

Identificação e efeitos toxicológicos dos subprodutos gerados na degradação de microcistina-LR por processos oxidativos avançados

Dentre os efeitos deletérios provocados pelo processo de eutrofização de águas naturais, um importante destaque, deve ser dado ao surgimento de florações de cianobactérias e a consequente geração de cianotoxinas com potente efeito hepatotóxico (ex. microcistina-LR). A presença de linhagens de cianobactérias produtoras de cianotoxinas, tem efeitos negativos nos corpos hídricos e em particular nos destinados a abastecimento público, devido ao efeito nocivo dessas substâncias à saúde humana e de animais. Os tratamentos convencionais de água, se mostram ineficientes para a remoção total destas toxinas, portanto são necessárias novas tecnologias alternativas, como os processos oxidativos avançados. No entanto, essas tecnologias favorecem a formação de subprodutos desconhecidos. O presente trabalho buscou avaliar os efeitos toxicológicos dos possíveis subprodutos formados da degradação de Microcistina-LR através dos processos oxidativos avançados. Foram utilizados dados de 4 estudos de caso que empregaram dois processos oxidativos avançados: o UV/H₂O₂ e Fenton, para obtenção dos fragmentos de íons de m/z obtidos. Os estudos de caso usaram água de abastecimento e água sintética, contaminadas com Microcistina-LR em diferentes concentrações. Foi realizada a análise das amostras por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM), utilizando o Espectro de Massa (LCQ FLEET) triplo quadruplo da marca Thermo Scientific de interface Electron-Spray Ion (ESI). Os softwares ChemDraw e ChemSketch foram empregados para formação das estruturas e fórmulas químicas referentes a cada fragmento. Para identificar a toxicologia dos fragmentos foram utilizadas as bases de dados Pubchem, Echa, Ecotox, TSCA e MolBase. Foram obtidos 33 fragmentos identificados nos 4 estudos de caso. Os primeiros subprodutos identificados apresentaram uma estrutura molecular cíclica intacta e ao decorrer da degradação foram sendo linearizados. Os fragmentos de m/z 967 e 553 tiveram toxicidade registrada pelas bases de dados. O tratamento UV/H₂O₂ gerou subprodutos tóxicos e moléculas grandes. O tratamento utilizando Fenton apresentou o melhor desempenho sendo indicado para tratamento de Microcistina-LR em águas destinadas a abastecimento.

Palavras-chave: Microcistina-LR; Subprodutos; Toxicologia; Degradação.

Identification and toxicological effects of by-products generated on microcystin-LR degradation by advanced oxidative processes

Among the deleterious effects caused by the natural waters eutrophication process, an important highlight should be given to the appearance of cyanobacterial blooms and the consequent generation of cyanotoxins with a potent hepatotoxic effect (eg microcystin-LR). The presence of strains of cyanobacteria that produce cyanotoxins has negative effects on water bodies and in particular those destined for public supply, due to the harmful effect of these substances on human and animal health. Conventional water treatments are inefficient for the total removal of these toxins, so new alternative technologies are needed, such as advanced oxidative processes. However, these technologies favor the formation of unknown by-products. The present work sought to evaluate the toxicological effects of possible by-products formed from the degradation of microcystin-LR through advanced oxidative processes. Data from 4 case studies of two advanced oxidative processes were used: UV/H₂O₂ and Fenton, to obtain the m/z ion fragments. The case studies used drinking water and synthetic water, contaminated with microcystin-LR in different concentrations. The analysis of the samples was carried out by means of high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS), using the Mass Spectrum (LCQ FLEET) triple quadrupole of the Thermo Scientific brand of Electron-Spray Ion interface (ESI). The ChemDraw and ChemSketch software were used to form the structures and chemical formulas for each fragment. The Pubchem, Echa, Ecotox, TSCA and MolBase databases were used to identify the toxicology of the fragments. 33 fragments identified in the 4 case studies were obtained. The first identified by-products showed an intact cyclic molecular structure and during the course of the degradation they were linearized. The fragments of m/z 967 and 553 had toxicity registered by the databases. The UV/H₂O₂ treatment generated toxic by-products and large molecules. The treatment using Fenton presented the best performance, being indicated for the treatment of microcystin-LR in water destined for supply.


Keywords: Microcystin-LR; Byproducts; Toxicology; Degradation.

Received: 13/04/2021
Approved: 13/05/2021


Topic: Engenharia Sanitária

Reviewed anonymously in the process of blind peer.

Julya Karolyne Neres Costa Soares
Universidade Estadual da Paraíba, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/7560595378616930>
julyakarolyneneres@gmail.com

Maria Virginia Conceição Albuquerque 
Universidade Estadual da Paraíba, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/9675009734261818>
<http://orcid.org/0000-0001-5060-584X>
virginia.albuquerque@yahoo.com.br

Valderi Duarte Leite 
Universidade Estadual da Paraíba, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/2319382787465258>
<http://orcid.org/0000-0001-5861-7407>
mangabeiraleite@gmail.com

Jose Tavares de Sousa 
Universidade Estadual da Paraíba, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/9348418607084437>
<http://orcid.org/0000-0002-1056-1771>
tavaresuepb@gmail.com

Wilton Silva Lopes 
Universidade Estadual da Paraíba, Brasil
<http://lattes.cnpq.br/1493216651945826>
<http://orcid.org/0000-0002-0151-7664>
wiltonuepb@gmail.com



DOI: 10.6008/CBPC2179-6858.2021.005.0026

Referencing this:

SOARES, J. K. N. C.; ALBUQUERQUE, M. V. C.; LEITE, V. D.; SOUSA, J. T.; LOPES, W. Identificação e efeitos toxicológicos dos subprodutos gerados na degradação de microcistina-LR por processos oxidativos avançados. *Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais*, v.12, n.5, p.301-313, 2021. DOI: <http://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2021.005.0026>

INTRODUÇÃO

O acelerado crescimento populacional vem causando ocupação desordenada de bacias hidrográficas e contribuindo com o aumento de atividades antropogênicas, como urbanização, industrialização e expansão agrícola, promovendo o lançamento de nutrientes (nitrogênio e fósforo) importantes para processo de eutrofização nos reservatórios. Estas atividades resultam no decréscimo da qualidade da água de rios, lagos e reservatórios, causando severos impactos ambientais e socioeconômico no mundo todo (ESTEVES, 2011; RIGOSI, et al., 2014).

