

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

JOICY MICHELETTO

**AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA-LR POR  
PROCESSO FOTO-FENTON SOLAR**

DISSERTAÇÃO

CURITIBA  
2016

JOICY MICHELETTO

**AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA-LR POR  
PROCESSO FOTO-FENTON SOLAR**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Ambientais, do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

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

Coorientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius de Liz

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

CURITIBA

2016

---

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**

---

M623a Micheletto, Joicy  
2016 Avaliação da degradação de microcistina-lr por processo foto-fenton solar / Joicy Micheletto.-- 2016.  
106 p.: il.; 30 cm

Texto em português, com resumo em inglês.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Curitiba, 2016.  
Bibliografia: p. 89-101.

1. Tecnologia ambiental - Dissertações. 2. Oxidação. 3. Fitotoxicidade. 4. Microcystis aeruginosa. 5. Processo foto-fenton. 6. Coletores solares. I. Freitas, Adriane Martins de. II. Liz, Marcus Vinicius de. III. Martins, Lúcia Regina Rocha. IV. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. V. Título.

CDD: Ed. 22 -- 363.7

## TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação n° 073

AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA-LR POR PROCESSO DE FOTO-FENTON SOLAR

Por

JOICY MICHELETTO

Dissertação apresentada às 14 horas do dia 30 de setembro de 2016, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, na área de concentração Tecnologias e Processos Ambientais, linha de pesquisa Controle e Monitoramento Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

### Banca examinadora:

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucila Adriani Coral  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carla Sirtori  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Visto da Coordenação:

---

Prof. Dr. Fernando Hermes Passig  
Coordenador do PPGCTA

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

*Ao meu esposo, amigo e conselheiro Rafael,  
pelo apoio, paciência e, principalmente, por  
não me deixar desistir.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por me dar forças para enfrentar as adversidades da vida e me mostrar que com Ele sou capaz de muito mais do que poderia imaginar. Por me permitir chegar até aqui e perceber que a vida é um aprendizado diário, que nada é por acaso e que, mesmo na dor, é possível crescer e se fortalecer.

À minha família, pelo apoio constante e compreensão nos momentos em que precisei estar ausente para realizar este trabalho. Principalmente ao meu pai e minha mãe, meus exemplos de honestidade, de amor, de doação. Por me ensinarem o valor da família e das pequenas coisas, me mostrarem que com muito trabalho se vai longe e que para crescermos não precisamos diminuir ninguém. Com vocês aprendi que a vida é passageira, mas que os ensinamentos que deixamos e o bem que fazemos ao outro são permanentes.

Ao meu irmão João Pedro, amigo e parceiro, por me escutar nos momentos de fraqueza e questionamentos. Você pode nem imaginar, mas nossas conversas filosóficas e trocas de idéias foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Você me fez ver um jeito mais leve de levar a vida.

Ao meu marido Rafael, por sonhar junto comigo e por não me deixar desistir. Nos momentos de dificuldade e de cansaço, você foi meu porto seguro. Era com você que eu unia forças para continuar. Cada jantar feito para me esperar, o café bem forte para aguentar as noites de escrita, as massagens após um dia exaustivo de experimentos, as conversas, tudo isso, por menor que pareça ser, foi determinante para que essa caminhada se tornasse mais fácil. Só fez crescer ainda mais a admiração que tenho por você. Agora vamos poder colher juntos os frutos de tamanha dedicação.

Em especial, aos meus orientadores, Adriane, Lúcia e Marcus por todo apoio, paciência, ensinamentos e por tornarem esse sonho possível. Pela contribuição essencial na minha formação profissional desde a graduação e por despertarem em mim potencialidades que eu mesma desconhecia. Eu, que já os admirava como profissionais, pude admirá-los também como amigos. As pausas para chás e cafés trouxeram consigo conselhos e contribuições não só para meu trabalho como também para a minha vida. O carinho com que me apoiaram no momento que mais precisei foi de grande valia. Serei eternamente grata à vocês!

Aos meus amigos do GPTec, do laboratório de Ecotoxicologia e do LLIeC, pelas trocas de experiências e conhecimento, pelas conversas e risadas que tornaram meus dias muito mais animados. Vocês são o que ganhei de melhor nesses dois anos! Os levarei para sempre em meu coração e guardarei com carinho as lembranças dos momentos juntos. Em especial Vinícius, Rafael, Matheus, Rubia, Camila, Vanessa, Regiane e Mariana que arregaçaram as mangas junto comigo e fizeram esse trabalho sair do papel. Por aguentar ao meu lado o sol escaldante, frio, vento, fome, entre outros percalços, que é melhor nem comentar, só para poderem me ajudar nos experimentos. Eu não conseguiria sem vocês!

Ao Tecnotrater (UFPR), ao Laboratório de Saneamento (DAQBi/UTFPR) e ao Laboratório de Ecotoxicologia (DAQBi/UTFPR) pelo apoio técnico e material que permitiu a realização deste trabalho.

À banca avaliadora pelo tempo despendido e pelas contribuições valiosas para este trabalho.

À UTFPR, ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro, técnico e pelo espaço físico que permitiu a realização deste trabalho. Que o meu trabalho e os conhecimentos gerados neste período possam se transformar em benefícios à população brasileira, como retribuição à confiança e investimentos em mim depositados.

À todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho. Muito obrigada!

*“A maior recompensa para o trabalho do homem  
não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se  
torna com isso.” John Ruskin*



## RESUMO

MICHELETTO, Joicy. **Avaliação da degradação de microcistina-LR por processo foto-Fenton solar**. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

O fenômeno de eutrofização de corpos d'água tem como uma de suas etapas o crescimento excessivo de cianobactérias. Como consequência, há o aumento na concentração de cianotoxinas em água, tais como a microcistina-LR. A presença de microcistinas em água potável configura um potencial risco ambiental e de saúde pública, uma vez que estes contaminantes apresentam elevada hepatotoxicidade, motivo pelo qual a legislação brasileira vigente estabelece o limite máximo de concentração em água potável em  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Visando suprir a deficiência do tratamento convencional de água na remoção de microcistinas, foram desenvolvidas tecnologias alternativas de tratamento, dentre os quais os processos avançados de oxidação (AOPs). Os AOPs consistem na oxidação de moléculas orgânicas pela ação dos radicais hidroxila formados no meio reacional, destacando-se o processo foto-Fenton assistido por radiação solar. Este trabalho avaliou a eficiência do processo foto-Fenton solar na degradação de microcistina-LR dissolvida em extrato bruto, em reator do tipo Coletor Parabólico Composto (CPC), bem como a fitotoxicidade em *Sinapis alba* antes, durante e após o tratamento. Experimentos do planejamento fatorial completo  $2^2$  com triplicata do ponto central foram realizados em menor escala (400 mL) para avaliar o efeito das variáveis  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  na eficiência do processo. Estes experimentos mostraram efeito significativo da dosagem de  $\text{Fe}^{2+}$  na remoção de microcistina-LR. Utilizando como referência os valores de Demanda Química de Oxigênio (DQO) das amostras, foi constatado que a melhor dosagem de  $\text{Fe}^{2+}$  e de  $\text{H}_2\text{O}_2$  seguem as proporções 0,318 ( $\text{Fe}^{2+}/\text{DQO}$ ) e 3,18 ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{DQO}$ ), respectivamente. As reações realizadas em meio de cultivo (ASM-1) demonstraram que a presença de íons sequestrante de radicais na matriz reacional prejudicam a velocidade da reação e sua eficiência em relação à degradação do analito de interesse. O processo foto-Fenton realizado em reator tipo CPC (2,1 L) se mostrou satisfatório na remoção de DQO (75%) e microcistina-LR (70%) do extrato bruto em meio ASM-1, após 120 minutos de tratamento. Para extrato bruto em água natural, o tratamento alcançou mineralização de 77%, e valores na remoção de microcistina-LR acima de 99% foram obtidos com apenas 45 min de reação. Os bioensaios com *Sinapis alba* não demonstraram aumento na fitotoxicidade da amostra após o processo foto-Fenton solar, sendo que, para amostras após 120 min de tratamento, não foram observados efeitos significativos sobre o crescimento das radículas. Os resultados do presente estudo apontam para o potencial do processo foto-Fenton solar como uma futura etapa para o tratamento de águas contaminadas com microcistina-LR.

**Palavra-chave:** Processos Avançados de Oxidação. Fitotoxicidade. CPC. *Microcystis aeruginosa*. Foto-Fenton em pH neutro.

## ABSTRACT

MICHELETTO, Joicy. **Evaluation of microcystin-LR degradability by solar photo-Fenton process**. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

The water bodies eutrophication has as one of its steps excessive growth of cyanobacteria. As a result, there is an increase in the concentration of cyanotoxins in water, such as microcystins. This characterizes an environmental and public health risk, since this contaminant has high hepatotoxicity, which is why the Brazilian legislation limits its concentration in drinking water at  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ . Aiming to overcome the deficiency of the conventional water treatment in removing microcystins, alternative treatment technologies were developed, among which the advanced oxidation processes (AOPs). AOPs come up with the purpose of organic compounds oxidation by hydroxyl radicals formed in the medium, highlighting the photo-Fenton process assisted by solar radiation. This study evaluated the efficiency of the solar photo-Fenton process in degradation of microcystin-LR dissolved in crude extract, in compound parabolic collector (CPC) reactor, as well as the phytotoxicity to *Sinapis alba* before, during and after treatment. The factorial  $2^2$  design experiments were carried out in a bench scale solar reactor (400 mL) and aimed at evaluating  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  effects on the process. This experiment showed significant effect of  $\text{Fe}^{2+}$  in microcystin removal. Using as reference the Chemical Oxygen Demand (COD) of the samples, it was found that the best conditions for the dosages of  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{Fe}^{2+}$  were these rates:  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{COD}=3,18$  e  $\text{Fe}^{2+}/\text{COD}=0,318$ . From matrix effect assays, it was concluded that scavengers radicals present in matrix composition (ASM-1) are responsible for a decrease on the reaction rate and mineralization of analyte. Despite that, the solar photo-Fenton process in CPC reactor (2,1 L) was satisfactory for COD (75%) and microcystin-LR (70%) removals from ASM-1 crude extract, after 120 minutes of treatment. For the natural water crude extract, the treatment achieved 77% mineralization of organic compounds, and up to 99% of microcystin-LR removal in only 45 minutes of reaction. The bioassays with *Sinapis alba* doesn't show increase in phytotoxicity for treated samples. After 120 minutes of solar photo-Fenton process, no significant effect in roots growth was observed. From this study, it was concluded that solar photo-Fenton process have potential for a future step in treatment of waters contaminated with microcystin-LR.

**Keywords:** Advanced Oxidation Processes. Phytotoxicity. CPC. *Microcystis aeruginosa*. Neutral photo-Fenton.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
3.1 O FENÔMENO DA FLORAÇÃO E SEU IMPACTO NA QUALIDADE DA ÁGUA	15
3.1.1 Cianobactérias e a produção de microcistinas .....	15
3.2 CONSEQUÊNCIAS DO FENÔMENO DE FLORAÇÃO NO TRATAMENTO CONVENCIONAL DE ÁGUA.....	18
3.3 PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO .....	20
3.3.1 Princípio e classificação de processos avançados de oxidação .....	20
3.3.2 Foto-Fenton solar: princípios e aplicações .....	22
3.4 ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE .....	26
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>30</b>
4.1 CULTIVO DE <i>Microcystis aeruginosa</i> E OBTENÇÃO DO EXTRATO.....	30
4.1.1 Análise de íons inorgânicos no extrato: série do nitrogênio, cloreto e fósforo total .....	32
4.2 REATORES.....	33
4.2.1 Reator de Bancada Assistido por Radiação Solar.....	33
4.2.2 Reator de bancada assistido por luz artificial .....	34
4.2.3 Reator em escala piloto tipo Coletor Parabólico Composto (CPC), assistido por luz solar.....	34
4.3 PROCESSO FOTO-FENTON SOLAR: PLANEJAMENTO E DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.....	36
4.3.1 Estudo do efeito das variáveis $Fe^{2+}$ e $H_2O_2$ na eficiência do processo foto-Fenton solar .....	36
4.3.2 Estudo do efeito de matriz na eficiência do tratamento .....	37
4.3.3 Experimentos foto-Fenton solar em reator tipo CPC.....	38
4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS .....	39
4.4.1 Extração em fase sólida (SPE) de microcistina-LR e ensaio de recuperação..	39
4.4.2 Quantificação de microcistina-LR por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD) .....	40
4.4.3 Análises Cromatográficas por LC-QTOF-MS .....	42
4.4.4 Concentração de $Fe^{2+}$ e $Fe^{3+}$ dissolvidos .....	43
4.4.5 Concentração de peróxido de hidrogênio.....	43
4.4.6 Carbono orgânico dissolvido .....	43
4.4.7 Demanda química de oxigênio .....	44
4.4.8 Cor aparente e cor verdadeira.....	44
4.4.9 Turbidez .....	45
4.4.10 Absorbância $UV_{254}$ .....	45
4.4.11 Quantificação da Intensidade Luminosa e Cálculo da Energia Acumulada....	45
4.4.12 Remoção do $H_2O_2$ residual.....	46
4.5 ENSAIO DE FITOTOXICIDADE AGUDA EM <i>Sinapis alba</i> .....	47
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>50</b>
5.1 CULTIVO DE <i>M. aeruginosa</i> E OBTENÇÃO DO EXTRATO.....	50
5.2 PROCESSO FOTO-FENTON SOLAR .....	53

5.2.1 Estudo do efeito das variáveis Fe <sup>2+</sup> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na eficiência do tratamento e escolha da melhor condição.....	53
5.2.2 Estudo do efeito de matriz na eficiência do processo foto-Fenton .....	65
5.2.3 Eficiência do processo em reator tipo Coletor Parabólico Composto .....	68
5.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS .....	73
5.3.1 Ensaio de recuperação.....	73
5.3.2 Análise de amostras .....	75
5.4 ENSAIO DE FITOTOXICIDADE EM <i>Sinapis alba</i> .....	81
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>86</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>100</b>
ANEXO A - Composição do meio líquido ASM-1 utilizado no cultivo de <i>M. aeruginosa</i> .....	100
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>101</b>
APÊNDICE A – Monitoramento de Fe, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e pH nos experimentos do planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> e efeitos isolados.....	101

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (2015), em todo o mundo cerca de 663 milhões de pessoas não possuem acesso à água potável. Com impactos diretos na saúde da população, estimou-se que em 2006, 24% das enfermidades e 23% das mortes prematuras resultaram da exposição a ambientes insalubres e sem recursos sanitários (WHO, 2006). No Brasil, os tratamentos de doenças derivadas do saneamento inadequado corresponderam a 19,8% do que foi gasto pelo Sistema Único de Saúde - SUS em 1999 (BRASIL, 2004a).

Efluentes e resíduos, sejam eles de origem doméstica, industrial ou agrícola, quando despejados sem o devido tratamento em corpos d'água, podem acarretar o desequilíbrio químico e biológico do meio aquático. O aumento na concentração de nutrientes como nitrogênio e fósforo, proporcionam condições favoráveis para a ocorrência de episódios de florações ou “*bloom*”, caracterizado pelo crescimento rápido e excessivo de produtores primários no ambiente aquático. Esse fenômeno merece atenção, principalmente quando ocorre em mananciais de abastecimento de água, devido à elevada densidade de cianobactérias no meio (FUNASA, 2013).

As cianobactérias são organismos unicelulares, procarióticos, capazes de realizar fotossíntese. Dentre elas, algumas cepas do gênero *Microcystis* possuem como característica a produção de toxinas hepatotóxicas, dentre as quais, a microcistina (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006). Em eventos de floração, a concentração de microcistinas dissolvidas aumenta, representando um elevado risco às populações de diferentes níveis tróficos. Se não removida corretamente, os níveis residuais dessas toxinas em água potável poderá trazer graves consequências à saúde de quem a consome, motivo pelo qual sua concentração não deve ultrapassar o limite estipulado pela Portaria nº 2914/11 do Ministério da Saúde, que é de 1 µg microcistinas totais L<sup>-1</sup> (BRASIL, 2011b).

A fim de adequar a água aos padrões de potabilidade, faz-se necessário o tratamento desta por processos químicos ou físicos. No entanto, tratamentos convencionais de água mostram-se, por vezes, ineficientes na remoção de toxinas. Neste sentido, faz-se necessário o estudo e aplicação de tecnologias alternativas de tratamento, dentre as quais destacam-se os processos físicos de adsorção e os processos químicos oxidativos (FUNASA, 2013).

Os processos avançados de oxidação (AOP, do inglês *Advanced Oxidation Processes*) constituem alternativas vantajosas, uma vez que permitem a degradação de contaminantes orgânicos, e não somente em sua transposição de fase. Além disso, o alto potencial de oxidação dos radicais hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) formados é capaz de tratar os mais diversos compostos.

Dentre tais processos, destaca-se o sistema foto-Fenton ativado por radiação solar que, além de propiciar um menor consumo de  $\text{Fe}^{2+}$  em relação a processos sem radiação, apresenta menor custo energético para o tratamento, por utilizar-se da energia solar para que a reação ocorra (MALATO *et al.*, 2009). Também buscando por reduções de custo e maior aplicabilidade dos AOPs em larga escala, alguns trabalhos propõem realizar o tratamento foto-Fenton em pH próximo da neutralidade (DIAS *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2014).

Considerando as atuais tendências nos estudos sobre aplicação de AOPs, muito ainda há por elucidar sobre processos foto-Fenton solar para a degradação de microcistinas, principalmente quanto à interferência da matéria orgânica e de íons inorgânicos, comumente presentes em águas naturais. Além disso, ainda que estes processos demonstrem elevada eficiência para parâmetros físico-químicos, a possibilidade de formação de subprodutos durante o tratamento suscita questionamentos acerca de aspectos (eco)toxicológicos (ZONG; SUN; SUN, 2013).

A Ecotoxicologia vem se mostrando como uma ferramenta importante no controle de processos de tratamento. Para tanto, utilizam-se ensaios com organismos-teste, os quais consistem na exposição destes organismos, previamente selecionados, a uma amostra cujo efeito tóxico se deseja conhecer, sob condições e período controlados. Através destes ensaios, pode-se avaliar a intensidade de um efeito tóxico para a amostra analisada, e determinar em quais concentrações o poluente causa efeitos deletérios ao organismo estudado (AZEVEDO; CHASIN, 2004).

Os efeitos tóxicos da microcistina-LR para diversos organismos é tema recorrente e conhecido na comunidade científica. No entanto, estudos sobre os efeitos tóxicos dos produtos de sua degradação, além de recentes, ainda possuem lacunas a serem exploradas. Freitas (2008) estudou a degradação de microcistina-LR pelo processo foto-Fenton solar, mas os organismos-testes escolhidos para o monitoramento da toxicidade de subprodutos não se mostraram sensíveis aos contaminantes do meio, fazendo-se necessários novos testes com outros

organismos pelo mesmo processo. Mais recentemente, o estudo de Zong e colaboradores (2013) testou a toxicidade de sete diferentes subprodutos de degradação da microcistina-LR quando submetida ao processo UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Após isolar cada um dos subprodutos, o estudo mostrou que para um deles o valor de CI<sub>50</sub> (concentração para 50% de inibição) foi menor que a da toxina original, atestando mais uma vez a importância dos ensaios ecotoxicológicos como controle da qualidade de água potável.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficiência do processo foto-Fenton solar na degradação de microcistina-LR dissolvida em extrato bruto obtido a partir de cultivo de *Microcystis aeruginosa*, bem como a fitotoxicidade em *Sinapis alba* antes, durante e após o tratamento.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência das variáveis experimentais (concentração de  $\text{Fe}^{2+}$  e peróxido de hidrogênio) na eficiência do processo foto-Fenton solar, via delineamento experimental, a ser realizado em reator solar em escala de bancada, visando definir as condições experimentais para o reator solar tipo CPC;
- Avaliar o efeito da matriz reacional, na eficiência do processo foto-Fenton solar;
- Verificar o modelo cinético que melhor se adequa ajuste à degradação de microcistina-LR pelo processo foto-Fenton solar em reator tipo CPC;
- Comparar a eficiência do processo foto-Fenton solar em reator tipo CPC quando aplicado ao extrato bruto em meio ASM-1 e em água do Rio Verde;
- Verificar a fitotoxicidade de microcistina-LR e seus subprodutos de degradação em bioensaios com a espécie *Sinapis alba*, realizados antes, durante e após o tratamento por foto-Fenton solar em reator CPC;



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 O FENÔMENO DA FLORAÇÃO E SEU IMPACTO NA QUALIDADE DA ÁGUA

A poluição de corpos hídricos é conhecidamente um problema global. O aporte de efluentes industriais, da agricultura ou domésticos nos ambientes aquáticos alteram as características físicas, químicas e biológicas do meio, contribuindo para o aumento do grau de trofia devido à elevada carga de compostos orgânicos e inorgânicos. Isto pode acarretar na mudança estrutural das comunidades aquáticas, devido ao aumento ou diminuição do número de indivíduos de uma população, extinção de organismos ou até mesmo na mudança da dominância de espécies (ANDREOLI; CARNEIRO, 2005).

Derivado de causas naturais ou pela ação antrópica, o fenômeno da eutrofização consiste na elevação da produtividade primária do fitoplâncton em razão do aumento da concentração de nitrogênio e fósforo no meio (ESTEVES, 2011), sendo estes compostos comumente encontrados em rios que sofrem com despejo de efluentes sem tratamento. Em estágio mais avançados, a eutrofização resulta na perda de biodiversidade, alteração da concentração de oxigênio dissolvido na coluna d'água e no aumento excessivo de algas, cianobactérias e macrófitas aquáticas, processo conhecido como floração ou “*bloom*” (ANDREOLI; CARNEIRO; 2005).

Comumente observada em episódios de floração nos reservatórios brasileiros, principalmente os gêneros *Anabaena*, *Microcystis* e mais recentemente *Cylindropermopsis*, as cianobactérias impactam diretamente na qualidade da água, devido às cianotoxinas que estes organismos produzem, e por dificultarem o tratamento da água (DÖRR *et al.*, 2010).

##### 3.1.1 Cianobactérias e a produção de microcistinas

As cianobactérias são microorganismos procariontes conhecidos por possuírem estruturas celulares semelhante às bactérias, porém, com capacidade fotossintética devido à presença de clorofila em suas células (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006). Além da clorofila, a produção de pigmentos como as ficobiliproteínas pode conferir ao organismo coloração vermelha (ficoeritrinas) ou

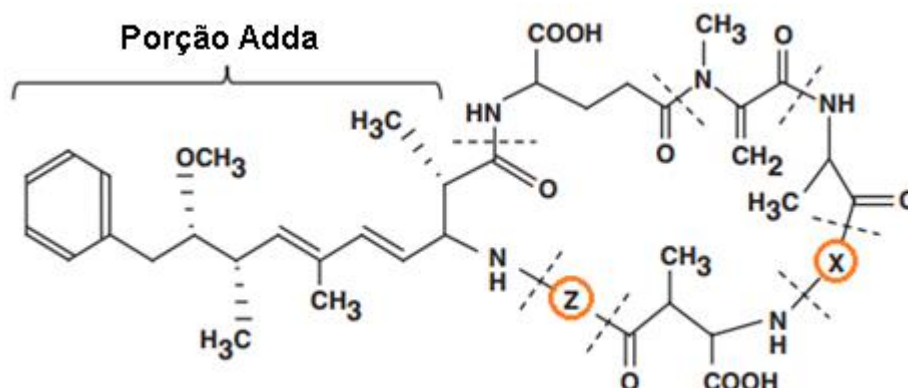
azul (ficocianinas e aloficocianinas). Por esta razão, também foram denominadas, erroneamente, como algas azuis (HAN *et al.*, 2013).

Além das características estruturais, as cianobactérias destacam-se pela capacidade de produzir, como metabólitos secundários, toxinas que, se liberadas na água, podem torná-la imprópria para o consumo, além de causar efeitos deletérios em outras espécies. Não se sabe ainda ao certo qual a função dessas toxinas que justifique sua produção, mas uma hipótese levantada é que tais compostos possam operar como um mecanismo de proteção contra predadores (CARMICHAEL, 1992).

Comumente encontrado nas bacias brasileiras (DÖRR *et al.*, 2010) e gênero predominante nos episódios de floração em reservatórios de água, a exemplo do reservatório de Mundaú (Pernambuco), com frequentes florações entre 2010 e 2011 (SILVA *et al.*, 2013), o gênero de cianobactéria *Microcystis* tornou-se um problema de saúde pública (ANDREOLI; CARNEIRO, 2005). Uma das classes de toxinas produzidas por esse gênero, a microcistina, possui efeito hepatotóxico e age como inibidora das enzimas fosfatase PP1 e PP2A. Essas enzimas são fundamentais para várias reações metabólicas que regulam atividades intracelulares. Em mamíferos, por exemplo, essa inibição pode, em maior grau, levar à desestabilização das proteínas estruturais dos hepatócitos, culminando com o desacoplamento das células do fígado, causando hemorragias, necroses ou o aparecimento de tumores (BISCHOFF, 2001; CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006).

Quanto à estrutura química, as microcistinas são formadas por peptídeos e sete diferentes aminoácidos que se unem por ligações peptídicas em uma conformação cíclica (MEREL *et al.*, 2013). As variantes dessa toxina diferem entre si pelos aminoácidos X e Z da molécula (Figura 1). Assim sendo, as microcistinas são nomeadas de acordo com o aminoácido que as compõe, como a microcistina-LR, foco desse estudo, que tem as posições em questão ocupadas por leucina (L) e arginina (R), respectivamente (ANTONIOU *et al.*, 2008). Segundo Chorus e Bartram (1999), a porção que confere toxicidade ao composto é o grupamento Adda (ácido (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metoxi-2-6-8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico), sendo que qualquer modificação, como saturação e isomerização desta estrutura, é capaz de tornar o contaminante atóxico.

Figura 1- Estrutura geral das microcistinas, onde X e Z representam os aminoácidos variáveis da molécula.



Fonte: Adaptado de MEREL *et al.*, 2013.

A alta estabilidade térmica, fotoquímica e biológica das microcistinas permite que esta substância persista em corpos aquáticos (ROEGNER *et al.*; 2014). Estudo anterior de Jones e Orr (1994), demonstra que após o uso de algicidas para o controle do crescimento de cianobactérias em um lago australiano, a toxina dissolvida pode permanecer no meio por até 9 dias, até que se inicie sua degradação. Segundo os autores, as principais explicações para a queda da concentração de microcistina no ambiente foi a sua diluição, biodegradação, fotólise, degradação térmica e adsorção em material particulado (JONES; ORR, 1994).

Em águas utilizadas para o abastecimento público, nem sempre essa toxina é eficientemente removida e pode chegar à residência dos consumidores, representando um risco à saúde da população (CALIJURI; ALVES; SANTOS, 2006). O caso de Caruaru, cidade do estado de Pernambuco, em 1996, demonstra bem esse agravante. Em uma unidade de hemodiálise da cidade, 126 pacientes apresentaram sintomas de intoxicação após realizarem o procedimento. Uma investigação das causas dos sintomas mostrou que a água utilizada na hemodiálise estava contaminada com microcistinas, o que acarretou em quadros de neurointoxicação aguda e hepatointoxicação subaguda, levando a óbito 60 pacientes (POURIA *et al.*, 1998). Mesmo após esse incidente, o governo brasileiro levou 8 anos para emitir a primeira portaria do Ministério da Saúde, a qual estabelecia limite de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  para microcistinas em água potável, além da obrigatoriedade de controlar o crescimento de cianobactérias em mananciais (BRASIL, 2004b).

Visando se adequar às novas normas, as empresas de saneamento buscaram criar uma rotina de controle de florações nos mananciais por contagem

celular e também pelo uso de algicidas, como o sulfato de cobre. No entanto, esses compostos acabam por provocar a lise celular e ocasionam a liberação da toxina intracelular para a água, dificultando sua remoção pelos processos convencionais de tratamento de água (MORAIS, 2012) e por isso seu uso foi proibido no Brasil a partir de 2004 (BRASIL, 2004b).

A exemplo dos transtornos que o fenômeno de floração pode causar, em agosto de 2014, o lago Erie, em Ohio (EUA) sofreu com um abrupto crescimento de cianobactérias, impactando diretamente no tratamento de água para consumo humano. Mesmo após o tratamento, foram encontradas concentrações de cianotoxinas ( $2,5 \mu\text{g}$  microcistinas  $\text{L}^{-1}$ ) acima da permitida para o consumo, deixando 400 mil residências da cidade de Toledo sem água, além do prejuízo econômico (BULLERJAHN *et al.*, 2016).

### 3.2 CONSEQUÊNCIAS DO FENÔMENO DE FLORAÇÃO NO TRATAMENTO CONVENCIONAL DE ÁGUA

A proibição do uso de algicidas no controle de florações em mananciais de abastecimento público (BRASIL, 2004b) deixou, muitas vezes, a cargo das estações de tratamento de água (ETAs) a responsabilidade na remoção de algas e cianobactérias bem como das toxinas por ela produzidas.

O tratamento de água por ciclo completo, ou tratamento convencional de água, consiste em uma sequência de 3 processos: a clarificação, a filtração e a desinfecção. Mais especificamente resume-se às etapas de coagulação, seguida de floculação, decantação ou flotação, filtração e, por fim, a desinfecção (Figura 2).

Figura 2 – Esquema das etapas de tratamento convencional de água.



Fonte: Adaptado de LIBÂNIO, 2010.

Quando ocorre um evento de floração, as alterações na qualidade da água tem impacto direto nos processos de tratamento (DI BERNARDO; PAZ, 2008). O aumento excessivo da densidade celular de produtores primários na água, além de elevar a concentração de matéria orgânica no meio, altera o padrão de cargas superficiais, e conseqüentemente dificulta o processo de neutralização dessas cargas durante a coagulação, além de requerer dosagens maiores de coagulantes. Um processo de coagulação, se mal realizado, levará, na etapa seguinte, a uma má formação dos flocos e conseqüentemente baixa remoção de matéria orgânica, principalmente em plantas que tenham a decantação na etapa de clarificação (ENDERSON; PARSONS; JEFFERSON, 2010).

