR)

Os resultados das análises de MC-LR dispostos na Figura 08 e na Tabela 02, indicam efeito sinérgico entre radiação UV-C e peróxido de hidrogênio, ambos os tratamentos T2 (UV-C/H₂O₂) e T3 (UV-C/H₂O₂+NAg) degradaram nos primeiros 30 minutos de reação 90,9% e 92,4% da MC-LR, respectivamente.

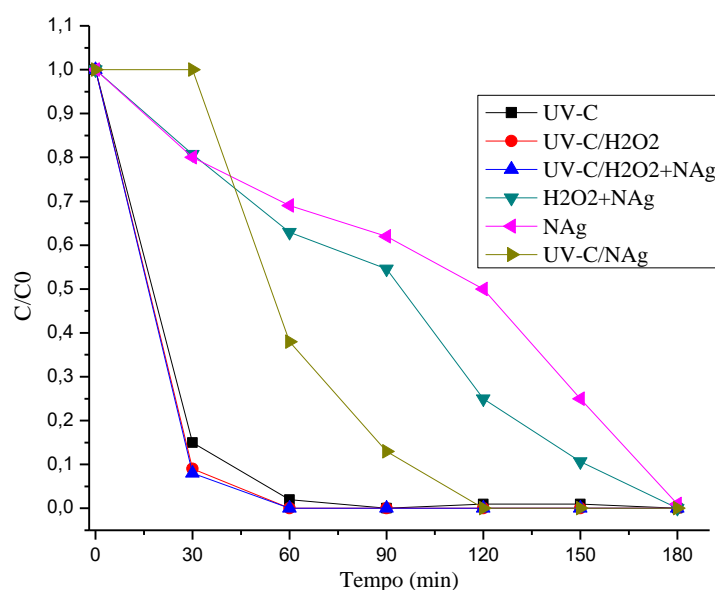


Figura 08. Razão entre as concentrações final e inicial (C/C_0) da Microcistina-LR em cada tratamento, incluindo as variáveis isoladas.

Corroboram com os resultados do presente estudo, os obtidos por He *et al.* (2015), os quais investigaram a degradação das variantes comuns de MCs em água, MC-LR, MC-RR, MC-YR e MC-LA, por processos baseados em UV 254 nm, entre eles a radiação UV e UV/H₂O₂. Observou-se que a fotólise direta de MCs é limitada, enquanto que a adição de um oxidante melhora significativamente a eficiência da degradação. A remoção de MC-LR por processo UV/H₂O₂ aparentou ser mais rápida devido à presença do radical hidroxila.

De encontro a isso, Qiao *et al.* (2005) investigaram a degradação da MC-RR por um sistema catalítico combinado, composto por UV/H₂O₂. Comparado com o tratamento usando individualmente a radiação de UV e peróxido de hidrogênio, o sistema combinado UV/H₂O₂ melhorou significativamente a eficiência de remoção daquela toxina de água devido ao efeito sinérgico entre o modo de oxidação por radiação UV e peróxido de hidrogênio.

Porém, analisados estatisticamente, os tratamentos 2 e 3 não apresentaram diferenças significativas entre as médias dos três ensaios, ao nível de significância de 5% (software OriginPro 8), logo, pode-se inferir que a presença das nanopartículas de prata não interferiram na otimização do processo em se tratando da degradação de MC-LR.

Tabela 02. Resultados da concentração de MC-LR (média das réplicas) de todos os tratamentos nos diversos tempos de monitoramento

Tratamento	Concentração de MC-LR ($\mu\text{g.L}^{-1}$)						
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
T1	192,37	28,1	4,41	3	2,66	1,93	0
T2	146,7	13,39	0	0	0	0	0
T3	146,7	11,19	0	0	0	0	0
T4	38,31	30,92	24,11	20,9	9,56	4,09	0
T5	209,42	167,54	145,36	129,84	143,17	52,36	1,79
T6	38,47	38,82	14,77	5,09	0	0	0

T1: UV-C; T2: UV-C/H₂O₂; T3: UV-C/H₂O₂ +NAg; T4: H₂O₂+NAg; T5: NAg; T6: UV-C/NAg.

Analisando-se o efeito das variáveis isoladas, o T1 (apenas UV-C) degradou 85,4% da MC-LR em 30 minutos de reação e 100% em $t \leq 180$ minutos.

A oxidação fotolítica tem sido reportada por muitos pesquisadores através de uma série de métodos. Para que ocorra a fotodegradação, é necessário que o composto absorva a luz no mesmo comprimento de onda emitido pela fonte de luz. Se este não for o caso a clivagem fotolítica pode ser atingida com um agente sensibilizador que absorve a luz e inicia a reação de decomposição (LAWTON e ROBERTSON, 1999).

Outros processos avançados de oxidação são aplicados juntamente com radiação. Liu *et al.* (2010) analisaram o efeito da radiação UV (254 nm) seguida de ozonização para remoção de MC-LR. Os resultados indicaram que o processo UV/O₃, em comparação com os efeitos isolados (somente UV e O₃) diminuiu efetivamente a concentração e a toxicidade da MC-LR.

Os resultados de MC-LR para o tratamento 5 reforçam o potencial de aplicação de nanopartículas de prata para desinfecção da água, pois somente as NAg (no escuro) foram capazes de degradar a toxina, embora não tenham provocado a lise celular e consequente liberação da toxina intracelular para o meio, como observado na Figura 07. Corroboram com estes resultados os decritos por Li *et al.* (2008), que revisaram o potencial de aplicação de nanomateriais para desinfecção da água e controle microbiológico. Vários nanomateriais naturais e artificiais demonstraram fortes propriedades antimicrobianas através de diversos mecanismos. Dentre os mecanismos de ação das nanopartículas de prata (NAg) estão: comprometimento do envólucro da célula bacteriana e interrupção de transdução de energia.

O tratamento 4 (H₂O₂+NAg no escuro) demonstrou capacidade de degradar 38,31 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR em $t \leq 180$ minutos. Fato este que está associado à presença da NAg, pois como se

pode observar na Figura 16, não houve degradação de peróxido de hidrogênio e consequente formação de radicais hidroxila.

O tratamento 6 (UV-C/NAg) demonstrou capacidade de degradar 38,47 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR em $t \leq 120$ minutos.

A reação de degradação da MC-LR demonstrou um decaimento exponencial (Figura 08), desta forma buscou-se uma equação através da ferramenta “exponencial fit” que descrevesse este comportamento.

Na Tabela 03 são apresentados os valores de “k” para cada um dos tratamentos aplicados. Neste estudo, o valor da constante k para o processo UV-C/ H_2O_2 (T2) foi de 0,080 min^{-1} , valor próximo ao encontrado para o processo UV-C/ H_2O_2 com adição de nanopartículas de prata (T3), de 0,086 min^{-1} . Para o tratamento com radiação UV-C (T1) a constante foi igual a 0,063 min^{-1} , demonstrando que o processo com adição de peróxido de hidrogênio e nanopartículas de prata foi ligeiramente mais rápido na degradação de MC-LR do que apenas o processo UV-C/ H_2O_2 , e que ambos foram mais rápidos que apenas a fotólise direta.

Tabela 03. Constante de velocidade de reação da degradação de MC-LR pelos diferentes tratamentos

Processo de tratamento	Constante de velocidade da reação (k) (min^{-1})
T1 (UV-C)	0,063
T2 (UV-C/ H_2O_2)	0,080
T3 (UV-C/ H_2O_2 + NAg)	0,086
T4 (H_2O_2 +NAg)	0,011
T5 (NAg)	0,007
T6 (UV-C + NAg)	0,017

3.5 Diâmetro celular

A análise dos dados dispostos na Figura 09, *Box chart* do diâmetro celular, permite que sejam feitas algumas considerações, de caráter complementar ao presente estudo.

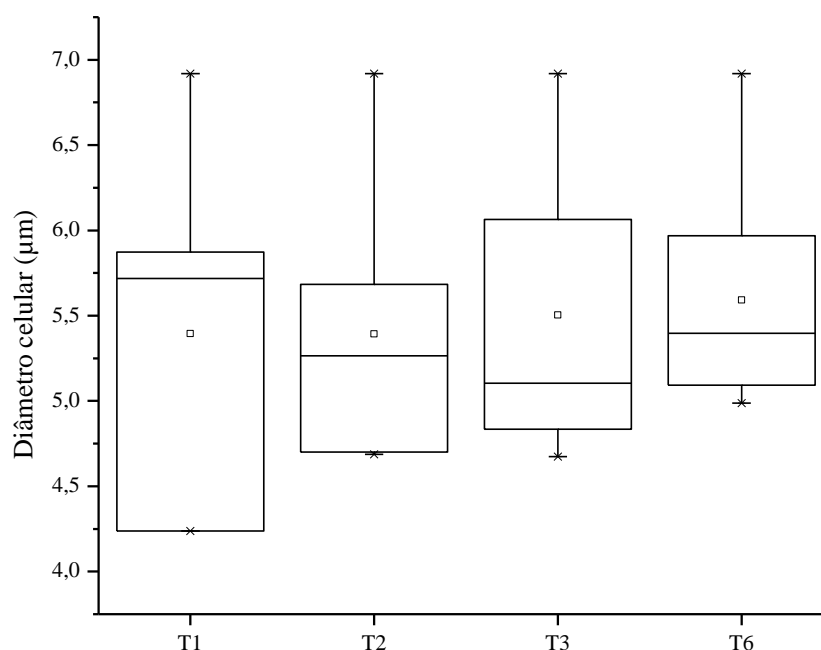


Figura 09. *Box chart* do diâmetro celular dos tratamentos T2 (UV-C/H₂O₂) e T3 (UV-C/H₂O₂ +NAg), e das variáveis isoladas T1 (UV-C) e T6 (UV-C/NAg), considerando a média do diâmetro celular de 5 células em cada tempo de monitoramento (0, 30, 60, 90, 120, 150, e 180 minutos).

O diâmetro médio das células submetidas aos tratamentos analisados foi bem próximo, que esteve em torno de 5,5 µm. Outro valor similar em todos os tratamentos analisados diz respeito ao maior diâmetro celular, em torno de 6,8 µm. Porém, em relação ao diâmetro celular mínimo, houve diferenças significativas. O tratamento 1, fotólise, se destacou por conter 50% do número de células com diâmetros distribuídos entre 4,24 e 5,75µm, além disso, foi o tratamento que apresentou diâmetros celulares menores, em comparação com os demais analisados. A irradiação UV-C interferiu nas atividades intracelulares, de modo a apresentar notável redução do diâmetro celular.