Uma das principais consequências da eutrofização é a floração excessiva de cianobactérias ou “blooms” que interferem no equilíbrio dos ecossistemas aquáticos, pois criam um biofilme superficial alterando a transparência do meio, conduzindo à desoxigenação do corpo d’água. As cianobactérias são microrganismos produtores de cianotoxinas (endotoxinas) que ficam no interior da célula podendo ser liberadas no ambiente aquático por lise celular, ficando dissolvidas na água e tornando as florações extremamente perigosas para saúde pública e para a biota aquática (PANTELIC et al., 2013; BOROWITZKA et al., 2016; RAMOS, et al., 2016).

A microcistina – LR, constitui a cianotoxina mais comumente encontrada em corpos aquáticos eutrofizados e são heptapeptídeos cíclicos com efeito hepatóxico (BOROWITZKA et al., 2016; MOREIRA et al., 2013). A molécula da microcistina (Figura 1) apresenta sete aminoácidos, possuindo uma porção invariável que contém três D-aminoácidos: β -eritro- β -metil ácido aspártico, alanina e γ -ácido glutâmico (D- β MeAsp, D-Ala e D-Glu), dois L-aminoácidos variáveis (localizados na região X e Y da Figura 1) e dois aminoácidos raros (Mdha e Adda). O Mdha é o N-metildehidroalanina e o Adda, responsável pelo caráter tóxico da molécula é o 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8, trimetildeca-4,6-ácido dienóico (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2014; CHANG et al., 2015). Seguindo diretrizes da Organização Mundial de Saúde (OMS), a Portaria de Consolidação N° 5 de 2017 do Ministério da Saúde, estabelece como Valor Máximo Permitido (VMP) de $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para a soma das variantes de microcistinas em águas destinadas ao abastecimento público (BRASIL,2017).

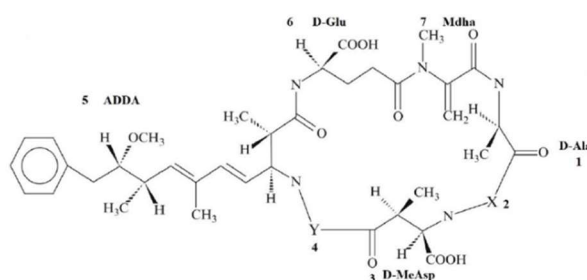


Figura 1: Estrutura Geral da Microcistina-LR. **Fonte:** METCALF et al. (2012).

As tecnologias de tratamento de água que realizam o ciclo completo, referidas como “convencionais” e que incluem a coagulação, floculação, sedimentação, filtração rápida, e desinfecção, são ineficientes para remoção de micropoluentes orgânicos como as microcistinas e outras cianotoxinas dissolvidas na água (ROEGNER et al., 2013), tornando necessário o emprego de métodos mais específicos para sua remoção ou destruição. Os Processos de Oxidação Avançada (POA) se baseiam na formação de radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$), vem ganhando interesse por alguns pesquisadores por serem tecnologias

promissoras frente aos processos de tratamento convencional de águas existentes. Esses processos podem operar em conjunto ou paralelo com o tratamento convencional na degradação de micropoluentes (JACOBS et al., 2013; HE et al., 2015; MIRANDA, 2016).

Uma grande preocupação com o tratamento por oxidação é a formação de subprodutos ou produtos intermediários, que podem resultar numa poluição secundária. Influenciada por compostos orgânicos coexistentes e qualidade da água, a mineralização completa da microcistina-LR se torna inviável, podendo ocorrer formação de subprodutos resultantes desta oxidação que podem apresentar toxicidade (ZONG et al., 2013), e não estão presentes como requisito de potabilidade na portaria do Ministério da Saúde. Portanto, a avaliação dos subprodutos e toxicidade ganha importância ao ampliar o entendimento da eficiência completa dos POAs para a degradação de poluentes ambientais. O presente estudo almeja avaliar os efeitos toxicológicos dos subprodutos formados da degradação de microcistina-LR por processos oxidativos avançados.

RELATO

Fragmentos

Os dados dos fragmentos formados no período reacional de degradação da MC-LR, foram obtidos de trabalhos realizados por Da Silva (2015), Miranda (2016) e Albuquerque (2017), divididos em 4 estudos de caso descritos abaixo:

Estudo de caso 1: Avaliou a eficiência do Reagente Fenton na oxidação de água desclorada contaminada com Microcistina-LR seguido das etapas de coagulação, floculação e sedimentação. Os experimentos de oxidação, coagulação, floculação e sedimentação foram realizados em JarTest simulando as etapas iniciais que fazem parte do ciclo completo de uma Estação de Tratamento de Água convencional. A concentração inicial de MC-LR foi de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$. Os valores de pH utilizados no estudo foram 2; 4,5 e 7, as concentrações de Fe^{2+} de 5; 17,5 e 30mg.L^{-1} e os tempos de sedimentação de 5; 12,5 e 20 min. Em todos os tratamentos as concentrações detectadas foram inferior a $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ tornado a água dentro dos padrões de qualidade estabelecido pela legislação para esse parâmetro (SILVA, 2015).

