

AVALIAÇÃO DA FITOTOXICIDADE DOS SUBPRODUTOS FORMADOS NA DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA – LR POR PROCESSO FENTON

MARIA VIRGÍNIA DA CONCEIÇÃO ALBUQUERQUE

Doutoranda em Engenharia Ambiental pela Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, virginia.albuquerque@yahoo.com.br;

ROBERTA MILENA MOURA RODRIGUES

Doutoranda em Engenharia Ambiental pela Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, robertamilenamoura9@gmail.com;

JOSIVALDO RODRIGUES SÁTIRO

Doutorando do Curso de Engenharia Civil da Universidade da Beira Interior (UBI), Portugal, josivaldosatiroo@gmail.com;

WILTON SILVA LOPES

Prof. Doutor do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UEPB, wiltonuepb@gmail.com;

RESUMO

Este estudo objetivou identificar, quantificar e avaliar o potencial efeito fitotóxico dos subprodutos formados na degradação de microcistina-LR por processo Fenton. Para tanto, o estudo foi realizado no Laboratório de Química Sanitária e Ambiental (LAQUISA), localizado na Estação Experimental de Tratamento Biológico de Esgotos Sanitários (EXTRABES/UEPB) e seguiu três etapas seqüenciais: inicialmente foi realizado cinco ensaios de oxidação Fenton com dosagens distintas, seguido da identificação dos subprodutos formados deste processo e posteriormente foi observado o efeito fitotóxico, utilizando como organismo teste a *Lactuca sativa*. Foi constatado que o processo Fenton proporcionou alterações nos parâmetros físico-químicos, tornando a qualidade de água tratada compatível com os limites estabelecidos pela Portaria revogada do Ministério da Saúde Brasileiro. A melhor dosagem do reagente Fenton para a água em estudo, foi de 20 mM de

($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 60mM de (H_2O_2) que contribuiu para redução em 99 % de turbidez e 99,9% de cor verdadeira e 96% de microcistina – LR. Analisando os dados advindos dos ensaios de fitotoxicidade foi observado que o processo Fenton não produziu um efluente atóxico em todos os tratamentos. O crescimento médio das plântulas de *Lactuca sativa* apresentou variação de acordo com o percentual de amostra utilizado e apenas o T1 e T2 não apresentaram toxicidade. Os resultados demonstraram que os metabólitos secundários produzidos por *Microcystis aeruginosa*, bem como os efluentes dos tratamentos avaliados, trazem uma série de impactos, uma vez que afetam a fisiologia dos organismos fotoautotróficos aquáticos e podem bioacumular ao longo da cadeia, acarretando graves conseqüências.

Palavras-chave: Cianotoxinas, MC-LR, Processos oxidativos, Ecotoxicidade,

INTRODUÇÃO

Em decorrência do rápido crescimento demográfico mundial (6,4 bilhões em 2004 a 7,7 bilhões até abril de 2019), da acelerada urbanização e diversas atividades antrópicas, os corpos hídricos estão submetidos, simultaneamente, a uma maior demanda de água e à deterioração de sua qualidade por serem receptores dos resíduos domésticos e industriais e sólidos descartados no ambiente. Dentre os processos que intensificam essa deterioração, pode-se destacar a eutrofização. Este processo consiste em um rápido enriquecimento artificial dos corpos aquáticos devido ao aumento das concentrações de compostos nitrogenados e fosfatados, o que resulta no aumento do processo de produção biológica dos mananciais, incluindo as florações de microalgas e cianobactérias.

A espécie *Microcystis aeruginosa* é uma das cianobactéria formadoras de florações comumente encontradas em ecossistemas eutrofizados de água doce e recebe grande atenção das pesquisas pela sua ampla distribuição geográfica em todos os continentes. Presentes em mananciais do Nordeste Brasileiro, esta espécie produz a cianotoxina microcistina-LR - tipo de hepatotoxina constituída por sete aminoácidos, que pode causar intoxicações agudas e crônicas no sistema heptático humano, que dependendo da dose ingerida, possibilita a morte em algumas horas ou dias.

Diante da seriedade da problemática das cianobactérias no cenário atual, inúmeros estudos têm sido desenvolvidos no intuito de fomentar conhecimentos relacionados a identificações dos organismos, degradação, tratamento, remoção, toxicidade e efeitos dos metabólitos sobre os seres humanos e a biota aquática. A utilização de Processos Oxidativos Avançado (POAs) tem apresentado grande eficiência no tratamento de águas eutrofizadas e conseqüentemente na degradação de microcistina-LR e na redução da toxicidade. Contudo, muitos destes processos, avaliam a eficiência de tratamento apenas quanto à redução da concentração do composto, não considerando a toxicidade final dos subprodutos formados.

O estudo toxicológico de micropoluentes, pré e pós-tratamento, é uma ferramenta para a determinação de efeitos deletérios de agentes químicos sobre o meio ambiente, possibilitando a verificação das características ecotoxicológicas de substâncias químicas, mecanismos de ação sobre organismos vivos, definição de diretrizes para controle da qualidade de efluentes e avaliação da eficiência de processos de tratamento (RIZZO et al., 2011). Dessa

forma, este estudo objetivou identificar, quantificar e avaliar o potencial efeito fitotóxico dos subprodutos formados da degradação de microcistina-LR por processo Fenton

METODOLOGIA

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

Extração e quantificação da microcistina-LR.

Para realização do processo de extração e quantificação da cianotoxina em estudo, utilizou-se a cepa da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (Word Data Center Microorganisms 835) produtora da microcistina - LR.