3.6 Varredura Espectral

Os comportamentos espectrais dos tratamentos que apresentaram variação da coloração visivelmente a olho nu foram avaliados durante a execução dos ensaios, como é possível observar na Figura 10.

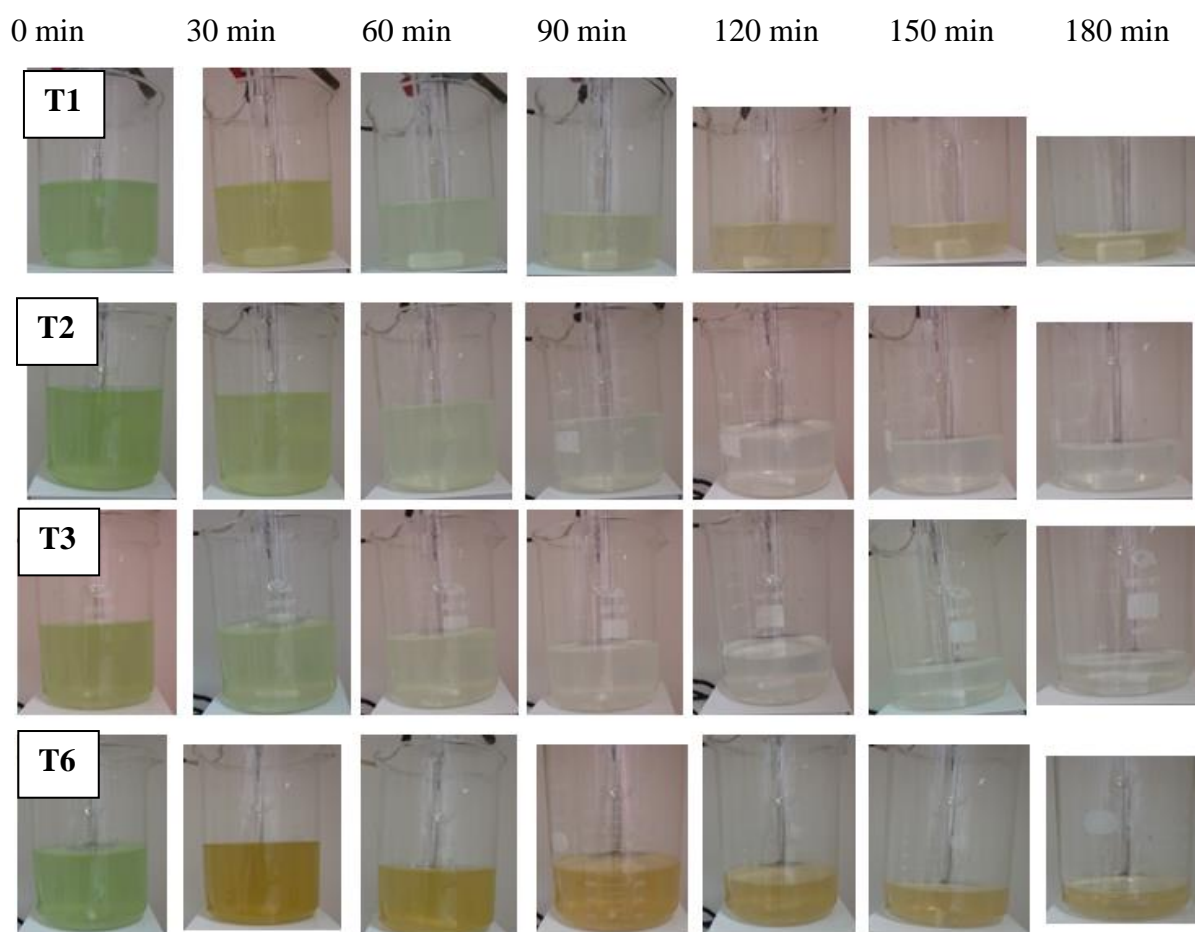


Figura 10. Imagens capturadas durante a execução dos ensaios, nos respectivos tempos de monitoramento. T1: UV-C; T2: UV-C/H₂O₂; T3: UV-C/H₂O₂ +NAg; T6: UV-C/NAg.

Algumas mudanças ocorridas na suspensão celular sob as condições dos diferentes tratamentos, podem ser inferidas a partir de informações presentes na literatura. Weaver e Wrigley (1994) avaliaram informações sobre comunidades e populações de fitoplâncton em ambientes aquáticos, sendo que as características espectrais de vários tipos de fitoplâncton foram comparadas para determinar as diferenças características na pigmentação entre os grupos, bem como os pigmentos típicos de cada um (Tabela 03).

Tabela 03. Comprimento de onda de absorção dos pigmentos de plânctons

Comprimento de onda (nm)	Pigmento	Tipo de Plâncton
438	Clorofila a	Todos os tipos
470	Hexa –fcoxantina	Cianobactéria
480	Bcaroteno	Dinoflagelados, diatomáceas, crisófitas
493	Ficorobilina	Cianobactérias
493	Ficoeritrina	Cianobactéria
562	C-ficoeritrina	Cianobactérias
567	Ficorobilina	Cianobactérias
615	C-ficocianina	Cianobactéria
624	Cp –cianina	Cianobactérias
627	Ficorobilina	Cianobactérias
650	Aloficocianina	Cianobactérias
673	Clorofila a	Cianobactérias e eucariontes
676	Clorofila a	Cianobactérias e eucariontes
680	Clorofila a	Cianobactérias e eucariontes

Fonte: Weaver and Wrigley, 1994.

A partir do trabalho de Weaver e Wrigley (1994) buscou-se entender e estabelecer um paralelo com os principais pigmentos encontrados neste estudo, os quais serão explicados brevemente.

O fitoplâncton deriva sua cor das proporções relativas de vários pigmentos, que se dividem em três classes: as clorofilas e os carotenóides que são ambos lipídios, e as ficobilinas, que são solúveis em água. Os espectros de absorção têm sido o modo preferido de visualizar as propriedades dos pigmentos. O pico alfa da clorofila *a*, em aproximadamente 680 nm é proeminente em todos os organismos fotossintéticos que evoluem com o oxigênio (WEAVER; WRIGLEY, 1994).

Os pigmentos lipídicos se dividem em duas classes principais: as clorofilas (*a*, *b*, *cl*, *c2*, *c3*) que são os tetrapirrois e seus produtos de degradação; e os carotenóides, caroteno e um grande número de derivados de caroteno oxidados, chamados coletivamente de xantofilas. As clorofilas funcionam como coletores de luz e passam a excitação de luz para centros de reação que consistem em clorofila-*a* em um ambiente especializado. As clorofilas *b*, *cl*, *c2* e *c3* são pigmentos acessórios que funcionam apenas como coletores de luz, sendo que, o único conversor de energia é clorofila-*a* (WEAVER; WRIGLEY, 1994).

Segundo os mesmos autores, os carotenóides podem funcionar como coletores de luz ou como agentes fotoprotetores. Todos os carotenóides absorvem fortemente na extremidade azul do espectro e se sobrepõem em grande parte. Já as biliproteínas (ou ficobilinas) constituem uma terceira classe de pigmentos que funcionam como pigmentos acessórios das cianobactérias e algas vermelhas, sendo estes pigmentos altamente fluorescentes.

As cianobactérias têm vantagem sobre os demais grupos do fitoplâncton quando o assunto é luz, por possuírem além de clorofila-*a* outros pigmentos fotossintéticos denominados genericamente de ficobilinas (ficoeritina, ficocianina e aloficocianina). Esses pigmentos captam a energia luminosa em regiões do espectro luminoso não absorvido pelas clorofilas, fazendo com que a transmissão de energia luminosa tenha eficiência próxima a 100% (GROSSMAN, 2003).

Lewis et al, (1998) relatam as propriedades de ação fotossintética, absorção e rendimento quântico das cianobactérias. Embora o espectro de absorção seja geralmente característico, existe um pico proeminente a 493 nm, característico da ficorobilina, juntamente com picos menores a 627 e 567 nm.

A Figura 11 ilustra o comportamento da suspensão celular presente na água de estudo, submetida a radiação UV-C. Observa-se que há uma diminuição das absorbâncias relativas aos principais pigmentos de cianobactérias, indicados na figura. A grande diminuição da clorofila-*a*, bastante expressiva nos primeiros 30 minutos de reação, pode ser facilmente relacionada ao observado na Figura 09, onde é visível a perda da coloração verde.

Segundo Seppälä *et al.* (2007) o principal complexo de pigmentos absorvedores de energia em cianobactérias, são as ficobilissomas, que por serem hidrofílicos, se localizam periféricamente nas membranas dos tilacóides. Estes pigmentos estão associados aos centros de reação do fotossistema II e concentram as ficobiliproteínas: ficocianinas (absorbância máxima em 615nm); aloficocianina (absorção em 650nm) e ficoeritrinas (absorção máxima em 575 nm). A clorofila-*a* (bandas de absorção em 440 e 675nm) está localizada principalmente (80 - 90%) na membrana do tilacóide e associada ao fotossistema I. Os fotossistemas I e II estão interligados por uma complexa cadeia de elétrons excitados, responsável pela síntese de ATP (Adenosina Trifosfato) e redução química de moléculas essenciais ao metabolismo celular.

Já nos comprimentos de onda mais baixos (190 a 400 nm), houve um aumento significativo das absorbâncias e conseqüentemente formação de picos proeminentes.

A maioria das proteínas absorve radiação a 280 nm. Segundo Berova *et al.* (1981), as estruturas de hélice apresentam uma banda positiva intensa a cerca de 192 nm e duas bandas negativas a cerca de 208 e 222 nm. Este fato também foi observado por Básaca-Loya (2009) através da análise do dicroísmo circular (fenômeno utilizado no estudo da estrutura secundária de proteínas), que mostrou uma banda positiva intensa a cerca de 195 nm que diminuiu quando a proteína estava sob condições ácidas. As bandas negativas a 210 e 222 nm estiveram

presentes na fração a pH 7 mas a intensidade das bandas diminuiu a pH 2 devido a uma perda de estrutura secundária.

De encontro aos resultados encontrados no presente trabalho (grande absorção de irradiação a 280 nm), Alomar *et al.* (2009) a partir da avaliação dos teores protéicos das cianobactérias, indicaram que estas podem ser uma fonte potencial de proteínas devido aos altos teores apresentados, geralmente entre 40 e 60% em peso seco, que associado ao balanço de aminoácidos, indica o alto valor biológico destas proteínas, que em muitos casos é comparável e até mesmo superior a fontes protéicas convencionais como a carne, ovos.