Com concentrações maiores de sólidos em suspensão, essa água pós coagulação/floculação levará a uma colmatação mais rápida dos filtros, aumentando o consumo de água para lavagem dos mesmos. Na etapa de desinfecção, além do aumento do consumo de cloro pela maior concentração de matéria orgânica na água, incorre-se no risco de maior formação de subprodutos de desinfecção, conhecidamente tóxicos (DI BERNARDO; MINILLO; DANTAS, 2010;).

Já que o processo convencional costuma ser mais efetivo na remoção de células intactas e não na toxina dissolvida, há uma preocupação para que durante o tratamento não ocorra lise celular, já que a concentração de toxinas intracelular é

mais elevadas que a extracelular, e o rompimento de células levaria ao aumento destas na água, dificultando o tratamento (CHOW *et al.*, 1999). Neste sentido, o estudo de Drika e colaboradores (2001) demonstrou que as células costumam passar intactas pelas etapas de coagulação, floculação. No entanto, nas etapas de decantação e na desinfecção, pode ocorrer lise celular, justificando a importância das etapas anteriores na remoção de células intactas.

Devido às limitações do processo convencional de tratamento já discutidas, uma alternativa encontrada pelo setor foi utilizar o tratamento convencional de água, já em operação na maior parte das plantas, e combiná-lo com processos adicionais, como a adsorção em carvão ativado e a pré-oxidação com cloro (ANDREOLI; CARNEIRO, 2005). Apesar de eficientes na remoção de microcistina dissolvida em água, nem sempre tais medidas são suficientes. Há registros de redissolução da toxina removida nos filtros de carvão bem como do lodo de decantador para a fase líquida quando a limpeza dos filtros, ou a remoção do lodo da planta não é feita com frequência (DRIKAS *et al.*, 2001). A pré-oxidação (anterior à coagulação), por sua vez, visa a degradação destes compostos ao invés de transpô-los de fase, mas também incorre em riscos pois tendem a ocasionar a lise celular, o que não é desejável.

Por consequência, vem se buscando outros métodos de tratamento, físicos, químicos ou biológicos, que possam suprir essa demanda (FUNASA, 2013).

### 3.3 PROCESSOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO

#### 3.3.1 Princípio e classificação de processos avançados de oxidação

A busca por novas tecnologias de tratamento de água, efluentes, áreas contaminadas e resíduos que fossem menos onerosas e “limpas” foi ponto decisivo para o surgimento dos processos avançados de oxidação (AOPs). Tendo como prioridade a questão ambiental, esses processos ganharam destaque nos últimos 30 anos, pois além de atender às condições anteriores citadas, abrangem e tratam os mais diversos compostos (TEIXEIRA; JARDIM, 2004).

Nem sempre os tratamentos convencionais são eficientes na remoção de contaminantes, seja devido à toxicidade ou à estabilidade destes compostos, de forma a atender às legislações mais rigorosas que vem se estabelecendo (OLLER;

MALATO; SÁNCHEZ-PÉREZ, 2011). Visando atender a essa demanda, vários trabalhos trazem os AOPs como alternativa aos tratamentos já comumente utilizados, substituindo-os ou de forma combinada a estes, visando a mineralização do contaminante ou torná-lo mais biodegradável e menos tóxico (TOOR; MOHSENI, 2007; WANG *et al.*, 2008).

Em definição, os AOPs são caracterizados como processos que geram espécies oxidantes, principalmente radicais hidroxilas, em quantidade suficiente para mineralizar a matéria orgânica a CO<sub>2</sub>, água e íons inorgânicos (TEIXEIRA; JARDIM, 2004). Essa oxidação ocorre, em sua maior parte, por ação dos radicais hidroxila (•OH) gerados no meio, os quais têm por característica o alto potencial de oxidação (2,8 V), sendo superado apenas pelo flúor (Tabela 1). A não seletividade do radical hidroxila justifica sua larga aplicação em reações de degradação de contaminantes (MALATO *et al.*, 2009).

**Tabela 1 - Potencial redox de alguns oxidantes.**

<b>Espécie</b>	<b>Potencial redox (V)</b>
Flúor	3,03
Radical hidroxila	2,80
Oxigênio atômico	2,42
Ozônio	2,07
Peróxido de hidrogênio	1,78
Permanganato	1,68
Dióxido de cloro	1,57
Cloro	1,36
Iodo	0,54

Fonte: DOMÉNECH; JARDIM; LITTER, 2001.

O mecanismo de reação que permite que compostos orgânicos sejam oxidados por ação de radicais hidroxila pode ser de três diferentes tipos (Equações 1 a 4): adição, abstração de hidrogênio e transferência de elétrons (NOGUEIRA *et al.*, 2007).



As diversas possibilidades reacionais para a formação desse radical de interesse (•OH) levaram ao desenvolvimento de diferentes AOPs, os quais podem

ser classificados seja pelas fases do meio reacional (homogêneo ou heterogêneo), e pelo uso ou não de radiação. No quadro abaixo, é apresentada a classificação de alguns dos processos existentes (Quadro 1) (HUANG; DONG; TANG, 1993; ANTONOPOULOU *et al.*, 2014).

**Quadro 1 - Classificação dos Processos Avançados de Oxidação.**

<b>SISTEMAS HOMOGÊNEOS</b>	<b>Com irradiação</b>
	O <sub>3</sub> /UV
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /O <sub>3</sub> /UV
	feixe de elétrons
	ultrassom
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /ultrassom
	UV/ultrassom
	foto-Fenton
	foto-eléto-Fenton
	γ-radiólise
	<b>Sem irradiação</b>
	O <sub>3</sub> / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
O <sub>3</sub> /OH <sup>-</sup>	
Fenton	
<b>SISTEMAS HETEROGÊNEOS</b>	<b>Com irradiação</b>
	TiO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub> /UV
	TiO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV
	ZnO/UV
	foto-eleto-Fenton
	<b>Sem irradiação</b>
	eleto-Fenton

Fonte: Adaptado de HUANG; DONG; TANG, 1993; ANTONOPOULOU *et al.*, 2014.

Frente à diversidade de processos que podem ser utilizados, a escolha do que melhor se aplica à degradação de determinado composto deve levar em conta o custo de instalação e aplicação do tratamento, recursos disponíveis, peculiaridades e especificidades de cada um dos processos e, principalmente, as características físicas e químicas do contaminante.

De maneira geral, podem ser citadas como algumas das características da utilização dos AOPs (DOMÉNECH; JARDIM; LITTER, 2001):

- Idealmente, ocorre a mineralização do contaminante e não a transferência de fase, o que trata o problema de forma definitiva;
- Maior possibilidade de se alcançar a mineralização completa da matéria orgânica, se comparado aos métodos convencionais;
- Menor consumo de energia, quando comparados a outros métodos, como a incineração, para processos que não sejam assistidos por radiação artificial;
- Alto custo para adaptação a grandes escalas.

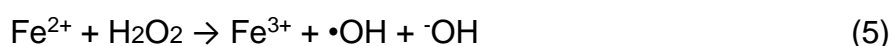


Como exemplo da aplicação desses métodos, processos fotocatalíticos e UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostraram eficiência superior a 70% na remoção de mais de trinta fármacos e de estrogênio em água (BENOTTI *et al.*, 2009). Já no tratamento de efluentes industriais, a reação Fenton utilizada no tratamento de licor negro advindo do processo de polpação na indústria papelreira, alcançou 94,8% de redução de DQO com apenas 90 minutos de tratamento, o que configura uma vantagem, pois está muito abaixo do tempo de retenção requerido por tratamentos biológicos (dias), por exemplo (TORRADES; SAIZ; GARCÍA-HORTAL, 2011). A ozonização fotocatalítica foi conduzida no tratamento de efluente hospitalar (KERN *et al.*, 2013) com eficiência na redução de 60% da DQO e 87% do nitrogênio total, corroborando mais uma vez a larga aplicação dos processos avançados de oxidação devido a sua não seletividade. Para a degradação de microcistina-LR em água sintética por processo UVC/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, He e colaboradores (2012) atestaram a eficiência do processo, o qual alcançou remoções da toxina acima de 90% para uma concentração inicial de 1 μmol L<sup>-1</sup> de microcistina-LR.

O foco desse estudo está no uso do processo foto-Fenton solar para degradação microcistina-LR. Este processo foi escolhido dentre os AOPs, devido aos bons resultados que vem apresentando para degradação dos mais diversos contaminantes, pela fácil operação, dentre outras vantagens que serão descrito mais detalhadamente na seção 3.3.2.

### 3.3.2 Foto-Fenton solar: princípios e aplicações

Elucidado em 1894 por H. J. Fenton, o processo Fenton têm como objetivo a oxidação de compostos orgânicos pela ação de radicais hidroxila (•OH) gerados pela quebra da molécula de peróxido de hidrogênio catalisada por íons de ferro II, conforme Equação 5 (FENTON<sup>1</sup> *apud* RUPPERT; HEISLER; BAUER, 1993):



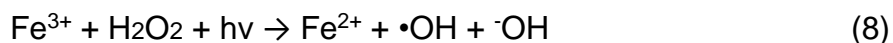
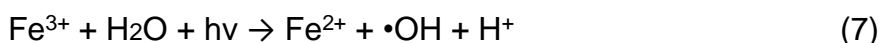
De fácil aplicação e utilizando-se de reagentes acessíveis, esses processos ficaram amplamente conhecidos devido a sua eficiência na oxidação dos

---

<sup>1</sup>FENTON, H. J. H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. **Journal of the Chemical Society**, v. 65, p.899-910, 1894.

mais diferentes compostos orgânicos, principalmente fármacos e hormônios em água (LI; ZHANG, 2014).

Testado já na década de 50, o processo foto-Fenton utiliza-se de radiação a fim de acelerar e aumentar o rendimento da oxidação. Além das reações já conhecidas no processo Fenton (Equação 5), a presença de radiação pode levar a reações paralelas tais como a fotólise de peróxido de hidrogênio (Equação 6) e a redução do  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  (Equações 7 e 8) que contribuem para o aumento da geração de radicais hidroxilas e para a regeneração do catalisador, fechando, com isso, um ciclo oxidação/redução dos íons ferro que possibilita um maior rendimento do processo além da economia de reagentes (NOGUEIRA *et al.*, 2007).

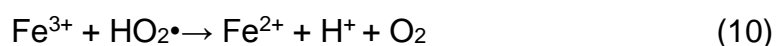


No entanto, em processos cuja fonte de radiação é o sol, a reação de fotólise do peróxido de hidrogênio (Equação 6) torna-se desprezível devido ao espectro emitido por essa fonte (BAUER; FALMANN, 1997). Isso torna atrativas as reações que utilizam como fonte de radiação o sol, pois torna o processo mais barato e mais ambientalmente correto (MALATO *et al.*, 2009)

Outro fator de relevante influência nas reações de Fenton é o pH. Isso se dá pela precipitação do ferro em pH maiores que 3 e a redução na presença de espécies ferrosas fotoativas no meio, levando os pesquisadores a optar por realizar o processo em pH em torno de 2,8, garantindo assim que o ferro adicionado se mantenha dissolvido (CARRA *et al.*, 2013). A presença de matéria orgânica no meio, porém, pode auxiliar na solubilidade do Fe. Em pH neutro, íons férricos possuem capacidade de formar complexos orgânicos fotoativos, como por exemplo complexos férricos com íons carboxilados (SPUHLER *et al.*, 2010). Essas observações trazem novas possibilidades para que as reações de Fenton sejam realizadas em pH próximo à neutralidade, possibilitando a redução de custos com reagentes para o ajuste de pH do meio.

A partir de então, tornou-se comum o emprego de processos mediados por complexos ferro-orgânicos, a exemplo do complexo ferroxalato. Segundo Hislop e Bolton (1999), seu emprego possibilita uma melhora do rendimento quântico da redução de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  no meio e, por consequência, aumenta a concentração de radicais hidroxila no meio. Além de dificultar a precipitação do ferro em pH mais próximo da neutralidade, os complexos Fe-oxalato ampliam a faixa de absorção de radiação, sendo possível levar o processo sob radiação solar (DOUMIC *et al.*, 2015).

Alguns estudos, no entanto, abrem mão do suporte de complexos orgânicos para realizar seus experimentos em pH neutro. Isso se dá devido à contribuição deste para o aumento de carbono orgânico dissolvido no meio, algo indesejável quando se trata de um tratamento terciário ou quando a amostra tratada será descartada no meio ambiente (CARRA *et al.*, 2013), por exemplo. Sob estas condições, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode reagir com  $\text{Fe}^{3+}$  em reações secundárias (Equações 9 e 10), gerando radicais menos energéticos mas também oxidantes, ficando esse sistema conhecido como *like-Fenton* (AGUIAR *et al.*, 2007).



Seguindo essa linha, o trabalho desenvolvido por Carra e colaboradores (2013) propôs a degradação de uma mistura de pesticidas, utilizando processo foto-Fenton solar em pH neutro. Os autores usaram como estratégia para alcançar melhores resultados, a adição do ferro II em pequenas doses durante o tratamento. Com isso, conseguiram mostrar eficiência semelhante quanto à mineralização dos contaminantes quando comparada à mesma reação em pH 2,8 e com uma dosagem única de  $\text{Fe}^{2+}$ .

Com vistas à maior aplicação das reações foto-Fenton por radiação solar, o intenso estudo e desenvolvimento de reatores fotocatalíticos solares tornou, nas últimas décadas, o processo atrativo frente aos custos e aplicabilidades em maiores escalas (TIBURTIUS, 2008). Dentre as configurações de reatores, merece destaque as do tipo Coletor Parabólico Composto (do inglês *Compound Parabolic Concentrator* - CPC) devido ao seu baixo custo de implementação e manutenção, por possibilitar o tratamento em regime contínuo e por aproveitar também a radiação difusa além da direta (DUARTE *et al.*, 2005).

Escolhida por sua eficiência, essa configuração de reator tem sido estudada tanto para remediação quanto desinfecção de água e efluentes (MALATO *et al.*, 2009). Os reatores CPC também foram adotados na Plataforma Solar de Almería (Figura 3), na Espanha, um renomado centro de estudos sobre a energia solar criado há mais de 30 anos e mantido pela União Europeia, que se tornou referência mundial no estudo do uso da energia solar (MALATO *et al.*, 2002; PSA, 2014).

**Figura 3 - Visão parcial da planta de demonstração da Plataforma Solar de Almería, mostrando reator do tipo CPC, adotado para os experimentos solares realizados na instituição.**



**Fonte: MALATO *et al.*, 2002.**

A aplicação de foto-Fenton solar no tratamento de esgoto sintético mostrou-se mais eficiente quando comparado à fotocatalise heterogênea, alcançando 80% de remoção de orgânicos do meio após 4 horas de irradiação (KOSITZI *et al.*, 2004). Visando à degradação de antibióticos em água, Michael e colaboradores (2012) utilizaram o reator tipo CPC para oxidação por foto-Fenton solar, obtendo como resultado uma remoção total do contaminante já nos primeiros 25 minutos de tratamento. Porém, foi necessário dar continuidade ao tratamento devido à elevada toxicidade de compostos intermediários de degradação.

Na degradação de cianotoxinas, mais especificamente de microcistina-LR, diversos trabalhos testaram a fotocatalise heterogênea, com sucesso, no tratamento deste contaminante. Antoniou e colaboradores (2008) estudaram a influência do pH na eficiência da degradação de microcistina-LR por fotocatalise heterogênea, assistida por radiação UVA artificial, bem como elucidaram os subprodutos formados durante a reação. Pode-se concluir que a degradação da toxina é facilitada em pH

ácido, chegando a remoção acima de 90% com apenas 30 min de tratamento. Também almejando encontrar catalisadores que possibilitem a fotocatalise sob radiação solar, Grahan e colaboradores (2010) propuseram 5 diferentes fotocatalisadores na degradação de microcistina-LR. O que apresentou melhor eficiência na absorção da radiação visível e conseqüentemente na degradação da toxina foi o filme de  $\text{TIO}_2\text{-Rh(III)}$ , com 90% de degradação em apenas 20 minutos de tratamento.

A reação foto-Fenton também mostrou-se bastante atrativa para tais fins. Segundo Bandala *et al.* (2004), tal processo, quando assistido por radiação UV-vis artificial, foi capaz de remover 84% de microcistina-LR após 25 min e 100% após 40 minutos de tratamento, demonstrando a aplicabilidade desse processo também sob radiação solar. Mais recentemente, avaliou-se a eficiência do processo foto-Fenton solar, em reator tipo CPC, para degradação de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de microcistina-LR. Já nos primeiros 10 minutos de tratamento, degradação superior a 90% foi alcançada (FREITAS, 2008).

Apesar dos bons resultados, muito há por se explorar quanto à influência da presença de matéria orgânica e íons inorgânicos na eficiência desses processos, bem como quanto à geração de subprodutos de degradação e toxicidade pós-tratamento dos mais diversos contaminantes.

### 3.4 ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE

A preocupação com o impacto da inserção dos mais diversos compostos no meio ambiente levou ao surgimento da Ecotoxicologia. Esta ciência se dedica ao estudo dos efeitos adversos causados aos organismos vivos pelas substâncias químicas presentes no ambiente e veio sanar questionamentos e limitações que análises físicas e químicas não poderiam responder (KNIE; LOPES, 2004).

A principal ferramenta da qual a Ecotoxicologia se utiliza para avaliar tais efeitos adversos são os bioensaios. Apesar dos primeiros testes realizados datarem de 1863 e 1917, somente em 1970 é que se estabeleceram critérios e normas para a execução de tais ensaios, com vistas a torná-los práticos, confiáveis e reprodutíveis (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Esses bioensaios têm como objetivos possibilitar o estabelecimento de limites para várias substâncias químicas, puras ou em misturas, cujas concentrações

o meio ambiente é capaz de suportar sem danos expressivos e, também, avaliar como e quais impactos tais poluentes causam à biota (KNIE; LOPES, 2004).

Além de avaliar concentrações ambientalmente aceitáveis de diversos compostos, os ensaios ecotoxicológicos também exercem seu papel na avaliação da eficiência de vários tratamentos de águas residuárias (METCALF; EDDY, 2003). Isso se justifica pela possibilidade de formação de produtos de degradação com toxicidade igual ou superior à inicial, e ainda assim serem eficientes quando considerados apenas parâmetros físicos e químicos (RIZZO, 2011).

A exemplo, Klammerth e colaboradores (2010) demonstraram a necessidade da boa operação do processo foto-Fenton solar para o tratamento de atrazina, diclofenaco, carbamazepina e cetorolaco em esgoto doméstico real e sintético. Apesar de degradar os contaminantes de maneira satisfatória, quando a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionada foi subdimensionada, pode-se observar um aumento na toxicidade para *Vibrio fischeri*, corroborando mais uma vez com a importância dos ensaios ecotoxicológicos como parâmetro à avaliação de tratamentos.

Frente à grande biodiversidade encontrada nos mais diversos ecossistemas, são necessários critérios para a escolha do organismo-teste a serem utilizados nestes bioensaios. Para tanto, é imprescindível considerar a representatividade do organismo, sua sensibilidade ao poluente que se quer estudar, a sua disponibilidade, e que o organismo faça parte da cadeia trófica do ambiente a ser estudado ou ao fim que se deseja dar à amostra tratada. A normatização dos ensaios com tais organismos também é fator importante na sua escolha (IAP, 1997; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Além dos organismos-teste, outros fatores bióticos e abióticos interferem nos resultados dos testes de ecotoxicidade e merecem atenção, a citar: o estágio de vida do organismo, tamanho, idade, estado nutricional, pH, oxigênio dissolvido, temperatura, dureza da água, características físico-químicas da amostra a ser testada e tempo de exposição à amostra. Esses parâmetros precisam ser conhecidos, monitorados e padronizados, a fim de garantirem a confiabilidade dos dados a serem obtidos, tanto nos ensaios crônicos, os quais duram grande parte do ciclo de vida ou se iniciam em estágios de vida iniciais, quanto nos agudos, de menor duração e que avaliam efeitos severos (AZEVEDO; CHASIN, 2004; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Devido ao aumento da preocupação com a qualidade ambiental, a ecotoxicologia passou a ser considerada nas legislações de todo o mundo, no que se refere à imposição de limites de concentração de substâncias químicas no meio ambiente e como critério de qualidade de água (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Sob influência das legislações e normas internacionais, como as preconizadas pela OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*), ISO (*Internacional Organization for Standardization*) e DIN (*Deutches Institut für Normung*), o Brasil passou a adotar os bioensaios em sua legislação (KNIE; LOPES, 2004). Atualmente, as resoluções CONAMA nº 357/05 (BRASIL, 2005) e nº 430/11 (BRASIL, 2011a) já preveem parâmetros ecotoxicológicos na classificação de corpos hídricos e no padrão de despejo de efluentes, respectivamente. No estado do Paraná, tem-se, por exemplo, as resoluções CEMA nº 70 (PARANÁ, 2009) e CEMA nº 81 (PARANÁ, 2010), as quais preconizam dois bioensaios crônicos e dois agudos com organismos de diferentes níveis tróficos, bem como dispõe valores limites para o fator de toxicidade (FT) para cada tipo de efluente a ser lançado nos corpos hídricos, contemplando organismos-teste clássicos e cuja metodologia de teste já é normatizada.

Conhecidamente tóxica, a hepatoxina microcistina-LR é constantemente foco de trabalhos que visam testar novos organismos que sejam sensíveis a este contaminante, ou avaliar a eficiência de tratamentos pela redução da toxicidade de amostras.

El Khalloufi e colaboradores (2012) avaliaram a interferência de extrato de cianobactérias, coletadas em um reservatório de água, contendo microcistinas em água de irrigação, quanto à germinação de *Lycopersicum esculentum*. Neste trabalho, pode-se concluir que 22,24 µg mL<sup>-1</sup> do extrato inibiu a germinação de 85% dos organismos testados.

Em sementes de *Lepidium sativum* (agrião), foram avaliados os efeitos da exposição a 1 e 10 µg L<sup>-1</sup> de microcistina-LR sobre a germinação e desenvolvimento da planta. Concluiu-se que 10 µg L<sup>-1</sup> da toxina é capaz de inibir significativamente o crescimento das raízes e folhas, e reduzir o peso seco da plântula com apenas 6 dias de exposição. Além disso, mesmo em concentrações menores (1 µg L<sup>-1</sup>), foram observadas estimulações na ação de glutathione-S-transferase e glutathione peroxidase (GEHRINGER *et al.*, 2003).

A partir de ensaio cometa, a genotoxicidade para *Oreochromis niloticus* foi confirmada pela exposição dos organismos a  $6,9 \mu\text{g kg}^{-1}$  até  $13,80 \mu\text{g kg}^{-1}$  de extrato de *Microcystis ssp.*, sendo observada em baixas concentrações do extrato apoptoses em maior número que necroses (SILVA; PIRES; GRISOLIA, 2011).

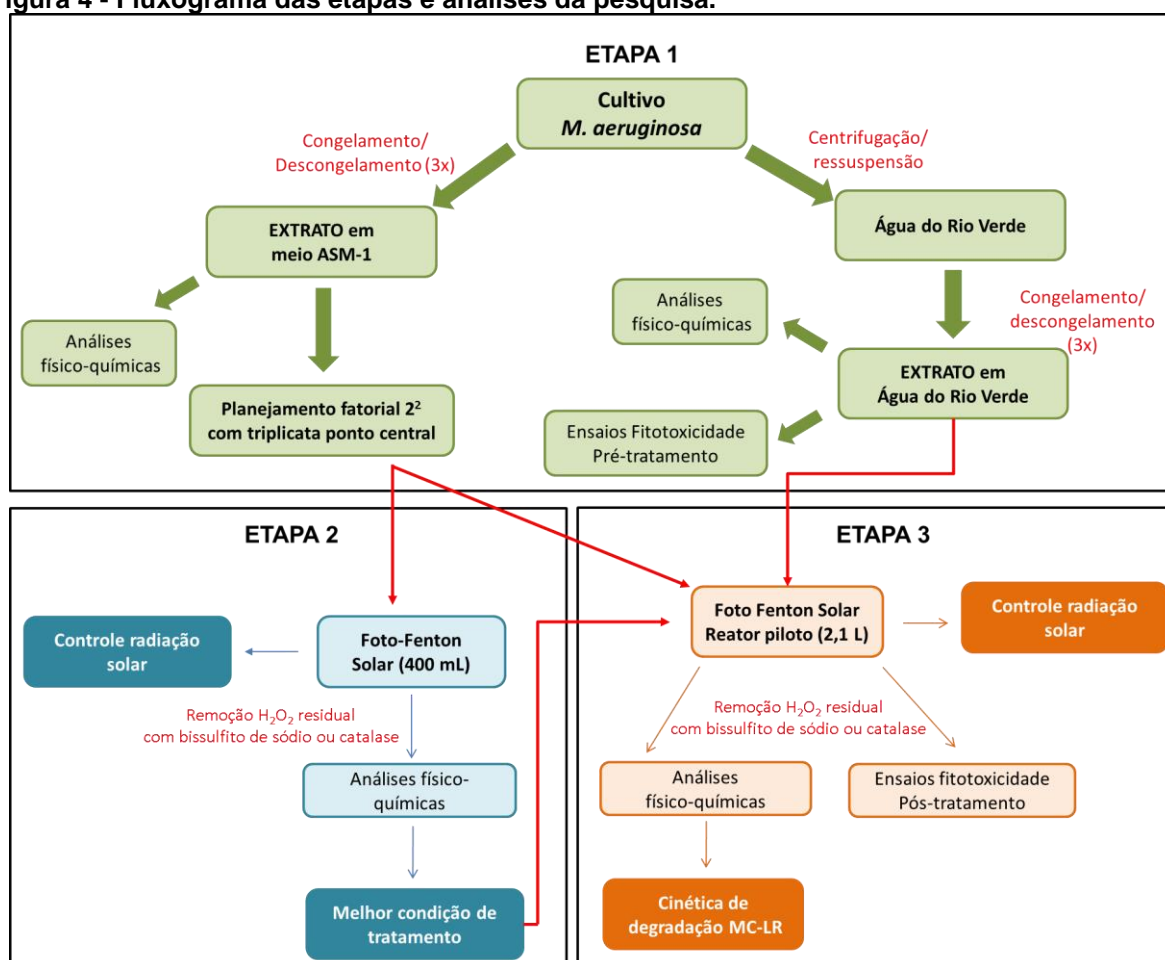
Smutná e colaboradores (2014) demonstraram por meio de testes crônicos e agudos que *Daphnia magna* é sensível para biomassa de cianobactérias apresentando  $CL_{50}=35,6 \text{ mg L}^{-1}$  para ensaio com 21 dias de exposição; no entanto, não demonstrou toxicidade aguda acentuada para este organismo.



## 4 METODOLOGIA

As várias etapas e análises descritas nesta metodologia estão organizadas no fluxograma (Figura 4), para melhor compreensão do trabalho. As metodologias utilizadas, bem como os resultados obtidos nas etapas do trabalho, serão apresentadas detalhadamente nos itens subsequentes.

Figura 4 - Fluxograma das etapas e análises da pesquisa.



Fonte: Autoria própria.

### 4.1 CULTIVO DE *Microcystis aeruginosa* E OBTENÇÃO DO EXTRATO

A obtenção da matriz utilizada nesse estudo se inicia com o cultivo da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*. A cepa utilizada neste trabalho, BB005, foi obtida do seu isolamento a partir de florações ocorridas no reservatório de Barra Bonita (São Paulo) e cedida pelo Prof. Dr. Armando Augusto H. Vieira, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos.

O organismo foi cultivado no Laboratório de Limnologia, Ecologia e Cromatografia (LLiEC) da UTFPR, seguindo as condições de cultivo utilizadas por Soares, Magalhães e Azevedo (2004) e Jiang e colaboradores (2008), sendo então o cultivo mantido sob fotoperíodo de 14 h claro e 10 h escuro, luminosidade de aproximadamente  $2150 \pm 230$  lux e temperatura variando entre 23 e 30 °C.

Erlenmeyers com capacidade para 2 L contendo 1,8 L de meio ASM-1 (ANEXO A) autoclavado (GORHAM *et al.*, 1964) foram inoculados a partir de cultivos anteriores, para obtenção de inóculo inicial contendo  $1.10^5$  células mL<sup>-1</sup>.

Esses frascos foram mantidos por 21 dias sob as condições previamente descritas, até alcançarem densidade celular entre  $1.10^6$  a  $2.10^6$  células mL<sup>-1</sup>, a qual foi conferida por contagem em câmara de Neubauer. O tempo para atingir tal densidade celular foi padronizado após estudo cinético do crescimento da *M. aeruginosa*. Para a obtenção da curva de crescimento, foram realizadas contagens do cultivo em câmara de Neubauer a cada dois dias. A densidade celular obtida foi correlacionada com o tempo de cultivo. Durante todo o período do cultivo, os frascos foram abertos somente em fluxo laminar, tomando-se os devidos cuidados para manter a assepsia do cultivo.

Após atingida a densidade celular desejada, o cultivo era fracionado em frascos PET previamente limpos e então submetido a 3 ciclos de congelamento e descongelamento para que ocorresse o rompimento das células de *M. aeruginosa* e, conseqüentemente, a liberação da toxina para o meio extracelular (SILVEIRA, 2012). O rompimento celular pode ser confirmado por visualização do cultivo em microscópio óptico (Primo Star ZEISS®), no aumento de 400 vezes.

O material resultante foi nomeado como “Extrato bruto em meio ASM-1”, foi utilizado nas etapas 2 e 3 do presente estudo. Este extrato de células lisadas em meio ASM-1, foi mantido refrigerado a -20 °C até o seu uso.

Para a etapa 3 deste trabalho, avaliou-se a eficiência do processo foto-Fenton solar também em água natural. Para tanto, foi necessária a obtenção de um extrato que não tivesse em sua composição o meio ASM-1.

Foram coletados 6 L de amostra de água no reservatório do Rio Verde em junho de 2016, em frascos de polietilenotereftalato (PET) previamente limpos com água de osmose reversa. Este reservatório está localizado em Araucária, na região metropolitana de Curitiba (PR) (-25°908.1” S; -49°28’03.1” O).