Estudo de caso 2: Avaliou a eficiência da oxidação da microcistina-LR de água destinada a abastecimento público, utilizando Reagente Fenton, seguido de coagulação, sedimentação e filtração. Os experimentos de oxidação, coagulação, floculação e sedimentação foram realizados em homogeneizador de soluções modelo (H1M1) simulando as etapas iniciais que fazem parte do ciclo completo de uma Estação de Tratamento de Água convencional. A concentração inicial de MC-LR foi de $4 \mu\text{g.L}^{-1}$. O valor de pH utilizado foi de 8,5. As dosagens de $\text{Fe}^{2+}:\text{H}_2\text{O}_2$ foram utilizadas na proporção 1:3 respectivamente, correspondendo a 14 tratamentos com valores de 1; 1,25; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 10; 15 e 20 mM de Fe^{2+} . Os tratamentos 12, 13 e 14 obtiveram concentrações detectadas inferior a $1 \mu\text{g.L}^{-1}$, tornando a água dentro dos padrões de qualidade estabelecidos pela legislação (ALBUQUERQUE, 2017).

Estudo de caso 3: Investigou a degradação de microcistina-LR em solução de água adicionada de MC-LR, aplicando processo oxidativo avançado (UV/ H_2O_2). Os experimentos de irradiação com

concentração inicial de MC-LR ocorreram em câmara fotocatalítica (0,46 m de altura e 0,70 m de comprimento e 0,40 m de largura) na qual foram acopladas três lâmpadas germicidas de 15W cada, que emitem radiação UV no comprimento de onda de 254 nm e um sistema de agitação mecânica. Os experimentos ocorreram em placa de Petri com volume de 50 mL com uma distância de 11 cm das lâmpadas. A intensidade da radiação foi medida com um radiômetro com comprimento de onda de 254 nm, Coleparmer instrument Co. Chicago, Ill, 60648, séries 9811. A concentração inicial de MC-LR foi de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A concentração de H_2O_2 utilizada foi de 4 mM e os tempos de reação foram de 0; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 45 e 60 min. A concentração de 0,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR foi alcançada com 15 min de reação (MIRANDA, 2016).

Estudo de caso 4: Avaliou a eficiência de um reator fotocatalítico de baixo custo para degradação de microcistina-LR em água de abastecimento, utilizando o processo UV/ H_2O_2 . Após o tratamento convencional, a água de estudo foi conduzida ao reator fotocatalítico (51 cm de altura e 7,5 cm de diâmetro), composto de um cano de PVC, tubo de quartzo que apresentou 50 cm de altura e 4,4 cm de diâmetro e uma lâmpada UVC com 15 w de potência e comprimento de 48 cm, para realização dos ensaios de oxidação. A concentração inicial de MC-LR foi de 3,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$. As concentrações de H_2O_2 utilizadas foram de 5; 25; 50; 100; 500 e 1000 mM e os tempos de reação foram de 0; 2,5; 5; 15; 30; 45 e 60 min. O tratamento com 1000 mM de H_2O_2 após 15 min atingiu valor de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, aos 60 min apresentou valor de 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (ALBUQUERQUE, 2017).

Para identificação do composto alvo (MC-LR) e dos subprodutos formados, foi utilizado em todos os tratamentos o Espectro de Massa (LCQ FLEET) triplo quadrupolo da marca Thermo Scientific 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.

Para detecção da MC-LR remanescente no espectrômetro de massa foi necessário o emprego de técnica de concentração da amostra. Inicialmente um volume de 60 mL da amostra foi filtrada em membrana de acetato de celulose (Millipore®) de porosidade de 0,45 μm e posteriormente o volume filtrado foi concentrado em cartucho octadecil C18 para retenção da microcistina-LR. Antes de utilizar o cartucho (C18) realizou-se o processo de condicionamento utilizando 5 mL de metanol e 5 mL de água. 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.

Identificação Estrutural

Após a obtenção dos fragmentos identificados nos tratamentos, foi utilizado o programa ChemDraw, para formar estruturas e fórmulas químicas, massa exata e massa molecular referentes à razão massa/carga de cada fragmento previamente identificado por espectroscopia de massas, obtido pelos

números de íons correspondentes a diferença do íon precursor Microcistina-LR (m/z 995). Os fragmentos foram identificados por tentativas de clivagem alterando a massa específica do peptídeo em estudo ou apenas identificando o fragmento do peptídeo intacto. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, e não existe biblioteca de dados de substâncias identificadas. Sendo assim, foi utilizado o programa ChemSketch para obtenção da nomenclatura referente a cada estrutura.

Toxicologia dos Subprodutos

Para identificação dos efeitos toxicológicos dos subprodutos foram utilizadas as seguintes bases de dados: Catálogo de toxicologia do Open Chemistry Database, acessado através da PubChem. O sistema é mantido pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI), um componente da National Library of Medicine, que faz parte dos U.S. National Institutes of Health (NIH); TSCA inventário de substâncias químicas da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos; Agência Europeia dos Produtos Químicos (ECHA), a principal força promotora entre as autoridades reguladoras da implementação da legislação inovadora da UE em matéria de produtos químicos; Molbase Enciclopédia, é o banco de dados mais abrangente e inovador de produtos químicos disponíveis comercialmente na China; Base de dados ECOTOX database (USEPA, 2017).

Por meio de buscas nestas bases de dados, foram encontrados registros ou identificadores numéricos como, Cid (número de identificação da substância no site Pubchem), CE (número de registro na Comunidade Européia) e CAS Number (registro numérico de padrão mundial para substâncias químicas identificadas na literatura) das substâncias. Estes registros são únicos para cada substância, que podem possuir diferentes nomenclaturas, e permitem acesso aos bancos de dados para obter informações como dados toxicológicos.