Foi considerada a MC-LR total - a soma das frações extracelulares e intracelulares. Para isso, as amostras de cultivo da cianobactéria foram submetidas a três ciclos de congelamento/descongelamento, com o objetivo de provocar a lise celular e consequente liberação da toxina intracelular para o meio extracelular (BROOKE et al., 2006; WANG et al., 2007). Para detecção da MC-LR remanescente no espectrômetro de massa, foi necessário o emprego de técnica de concentração da amostra. Inicialmente realizou-se a filtração de 60 mL da amostra em membrana de acetato de celulose (Millipore®) de porosidade de 0,45 µm e posteriormente o volume filtrado foi concentrado cartucho octadecil C18 para retenção da microcistina-LR. Após a amostra concentrada, o filtrado foi descartado e o concentrado que foi adsorvido na fase sólida no cartucho foi recolhido e eluído com 5 mL de metanol, para posterior quantificação.

Preparação da água de estudo (AE)

Para realização dos ensaios de degradação foi utilizada como matriz a água deionizada acrescida do extrato semipurificado da microcistina-LR, quantificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM). Foi determinado um valor na ordem

de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ por representar uma situação extrema de águas naturais contaminadas por cianotoxinas.

Procedimento Experimental

ETAPA I: Processo Fenton

Os experimentos de oxidação, coagulação, floculação e sedimentação com Fenton, foram realizados em equipamento de Jar test que simulou as etapas iniciais que fazem parte do ciclo completo de uma Estação de Tratamento de Água (ETA) convencional. O processo de filtração foi realizado por filtros de papel de laboratório de filtragem rápida, para reter as partículas ainda presentes após as etapas anteriores.

Os experimentos foram realizados utilizando os parâmetros operacionais contidos na Tabela 1.

Tabela 1. Condições operacionais adotadas no processo Fenton.

Condição Experimental	Valores
Volume da água de estudo (mL)	2000
Razão molar de $\text{Fe}^{2+}:\text{H}_2\text{O}_2$	1:3
pH de oxidação	7,5
Tempo de oxidação (min)	10
Velocidade de agitação (rpm)	400
pH de floculação	8,5
Tempo de mistura rápida (min)	1
Velocidade de mistura rápida (rpm)	400
Tempo de mistura lenta -floculação (min)	10
Velocidade da mistura lenta (rpm)	40
Tempo de sedimentação (min)	10

Fonte: Autor, 2021.

Para realização dos ensaios de degradação com oxidação Fenton foram submetidos cinco ensaios simultâneos utilizando de água de estudo (AE). A concentração de peróxido de hidrogênio foi estabelecida com base na razão molar $[\text{Fe}^{2+}]:[\text{H}_2\text{O}_2]$ de 1:3 para cada tratamento (Tabela 2).

Tabela 2. Dosagens de Fe^{2+} e H_2O_2 para cada tratamento.

Tratamento	Dosagem de Fe^{2+} (mM)	Dosagem de H_2O_2 (mM)	Proporção ($\text{Fe}^{2+}:\text{H}_2\text{O}_2$)
T1	5	15	1:3
T2	5,5	16,5	1:3
T3	10	30	1:3
T4	15	45	1:3
T5	20	60	1:3

Fonte: Autor, 2021.

Em cada reator do Jar teste, contendo 2000 mL da AE, adicionou-se soluções de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e H_2O_2 para cada tratamento. Em seguida, o pH reacional foi ajustado para 7,5, pela adição de HCl. A mistura foi mantida sob agitação mecânica a 400 rpm. As reações de Fenton prosseguiram por 10 min. Decorrido o tempo, a reação foi interrompida com o ajuste do pH para 8,5, pela adição de NaOH. Subsequentemente, a mistura foi agitada mecanicamente por 10s a 400 rpm (mistura rápida) seguida de uma etapa de floculação, na qual a mistura foi mantida sob agitação a 40 rpm por 10 minutos (mistura lenta). Após a etapa reacional, a mistura foi mantida em repouso por 10 min, o sobrenadante foi coletado, filtrado e subsequentemente caracterizado para os parâmetros observados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros monitorados durante os ensaios de Fenton.

PARÂMETROS	MÉTODOS
Cor verdadeira (uH)	Espectrofotométrico 2120 C*
Turbidez (uT)	Nefelométrico 2130 B*
Microcistina – LR ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	CLAE - EM

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012).

Fonte: Autor, 2021.

ETAPA II: Subprodutos formados nos processos da oxidação da microcistina-LR

Os fragmentos de degradação da molécula de microcistina-LR após cada tratamento foram identificados através de varredura no modo “FULL MS2” utilizando o espectrômetro de massas (LCQ FLEET) triplo quadrupolo da marca ThermoScientific de interface Electron-Spray Ion (ESI). O Ion Max Electrospray Ionization (ESI) foi aplicado no modo de ionização positiva.

Os sistemas foram controlados pelo software Xcalibur. Para uma melhor seletividade das amostras, foram realizados no modo de aquisição por Monitoramento de Íon Específico com intervalo de varredura de 800 a 1100 m/z para MC-LR em 995,55 (M+1)⁺. A voltagem do Spray foi de 5kV para o modo positivo. A temperatura do capilar de transferência de íon, sheath gás, gás auxiliar e gás de arraste foram 350 °C, 30, 10 e 0 (unidades arbitrárias), respectivamente.