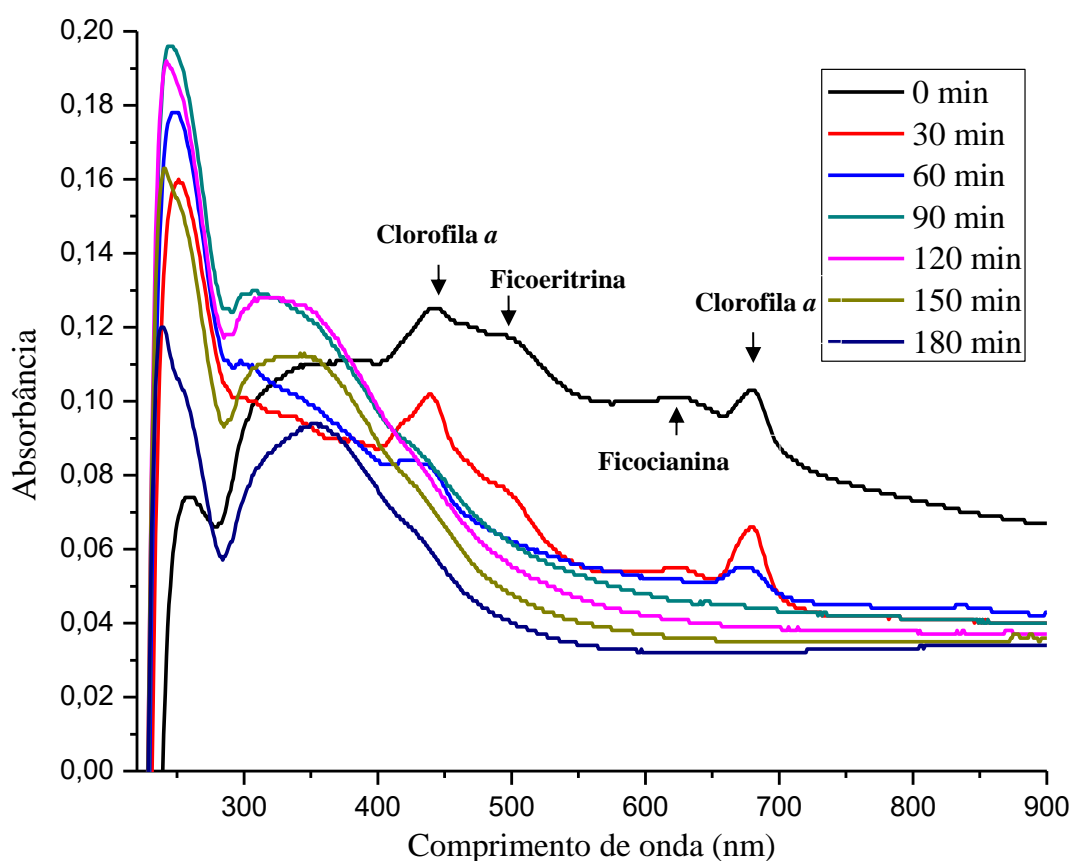


Figura 11. Varredura espectral de 200 a 900 nm do tratamento T1 (UV-C) em cada tempo de monitoramento (0, 30, 60, 90, 120, 150, e 180 minutos).

Na Figura 12, é possível observar o comportamento da suspensão celular presente na água de estudo, submetida a processo UV-C/H₂O₂. Observa-se que há uma diminuição das absorbâncias relativas aos principais pigmentos de cianobactérias, indicados na figura. A grande diminuição da clorofila-*a*, bastante expressiva nos primeiros 30 minutos de reação, pode ser facilmente relacionada à Figura 09, onde é visível a perda da coloração verde. Porém

em 60 minutos de reação, o pico de clorofila *a* permanece próximo ao de 30 minutos, e em 90 minutos há um aparente deslocamento do mesmo para a direita. A análise deste tempo de reação nos comprimentos de onda mais baixos (190 a 300 nm) demonstrou um pico proeminente com relação aos demais tempos.

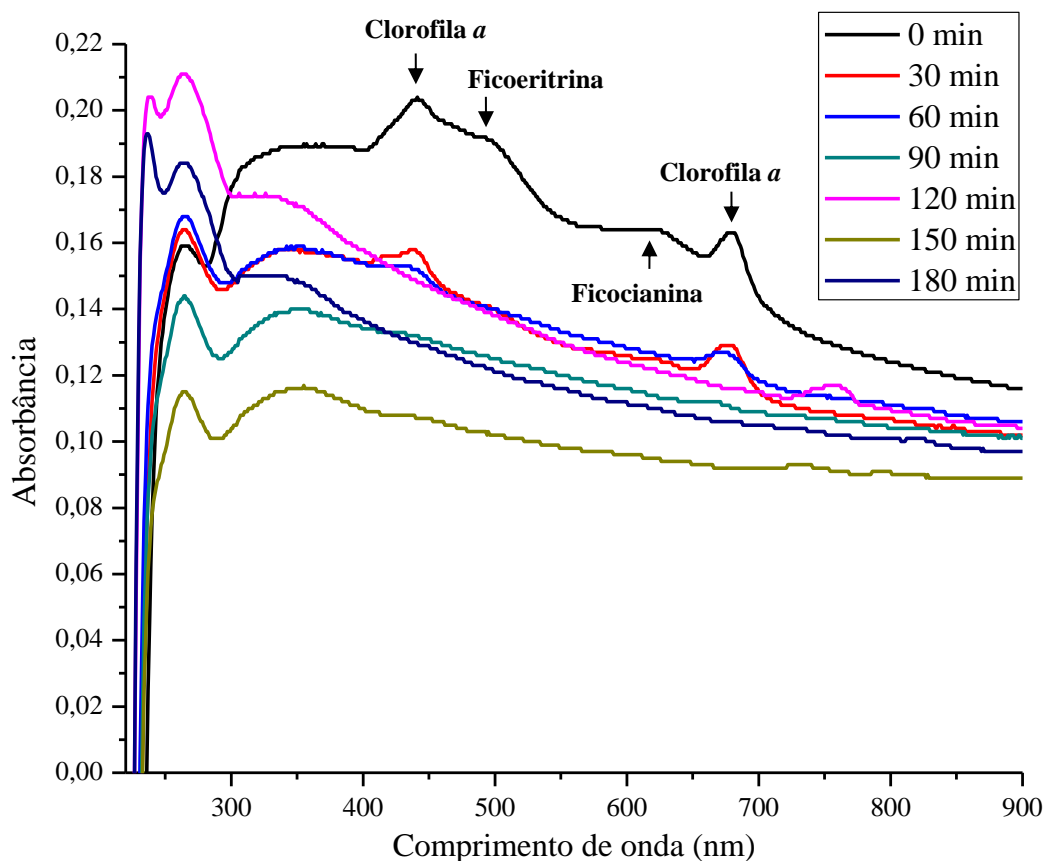


Figura 12. Varredura espectral de 200 a 900 nm dos tratamentos T2 (UV-C/H₂O₂) em cada tempo de monitoramento (0, 30, 60, 90, 120, 150, e 180 minutos).

Assim como nos demais casos, neste tratamento (UV-C/H₂O₂+NAg), também ocorreu uma diminuição das absorbâncias relativas aos principais pigmentos de cianobactérias (Figura 13). A diminuição da clorofila-*a* foi expressiva nos primeiros 30 minutos de reação, o que explica a visível perda da coloração verde (Figura 09). A análise dos tempos de monitoramento de reação nos comprimentos de onda mais baixos (190 a 300 nm), demonstrou a presença de picos proeminentes de 30 a 120 minutos de reação, quando comparados às absorbâncias da amostra inicial (0 minutos), após este tempo as absorbâncias permaneceram inferiores a inicial.

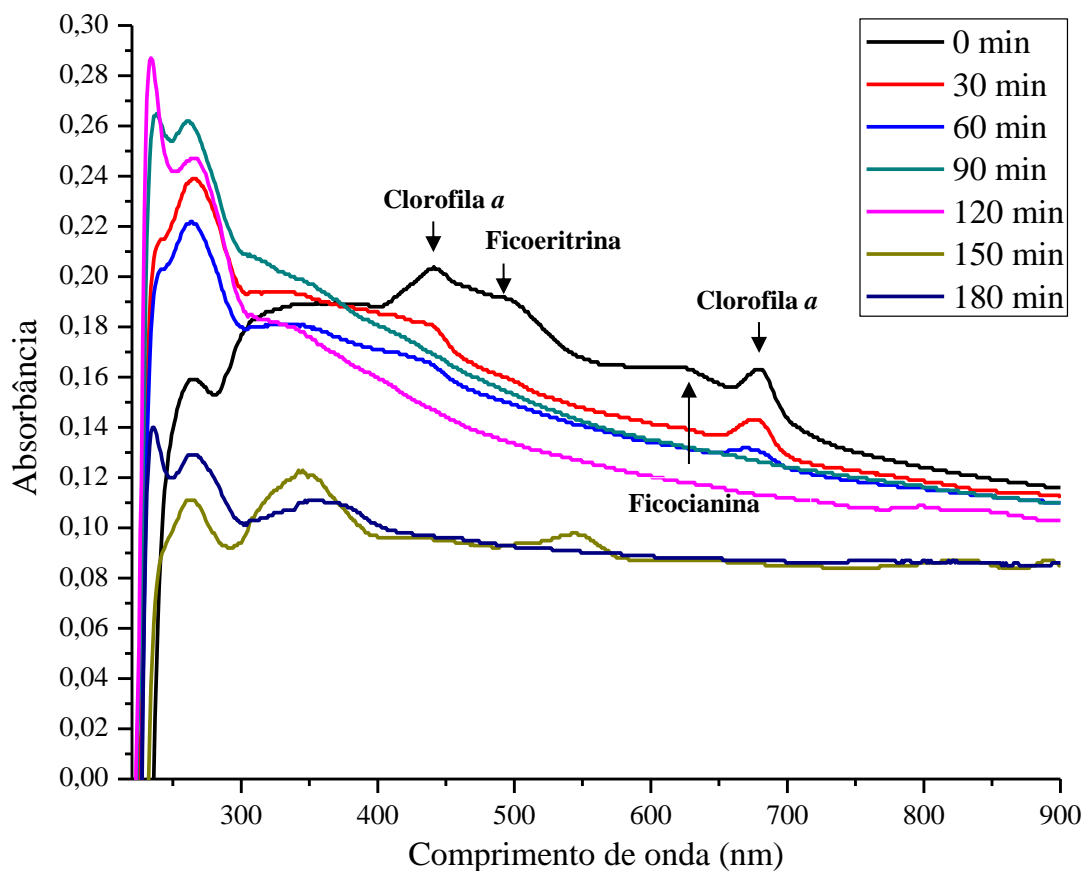


Figura 13. Varredura espectral de 200 a 900 nm do tratamento T3 (UV-C/H₂O₂+NAg) em cada tempo de monitoramento (0, 30, 60, 90, 120, 150, e 180 minutos).

