

I-152 - AVALIAÇÃO DA REMOÇÃO DE MICROCISTINAS NO TRATAMENTO DE ÁGUA CONVENCIONAL EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORO VEZES O TEMPO DE CONTATO

Maria Martins do Nascimento ⁽¹⁾

Química Industrial pela Universidade Federal do Maranhão. Mestre em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos pela Universidade de Brasília (UnB). Especialista em Regulação e Fiscalização de Serviços Públicos na área de Saneamento da ARSESP.

Cristina Celia Silveira Brandão

Doutora em Engenharia Ambiental pelo Imperial College of Science, Technology and Medicine. Professora Adjunta do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da Universidade de Brasília, Brasília - DF, Brasil. cbrandao@unb.br

Endereço ⁽¹⁾: Rua Arcipreste Ezequias, 473, Ipiranga - São Paulo - SP - CEP: 04271 060 - Brasil - Tel: (11) 34811860 e-mail: mmnascimento@gmail.com

RESUMO

A presença de cianobactérias, nas águas dos mananciais superficiais usados para abastecimento público, além de conferir gosto e odor são potenciais produtores de toxinas. A lise celular das cianobactérias liberam toxinas para coluna d'água e o tratamento convencional não é eficiente na remoção dessas toxinas dissolvidas.

A maioria das estações de tratamento de água no Brasil é do tipo convencional, compostas das etapas coagulação, floculação, decantação e filtração. Uma grande parte dessas estações utiliza o cloro com agente da desinfecção. De posse de tal constatação, faz-se necessário que se investigue a remoção de microcistinas dissolvidas na etapa de desinfecção por meio do processo de oxidação química usando cloro.

Sendo assim, o presente trabalho teve com objetivo avaliar, em laboratório, as diferentes concentrações de cloro vezes os tempos de contato na remoção das microcistinas no processo de desinfecção na água para consumo humano. Previamente, foi realizada, por meio das técnicas de cromatografia líquida e espectrometria de massas, a análise dos análogos de microcistinas constituintes na água dos ensaios de oxidação.

Em função dos resultados obtidos, foi observado que, para uma determinada concentração de microcistinas dissolvidas, a eficiência de remoção dessas toxinas foi proporcional ao CT (concentração de cloro vezes tempo de contato). Para as concentrações de microcistinas cerca de 40 e 20 µg L⁻¹ os produtos CT obtidos, foram respectivamente, 60 e 30 mg L⁻¹ min.

PALAVRAS-CHAVE: Oxidação, hipoclorito de sódio, microcistinas, Espectrometria de massas.

INTRODUÇÃO

O crescente enriquecimento artificial nos mananciais superficiais, devido à extensa utilização de fertilizantes na agricultura e descarga de esgotos industriais e domésticos sem tratamento adequado, propicia a floração de cianobactérias. Há relatos na literatura científica da ocorrência de cianobactérias em águas de mananciais superficiais em várias regiões do Brasil (Sant'Anna *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2008; Lira *et al.*, 2011, entre outros). A presença desses microrganismos na água para abastecimento público além de conferir gosto e odor são potenciais produtores de toxinas, e pode representar um sério risco à saúde da população. O tratamento de água convencional, composto das etapas floculação, coagulação, decantação e filtração, não é eficiente na remoção das toxinas dissolvidas.

Para garantir a potabilidade da água nos sistemas de abastecimento para consumo humano através de estações de tratamento água (ETA) convencional que tratam água na presença de cianobactérias e cianotoxinas é necessário a implantação de processo e ou etapas complementares. A literatura científica relata a eficiência na remoção de microcistinas e outras toxinas dissolvidas em de água por meio da oxidação química usando o cloro (Acero *et al.*, 2008). O cloro é o produto químico amplamente utilizado como agente desinfetante nas ETAs, pois é um agente químico não tóxico aos seres humanos, não confere sabor e odor às águas e apresenta custo razoável.

A eficiência na remoção de microcistinas em tratamento de água está relacionada a diversos fatores como o tipo de variante, temperatura, pH, concentração do agente oxidante, tempo de contato, dentre outros. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é avaliar, no processo de desinfecção na água para consumo humano, a remoção das microcistinas constituintes da cepa NPLJ-4, usando diferentes concentrações de cloro vezes os tempos de contato.

Dos estudos realizados em laboratório, considerando as condições experimentais avaliadas, a eficiência de remoção dessas microcistinas foi proporcional ao CT (concentração de cloro vezes tempo de contato). Para as concentrações de microcistinas cerca de 40 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, os produtos CT que atendem ao padrão de potabilidade de água para consumo humano descrito na Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde, foram respectivamente, 60 e 30 $\text{mg L}^{-1} \text{min}$.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado em escala de bancada, dividido em três etapas. Na etapa preliminar, consistiu no cultivo de cianobactérias, extração, semipurificação das microcistinas produzidas pela linhagem NPLJ-4. Na primeira etapa, realizou-se a análise e caracterização da microcistina predominante na cepa. Na segunda etapa, foram realizados os ensaios de oxidação e avaliação do tempo de contato do cloro com as diferentes concentrações microcistinas. As três etapas de trabalho serão descritas a seguir:

ETAPA PRELIMINAR: OBTENÇÃO DAS MICROCISTINAS PRODUZIDAS PELA LINHAGEM NPLJ-4

As microcistinas usadas na preparação da água de estudo (AE) foram obtidas a partir da lise de células de cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa* (cepa NPLJ-4) cultivadas no Laboratório de análise Ambiental (LAA) da UNB. O cultivo foi unialgal, em meio de cultura ASM-1 realizado a temperatura de $24^\circ\text{C} \pm 1$, intensidade luminosa controlada (cerca de $40 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) e foto-período de 12 horas (12:12 h).