ETAPA III: Bioensaios de fitotoxicidade utilizando como organismo teste *Lactuca sativa*

Para realização dos testes de fitotoxicidade, foram utilizadas amostras comerciais de sementes de alface variedade Boston branca (Isla Pak), sem defensivos agrícolas, e taxa de germinação do lote de 98%. Para os ensaios, utilizaram-se placas de Petri de 10 cm de diâmetro. Em cada placa foi adicionado um papel filtro qualitativo (marca Unifil, 80 g/m²) e nele adicionados 4 mL de amostra. Em seguida, 20 sementes de alface foram distribuídas de forma equidistantes sobre o papel filtro de forma homogênea. Os ensaios foram realizados em triplicata, as placas então foram cobertas com filme plástico, a fim de manter a umidade, e incubadas no escuro (câmara de germinação tipo DBO, (marca SOLAB) a uma temperatura constante de 22 ± 2 °C, durante 120 horas. Um controle positivo composto por solução de ZnSO₄ 0,05 N e um controle negativo por água destilada foram preparados nas mesmas condições. A metodologia adotada para o teste de fitotoxicidade seguiu as recomendações de Sobrero e Ronco (2004) modificadas por Young et al. (2012)

Após o período de incubação, foi verificado o número de sementes germinadas em cada placa, bem como a medição do comprimento das radículas (cm), com auxílio de uma régua. Com estes resultados, foram avaliados o índice de germinação (IG), e o índice de crescimento relativo (ICR) para cada amostra, utilizando as recomendações de Garcia et al. (2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização da água de estudo (AE)

A água de estudo foi previamente caracterizada antes de todos os ensaios realizados. Os resultados estão dispostos na Tabela 4.

Tabela 4. Caracterização da água de estudo.

Parâmetros	Médias
pH	7,8
Alcalinidade (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	73
Dureza (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	56
Cor Aparente (uH)	100
Cor Verdadeira (uH)	55
Turbidez (uT)	24
MC-LR (µg.L ⁻¹)	5

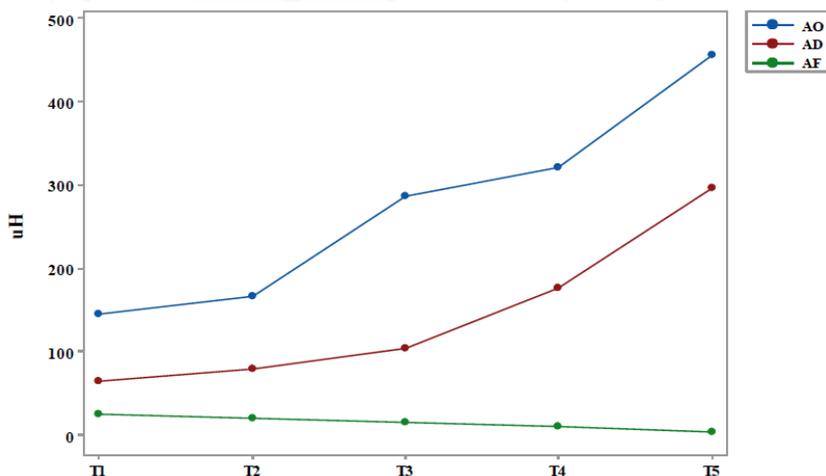
Conforme se observa a tabela 4, a água de estudo apresentou pH alcalino. A turbidez correspondeu a um valor de 24 uT, o que representa aproximadamente 5x mais do que o valor exigido para água potável pelas recomendações da Portaria de nº05 de 2017, anexo XX do Ministério de Saúde Brasileiro. Observou-se uma elevada cor aparente com um valor quase 7x maior (100 uH) em relação ao VMP pela portaria citada. Após a adição do extrato semipurificado de MC-LR, a água de estudo obteve concentração de 5 µg.L⁻¹, valor elevado, sendo este encontrado com frequência em ambientes lênticos eutrofizados e indica riscos sérios à saúde humana.

Ensaio de oxidação seguidos de coagulação, floculação, sedimentação e filtração

Cor verdadeira

Sendo a cor verdadeira determinada por espectrofotometria, correspondente à medida com a remoção de partículas suspensas da água após a filtração, verificou-se que o reagente Fenton foi eficiente na remoção da cor verdadeira para todos os tratamentos realizados, apresentando valores expressivos de remoção (Figura 1). O valor médio inicial da cor aparente na água de estudo foi de 100 uH. Com a adição do coagulante este valor alcançou 456 uH (Figura 1) quando utilizou a dosagem de 20 mM de (FeSO₄.7H₂O) e 60mM de (H₂O₂) no T5. Após o processo de 10 minutos de decantação, observou um valor de 289 uH, para o mesmo tratamento, isto se deve ao fato de que a reação de Fenton acontece de forma mais eficiente em valores de pH moderadamente ácido, fazendo com que uma maior parte do ferro se encontre na forma complexada, caso contrário contribui para a elevação da cor aparente.

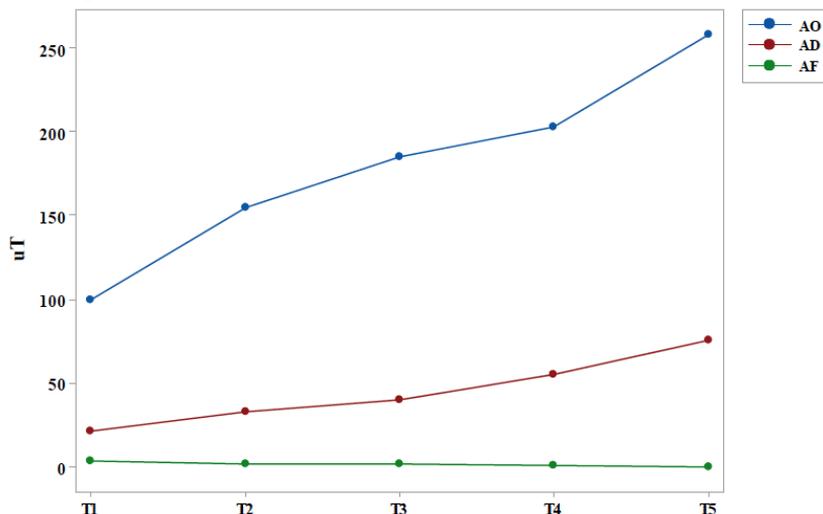
Figura 1. Cor verdadeira remanescente após oxidação Fenton, decantação e filtração.