DISCUSSÃO

Fragmentos Obtidos

A molécula protonada de MC-LR ($C_{49}H_{74}O_{12}N_{10}$) de massa ($M + H$) + 1 = 995, foi selecionada em um segmento de modo de aquisição por monitoramento de íons específico (SIM). A identificação de subprodutos formados pelas reações UV/ H_2O_2 e Fenton foi realizada pelas análises de espectrometria de massas (EM) de acordo com a sensibilidade do LCQ Fleet – MS/MS, no monitoramento dos valores de m/z .

Em estudos realizados por Silva (2015), Miranda (2016) e Albuquerque (2017) utilizando os processos oxidativos avançados UV/ H_2O_2 e Fenton para degradação de Microcistina-LR foram detectados 18 tipos de subprodutos distintos. As razões m/z (Tabela 1) foram geradas pela clivagem de ligações peptídicas na molécula de microcistina-LR, resultando em porções liberadas. Estes resultados são obtidos através dos números de íons correspondentes pela diferença do íon precursor de razão massa/carga 995.

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.

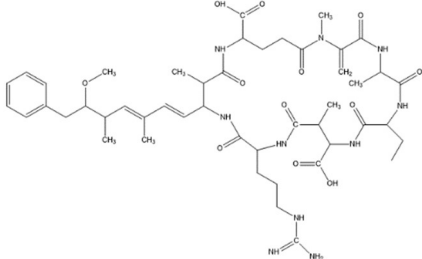
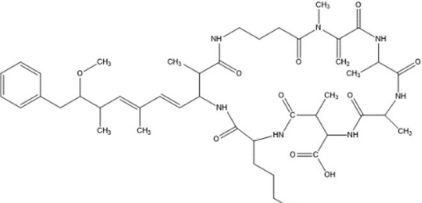
Tabela 1: Razão m/z de cada fragmento

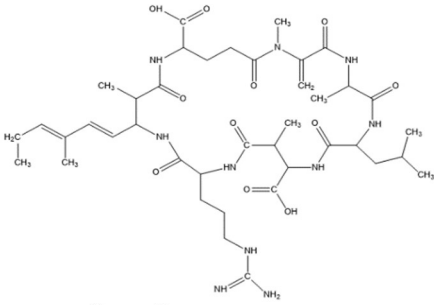
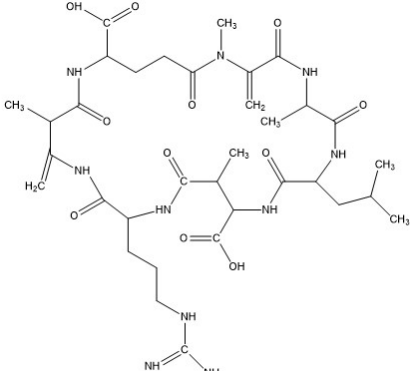
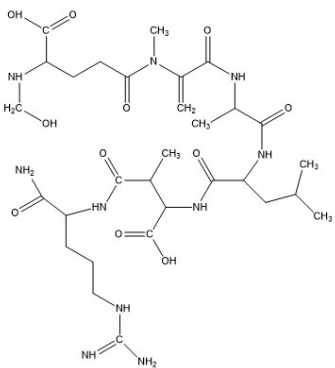
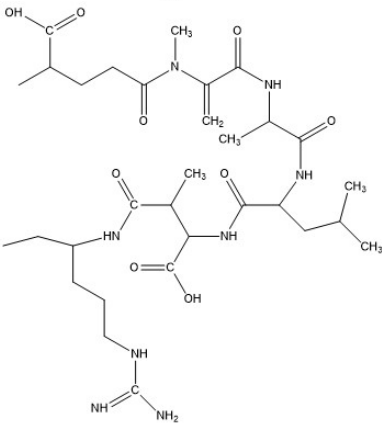
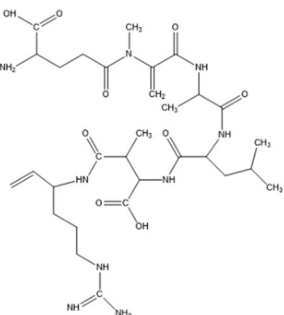
Razão m/z	Referência
967	Antoniou (2008)
866	Antoniou (2008), Benke (2015), Zong (2013), Zong (2013), Zong (2015)
860	Antoniou (2008)
778	-
728	Mayumi (2006)
682	Mayumi (2006), Zong (2013), Zong (2013), Antoniou (2008), Zong (2015)
681	Antoniou (2008)
599	Fastner (2001), Mayumi (2006), Antoniou (2008), Benke (2015), Zong (2015), Zong (2013)
553	Antoniou (2008), Mayumi (2006), Zong (2013), Zong (2013), Zong (2015)
444	-
375	Fastner (2001), Antoniou (2008), Al Momani (2010)
286	Fastner (2001), Zong (2015), Zong (2013)
214	Fastner (2001), Dahlmann & Luckas (2010), Zong (2013), Zong (2015)
213	-
161	Zong (2013)
160	-
135	Fastner (2001), Dahlmann & Luckas (2010)
70	Fastner (2001)