A Figura 14, ilustra o comportamento da suspensão celular presente na água de estudo, submetida a processo UV-C/NAg. Observa-se que há uma diminuição das absorbâncias relativas aos principais pigmentos de cianobactérias, indicados na figura, porém, a diminuição da clorofila *a* (675 nm), foi muito menos expressiva que nos ensaios anteriores, o que pode ser observado na Figura 09. Quando comparado aos tratamentos anteriores, a variação da coloração é bastante inferior.

Outro fato a ser destacado é a formação de um pico proeminente entre 350 e 500 nm, nas primeiras horas do ensaio ($t \leq 120$ min), diferentemente dos demais tratamentos. Nos comprimentos de onda mais baixos (190 a 300 nm), também houve o aumento da absorbância, porém inferiores aos casos acima relatados. Como pode-se observar, a presença da prata aumentou a absorbância nas bandas espectrais de 350-500 nm. Machado (2012) estudou a sintetização de nanopartículas de prata em fase aquosa por redução química a 600

RPM. O espectro de UV-Vis da reação (Figura 14) forneceu uma banda com comprimento de onda médio em 429,42 nm e comprimento de onda máximo em 404,04 nm.

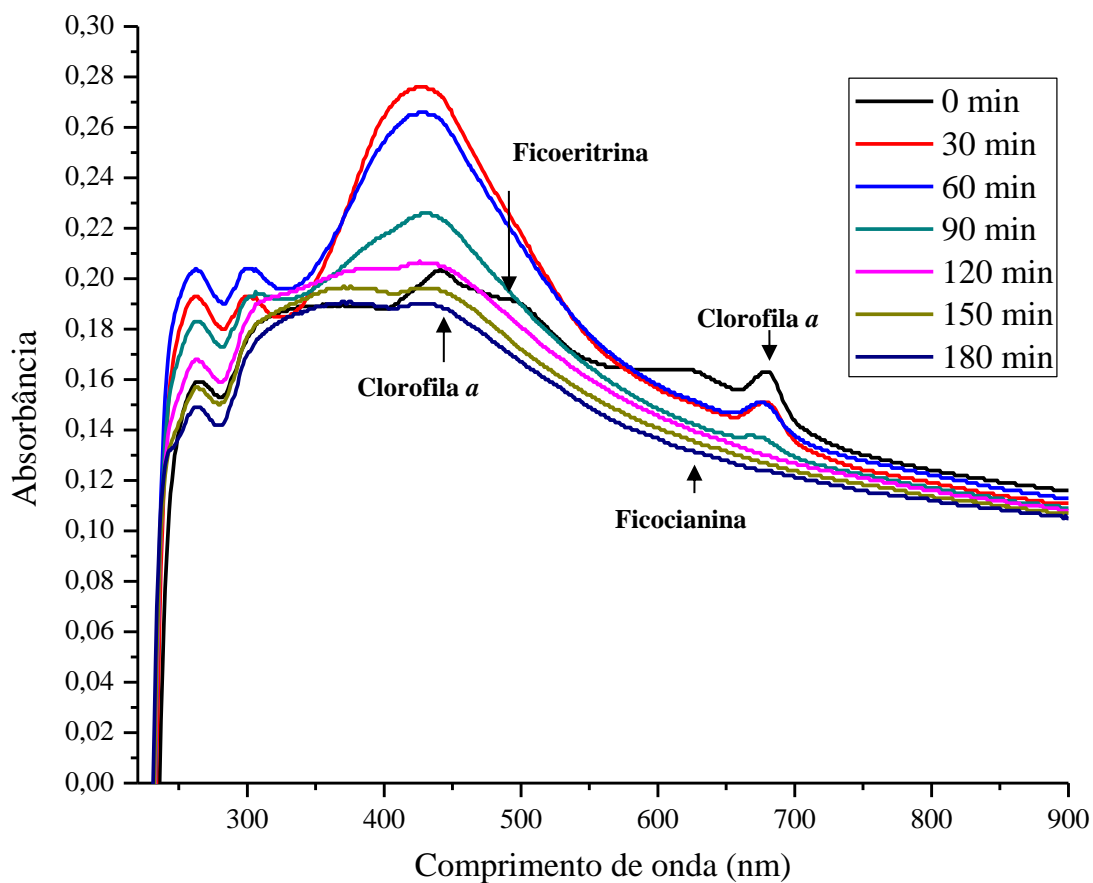


Figura 14. Varredura espectral de 200 a 900 nm do tratamento T6 (UV-C/NAg) em cada tempo de monitoramento (0, 30, 60, 90, 120, 150, e 180 minutos).

O comportamento espectral nas NAg observado por Machado (2012) (Figura 15), é similar ao observado no presente estudo, podendo-se inferir desta forma que o pico proeminente formado entre 350-500 nm se refere as NAg, e que com o decorrer da reação as absorvâncias nestes comprimentos de onda são modificados.

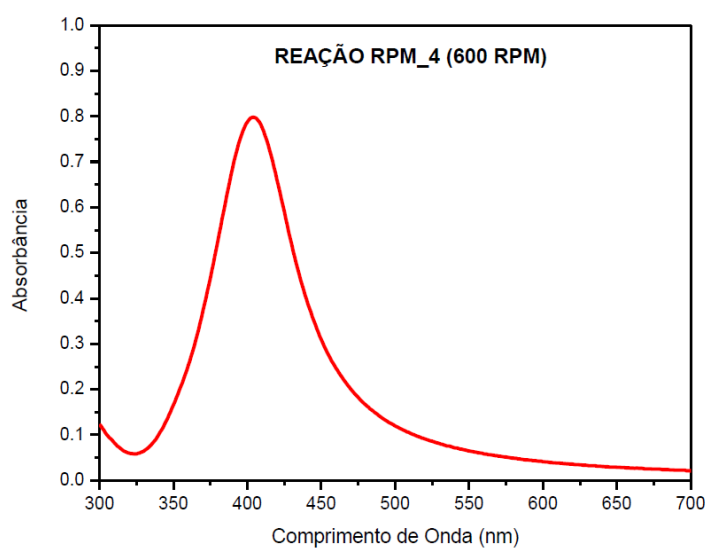


Figura 15. Espectro de UV-Vis da reação de sintetização de nanopartículas de prata, conduzida com 600 RPM.

Fonte: Machado, 2012.

3.7 Peróxido de Hidrogênio Residual

O processo avançado de oxidação que associa radiação UV-C e peróxido de hidrogênio é baseado na clivagem da molécula de H_2O_2 em radicais hidroxila (OH), que tem a propriedade de ser altamente reativos com os mais variados compostos. As análises de peróxido de hidrogênio residual permitem inferir cronologicamente a formação de radicais hidroxila e sua associação e conseqüente destruição da molécula de interesse, neste caso a MC-LR. Os resultados dos tratamentos com adição de H_2O_2 estão dispostos na tabela abaixo.

Tabela 04. Peróxido de Hidrogênio Residual ($mg.L^{-1}$) dos tratamentos T2, T3 e T4 em cada tempo de monitoramento

Tempo (min)	T2: UV-C/ H_2O_2			T3: UV-C/ H_2O_2 + NAg			T4: H_2O_2 + NAg	
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 1	Replica 2
0	60	137	97	117	105	126	162	107
30	45	122	86	104	93	120	159	107
60	38	108	79	88	80	110	159	107
90	26	87	76	84	67	98	159	107
120	17	75	71	60	60	80	159	107
150	8	73	61	58	48	75	159	107
180	3	49	53	42	32	66	159	107

Monitorou-se o consumo do H_2O_2 de 30 em 30 minutos. Durante a dosagem do mesmo a partir da solução mãe, notou-se uma dificuldade em obter-se a concentração desejada, desta forma houve uma variação nas concentrações iniciais, mesmo assim optou-se por manter os ensaios, visto que seriam realizadas réplicas. Para facilitar a interpretação dos resultados realizaram-se estudos cinéticos, onde encontrou-se a constante k de decaimento das concentrações de H_2O_2 .

Na Figura 16, está expressa a progressão do consumo de H_2O_2 no tempo determinado em relação ao tempo inicial. Foi possível observar que os tratamentos 2 e 3, apresentaram resultados similares. Observou-se que a razão entre a concentração final e a concentração inicial foi influenciada pela dosagem inicial. No T2 - réplica 1, por exemplo, a concentração inicial era de 60 mg.L^{-1} (inferior às demais) o que propiciou que a concentração de H_2O_2 se aproximasse de 0 mais rapidamente. O objetivo era que a concentração inicial estivesse próxima a 100 mg.L^{-1} de H_2O_2 , pois como já justificado na metodologia deste trabalho, esta é a concentração inicial usual do composto utilizado domesticamente. Porém, analisando os resultados de MC-LR paralelamente, para cada uma das réplicas, em 30 minutos, o T2 - réplica 1, reduziu 85% da MC-LR inicial, enquanto que o T2 - réplica 2, reduziu 95% da MC-LR inicial, e o T2 - réplica 3, reduziu 88% da MC-LR inicial.