Os valores de cor verdadeira após o processo de filtração para os tratamentos T3, T4 e T5, foram menores que o valor exigido pela Portaria revogada de Consolidação do Ministério da Saúde que estabelece valor de 15 uH. O tratamento T5 com dosagem de mM de $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ e 60mM de (H_2O_2) promoveu uma remoção de 99,9%, apresentando cor verdadeira residual de 0,05 uT.

Turbidez

Após 10 minutos de sedimentação todos os tratamentos não apresentaram valores de turbidez que atendem as recomendações da portaria vigente. Sabe-se que a eficiência da etapa da filtração é avaliada pela redução da turvação da água. Convém que a turvação na saída dos filtros esteja entre 0,06 – 0,10 uT. Se o resultado for superior a 0,10 uT, normalmente deve-se à não eficácia das etapas anteriores, nomeadamente a coagulação, floculação e flotação (CASTRO et al., 2015). Neste estudo, os valores de turbidez após o processo de filtração para os tratamentos T3, T4 e T5, foram menores que o valor exigido pela Portaria revogada do Ministério da Saúde que estabelece valor de turbidez $\leq 0,5$ uT. O tratamento T5 com dosagem de 20 mM de $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ e 60mM de (H_2O_2) promoveu uma remoção de 99,9%, apresentando turbidez final de 0,08 uT, conforme observado na Figura 2.

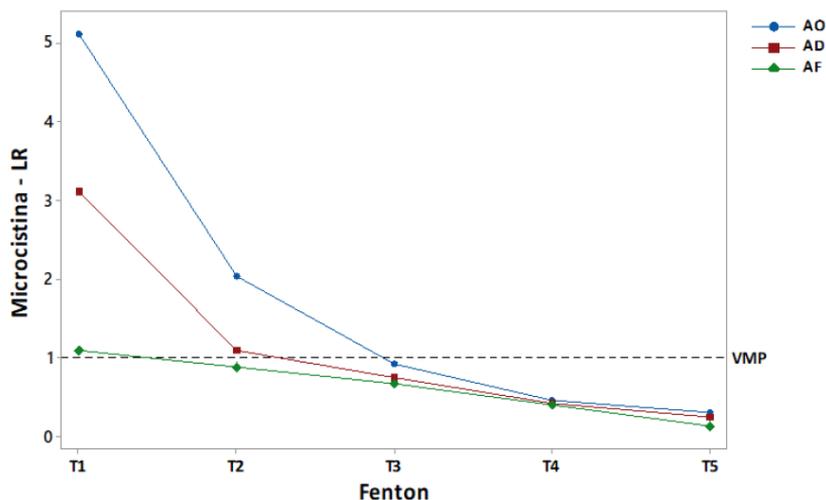
Figura 2. Turbidez remanescente após oxidação Fenton, decantação e filtração

Sabe-se que as análises de peróxido de hidrogênio residual permitem inferir cronologicamente a formação de radicais hidroxila e sua associação e consequente destruição da molécula de interesse, neste caso a MC-LR. O monitoramento dos níveis deste composto é indispensável, uma vez que, a presença de peróxido residual pode causar sérios danos ao meio ambiente, no caso de águas residuais tratadas, ou sérios danos à saúde da população, no caso de água destinada ao abastecimento público

Microcistina - LR

Utilizando o pH 7,5 de coagulação para todos os tratamentos, foi verificado que houve eficiência de remoção de microcistina-LR para as dosagens mais altas de $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$: 3 de (H_2O_2) , conforme mostrado na Figura 3.

Figura 3 - Microcistina - LR remanescente após oxidação Fenton, decantação e filtração.



A alta velocidade em que ocorre a reação de Fenton, associada ao elevado potencial oxidativo dos radicais hidroxila gerados pela mesma, fazem com que uma grande quantidade do contaminante alvo possa ser removido em poucos minutos. No estudo, a MC-LR remanescente após 10 min de oxidação, decantação e filtração, as concentrações detectadas nos tratamentos (T3, T4 e T5) foram inferiores a $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ tornando a água dentro dos padrões de qualidade estabelecido pela legislação atual.

O T5 promoveu remoção de 96% de microcistina - LR atingindo concentração de $0,15 \mu\text{g.L}^{-1}$. Estes resultados evidenciam o potencial de oxidação apresentado pelo processo de Fenton e também pelo fato do H_2O_2 também atuar como um agente oxidante, porém, com um potencial oxidativo menor que o do radical hidroxila livre, o que faz com que em condições ideais para a realização da reação, ocorra uma elevada remoção do contaminante.