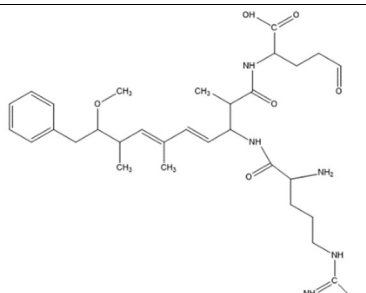
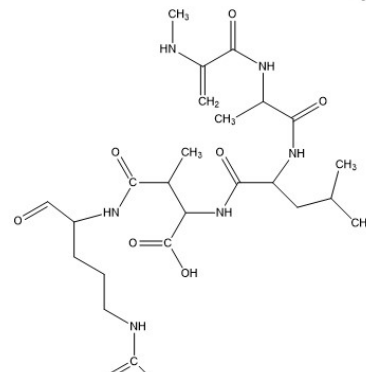
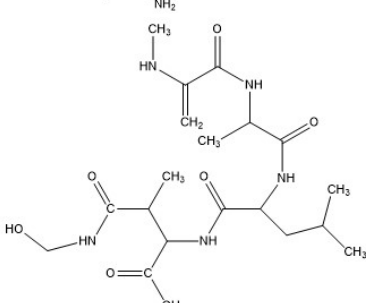
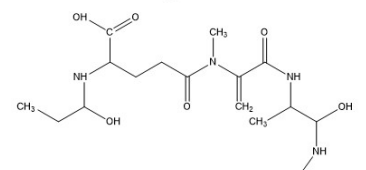
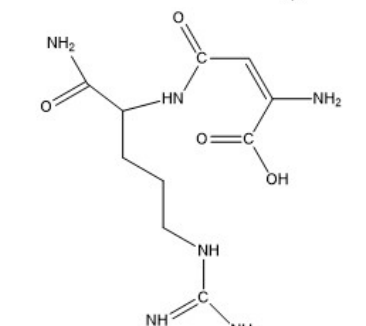
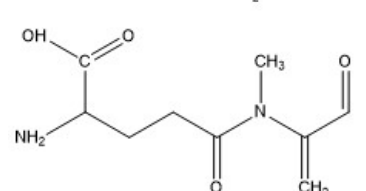
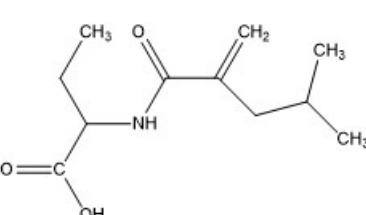
Identificação Estrutural dos Fragmentos

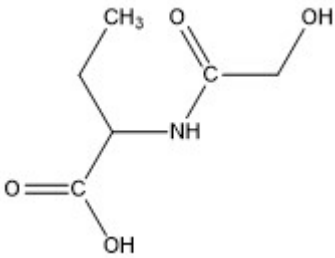
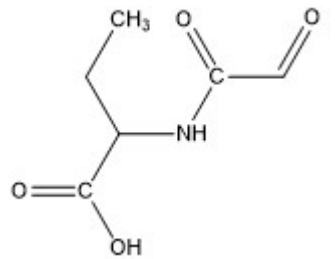
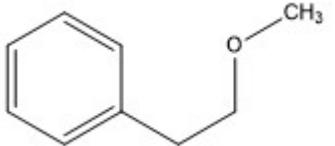
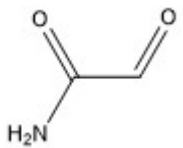
A microcistina-LR é uma molécula relativamente grande e apresenta vários grupos funcionais em diversas posições e cada grupo apresenta suscetibilidade para rompimento das ligações gerando os subprodutos da degradação (SILVA, 2015). Embora a MC-LR apresente uma estrutura complexa, a alta eficiência de degradação por POAs pode ser atribuída pela clivagem das ligações peptídicas (CHANG et al. 2014). Segundo Lawton et al. (1999) relatam que o radical OH• reage facilmente com ligações insaturadas, tais como aquelas incluídas na porção Adda da microcistina. Este grupo é comumente utilizado como um cromóforo para análise da toxina e a clivagem dessa porção resulta na eliminação da toxicidade. Com base nos valores de razão m/z, as fórmulas químicas e identificações estruturais dos fragmentos foram obtidas utilizando os softwares ChemDraw e ChemSketch, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2: Fontes e Dados de Identificação referentes a cada fragmento

N°	(m/z) / Fórmula Química / Registro	Estrutura Química	Estudo de caso
1	967 C ₄₇ H ₇₀ N ₁₀ O ₁₂ CAS: 126268-88-0 CID: 6441615		3
2	866 C ₄₄ H ₆₆ N ₈ O ₁₀ CID: 130235479		1 e 2

3	860 C ₄₀ H ₆₄ N ₁₀ O ₁₁ CID: 10284362		3 e 4
4	778 C ₃₄ H ₅₄ N ₁₀ O ₁₁ CID: 10190796		3
5	728 C ₃₀ H ₅₂ N ₁₀ O ₁₁ CAS: 852620-70-3 CID: 71414300		1 e 2
6	682 C ₃₁ H ₅₄ N ₈ O ₉ CAS: 852620-70-3 CID: 71414300		1 e 2
7	681 C ₂₉ H ₄₇ N ₉ O ₁₀ CID: 88591091		3 e 4

8	599 C ₃₁ H ₄₈ N ₆ O ₆ CID: 449482		1 e 2
9	553 C ₂₅ H ₄₃ N ₇ O ₇ CID: 381425		1, 2 e 3
10	444 C ₁₉ H ₃₃ N ₅ O ₇ CID: 11568452		3
11	375 C ₁₆ H ₃₀ N ₄ O ₆ CID: 18220492		1 e 2
12	286 C ₁₀ H ₁₈ N ₆ O ₄ CAS: 674296-02-7 CID: 3809863		1 e 2
13	214 C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₄ CAS: 140-98-7 CID: 5355031		1, 2 e 4
14	213 C ₁₁ H ₁₉ NO ₃ CID: 180642		3

15	161 C ₆ H ₁₁ NO ₄ CID: 56666828		3
16	160 C ₆ H ₉ NO ₄ CAS: 3103-38-6 CID: 76549 CE: 221-459-5		4
17	135 C ₉ H ₁₂ O CAS: 539-30-0 CID: 10873 CE: 208-714-6		1, 2 e 3
18	70 C ₂ H ₃ NO ₂ CAS: 60939-21-1 CID: 11708045		3

A primeira via de oxidação m/z 967 indica uma desmetilação na molécula de Microcistina-LR. Grupos metila nas porções aspartil e desidroalanina da microcistina LR são removidos. A segunda via de oxidação m/z 866 indica pequenas clivagens nas porções L-Leu, L-Arg e D-Glu. A via de oxidação com m/z de 860 indica quebras nos aminoácidos L-Leu, L-Arg e Adda. A oxidação quase completa do grupamento Adda ocorre no fragmento de m/z 778. Os fragmentos 728, 682 e 681, correspondem à completa oxidação do aminoácido Adda. Eliminando a porção responsável pela toxicidade da molécula. No entanto, a via de oxidação número 8 com m/z 599 indica uma possibilidade de clivagem nos aminoácidos Mdha e Measp, rompendo da molécula também as porções D-Ala e L-Leu.