Para a obtenção desse extrato em água natural, foi realizado o cultivo de *M. aeruginosa* em meio ASM-1, também por 21 dias, seguindo a mesma metodologia anteriormente mencionada. Após este período, o cultivo tinha sua densidade celular quantificada por contagem em câmara de Neubauer. Para separar as células ainda intactas do meio ASM-1, seguiu-se uma etapa de centrifugação do cultivo.

Porções de 40 mL do cultivo foram transferidos para tubo tipo Falcom (50 mL), e centrifugado a 10 000 rpm, por 20 min e 20 °C (microcentrífuga modelo CF15RN Hitachi®). O sobrenadante era descartado e mais uma nova alíquota de 40 mL do cultivo era transferida para o tubo para centrifugação. Esse processo foi realizado seguidas vezes até que todo o cultivo fosse centrifugado e fosse obtido um “pellet” contendo as células de *M. aeruginosa* ainda intactas. Ainda em tubo Falcom, o “pellet” era ressuscitado em solução de NaCl 0,1% para “lavagem” do meio, objetivando a remoção de qualquer residual do meio ASM-1. Este processo de lavagem foi realizado por duas vezes e o sobrenadante também foi descartado.

As células centrifugadas foram então ressuscitada em água do Rio Verde, sendo esta previamente filtrada em fibra de vidro 1,2 µm (Axiva), em volume igual ao do cultivo centrifugado. A densidade celular pós centrifugação foi quantificada novamente por contagem em câmara de Neubauer.

Seguiu-se então, assim como para o extrato bruto em meio ASM-1, com os ciclos de congelamento e descongelamento do extrato, o qual foi mantido refrigerado a -20 °C até que o ensaio foto-Fenton solar fosse realizado nesta amostra. Este extrato foi nomeado “Extrato Bruto em Água do Rio Verde”.

É necessário frisar que para todos os extratos bruto utilizados neste trabalho, nenhuma etapa de filtração foi aplicada antes do processo avançado de oxidação.

#### 4.1.1 Análise de íons inorgânicos no extrato: série do nitrogênio, cloreto e fósforo total

Para a quantificação de íon cloreto no extrato, a amostra foi titulada com solução de AgNO<sub>3</sub>, conforme descrito no método 4500 do “*Standard Methods*” (APHA,2012). Os resultados foram expressos em mg Cl<sup>-</sup> L<sup>-1</sup>.

As análises de fósforo e da série nitrogenada foram realizadas no Laboratório de Saneamento (DAQBi/UTFPR) e utilizaram métodos da série 4500 do “*Standard*

*Methods*” (APHA, 2012). Titulometria foi o recurso escolhido na quantificação de nitrogênio orgânico Kjeldahl (NTK) e nitrogênio amoniacal enquanto que para as análises de nitrito e nitrato a quantificação se deu por espectrofotometria. Os resultados foram expressados em  $\text{mg N L}^{-1}$ . Também quantificado por espectrofotometria, o fósforo total presente nas amostras foram expressos em  $\text{mg PO}_4^{3-} \text{L}^{-1}$ .

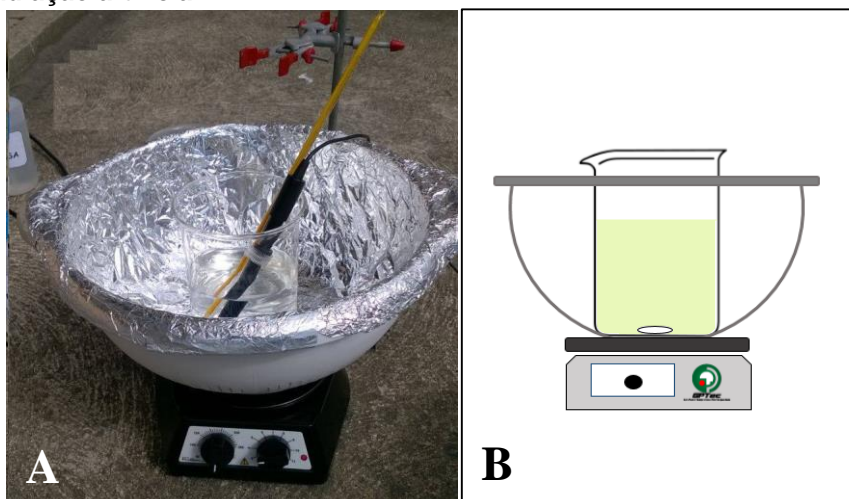
## 4.2 REATORES

### 4.2.1 Reator de Bancada Assistido por Radiação Solar

Para os ensaios que visam avaliar as condições experimentais, conduzidas na etapa 2 do projeto (Figura 4), foi utilizado um reator em escala de bancada.

O reator de bancada, construído com vidro borossilicato, é cilíndrico, possui 9 cm de diâmetro, abertura na parte superior, capacidade para tratar 400 mL em batelada e é equipado com agitação magnética. A radiação solar pode ser concentrada utilizando-se de coletor parabólico revestido de papel alumínio (Figura 5).

**Figura 5 - Foto (A) e representação esquemática (B) no reator fotoquímico com radiação artificial.**

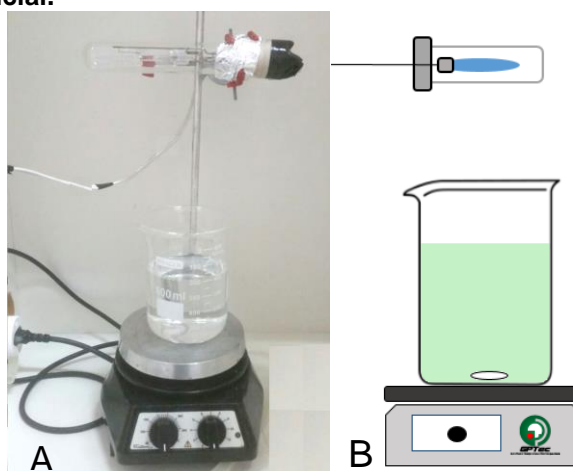


Fonte: Autoria própria.

#### 4.2.2 Reator de bancada assistido por luz artificial

Para o ensaio que avaliou o efeito da matriz na eficiência do processo foto-Fenton, utilizou-se um reator de bancada assistido por luz artificial. Este reator consiste em um recipiente cilíndrico de borossilicato, com 9 cm de diâmetro e abertura na parte superior. Com capacidade para tratar 400 mL, em batelada, é equipado com agitação magnética. A lâmpada utilizada foi uma lâmpada de vapor de mercúrio de alta pressão, 125 W de potência (Philips) e desprovido do seu bulbo original, o qual foi substituído por um bulbo de borossilicato (Pirex). A lâmpada foi posicionada acima do reator na posição horizontal, a uma distância de 20 cm acima do reator (Figura 6).

**Figura 6- Foto (A) e representação esquemática (B) do reator fotoquímico assistido por radiação artificial.**



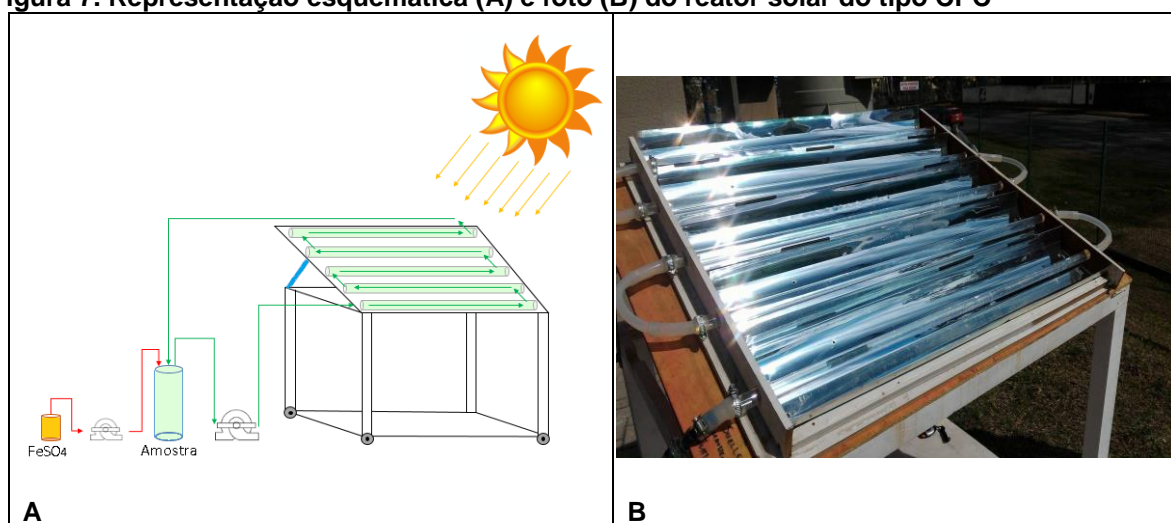
**Fonte: Autoria própria.**

#### 4.2.3 Reator em escala piloto tipo Coletor Parabólico Composto (CPC), assistido por luz solar

Durante a etapa 3 deste trabalho (Figura 4), após escolhida a melhor condição experimental dentre as testadas no planejamento fatorial  $2^2$ , foi utilizado um reator solar do tipo Coletor Parabólico Composto (CPC) (MALATO *et al.*, 2002), o qual é composto por cinco tubos de vidro borossilicato com diâmetro interno de 1,8 cm e diâmetro externo de 2,2 cm, por onde circulava o extrato contendo microcistina-LR, um reservatório de amostra com capacidade para 1 litro, bomba peristáltica de recirculação (modelo AWG5000-A, Provitec), bomba peristáltica dosadora (modelo SJ-I211, Atta) e tubos conectores. Os refletores são

confeccionados em alumínio de alta reflectância e fixados em uma base com ajuste regulável quanto ao ângulo de inclinação, para obtenção do máximo aproveitamento da radiação solar (considerando a latitude da cidade de Curitiba, o reator foi operado com inclinação de 25°). A área de irradiação é de 780 cm<sup>2</sup>, e o volume da amostra irradiada é de aproximadamente 1,1 L (Figura 7). O volume morto do reator é de 550 mL. Para cada um dos ensaios foram necessários 2,1 L de amostra.

**Figura 7. Representação esquemática (A) e foto (B) do reator solar do tipo CPC**



Fonte: Autoria própria.

Para os ensaios realizados em reator CPC, a bomba de recirculação funcionou em vazão máxima (1,7 L min<sup>-1</sup>). Nesta vazão, o tempo de residência nos coletores é de 39 segundos e o tempo de recirculação é de 75 segundos.

A dosagem de sulfato ferroso foi realizado por bomba peristáltica de baixa vazão, a partir de uma solução de FeSO<sub>4</sub> à 1000 mg L<sup>-1</sup>. A vazão da bomba foi ajustada a cada ensaio para que a dosagem ocorresse por 75 segundos, considerando o tempo de recirculação calculado e a concentração a ser dosada, nos tempos do processo foto-Fenton solar pré-determinados para a dosagem.

A amostragem para controle do processo foi realizado na saída do reator, sempre 1 minuto após cessada as dosagens de FeSO<sub>4</sub>.

### 4.3 PROCESSO FOTO-FENTON SOLAR: PLANEJAMENTO E DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

#### 4.3.1 Estudo do efeito das variáveis $\text{Fe}^{2+}$ e $\text{H}_2\text{O}_2$ na eficiência do processo foto-Fenton solar

A fim de avaliar a influência das variáveis experimentais (dosagem de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) na eficiência do processo foto-Fenton solar, foi realizado um planejamento experimental fatorial completo  $2^2$  com ponto central, sendo que as condições do ponto central foram reproduzidas em triplicata verdadeira (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). A fim de avaliar os efeitos de fotólise,  $\text{H}_2\text{O}_2$  sob radiação,  $\text{Fe}^{2+}$  sob radiação e efeitos isolados dos fatores estudados na degradação da toxina, experimentos foram realizados aplicando os mesmos procedimentos utilizados para os ensaios do planejamento fatorial.

Ao total, foram realizados 12 ensaios, em reator de bancada assistido com radiação solar, aplicando 400 mL de extrato bruto em cada ensaio.

A fim de variar a proporção  $[\text{Fe}^{2+}]/[\text{H}_2\text{O}_2]$  entre os experimentos, mas ainda testar a melhor proporção encontrada no trabalho de Carra e colaboradores (2013), adotou-se como nível mínimo de  $\text{Fe}^{2+}$  a ser dosado a proporção  $[\text{Fe}^{2+}]/\text{DQO}=0,212$  e para o nível máximo o dobro desta proporção. O valor de  $\text{Fe}^{2+}$  a ser dosado foi dividido em 5 dosagens de igual valor, a serem distribuídas ao longo do processo. A partir destes valores, obteve-se a matriz de planejamento a seguir (Tabela 2).

**Tabela 2 - Planejamento fatorial de experimentos completo  $2^2$  e ensaios de efeitos isolados para a degradação de microcistina-LR em extrato.**

Experimento	Radiação	$[\text{H}_2\text{O}_2]/\text{DQO}$	$[\text{Fe}^{2+}]/\text{DQO}$
1	Sim	2,12	0,212
2	Sim	4,24	0,212
3	Sim	2,12	0,424
4	Sim	4,24	0,424
5	Sim	3,18	0,318
6	Sim	3,18	0,318
7	Sim	3,18	0,318
8	Sim	0	0,424
9	Sim	3,18	0
10	Sim	0	0
11	Não	0	0,424
12	Não	3,18	0

A escolha da melhor condição testada foi amparada em tratamento estatístico de dados como gráfico de Pareto e teste t de Student (VICENTINI *et al.*, 2011).

Os ensaios foram realizados entre os meses de abril e junho de 2016, na cidade de Curitiba-PR (-25°44'31.36" S; -49°35'38.53" O) sempre em dias predominantemente ensolarados e no período entre 11h e 14h.

O extrato bruto submetido ao tratamento (seção 4.1) foi descongelado em banho-maria a 40 °C, uma hora antes do início do tratamento, sendo mantido ao abrigo de luz. É importante ressaltar que o pH do extrato bruto (próximo a 7,8) não foi alterado para a realização dos experimentos. As amostras do extrato bruto (400 mL) foram transferidas para o reator de bancada (Figura 5) assistido por radiação solar e colocadas sob constante agitação magnética. Em seguida, foi adicionado peróxido de hidrogênio a partir de uma solução 35% (m/m) (Peróxidos do Brasil LTDA) e logo após a primeira adição de  $\text{Fe}^{2+}$  a partir de uma solução 1000 mg  $\text{Fe}^{2+}$   $\text{L}^{-1}$  ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - Vetec). Só então, o extrato era exposto à radiação solar. Além da adição inicial, novas dosagens de  $\text{Fe}^{2+}$ , de mesmo volume e concentração da adição inicial, foram realizadas nos tempos 15, 30, 45 e 60 min de tratamento.

Com o intuito de controlar parâmetros que indicam a efetividade do tratamento foto-Fenton, foram tomadas alíquotas de 6,5 mL, sempre 1 minuto após as dosagens de  $\text{Fe}^{2+}$  e nos tempos 90 e 120 min, para a quantificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  residual,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  dissolvidos, pH e temperatura.

Por sua vez, a análise da concentração de microcistina-LR foi realizada nos tempos 0, 90 e 120 min, sendo que neste último também foram realizadas análises de COD e DQO para caracterização da amostra pós tratamento.

A intensidade de radiação foi medida em intervalos de 5 min, durante todo o período do tratamento (radiômetro MRUR 202 Instrutherm®).

#### 4.3.2 Estudo do efeito de matriz na eficiência do tratamento

Com a finalidade de avaliar o efeito da composição do meio ASM-1 na eficiência do processo foto-Fenton, foram realizados experimentos com mesma concentração de matéria orgânica padrão (biftalato de potássio) dissolvida em diferentes matrizes: água de osmose reserva e meio ASM-1.

Os experimentos foram realizados utilizando reator de bancada assistido por radiação artificial. A lâmpada foi posicionada de forma que a radiação emitida pela



lâmpada, cuja intensidade UVA (radiômetro MRUR 202 Instrutherm) chega à superfície da amostra com cerca de  $0,85 \text{ mW cm}^2$ , fosse muito próxima à observada nos experimentos foto-Fenton solar.

Para estes experimentos, foram dissolvidos 20 mg de biftalato de potássio (Vetec), previamente seco em estufa a  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  (concentração final de  $50 \text{ mg C}_8\text{H}_5\text{O}_4\text{K L}^{-1}$ ), em 400 mL de água de osmose reversa ou em 400 mL de meio ASM-1. Após ser transferida para o reator, a amostra foi colocada sob agitação constante e o pH da mesma ajustada para 7,8, utilizando soluções de  $\text{NaOH } 1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ . Com base na DQO da amostra, analisada na amostra antes de iniciar o processo, era feita a dosagem de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e logo em seguida a dosagem inicial de  $\text{Fe}^{2+}$ . Assim como nos experimentos da seção 4.3.1, após a dosagem inicial, seguiam-se mais 4 dosagens de  $\text{Fe}^{2+}$  de igual concentração nos tempos de reação 15, 30, 45 e 60 min.

Foram monitorados pH, temperatura,  $\text{H}_2\text{O}_2$  residual, Fe total dissolvido, COD e DQO, após 90 e 120 minutos de reação.

#### 4.3.3 Experimentos foto-Fenton solar em reator tipo CPC

Após escolhida a melhor condição para a realização dos ensaios foto-Fenton solar em reator tipo CPC, os ensaios foram realizados no mês de julho de 2016, na cidade de Curitiba-PR ( $-25^\circ 44' 31.36'' \text{ S}$ ;  $-49^\circ 35' 38.53'' \text{ O}$ ), em diferentes dias, sendo todos predominantemente ensolarados. Os experimentos ocorreram no período de maior intensidade de radiação, entre 11h e 14h.

O extrato bruto submetido ao processo (seção 4.1) foi descongelado em banho maria a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , uma hora antes do início do tratamento, sendo mantido ao abrigo de luz até o início do tratamento. O pH do extrato bruto (próximo a 7,8) não foi alterado para a realização dos experimentos. Com base na DQO inicial da amostra, seguiu-se com a dosagem de  $\text{H}_2\text{O}_2 35\% \text{ (m/m)}$  (Peróxidos do Brasil LTDA) no extrato bruto, o qual foi rapidamente homogeneizado manualmente e transferido para o reservatório de amostra do reator, sendo bombeado até que os 2,1 L de amostra preenchessem completamente o reator e o volume morto. Durante esse período, tanto a amostra quanto o reator permaneceram ao abrigo de luz. O processo se iniciava com a primeira dosagem de  $\text{Fe}^{2+}$ , feito pelo gotejamento da solução de  $\text{Fe}^{2+}$  ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ - Vetec) dentro no recipiente de amostra, em vazão e

período controlados. A amostra de saída do reator, retornava ao recipiente de amostra, e a turbulência garantia a homogeneização do meio. Só então, o extrato era exposto à radiação solar. Após adição inicial, novas dosagens de  $\text{Fe}^{2+}$ , de mesmo volume e concentração, foram realizadas nos tempos 15, 30, 45 e 60 min de tratamento.

Para o controle dos parâmetros que indicam a eficiência do processo foto-Fenton, foram tomadas alíquotas, na saída do reator, nos tempos 2, 17, 32, 62, 90 e 120 minutos de reação, para a quantificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  residual,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  dissolvidos e microcistina-LR, bem como a determinação de pH e temperatura. Ao final do processo, 120 min, além das análises já descritas, eram aliqüotadas amostras para análise de turbidez, cor aparente, cor verdadeira,  $\text{UV}_{254\text{nm}}$ , COD e DQO.

Para o extrato bruto em água do Rio Verde, foram reservados 20 mL de amostra nos tempo 0, 62 e 120 min para os ensaio de fitotoxicidade em *Sinapis alba*.

A intensidade de radiação foi medida em intervalos de 5 min, durante todo o período do tratamento (radiômetro MRUR 202 Instrutherm®).

#### 4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

##### 4.4.1 Extração em fase sólida (SPE) de microcistina-LR e ensaio de recuperação

Anteriormente à análise cromatográfica, procedeu-se uma etapa de preparo das amostras por extração em fase sólida (SPE), objetivando remoção de substâncias passíveis de contaminação do sistema cromatográfico e concentração da microcistina-LR.

Nesta etapa foram utilizados cartuchos C18 (Applied Separations®, 1000 mg), os quais foram acoplados ao aparato tipo “*manifold*” (Agilent®) e bomba a vácuo (Logen Scientific®) com controle de pressão aplicada no sistema (-3,5 inHg).

Os cartuchos foram primeiramente condicionados com 10 mL de metanol, seguido de igual volume de água ultrapura. Na próxima etapa, 25 mL da amostra foi diluída a 100 mL com água de osmose reversa e então todo o volume (100 mL) foi aplicado no cartucho. O “*cleanup*” foi feito pela aplicação de 10 mL de água ultrapura no cartucho e eluição com 10 mL de metanol. Para a limpeza do cartucho, com fins à sua reutilização, aplicou-se-se acetoneitrila (10 mL). O solvente do eluato foi

completamente evaporado sob fluxo de ar comprimido, a amostra seca foi redissolvida em 0,5 mL de água ultrapura e homogeneizada em agitador para tubos (Vixar®). As amostras foram transferidas para recipientes tipo *vials* e 50 µL foram injetados em cada análise.

Para as amostras pós-tratamento, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual precisou ser removido adicionando solução de enzima catalase, conforme método descrito na seção 4.4.12, de forma a preservar a amostra e evitar que o oxidante residual danificasse o material sorvente do cartucho de SPE ou da coluna cromatográfica. Devido à formação de Fe precipitado após neutralização do pH da amostra, a extração em fase sólida foi precedida de centrifugação da amostra (40 mL) em tubo tipo Falcon, a 8000 rpm, por 20 min e 20 °C (microcentrífuga modelo CF15RN Hitachi®). O sobrenadante foi então utilizada de forma análoga à acima descrita.

Para verificar a eficiência do processo de extração, foram realizados ensaios de recuperação. Para tanto foi seguida a metodologia preconizada pela ANVISA na sua resolução nº 899/03 (BRASIL,2003).

Considerando a linearidade do método cromatográfico validado por TORRES (2016) (0,03 a 1,5 mg MC-LR L<sup>-1</sup>), foram selecionados 3 diferentes concentrações da toxinas a serem testadas: 0,1 , 0,7 e 1,3 mg L<sup>-1</sup>. Estas soluções de trabalho foram preparadas a partir de uma solução estoque do padrão de microcistina-LR a 1 mg L<sup>-1</sup> em água, obtendo-se soluções de 0,002 , 0,014 e 0,026 mg L<sup>-1</sup> em meio ASM-1 (considerando fator de concentração igual a 50), sendo cada um dos níveis preparados em triplicata. As amostras foram submetidas ao processo de extração e análise.

Para o cálculo de recuperação, as áreas dos picos das amostras extraídas, obtidas na análise cromatográfica, foram comparadas às áreas obtidas pela análise de padrão de microcistina-LR, nas mesmas concentrações (0,1, 0,7 ou 1,3 mg L<sup>-1</sup>), porém não submetidas ao processo de extração em fase sólida.

#### 4.4.2 Quantificação de microcistina-LR por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD)

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Prominence (Shimadzu®) equipado com bomba quaternária LC-2AT, degaseificador

DGU-20A, forno CTO-20A, detector (DAD) SPD-M20A e controladora CBM-20A. Este sistema é operado através do programa LCSolutions.

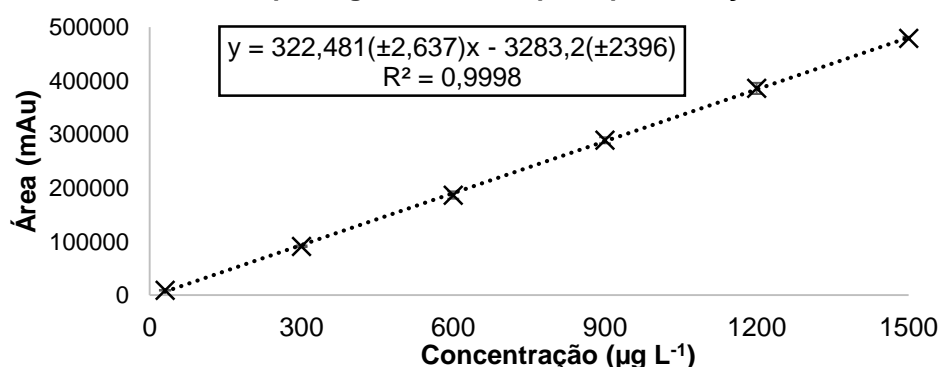
A coluna analítica utilizada apresenta fase estacionária octadecilsilica polimérica, com partículas de 3,4  $\mu\text{m}$  (XTerra, Waters®), 150 mm de comprimento e 3 mm de diâmetro interno. Foi utilizada pré-coluna C18 (Phenomenex®).

O método cromatográfico utilizado neste trabalho foi previamente desenvolvido e validado por Torres (2016, dados não publicados) e consiste dos seguintes parâmetros:

- Fase móvel: solução de ácido flúoracético 0,05% v/v (Himedia), como solvente A; e metanol (J. T. Baker) filtrado em membrana de PTFE 0,45  $\mu\text{m}$  (Unifil) como solvente B; vazão 0,3  $\text{mL min}^{-1}$ ; temperatura 35  $^{\circ}\text{C}$ . A separação foi realizada por método com eluição gradiente, da seguinte forma: concentração inicial de 50% de solvente B mantida isocraticamente por 50 min, seguida de gradiente de limpeza de 50 a 100% de solvente B em 2 min, mantendo-se em 100% por 20 min e retorno à condição inicial em 2 min.
- Volume de injeção: 50  $\mu\text{L}$
- As separações foram adquiridas no intervalo de 190 a 450 nm e os cromatogramas foram monitorados a 238 nm, que corresponde ao máximo de absorção das microcistinas análogas.

A curva de calibração para a quantificação da toxina, foi obtida por padronização externa, utilizando padrão de microcistina-LR (Enzo Life Sciences, 95% pureza) (Figura 8). O limite de quantificação (LQ) obtido foi de 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  e o intervalo estabelecido entre 30 e 1500  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Figura 8 - Curva analítica obtida por regressão linear para quantificação de microcistina-LR.



Fonte: TORRES, 2016.

#### 4.4.3 Análises Cromatográficas por LC-QTOF-MS

A confirmação da estrutura referente à banda cromatográfica atribuída à microcistina-LR foi realizada por experimentos de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Os experimentos foram conduzidos com amostra liofilizada do extrato de *M. aeruginosa*, seguindo os procedimentos descritos a seguir: preparou-se uma solução aquosa da amostra ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e utilizou-se o mesmo protocolo de preparo de amostra conduzido com os extratos líquidos recém-cultivados, aplicando-se 2 mL da solução em cartuchos de extração em fase sólida (Chromabond C18, 1000 mg). O eluato metanólico foi evaporado sob vácuo e redissolvido em 500  $\mu\text{L}$  de água ultrapura.

As análises foram realizadas por injeção de 5  $\mu\text{L}$  da amostra em coluna analítica C18 (Poroshell 120<sup>®</sup>, Agilent, 150 x 2,1 mm d.i., 2,7  $\mu\text{m}$  de diâmetro de partícula) utilizando fase móvel (vazão  $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ ) constituída de metanol (solvente B) e ácido fórmico 0,1% (solvente A) em iguais proporções (1:1 v/v) durante 30 minutos, seguido de gradiente de limpeza e reequilíbrio da fase estacionária.

Os experimentos foram conduzidos no laboratório Separare da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), utilizando cromatógrafo líquido de ultra alta performance (UHPLC Nexera<sup>®</sup>, Shimadzu), composto por duas bombas quaternárias (LC-30AD), autoinjeter (SIL-30AC), forno CTO-30A (35 °C) e válvula seletora para a comutação de colunas e detector de arranjo de diodos (SPDM-30A) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução (Impact HD<sup>®</sup>, Bruker Daltonics) com fonte de ionização do tipo *electrospray* (ESI, **modo positivo**) e analisador de massas híbrido quadrupolo/tempo de voo (QTOF). O sistema é operado simultaneamente pelos programas Hystar<sup>®</sup> (Shimadzu) e QtofControl<sup>®</sup> (Bruker); os dados obtidos foram analisados no sistema Data Analysis<sup>®</sup> (Bruker).

Os parâmetros ajustados para a fonte de ionização ESI foram: extensão da agulha 0,25 mm; pressão do gás de nebulização 3,0 bar; gás de secagem a  $12 \text{ L min}^{-1}$  e temperatura entre 250 a 300 °C. Os parâmetros no analisador foram: lentes de focalização a 200 V (RF1 e RF2); RF 60V para a energia de dissociação (CID - *collision induced dissociation*) no hexapolo; energia de íon no quadrupolo 5 eV. Para a cela de colisão, os parâmetros foram: energia 10 eV, RF 600 V, transfer line 70  $\mu\text{s}$  e tempo de pulso 5  $\mu\text{s}$ .

#### 4.4.4 Concentração de $\text{Fe}^{2+}$ e $\text{Fe}^{3+}$ dissolvidos

A reação de complexação entre  $\text{Fe}^{2+}$  e o-fenantrolina determina diretamente a concentração de íons ferrosos pela medição espectrofotométrica do complexo formado na região do visível (508 nm). A concentração de íons  $\text{Fe}^{3+}$ , por sua vez, consiste na diferença entre a concentração de ferro total e  $\text{Fe}^{2+}$  na amostra. Para tanto, hidroquinona foi adicionada ao meio de forma que o  $\text{Fe}^{3+}$  presente no meio fosse reduzido a  $\text{Fe}^{2+}$  e então o ferro total seja determinado da mesma maneira que o  $\text{Fe}^{2+}$  (APHA, 2012).

A curva de calibração foi obtida a partir de soluções padrão preparadas com solução de sulfato ferroso amoniacal, mostrando boa linearidade entre 0,1 e 4 mg L<sup>-1</sup> (R=0,9998). Para a quantificação da fração dissolvida de Fe, as amostras foram previamente filtradas em membrana de nitrato de celulose 0,45 µm (Unifil). Os resultados foram expressos em mg L<sup>-1</sup>.