A lise foi realizada por meio do processo de gelo/degelo do cultivo por três vezes consecutivas e em seguida submetidas a banho de ultra-som (Nicholson e Burch, 2001). Em seguida, o material obtido foi submetido ao processo de semipurificação, com base no procedimento descrito no método ISO 20179:2005 (ISO, 2005), obtendo assim, um extrato semipurificado de microcistinas.

PRIMEIRA ETAPA: ANÁLISES E CARACTERIZAÇÃO

A análise do extrato semipurificado de microcistinas proveniente da cepa NPLJ-4, foi realizada por meio das técnicas de cromatografia de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e a cromatografia líquida com detector de massas.

A técnica CLAE-DAD foi utilizada para a separação da fração de microcistina predominante no presente extrato. Nesta análise, utilizou-se a coluna C_{18} , em fase reversa, Zorbax Eclipse XDB- C_{18} com dimensões de 4,6 X 150 mm e diâmetro das partículas da fase reversa de 5 μm .

Esta análise cromatográfica foi realizada usando as soluções de acetonitrilo e água a um fluxo de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ e injeção de 100 μL . Baseado nos estudos realizados pelos pesquisadores Tsuji *et al.* (1997) a detecção foi realizada a 210 e 238 nm e o espectro de absorção do pico de maior intensidade foi analisado entre 200-300 nm.

A avaliação preliminar da variante de microcistina predominante no extrato semipurificado proveniente da lise das células produzidas pela linhagem NPLJ-4 foi realizada comparando a fração cromatográfica com o padrão de MCYST-LR. Para tal, comparou-se o tempo de retenção no sistema de cromatografia, assim como o índice de similaridade dos espectrogramas de microcistinas na faixa de absorvância de 200 a 300nm.

Dando sequência à avaliação preliminar, a fração cromatográfica referente à potencial variante de microcistina, predominante no extrato, observada no espectrograma por CLAE-DAD foi coletada, separadamente em vial de 5 mL.

A fração cromatográfica isolada no sistema CLAE-DAD foi submetida à análise por meio da técnica de espectrometria de massas em equipamento CL-EM/EM. O sistema da espectrometria de massas foi operado no modo positivo e varredura na faixa de 100 a 1200 unidades de massa atômica (u.m.a). Cada fração cromatográfica foi injetada, por infusão, a $10 \mu\text{L min}^{-1}$ para otimizar os parâmetros do potencial de orifício (DP); a energia de colisão (CE) e o potencial de saída da célula de colisão (CXP).

RESULTADOS DA PRIMEIRA ETAPA

A linhagem NPLJ-4 referente à *Microcystis aeruginosa* isolada na Lagoa de Jacarepaguá, Rio de Janeiro, apresenta 4 variantes de microcistinas, sendo a MCYST-LR a mais abundante, representando cerca de 80% do total das microcistinas produzidas (Soares *et al.* 2004). Para verificar se o extrato semipurificado proveniente do cultivo da linhagem NPLJ-4 apresentava essa mesma característica foram realizadas análises do extrato, utilizando as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD) e, posteriormente, a técnica de cromatografia líquida com detector de massas (CL-EM/EM). A Figura 1 apresenta os cromatogramas referentes ao extrato das toxinas semipurificadas proveniente da linhagem NPLJ-4 (A) e ao padrão MCYST-LR (B).

Embora o índice de similaridade, de 0,994, obtido entre o padrão MCYST-LR e a fração cromatográfica apresentada do pico 2 (Figura 1A) indique que se trata da mesma molécula, quando são comparados os tempos de retenção das frações cromatográficas com o padrão MCYST-LR, observa-se que a fração mais abundante presente no cromatograma, Figura 1(A), apresenta um tempo de retenção de 16 min, enquanto que o cromatograma referente ao padrão MCYST-LR, Figura 1(B), revela que o tempo de retenção dessa variante é de 14,4 min. Essa diferença nos tempos de retenção sugere que essa fração cromatográfica (pico 2) não corresponde à MCYST-LR.