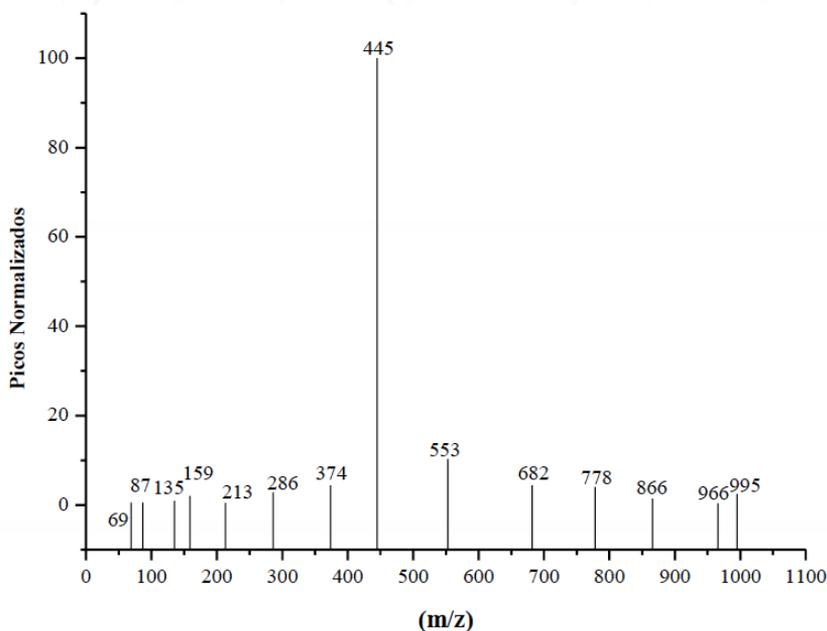
Subprodutos formados nos processos da oxidação da microcistina-LR

Os fragmentos de degradação da molécula de microcistina- LR apresentaram massa/carga (m/z) de 69; 87; 135; 159; 213; 286; 374; 445; 553; 558; 682; 778; 866; 967 e 995 que se mostraram presentes com pequenas variações de intensidade relativa nos 5 tratamentos realizados. Os fragmentos mais encontrados na literatura foram de razões m/z 866, 682, 599, 553, 375, 286

e 214. Por outro lado, quando comparando os resultados obtidos por Miao et al. (2010) e Chang et al. (2014) os autores identificaram intermediários de peso molecular de m/z 855, 853, 835, 827, 815 e 795 aplicando o processo de ozonização e com intensidade relativa em torno de 100%, o que diverge dos fragmentos de íons identificados nos experimentos. Os fragmentos de razões m/z 778, 444, 213 e 160 não foram encontrados na literatura.

Por ser uma molécula relativamente grande e apresentar vários grupos funcionais em diversas posições, em cada grupo apresenta suscetibilidade para rompimento das ligações gerando os subprodutos da degradação (SILVA, 2015). O processo de degradação mediado por radical hidroxila se inicia com a incorporação de radicais hidroxila, usualmente 2, 3 ou 4, no grupo Adda. Posteriormente, rearranjos permitem a eliminação de grupos mais lábeis (por exemplo, Adda, leucina), assim como reações de ciclização intramolecular, que levam à formação de ciclos de menor massa molar.

A maior parte dos intermediários identificados no estudo apresentou a estrutura cíclica intacta e ao decorrer da degradação os intermediários foram sendo linearizados, os peptídeos com massa molar mais baixos puderam ser identificados pela clivagem da porção MeAsp e L-Arg. Segundo Song et al., 2009, esses fragmentos podem ter sido gerados pela clivagem de ligações peptídicas, uma vez que os números de massa/carga correspondem à diferença entre a molécula precursora (MC-LR m/z 995) e as porções dos peptídeos libertados. Os intermediários formados durante o ataque da hidroxila através da reação Fenton sobre a MC-LR apresentou melhor eficiência de degradação no T5. O espectro da fragmentação da MC-LR obtido no tratamento T5 se apresenta na Figura 4.

Figura 4. Espectro da fragmentação da MC-LR obtido no Tratamento T5

No estudo, as vias degradadas foram o anel aromático, o grupo metoxi do aminoácido ADDA e ligação dupla do aminoácido MDHA. O ataque de radicais hidroxila no grupamento Adda permite a eliminação de grupos químicos pouco estáveis, assim como reações de ciclização intramolecular formando ciclos de massa molar menor. Os locais mais propensos ao ataque da HO[•] são nas ligações duplas conjugadas devido à sua posição na molécula.

O fragmento com a relação massa/carga (m/z) 135 é característico do aminoácido ADDA presente na molécula e responsável pela hepatotoxicidade sendo observado no tratamento T14 em baixa intensidade. O fragmento Glu – Mdha, representado pela m/z 213 apresentou intensidade relativa de 12,4. É importante destacar que o fragmento (m/z) 445 apresentou elevada intensidade e segundo ZONG et al., (2015), este subproduto representa o aminoácido [Ala – Leu – MeAsp + Larg + H⁺] e têm fórmula molecular C₁₈H₂₇N₃O₄.

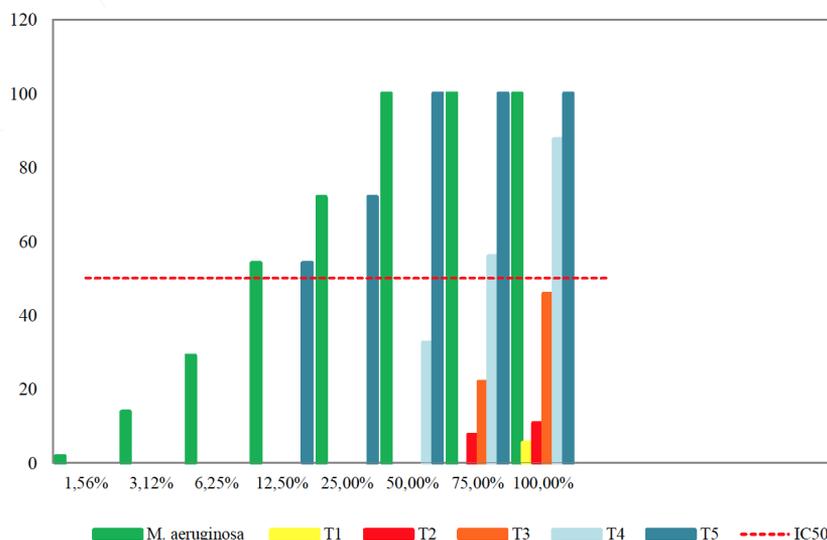
Fitotoxicidade utilizando como organismo teste a *Lactuca sativa*