#### 4.4.5 Concentração de peróxido de hidrogênio

Para a quantificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no meio, utilizou-se metodologia adaptada de Schick e colaboradores (1997). O método consiste na reação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com sal de titânio em pH ácido (reagente Allper®, Peróxidos do Brasil LTDA.), levando à formação de um complexo (peroxotitânio) de cor amarelada, a qual absorve fortemente em 395 nm. Duas curvas analíticas foram utilizadas neste trabalho, para diferentes faixa de concentração: curva de alta concentração com boa linearidade entre 10 e 50 mg L<sup>-1</sup> (r = 0,9997) e outra de baixa concentração, quantificando entre 0,1 a 10 mg L<sup>-1</sup> (r = 0,9997). As curvas foram cnstruídas a partir de soluções padrão de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , obtidas da diluição de uma solução comercial de  $\text{H}_2\text{O}_2$  35% m/m (Peróxidos do Brasil LTDA.). Os resultados foram expressos em mg  $\text{H}_2\text{O}_2$  L<sup>-1</sup>.

#### 4.4.6 Carbono orgânico dissolvido

Para a determinação de carbono orgânico dissolvido (COD), foi necessária a filtração da amostra em membrana de nitrato de celulose 0,45 µm (Unifil) e a acidificação a pH<2 com solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 mol L<sup>-1</sup>. Amostras que continham  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tiveram o residual removido com bissulfito de sódio, conforme metodologia da

seção 4.4.12. As amostras foram mantidas refrigeradas até a análise e tiveram o COD quantificado conforme o método 5310C do APHA (2012), pelo analisador de carbono HiPerTOC® (Thermo Scientific). Neste método, o valor de carbono orgânico dissolvido foi obtido pela diferença entre os valores de carbono total dissolvido e carbono inorgânico dissolvido. O método mostrou-se linear para concentrações de carbono total dissolvido e carbono inorgânico dissolvido entre 1 e 50 mg C L<sup>-1</sup>, com coeficientes de regressão 0,9991 e 0,9980, respectivamente. Os resultados foram expressos em mg C L<sup>-1</sup>.

#### 4.4.7 Demanda química de oxigênio

Para a determinação da DQO, fez-se uso do dicromato de potássio (Vetec) como agente oxidante. A digestão da amostra foi realizada a 150 °C por 2 horas em bloco digestor (Marconi) e a leitura do ensaio por espectrofotometria, pela absorção do íon Cr<sup>3+</sup> na região de 420 nm, conforme o método 5220D do APHA (2012). O método mostrou-se linear para valores entre 10 e 90 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (R=0,9945).

Do resultado obtido, foi descontada o valor da contribuição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (calculado estequiometricamente), considerando sua concentração na amostra (KANG; CHO; HWANG,1999). Os resultados foram expressos em mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>.

#### 4.4.8 Cor aparente e cor verdadeira

Para obter-se o valor de cor verdadeira da amostra foi necessário que se fizesse uma filtração prévia em filtro de nitrato de celulose 0,45 µm (Unifil), etapa não realizada na determinação da cor aparente. Amostras que continham H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tiveram o residual abatido com bissulfito de sódio (seção 4.4.12), para cessar a reação até que a análise fosse realizada. A amostra teve o pH corrigido para 7,6 com soluções de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>, e sua cor determinada por espectrofotometria com leitura em 455 nm, utilizando cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico (NSCEP, 1984). O método mostrou-se linear para valores entre 0 e 50 uH (R=0,9947) e entre 50 e 1000 uH (R=0,9996), sendo o resultado expresso em unidades Hazen (uH).

#### 4.4.9 Turbidez

As análises de turbidez foram realizadas em um turbidímetro da marca Hanna, modelo HI98703 calibrado com soluções padrão de formazina, cuja turbidez variava entre 0,2 e 984 NTU. As amostras eram agitadas e analisadas com base no Método 2130B do Standard Methods (APHA, 2012) e os resultados expressos em NTU. Amostras que continham H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tiveram o residual abatido com bissulfito de sódio (seção 4.4.12), para cessar a reação foto-Fenton e conservar a amostra até a realização da análise.

#### 4.4.10 Absorbância UV<sub>254</sub>

Após filtração em membrana de nitrato de celulose 0,45 µm (Unifil), as amostras foram analisadas em espectrofotômetro, com cubeta de quartzo 1 cm de caminho óptico, em 254 nm (USEPA, 2009). Os resultados foram expressos em unidades de absorbância. Amostras que continham H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tiveram o residual abatido com catalase, conforme metodologia da seção (4.4.12), para evitar danos ao equipamento e conservar a amostra. A mesma concentração de catalase adicionada à amostra, foi adicionada ao branco (água de osmose reversa), para que fosse descontada possíveis contribuições da catalase na absorbância em 254 nm.

#### 4.4.11 Quantificação da Intensidade Luminosa e Cálculo da Energia Acumulada

A intensidade média da radiação UVA (320 a 390 nm) durante os ensaios de foto-Fenton foi quantificada com auxílio de um radiômetro MRUR 202 (Instrutherm), com medições em intervalos de 5 minutos. Estes dados foram usados no cálculo de energia acumulada (Equação 11), a fim de comparar a eficiência obtidas por processos solares realizados em dias com diferentes intensidade de radiação UVA.

$$Q_{UV,n} = Q_{UV,n-1} + \Delta t \overline{UV_{G,n}} (A_r/V_t); \quad \Delta t_n = t_n - t_{n-1} \quad (11)$$

Onde,  $t_n$  é o tempo experimental de cada amostra medida em minutos,  $Q$  é a energia acumulada (kJ L<sup>-1</sup>),  $UV_{G,n}$  é a medida da intensidade média de radiação no



período ( $W m^{-2}$ ),  $A_r$  a área irradiada ( $m^2$ ) e  $V_t$  o volume total de amostra (L) que é irradiada (SIRTORI, 2010).

Com o intuito de normalizar os dados, corrigiu-se a intensidade média de irradiação dos experimentos para a condição de  $30 W m^{-2}$ , e representou-se os resultados em função do tempo de irradiação ( $t_{30W}$ ) (Equação 12).

$$t_{30W,n} = t_{30W,n-1} + \Delta t_n (UV/30)(V_i/V_t); \quad \Delta = t_n - t_{n-1} \quad (12)$$

Sendo  $V_i$  o volume de amostra submetida à radiação (L) e  $V_t$  o volume total de amostra (L) (ZAPATA *et al.*, 2010).

#### 4.4.12 Remoção do $H_2O_2$ residual

O consumo de  $H_2O_2$  residual pode ser feito de duas formas, com a adição de catalase ou de bissulfito de sódio, dependendo da análise realizada.

Para remoção com bissulfito de sódio, foram preparadas diariamente soluções em água de osmose reversa  $10 g L^{-1}$ . Testes previamente realizados no laboratório (dados não apresentados), visando o consumo total do bissulfito adicionado, chegaram a seguinte proporção: para consumir peróxido de hidrogênio em 10 mL de amostra, a cada  $mg H_2O_2 L^{-1}$  de residual, foram adicionados  $2 \mu L$  da solução de bissulfito.

Por sua vez, para remover  $H_2O_2$  com catalase, esta foi preparada pela dissolução de  $10 g$  catalase  $L^{-1}$ , em água de osmose reversa, a partir de catalase liofilizada em pó (Sigma Aldrich) (LUNA *et al.*, 2014). A solução foi mantida refrigerada a  $4 ^\circ C$  e ao abrigo de luz por até uma semana. Para a adição da catalase, foi necessário que o pH da amostra fosse neutralizado, com NaOH ou  $H_2SO_4 0,5 mol L^{-1}$ , para evitar a desnaturação da catalase. Para 100 mL de amostra, padronizou-se adicionar 4 gotas de catalase  $10 g L^{-1}$ . Esse volume foi suficiente para consumir  $H_2O_2$  em até 1 min, para residuais de até  $200 mg H_2O_2 L^{-1}$ .

Foram utilizadas fitas reativas semi-quantitativas Quantofix® (Macherey-Nagel) para averiguar a presença de  $H_2O_2$  no meio após consumo por bissulfito de sódio ou catalase. O método permite quantificar  $H_2O_2$  entre  $0,5$  e  $25 mg L^{-1}$ .

#### 4.5 ENSAIO DE FITOTOXICIDADE AGUDA EM *Sinapis alba*

As amostras de extrato bruto em água do Rio Verde, antes e após 62 e 120 min de processo foto-Fenton solar tiveram sua fitotoxicidade em sementes de *Sinapis alba* (mostarda amarela) testada.

Os ensaios foram realizados no laboratório de Ecotoxicologia (DAQBi/UTFPR) e a metodologia empregada foi adaptada de Kós *et al.* (1995) e de Sobrero e Ronco (2008). Primeiramente, as amostras submetidas ao processo foto-Fenton solar tiveram o pH ajustado para 7,0 e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual removido com catalase, conforme descrito na seção 4.4.12. As amostras foram mantidas congeladas a -20 °C até a realização dos bioensaios. Após descongeladas em temperatura ambiente, as amostras foram submetidas aos ensaios de fitotoxicidade em até 24 horas.

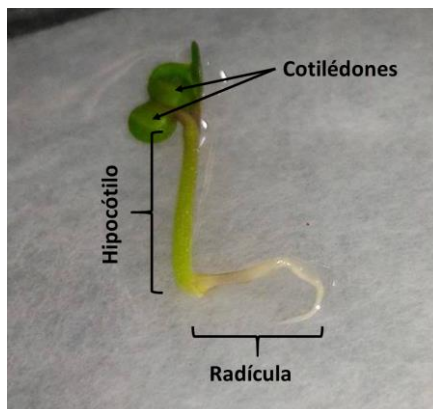
Placas de Petri foram previamente limpas em banho de HCl 10% e enxaguadas com água de osmose reversa. Papeis filtro qualitativo (Unifil, gramatura 80 g m<sup>-2</sup>) foram dispostos no fundo das placas para servirem como substrato às sementes. Para cada uma das amostras testadas, controle negativo (água de osmose reversa) e controle positivo (solução de glifosato comercial 6%, Dipil) foram utilizadas.

Cada uma das placas, previamente identificadas, recebeu 4 mL de amostra, disposta sobre o filtro de maneira homogênea, evitando formação de bolhas, e então 15 sementes de *Sinapis alba* foram cuidadosamente distribuídas em cada uma das placas, mantendo distância entre si. As placas de Petri foram embaladas em filme PVC para evitar perda de amostra por evaporação durante o período de incubação. Todas as amostras e controles foram testados em triplicata (n=45 sementes).

As placas foram incubadas por 120 h em câmara incubadora (Thelga, modelo TFA35U), equipada com fotoperíodo de 16 horas claro e 8 horas escuro, a 20 ± 2 °C.

Após o período de incubação, contou-se o número de sementes germinadas bem como se mediu, com auxílio de uma régua milimetrada, o comprimento de suas radículas (Figura 9). Padronizou-se, considerar germinadas, apenas as plantas com radículas medindo 2 mm ou mais.

Figura 9 - Identificação das diferentes partes da semente de *Sinapis alba* encubada e germinada.



Fonte: Autoria própria.

Com os dados de sementes germinadas foi possível obter o índice de germinação para cada uma das amostras e dos controle, conforme equação 14 (GARCIA *et al.*, 2009).

$$IG (\%) = \frac{\text{número de sementes germinadas por placa}}{\text{número total de sementes em cada placa}} \quad (14)$$

O teste foi aceito quando a taxa de germinação foi menor ou igual a 10% no controle positivo (glifosato 6%), maior ou igual a 90% no controle negativo (água de osmose) e coeficiente de variação, entre as médias das réplicas, foi menor ou igual a 30% no controle negativo (SOBRERO; RONCO, 2008).

As medidas de comprimento de radícula foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e teste t para comparação entre as médias.

Neste trabalho, além do extrato bruto em água do Rio Verde, antes e após processo foto-Fenton solar, foram submetidas aos bioensaios amostras denominadas “branco”. Essas amostras consistiam na água do Rio Verde, sem a adição das células de *M. Aeruginosa* obtidas no cultivo, antes e após processo foto-Fenton solar em reator solar, nos mesmos tempos de amostragem do extrato bruto em água do Rio Verde e nas mesmas condições experimentais.

Também foram realizados ensaios com soluções de microcistina-LR em água de osmose reversa (1 a 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), obtidas a partir da diluição de um padrão certificado da toxina (Enzo Life Sciences, 95% pureza). O mesmo ensaio de fitotoxicidade foi realizado com meio ASM-1. Estes experimento objetivaram avaliar a

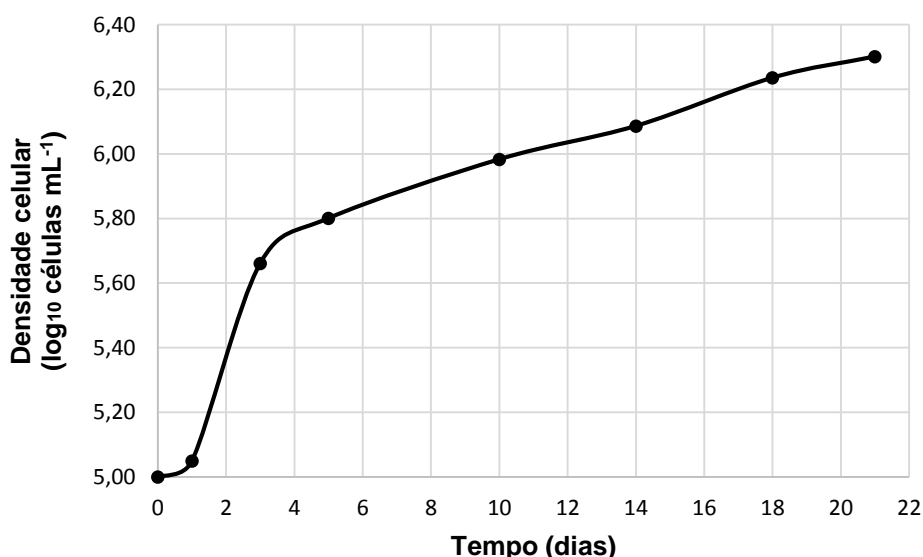
fitoxocidade da toxina e da matriz, isoladamente, sobre a germinação e crescimento de *Sinapis alba*.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CULTIVO DE *M. aeruginosa* E OBTENÇÃO DO EXTRATO

Para a obtenção do extrato, o cultivo de *Microcystis aeruginosa* foi conduzido por 21 dias até que, ainda na fase exponencial de crescimento celular (Figura 10), o cultivo atingisse uma densidade entre  $1$  e  $2 \cdot 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Esta concentração permite obter um extrato celular bruto cuja concentração de microcistina-LR seja quantificável (maior que  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ , considerando o fator de pré-concentração de 50 vezes) e a turbidez não seja demasiadamente elevada a ponto de não permitir a passagem de radiação solar durante o processo foto-Fenton solar (caracterização apresentada na Tabela 3). Além disso, conforme Portaria nº 2914/11 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011b), essa densidade celular já está acima do limite para o qual se exige que as estações de tratamento de água façam o monitoramento semanal da concentração de cianobactérias e de cianotoxinas no meio ( $2 \cdot 10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ ).

Figura 10 – Gráfico da curva de crescimento de *Microcystis aeruginosa*.

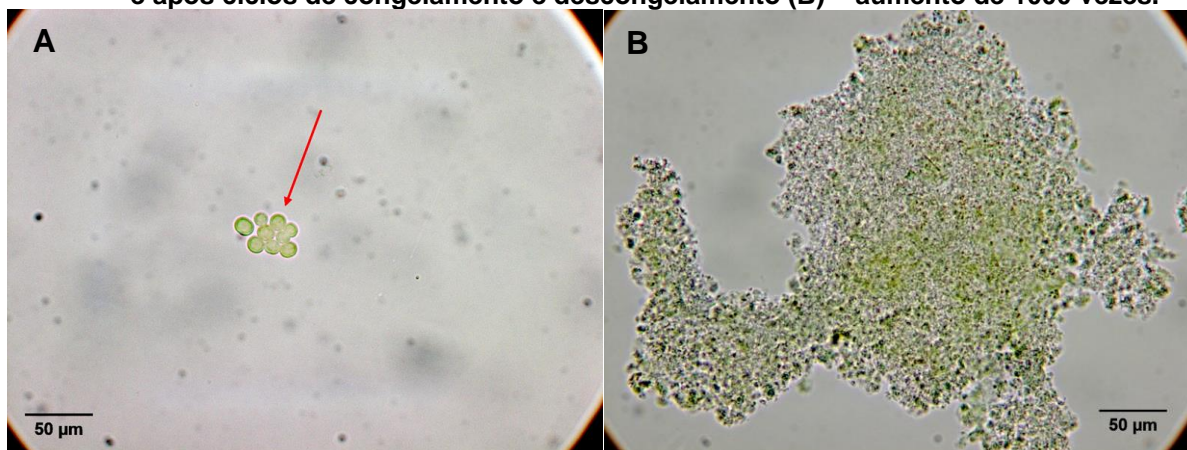


Fonte: Autoria própria.

Ciclos de congelamento e descongelamento foram realizados no cultivo, com o intuito de romper as células e, conseqüentemente, liberar a toxina intracelular no meio, mostrando-se eficiente para tal fim. Como pode ser observado na Figura 11, houve total desconfiguração do formato esférico das células após o

procedimento. Também foi possível visualizar a tendência de aglutinação do material celular lisado (“debris”), formando grandes grumos.

Figura 11- Microscopia de cultivo de células de *M. aeruginosa* ( $1,67 \cdot 10^6$  células mL<sup>-1</sup>) antes (A) e após ciclos de congelamento e descongelamento (B) – aumento de 1000 vezes.



Fonte: Autoria própria.

Com o intuito de se obter uma matriz com elevada concentração de nutrientes, íons inorgânicos e de toxina dissolvida, tal qual uma amostra de água com floração após um processo físico-químico de remoção das células intactas, optou-se por manter o conteúdo celular em meio ASM-1 para o tratamento. A concentração de nitrogênio e fósforo deste meio é maior que os níveis geralmente encontrados no reservatório do rio Irai (PR), localizado na região metropolitana de Curitiba, o qual sofre constantemente com episódios de floração (CUBAS *et al.*, 2009) ( $\text{NO}_3^- < 0,02 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $\text{NO}_2^- = 0,011 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $\text{PO}_4^{3-} = 0,0092 \text{ mg L}^{-1}$ ). A escolha pela matriz também baseou-se na classificação da qualidade de água de reservatórios utilizadas pelo Instituto Ambiental do Paraná - IAP (2009) a qual considera a concentração de cianobactérias, nitrogênio e fósforo para a classificação.

Devido à composição do meio ASM-1 (Anexo A), houve a preocupação em quantificar a concentração de íons que sabidamente são sequestrantes de radicais hidroxilas (KLAMERTH *et al.*, 2010), a fim de avaliar sua influência na eficiência do processo foto-Fenton solar (Tabela 3).

**Tabela 3 - Caracterização do meio reacional antes e após cultivo, quanto à íons sequestrantes de radicais.**

Parâmetro (mg L <sup>-1</sup> )	Meio ASM-1	Meio ASM-1 após 21 dias de cultivo (sem células)	Extrato bruto celular
Cloreto <sup>1</sup>	29,29	8,11	11,64
Nitrogênio amoniacal <sup>2</sup>	0	3,08	3,87
NTK <sup>2,3</sup>	0,56	3,60	8,23
Nitrito <sup>2</sup>	0	0,604	0,594
Nitrato <sup>2</sup>	28,00	13,25	12,01
Fósforo total <sup>4</sup>	17,6	25,98	25,24
Sulfato <sup>5</sup>	15,94	-	-

<sup>1</sup> medida em massa de Cl<sup>-</sup>; <sup>2</sup> medida em massa de N; <sup>3</sup> NTK: nitrogênio Kjeldahl;

<sup>4</sup> medida em massa de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>; <sup>5</sup> medida em massa de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>

Fonte: Autoria própria.

Estudos anteriores (FARIA; ÓRFAO; PEREIRA, 2009; HUANG *et al.*, 2005; KARTHIKEYAN *et al.*, 2011) demonstraram que alguns íons (carbonato, bicarbonato, fosfatos monobásicos e dibásicos, haletos, sulfatos), quando presentes no meio, podem interferir negativamente no rendimento do processo foto-Fenton pela reação com Fe<sup>2+</sup> e/ou Fe<sup>3+</sup> ou pelo sequestro de radicais hidroxilas, como mostra as reações a seguir (Equações 15 e 16).



Segundo Zapata e colaboradores (2009), o efeito negativo do sequestro radicalar por íons inorgânicos na eficiência de processos foto-Fenton solar mostrou-se significativo apenas quando a concentração total desses íons ultrapassa 500 mg L<sup>-1</sup>. No entanto, em mais recente estudo (PINHO *et al.*, 2015b), foram realizados experimentos de fotocatalise heterogênea solar para a degradação de microcistina-LR. Os dados demonstram que, quando a toxina se encontra dissolvida em água natural, o processo requer 10 vezes mais energia acumulada para a degradação de 90% da toxina, em comparação com a mesma concentração de microcistina-LR dissolvida em água destilada. Tal resultado foi atribuído à presença de compostos orgânicos e inorgânicos na água natural (COD= 2,2 mg L<sup>-1</sup>; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>=3,0 mg L<sup>-1</sup>; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>=0,2 mg L<sup>-1</sup>; Cl<sup>-</sup>=4,9 mg L<sup>-1</sup>), em concentrações significativamente mais elevada que a da toxina (100 µg MC-LR L<sup>-1</sup>), e que competem pelo radical hidroxila formado

durante o processo. Considerando que o extrato bruto utilizado no presente estudo possui concentrações mais elevadas de COD e íons inorgânicos que a água natural testada, seria justificável, então, a realização de experimento que avaliasse a interferência do sequestro de radicais na eficiência do processo para a toxina dissolvida em meio de cultivo.

## 5.2 PROCESSO FOTO-FENTON SOLAR

### 5.2.1 Estudo do efeito das variáveis $\text{Fe}^{2+}$ e $\text{H}_2\text{O}_2$ na eficiência do tratamento e escolha da melhor condição

A caracterização dos extratos brutos, utilizados nos experimentos para avaliar a influência das concentrações de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  na eficiência do processo foto-Fenton solar, está apresentada a seguir (Tabela 4).

**Tabela 4- Caracterização do extrato bruto celular (30.03.16) utilizado nos experimentos do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> e ensaios de efeitos isolados.**

Parâmetro	Extrato Bruto 1	Extrato Bruto 2
pH	7,80	7,66
Densidade celular (célula mL <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	1,71.10 <sup>6</sup>	1,63.10 <sup>6</sup>
DQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	64,26±6,34	40,02±3,21
COD (mg C L <sup>-1</sup> )	19,61±0,39	23,25±0,50
Microcistina-LR (µg L <sup>-1</sup> )	34,74±0,30	80,48±1,50

<sup>1</sup> células intactas antes dos ciclos de congelamento e descongelamento.

Fonte: Autoria própria.

Essas informações serviram não somente para comparação e cálculo de redução DQO, COD e microcistina-LR após o tratamento, mas também como ponto de partida para as concentrações de  $\text{Fe}^{2+}$  e peróxido de hidrogênio a serem dosados no experimento.

Os níveis superiores e inferiores para cada um dos parâmetros estudados foram baseados e adaptados do trabalho de Carra e colaboradores (2013). Neste trabalho, a dose de  $\text{H}_2\text{O}_2$  aplicada nos experimentos correspondia ao dobro da proporção estequiométrica requerida para mineralizar os compostos orgânicos da amostra a ser tratada (mistura de pesticidas com COD igual a 50 mg C L<sup>-1</sup>), estando em excesso. Foram testadas diferentes doses de  $\text{Fe}^{2+}$  ao processo foto-Fenton solar em pH neutro, e puderam concluir que uma proporção de aproximadamente 1/10 =



[Fe<sup>2+</sup>]/[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] dividido em 5 adições durante o processo foi a que permitiu atingir melhores níveis de mineralização.

Desta forma, considerando que para a presente pesquisa, os extratos bruto a serem utilizados nos experimentos possuem em sua composição significativas concentrações de íons sequestrante de radicais, os quais podem contribuir para uma maior demanda de oxidante, o valor da DQO da amostra foi utilizada para os cálculos de dosagem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao invés de COD, com vistas a não subdimensionar a dose a ser aplicada.

A equação para o cálculo estequiométrico assumido, considera que o peróxido de hidrogênio será a fonte de oxigênio requerido na DQO, como mostra a Equação 17.



Levando em conta a proporção molar e as massas molares do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, chega-se à conclusão que a cada mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> requerido na DQO, são necessário 2,12 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. Essa proporção foi adotada para o nível mínimo da dosagem de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enquanto que para o nível máximo foi o dobro desse valor.

Os resultados da caracterização pós tratamento, para as diferentes concentrações testadas, estão organizadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Caracterização de extrato celular após 120 min de tratamento por processo foto-Fenton solar, para as diferentes condições experimentais (para o parâmetro microcistina-LR são apresentados os dados também para 90 min).

Ensaio	Radiação	Níveis			T (°C) <sup>1</sup>	pH	ε (kJ L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	t <sub>30w</sub> (min)	Fe <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Fe <sub>total</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Redução (%)				
		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fe <sup>2+</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /Fe <sup>2+</sup>							H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	COD	DQO	MC-LR 90 min <sup>3</sup>	MC-LR 120 min <sup>3</sup>
1	Sim	-1	-1	10	38	5,38	4,31	38	2,80	2,34	21,6	29,4	9,4	76,7	87,9
2	Sim	+1	-1	20	40	5,84	3,56	31	0,90	0,18	22,8	16,2	0	79,9	83,3
3	Sim	-1	+1	5	21	5,90	2,12	19	0,38	0,44	29,8	21,4	34,7	>98,3	>98,3
4	Sim	+1	+1	10	40	5,01	3,98	35	0,39	0,28	19,6	24,8	32,3	>98,3	>98,3
5	Sim	0	0	10	39	4,13	4,31	38	0,28	0,13	17,4	30,5	66,7	83,8	96,8
6	Sim	0	0	10	39	4,01	3,98	35	0,49	0,28	11,9	26,7	83,9	91,9	96,0
7	Sim	0	0	10	38	3,84	3,56	31	6,54	1,21	17,3	15,2	75,6	93,1	95,7
8	Sim	Não	+1	-	29	4,67	2,96	26	9,11	9,06	-	23,5	18,4	68,9	71,3
9	Sim	-1	Não	-	31	7,54	2,96	26	-	-	23,9	9,7	39,9	73,3	73,0
10	Sim	Não	Não	-	36	7,74	2,96	26	-	-	-	0,0	36,2	79,0	81,3
11	Não	Não	+1	-	25	4,94	-	-	12,09	13,06	-	26,54	0,0	32,1	32,8
12	Não	-1	Não	-	24	7,49	-	-	-	-	7,7	22,71	11,5	22,5	26,1

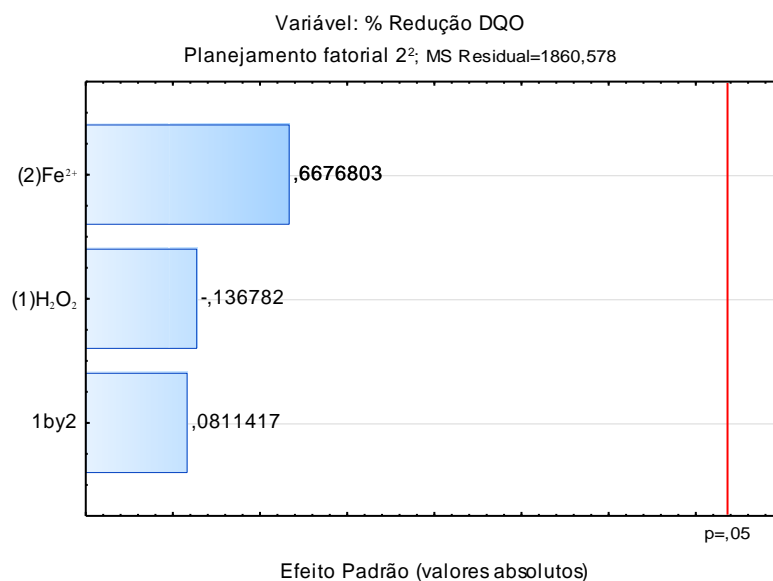
<sup>1</sup> T= temperatura

<sup>2</sup> ε = energia acumulada

<sup>3</sup> LQ=0,6 µg L<sup>-1</sup> (considerando fator de concentração da amostra=50 e LQ do método 30 µg L<sup>-1</sup>).

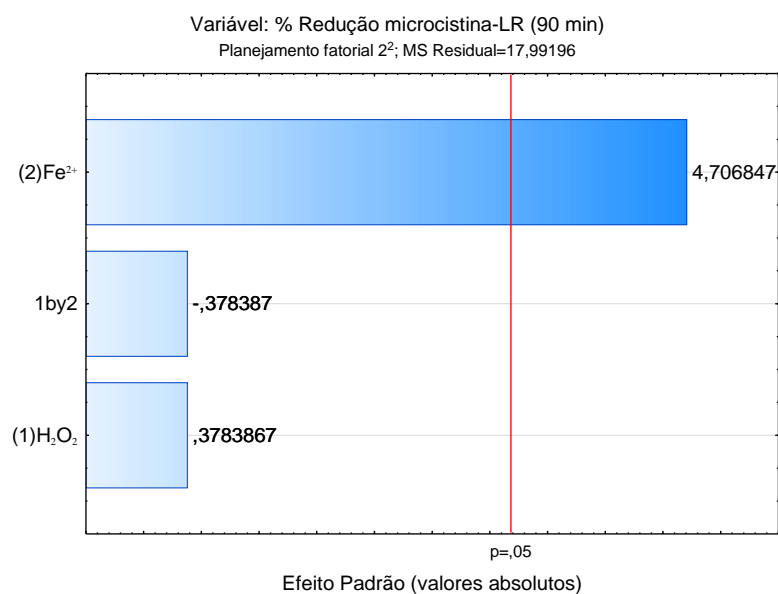
A partir dos dados apresentados, foi possível avaliar os efeitos da variação da concentração de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  na eficiência da redução de DQO e a mineralização ao final do processo (120 min), e para a degradação de microcistina-LR após 90 e 120 min (Figuras 12 a 15).