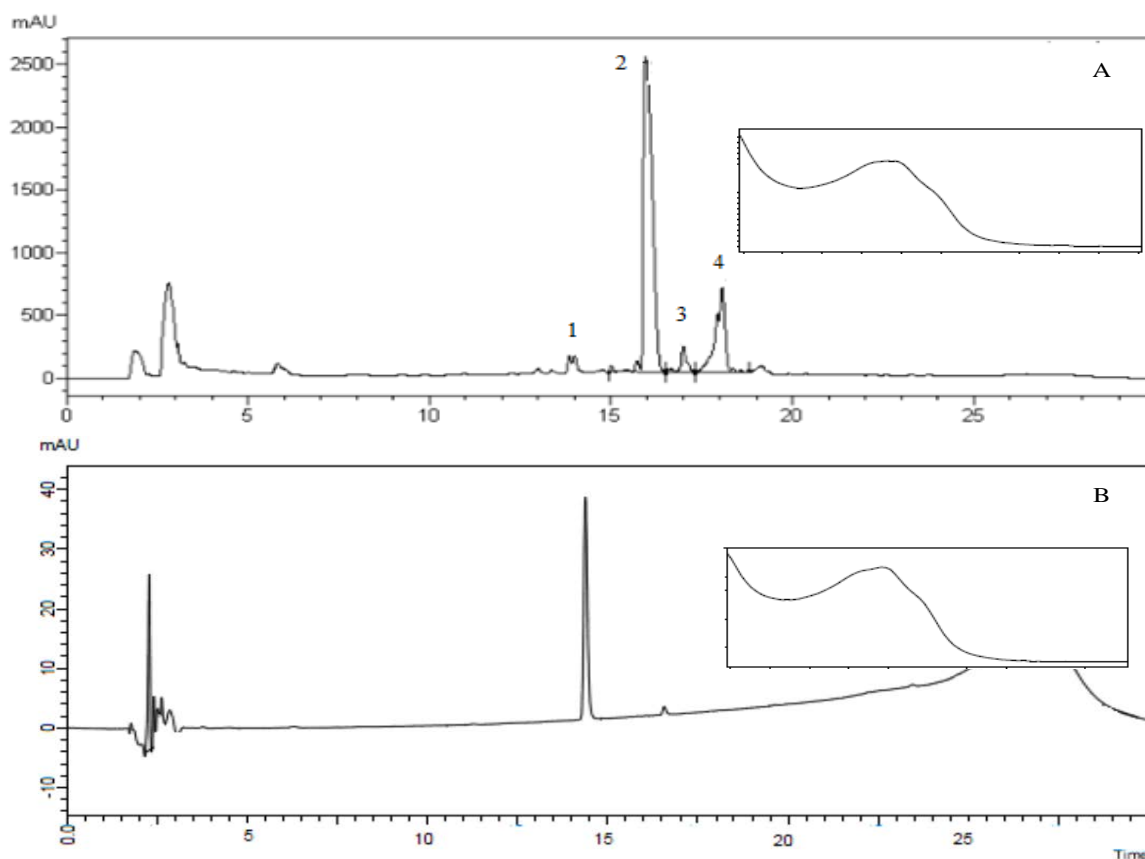


Figura 1- Cromatograma referente ao extrato semipurificado (A) e ao padrão MCYST-LR (B).

Para confirmar a hipótese de que a fração predominante não correspondia à MCYST-LR, inicialmente foi realizada a análise de uma alíquota do extrato semipurificado por meio do teste ELISA, que quantificou uma concentração de aproximadamente $2230 \mu\text{g L}^{-1}$ de microcistinas. Outra alíquota do mesmo extrato foi analisada por meio da técnica da espectrometria de massas, utilizando a curva de calibração (Figura 2) para quantificação de MCYST-LR, e obteve-se a concentração de $22 \mu\text{g L}^{-1}$ de MCYST-LR, indicando a presença de aproximadamente 1% dessa variante no extrato semipurificado obtido do cultivo da linhagem NPLJ-4 de *Microcystis aeruginosa*.

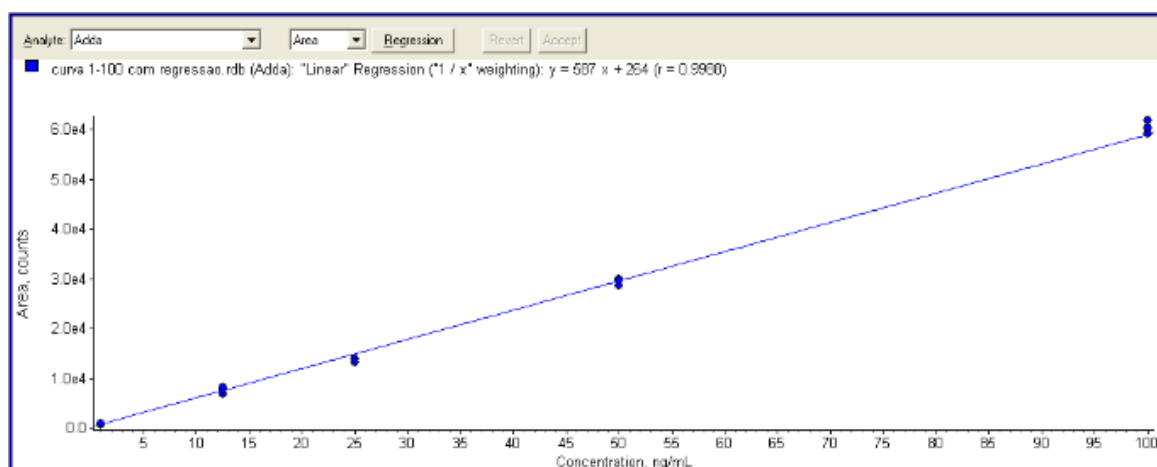


Figura 2 - Curva analítica obtida a partir do padrão para quantificação de MCYST-LR.

Posteriormente, para confirmar a ocorrência da microcistina-LR no extrato foi realizada uma varredura por meio da técnica de espectrometria de massas. A Figura 3 apresenta o espectrograma da análise da varredura referente ao extrato semipurificado de microcistinas realizada na faixa de 700 a 1100 unidades de massa atômica (a.m.u). Observa-se que a toxina mais abundante apresenta massa molecular m/z 1037,7 (M+H⁺) divergindo dos estudos realizados, em 2004, por Soares e colaboradores com a mesma linhagem NPLJ-4, cujos relatos apresentam a MCYST-LR, m/z 995,5 (M+H⁺), como a variante mais abundante.