O fragmento de m/z 553 indica uma oxidação dos aminoácidos Adda e D-Glu da molécula. O fragmento de m/z 444 indica a oxidação dos aminoácidos Adda, D-Glu e L-Arg. A via de oxidação de m/z 375 indica clivagem nas porções L-Leu e Adda, liberando também os aminoácidos Measp, L-arg. O fragmento m/z 286 resulta na presença apenas dos aminoácidos MeAsp e L-Arg. A razão m/z de 214 indica a presença das porções Mdha e D-Glu. No entanto, o fragmento de m/z 213 indica presença dos aminoácidos L-Leu e MeAsp. Os fragmentos de m/z 161 e 160 indicam partes dos aminoácidos L-Leu e MeAsp, diferenciando na perda de um H no segundo. A via de oxidação N° 17 de m/z 135 indica a presença de parte do grupamento Adda. A razão m/z 70 está relacionada à parte do grupamento MeAsp.

Zong et al. (2015), estudaram o efeito da cloração nas MC-LR e os potenciais riscos de subprodutos de desinfecção e identificaram diversos subprodutos incluindo os de m/z 214, 553 os quais correspondem aos fragmentos de íons [Glu-Mdha+H]⁺ e [Mdha-Ala-Leu-MeAsp-Arg+H]⁺ respectivamente.

Sabe-se que o processo de degradação mediado por radical hidroxila se inicia com a incorporação

de radicais hidroxila, usualmente 2, 3 ou 4, no grupamento Adda. Posteriormente, rearranjos permitem a eliminação de grupos mais lábeis (por exemplo, L-Arg e MeAsp), assim como reações de ciclização intramolecular, que levam à formação de ciclos de menor massa molar. A princípio, a maior parte dos intermediários identificados apresenta uma estrutura molecular cíclica intacta e ao decorrer da degradação os intermediários foram sendo linearizados. Os peptídeos com peso molecular mais baixos podem ser identificados pela clivagem da porção MeAsp, L-Arg ou L-Leu.

Toxicologia dos Subprodutos

A Microcistina-LR na sua forma inicial, de registros CAS: 101043-37-2, CID: 445434 e CE: 621-323-9, possui efeitos toxicológicos como dor abdominal, vômitos e diarreia, inflamação e hemorragia do fígado, pneumonia aguda, dermatite aguda, danos nos rins e potencial crescimento tumoral (EPA, 2014). Atua como hepatotóxica potente inibidora de fosfatases de proteína serina / treonina PP1 e PP2A, bem como pró-oxidantes, capazes de induzir estresse oxidativo nas células através da geração de espécies reativas de oxigênio. A LD50 pela via intraperitoneal é de aproximadamente 25-150 ug / kg de peso corporal em camundongos, a LD50 oral é de 5000 ug / kg de peso corporal em camundongos e maior em ratos (WHO, 2003). Danos graves no fígado são caracterizados por uma ruptura da estrutura celular do fígado (devido a danos no citoesqueleto), perda da estrutura sinusoidal, aumento do peso do fígado devido à hemorragia intra-hepática, choque hemodinâmico, insuficiência cardíaca e morte. Outros órgãos afetados são os rins, pulmões e intestinos (KUIPER-GOODMAN et al., 1999).

A molécula $C_{47}H_{70}N_{10}O_{12}$ que se refere a m/z 967, de registros CAS: 126268-88-0 e CID: 6441615, é heptapeptídeo tóxico de uma cepa axênica de *Microcystis aeruginosa* K-139. Possui as mesmas propriedades tóxicas da molécula inicial. A molécula $C_{44}H_{66}N_8O_{10}$ foi identificada como um tipo de macrolídeo, que são antibióticos que pertencem a uma família de compostos químicos caracterizada pela presença de um anel macrocíclico de lactona, cuja droga de referência é a eritromicina.

As moléculas $C_{40}H_{64}N_{10}O_{11}$ (CID: 130235479), $C_{34}H_{54}N_{10}O_{11}$ (CID: 10284362), $C_{30}H_{52}N_{10}O_{11}$ (CAS: 852620-70-3, CID: 10190796), $C_{31}H_{54}N_8O_9$ (CAS: 852620-70-3, CID: 71414300), $C_{29}H_{47}N_9O_{10}$ (CID: 71414300) e $C_{31}H_{48}N_6O_6$ (CID: 88591091) correspondentes as m/z 860, 778, 728, 682, 681 e 599 respectivamente, são peptídeos sem toxicidade registrada. A molécula $C_{25}H_{43}N_7O_7$ que possui m/z de 553, de registros CAS: 864460-70-8 e CID: 381425 é um peptídeo Glicinamida. O Cloridrato de Glicinamida possui propriedades tóxicas como irritação cutânea (Categoria 2), Irritação ocular (Categoria 2) e toxicidade para órgãos-alvo específicos com exposição única, (Categoria 3).