**Figura 12- Gráfico de Pareto dos efeitos obtidos para a variável DQO, após 120 minutos de tratamento.**



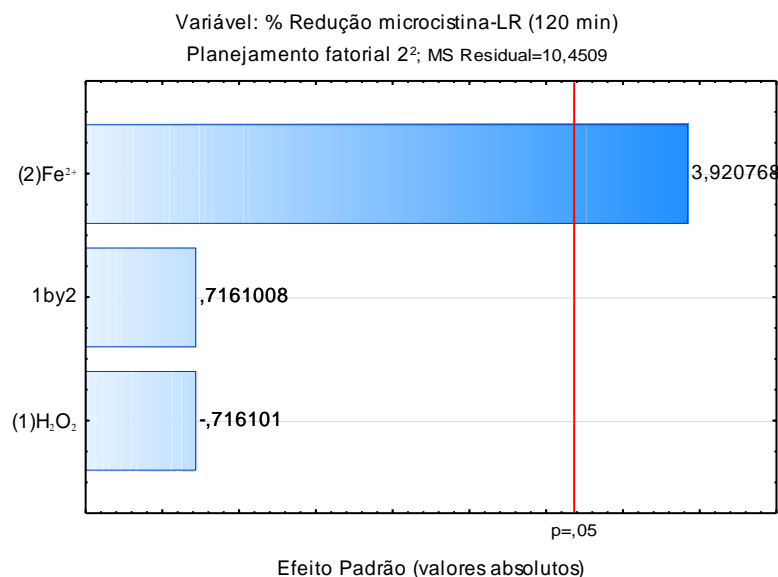
Fonte: Autoria própria.

**Figura 13- Gráfico de Pareto dos efeitos obtidos para a variável microcistina-LR, após 90 minutos de tratamento.**



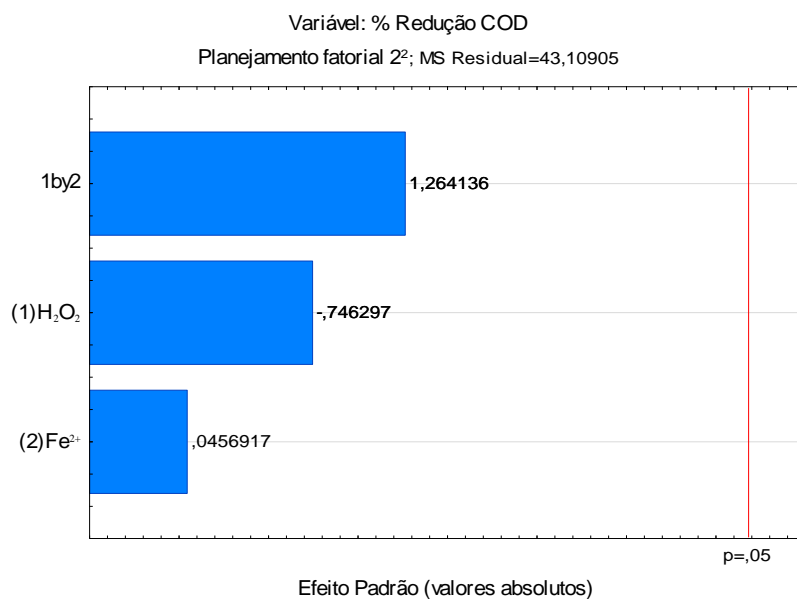
Fonte: Autoria própria.

**Figura 14 - Gráfico de Pareto dos efeitos obtidos para redução de microcistina-LR, após 120 minutos de tratamento.**



**Fonte: Autoria própria.**

**Figura 15- Gráfico de Pareto dos efeitos obtidos para a redução de carbono orgânico dissolvido, após 120 minutos de tratamento.**

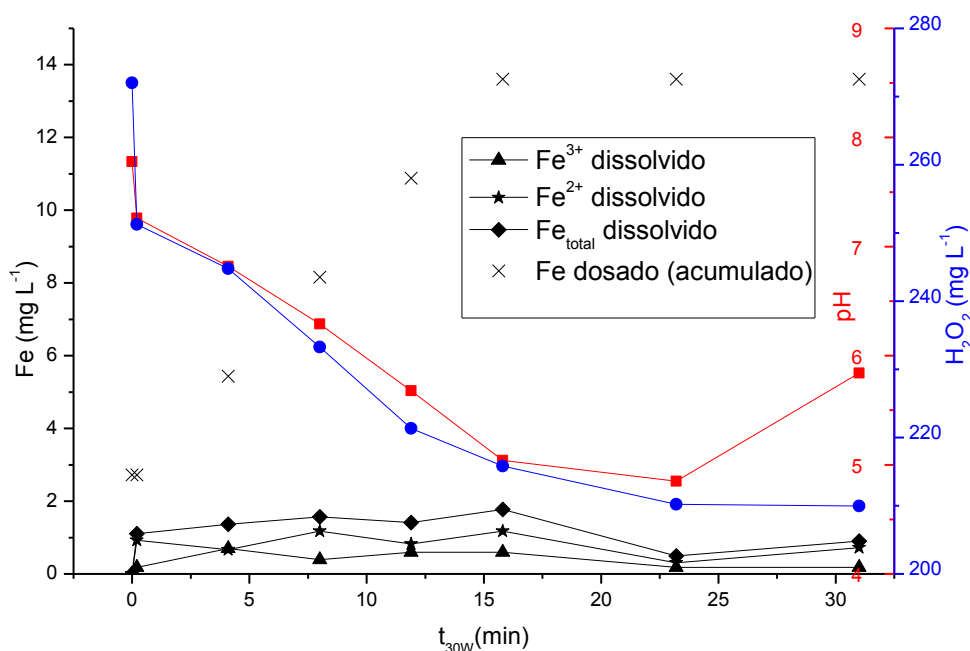


**Fonte: Autoria própria.**

Para os parâmetros DQO e COD, os gráficos de Pareto revelam que não houveram efeitos primários e de interação significativos ( $p=0,05$ ) na eficiência do processo foto-Fenton solar, para as condições testadas. No entanto, para a redução de microcistina-LR em 90 e 120 min o aumento da concentração de Fe<sup>2+</sup> dosado se refletiu em um efeito positivo significativo para este parâmetro.

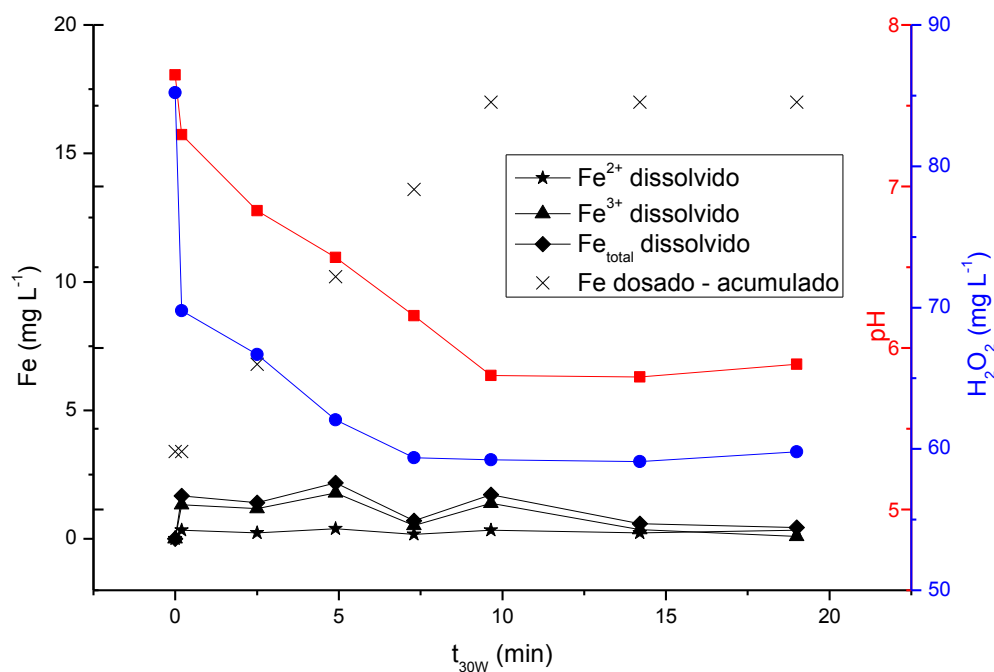
O discreto efeito do  $\text{H}_2\text{O}_2$  adicionado pode ser explicado pelo excesso do oxidante em ambos os níveis, sendo o  $\text{Fe}^{2+}$  o reagente limitante. Já o efeito pouco significativo do  $\text{Fe}^{2+}$  para a redução da DQO e COD, pode ser explicado por dois fatores. Um dos fatores é a reação de hidrólise inicial do  $\text{Fe}^{2+}$ , a qual é comprovada pela redução do pH do meio após as adições iniciais do sulfato ferroso, tornando o metal menos disponível para reações (Figuras 16 a 18). O outro fator é a provável ocorrência de reações secundárias do tipo like-Fenton pois, estando o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em excesso, quando  $\text{Fe}^{2+}$  é adicionado ao meio este é rapidamente convertido a  $\text{Fe}^{3+}$  que, por sua vez, pode gerar radical hidroperoxila ( $\text{HO}_2\bullet$ ), de menor potencial oxidativo que o radical hidroxila. No entanto, considerando que esta reação seja mais lenta ( $k = 0,001\text{-}0,01 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (VILLA; SILVA; NOGUEIRA, 2007) e seja pH dependente (PIGNATELLO; OLIVEROS; MACKAY, 2006), talvez não haja oxidação suficiente para mineralização dos compostos, mas apenas para oxidações parciais, o que explica o efeito significativo apenas para a microcistina-LR.

Figura 16- Variação do pH,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e das espécies de ferro no meio, durante processo foto-Fenton solar (Ensaio 2  $\text{H}_2\text{O}_2=272 \text{ mg L}^{-1}$ (nível +);  $\text{Fe}^{2+}=2,72 \text{ mg L}^{-1}$  (nível -) x 5 adições).



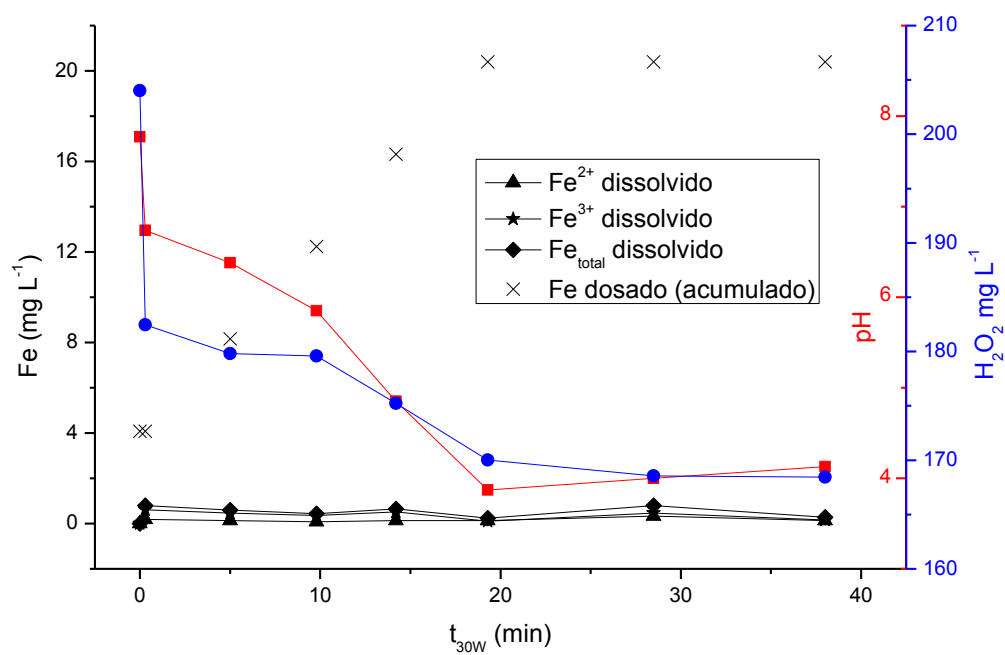
Fonte: Autoria própria.

Figura 17- Variação do pH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e das espécies de ferro no meio, durante processo foto-Fenton solar (Ensaio 3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=85,20 mg L<sup>-1</sup>(nível -); Fe<sup>2+</sup>=3,40 mg L<sup>-1</sup> (nível +) x 5 adições).



Fonte: Autoria própria.

Figura 18- Variação do pH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e das espécies de ferro no meio, durante processo foto-Fenton solar (Ensaio 5 PONTO CENTRAL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=204 mg L<sup>-1</sup>; Fe<sup>2+</sup>=4,08 mg L<sup>-1</sup> x 5 adições).



Fonte: Autoria própria.

Foi possível observar também o baixo consumo de peróxido de hidrogênio em todos os ensaios, em torno de 20%, mesmo quando a concentração de  $\text{Fe}^{2+}$  adicionado foi maior. Dias e colaboradores (2014) também observaram baixo consumo de peróxido quando aplicaram o processo foto-Fenton em pH neutro para degradação de antibióticos em água. A explicação reforça a hipótese da rápida conversão de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  pela oxidação por  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Em vários dos ensaios realizados, o rápido consumo do peróxido ficou evidente principalmente na primeira adição de íons ferrosos, como mostram as Figuras 16 a 18. Como consequência, o  $\text{Fe}^{3+}$  formado da oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  pode ligar-se ao próprio contaminante, ficando menos disponível para ser regenerado ou para participar de reações do sistema *like*-Fenton. Além disso, a precipitação do  $\text{Fe}^{3+}$  na forma de hidróxidos, devido ao elevado pH do meio, reduz a formação de radicais hidroxila. A menor disponibilidade de Fe no meio por ambos os processos contribui para um menor consumo do oxidante (NEYENS; BAEYENS, 2003).

O acompanhamento da dissolução de ferro no meio, realizado em diferentes tempos do processo, mostrou que este é o responsável pela queda de pH no meio, já que isto não foi observado nos ensaios 9, 10 e 12 (Tabela 5), onde a adição de sulfato ferroso não aconteceu. No entanto, tal acidificação não foi suficiente para a dissolução do ferro adicionado, ficando a concentração da fração dissolvida muito aquém da adicionada, como mostram os gráficos das Figuras 16 a 18, para diferentes condições experimentais. Além disso, houve visível precipitação do  $\text{Fe}^{3+}$  formado em todos os ensaios foto-Fenton solar, diminuindo a disponibilidade deste para a formação de radicais, já que segundo Pignatello e colaboradores (2006), mesmo após a queda do pH, espécies precipitadas dificilmente se redissolvem. As melhores solubilizações de Fe foram observada nos ensaios 8 e 11, o que pode ser explicado pela ausência de oxidantes no meio, predominando portanto a forma  $\text{Fe}^{2+}$ . A partir desta resposta, pode-se concluir que a precipitação de ferro se dá de forma mais pronunciada pela sua oxidação a  $\text{Fe}^{3+}$  e formação de hidróxidos do que pela hidrólise de  $\text{FeSO}_4$  e posterior precipitação de hidróxidos de  $\text{Fe}^{2+}$ .

Para todos os ensaios foto-Fenton solar, foi possível observar a queda gradual do pH após as sucessivas adições de  $\text{Fe}^{2+}$  atingindo menor valor entre 60 e 90 min (ANEXO B). Cabe ressaltar uma tendência ao aumento de ferro total dissolvido nos ensaios foto-Fenton solar em 90 min para os ensaios 1, 5, 6, 7 mesmo já cessada a adição fracionada do  $\text{FeSO}_4$ . Para as diferentes condições

testadas, esse pico de solubilidade do metal é normalmente acompanhado de um aumento na proporção  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ , levantando a hipótese de que em algum momento do processo esteja sendo formados compostos orgânicos carboxilados de menor cadeia, os quais possuem característica de complexação com  $\text{Fe}^{3+}$ . Estes complexos orgânicos, a exemplo do Fe-oxalato e Fe-EDTA, impede que  $\text{Fe}^{3+}$  precipite na forma de hidróxido e colabora para ampliar o espectro de absorção do metal, mostrando-se estável e com rendimento quântico máximo entre pH 3 e 5 (DOUMIC *et al.*, 2015), tal como observado nos experimentos. Para complexos Fe-EDTA, a serem considerados visto que o EDTA faz parte da composição do meio ASM-1, trabalhos recentes mostram seu efeito positivo na formação de radicais hidroxilas *in situ* também em pH neutro (LI; SUN; SUN, 2016; ADEWUYI; KHAN, 2016). Após esse pico de solubilização, pode-se observar que o Fe total dissolvido volta a cair, provavelmente pela decomposição da cadeia carbônica de tais compostos complexantes no meio, os quais perdem seu potencial quelante.

Nos gráficos anteriormente apresentados (Figuras 16 a 18) também é possível observar variações na proporção entre  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  durante o processo, atestando que as reações esperadas nos processos foto-Fenton, como a regeneração de  $\text{Fe}^{2+}$  no meio, estão efetivamente ocorrendo.

Quanto aos valores de redução de COD alcançados pelo tratamento pode-se afirmar que para todas as condições testadas não se observaram níveis de mineralização expressivas (Tabela 5).

A baixa mineralização da matéria orgânica presente no extrato, levanta duas hipóteses: a) não foram formados radicais hidroxilas em quantidade suficiente para levar à oxidação completa dos compostos orgânicos; ou b) íons sequestrante de radicais presentes no meio estão interferindo significativamente na eficiência do processo foto-Fenton solar.

Quando comparados os dados entre os ensaios do ponto central (ensaios 5, 6 e 7), observa-se variações entre as replicatas para a redução de COD e DQO (Tabela 5). Estes experimentos foram realizados em dias distintos e as energias acumuladas diferem-entre si, o que poderia explicar tal variação. No entanto, o estudo de correlação não demonstra influência significativa da energia acumulada para tais parâmetros (Tabela 6). Para os valores de DQO, entretanto é necessário que se considere a alta variabilidade, intrínseca ao método, de 10% (APHA, 2012).



**Tabela 6- Matriz de correlação entre variáveis e parâmetros estudados.**

Fator	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fe <sup>2+</sup>	1by2	ε*	COD	DQO	MC-LR (90 min)	MC-LR (120 min)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,00	0,00	0,00	0,30	-0,33	-0,07	0,08	-0,16
Fe <sup>2+</sup>	0,00	1,00	0,00	-0,48	0,02	0,36	0,93	0,89
1by2	0,00	0,00	1,00	0,71	0,56	0,04	-0,08	0,16
ε*	0,30	-0,48	0,71	1,00	0,53	0,11	-0,53	-0,22
COD	-0,33	0,02	0,56	0,53	1,00	0,12	-0,23	0,24
DQO	-0,07	0,36	0,04	0,11	0,12	1,00	0,44	0,69
MC-LR (90 min)	0,08	0,93	-0,08	-0,53	-0,23	0,44	1,00	0,82
MC-LR (120 min)	-0,16	0,89	0,16	-0,22	0,24	0,69	0,82	1,00

\* ε: Energia acumulada

Uma hipótese levantada para os valores discrepantes de ferro dissolvido encontrados no ensaio 7 são possíveis erros na etapa de filtração, já que não foram observados valores elevados ou redissolução do metal tão abruptamente em nenhum dos ensaios realizados.

Da matriz de correlação (Tabela 6), cabe destacar a forte correlação observada entre a remoção de microcistina-LR e a concentração de ferro adicionado, corroborando o efeito significativo deste fator, apresentados nos gráficos de Pareto e discutidos anteriormente. Tal correlação poderia ser explicada pela rápida formação de radicais hidroxila pela redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em presença de Fe<sup>2+</sup> (Equação 5), já que para os ensaios que alcançaram maiores remoções da toxina, a proporção Fe<sup>2+</sup>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no meio também é mais elevada (FREITAS, 2008; ZHONG *et al.*, 2009). Essa rápida produção inicial de radicais hidroxila, pode ter acelerado a cinética de degradação microcistina-LR. Isso se reflete na redução da toxina em menores tempo de reação para os ensaios 4 e 3.

Dos dados apresentados na Tabela 5, pode-se concluir que a remoção da toxina não foi proporcional às remoções de DQO e COD no meio. De fato, os dados de correlação (Tabela 6) não mostraram elevada correlação entre Fe<sup>2+</sup> e esses dois parâmetros. A provável explicação seria que pequenas alterações na molécula de microcistina-LR (oxidação parcial) possa levar à transformação do seu espectro de absorção UV, não sendo mais detectado em 238 nm, bem como alterar o tempo de retenção dos subprodutos durante a separação cromatográfica. Corroborando esta hipótese, estudos que trazem a identificação de subprodutos de degradação de microcistina-LR após processos oxidativos, o fazem utilizando quase sempre um

analisador de massa (PINHO *et al.*, 2015a; LIU *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2015). Enquanto isso, para alcançar valores mais expressivos na remoção de DQO e COD são necessários estágios mais avançados de oxidação, o que demanda mais tempo de reação e maior produção de radicais hidroxila.

Para a redução da DQO nos ensaios do planejamento fatorial, observa-se que esta redução foi menor nos ensaios 1 e 2 em relação aos demais, níveis em que a dose de  $\text{Fe}^{2+}$  no meio foi menor e conseqüentemente a cinética de produção de radicais hidroxilas também. Além disso, em níveis menores de ferro, o pH do meio é mais elevado, prejudicando o rendimento quântico da reação, principalmente pela ação dos complexos Fe-orgânicos, como já discutido anteriormente. Em contrapartida, para os ensaios do ponto central, alcançou-se as melhores reduções de DQO do planejamento experimental. Esses ensaios, além de alcançarem menores pH, possuem proporção  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$  dosados igual a 10, proporção similar à encontrada por Carra e colaboradores (2013) como a melhor a ser empregada na degradação de uma mistura de pesticidas por processo foto-Fenton em pH neutro.

Os ensaios 8 ( $\text{Fe}^{2+}$ +luz) e 9 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ +luz) foram propostos com a finalidade de avaliar o efeito das variáveis separadamente em presença de luz, enquanto que o ensaio 10 (só luz) buscou avaliar o efeito da fotólise, e os ensaios 11 (só  $\text{Fe}^{+2}$ ) e 12 (só  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) o efeito isolado dos fatores estudados.

O ensaio 8, mostrou maior redução de COD em comparação ao ensaio 10, em que o  $\text{Fe}^{2+}$  não é adicionado, ocorrendo o inverso para reduções de DQO. Essa resposta pode ser explicada pela “adsorção” de compostos orgânicos do meio quando há a precipitação de  $\text{Fe}^{3+}$ , o que pode ser confirmada pelo ensaio 11. Sendo analisada somente a fração dissolvida dos compostos orgânicos, a fração ligada aos polihidroxidos formados nesse pH (PIGNATELLO; OLIVEROS; MACKAY, 2006) não seria quantificada na análise de COD, mas contribuiria na análise de DQO, cuja etapa de filtração não ocorre. De fato, o ensaio 11 mostrou redução significativa de COD (26,54%), ficando muito próximas dos valores alcançados nos ensaios foto-Fenton solar, mas não houve alteração da DQO. O resultado obtido nesse ensaio coloca em questão, então, qual fração da toxina removida nos processos foto-Fenton solar se deve à efetiva degradação da microcistina-LR ou ao seu “arraste” para o precipitado.

Já no ensaio 9 ( $\text{H}_2\text{O}_2$  + luz), foi observada redução discreta no valor de COD e expressivas para DQO, levando a crer que a formação de radicais pela

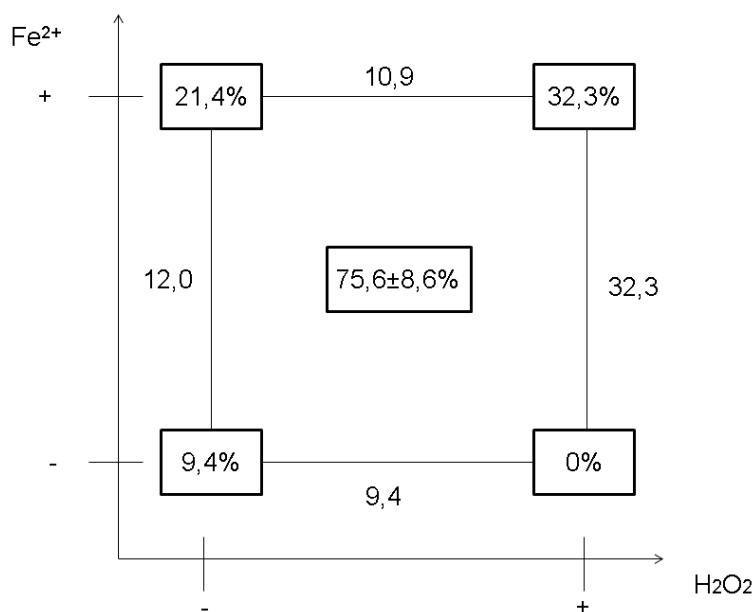
decomposição de  $H_2O_2$  possa ter ocorrido, ainda que a fração UVC no espectro solar seja muito baixa (intensidade menor que 1% da radiação UVA), e levado à oxidação parcial de alguns compostos e à mineralização de outros compostos orgânicos no meio. Tais dados são acompanhados por elevadas remoções de microcistina-LR do meio.

No ensaio de fotólise (ensaio 10) não houve redução de COD mas sim de DQO. Isto leva a crer que a ação isolada da radiação possa ter sido responsável pela fotodegradação de alguns compostos presentes na matriz, mas não é suficiente para que seja alcançada a mineralização destes. Reduções próximas a 80% foram observadas para microcistina-LR, e podem ser explicadas por dois processos: a possível formação do isômero geométrico da microcistina-LR, pela alteração no grupo Adda da molécula ou então pela sua fotodegradação, a qual é favorecida pela presença de fotopigmentos advindos da lise celular (TSUJI *et al.*, 1994; YAN; ZHANG; SONG, 2014). Ao contrário do observado por Pinho e colaboradores (2015b), em que a degradação de microcistina-LR foi ligeiramente maior na presença de  $H_2O_2$  e radiação solar, quando comparada à fotólise, o ensaio 9 mostrou uma remoção da toxina ligeiramente menor. É necessário ressaltar, no entanto, que o ensaio 9 foi realizado sob menor intensidade de radiação solar e que o ensaio de efeito isolado do  $H_2O_2$  (Ensaio 12) não foi tão eficiente na remoção da toxina. Isso nos leva a crer que a contribuição da isomerização e fotodegradação da toxina são mais significativas na remoção que a oxidação por  $H_2O_2$ , principalmente quando compara-se remoções da toxina entre ensaios irradiados e não-irradiados.

Mesmo com a ocorrência de processos paralelos no meio, que não a degradação dos compostos orgânicos por ação do radical hidroxila, os ensaios foto-Fenton solar se justificam pela redução significativamente maior da toxina por esse processo (teste t entre grupos,  $p < 0,05$ ).

Assim sendo, devido às remoções de COD não diferirem significativamente entre os ensaios 1 a 7, a interferência do arraste por ferro precipitado nesta análise e o questionamento sobre a real degradação na microcistina-LR pelo processo foto-Fenton solar, a escolha da condição experimental aplicada na etapa 3, em reator CPC, foi baseada na remoção da DQO, cujos resultados mostraram-se menos impactados por tais processos paralelos. Desta forma, a representação geométrica para esta variável (Figura 19) demonstra que a melhor eficiência do processo foto-Fenton solar foi obtida nas condições do ponto central.

Figura 19- Representação geométrica da remoção de DQO para os ensaios do planejamento fatorial  $2^2$  com triplicata do ponto central.



Fonte: Autoria própria.

### 5.2.2 Estudo do efeito de matriz na eficiência do processo foto-Fenton

Para avaliar a interferência da matriz na eficiência do processo, é importante frisar que a escolha do biftalato de potássio como padrão de matéria orgânica visou, além de garantir as mesmas concentrações de material carbonáceo, permitir que o radical hidroxila a ser formado durante o processo interagisse da mesma forma com o substrato.

As soluções de biftalato em água de osmose reversa e em meio ASM-1, utilizadas nos ensaios que estudaram o efeito da matriz na eficiência do processo foto-Fenton, estão caracterizadas a seguir (Tabela 7).

Tabela 7- Caracterização das soluções de biftalato ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) dissolvida em diferentes matrizes.

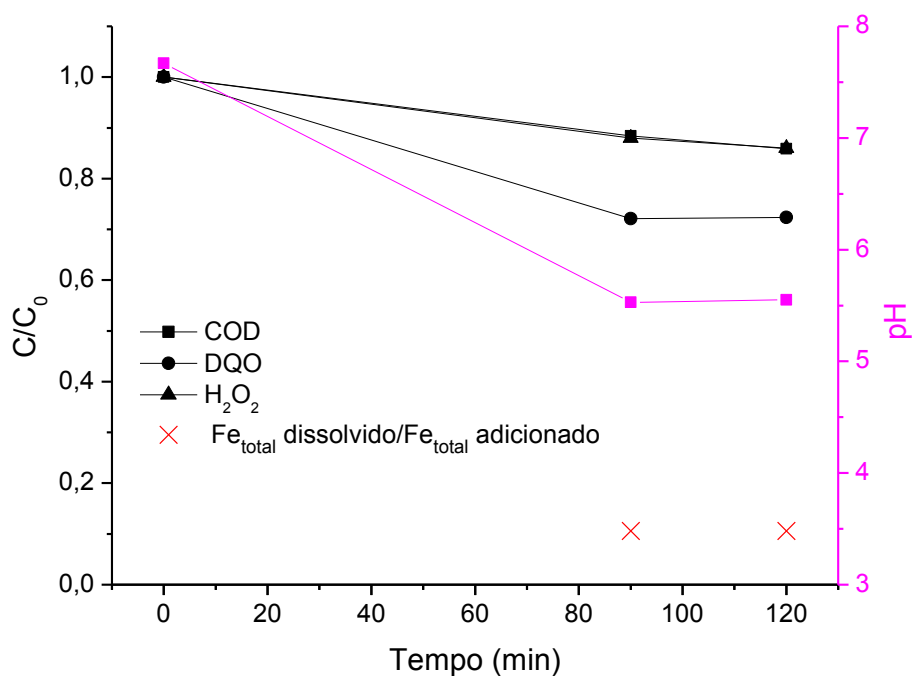
Parâmetro	Meio ASM-1 + biftalato	Água + biftalato
COD ( $\text{mg C L}^{-1}$ )	24,37	19,35
DQO ( $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ )	47,82	29,92
pH	7,72	7,83
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	16	16

Da Tabela 7 é possível destacar maiores valores de COD quando o biftalato é solubilizado em meio ASM-1. Isso se deve à contribuição de carbono

advindo do EDTA presente na composição do meio. No entanto, a proporção DQO/COD mais elevada nesta amostra pode ser explicada pela presença de íons inorgânicos (Tabela 4, seção 5.1) que contribuem para o consumo de oxidante, elevando a DQO da amostra.