Os dados dos ensaios de fitotoxicidade aguda para o organismo *Lactuca sativa*, com *Microcystis aeruginosa* e o efluente Fenton são apresentados a

seguir. Considerado um teste estático de toxicidade aguda, através do qual podem ser avaliados os efeitos fitotóxicos que a presença de determinadas substâncias pode vir a ocasionar durante o processo de germinação das sementes e no desenvolvimento das mudas durante os primeiros dias de crescimento, neste estudo os resultados são expressos em termos de comparação percentual com relação ao grupo controle.

O ensaio de germinação apresentado na Figura 5 evidenciou toxicidade aguda tanto nas amostras de *Microcystis aeruginosa* quanto nas amostras submetidas ao processo Fenton.

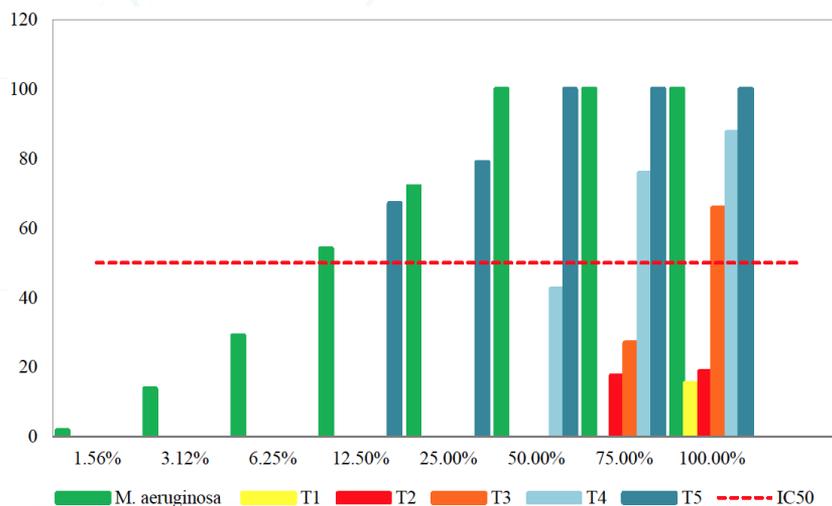
Figura 5. Toxicidade aguda, expressa sob a forma de comparação percentual com relação ao controle. Percentual de inibição de germinação em *L. sativa* exposta a diferentes concentrações de *Microcystis aeruginosa* e efluente Fenton (EF) tratado (valores acima da linha pontilhada representam resposta positiva para toxicidade em comparação ao controle).



Nas sementes expostas a *Microcystis aeruginosa* observou-se que todas as concentrações de exposição inibiram a germinação. Quando as sementes foram expostas a uma concentração 50, 75 e 100 % de *Microcystis aeruginosa*, uma inibição de 100% na germinação foi observada, denotando a elevada toxicidade da cepa de cianobactéria. Mesmo após o tratamento Fenton, a maioria das concentrações causou inibição na germinação. No entanto, o T5 com concentração de 50, 75 e 100 % apresentou toxicidade aguda, com inibição de 100%, conforme observado na Figura 5.

A presença de toxicidade aguda nas amostras *Microcystis aeruginosa* e o efluente Fenton também foi constatada com a avaliação do crescimento radicular. Entretanto, a inibição do crescimento radicular foi mais evidente nas amostras de *Microcystis aeruginosa* como pode ser observado na Figura 6.

Figura 6. Toxicidade aguda, expressa sob a forma de comparação percentual com relação ao controle. Percentual de inibição do crescimento radicular em *L. sativa* exposta a diferentes concentrações de *Microcystis aeruginosa* e efluente Fenton (T) tratado (valores acima da linha pontilhada representam resposta positiva para toxicidade em comparação ao controle).



A inibição do crescimento radicular pode estar relacionada ao bloqueio da ação de citocina e auxina, fitormônios que influenciam em processos de desenvolvimento, como ativação de genes, taxas de expansão e divisão celular (RAVEN et al., 2010). Além da microcistina-LR, outra possível fonte de toxicidade é o lipolissacarídeo, presente na parede celular de *M. aeruginosa*, sendo um provável desregulador osmótico (BEST et al., 2013).

Em *Lactuca sativa* não foram observados efeitos sobre o crescimento radicular, uma vez que o ICR dos tratamentos de 1 a 3 ficou dentro da faixa considerada sem efeito ($ICR \geq 0,8$ ou $\leq 1,2$) (YOUNG et al., 2012). Nos testes estatísticos também não houve diferenças significativas entre controle negativo e extrato bruto.

Os mecanismos de absorção e metabolização de microcistina-LR, presente no extrato bruto, tem como principal atuação o gene *mlrA*

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

Hereman (2010) observou aumento da atividade enzimática de peroxidases e bioacumulação de microcistina-LR em tecidos de alfaces expostas a extrato bruto de *M. aeruginosa*. Segundo Salvatore et al. (2008), a inibição do crescimento radicular depende de alguns fatores, como: tipo de amostra, concentração e espécies testadas. Esses fatos, possivelmente, explicam a ausência de efeitos inibitórios do extrato bruto sobre as radículas de *L. sativa*.