As razões m/z 444 e 375 correspondem às moléculas $C_{19}H_{33}N_5O_7$ (CID:11568452) e $C_{16}H_{30}N_4O_6$ (CID: 18220492), são peptídeos sem toxicidade registrada. A molécula $C_{10}H_{18}N_6O_4$ possui m/z 286 e registros CAS: 674296-02-7, CID: 3809863 é uma substância química sem toxicidade registrada. As moléculas $C_{10}H_{18}N_6O_4$ (CAS: 674296-02-7, CID: 3809863) e $C_{11}H_{19}NO_3$ (CID: 180642) correspondem a m/z 214 e 213 são substâncias químicas sem registro de toxicidade. A molécula $C_6H_{11}NO_4$ (CID: 56666828) de m/z 161 corresponde ao composto Ácido 4 - [(hidroxi) (acetil) amino] butanoico que não possui toxicidade

registrada.

A fórmula química $C_6H_9NO_4$ de m/z 160 e registros CAS: 3103-38-6, CID: 76549, CE: 221-459-5 corresponde ao aminoácido Glicina. A fórmula $C_9H_{12}O$ correspondente a m/z 135, de registros CAS: 539-30-0, CID: 10873, CE: 208-714-6 é éter benzílico etílico. A molécula $C_2H_3NO_2$ correspondente a m/z 70 com registros CAS: 60939-21-1, CID: 11708045 é o composto 2-Oxoacetamida pertencente à classe das glioxamidas. Estes compostos não possuem toxicidade registrada nas bases de dados. Al Momani et al. (2010) e Liu e colaboradores, 2016, em estudos realizados sobre a degradação da Microcistina, remetem a toxicidade dos subprodutos da molécula à presença do grupamento Adda, apontando que os fragmentos sem o grupamento presente não sejam tóxicos.

Nos Estudos de caso 1 e 2 apenas o fragmento 553 apresentou registro de toxicidade, no entanto, na estrutura da molécula o grupamento Adda foi oxidado. Indicando que o fragmento não possui toxicidade alta. Porém no Estudo de caso 1, o fragmento de m/z 866 apresentou o grupamento Adda em sua estrutura. Portanto o Processo Oxidativo Avançado (Fenton) pode ser empregado em Estações de Tratamento de Água na potabilização de água com concentrações elevadas de compostos orgânicos e microcistina-LR. No Estudo de caso 3 os fragmentos de íons dominantes no período reacional de m/z foram 967, 860, 778, 681, 553 e 444. Os fragmentos 967 e 553 apresentaram registros de toxicidade, indicando que o processo oxidativo avançado (UV/H₂O₂) utilizado no experimento gerou subprodutos tóxicos e de alta massa molecular na degradação de Microcistina-LR.

No Estudo de caso 4 os fragmentos não apresentaram toxicidade registrada nas bases de dados. No entanto o fragmento m/z 860 ainda apresentou parte do grupamento tóxico da molécula (grupamento ADDA), além de massa molecular alta. Portanto, o Processo Oxidativo Avançado (UV/H₂O₂) utilizado apresentou pouca eficiência na oxidação da molécula de Microcistina-LR.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos Processos Oxidativos Avançados aplicados no tratamento da Microcistina-LR utilizados nos 4 experimentos, foram identificados 34 subprodutos formados da oxidação da Microcistina-LR, sendo 18 deles distintos e 14 destes foram encontrados na literatura. Entre os fragmentos identificados nas bases de dados, os de m/z 967 e 553 apresentaram toxicidade registrada. As estruturas dos fragmentos m/z 967, 866 e 860 apresentaram o grupamento tóxico da molécula (Adda), o que leva a concluir que muito provavelmente eles devem apresentar toxicidade. Tais subprodutos de oxidação não apresentaram registro de toxicidade nas bases de dados, sendo necessários testes de toxicidades registrados para uma melhor classificação toxicológica dos subprodutos gerados.

A comparação entre os processos oxidativos Fenton e UV/H₂O₂ indicou, que o Fenton (Estudo de caso 2) apresentou melhor desempenho. Os resultados obtidos através da análise de subprodutos de oxidação de Microcistina-LR indicaram que o tratamento possibilitou a formação de compostos mais simples, com moléculas menores. Verificou-se que os processos Fenton formaram subprodutos de oxidação com moléculas menores e de baixa toxicidade, quando comparados à UV/H₂O₂. O Estudo de caso 3 gerou