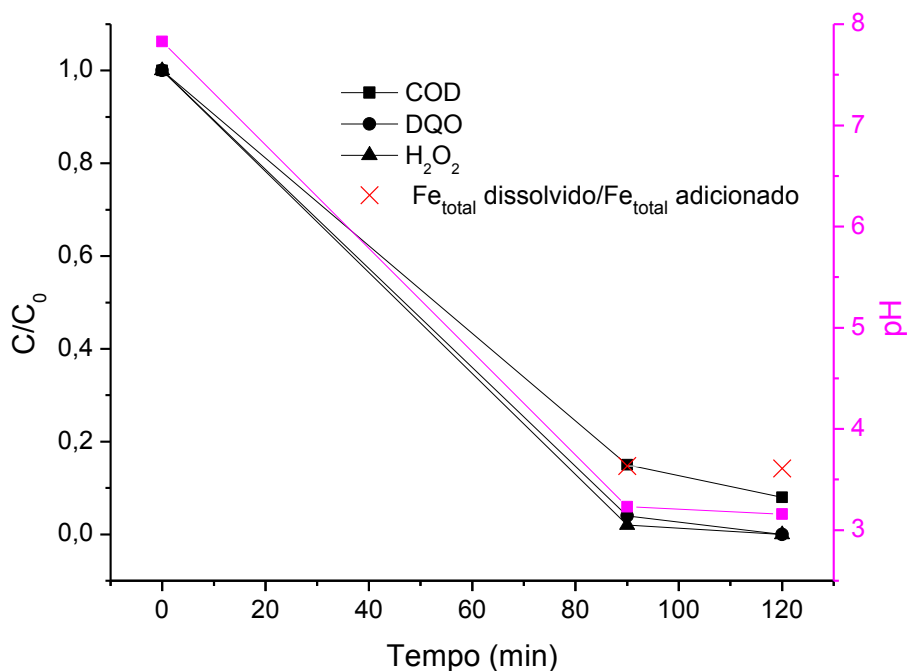
O monitoramento do pH, concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , DQO e COD antes do processo e após 90 e 120 min, para ambas as matrizes, estão apresentados nas Figura 20 e 21.

**Figura 20-** Gráfico do decaimento de DQO, COD,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e pH em amostra de biftalato ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) dissolvido em meio ASM-1 e tratada por processo foto-Fenton (PONTO CENTRAL:  $\text{H}_2\text{O}_2=153 \text{ mg L}^{-1}$  e  $\text{Fe}^{2+}= 5 \times 3,06 \text{ mg L}^{-1}$ ).



Fonte: Autoria própria.

Figura 21- Gráfico do decaimento de DQO, COD, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e pH em amostra de biftalato (50 mg L<sup>-1</sup>) dissolvido em água de osmose reversa e tratada por processo foto-Fenton (PONTO CENTRAL: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>=95,7 mg L<sup>-1</sup> e Fe<sup>2+</sup>= 5 x 1,91 mg L<sup>-1</sup> ).



Fonte: Autoria própria.

A partir das Figuras 20 e 21, é possível observar o efeito negativo do meio ASM-1 na degradação de compostos orgânicos por processo foto-Fenton. Primeiramente, a adição de tampão fosfato ao meio ASM-1 se refletiu diretamente em menor redução no pH pela adição de FeSO<sub>4</sub> no meio. O menor pH na amostra em água de osmose reversa não se refletiu em uma significativa melhora da solubilidade das espécies de Fe no meio (cerca de 10% do Fe adicionado para a amostra em meio ASM-1 e 15% para a amostra em água de osmose reversa) mas, como já extensamente discutido na seção 5.2.1, pode contribuir para o melhor rendimento quântico de complexos Fe-orgânicos formados durante a reação e, conseqüentemente, na formação de radicais oxidantes (HO• e HO<sub>2</sub>•). Outro fator importante é a redução na concentração de íons sequestrantes de radicais na amostra de biftalato dissolvido em água de osmose reversa, o que também permite que os radicais oxidantes formados durante as reações foto-Fenton e like-Fenton atuem mais efetivamente na degradação dos compostos orgânicos presentes no meio. Estas hipóteses são reforçadas quando observado o maior consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e redução mais elevada de DQO e COD em água de osmose reversa, mesmo para tempos menores de tratamento. A partir disto, pode-se concluir que o processo foto-

Fenton solar é mais eficiente em matrizes com menor concentração de íons sequestrantes, demandando inclusive, menores tempos de reação e menor consumo de reagentes. E que, ao contrário do que foi defendido por Zapata e colaboradores (2009), concentrações menores que 500 mg L<sup>-1</sup> de íons inorgânicos sequestrantes de radicais no meio podem causar efeito negativo significativo para o processo estudado. Espera-se, portanto, que em águas naturais contaminadas por microcistina-LR, a eficiência dos processos foto-Fenton solar sejam melhores que as observadas para as matrizes em meio ASM-1, testadas neste trabalho.

### 5.2.3 Eficiência do processo em reator tipo Coletor Parabólico Composto

Com base nas condições previamente testadas no delineamento experimental apresentado, foram realizados os experimentos em reator tipo Coletor Parabólico Composto (CPC), a fim de comparar resultados com remoções alcançadas em reator em escala de bancada e avaliar sua eficiência na degradação de amostras contaminadas com microcistina-LR.

Visto os resultados anteriormente obtidos, os quais mostraram o efeito negativo do meio ASM-1 na eficiência do processo foto-Fenton solar, além do extrato bruto celular em meio ASM-1, foi testado o processo em extrato bruto celular em água do reservatório do Rio Verde. Desta forma foi possível avaliar a aplicabilidade do processo foto-Fenton solar no tratamento de água para consumo humano. As caracterizações das amostras utilizadas nesta etapa do estudo estão dispostas na Tabela 8.

**Tabela 8 - Caracterização dos extratos brutos utilizados em ensaios foto-Fenton solar em reator tipo CPC e da água do reservatório do Rio Verde.**

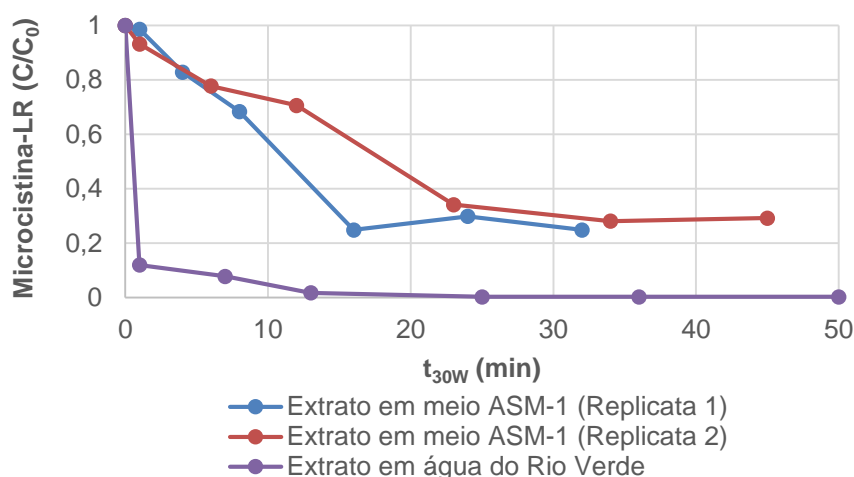
Parâmetro	EXTRATO BRUTO em meio ASM-1	EXTRATO BRUTO em água do Rio Verde	Água do Rio Verde
pH	7,77	7,85	7,10
Densidade celular (cél mL <sup>-1</sup> )*	2.10 <sup>6</sup>	1,47.10 <sup>6</sup>	-
MC-LR (µg L <sup>-1</sup> )	58,52	204,78	<0,6
COD (mg C L <sup>-1</sup> )	11,53	18,01	12,88
DQO (mg O <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> )	48,33	21,40	18,05
Cor aparente (uH)	69	15	12
Cor verdadeira (uH)	5	5	5
UV <sub>254nm</sub> (u.a.)	0,280	0,121	0,029
Turbidez (NTU)	5,98	6,17	5,17

\* antes dos ciclos de congelamento e descongelamento

Fonte: Autoria própria.

Com fins à comparação da eficiência e velocidade de degradação de microcistina-LR nas diferentes amostras em diferentes dias, os dados foram dispostos em função de  $t_{30W}$  (Figura 22).

**Figura 22-** Gráfico do decaimento de microcistina-LR em diferentes extratos brutos, durante processo foto-Fenton solar em reator tipo CPC (condições do ponto central).



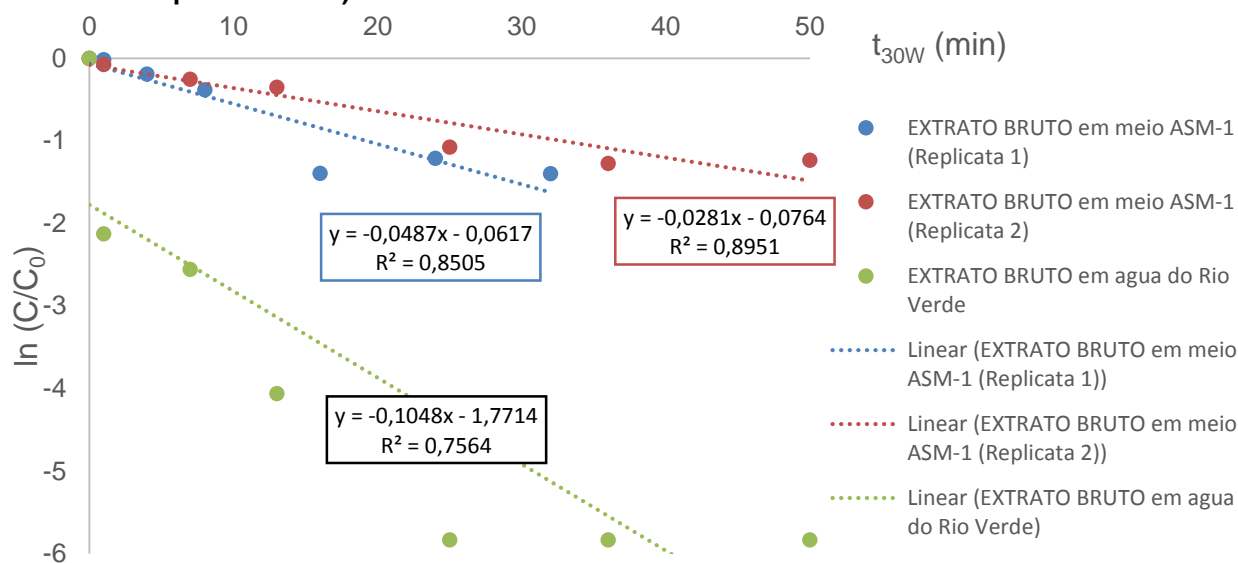
**Fonte:** Autoria própria.

A padronização para  $30 \text{ W m}^{-2}$  foi escolhida pois é a intensidade média de radiação observada ao meio dia na região da cidade de Almería, Espanha (ZAPATA *et al.*, 2009) A mesma intensidade foi utilizada para padronização em experimentos realizados em outras localidades como Portugal e Itália (SOUZA *et al.*, 2014; RIZZO, 2011). Optou-se por padronizar as respostas dos experimentos para  $30 \text{ W m}^{-2}$ , visando a futura publicação dos resultados deste trabalho bem como para possibilitar a comparação entre dados obtidos em diferentes estudos.

Do gráfico (Figura 22) é possível concluir, mais uma vez, o efeito negativo do meio ASM-1 na degradação de microcistina-LR, corroborando o que foi observado em escala de bancada. Para a mesma proporção de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{DQO}$  e  $\text{Fe}^{2+}/\text{DQO}$  dosados e energia acumulada, foi observado maior nível de degradação da toxina quando esta se encontra dissolvida em água do reservatório do Rio Verde, com valor próximo à 100%, enquanto que em meio ASM-1 não ultrapassa 80%, ainda que neste se encontre menores concentrações iniciais de microcistina-LR. Além disso, é possível afirmar que a reação se deu de forma mais rápida em água natural, o que pode ser confirmado quando traçados os gráficos de cinética, apresentados abaixo (Figura 23).



**Figura 23 - Cinética de degradação de microcistina-LR presente nos extratos, quando submetidos a processos foto-Fenton solar em reator tipo CPC (condições do ponto central).**



Fonte: Autoria própria.

Os processos foto-Fenton são descritos na literatura como reações de primeira-ordem ou *pseudo*-primeira ordem (MICHAEL *et al*, 2012; MOMANI; SMITH; EL-DIN, 2008). Os estudos cinéticos demonstraram que este modelo é o que mais se adequou aos experimentos realizados neste estudo. Os gráficos de  $\ln(C/C_0)$  em função do tempo apresentam boa correlação com o modelo (ATKINS; PAULA, 2011), além de permitir obter os valores de  $k$  (constante de velocidade) e  $t_{1/2}$  (tempo de meia vida) (Tabela 9).

**Tabela 9 – Parâmetros cinéticos ( $k$  e  $t_{1/2}$ ) para reações foto-Fenton solar em reator CPC.**

Parâmetro cinético	EXTRATO em meio ASM-1 (Replicata 1)	EXTRATO em meio ASM-1 (Replicata 2)	EXTRATO em água do Rio Verde
$k$ ( $\text{min}^{-1}$ ) <sup>1</sup>	0,0487	0,0281	0,1048
$t_{1/2}$ (min) <sup>2</sup>	14	25	7
$T_{\text{médio}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ ) <sup>3</sup>	26	19	24

<sup>1</sup>  $k$ : constante de velocidade da reação

<sup>2</sup>  $t_{1/2}$ : tempo de meia vida

<sup>3</sup>  $T_{\text{médio}}$ : temperatura média

Fonte: Autoria própria.

Considerando a dependência entre temperatura e a constante de velocidade já descrita na literatura (BALL, 2006), a variação da temperatura ambiente entre os dias dos experimentos explica diferentes valores obtidos para os parâmetros cinéticos dos experimento que trataram o extrato em meio ASM-1 .

Maior valor para a constante de velocidade foi encontrado quando o processo ocorre em água natural, mesmo em menores temperaturas (comparado

com a Replicata 2 no ensaio em meio ASM-1). O comportamento esperado nestas condições, seria da diminuição da constante cinética com a diminuição da temperatura. No entanto, como já discutido anteriormente, a interferência negativa do meio ASM-1 para a ocorrência da reação de oxidação dá-se principalmente pela presença, em concentrações significativas, de íons sequestrante de radicais hidroxila e pela resistência à queda no pH devido ao tamponamento do meio, diminuindo a disponibilidade de ferro para a reação.

Além do monitoramento de microcistina-LR na amostra, o processo foi acompanhado quanto à sua eficiência para outros parâmetros (Tabela 10), visando, sobretudo, avaliar a aplicabilidade desse processo na obtenção de água potável.

**Tabela 10 – Eficiência do processo foto-Fenton solar em reator tipo CPC, após 120 min de tratamento (PONTO CENTRAL:  $[H_2O_2]/DQO=3,18$  e  $[Fe^{2+}]/DQO=0,318$ ), em números relativos (%).**

Parâmetro (% redução)	EXTRATO BRUTO em meio ASM-1 (Replicata 1)	EXTRATO BRUTO em meio ASM-1 (Replicata 2)	EXTRATO BRUTO em água do Rio Verde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50,70	39,62	99,68
MC-LR	75,17	70,81	99,71
COD	25,76	35,65	77,51
DQO	74,57	79,70	73,13
Cor aparente	-82,61	-57,97	-1360,00
Cor verdadeira	-140,00	-80,00	-800,00
UV <sub>254nm</sub>	100,00	100,00	100,00
Turbidez	-145,32	-246,15	-228,53

Fonte: Autoria própria.

Da Tabela 10 é possível concluir que os valores de remoção de COD e DQO para o extrato bruto em meio ASM-1 são similares aos observados para a mesma condição testada em escala de bancada. Isso demonstra que o planejamento fatorial desenvolvido para a escolha da melhor condição a ser testada em reator tipo CPC foi satisfatório na predição das respostas obtidas nesta etapa da pesquisa.

Quando comparados os ensaios em extrato bruto em meio ASM-1 e em água do reservatório do Rio verde, pode-se observar que ambos alcançaram níveis semelhantes de remoção para DQO e UV<sub>254nm</sub>, mas que tanto o consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quanto a mineralização de compostos orgânicos e a degradação da toxina foram mais expressivas quando o processo ocorre em água natural. Esses dados confirmam que nesta matriz o processo de formação de radical hidroxila a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de hidrogênio foi mais efetivo e permitiu que a oxidação de compostos

orgânicos alcançasse níveis mais avançados, chegando à mineralização de parte destes. Ou seja, além de formar mais radicais hidroxilas no meio, o processo foto-Fenton solar em água natural permitiu o efetivo ataque destes radicais aos compostos de interesse.

Quando observados valores de redução de COD próximos à 30% para os extratos brutos em meio ASM-1, pode-se afirmar que, como já avaliado anteriormente, boa parte deste deve-se ao arraste da matéria orgânica do meio pelo Fe precipitado. Apesar de também se observar precipitação quando em água natural, o elevado valor para a remoção de COD leva a crer que além do arraste por Fe, uma fração significativa destes compostos foram efetivamente mineralizados.

Os parâmetros turbidez, cor aparente e cor verdadeira foram avaliados antes e após o processo pois estão diretamente ligados às características organolépticas da água, sendo os dois primeiros, inclusive, contemplados no padrão de potabilidade da Portaria nº 2914/11 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011b).

A caracterização da amostra bruta em água do Rio Verde após o processo foto-Fenton solar é apresentada na Tabela 11.

**Tabela 11- Caracterização do extrato bruto em água do Rio verde após 120 min de processo foto-Fenton solar em reator tipo CPC.**

Parâmetro	EXTRATO BRUTO em água do Rio Verde
MC-LR ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )*	<0,6
COD ( $\text{mg C L}^{-1}$ )	4,05
DQO ( $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ )	12,75
Cor aparente (uH)	219
Cor verdadeira (uH)	45
Fe total dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ )	1,79
Turbidez (NTU)	20,27

**\*já considerado o fator de concentração=50.**

**Fonte: Autoria própria.**

A precipitação da maior fração de Fe adicionado ao processo, contribuiu diretamente para o aumento da turbidez e cor aparente do meio, já que a análise deste parâmetro não é precedida por etapa de filtração ou decantação. A concentração de  $\text{Fe}^{3+}$  dissolvida no meio, ainda que baixa ( $0,32 \text{ mg L}^{-1}$ ) confere coloração amarelada ao meio, pelo aumento da absorvidade da amostra em 455 nm e, conseqüentemente, aumenta o valor de cor verdadeira. Para a amostra pós tratamento, pode-se concluir que o processo foto-Fenton solar não atende aos

padrões organolépticos estipulados na legislação, se pensado como etapa única de tratamento. No entanto, este problema poderia ser facilmente resolvido com a inclusão de uma etapa posterior ao processo foto-Fenton solar, tais como filtração ou decantação.

Ainda assim, o processo tem como pontos positivos a boa remoção de microcistina-LR do meio, ficando abaixo do limite máximo estipulado pela portaria ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ), e a mineralização de compostos orgânicos. Se aplicada uma posterior etapa de cloração para desinfecção, obrigatória no tratamento de água potável, a redução na concentração de compostos orgânicos alcançada pelo processo foto-Fenton solar poderia contribuir para menor formação de trihalometanos (THM) ao final do tratamento. Essas substâncias, as quais tem suas concentrações totais limitadas no padrão de potabilidade em vigor ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) (BRASIL, 2011b), foram quantificadas em estudo de Moncayo-Lasso e colaboradores (2012), no qual se atestou que a redução da matéria orgânica natural em água do Rio Pance (Colômbia) tratada por processo foto-Fenton solar se refletia em uma significativa redução (cerca de 85%) na formação de THM. O autor sugere ainda que uma sequencia interessante no tratamento de água potável e que tornaria o uso do processo foto-Fenton solar viável, seria uma etapa inicial de filtração, seguida do processo foto-Fenton solar e posterior cloração para desinfecção.

### 5.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

#### 5.3.1 Ensaio de recuperação

As análises cromatográficas foram avaliadas quanto a sua exatidão através de ensaios de recuperação em três níveis, usualmente denominados controles de qualidade (BRASIL, 2003). Os resultados obtidos (Tabela 12) mostraram que o procedimento de preparo de amostra foi adequado para a faixa de concentração contemplada na validação do método ( $0,03$  a  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), uma vez que valores de desvio padrão relativo (CV) entre as réplicas e os valores de recuperação estão de acordo com os parâmetros aceitáveis pelas agências regulatórias nacionais e internacionais (CASSIANO *et al.*, 2009).

Considerando o intervalo da curva de calibração do método e o fator de concentração aplicado ao preparo de amostras, a concentração máxima de

microcistina-LR presente na amostra poderia ser de 30  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Uma vez verificado a presença de concentrações maiores nos extratos utilizados no presente trabalho, foi necessário realizar, nesses casos, o preparo da amostra utilizando fator de concentração menor (10).

**Tabela 12- Valores de recuperação obtidos em diferentes concentrações de microcistina-LR em meio ASM-1 extraída em fase sólida (fator de concentração =50).**

Concentração teórica ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Réplica	Área	Área Média	Desvio Padrão	CV (%)	Concentração média ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Recuperação média (%)
0,1	1	22564					
	2	20824	20622	2050	9,94	0,074	83
	3	18479					
0,7	1	207354					
	2	207050	213329	10613	4,98	0,672	103
	3	225583					
1,3	1	402254					
	2	433415	416650	15715	3,77	1,302	94
	3	414281					

CV:coeficiente de variação

Fonte: Autoria própria.

Com o intuito de comparar a quantificação obtida em relação aos dois fatores de concentração, uma amostra do extrato foi preparada, em triplicata, utilizando ambos fatores de concentração. Os valores de concentração obtidos e os coeficientes de variação foram avaliados e comparados (Tabela 13).

Foram observados boa precisão entre as réplicas para ambos os fatores de concentração testados, sendo que a concentração média de microcistina-LR encontrada para um fator igual a 10 foi apenas 4,8% inferior ao fator utilizado nos ensaios de recuperação (50).

**Tabela 13- Comparação da concentração de microcistina-LR em extrato bruto para diferentes fatores de concentração (cultivo 04.05.16).**

Fator de Concentração	Replicata	Área	Média ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Desvio Padrão ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	CV(%)
10	1	253516			
	2	261823	80,48	1,50	1,9
	3	253380			
50	1	1401588			
	2	1351756	84,57	2,33	2,8
	3	1327848			

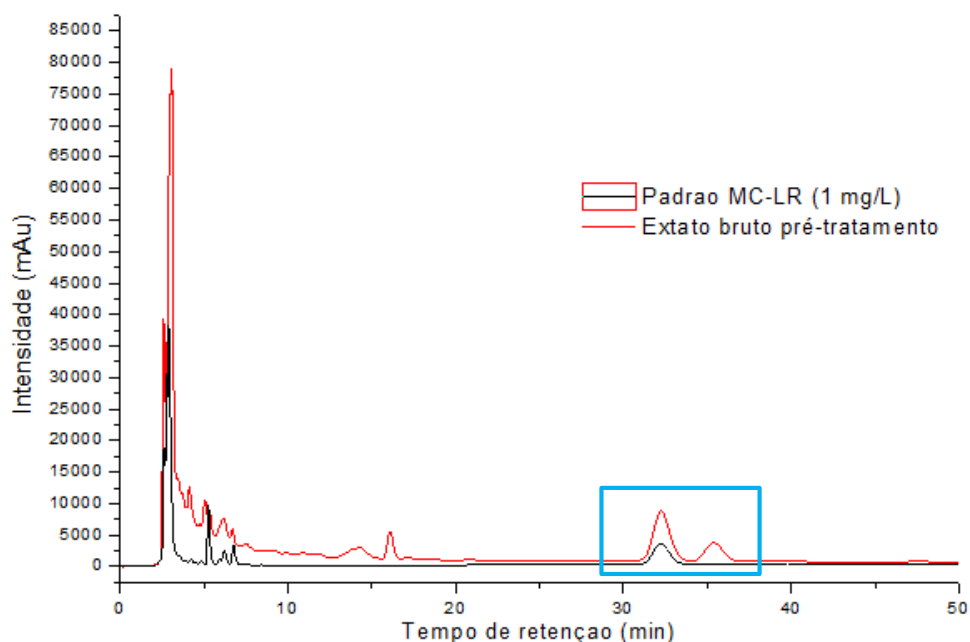
CV:coeficiente de variação

Fonte: Autoria própria.

### 5.3.2 Análise de amostras

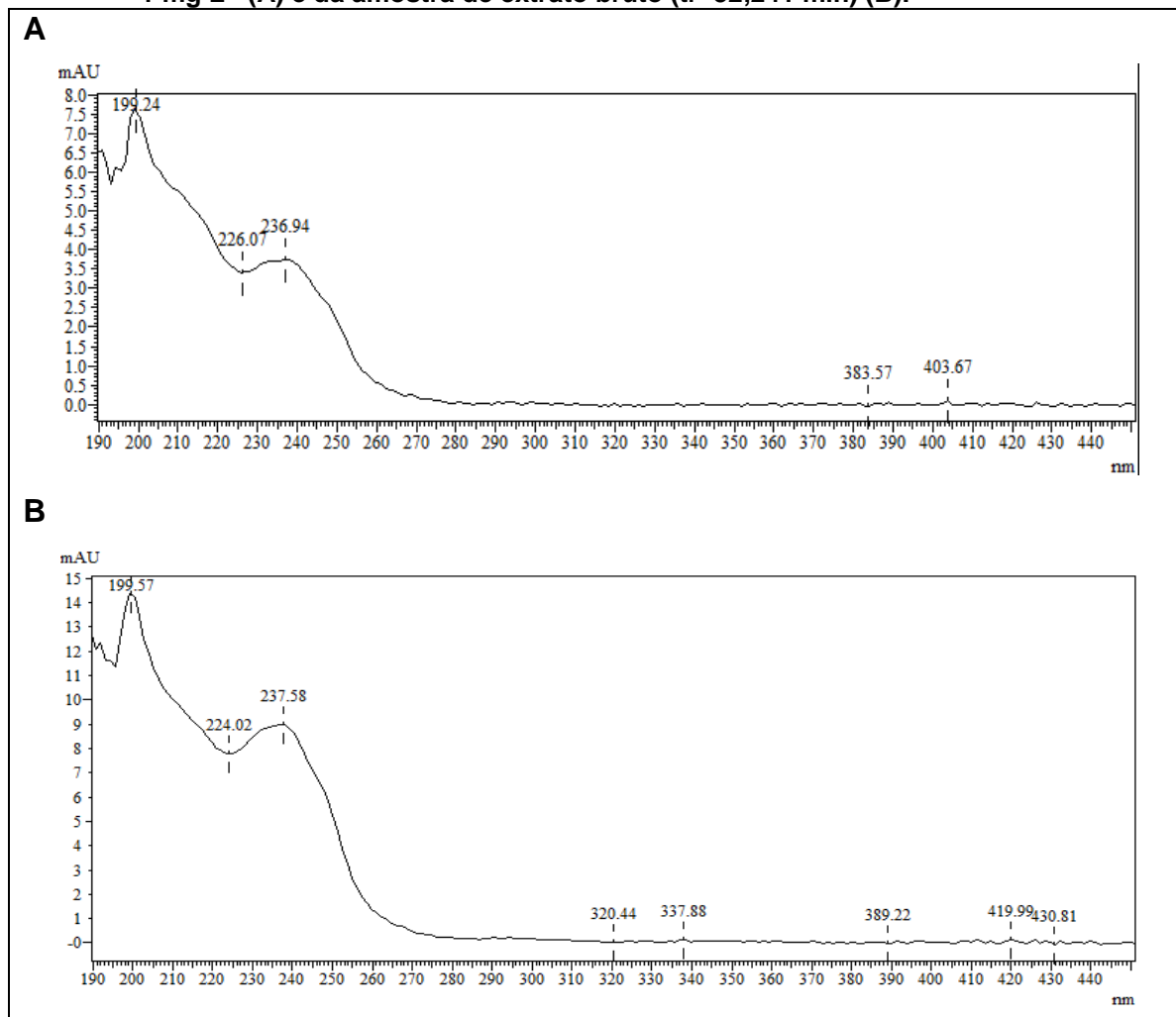
A amostra do extrato bruto utilizado nos experimentos para escolha da melhor condição reacional foi analisada conforme descrito na seção 4.4.2. O cromatograma obtido (238 nm) foi comparado ao do padrão, de modo a identificar o pico correspondente à microcistina (Figura 24), o qual evidenciou uma banda cromatográfica no tempo de retenção 32,24 min, sendo atribuída à toxina, uma vez que além da coincidência com o tempo de retenção do padrão, apresenta também o espectro de absorção característico da microcistina-LR (Figura 25) (Liu *et al*, 2010).

**Figura 24 - Cromatograma ( $\lambda=238$  nm) do extrato bruto e do padrão de microcistina-LR ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ).**



Fonte: Autoria própria.