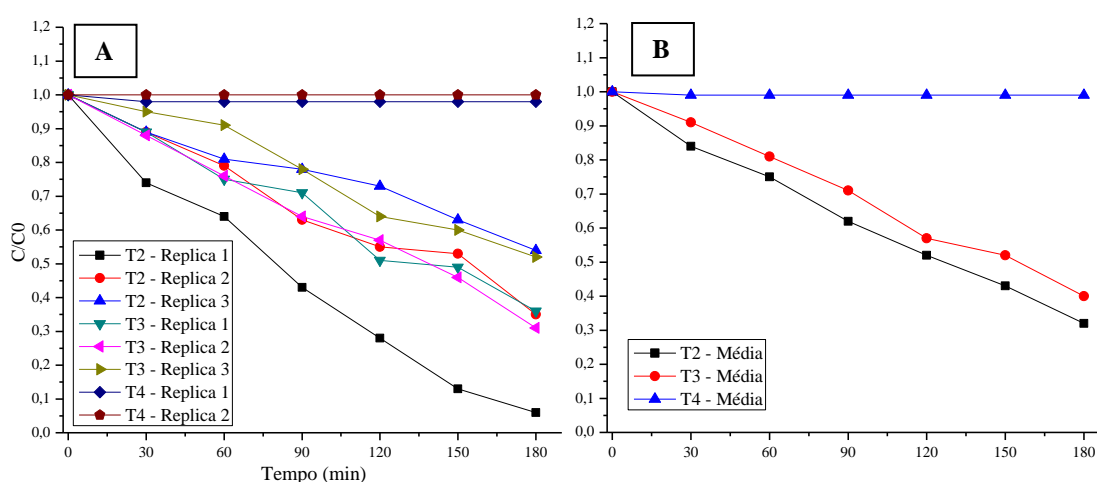


Figura 16. Razão entre as concentrações final e inicial (C/C_0) do peróxido de hidrogênio residual dos tratamentos T2 (UV-C/ H_2O_2), T3 (UV-C/ H_2O_2 +NAg) e T4 (H_2O_2 +NAg) nos diversos intervalos de monitoramento. Em (A) todas as réplicas, em (B) a média das réplicas.

No tratamento 4, conduzido no escuro, não houve degradação de H_2O_2 , entretanto, os resultados da densidade celular imediata (Figura 07) demonstraram decréscimo da contagem

celular de 38% nos 30 primeiros minutos, chegando a redução de 55% no tempo final. Fato este que pode estar associado à transparência das células, causada por alterações nos fotossistemas celulares. Outro fato a ser considerado, é que o presente tratamento foi capaz de degradar $38,31\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR em $t \leq 180$ minutos, e de inviabilizar as células já nos primeiros minutos.

Análises cinéticas foram realizadas com o intuito de comparar a velocidade da reação de consumo de peróxido de hidrogênio. Como visto, o decaimento das concentrações do reagente apresentou um comportamento linear (Figura 16), desta forma utilizou-se a ferramenta "linear fit" do OriginPro 9.0, para encontrar a constante de decaimento da concentração.

Na Tabela 05 são apresentados os valores de k para cada um dos processos aplicados. Neste estudo, a média do valor da constante k para o processo UV/H₂O₂ foi de $0,34 \text{ min}^{-1}$. Para o tratamento UV/H₂O₂ (T2) com adição de NAg, a média das constantes foi igual a $0,39 \text{ min}^{-1}$, demonstrando que o processo com adição de nanopartículas de prata (T3) foi ligeiramente mais rápido no consumo de H₂O₂, apesar do T2 ter apresentado k máximo ($0,47 \text{ min}^{-1}$).

Tabela 05. Constante de velocidade de reação do consumo de H₂O₂ pelos diferentes tratamentos

Processo de tratamento		Constante de velocidade da reação (k) (min ⁻¹)
T2 (UV-C/H ₂ O ₂)	Repetição 1	0,31
	Repetição 2	0,47
	Repetição 3	0,23
T3 (UV-C/ H ₂ O ₂ + NAg)	Repetição 1	0,41
	Repetição 2	0,39
	Repetição 3	0,36
T4 (H ₂ O ₂ +NAg)	Repetição 1	0,01
	Repetição 2	0,00

4 CONSIDERAÇÕES DO CAPÍTULO

Os processos avançados de oxidação avaliados no presente estudo, fotólise (UV-C) e UV-C/H₂O₂, apresentaram resultados satisfatórios para degradação e inviabilização celular da cepa de estudo. Os métodos empregados também foram efetivos na degradação de MC-LR,

sob as condições de estudo (densidade celular inicial $\geq 1 \times 10^6$ cél.mL⁻¹, MC-LR entre 146 e 192 µg.L⁻¹).

A adição de nanopartículas de prata – NAg acarretou sensível aumento da velocidade do consumo do peróxido de hidrogênio, e por conseguinte da degradação da MC-LR. Porém não aumento da eficiência ao processo UV-C/H₂O₂, quando avaliados o decaimento da densidade celular imediata e inviabilização celular ao longo do tempo. No entanto, a análise do efeito das variáveis isoladas, demonstrou que somente as NAg (na ausência de radiação) exercem efeito bactericida, pois inviabilizaram totalmente as células em 150 minutos. Adicionalmente, foi capaz de degradar 38,91 µg.L⁻¹ de MC-LR em $t \leq 180$ min.

De modo geral, o presente estudo demonstrou que os processos UV-C e UV-C/H₂O₂ possuem grande potencial para inativação de cianobactérias e degradação de MC-LR. Contudo, estudos em maior escala se fazem necessários, a fim de avaliar a aplicabilidade em estações de tratamentos reais. Além disso, a otimização dos processos, avaliando diferentes intensidades de radiação e concentrações de H₂O₂ podem ajudar a melhorar as condições de aplicação, tornando estes tratamentos mais atrativos e viáveis economicamente.

5 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE JUNIOR, E. C. **Produção e Caracterização de Carvão Ativado Para Remoção de Microcistinas**. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2006.

BACCAN, N. *et al.* **Química analítica quantitativa elementar**. Edgard Blucher, 1979.

BANSAL, A. *et al.* Effect of silver on the photocatalytic degradation of humic acid. **Catalysis Today**, v. 131, n. 1, p. 250-254, 2008.

CHEN, X., SCHLUESENER, H. J. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. In: **Toxicology Letters**, v. 176, n. 1, p. 1-12, 2008.

CHENG, X. *et al.* Effects of oxidative and physical treatments on inactivation of *Cylindrospermopsis raciborskii* and removal of cylindrospermopsin. **Water Science & Technology**, v. 60, n. 3, 2009.

CHOW, C.W.K. *et al.* The Impact of Conventional Water Treatment Processes on Cells of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Wat.Res.** v. 33, p. 3253-3262, 1998.

FENG, Q.L., WU, J., CHEN, G.Q., CUI, F.Z., KIM, T.N., KIM, J.O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **J. Biomed. Mat. Res.** 2000. 52 (4), 662–668.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. São Paulo, v. 5, p. 61, 2002.

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.

HE, X. *et al.* Destruction of microcystins (cyanotoxins) by UV-254 nm-based direct photolysis and advanced oxidation processes (AOPs): Influence of variable amino acids on the degradation kinetics and reaction mechanisms. **Water research**, v. 74, p. 227-238, 2015.

HUO, X. *et al.* Exposure of *Microcystis aeruginosa* to Hydrogen Peroxide under Light: Kinetic Modeling of Cell Rupture and Simultaneous Microcystin Degradation. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 9, p. 5502-5510, 2015.

KIM, J.Y., LEE, C., CHO, M., YOON, J. Enhanced inactivation of *E. coli* and MS-2 phage by silver ions combined with UV-A and visible light irradiation. **Water Res.** 42 (1–2), 356–362, 2008.

KURODA, E. K. **Remoção de células e subprodutos de *Microcystis spp.* por dupla filtração, oxidação e adsorção**. 2006. 276 f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

LI, Q. *et al.* Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. **Water research**, v. 42, n. 18, p. 4591-4602, 2008.

MACHADO, F. M. *et al.* **Avaliação do uso de nanopartículas de prata e atividade antimicrobiana para tratamento de águas**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal De Santa Catarina - UFSC, 2012.

QIAO, R. P.; LI, N.; QI, X. H.; WANG, QI-S.; ZHUANG, Y.-Y. Degradation of microcystin - RR by UV radiation in the presence of hydrogen peroxide. **Toxicon**, v.45, p.745-752, 2005.

SAKAI, Hiroshi *et al.* Effects of low-or medium-pressure ultraviolet lamp irradiation on *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena variabilis*. **Water research**, v. 41, n. 1, p. 11-18, 2007.

SCHICK, R.; STRASSER, I.; HANS-HENNING, S. Fluorometric Determination of Low Concentrations of H₂O₂ in Water: Comparison with Two Other Methods and Application to Environmental Samples and Drinking-Water Treatment. **Water Research**. V. 31, p. 1371-1378, 1997.

ZARPELON, F. **Preparação, caracterização e aplicação de filmes finos de PAH/PAA com nanopartículas de prata no tratamento microbiológico de efluentes industriais para reúso**. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais - Universidade De Caxias Do Sul, 2013.

DEKKER, A.G. **Detection of Optical Water Quality Parameters for Eutrophic Waters by High Resolution Remote Sensing**. University of Amsterdam. 1993.

WEAVER, E. C.; WRIGLEY, R. **Factors Affecting the Identification of Phytoplankton Groups by Means of Remote Sensing**. NASA Technical Memorandum 108799. 1994

LEWIS, M. R.; ULLOA, O.; PLATT, R. Photosynthetic action, absorption, and quantum yield spectra fora natural population of *Oscillatoria* in the North Atlantic. **Limnol. Oceanogr.**, 1988.33: p. 92-98.

SEPPÄLÄ, J. *et al.* Ship-of-opportunity based phycocyanin fluorescence monitoring of the filamentous cyanobacteria bloom dynamics in the Baltic Sea. **Estuarine, Coastal and Shelf Science** 73, 489 - 500,2007.

BÁSACA-LOYA, G. A. *et al.* Extracción y purificación de B-ficoeritrina de la microalga roja *Rhodorus marinus*. **Ciencias marinas**, v. 35, n. 4, p. 359-368, 2009.

BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY, R.W. (editors). **Circular Dichroism, Principles and Applications**. 2 ed. Wiley-VCH: New York, 1981.

ALOMAR, D.; FUCHSLOCHER, R.; STOCKBRAND, S. Effects of oven or freeze-drying on chemical composition and NIR spectra of pasture silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 80, p. 309-319, 1999.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; GRANT, M. A.; BURKHARDT, W. BAM: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. In: **Bacteriological Analytical Manual**, cap. 4, 2001.

GROSSMAN, A. R. A molecular understanding of complementary chromatic adaptation. **Photosynthesis Research**. 2003, n. 1-3. 76: 207-215.