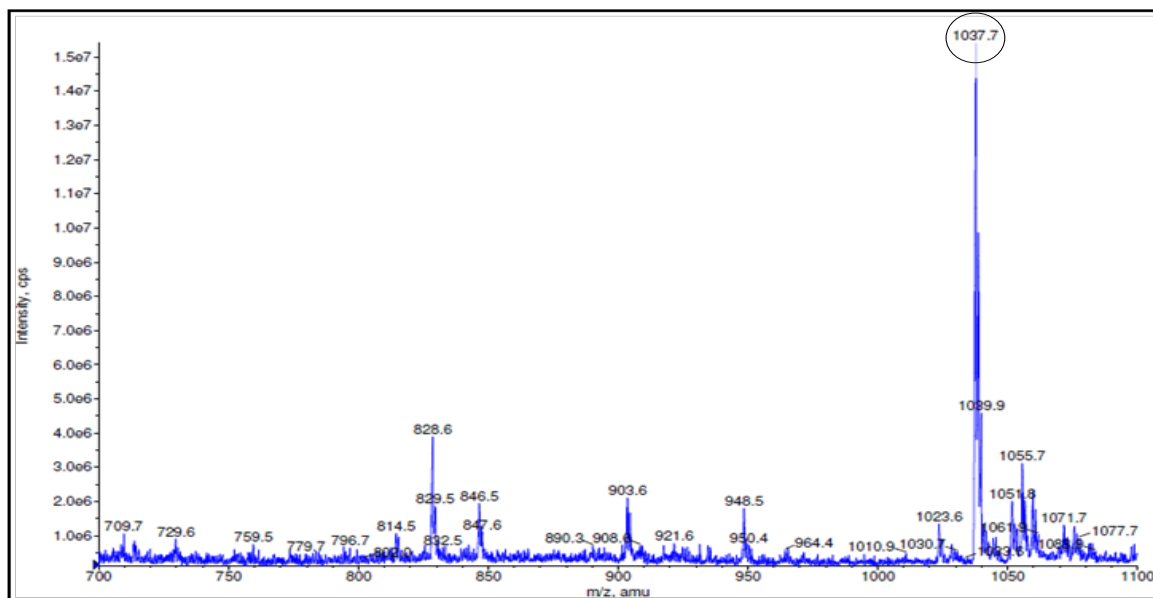


Figura 3 - Espectro de massas EM referente ao extrato semipurificado de microcistina.

A Figura 4 apresenta a varredura referente à fração cromatográfica correspondente ao pico 2, onde se verifica, mais uma vez a predominância do composto m/z 1037,7. A fragmentação dessa molécula, apresentada na Figura 4(B), revela a presença do fragmento Adda, m/z 135, característico de uma microcistina (Kondo *et al.*, 1992).

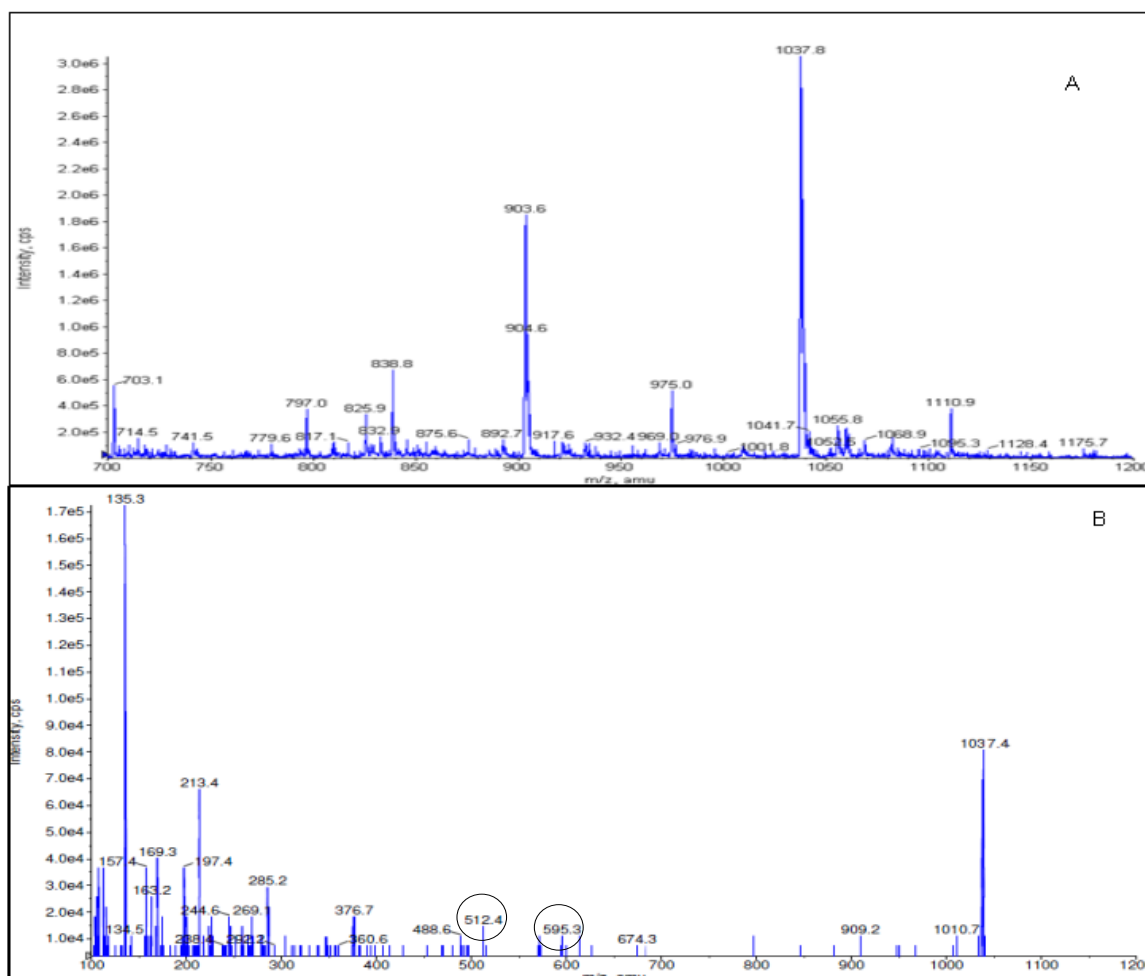


Figura 4- Espectro de massas EM (A) e EM/EM (B) referente ao pico (2) predominante observado no extrato de microcistinas.

Com base nos estudos realizados pelos pesquisadores Matthiensen *et al.* (2000) e Park *et al.* (2001) sugere-se que o componente de massas 1037,7 ($M+H^+$) corresponde à variante [D-Leu] MCYST-LR, pois a presença dos fragmentos m/z 213, 375 e 286 (Figura 4 B) mostra que não ocorreram desmetilações nos grupos Mdha e MeAsp e os fragmentos m/z 595 e 512 confirmam a estrutura Mdha⁷-Leu¹-Leu²-MeAsp³-Arg⁴ e Leu¹-Leu²-MeAsp³-Arg⁴, respectivamente.