Alguns estudos corroboram com isto, a exemplo da pesquisa realizada por Freitas e colaboradores (2015), que avaliaram os efeitos de concentrações ambientalmente relevantes (1, 10 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$) de MC-LR, CYN e uma mistura MC-LR / CYN no crescimento, sistema de defesa antioxidante e conteúdo mineral em *Lactuca sativa*. No geral, a atividade GST aumentou significativamente nas raízes, ao contrário da atividade GPx, que diminuiu nas raízes e nas folhas. O conteúdo mineral nas folhas de alface mudou devido à sua exposição a cianotoxinas. Os efeitos da mistura MC-LR/CYN foram quase sempre semelhantes às cianotoxinas únicas, embora o MC-LR pareça ser mais tóxico que o CYN. Os resultados sugerem que a *Lactuca sativa* em estágios não iniciais de desenvolvimento, são capazes de lidar com concentrações mais baixas de MC-LR, CYN e a mistura MC-LR/CYN; no entanto, concentrações mais altas (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$) podem afetar o rendimento da alface e a qualidade nutricional.

Levizou et al. (2017) investigaram o efeito da água de irrigação rica em microcistinas (MCs) em alface de diferentes estágios de desenvolvimento, durante um período de dois meses, desde a germinação das sementes até a colheita em tamanho comercial da planta. Foram avaliados quatro grupos de *L. sativa* que receberam água enriquecida de MCs (1,81 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Foram medidos o crescimento da alface, o desempenho fotossintético, as características bioquímicas e minerais, bem como o acúmulo de MCs nas folhas, raízes e solo. O desempenho geral da alface em vários estágios de desenvolvimento apontou para o aumento da tolerância, uma vez que o crescimento

mostrou pequenas alterações e os antioxidantes não enzimáticos permaneceram inalterados. As plantas que receberam água rica em MCs no estágio da semente exibiram maior capacidade fotossintética, clorofilas e teor de nitrogênio nas folhas. No entanto, ocorreu um acúmulo considerável de MCs em vários tecidos vegetais. Quanto mais cedo as plantas de alface começaram a receber água rica em MCs, mais MCs acumularam nas raízes e folhas. Os cotilédones apresentaram concentrações de MCs duplicadas em comparação com os respectivos tecidos do grupo 4 folhas. Além disso, as raízes acumularam quantidades significativamente maiores de MCs do que as folhas do mesmo grupo de plantas. Os resultados indicaram que a irrigação de alface com água rica em MCs pode constituir um sério risco à saúde pública, especialmente quando a água contaminada é recebida desde os estágios iniciais de desenvolvimento (semente e cotilédone).

Um estudo de campo de 120 dias foi realizado por Cao et al. (2018) objetivou avaliar a bioacumulação de congêneres de microcistina (MC) em um sistema solo-planta, bem como o risco à saúde humana ao consumir plantas comestíveis irrigadas com água contaminada por MCs. A água do lago apresentava florações de cianobactérias naturais e água do lago contendo florações de cianobactérias naturais diluídas com água da torneira, foram usadas para irrigar alface e arroz. Um tratamento adicional envolvendo a fertilização com cianobactérias foi aplicado apenas no experimento de alface. Foi verificado que as concentrações de MCs em solos, raízes, folhas e grãos (arroz) foram detectados. No sistema solo-alface, os três congêneres de MC em solos fertilizados com cianobactérias não foram detectados. No sistema solo-arroz, a maior concentração de MCs foi acumulada nas raízes, entretanto, a concentração de MCs que se acumularam nos grãos foi extremamente baixa, com uma concentração total de MCs de 5,2 (MC-LR 2,1, MC-RR 2,0, MC-YR 1,1) $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ no tratamento de água do lago. Os resultados obtidos com os indicadores de crescimento sugerem que a bioacumulação de MCs em plantas comestíveis não está necessariamente associada a efeitos fitotóxicos.

Objetivando avaliar a suscetibilidade de dois vegetais verdes, espinafre e alface, sobre diferentes concentrações de microcistinas (MC) e cilindrospermopsina (CYN), individualmente e em mistura, Cabello e colaboradores (2019), cultivaram os dois vegetais em hidroponia, sob condições controladas, por 21 dias em meio nutriente dopado com MC, CYN a 10 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, e em mistura CYN / MC a 5 + 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e 25 + 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. A obtenção destas cianotoxinas

foi através dos extratos de *Microcystis aeruginosa* e *C. ovalisporum*. O estudo revelou inibição do crescimento da parte aérea (folhas) em ambas as espécies quando tratadas com 50µg.L⁻¹ de mistura MC, CYN e CYN / MC. A cianotoxina MC mostrou ser mais prejudicial ao crescimento das plantas do que o CYN. No geral, os dados de crescimento evidenciaram o aumento da sensibilidade do espinafre às cianotoxinas em comparação à alface. Por outro lado, as plantas expostas à mistura CYN / MC apresentaram acúmulo diferencial de CYN e MC. Além disso, a CYN, foi translocada das raízes para as folhas. Foi constatado que CYN e MC afetaram os níveis de minerais, particularmente nas raízes das plantas.