Capítulo III - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA APÓS DEGRADAÇÃO DE *Microcystis aeruginosa* e MC-LR A PARTIR DE TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM *Daphnia magna*

Resumo: A ocorrência cada vez mais comum de florações de cianobactérias toxigênicas em reservatórios de captação de água para abastecimento, torna essencial a realização de pesquisas em torno da eficiência do método de tratamento empregado, além de especial atenção à qualidade da água pós-tratamento. Com essa finalidade, métodos de avaliação da ecotoxicidade da água têm sido empregados. O teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo plântônico da espécie *Daphnia magna*, tem sido reportado como bom indicador. No presente trabalho, os organismos teste submetidos aos ensaios apresentaram diferentes graus de toxicidade, quando avaliado o grau de mobilidade dos organismos. A amostra inicial em T0 (MC-LR=146,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$) não apresentou toxicidade aguda para *D. magna*. Com base no fator de diluição – FTd (a menor diluição em que a amostra não apresenta toxicidade) os tratamentos que obtiveram menor FTd foram o T2 (UV-C/H₂O₂) e o T3 (UV-C/H₂O₂ +NAg), com FTd de 2, e porcentagem de imobilidade dos organismos de 70% e 50%, respectivamente. A toxicidade da água de estudo após o tratamento foi intensificada no T1 (UV-C), onde obteve-se FTd de 8, e porcentagem de imobilidade dos organismos de 30% na amostra sem diluição, 26,6% de imobilidade na amostra diluída na proporção 1:2, e 16,7% de imobilidade na diluição 1:4. No último caso analisado, o tratamento T6 (UV-C/NAg) demonstrou alto grau de toxicidade, causando a imobilidade de 100% dos organismos-teste em todas as diluições analisadas (até a diluição de 16 vezes).

Palavras-chaves: Ecotoxicidade. Processos Avançados de Oxidação. Desinfecção da Água. Nanopartículas de Prata.

1 INTRODUÇÃO

O tipo mais comum de intoxicação envolvendo cianobactérias é ocasionado por hepatotoxinas, podendo causar morte num intervalo de poucas horas a poucos dias. As espécies já identificadas como produtoras dessas hepatotoxinas estão incluídas nos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc* e *Cylindrospermopsis* (CARMICHAEL, 1994).

A ocorrência de cianobactérias, inclusive de *Microcystis aeruginosa*, tem sido dominante em períodos de florações do fitoplâncton no Brasil, seja em ambientes de reservatórios, lagoas costeiras, lagos de inundação ou outros lagos naturais (HUSZAR; SILVA, 1999). As microcistinas (MCs) são o grupo de hepatotoxinas mais frequentemente

relacionada a casos de intoxicação. Segundo Harada *et al.* (1988) podem ocorrer várias mudanças na molécula que modificam seu grau de toxicidade.

Cerca de 80 variantes de MC foram identificadas, destas, seis ocorrem com mais frequência: MC-LR, MC-LA, MC-YR, MC-RR, MC-LF e MC-LW. Estudos indicaram que a MC-LR é a mais abundante, compreendendo de 46,0 a 99,8% da concentração total de MCs em florações naturais (VASCONCELOS *et al.*, 1996), e mais tóxica, quando comparada as demais variantes.

Nas últimas décadas, os processos avançados de oxidação (do inglês *advanced oxidation processes* - AOPs) têm sido desenvolvidos e aplicados para o tratamento de poluentes recalcitrantes e emergentes (RODRÍGUEZ *et al.*, 2007). Em comparação com outros AOPs, como Fenton, ozônio, UV/O₃, UV/TiO₂, etc, o processo combinado UV/H₂O₂ pode ser mais prático devido a que envolve a dissociação de etapa única de peróxido de hidrogênio para formar dois radicais hidroxilas (OH), os quais podem oxidar uma grande variedade de poluentes orgânicos recalcitrantes na água. Durante as últimas décadas, pesquisadores têm relatado aplicações bem sucedidas na combinação do sistema UV/H₂O₂ para corantes e intermediários farmacêuticos ou tratamentos químicos tóxicos (SHU; CHANG; FAN, 2004).

Apesar de sua comprovada eficiência na destruição de determinados poluentes, os AOPs vêm sendo questionados com relação à qualidade do efluente final ou da água tratada, devido à formação de subprodutos, podendo gerar produtos de decomposição mais tóxicos do que a molécula de estudo.

Além disso, a preocupação com relação à toxicidade e ecotoxicidade de nanopartículas se devem principalmente, ao fato de que os nanomateriais nunca foram produzidos e utilizados em produtos comerciais em tão larga escala como atualmente. Os nanomateriais com maior produção mundial são o TiO₂, os nanotubos de carbono e a nanop prata (MUELLER; NOWACK, 2008), sendo que a fabricação de produtos contendo nanop prata foi a que mais aumentou em relação aos principais nanomateriais produzidos (MARCONE, 2011).

Em decorrência do tamanho as propriedades ópticas, elétricas, de transporte, magnéticas, catalíticas e mecânicas, os nanomateriais apresentam grandes vantagens quando comparadas ao material sólido massivo. Desta forma, estão sendo aplicados em vários setores, como o de energia, iluminação, automobilístico, de embalagens, cosméticos, tecidos, fármacos e esportivos, por viabilizarem produtos finais mais leves, eficientes e principalmente de baixo custo (ZARBIN, 2007). Contudo, as mesmas propriedades que tornam os

nanomateriais tão atrativos podem também ser responsáveis por efeitos nocivos aos organismos vivos (MOORE, 2006).

Neste contexto, o presente estudo avaliou a qualidade da água após ser submetida a tratamentos (UV-C, UV-C/H₂O₂, UV-C/H₂O₂+NAg e UV-C/NAg) para degradação de *Microcystis aeruginosa* e MC-LR, a partir de testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna*.

2 METODOLOGIA

2.1 Cultivo de *Daphnia magna*

Daphnia magna Straus, 1820 (Crustacea, Cladocera), é um microcrustáceo planctônico, de 5 mm a 6 mm de comprimento, que atua como consumidor primário na cadeia alimentar aquática e se alimenta por filtração de material orgânico particulado em suspensão. Os organismos deste gênero são vulgarmente conhecidos como pulga d'água e tem larga distribuição no hemisfério norte (BRASIL, 2016).

As águas de cultivo e de diluição foram preparadas a partir das soluções e critérios estabelecidos na norma brasileira ABNT NBR 12713/2016, com dureza total mg CaCO₃/L entre 115 a 225, e pH entre 7,6 e 8,0.

Os organismos foram mantidos em lotes de até 25 adultos por litro, com luminosidade difusa, fotoperíodo de 16 h de luz e temperatura de 18°C a 22°C, sendo a água de cultivo renovada no mínimo uma vez por semana.

Para a alimentação de *D. magna*, foram cultivadas algas verdes unicelulares da espécie *Scenedesmus subspicatus* cultivadas a partir das soluções e critérios estabelecidos na norma brasileira ABNT NBR 12713/2016.

Mensalmente, a sensibilidade do organismo-teste foi avaliada por meio de ensaio com dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇), e calculados os valores médios, o desvio-padrão e coeficiente de variação, com auxílio de carta controle. Considerou-se o lote aceitável para uso quando a porcentagem de imobilidade foi inferior ou igual a 10 % em 48 h de exposição.

2.2 Método de ensaio

Todos os passos metodológicos aqui apresentados foram seguidos conforme a norma brasileira ABNT NBR 12713/2016.

Para execução dos ensaios de toxicidade aguda, utilizaram-se organismos jovens do gênero *Daphnia magna*, entre 2 h e 26 h de idade, obtidos a partir de fêmea com idade entre 10 dias e 60 dias. A vidraria utilizada nos ensaios, no cultivo dos organismos e para as amostras foi lavada com solução de ácido clorídrico 10 %, água corrente, água processada em osmose reversa e água ultrapura.

Entende-se por toxicidade aguda o efeito deletério causado pela amostra na mobilidade dos organismos-teste, em um período de 48 h de exposição. O método de ensaio consiste na exposição de organismos jovens da espécie *Daphnia magna* a várias diluições da amostra, por um período de 48 h.

Os organismos foram transferidos para as soluções-teste de forma aleatória evitando a alteração da concentração final delas, liberando-se o organismo próximo da superfície da solução, para evitar a entrada de ar sob sua carapaça e sua consequente flutuação. O ensaio foi mantido entre 18°C e 22°C por 48 h, em ambiente escuro ou com fotoperíodo de 12 h a 16 h de luz difusa, sem alimentação dos organismos, e os recipientes-teste cobertos.

Após 48 h, observou-se e registrou-se o número de organismos móveis. Logo após, efetuou-se a leitura do oxigênio dissolvido e do pH, pelo menos na solução-teste mais diluída onde observou-se imobilidade superior a 10 dos organismos, para determinação do fator de toxicidade e determinação qualitativa; o maior percentual de imobilidade, para determinação da concentração efetiva inicial mediana (CE(1)50: concentração nominal da amostra no início do ensaio, que causa efeito agudo a 50 % dos organismos no tempo de exposição, nas condições de ensaio).

O fator de toxicidade foi determinado através da observação direta da mobilidade dos organismos na série de soluções-teste, e o resultado expresso por um número inteiro. Considerou-se o resultado como "tóxico" quando a porcentagem de imobilidade na amostra for significativamente maior que no controle, ou "não tóxico" quando não constatada diferença significativa.

2.3 Varredura Espectral

A varredura espectral teve o objetivo de avaliar os comportamentos espectrais das amostras submetidas aos distintos tratamentos, durante a execução dos ensaios.

Durante a execução dos ensaios retirou-se uma alíquota de 4 mL destas amostras, nos tempos de monitoramento determinados, as quais foram submetidas a leitura em espectrofotômetro UV-Vis (Shimatzu®). Adotou-se a faixa espectral de 200 a 900 nm.

3 RESULTADOS

O fator de toxicidade foi determinado através da observação direta da mobilidade dos organismos na série de soluções-teste. Considerou-se o resultado como "tóxico" quando a porcentagem de imobilidade na amostra foi superior a 10%. Os resultados dos ensaios podem ser observados no Quadro 01.