Em estudos realizados no Brasil, Matthiensen e colaboradores detectaram a presença predominante da [D-Leu] MCYST-LR em florações ocorridas em dezembro de 1996 no estuário da Lagoa de Patos. As análises cromatográficas, espectrométricas de massas e de ressonância magnética nuclear permitiram a elucidação da sua estrutura molecular. Os dados obtidos definiram este composto como tendo um componente de massas 1037,6 ($M+H^+$) apresentando a fórmula molecular $C_{52}H_{80}O_{12}N_{10}$ correspondente a um peptídeo cíclico -Leu¹-Leu²-Masp³-Arg⁴-Adda⁵-Glu⁶-Mdha⁷.

Ainda segundo Matthiensen *et al.* (2000) e Park *et al.* (2001), a única diferença estrutural entre a variante [D-Leu] MCYST-LR e a MCYST-LR é a substituição de alanina (Ala) por uma Leucina (Leu) na posição 1 da molécula (Figura 5). Essa substituição resulta em diferença de 42 unidades de massa molecular entre a MCYST-LR, de m/z equivalente a 995,7 ($M+H^+$), e a [D-Leu] MCYST-LR, de m/z equivalente a 1037,6 ($M+H^+$).

Em 2001, no Canadá, Park e colaboradores realizaram estudos usando água do lago Pakowki com o intuito de descobrir a possível causa de mortes de pássaros ocorridas em 1997. Os dados obtidos identificaram a presença da variante de [D-Leu]-MCYST-LR, que foi associada às mortes das aves.

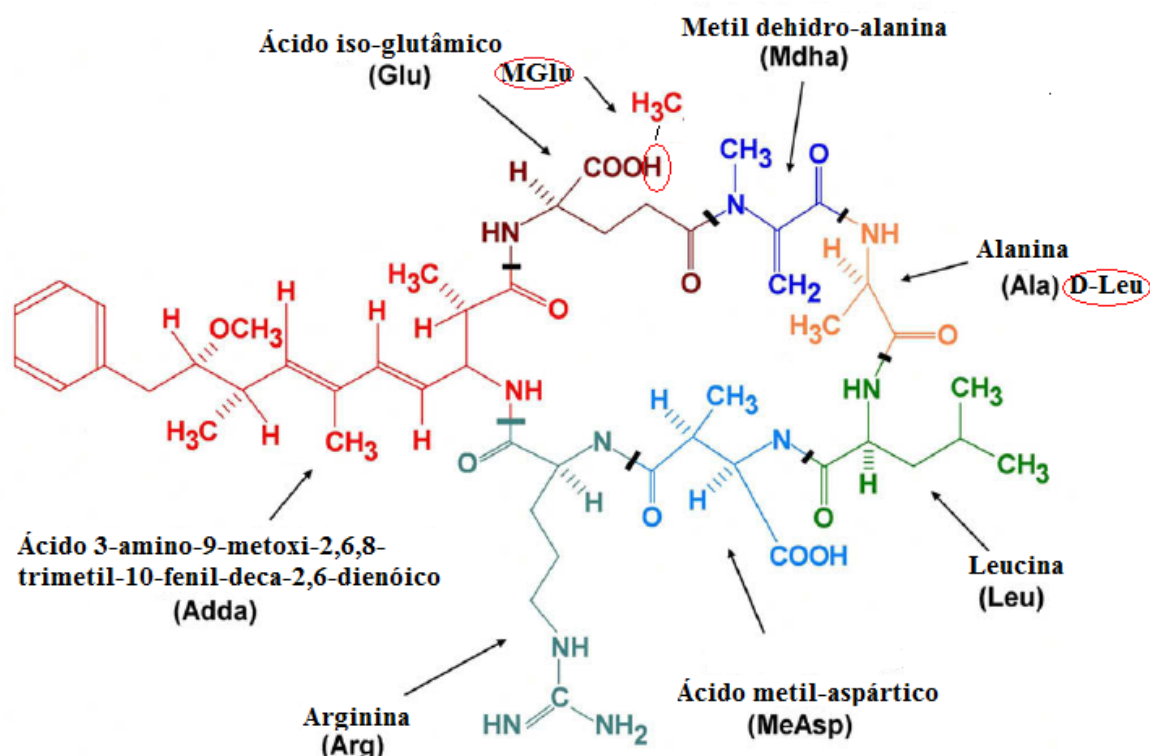


Figura 5 - Estrutura molecular referente à MCYST-LR, modificada a partir de Merel *et al.*, 2009.

SEGUNDA ETAPA: OXIDAÇÃO

Após a caracterização foi realizada a oxidação das microcistinas presentes no extrato semipurificado, proveniente da cepa NPLJ-4, usando o hipoclorito de sódio com o intuito de observar o comportamento dessas microcistinas no processo de oxidação. Foi realizado o ensaio 1, em duas repetições, usando as concentrações de 2,3 mg L⁻¹ de microcistinas e doses distintas de cloro, sendo a oxidação observada nos tempos de contato de 3 e 24 horas. O valor de pH adotado no ensaio foi de 7,0 ± 0,2 e temperatura de 25 °C. As amostras obtidas, após o processo de oxidação, foram submetidas à análise por meio da técnica de espectrometria de massas.

No ensaio 1 a água de estudo (AE) contendo cerca de 2,2 mg L⁻¹ de toxinas semipurificadas foi oxidada com 60 mg L⁻¹ de cloro. Após três horas de tempo de contato, duas alíquotas eram retiradas. Na primeira alíquota de 60 mL era analisado, de imediato, o teor de cloro residual livre e total. Na segunda alíquota de 15 mL eram adicionados 2 mg de ácido ascórbico. A segunda alíquota foi submetida ao processo de secagem por meio de rotoevaporação e resuspensão em 2 mL de solução metanol/água (1:1) para o estudo posterior do comportamento das microcistinas no processo de oxidação. Uma amostra de 15 mL da AE contendo as microcistinas semipurificadas, considerada como branco, portanto sem adição de cloro, era evaporada e resuspensão em 2 mL de metanol/água (1:1). O mesmo procedimento foi realizado para as alíquotas retiradas no tempo de contato de 24 horas.