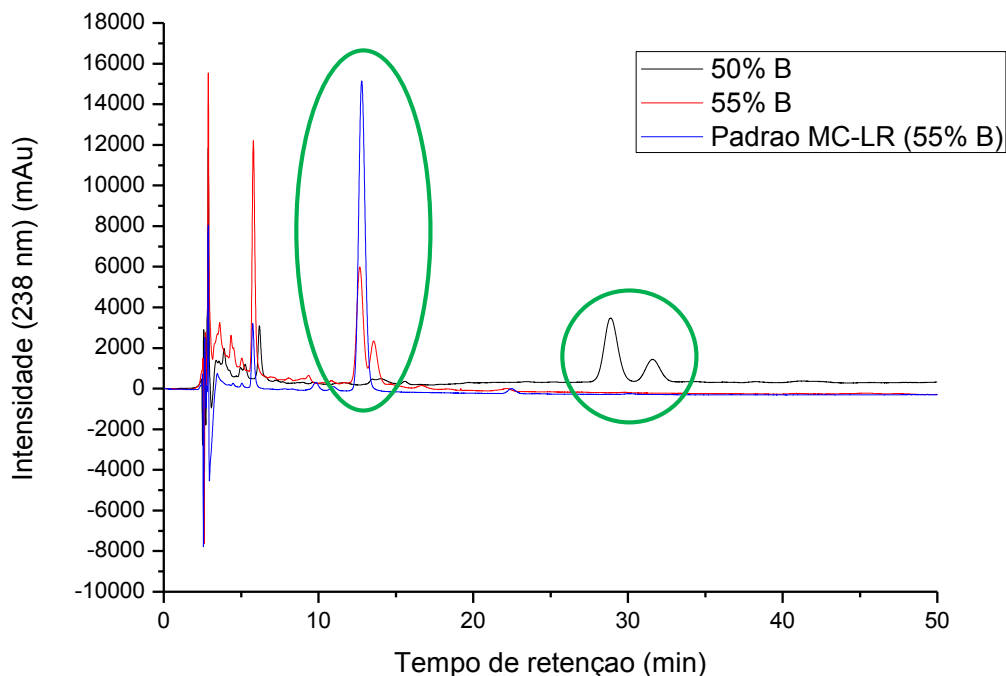
Figura 25- Perfil de absorção UV-vis das bandas cromatográficas do padrão de microcistina-LR 1 mg L<sup>-1</sup> (A) e da amostra de extrato bruto (tr=32,241 min) (B).



Fonte: Autoria própria.

Com o intuito de diminuir o tempo da análise, foi avaliada a diminuição do tempo de retenção do analito na coluna cromatográfica, aumentando a proporção do modificador orgânico na fase móvel de 50% para 55% v/v (Figura 26). Embora o tempo de retenção tenha sido reduzido de 28,9 min para 12,7 min, observou-se a deterioração na qualidade da separação, que pode ser expressa pela queda na resolução de 1,14 para 0,77. Desta forma, optou-se por manter as condições cromatográficas anteriormente validadas por Torres (2016).

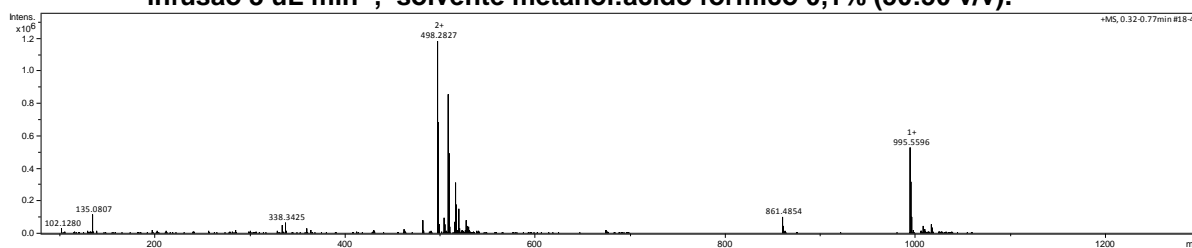
**Figura 26-** Cromatogramas ( $\lambda=238$  nm) do extrato bruto celular e padrão de microcistina-LR, em diferentes composições da fase móvel (solvente A: água ultra pura com 0,05% de TFA; solvente B: metanol).



**Fonte:** Autoria própria.

A confirmação da estrutura da microcistina-LR foi obtida através de análises do extrato bruto em experimentos de LC-QTOF-MS, conforme descrito na seção 4.4.3. Inicialmente foi obtido o espectro de massas da solução de padrão ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) em experimento de infusão direta no modo positivo, com o intuito de ajustar os parâmetros de ionização e verificar os fragmentos formados (Figura 27). A presença do íon molecular  $[M-H]^+$  pode ser verificada pela razão  $m/z$  995,5596, assim como pela presença de  $m/z$  498,2827, correspondente à molécula com duas cargas positivas  $[M-H]^{+2}$ .

**Figura 27 -** Espectro de massas de solução padrão de microcistina-LR ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ), vazão de infusão  $3 \text{ uL min}^{-1}$ , solvente metanol:ácido fórmico 0,1% (50:50 v/v).

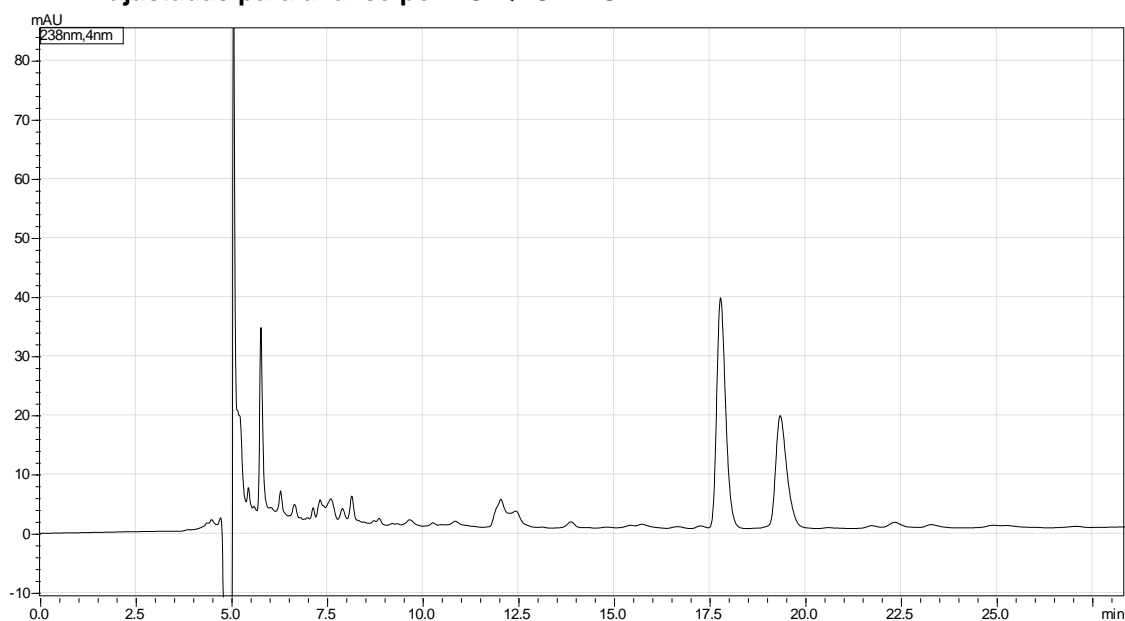


**Fonte:** Autoria própria



O cromatograma obtido para a amostra de extrato bruto apresentou características semelhantes às obtidas no método de quantificação (Figura 28), entretanto a banda cromatográfica referente ao padrão apresentou tempo de retenção de 17,6 min. Da mesma forma como anteriormente observado, a presença de uma banda cromatográfica em tempo de retenção próximo ao padrão (~19 min) foi verificada e seu espectro de absorção UV apresentou semelhança em relação ao das microcistinas.

**Figura 28- Cromatograma ( $\lambda = 238$  nm) de amostra de extrato bruto obtido em condições ajustadas para análise por LC-QTOF-MS.**

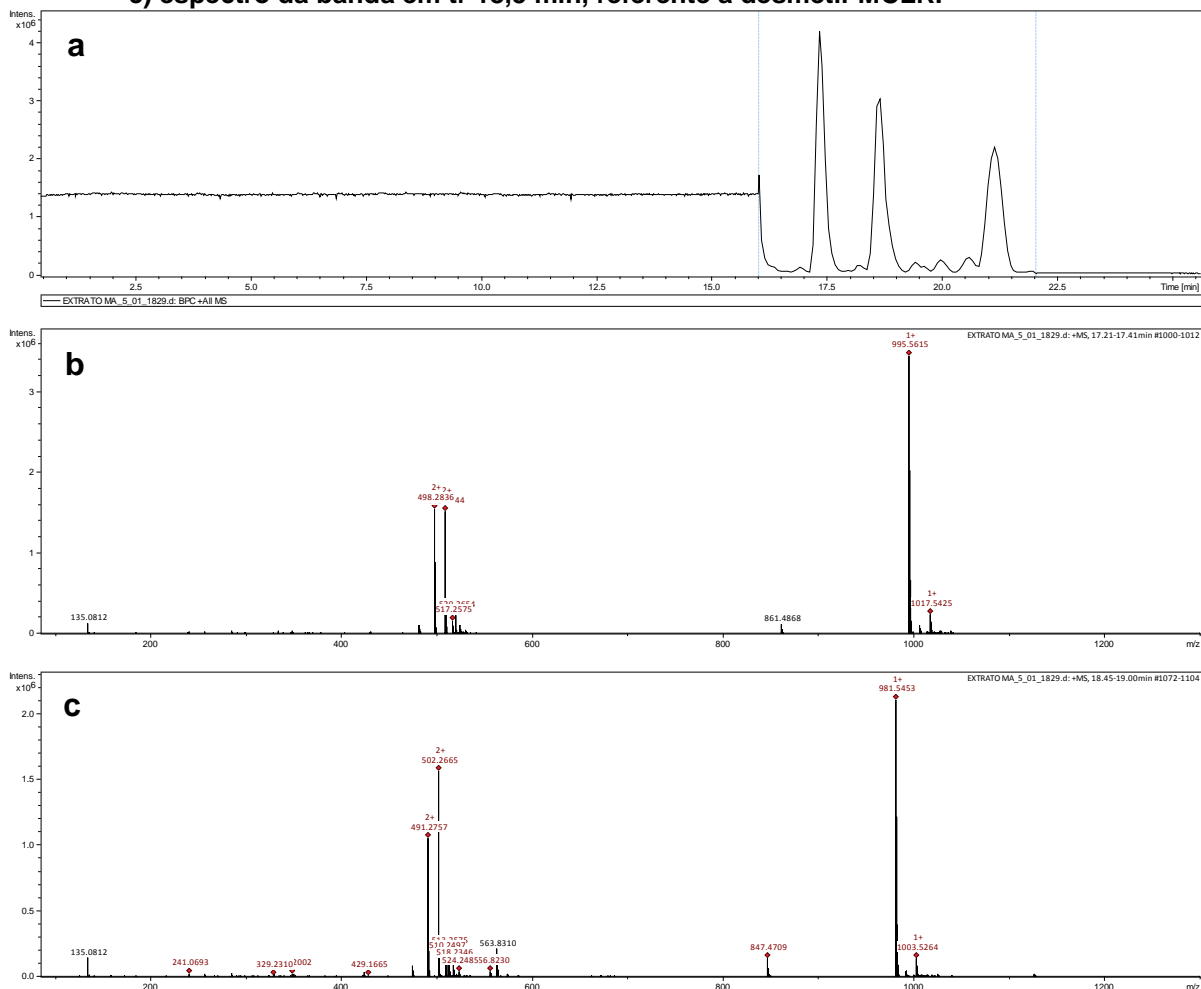


**Fonte: Autoria própria.**

Nas análises de LC-QTOF-MS, a presença da microcistina-LR no extrato bruto foi novamente confirmada por análises no modo AutoMSn e MRM, nas quais se obtém a fragmentação dos íons de maior intensidade e de íons-precusores selecionados, respectivamente (Figuras 29 e 30). A banda cromatográfica de tr 18,6 min foi identificada como a variante desmetilada da microcistina-LR, uma vez que sua massa molecular  $[M-H]^+$  correspondeu a  $m/z$  981,5453. Ambas as estruturas foram detectadas também na forma de adutos de sódio  $[M-Na]^+$ , com razões  $m/z$  1017,5425 e 1003,5264 e como estruturas duplamente carregadas  $[M-H]^{+2}$  ( $m/z$  498,2827 para microcistina-LR e 491,2757 para a variante desmetilada). A presença do íon em  $m/z$  135,0812 corresponde ao fragmento da porção Adda, característico da estrutura de microcistinas (Figura 1) e presente em todos os experimentos

realizados (MILMAN, B.L; ZHURKOVICH, I.K., 2014). A banda cromatográfica com tempo de retenção 21 min não teve sua estrutura identificada.

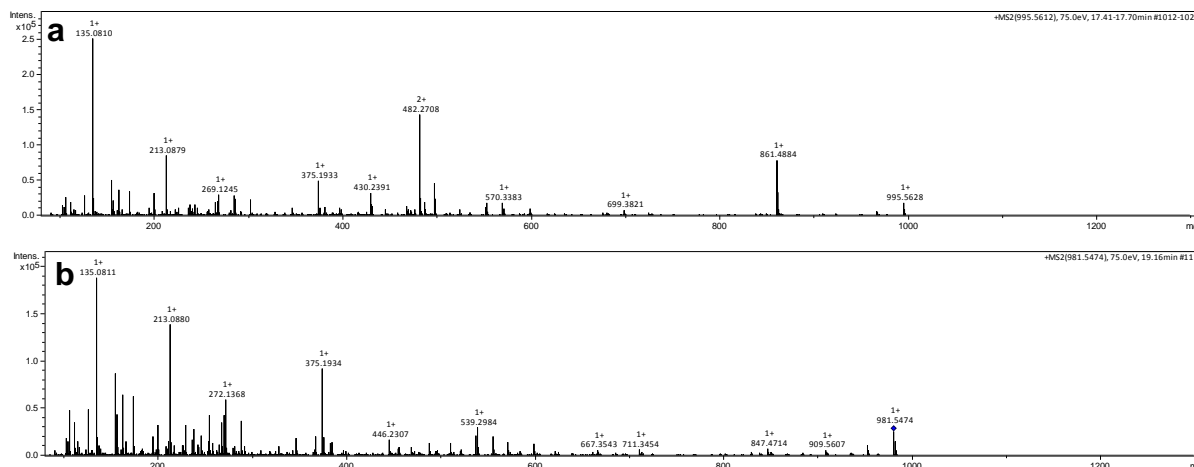
**Figura 29- Cromatograma no modo AutoMSn de amostra de extrato bruto de *M. aeruginosa*. a) cromatograma de pico base; b) espectro da banda em tr 17,5 min, referente à MCLR; c) espectro da banda em tr 18,5 min, referente à desmetil-MCLR.**



**Dados de composição: microcistina-LR (MCLR): composição molecular:  $C_{49}H_{74}N_{10}O_{12}$ , massa calculada:  $995,5560 \text{ g mol}^{-1}$ , a massa exata experimental:  $995,5615$  (erro médio de  $5,5 \text{ ppm}$ ).**

**Fonte: Autoria própria.**

**Figura 30-** Espectros de massas obtidos no modo MRM. a) microcistina-LR  $[M-H]^+$   $m/z$  995,5612, b) desmetil-MCLR  $[M-H]^+$   $m/z$  981,5474.

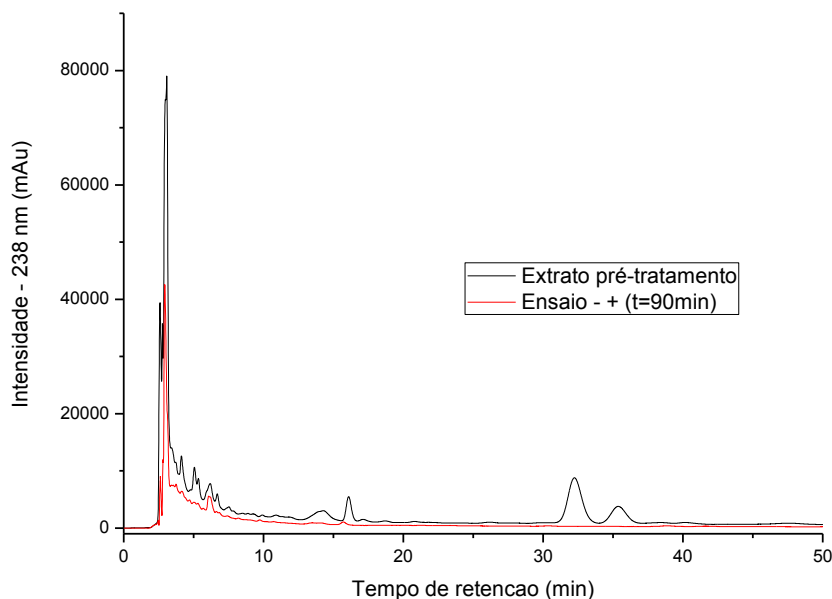


Fonte: Autoria Própria.

As análises por LC-QTOF-MS confirmaram a identificação da banda cromatográfica atribuída para a microcistina-LR. A presença de sua variante desmetilada no extrato bruto é um indicativo de variabilidade no metabolismo da cepa cultivada e mostra o potencial tóxico da mesma, uma vez que ambas as estruturas contém a porção Adda, à qual é atribuída atividade tóxica. Entretanto, a posição da desmetilação na estrutura e determinação exata da variante presente requer experimentos adicionais de caracterização estrutural, que estão fora do escopo do presente trabalho.

Para as análises das amostras pós-tratamento, constatou-se a manutenção da seletividade do método cromatográfico, com ausência de coeluição de bandas com a microcistina-LR, o que permitiu sua quantificação pelo mesmo método de separação já empregado para as amostras de extrato bruto. Na Figura 31 são apresentados os cromatogramas antes e após o de tratamento do extrato (condições do ensaio 3), na qual observa-se a diminuição do pico da microcistina-LR a níveis abaixo do LQ.

**Figura 31- Cromatograma ( $\lambda=238$  nm) do extrato celular antes e após 90 min de processo foto-Fenton solar (Ensaio 3  $\text{H}_2\text{O}_2= 85,20 \text{ mg L}^{-1}$  e  $\text{Fe}^{2+}= 5$  adições de  $3,40 \text{ mg L}^{-1}$ ).**



**Fonte: Autoria própria.**

#### 5.4 ENSAIO DE FITOTOXICIDADE EM *Sinapis alba*

Para todas as amostras testadas e controles negativo e positivo, observou-se coeficiente de variação nas medidas das radículas menores que 30%, e índice de germinação acima de 90% para o controle negativo, atendendo aos requisitos para aceitar os resultados dos bioensaios realizados como válidos.

Ensaio de fitotoxicidade em *Sinapis alba* foram realizados com diferentes concentrações de microcistina-LR em água de osmose reversa, a partir de padrão certificado da toxina, e também para o meio ASM-1 (Tabela 14). Dos dados da Tabela 14, pode-se concluir que o efeito fitotóxico no alongamento de radícula de *Sinapis alba* é dependente da concentração da microcistina-LR no meio. Considerando os resultados de ANOVA, concentrações de microcistina-LR próximo ao limite aceito em água potável,  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ , causou estimulação do crescimento das radículas, enquanto que, à medida que se aumenta a concentração de toxina no meio, é observada esta estimulação no crescimento das radículas até atingir um ponto de inflexão, próximo a  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , quando a toxina passa a estimular cada vez menos o crescimento, tornando-se tóxica ao desenvolvimento da planta em concentrações próximas a  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ .

**Tabela 14- Efeito fitotóxico de diferentes concentrações de microcistina-LR dissolvidos em água de osmose reversa e do meio ASM-1 no crescimento da radícula de *Sinapis alba*.**

Amostra	IG <sup>1</sup> (%)	Média (cm)	Categoria de toxicidade
Controle	100	1,84±0,30 <sup>a</sup>	--
MC-LR 1 µg L <sup>-1</sup>	100	2,07±0,27 <sup>b</sup>	E
MC-LR 10 µg L <sup>-1</sup>	100	3,12±0,75 <sup>c</sup>	E
MC-LR 50 µg L <sup>-1</sup>	98,1	2,23±0,45 <sup>b</sup>	E
MC-LR 100 µg L <sup>-1</sup>	98,1	1,72±0,44 <sup>a,d</sup>	SE
MC-LR 200 µg L <sup>-1</sup>	98,1	1,65±0,29 <sup>d</sup>	I
MEIO ASM-1	98,1	1,52±0,23 <sup>d</sup>	I

<sup>1</sup>Índice de Germinação; E = estimulação; I= inibição; SE = sem efeito significativo; médias com diferentes letras possuem diferenças significativa (teste t, p<0.05).  
Fonte: A autoria própria.

Os mecanismos de atuação da microcistina-LR em plantas ainda não foram bem elucidados, no entanto sabe-se que esta toxina está relacionada com a inibição da fosfatase PP1 e PP2A também em plantas e que estas enzimas, por sua vez, são responsáveis por vários processos fisiológicos e moleculares como a regulação de genes ligados ao armazenamento de amido, a ativação de enzimas responsáveis pela fixação de CO<sub>2</sub>, à indução da síntese de sacarose, entre outros (MCELHINEY; LAWTON; LEIFERT, 2001).

Estudos anteriores relatam efeitos significativos de microcistina-LR são só no crescimento de radículas de *Sinapis alba*, como também outro efeitos. Kós e colaboradores (1995), observaram inibição no crescimento das raízes de *Sinapis alba*, quando a semente é exposta a microcistinas purificadas, com CI<sub>50</sub> de 3 mg L<sup>-1</sup>. Quando testada a ação fitotóxica de microcistina-LR sobre o crescimento desta mesma espécie, esse valor cai para 1,9 mg L<sup>-1</sup> (MCELHINEY; LAWTON; LEIFERT, 2001). M-Hamvas e colaboradores (2003) observaram efeito significativos de microcistina-LR também na massa e no crescimento do hipocótilo dessas plantas, tanto quando encubadas ao abrigo de luz quanto com fotoperíodo, a partir de

contrações da toxina de 3,5 mg L<sup>-1</sup>. Além disso, alterações no número de raízes secundárias e necroses nos cotilédones foram observadas em maiores concentrações (22 mg microcistina-LR L<sup>-1</sup>). Também destacou-se a dependência da concentração da toxina com o efeito nos organismos, indo ao encontro das respostas obtidas no presente trabalho.

Percebe-se, no entanto, que os trabalhos anteriormente mencionados testam concentrações bastante elevadas quando comparada às avaliadas no presente estudo, e que portanto, não puderam avaliar o efeito de estimulação da toxina em concentrações menores. Gehringer e colaboradores (2003) avaliaram o efeito de baixas concentrações de microcistina-LR em extrato metanólico de *M. aeruginosa* (1 e 10 µg microcistina-LR L<sup>-1</sup>) em sementes de *Lepidium sativum* (agrião), não só para o peso seco e crescimento das plantas mas também para alterações enzimáticas, glutathione S-transferase (GST) e glutathione peroxidase (GPx). Essas enzimas estão ligados a mecanismos de desintoxicação da célula. Para a menor concentração da toxina testada, 1 µg L<sup>-1</sup>, foi possível observar uma inibição na atividade dessas enzimas nos primeiros dias de exposição e uma posterior estimulação, o que não ocorreu para níveis maiores de microcistina, as quais estimularam os mecanismos de desintoxicação desde o início do bioensaio. Correlacionando com os dados apresentados na Tabela 14, talvez, assim como no trabalho de Gehringer (2001), diferentes concentrações de microcistina-LR produzam efeitos antagônicos em sistemas responsáveis pelo crescimento radicular, justificando uma inicial estimulação no crescimento em menores concentrações da toxina.

O meio ASM-1, quando testado sem a adição de padrão ou do cultivo de *M. aeruginosa*, mostrou inibição ao crescimento da planta provavelmente devido à composição do meio. Mesmo estando em concentrações menores no meio ASM-1, Hernández-Allica e colaboradores (2007) mostraram o efeito fitotóxico do EDTA em *Cynara cardunculos*, a partir de 250 µM. Nesta concentração, o quelante inibiu significativamente ( $p < 0,05$ ) o crescimento das raízes bem como interferiu na razão da transpiração e evapotranspiração das plantas. O resultado obtido para o bioensaio com *Sinapis alba* justifica não ter sido realizados bioensaios com amostras do extrato em meio ASM-1 antes e após o processo foto-Fenton, já que os resultados sofreriam com a interferência da matriz.

Os efeitos observados nas amostras de extrato bruto em água do Rio Verde, antes e pós processo foto-Fenton estão apresentados na Tabela 15.

**Tabela 15 - Efeito fitotóxico de amostras, antes e após serem submetidos ao processo foto-Fenton solar em reator tipo CPC, no crescimento da radícula de *Sinapis alba*.**

Amostra	IG <sup>1</sup> (%)	Média (cm)	Categoria de toxicidade
Controle	100	1,68±0,39 <sup>a</sup>	--
Branco t=0 min (Água do Rio Verde)	90,7	2,74±0,64 <sup>b</sup>	E
Branco t=62 min	87	1,50±0,51 <sup>a,d,e</sup>	SE
Branco t=120 min	90,7	1,28±0,09 <sup>a,d,e</sup>	SE
Extrato Rio Verde t=0 min	83,3	3,41±0,15 <sup>c</sup>	E
Extrato Rio Verde t=62 min	81,5	3,46±0,96 <sup>c</sup>	E
Extrato Rio Verde t=120 min	92,6	1,48±0,29 <sup>a,d</sup>	SE

<sup>1</sup>Índice de Germinação; E = estimulação; I= inibição; SE = sem efeito significativo; médias com diferentes letras possuem diferenças significativa (teste t, p<0.05).

Fonte: Autoria própria.

Foi possível observar, a partir dos dados apresentados, que houve estimulação no crescimento da radícula da mostarda, para a amostra de extrato não submetido ao processo e para amostra de água do Rio Verde. Isso pode ser explicado pela maior oferta de nutrientes nestes meios, permitindo que a planta possa se desenvolver de forma mais eficaz. Na amostra de extrato, no entanto, a concentração de microcistina-LR é elevada, 204,78 µg L<sup>-1</sup>, o que justificaria uma inibição significativa no crescimento de radícula por ação da toxina, como mostrado anteriormente da Tabela 14. Há de se considerar, no entanto, que possam ocorrer interações da microcistina-LR com demais componentes do meio, tornando a toxina menos disponível para atuar nas reações bioquímicas da planta. Neste sentido, já existem estudos que demonstram a forte interação de compostos com características hidrofóbicas com a matéria orgânica natural (ácido húmicos, ácidos fúlvicos e compostos não-húmicos) alterando a disponibilidade dos mais diferentes compostos (organoclorados, pirenos e várias classes de pesticidas) podendo potencializar ou

abrandar os efeitos tóxicos desses contaminantes sobre diferentes organismos aquáticos (ZHANG; LIN; WU, 2016).

Para as amostras submetidas ao processo foto-Fenton solar pode-se observar que ao longo do tempo de reação, estas deixam de causar efeitos significativos sobre *S. alba*, sendo que para amostra CPC Branco, isso foi alcançado em menores tempos de tratamento. Possivelmente isso se dá pela menor carga orgânica neste meio, em comparação ao Extrato Bruto em Água do Rio Verde, de forma que a oxidação dos compostos do meio se dê de forma mais rápida.

Observou-se leve decréscimo no índice de germinação das sementes submetidas à amostras de água do Rio Verde e do extrato em água do Rio Verde, tratadas ou não, ainda que o índice de germinação se mantivesse acima de 80%. O mesmo não se observou quando as sementes foram postas em contato com meio ASM-1 ou com a toxina em água de osmose reversa (Tabela 14), com IG acima de 90% para todas as amostras. Isto nos leva a crer que pudesse haver na água do Rio Verde, algum componente que pudesse interferir na germinação de *Sinapis alba*, mas que, por sua composição complexa, não pode ser identificada.

Desta forma, pode-se concluir que o processo foto-Fenton não gerou subprodutos de degradação que conferissem à amostra submetida ao tratamento fitotoxicidade para o organismo testado.



## 6 CONCLUSÕES

A partir dos ensaios do planejamento fatorial, pode-se observar efeito significativo da dosagem de  $\text{Fe}^{2+}$  sobre a remoção de microcistina-LR no extrato bruto mas o mesmo não foi observado para variações na dosagem de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Foi possível concluir que a melhor condição para o processo foto-Fenton solar, dentre as testadas, são as condições do ponto central ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{DQO}=3,18$  e  $\text{Fe}^{2+}/\text{DQO}=0,318$ ), escolhidas com base na remoção de DQO, apenas. Valores de remoção de COD e microcistina-LR alcançadas nos experimentos não foram consideradas como respostas pois sofrem diretamente com a interferência do arraste de matéria orgânica pelo Fe precipitado.

O estudo sobre o efeito da matriz na eficiência do processo mostrou que a presença de íons sequestrante de radicais no meio ASM-1 prejudicou de forma significativa a eficiência do processo foto-Fenton.

Mesmo com a presença de íons inorgânicos em elevada concentração, ensaios realizados em reator CPC ainda se mostraram satisfatórios na remoção de DQO (75%) e microcistina-LR (70%) do extrato bruto em meio ASM-1, para ambas as replicatas, após 120 minutos de tratamento. Ainda pode-se concluir que, para o extrato bruto em água natural, a eficiência do processo foi ainda melhor. Com mesmo tempo de reação, mineralizou-se 77% dos compostos orgânicos do meio, e valores na remoção de microcistina-LR acima de 99% foram alcançados com apenas 45 min de reação, mesmo partindo de concentrações iniciais da toxina próximas a  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ . O modelo cinético das reações de degradação de microcistina-LR pelo processo foto-Fenton solar se aproximam à cinética de primeira ordem, tal qual relatado em estudos anteriores. No entanto, observou-se uma piora nos parâmetros turbidez, cor verdadeira e cor aparente após o tratamento, devido à presença do Fe precipitado na amostra. O estudo de fitotoxicidade em sementes de *S. alba* mostraram que o tratamento não conferiu toxicidade à amostra.