No que se refere ao crescimento médio das plântulas, houve variação de acordo com o percentual de amostra utilizado, onde soluções menos concentradas possibilitaram um maior desenvolvimento das mesmas, aproximando-se ao valor obtido para a amostra controle. Após o tratamento Fenton, observou-se uma redução na toxicidade de microcistina – LR para os tratamentos T1 e T2. Comparando-se o crescimento médio das plântulas obtidos quando expostas a 100 % da amostra para o cultivo lisado de *Microcystis aeruginosa* e tratado, foi verificado um aumento no crescimento da plântula de 77,8% e 83,9 % expostas aos efluentes Fenton do T1 e T2, respectivamente. Estes resultados indicam que o tratamento oxidativo Fenton aplicado a microcistina-LR apresentam limitações quanto à eliminação de compostos fitotóxicos.

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

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

Amostra	% amostra	Crescimento médio das plântulas (cm)
Controle negativo	0,00	5,07
<i>Microcystis aeruginosa</i>	1,56	3,45
	3,12	2,63
	6,25	2,04
	12,5	1,92
	25,0	1,82
	50,0	1,51
	75,0	1,01
	100	0,71

Amostra	% amostra	Crescimento médio das plântulas (cm)
Efluente Fenton	T1	3,21
	T2	4,42
	T3	0,0
	T4	0,0
	T5	0,0

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A proposta da utilização de Processos Oxidativos Avançados (POAs), foi baseada na possibilidade da eliminação e/ou transformação de produtos resistentes à biodegradação em produtos com maior potencial de biodegradabilidade. Quando o processo Fenton foi empregado, em escala de bancada, proporcionou alterações nos parâmetros físico-químicos, tornando a qualidade de água tratada compatível com os limites estabelecidos pela Portaria do Ministério da Saúde Brasileiro.

A melhor dosagem do reagente Fenton para a água em estudo, foi de 20 mM de $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ e 60mM de (H_2O_2) que contribuiu para redução em 99 % de turbidez e 99,9% de cor verdadeira e 96% de microcistina - LR. Estes resultados evidenciam o potencial de oxidação apresentado pelo processo de Fenton e também pelo fato do H_2O_2 também atuar como um ótimo agente oxidante, porém, com um potencial oxidativo menor que o do radical hidroxila livre.

Analisando os dados advindos dos ensaios de fitotoxicidade foi constatado que, mesmo apresentando elevadas eficiências de remoção dos parâmetros químicos, o processo Fenton não produziu um efluente atóxico. O crescimento médio das plântulas de *Lactuca sativa* apresentou variação de acordo com o percentual de amostra utilizado, onde soluções menos concentradas possibilitaram um maior desenvolvimento das mesmas, aproximando-se ao valor obtido para a amostra controle. Após o tratamento Fenton, observou-se uma redução na toxicidade de microcistina - LR para os tratamentos T1 e T2. Comparando-se o crescimento médio das plântulas, obtidos quando expostas a 100 % da amostra para o cultivo lisado de *Microcystis aeruginosa* e tratado, estes resultados indicam que o tratamento oxidativo Fenton aplicado a microcistina-LR apresentam restrições quanto à eliminação de compostos fitotóxicos.

Logo, os resultados demonstraram que os metabólitos secundários produzidos por *Microcystis aeruginosa*, bem como os efluentes dos tratamentos

avaliados, trazem uma série de impactos, uma vez que afetam a fisiologia dos organismos fotoautotróficos aquáticos e podem bioacumular ao longo da cadeia, acarretando graves consequências. Dessa forma, frente ao aumento expressivo de corpos hídricos eutrofizados, o estudo dos possíveis efeitos alelopáticos ocasionados por cianobactérias e tratamento para remoção das mesmas, se torna cada vez mais significativo.

REFERÊNCIAS

BEST, J. H. Effects of Microcystis cells, cell extracts and lipopolysaccharide on drinking and liver function in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. **Aquatic Toxicology**. v. 64 p. 419-426. 2003.

BROOKE, S., NEWCOMBE, G., NICHOLSON, B., & KLASS, G. Decrease in toxicity of microcystins LA and LR in drinking water by ozonation. **Toxicol**, 48, 1054–1059. 2006.

BOURNE, D.G.; RIDDLES, P.; JONES, G.J.; SMITH, W.; BLAKELEY, R.L. (2001) Characterisation of a Gene Cluster Involved in Bacterial Degradation of the Cyanobacterial Toxin Microcystin LR. **Environmental Toxicology**, v. 16, p. 523-534.

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

FREITAS, A.M.; SIRTORI, C.; LENZ, C.A.; ZAMORA, P.G.P. Microcystin-LR degradation by solar photo-Fenton, UV-A/photo-Fenton and UV-C/H₂O₂: a comparative study. **Photochem Photobiol Sci**, p.696-702, 2015.

GARCIA, J. C. et al. Evolutive follow-up of the photocatalytic degradation of real textile effluents in TiO₂ and TiO₂/H₂O₂ systems and their toxic effects on *Lactuca sativa* seedlings. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 20, n. 9. São Paulo, 2009

HEREMAN, T. C. Efeitos do extrato bruto e da microcistina-LR em *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). 2010. **Dissertação**. Instituto de Biociências – Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho.

LEVIZOU, E., STATIRIS, G., PAPADIMITRIOU, T., LASPIDOU, C. S., & KORMAS, K. A. (2017). Lettuce facing microcystins-rich irrigation water at different developmental stages: Effects on plant performance and microcystins bioaccumulation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 143, 193–200.

MINISTÉRIO DA SAUDE DO BRASIL. (2018). Portaria de consolidação, nº anexo XX, de 28 de setembro de 2017. Dispõe Sobre os Procedimentos de Controle e de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano e seu Padrão de Potabilidade. Brasília: Diário Oficial da União.

RAVEN PH, EVERT RF, EICHHORN SE (2010) Biologia vegetal. 7ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 856p.

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

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

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

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

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