Os demais ensaios de oxidação, ensaios 2, 3, 4 e 5, foram realizados sob temperatura de 24°C±1 e valor de pH 6, sendo os produtos CT (concentrações vezes os tempos de contato) de 30 mg L⁻¹min e 60 mg L⁻¹min. Cada ensaio foi realizado em duas repetições e as análises em triplicatas.

Os ensaios, de 2 a 5, foram realizados aplicando a solução de hipoclorito de sódio na água de estudo, na dose apropriada, sob agitação de 100 rpm no primeiro minuto do tempo de contato. As amostras para análises eram coletadas nos tempos de contato de 15 e 30 minutos. Cada amostra coletada era dividida em duas alíquotas. Na primeira alíquota, de 60 mL, eram realizadas, de imediato, as determinações de cloro residual livre e cloro total. Na segunda alíquota, de 10 mL, era adicionado 0,2 mL de tiosulfato de sódio na concentração de 1M para eliminar o cloro residual e a alíquota era armazenada em freezer para posterior análise da concentração de microcistinas.

A quantificação das microcistinas nos ensaios de oxidação era realizada por meio do método ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) e as medições do cloro livre foram realizadas pelo método DPD (dietil-p-fenil-diamina) utilizando reagentes HACH.

Os produtos CT na oxidação das microcistinas com o cloro foram avaliados usando água de estudo com concentrações iniciais de microcistinas de aproximadamente 20, 40 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os experimentos eram realizados com a aplicação de distintas doses de cloro, 1,0, 2,0 e 4,0 mg L^{-1} , na água de estudo e tempos de contato de 15 e 30 minutos.

RESULTADOS DA SEGUNDA ETAPA

A Figura 6 apresenta os espectros de massas obtidos no ensaio 1, antes da oxidação (Figura 6A), após 3 horas (Figura 6B) e 24 horas (Figura 6C). Ao comparar os espectrogramas, observa-se que a variante predominante, [D-Leu]-MCYST-LR, massa m/z 1037,7, desaparece nas primeiras horas de tempo de contato.

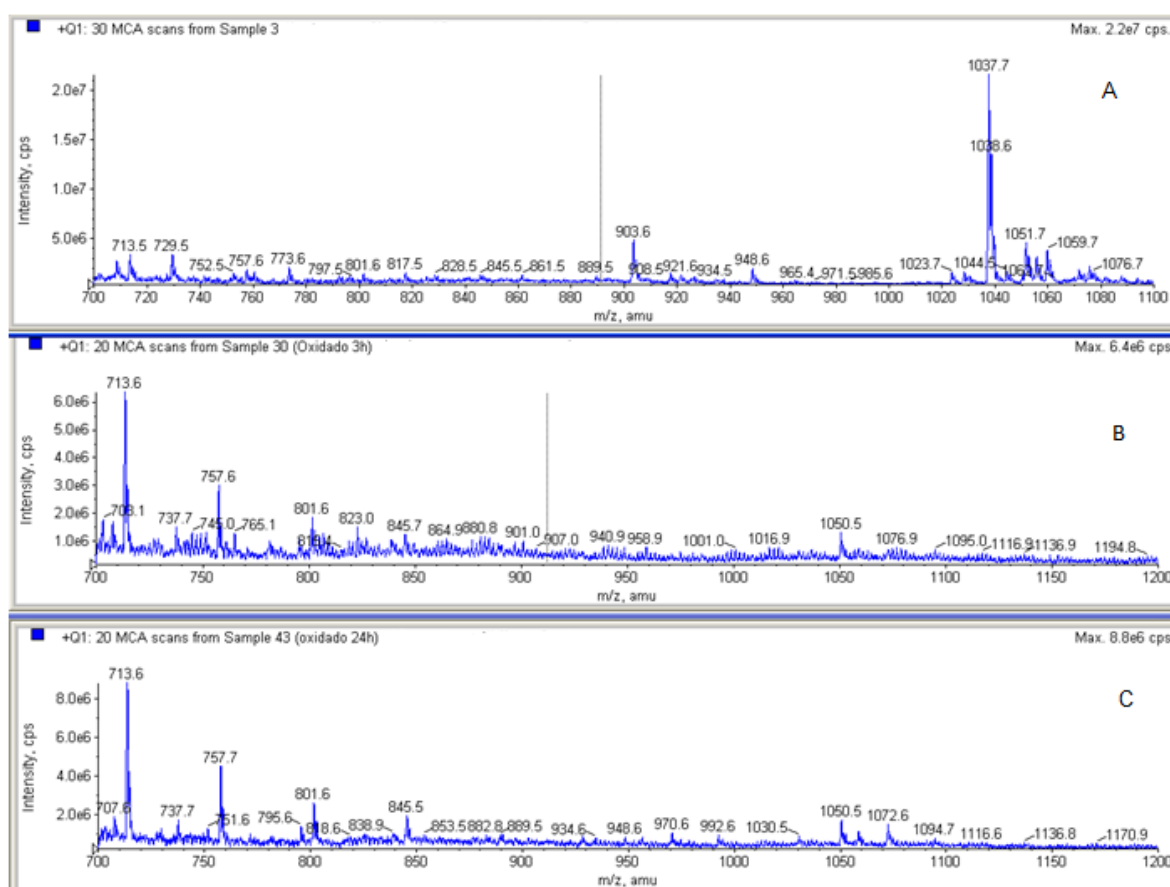


Figura 6 - Espectrograma de massas EM antes da oxidação (A), EM após 3 horas (B) e EM após 24 horas de tempo de contato (C).