Quadro 01. Resultados dos testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna*, dos tratamentos T1: UV-C; T2: UV-C/H₂O₂; T3: UV-C/H₂O₂ +NAg e T6: UV-C/NAg

(Continua)

Amostra	Diluição (% de amostra)	% imobilidade	Resultado em Fator de Diluição
T0	1 (100%)	0%	FTd = 1
	2 (50%)	0%	
	4 (25%)	0%	
	8 (12,5%)	0%	
	16 (6,25%)	0%	
T1	1 (100%)	30%	FTd = 8
	2 (50%)	27%	
	4 (25%)	17%	
	8 (12,5%)	0%	
	16 (6,25%)	0%	
T2	1 (100%)	70%	FTd = 2
	2 (50%)	0%	
	4 (25%)	0%	
	8 (12,5%)	0%	
	16 (6,25%)	0%	
T3	1 (100%)	50%	FTd = 2
	2 (50%)	0%	
	4 (25%)	0%	
	8 (12,5%)	0%	
	16 (6,25%)	0%	
T6	1 (100%)	100%	FTd > 16
	2 (50%)	100%	
	4 (25%)	100%	

	8 (12,5%)	100%
	16 (6,25%)	100%

LEMBRETES:

FTd = Menor diluição em que a amostra não apresenta toxicidade para *D. magna*

Considera-se tóxico quando: % imobilidade é > 10%

Os resultados demonstram que, no primeiro caso, a amostra inicial em T0, onde a concentração de MC-LR era de 146,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$, não apresentou toxicidade aguda para *D. magna*.

Vários estudos sobre os efeitos de microcistinas sobre o zooplâncton são reportados a décadas e corroboram com o fato acima. Jungmann e Benndorf (1994) relataram que a exposição de *Daphnia* a MCs apresentaram efeitos apenas em concentrações de várias ordens de grandeza acima das encontradas em amostras de campo. No entanto, observaram toxicidade para *Daphnia* por metabolitos não identificados que não as microcistinas de *Microcystis*.

DeMott *et al.* (1991) estudaram a sensibilidade de quatro espécies de zooplâncton a MC-LR, e obtiveram diferentes resultados em quase duas ordens de grandeza, mas a toxicidade foi observada apenas em concentrações muito altas que são raramente encontradas em corpos de água naturais (48h CL50 - concentração da amostra que causa efeito agudo a 50% dos organismos no tempo de exposição, variando de 450 a 21400 μg de MC por litro).

Tendo como base o fator de diluição - FTd, ou seja, a menor diluição em que a amostra não apresenta toxicidade para *D. magna*, os tratamentos que obtiveram menor FTd foram o T2 (UV-C/H₂O₂) e o T3 (UV-C/H₂O₂ +NAg), com FTd de 2, e porcentagem de imobilidade dos organismos de 70% e 50%, respectivamente.

Este fato indica que a amostra após o tratamento, sem diluição, foi tóxica aos organismos-teste. A toxicidade da água de estudo após o tratamento foi intensificada no T1 (UV-C), onde obteve-se FTd de 8, e porcentagem de imobilidade dos organismos de 30% na amostra sem diluição, 27% de imobilidade na amostra diluída na proporção 1:2, e 17% de imobilidade na diluição 1:4, ou seja, a amostra pós-tratamento apresentou toxicidade para *D. magna* mesmo diluída 4 vezes.

No último caso analisado, apesar da relativa eficiência do processo, é importante salientar que a reação gerou subprodutos altamente tóxicos, o tratamento T6 (UV-C/NAg) demonstrou alto grau de toxicidade, causando a imobilidade de 100% dos organismos-teste em todas as diluições analisadas (até a diluição de 16 vezes).

Lawton e Robertson (1999) advertem que a maioria dos oxidantes frequentemente empregados para o tratamento de água (radical hidroxila, ozônio, peróxido de hidrogênio,

radical perhidroxila, permanganato, ácido hipocloroso, cloro, dióxido de cloro) reage facilmente com ligações insaturadas, tais como aquelas incluídas na porção ADDA da MC, se ela é modificada a toxina parece desaparecer. No entanto, não fornecem informações sobre os subprodutos que são gerados e os perigos potenciais que podem apresentar.

Liao *et al.* (2015) avaliaram a formação de 5 subprodutos da desinfecção a partir da cloração de água com presença de *Microcystis aeruginosa* e da diatomácea *Cyclotella meneghiniana*. A formação dos subprodutos pode ocorrer a partir de componentes de *M. aeruginosa*, sendo a matéria orgânica intracelular a principal precursora. Os subprodutos monitorados incluíram triclorometano (TCM), tricloronitrometano (TCNM), dicloroacetoneitrila (DCAN), 1,1-dicloropropano (1,1-DCP) e 1,1,1-tricloropropano (1,1,1-TCP).

O processo de retirada de cianotoxinas da água pode ocorrer a partir de processos de separação ou de conversão. Os processos de conversão envolvem a transformação da substância para uma forma química diferente, reduzindo assim o problema da qualidade da água. Porém, embora os processos de conversão sejam caracterizados em algum momento como destruição, haverá a formação dos subprodutos da reação. Processos de conversão ideais são aqueles que produzem produtos de reação inócuos (HRUDEY *et al.*, 1999). O que não foi observado no presente estudo.

No presente estudo, buscou-se correlacionar as varreduras espectrais obtidas durante a execução dos ensaios, aos resultados de toxicidade obtidos. Para isso realizou-se a subtração das varreduras espectrais dos tempos de monitoramento, dos tratamentos analisados, com relação a varredura espectral inicial (Figura 01). Identificou-se que quanto maior os picos, maior a diferença com relação ao tempo inicial, e quanto menor os picos, menor a diferença, e portanto o tratamento foi menos eficiente na remoção dos pigmentos, ou, o processo ao qual foi submetido gerou subprodutos que podem ser notados em determinadas regiões do espectro.

Analisando-se os tempos iniciais de monitoramento (30, 60, 90 min – Figura 01), pode-se observar um pico negativo referente ao tratamento 6, em comprimentos de onda próximos a 400-450 nm, diferença esta associada a presença da prata, a qual não estava presente no tempo zero. Analisando-se os tempos finais de monitoramento (150 e 180 min – Figura 01), pode-se inferir que o tratamento 6 gerou subprodutos a partir das nanopartículas de prata, que podem ser notados linearmente em várias regiões do espectro.

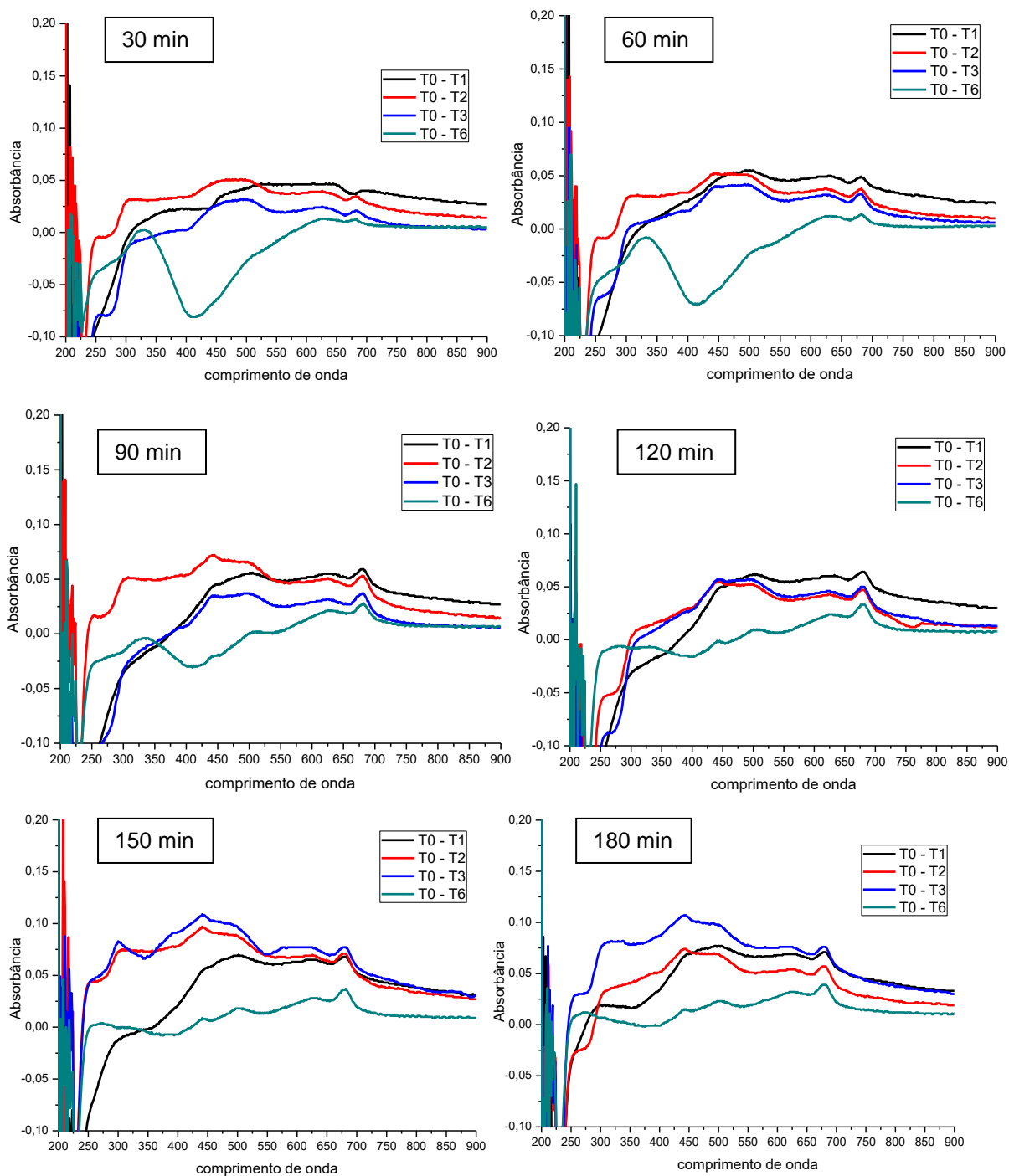


Figura 01. Subtração das varreduras espectrais dos tratamentos, da varredura espectral inicial (200 a 900 nm), em cada tempo de monitoramento (30, 60, 90, 120, 150, e 180 minutos). T1: UV-C; T2: UV-C/H₂O₂; T3: UV-C/H₂O₂ + NAg e T6: UV-C/NAg.

4 CONSIDERAÇÕES DO CAPÍTULO

Os tratamentos químicos aplicados para degradação e inviabilização celular de *Microcystis aeruginosa* BB005, e degradação de MC-LR apresentaram resultados satisfatórios, entretanto, ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia magna*, revelaram que a água pós-tratamento acabou desenvolvendo toxicidade, cenário este que não se apresentava antes de submeter a água de estudo as condições dos ensaios, pois MC-LR apresenta toxicidade apenas em concentrações bastante elevadas, diferentemente do encontrado em florações de cianobactérias.