Avaliando o processo por completo, quanto ao seu potencial no tratamento de água para consumo humano, é possível afirmar que uma etapa que contemplasse o processo foto-Fenton solar poderia ser acoplado ao sistema convencional de tratamento, podendo o processo ser realizado após as etapas de coagulação /floculação e sedimentação/flotação. Assim, células intactas de *Microcystis aeruginosa* seriam removidas e a água chegaria à etapa de oxidação

avançada com melhor qualidade, requerendo menores tempos de retenção no reator, além de diminuir a demanda por  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Os problemas com o aumento da turbidez e de cor aparente devido à precipitação de Fe durante o processo foto-Fenton solar, seria facilmente resolvida pela posterior etapa de filtração, comumente encontradas nas ETAs. A contribuição da etapa de oxidação avançada no tratamento, certamente se refletiria na redução da formação de subprodutos de desinfecção, tais como THM e HAAs, ao final do tratamento.

Porém, até sua efetiva implantação em escala real de tratamento, é necessário que novos estudos sejam realizados com vistas a testar a eficiência do processo foto-Fenton solar em amostras de águas superficiais em eventos de floração, a otimização das condições de tratamento, ensaio acoplados à outras etapas físicas de tratamento, estudos de viabilidade econômica e de engenharia para transposição do processo a escalas maiores.

Além disso, poderiam ser melhor elucidados os subprodutos de degradação da microcistina-LR formados no processo foto-Fenton solar, explorar bioensaios com organismos de diferentes níveis tróficos, avaliando diferentes tipos de efeitos e também alternativas que possam melhorar a solubilidade de Fe no meio reacional.

## REFERÊNCIAS

ADEWUYI, Y.; KHAN, M. Nitric oxide removal from flue gas by combined persulfate and ferrous–EDTA solutions: Effects of persulfate and EDTA concentrations, temperature, pH and SO<sub>2</sub>. **Chemical Engineering Journal**, v. 304, p. 793-807, 2016.

AGUIAR, A. et al. Mecanismo e Aplicações da Reação de Fenton Assistida por Compostos Fenólicos Redutores de Ferro. **Química Nova**, v. 30, p. 623-628, 2007.

ANDREOLI, C. V.; CARNEIRO, C. **Gestão integrada de mananciais de abastecimento eutrofizados**. Curitiba: Sanepar Finep, 2005.

ANTONIOU, M. G. et al. LC/MS/MS structure elucidation of reaction intermediates formed during the TiO<sub>2</sub> photocatalysis of microcystin-LR. **Toxicon**, v. 51, p. 1103-1118, 2008.

ANTONOPOULOU, M. et al. A review on advanced oxidation processes for the removal of taste and odor compounds from aqueous media. **Water Research**, v. 53, p.215-234, 2014.

APHA - American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 22th ed., 2012.

ATKINS, P. W.; PAULA, J. de. **Físico-química**. 8 ed., v. 2. Rio de Janeiro: LTC, 2011.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. da M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Paulo: Rima, 2004.

BANDALA, E. R. et al. Degradation of microcystin-LR toxin by Fenton and Photo-Fenton processes. **Toxicon**, 43, p. 829-832, 2004.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento da ciência e na indústria**. 4 ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

BAUER, R.; FALMANN, H. The photo-Fenton oxidation: a cheap and efficient wastewater treatment method. **Research on Chemical Intermediates**, v. 23, n.4, p. 341-354, 1997.

BENOTTI, M. J. et al. Evaluation of photocatalytic reactor membrane pilot system for the removal of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds from water. **Water Research**, v. 43, p. 1513-1522, 2009.

BISCHOFF, K. The toxicology of microcystin-LR: Occurrence, toxicokinetics, toxicodynamics, diagnosis and treatment. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 43, p.294-297, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**.

BRASIL. Ministério das Cidades. **Saneamento ambiental 5**. Brasília, DF, 2004a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução n.518, de 25 de março de 2004b. **Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências**.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n.357, de 18 de maio de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências**.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n.430, de 13 de maio de 2011a. **Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n. 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA**.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução n.2914, de 12 de dezembro de 2011b. **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**.

BULLERJAHN, G. S. et al. Global solution to regional problems: collecting global expertise to address the problem of harmful cyanobacteria blooms. A Lake Erie case study. **Harmful Algae**, v. 54, p. 223-238, 2016.

CALIJURI, M. C.; ALVES, M. S. A.; SANTOS; A. C. A. do. **Cianobactérias e Cianotoxinas em Águas Continentais**. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2006.

CARMICHAEL, W. Cyanobacteria secondary metabolites- the cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, p.445-459, 1992.

CARRA, I. et al. Iron dosage as a strategy to operate the photo-Fenton process at initial neutral pH. **Chemical Engineering Journal**, v. 224, p.67-74, 2013.

CASSIANO, N. M. et al. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

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

CHOW, C. et al. The impact of convencional water treatment processes on cells of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Water Research**, v. 33, n.15, p.3253-3262, 1999.

CUBAS, K. G. et al. Avaliação do desempenho de carvões ativos usados na remoção de compostos orgânicos de águas naturais, provenientes de cianobactérias e suas toxinas. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, v. 14, p. 27-32, 2009.

DIAS, I. N. et al. Enhancement of the photo-Fenton reaction at near neutral pH through the use of ferrioxalate complexes: A case study on trimethoprim and sulfamethoxazole antibiotics removal from aqueous solutions. **Chemical Engineering Journal**, v. 247, p. 302-313, 2014.

DI BERNARDO, L.; PAZ, L. P. S. **Seleção de tecnologias de tratamento de água**. São Carlos: LDiBe, 2008.

DI BERNARDO, L.; MINILLO, A.; DANTAS, A. D. B. **Florações de algas e de cianobacterias: suas influencias na qualidade de águas e nas tecnologias de tratamento**. São Carlos: LDiBe, 2010.

DOMÉNECH, X.; JARDIM, W.F.; LITTER, M. I. Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. In: BLESA, M. A. Eliminación de Contaminantes por Fotoatálisis Heterogénea, 2001, La Plata. **Anais...La Plata**, Digital Graphic, 2001. p. 3-26.

DÖRR, F. A. et al. Microcystins in South American aquatic ecosystems: occurrence, toxicity and toxicological assays. **Toxicon**, v.56, p. 1247-1256, 2010.

DOUMIC, L. I. et al. Enhancement of a solar photo-Fenton reaction by using ferrioxalate complexes for the treatment of a synthetic cotton-textile dyeing wastewater. **Chemical Engineering Journal**, v. 277, p. 86–96, 2015.

DRIKAS, M. et al. Using coagulation, flocculation and settling to remove toxic cyanobacteria. **Journal of American Water Works Association – AWWA**, v. 94, n.2, p.100-111, 2001.

DUARTE, E. T. F. M et al. Construção e estudos de performance de um reator fotoquímico tipo CPC ("Compound Parabolic Concentrator"). **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 921-926, 2005.

EL KHALLOUFI, F. et al. Phytotoxic effects of a natural bloom extract containing microcystins on *Lycopersicon esculentum*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 79, p. 199-205, 2012.

ESTEVEZ, F. de A. **Fundamentos de Limnologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2011.

FARIA, P. C. C.; ÓRFÃO, J. J. M.; PEREIRA, M. R. F. Activated carbon and ceria catalysts applied to catalytic ozonation of dyes and textile effluents. **Applied Catalysis B:Environmental**, v. 88, p.341-350, 2009.

FREITAS, Adriane Martins de. **Utilização de processo oxidativos avançados para remediação de águas contaminadas por toxinas produzidas por cianobactérias**. 2008. 130 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. **7º Caderno de Pesquisa em Engenharia de Saúde Pública**. Brasília, DF, 2013.

GARCIA, J. C. et al. Evolutionary follow-up of the photocatalytic degradation of real textile effluents in TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> systems and their toxic effects on *Lactuca sativa* seedlings. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 20, n. 9. São Paulo, 2009.

GEHRINGER, M. et al. The use of *Lepidium sativum* in a plant bioassay system for the detection of microcystin-LR. **Toxicon**, 41, p.871-876, 2003.

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**, 15, p. 796–804, 1964.

GRAHAN, D. et al. The degradation of microcystin-LR using doped visible light absorbing photocatalysts. **Chemosphere**, v. 78, p.1182-1185, 2010.

HAN, J. et al. The effect of alum coagulation for in-lake treatment of toxic Microcystis and other cyanobacteria related organisms in microcosm experiments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 96, p. 17-23, 2013.

HE, X. et al. Efficient removal of microcystin-LR by UV-C/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in synthetic and natural water samples. **Water research**, v. 46, p. 1501-1510, 2012.

HENDERSON, R. K.; PARSONS, S. A.; JEFFERSON, B. The impact of differing cell and algogenic organic matter (AOM) characteristics on the coagulation and flotation of algae. **Water Research**, v. 44, p.3617-3624, 2010.

HERNÁNDEZ-ALLICA, J. et al. EDTA-induced heavy metal accumulation and phytotoxicity in cardoon plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.60, p. 26-32, 2007.

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

HUANG, C. P.; DONG, C.; TANG, Z. Advanced chemical oxidation: its present role and potential future in hazardous waste treatment. **Waste Manage**, v. 13, p. 361-377, 1993.

HUANG, K. et al. Degradation of volatile organic compounds with thermally activated persulfate oxidation. **Chemosphere**, v.61, p. 551-560, 2005.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ - IAP. Manual de métodos para avaliação de toxicidade. Curitiba: IAP, 1997. p. 101.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ – IAP. Monitoramento da qualidade das águas dos reservatórios do estado do Paraná, no período de 2005 a 2008. Curitiba, 2009. Disponível em: <  
[http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/boletins/RELATORIO\\_AGUA/relatorio\\_RESERVATORIOS\\_2005\\_2008.pdf](http://www.iap.pr.gov.br/arquivos/File/boletins/RELATORIO_AGUA/relatorio_RESERVATORIOS_2005_2008.pdf)>. Acesso em: 8. Mai. 2016.

KANG, Y. W.; CHO, M.; HWANG K. Correction of hydrogen peroxide interference on standard chemical oxygen demand test. **Water Research**, v.33, p.1247-1251, 1999.

KARTHIKEYAN, S. et al. Treatment of textile wastewater by homogeneous and heterogeneous Fenton oxidation processes. **Desalination**, v. 281, p.438-445, 2011.

KERN, D. I. et al. Toxicity and genotoxicity of hospital laundry wastewaters treated with photocatalytic ozonation. **Science of the Total Environment**, v. 443, p. 566-572, 2013.

KLAMERTH, N. et al. Degradation of fifteen emerging contaminants at  $\mu\text{gL}^{-1}$  initial concentrations by mild solar photo-Fenton in MWTP effluent. **Water Research**, v. 44, p. 545-554, 2010.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes Ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004.

KÓS, P. et al. Simple and Efficient Method for Isolation and Measurement of Cyanobacterial Hepatotoxins by Plant Tests (*Sinapis alba* L.). **Analytical Biochemistry**, v. 225, p. 49-53. 1995.

KOSITZI, M. et al. Solar photocatalytic treatment of simulated dyestff effluents. **Solar Energy**, v. 77, p. 591-600, 2004.

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

JONES, G.J.; Orr, P.T. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. **Water Research**, v. 28, p. 871–876, 1994.

LI, Y.; SUN, J.; SUN, S.  $\text{Mn}^{2+}$ -mediated homogeneous Fenton-like reaction of Fe(III)-NTA complex for efficient degradation of organic contaminants under neutral conditions. **Journal of Harzardous Material**, v. 313, p.193-200, 2016.

LI, Y.; ZHANG, A. Removal of steroid estrogens from waste activated sludge using Fenton oxidation: influencing factors and degradation intermediates. **Chemosphere**, 105, p. 24-30, 2014.



LIBANIO, M. **Fundamentos de qualidade e tratamento de água**. 3 ed. Campinas: Átomo, 2010.

LIU, X. et al. Degradation and detoxification of microcystin-LR in drinking water by sequential use of UV and ozone. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, p. 1897-1902, 2010.

LUNA, L. A. V. et al. Aquatic toxicity of dyes before and after photo-Fenton treatment, **Journal of Hazardous Materials**, v. 276, p. 332-338, 2014.

MALATO, S. et al. Photocatalysis with solar energy at a pilot-plant scale: an overview. **Applied Catalysis B: Environment**, v. 37, p. 1-15, 2002.

MALATO, S. et al. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: recent overview and trends. **Catalysis Today**, v. 147, p. 1-59, 2009.

MCELHINEY, J.; LAWTON, L. A.; LEIFERT, C. Investigations into the inhibitory effects of microcystins on plant growth, and the toxicity of plant tissues following exposure. **Toxicol**, v. 39, p. 1411-1420, 2001.

MEREL, S. et al. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. **Environment Internacional**, v. 59, p. 303-327, 2013.

METCALF, L.; EDDY, H. P. **Wastewater engineering treatment in reuse**. 4.ed. Mcgraw Hill: Boston, 2003.

MICHAEL, I. et al. Solar photo-Fenton process on the abatement of antibiotics at a pilot scale: Degradation kinetics, ecotoxicity and phytotoxicity assessment and removal of antibiotic resistant enterococci. **Water Research**, v. 46, p. 5621-5632, 2012.

MILMAN, B.; ZHURKOVICH, I. K. Identification of toxic cyclopeptides based on mass spectral library. **Analytical Chemistry Research**, v.1, p. 8-15, 2014.

M-HAMWAS, M. et al. Microcystin-LR alters the growth, anthocyanin content and single-stranded DNase enzyme activities in *Sinapis alba* L. seedlings. **Aquatic Toxicology**, v. 62, p. 1-9, 2003.

MOMANI, F. A.; SMITH, D. W.; EL-DIN; M. G. Degradation of cyanobacteria toxin by advanced oxidation processes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 120, p.238-249, 2008.

MONCAYO-LASSO, A. et al. Significant decrease of THMs generated during chlorination of river water by previous photo-Fenton treatment at near neutral pH. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 229, p.46-52, 2012.

MORAIS, Anderson de Assis. Avaliação de técnicas convencionais de tratamento de água para consumo humano na remoção de cianobactérias e cianotoxinas e processos oxidativos para remoção de microcistinas. 159 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

NEYENS, E., BAEYENS, J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. **Journal of Hazardous Materials**, v. 98, p. 33-50, 2003.

NOGUEIRA, R. F. P. et al. Fundamentos e aplicações ambientais dos processos Fenton e foto-Fenton. **Química Nova**, v. 30, n.2, p. 400-408, 2007.

NSCEP - National Service Center for Environmental Publications. **Guidelines Establishing Teste Procedures for the Analysis of pollutants under the clean water**, 1984.

OLLER, I.; MALATO, S.; SÁNCHEZ-PÉREZ, J. A. Combination of advanced oxidation processes and biological treatments for wastewater decontamination – a review. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 4141-4166, 2011.

PARANÁ. Secretária Estadual do Meio Ambiente. Resolução n. 70, de 11 de agosto de 2009. **Dispõe sobre o licenciamento ambiental, estabelece condições e critérios e dá outras providências, para Empreendimentos Industriais.**

PARANÁ. Secretaria Estadual do Meio Ambiente. Resolução n. 81, de 29 de setembro de 2010. **Dispõe sobre Critérios e Padrões de ecotoxicidade para o Controle de Efluentes Líquidos lançados em águas superficiais no Estado do Paraná.**

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

PINHO, L. et al. Effect of TiO<sub>2</sub> Photocatalysis on the Destruction of *Microcystis aeruginosa* Cells and Degradation of Cyanotoxins Microcystin-LR and Cylindrospermopsin. **Chemical Engineering Journal**, v. 268, p. 144-152, 2015a.

PINHO, L. et al. Oxidation of microcystin-LR and cylindrospermopsin by heterogeneous photocatalysis using a tubular photoreactor packed with different TiO<sub>2</sub> coated supports. **Chemical Engineering Journal**, v. 266, p. 100-111, 2015b.

POURIA, S. et al. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **The Lancet**, v. 352, p. 21-26, 1998.

PSA – Plataforma Solar de Almería. Disponível em: <<http://www.psa.es/webesp/index.php>> Acesso em: 15 ago. 2014.

RIZZO, L. Bioassays as a tool for evaluating advanced oxidation processes in water and wastewater treatment. **Water Research**, v. 45, p. 4311-4340, 2011.

ROEGNER, A. F. et al. Microcystins in potable surface water: toxic effects and removal strategies. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, p.441-457, 2014.

RUPPERT, G.; HEISLER, G.; BAUER, R. The photo-Fenton reaction - an effective photochemical wastewater treatment process. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 73, p. 75-78, 1993.

SCHICK, R.; STRASSER, I.; HANS-HENNING, S. Fluorometric determination of low concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in water: comparison with two other methods and application to environmental samples and drinking-water treatment. **Water Research**, v. 31, p. 1371-1378, 1997.

SILVA, E. M da et al. Ocorrência de cianobactérias no reservatório de Mundaú, no estado de Pernambuco, no período de Janeiro de 2010 a Novembro de 2011. **Vigilância Sanitária em Debate**, v.1, n.3, p. 35-42, 2013.

SILVA, R. R. P. da; PIRES, O. R.; GRISOLIA, C. K. Genotoxicity in *Oreochromis niloticus* (Cichlidae) induced by *Microcystis spp* bloom extract containing microcystins

R.R. **Toxicon**, v. 58, p. 259-264, 2011.

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

SIRTORI, Carla. Evaluación analítica de procesos de transformación biológica, fotoquímica y fotocatalítica de fármacos em agua.2010. 304 f. Tese (Doutora em Ciências Químicas) – Universidade de Almeria, Almeria, 2010.

SMUTNÁ, M. et al. Acute, chronic and reproductive toxicity of complex cyanobacterial blooms in *Daphnia magna* and the role of microcystins. **Toxicon**, v. 79, p. 11-18, 2014.

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

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. In: ROMERO, P. R.; CANTÚ, A. M. (Ed.) **Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas em água y suelo - La experiencia em México**. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2008. p. 55-68.

SOUZA, B. M. et al. Intensification of a solar photo-Fenton reaction at near neutral pH with ferrioxalate complexes: A case study on diclofenac removal from aqueous solutions. **Chemical Engineering Journal**, v. 256, p. 448-457, 2014.

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

TEIXEIRA, C. P. A. B.; JARDIM, W. F. **Processos oxidativos avançados: conceitos teóricos**. v. 5, 2004. Disponível em <[http://lqa.iqm.unicamp.br/cadernos/caderno 3.pdf](http://lqa.iqm.unicamp.br/cadernos/caderno%203.pdf)>. Acesso em 13 out. 2014.

TIBURTIUS, Elaine Regina Lopes. **Remediação de solos e águas contaminadas por compostos orgânicos voláteis (BTX), utilizando processos Fenton e**

**lavagens com biosurfactantes**. 2008. 146 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

TOOR, R.; MOHSENI, M. UV-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> based AOP and its integration with biological activated carbon treatment for DBP reductions in drinking water. **Chemosphere**, v. 66, p.2087-2095, 2007.

TORRADES, F.; SAIZ, S.; GARCÍA-HORTAL, J. A. Using central composite experimental design to optimize the degradation of black liquor by Fenton reagent. **Desalination**, v. 268, p. 97-102, mar. 2011.

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

TSUJI, K. et al. Stability of microcystins from cyanobacteria: effect of light on decomposition and isomerization. **Environmental Science and Technology**, v.28, p.173-177, 1994.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **USEPA 415.3**: Determination of total organic carbon and specific UV absorbance at 254 nm in source water and drinking water. Ohio, 2009.

VICENTINI, F. C. et al. Planejamento fatorial e superfície de resposta: otimização de um método voltamétrico para a determinação de Ag(I) empregando um eletrodo de pasta de nanotubos de carbono. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 825-830, 2011.

VILLA, R. D.; SILVA, M. R.; NOGUEIRA, R. F. P. Potencial da aplicação do potencial do processo foto-Fenton solar como pré-tratamento de efluente da indústria de laticínios. **Química Nova**, v. 30, p. 1799-1803, 2007.

WANG, X. et al. Degradation of microcystin-LR by highly efficient AgBr/Ag<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> heterojunction photocatalyst under simulated solar light irradiation. **Applied Surface Science**, v. 325,p. 1-12, 2015.

WANG, S. et al. Degradation characteristics of secondary effluent of domestic wastewater by combined processo of ozonation and biofiltration. **Journal of Hazardous Materials**, v. 150, p. 109-114, 2008.

WHO – World Health Organization. **Preventing disease through healthy environments: towards an estimate of the environmental burden of disease.** World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2006.

WHO - World Health Organization. **Progress on Drinking Water and Sanitation: 2015 Update and MDG.** World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2015.

YAN, S.; ZHANG, D.; SONG, W. Mechanistic considerations of photosensitized transformation of microcystin-LR (cyanobacterial toxin) in aqueous environments. **Environmental Pollution**, v. 193, p. 111-118, 2014.

YOUNG, B. J. et al. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 182-186. 2012.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: princípios e conceitos.** 2 ed. São Paulo: Rima, 2008.

ZAPATA, A. et al. Evaluation of operational parameters involved in solar photo-Fenton degradation of a commercial pesticide mixture. **Catalysis Today**, v. 144, p. 94-99, 2009.

ZAPATA, A. et al. Evaluation of operating parameters involved in solar photo-Fenton treatment of wastewater: interdependence of initial pollutant concentration, temperature and iron concentration. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 97, p. 292-298, 2010.

ZHANG, S.; LIN, D.; WU, F. The effect of natural organic matter on bioaccumulation and toxicity of chlorobenzenes to green algae. **Journal of Hazardous Material**, v. 311, p. 186-193, 2016.

ZHONG, Y. et al. Destruction of microcystin-RR by Fenton oxidation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, p. 1114-1118, 2009.

ZONG, W.; SUN, F.; SUN, X. Oxidation by-products formation of microcystin-LR exposed to UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: toward the generative mechanism and biological toxicity. **Water Research**, v. 47, p.3211-3219, 2013.

## ANEXO

ANEXO A - Composição do meio líquido ASM-1 utilizado no cultivo de *M. aeruginosa*.

Tabela A1 – Composição do meio de cultivo ASM-1

Solução Estoque para Preparo do Meio ASM-1	Composição da Solução Estoque	Concentração do Sal na Solução Estoque (g L <sup>-1</sup> )	Volume a adicionar para 1 L de meio (mL)
Solução A	NaNO <sub>3</sub>	8,5	20
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,45	
	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,05	
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,45	
Solução B	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,7	5
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	7,06	
Solução C	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	28,4	0,1
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	13,9	
	FeCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	9,14	
	ZnCl <sub>2</sub>	3,35	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,19	
	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,014	
Solução D	EDTA Tritriplex	18,6	0,4

Fonte: Adaptado de Silveira (2012).

O pH é corrigido para 7,4±0,1 utilizando solução NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>.

## APÊNDICE

APÊNDICE A – Monitoramento de Fe, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e pH nos experimentos do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> e efeitos isolados.

**Tabela B1 - Dados do monitoramento de frações de Fe, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual e pH para as diferentes condições experimentais testadas.**

Ensaio 1 (136 mg L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e 5X 2,72 mg L <sup>-1</sup> Fe <sup>2+</sup> )								
Parâmetro	Tempo (min)							
	0	1	16	31	46	61	90	120
Fe <sub>total</sub> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	2,95	3,83	2,80	3,52	2,65	8,17	2,80
Fe <sup>2+</sup> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	1,93	2,54	2,24	2,59	2,24	2,25	2,34
Fe <sup>3+</sup> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	1,03	1,28	0,56	0,92	0,41	5,92	0,46
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	136,00	125,78	105,09	111,21	-	108,96	106,78	106,56
pH	7,77	6,95	6,62	6,26	5,88	5,87	5,36	5,38
Ensaio 2 (272 mg L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e 5X 2,72 mg L <sup>-1</sup> Fe <sup>2+</sup> )								
Parâmetro	Tempo (min)							
	0	1	16	31	46	61	90	120
Fe <sub>total</sub> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	1,11	1,36	1,57	1,41	1,77	0,49	0,90
Fe <sup>2+</sup> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	0,18	0,70	0,39	0,59	0,59	0,18	0,18
Fe <sup>3+</sup> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	0,92	0,67	1,18	0,82	1,18	0,31	0,72
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	272,00	251,24	244,79	233,28	221,35	215,80	210,21	209,98
pH	7,78	7,26	6,82	6,29	5,68	5,04	4,85	5,84
Ensaio 3 (85,20 mg L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e 5X 3,40 mg L <sup>-1</sup> Fe <sup>2+</sup> )								
Parâmetro	Tempo (min)							
	0	1	16	31	46	61	90	120
Fe <sub>total</sub> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	1,67	1,41	2,18	0,70	1,72	0,59	0,44
Fe <sup>2+</sup> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	0,34	0,23	0,39	0,18	0,34	0,23	0,34
Fe <sup>3+</sup> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	1,33	1,18	1,79	0,52	1,38	0,36	0,10
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	85,20	69,77	66,68	62,05	59,38	59,24	59,10	59,80
pH	7,69	7,32	6,85	6,56	6,20	5,83	5,82	5,90

(continua)



Tabela B1 - Dados do monitoramento de das frações de Fe, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual e pH para as diferentes condições experimentais testadas.

Ensaio 4 (272 mg L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e 5X 5,44 mg L <sup>-1</sup> Fe <sup>2+</sup> )								
Parâmetro	Tempo (min)							
	0	1	16	31	46	61	90	120
Fe <sub>total</sub> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	3,31	0,75	0,59	11,32	0,39	0,29	0,39
Fe <sup>2+</sup> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	0,90	0,23	0,18	3,42	0,29	0,13	0,28
Fe <sup>3+</sup> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	2,41	0,51	0,41	7,90	0,10	0,15	0,13
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	272,00	243,94	234,40	231,17	228,65	227,10	227,38	218,82
pH	7,84	7,30	4,38	4,38	4,00	3,96	4,98	5,01
Ensaio 5 (204 mg L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e 5X 4,08 mg L <sup>-1</sup> Fe <sup>2+</sup> )								
Parâmetro	Tempo (min)							
	0	1	16	31	46	61	90	120
Fe <sub>total</sub> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	0,80	0,59	0,44	0,64	0,23	0,80	0,28
Fe <sup>2+</sup> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	0,18	0,13	0,08	0,13	0,13	0,34	0,13
Fe <sup>3+</sup> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	0,62	0,46	0,36	0,51	0,10	0,46	0,15
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	204,00	182,47	179,80	179,59	175,24	170,01	168,54	168,44
pH	7,77	6,74	6,38	5,85	4,85	3,87	4,00	4,13
Ensaio 6 (204 mg L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e 5X 4,08 mg L <sup>-1</sup> Fe <sup>2+</sup> )								
Parâmetro	Tempo (min)							
	0	1	16	31	46	61	90	120
Fe <sub>total</sub> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	2,39	1,88	8,55	0,64	0,54	2,13	0,49
Fe <sup>2+</sup> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	0,59	0,70	3,00	0,29	0,18	0,64	0,28
Fe <sup>3+</sup> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	1,80	1,18	5,54	0,36	0,36	1,49	0,21
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	204	198,89	186,12	177,00	177,56	173,63	175,87	179,66
pH	7,84	7,39	6,70	4,90	4,80	4,62	3,00	4,01

(continua)

Tabela B1 - Dados do monitoramento de frações de Fe, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual e pH para as diferentes condições experimentais testadas.

Ensaio 7 (204 mg L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e 5X 4,08 mg L <sup>-1</sup> Fe <sup>2+</sup> )								
Parâmetro	Tempo (min)							
	0	1	16	31	46	61	90	120
Fe <sub>total</sub> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	0,90	6,13	3,21	1,77	0,23	0,39	6,54
Fe <sup>2+</sup> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	0,23	1,77	1,00	0,29	0,08	0,18	1,21
Fe <sup>3+</sup> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	0,67	4,36	2,21	1,49	0,15	0,21	5,33
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	204	183,38	179,45	172,08	172,36	168,72	167,45	168,71
pH	7,78	7,19	6,50	5,84	4,83	3,50	3,55	3,84
Ensaio 8 (5X 5,44 mg L <sup>-1</sup> Fe <sup>2+</sup> )								
Parâmetro	Tempo (min)							
	0	1	16	31	46	61	90	120
Fe <sub>total</sub> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	3,36	3,47	5,11	8,80	13,57	10,80	9,11
Fe <sup>2+</sup> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	0,85	2,54	4,85	8,75	13,01	10,44	9,06
Fe <sup>3+</sup> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	2,51	0,92	0,26	0,05	0,56	0,36	0,05
pH	7,80	6,80	6,17	5,49	4,73	3,94	3,74	4,67
Ensaio 9 (272 mg L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )								
Parâmetro	Tempo (min)							
	0	1	16	31	46	61	90	120
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	272,00	266,80	242,14	224,04	223,20	215,20	204,68	206,90
pH	7,80	7,53	7,69	7,64	7,50	7,56	7,65	7,54
Ensaio 10 (Somente radiação solar)								
Parâmetro	Tempo (min)							
	0	1	16	31	46	61	90	120
pH	7,80	8,02	8,13	8,05	7,78	7,15	7,81	7,74
Ensaio 11 (5X 5,44 mg L <sup>-1</sup> Fe <sup>2+</sup> sem radiação)								
Parâmetro	Tempo (min)							
	0	1	16	31	46	61	90	120
Fe <sub>total</sub> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	3,67	6,70	8,03	10,60	15,32	14,75	13,06
Fe <sup>2+</sup> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	1,57	4,29	5,77	9,57	14,60	13,52	12,09
Fe <sup>3+</sup> dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	0	2,10	2,41	2,26	1,03	0,72	1,23	0,97
pH	7,72	7,26	6,6	5,99	5,4	4,68	4,93	4,94

(continua)

Tabela B1 - Dados do monitoramento das frações de Fe, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual e pH para as diferentes condições experimentais testadas.

Ensaio 12 (136 mg L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sem radiação)								
Parâmetro	Tempo (min)							
	0	1	16	31	46	61	90	120
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	136,00	129,20	126,05	120,15	123,52	124,36	124,35	125,48
pH	7,72	7,67	7,64	7,54	7,44	7,39	7,55	7,49

**(conclusão)**