Com relação à oxidação, ensaios 2 a 5, observa-se que é possível se obter elevadas remoções de microcistinas com menores tempos de contato se utilizadas maiores doses de cloro, ou seja, quanto menor o tempo de contato maior será a dose de cloro necessária para a oxidação. Por outro lado, para menores doses de cloro maior tempo de contato será necessário para se obter o mesmo resultado na remoção das microcistinas. Em outras palavras, a eficiência de remoção de microcistinas depende do produto CT (concentração vezes tempo de contato), conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1- Influência do CT na oxidação de microcistinas.

	Dose Cloro (mg L ⁻¹)	T (min)	CT (mg min L ⁻¹)	CT médio (mg min L ⁻¹)	C ₀ MCYST (µg L ⁻¹)	C _{15;30 min} MCYST (µg L ⁻¹)	Remoção MCYST (%)	MCYST (média%)	DP
Ensaio 2	2,01	30	60,3		110,9	49,1	55,7		
	2,06	30	61,8	61,0	96,9	47,9	50,5	49,8	6,3
	2,03	30	60,9		102,0	58	43,1		
	3,94	15	59,1		110,9	52	53,1		
	3,99	15	59,9	59,7	96,9	51	47,4	52,7	5,2
	4,00	15	60,0		102,0	43	57,8		
Ensaio 3	2,08	30	62,4		47,4	0,41	99,1		
	2,02	30	60,6	61,0	42,0	1,63	96,1	96,8	2,0
	2,00	30	60,0		43,0	2,0	95,3		
	4,01	15	60,2		47,4	0,1	99,8		
	4,08	15	61,2	60,4	42,0	0,1	99,71	99,8	0,1
	3,99	15	59,9		43,0	0	100,0		
Ensaio 4	0,99	30	29,7		37,2	18,5	50,2		
	0,90	30	27,0	28,9	39,0	17	56,4	53,7	3,1
	1,00	30	30,0		44,0	20	54,5		
	2,10	15	31,5		37,2	18	51,6		
	2,01	15	30,2	31,6	39,0	17,0	56,4	53,8	2,4
	2,20	15	33,0		44,0	20,5	53,4		
Ensaio 5	1,10	30	33,0		22,1	1,9	91,4		
	1,10	30	33,0	32,0	22,0	1	95,4	94,8	3,1
	1,00	30	30,0		20,0	0,5	97,5		
	2,00	15	30,0		22,1	0,1	99,5		
	2,01	15	30,2	30,3	22,0	0,2	99,3	99,1	0,5
	2,05	15	30,8		20,0	0,3	98,5		

DP=desvio padrão.

Na Tabela 1 estão contidos os dados e informações referentes aos ensaios de oxidação. Verificam-se as eficiências na remoção de microcistinas para os CT considerando as diferentes concentrações e os diversos tempos de contato. Para os ensaios 3 e 5 obteve-se eficiência na remoção de microcistinas entre 95 a 99%. A Figura 7 auxilia no entendimento dos resultados obtidos.

Observa-se ainda que, para as concentrações iniciais de microcistinas de cerca de 40 e 20 µg L⁻¹, os produtos CT mínimos necessários para obtenção de concentrações de microcistinas atendendo o padrão de potabilidade estabelecido pela Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde, de 1 µg L⁻¹, foram respectivamente, 60 e 30 mg L⁻¹ min.

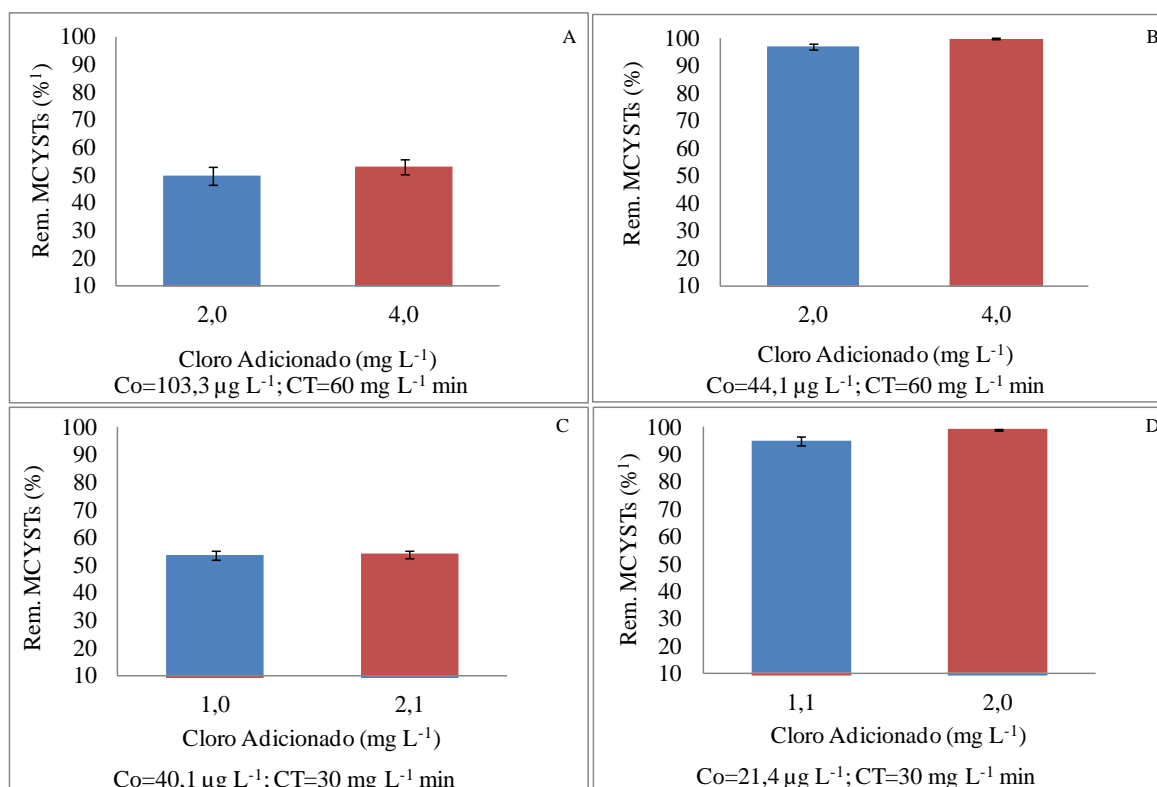


Figura 7 - Oxidação das microcistinas em função do CT (concentração vezes tempo de contato).