A adição de nanopartículas de prata – NAg não causou diferenças significativas ao processo UV-C/H₂O₂, e não aumentou a toxicidade da água pós tratamento. No entanto, a análise do efeito das variáveis isoladas, demonstrou que somente as NAg na presença da radiação UV-C, foi capaz de aumentar expressivamente a toxicidade da água, e consequentemente os efeitos negativos sobre os organismos testes.

De modo geral, o presente estudo demonstrou que deve-se tomar cuidado ao afirmar que os processos avançados de oxidação são a melhor escolha, isto dentro do padrão de qualidade desejável, pois a degradação de moléculas específicas pode denotar falsas conclusões sobre a qualidade da água que se está sendo produzida, tendo em vista que novos compostos podem ser formados, e estes podem ser ainda mais prejudiciais que a molécula que se queria inicialmente degradar.

5 REFERÊNCIAS

BRASIL. **ABNT NBR 12713/2016**: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2016.

CARMICHAEL, W. W. **The toxins of Cyanobacteria**. Scientific American. 270(1), 1994, p. 78 - 86.

DEMOTT, W.R.; ZHANG, Q.; CARMICHAEL, W.W. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. **Limnol.Oceanog.**,36 (7), 1991, p. 1346-1357.

HARADA, K.-I, MATSUURA, K., SUZUKI, M., OKA, H., WATANABE, M. F., OISHI, S., DAHLEM, A.M., BEASLEY, V. R., CARMICHAEL, W.W. Chemical analysis of toxic peptides produced by cyanobacteria, **J. Chromatogr.**, 448, 275, 1988.

HRUDEY, S.; BURCH, M.; DRIKAS M.; GREGORY, R. Remedial measures. In Chorus, Bartran editors. **Toxic cyanobacteria in water**: London: Spon Press, 1999.

HUSZAR, V.L.M. e SILVA, L.H.S., A Estrutura da Comunidade Fitoplanctônica no Brasil: Cinco Décadas de Estudo. **Limnotemas**, 2, Julho 1999.

JUNGMANN, D.; BENNDORF, J. Toxicity to *Daphnia* of a compound extracted from laboratory and natural *Microcystis* spp., and the role of microcystins. **Freshwat. Biol.**, 32, 1994, 13-20.

LAWTON, L. A; ROBERTSON, P. K J. Physico-chemical treatment methods for the removal of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) from potable waters. **Chemical Society Reviews**, v. 28, n. 4, p. 217-224, 1999.

LIAO, X. *et al.* Evaluation of disinfection by-product formation potential (DBPFP) during chlorination of two algae species—Blue-green *Microcystis aeruginosa* and diatom *Cyclotella meneghiniana*. **Science of the Total Environment**, v. 532, p. 540-547, 2015.

MARCONE, G. P. **Avaliação da ecotoxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio e prata**. 2011. 207 f. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Química. UNICAMP, Campinas, 2011.

MOORE, M. N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?. **Environ. Int.**, 2006, 32, 967-976.

MUELLER, N. C.; NOWACK, B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. **Environ. Sci. Technol.**, 2008, 42, 4447–4453.

RODRÍGUEZ. E.; SORDO, A.; METCALF, J. S.; ACERO, J. L. Kinetics of the oxidation of cylindrospermopsin and anatoxin-a with chlorine, monochloramine and permanganate, **Water Res.** 2007, v. 41, p. 2048–2056.

SHU, H.Y.; CHANG, M. C.; FAN, H.J. Decolorization of azo dye acid black 1 by the UV/H₂O₂ process and optimization of operating parameters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 113, n. 1, p. 201-208, 2004.

VASCONCELOS, V.M.; SIVONEN, K.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W.; NAMIKOSHI, M. Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in Portuguese freshwaters, **Water Res.** 30, 1996,p. 2377–2384.

ZARBIN, A. J. G. Química de (nano) materiais. **Quim. Nova**, 2007, 30, 1469-1479.

CONCLUSÃO

A análise bibliométrica mostrou-se uma ferramenta útil para a compreensão do universo de estudo, possibilitando ao leitor desde uma visão geral dos estudos em escala mundial, até o conhecimento das técnicas empregadas para o tratamento de água contaminada com cianobactérias e cianotoxinas desde o princípio, sua evolução, os métodos mais abordados atualmente, até uma possível identificação da tendência de pesquisa em trabalhos futuros.

Percebeu-se uma crescente preocupação com relação aos subprodutos da degradação das cianotoxinas de estudo, e cada vez mais ensaios ecotoxicológicos vêm sendo empregados para análise da água produzida, além de estudos qualitativos mais aprofundados.

A fotólise e o processo UV-C/H₂O₂ demonstraram resultados satisfatórios, porém deve-se ficar atento aos subprodutos oriundos da degradação celular das cianobactérias, bem como das cianotoxinas, neste caso da MC-LR. Os ensaios com *D. magna* demonstraram toxicidade mesmo quando a água após submetida a fotólise foi diluída quatro vezes. E com relação ao processo UV-C/H₂O₂ (sem e com adição de NAg), a amostra foi tóxica quando não diluída. Já quando empregada as NAg combinadas a radiação UV-C, esta apresentou toxicidade extremamente alta, afetando todos os organismos em todas as diluições (até 16 x).

De maneira geral, a abordagem adotada no presente trabalho foi importante para demonstrar que os processos avançados de oxidação empregados foram eficientes para remover os poluentes de estudo, porém, que não se deve descuidar com relação aos subprodutos da degradação dos mesmos, os quais podem ser ainda mais tóxicos.

REFERÊNCIAS

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**, 2002, p. 441-446.

AZEVEDO, M.T.P. & SANT'ANNA, C. L. *Sphaerocavum brasiliense*, a new planktic genus and species of Cyanobacteria from reservoirs of São Paulo State, Brazil. *Algological Studies* 109: 79-92, 2003.

BISHOP, C.T., ANET, E.F.L.J. GORHAM, P.R. Isolation and identification of the fast-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1, **Can. J. Biochem. Physiol.**, v. 37, 453, 1959.

BITTENCOURT, M. C. O. MOLICA, R. Cianobactéria Invasora. **Revista Biotecnologia**, 2003. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio30/cianobacteria.pdf>> Acesso em: 10 dez 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria n.º 2.914 de 12 de dezembro de 2011**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília, 2011, 32 p.

BRITTO, J. M.; RANGEL, M. C. Processos avançados de oxidação de compostos fenólicos em efluentes industriais. **Quim. Nova**, Vol. 31, No. 1, 2008, p. 114-122.

CAIRES, T. A. **Cianobactérias marinhas bentônicas filamentosas do litoral do estado da Bahia, Brasil**. 2013. 140 f. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-graduação em Botânica. Feira de Santana, Bahia, 2013.

CARMICHAEL, W. W. **The toxins of Cyanobacteria**. *Scientific American*. 270(1), p. 78 – 86, 1994.

CHORUS, I. BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. London e New York: WHO, 1999.

FALCONER, I. R. **Cyanobacterial toxins of drinking water supplies**. CRC Press, Boca Raton, USA. 2005, 279 p.

FENG, Q. L.; WU, J.; CHEN, G. Q.; CUI, F. Z.; KIM, T. N.; KIM, J. O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, **Journal of Biomedical Materials Research**, 2000, v. 52, p. 662-668.

FUNASA. **Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano**. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2003.

HARADA, K.-I, MATSUURA, K., SUZUKI, M., OKA, H., WATANABE, M. F., OISHI, S., DAHLEM, A.M., BEASLEY, V. R., CARMICHAEL, W.W. Chemical analysis of toxic peptides produced by cyanobacteria, **J. Chromatogr.**, 1988.

HARADA, K.; MURATA, H.; QIANG, Z.; SUZUKI, M.; KONDO, F. Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. **Toxicon**, v.34, n.6, 1996, p.701-710.

HUSZAR, V. L. M. & SILVA, L. H. S., A Estrutura da Comunidade Fitoplanctônica no Brasil: Cinco Décadas de Estudo. **Limnotemas**, 2 Jul, 1999.

KOMÁREK, J. Cyanobacterial taxonomy: Current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. **Algae** 21(4): 349-375, 2006.

KURIAMA, F. **Avaliação do potencial de biodegradação de microcistinas e biocontrole de cianobactérias por microrganismos em águas**. 2012. 97 f. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-graduação em Engenharia de Edificações e Saneamento, Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2012.

POURIA, S.; ANDRADE, A.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, R. L.; BARRETO, V. T. S.; WARD, C. J.; PREISER, W.; POON, G. K.; NEILD, G. H.; CODD, G. A. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **The Lancet**. Vol 352, 1998, 21 - 26 p.

PANÁČEK, A.; KVITEK, L.; PRUCEK, R.; KOLAR, M.; VECEROVA, R.; PIZUROVA, N. *et al.* Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity, **Journal of Physical Chemistry B.**, 2006, v. 110, p. 16248 -16253.

RODRÍGUEZ. E.; SORDO, A.; METCALF, J. S.; ACERO, J. L. Kinetics of the oxidation of cylindrospermopsin and anatoxin-a with chlorine, monochloramine and permanganate, **Water Res.** 2007, v. 41, p. 2048–2056.

SHU, H.Y.; CHANG, M. C.; FAN, H.J. Decolorization of azo dye acid black 1 by the

UV/H₂O₂ process and optimization of operating parameters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 113, n. 1, p. 201-208, 2004.

WALSBY, A. E. Gas vesicles. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 1, p. 94-144, 1994.

ANEXOS

ANEXO A - Carta Controle de sensibilidade de *D. magna* ao dicromato de potássio

Número teste	Data	CE ₅₀ K ₂ Cr ₂ O ₇ (mg L ⁻¹)
191	21/07/2016	0,67
192	27/07/2016	0,80
193	28/07/2016	0,73
194	29/07/2016	0,70
195	06/08/2016	0,72
196	12/08/2016	0,72
197	19/08/2016	0,87
198	26/08/2016	0,79
199	02/09/2016	0,85
200	15/09/2016	0,79
201	22/09/2016	0,81
202	30/09/2016	0,64
203	07/10/2016	0,83
204	20/10/2016	0,81
205	28/10/2016	0,78

ANEXO B - Carta Controle de Sensibilidade K₂Cr₂O₇