substâncias tóxicas e de massas moleculares maiores.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M. V. D. C.. **Avaliação da degradação de Microcistina-LR no tratamento de água de abastecimento em sistema convencional seguido por Processo Oxidativo Avançado (POA)**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Estadual da Paraíba, 2017.
- AL MOMANI, F. A.; JARRAH, N.. Treatment and kinetic study of cyanobacterial toxin by ozone. **Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**. v.45, n.6, p.719-731, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1080/10934521003648933>
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; HEREMAN, T. C.; CORDEIRO-ARAÚJO, M. K.; MACEDO-SILVA, I.; DIAS, C. T.; SASAKI, F. F. C.; MOURA, A. N.. Phytotoxicity associated to microcystins: a review. **Brazilian Journal of Biology**, v.74, p.753-760, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.06213>
- BOROWITZKA, M. A.; BEARDALL, J.; RAVEN, J. A.. **The Physiology of Microalgae**. Springer, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria de Consolidação nº 5 de 28 de setembro de 2017**. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Brasília, 2017
- CHANG, J.; CHEN, Z.; WANG, Z.; SHEN, J.; CHEN, Q.; KANG, J.; YANG, L.; LIU, X.; NIE, C. Ozonation degradation of microcystin-LR in aqueous solution: intermediates, byproducts and pathways. **Water research**, v.63, p.52-61, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.06.007>
- CHANG, J.; CHEN, Z.; WANG, Z.; KANG, J.; CHEN, Q.; YUAN, L.; SHEN, J. Oxidation of microcystins-LR in water by ozone combined with UV radiation: The removal and degradation pathway. **Chemical Engineering Journal**. v.276, p.97-105, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2015.04.070>
- SILVA, A. G.. **Avaliação do Ph de Oxidação do Processo Fenton na remoção de Microcistina-LR de água de abastecimento**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental)-Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2015.
- ESTEVEZ, F. A.. **Fundamentos de Limnologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2011.
- EPA. **Cyanobacteria and Cyanotoxins: Information for Drinking Water Systems**. Environmental Protection Agency, 2014.
- HE, X.; DE LA CRUZ, A. A.; HISKIA, A.; KALOUDIS, T.; O'SHEA, K.; DIONYSIOU, D. D. Destruction of cyanotoxin microcystins by UV-254nm based direct photolysis and advanced oxidation processes (AOPs): influence of variable amino acids on the degradation kinetics and reaction mechanisms. **Water Research**, v.74, p.227-238, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.011>
- JACOBS, L. C. V.; PERALTA-ZAMORA, P.; CAMPOS, P. R.; PONTAROLO, R.. Photocatalytic degradation of microcystin-LR in aqueous solutions. **Chemosphere**, v.90, p.1552-1557, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.004>
- KUIPER-GOODMAN, T.; FALCONER, I.; FITZGERALD, J.. Human health aspects. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J.. **Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management**. E & FN Spon., p.134-178, 1999.
- LAWTON, L. A.; ROBERTSON, P. K. J.. Physico-chemical treatment methods for the removal of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) from potable waters. **Chemical Society Reviews** v.28, n.4, p.217-224, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1039/A805416l>
- LIU, Y.; REN, J.; WANG, X.; FAN, Z.. Mechanism and Reaction Pathways for Microcystin-LR Degradation through UV/H2O2 Treatment. **PLOS ONE**, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156236>
- METCALF, J. S.; CODD, G. A.. Cyanotoxins. In **Freshwater Benthic Environments**. In: WHITTON, B. A.. **Ecology of Cyanobacteria II: their Diversity in Space and Time**. New York: Springer, 2012.
- MIAO, H-F.; QIN, F.; TAO, G-J.; TAO, W-Y.; RUAN, W-Q.. Detoxification and degradation of microcystin-LR and -RR by ozonation. **Chemosphere**, v.79, p.355-361, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.02.024>
- MIRANDA, A. C.. **Degradação de microcontaminantes emergentes e inativação de cepa de E. coli resistentes a antibióticos por Processos Oxidativos Avançados**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Estadual da Paraíba, 2016.
- MOREIRA, C.; VASCONCELOS, V.; ANTUNES, A.. Phylogeny and Biogeography of Cyanobacteria and Their Produced Toxins. **Marine Drugs**, v.11, p. 4350-4369, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.003>
- PANTELIC, D.; SVIRCEV, Z.; SIMEUNOVIC, J.; VIDOVIC, M.; TRAJCOVIC, I.. Cyanotoxins: characteristics, production and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia. **Chemosphere**, v.91, p. 421-441, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.003>
- RAMOS, C. P. S.; MENEZES, T. G. C.; AGRELLI, A.; ALVES, I. A. B. S.; DA LUZ, J. C.; DA SILVA, C. T. G.; PINHEIRO, I. O.; JUNIOR, A. T. J.. Cianobactérias e microcistina em águas de rio destinadas ao abastecimento de centro industrial de Caruaru, PE, Brasil. **Vigilância sanitária em debate: sociedade, ciência e tecnologia**, v.4, p.27-35, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3395/2317-269x.00602>
- RIGOSI, A.; CAREY, C. C.; IBELINGS, B. W.; BROOKES, J. D.. The interaction between climate warming and eutrophication to promote cyanobacteria is dependent on trophic state and varies among taxa. **Limnology Oceanography**, v.59, p.99-114, 2014. DOI: <https://doi.org/10.4319/lo.2014.59.01.0099>

ROEGNER, A. F.; BRENA, B.; GONZALEZ-SAPIENZA, G.; PUSCHNER, B.. Microcystins in potable surface Waters: toxic effects and removal strategies. **Journal of Applied Toxicology**, v.34, p.441-457, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/jat.2920>

SILVA, M. N. C. E.; OLIVEIRA, R.; CEBALLOS, B. S. O.; GUERRA, A. B.; AQUINO, S. F.; LIBÂNIO, M.. Hierarquização da eficiência de remoção de cianotoxinas por meio de adsorção em carvão ativado granular. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v.22, p.691-697, 2017.

USEPA. **ECOTOX User Guide**: ECOTOXicology Database System. Environmental Protection Agency, 2017.

WHO. World Health Organization. **Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in Drinking-water**. World Health Organization, 2003.

ZONG, W.; SUN, F.; SUN, X.. Oxidation by-products formation of microcystin-LR exposed to UV/H2O2: toward the generative mechanism and biological toxicity. **Water Research**, v.47, p.1-9, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.03.037>

ZONG, W.; SUN, F.; PEI, H.; HU, W.; PEI, R.. Microcystin-associated disinfection by-products: the real and non-negligible risk to drinking water subject to chlorination. **Chemical engineering journal**, v.279, p.498-506, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.05.048>

A CBPC – Companhia Brasileira de Produção Científica (CNPJ: 11.221.422/0001-03) detém os direitos materiais desta publicação. Os direitos referem-se à publicação do trabalho em qualquer parte do mundo, incluindo os direitos às renovações, expansões e disseminações da contribuição, bem como outros direitos subsidiários. Todos os trabalhos publicados eletronicamente poderão posteriormente ser publicados em coletâneas impressas sob coordenação da Sustenere Publishing, da Companhia Brasileira de Produção Científica e seus parceiros autorizados. Os (as) autores (as) preservam os direitos autorais, mas não têm permissão para a publicação da contribuição em outro meio, impresso ou digital, em português ou em tradução.