A Figura 7 apresenta a influência do CT na oxidação, pois ao usar o mesmo valor de CT para as mesmas concentrações iniciais de microcistinas semelhante percentual de remoção de microcistina é obtido. Contudo, ao aumentar o valor de CT a remoção de microcistinas aumenta quase que proporcionalmente (Figura 7 B e C).

CONCLUSÕES

Considerando as condições experimentais avaliadas, os resultados obtidos neste trabalho permitiram confirmar que para uma determinada concentração de microcistinas dissolvidas, a eficiência de remoção dessas toxinas foi proporcional ao CT (concentração de cloro vezes tempo de contato). Para as concentrações de microcistinas cerca de 40 e 20 µg L⁻¹ os produtos CT necessários para obtenção de concentrações de microcistinas atendendo o padrão de potabilidade de água para consumo humano foram, respectivamente, 60 e 30 mg L⁻¹ min.

Com referência a caracterização da linhagem NPLJ-4 usada no estudo, foi observado que a [D-Leu] MCYST-LR é a variante de microcistina predominante.

Considerando a diversidade dos produtos formados no processo de oxidação, e que o cloro é o composto mais utilizado na desinfecção em estações de tratamento de água brasileiras, recomenda-se a oxidação isolada de cada variante de interesse de microcistinas para que seja possível a realização de estudos detalhados dos compostos formados, bem como o tempo de contato necessário para oxidar cada variante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACERO, J. L., RODRIGUEZ, E., MAJADO, M. E., SORDO, A., MERILUOTO, J. Oxidation of microcystin-LR chlorine and permanganate drinking water treatment. *Journal of Water Supply: Research and Technology*, 57(6), p.371-380, 2008.
2. AZEVEDO, S. M. F. O., CARMICHAEL, W.W., JOCHIMSEN, E.M., RINEHART, K.L., SHARON L., Shaw, G. L., EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology*, 181-182, p.441-446, 2002.

3. CARVALHO, L. R., PIPELE, F., WERNER, V. R., LAUGHINGHOUSE, H. D., CAMARGO, A. C. M., RANGEL, M., KONNO, K., SANT'ANNA, C. L. A toxic cyanobacterial bloom in an urban coastal lake, Rio Grande do Sul state, Southern Brazil, Brazilian Journal of Microbiology. v.39, n.4, p. 761-769. 2008.
4. HO, L., ONSTAD, G., VON GUNTEN U., RINCK-PEIFFER, S., CRAIG, K., NEWCOMBE, G. Differences in the chlorine reactivity of four microcystin analogues. Water Research, v.40, p.1200-1209, 2006.
5. International Organization for Standardization - ISO 20179 Water quality - Determination of *microcystis*-Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (CLAE) with ultraviolet (UV) detection. First edition, 2005.
6. KONDO, F., IKAI, Y., OKA, H., ISHIKAWA, N., WATANABE, M. F., WATANABE, M., HARADA, K., SUZUKI, M. Separation and identification of microcystin in cyanobacteria by frit-fast atom bombardment liquid chromatography/mass spectrometry. Toxicon, **30**(3), p.227-237, 1992.
7. LIRA, G. A. S. T., ARAÚJO, E. L., OLIVEIRA, M. C. B., MOURA, A. N. Phytoplankton abundance, dominance and coexistence in an eutrophic reservoir in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v.83, n.4, p. 1313-1326, 2011.
8. MATTHIENSEN, A.; BEATTIE, K. A.; YUNES, J. S.; KAYA, K.; CODD, G. A. [d-Leu1] Microcystin-LR, from the cyanobacterium Microcystis RST 9501 and from a Microcystis bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil, Phytochemistry 55, p.383-387, 2000.
9. MEREL, S., LEBOT, B., CLÉMENT, M., SEUX, R., THOMAS, O. Ms Identification of microcystin-LR chlorination by-products. Chemosphere, **74**(6), p.832-839, 2009.
10. NICHOLSON, B.C., BURCH, M. D. Evolution of Analytical Methods for Detection and Quantification of Cyanotoxins in Relation to Australian Drinking Water Guidelines. Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment, 2001.
11. PARK, H., NAMIKOSHI, M., BRITTAIN, S. M., CARMICHAEL, W.W., MURPHY, T. [d-Leu1] microcystin-LR, a new microcystin isolated from waterbloom in a Canadian prairie lake. Toxicon, 39, p.855-862, 2001.
12. SANT'ANNA, C. L., BRANCO, L. H. Z., GAMA Jr, W. A. & WERNER, V. R. Lista de Cyanobacteria do Estado de São Paulo, Biota Neotrop., v. 11, 2011.
13. SOARES, M. R., MAGALHÃES, F. V., AZEVEDO, S. M. F. O. Accumulation and depuration of microcystins (cianobactéria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. Aquatic Toxicology, 70, p.1-10, 2004.
14. TSUJI, k., WATANUKI, T., KONDO, F., WATANABE, M., NAKAZAWA, S. Stability of microcystins from cyanobacteria – IV effect chlorination on decomposition. Toxicon, **35**(7), p.1033-1041, 1997.