

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL**

**REMOÇÃO DE SAXITOXINAS POR MEIO DE OXIDAÇÃO  
COM CLORO**

**ROGÉRIO PINHEIRO MAGALHÃES CARVALHO**

**ORIENTADORA: CRISTINA CELIA SILVEIRA BRANDÃO**

**TESE DE DOUTORADO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL  
E RECURSOS HÍDRICOS**

**PUBLICAÇÃO PTARH.TD – 06/10  
BRASÍLIA/DF, JULHO/2010**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL**

**REMOÇÃO DE SAXITOXINAS POR MEIO DE OXIDAÇÃO COM  
CLORO**

**ROGÉRIO PINHEIRO MAGALHÃES CARVALHO**

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL DA FACULDADE DE TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM TECNOLOGIA AMBIENTAL E RECURSOS HÍDRICOS.**

**APROVADA POR:**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Cristina Celia Silveira Brandão, PhD (ENC – UNB)  
(Orientadora)**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Ariuska Karla Barbosa Amorim, Dr. (ENC - UNB)  
(Examinadora Interna)**

---

**Prof. Marco Antonio Almeida de Souza, PhD (ENC – UnB)  
(Examinador Interno)**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Cristina Filomêna Pereira Rosa Paschoalato, Dr. (ENQ - UNAERP)  
(Examinadora Externa)**

---

**Prof. Maurício Luiz Sens, PhD (ENS - UFSC)  
(Examinador Externo)**

**BRASÍLIA/DF, 08 DE JULHO DE 2010**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

CARVALHO, ROGÉRIO PINHEIRO MAGALHÃES

Remoção de Saxitoxinas por Meio de Oxidação com Cloro.

vi, 121p., 210 x 297 mm (ENC/FT/UnB, Doutor, Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, 2010). Tese de Doutorado – Universidade de Brasília. Faculdade de Tecnologia.

Departamento de Engenharia Civil e Ambiental.

1. Tratamento de água

2. Remoção de Saxitoxinas

3. Oxidação com Cloro

4. Subprodutos da Cloração

## **REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

CARVALHO, R.P.M. (2010). *Remoção de Saxitoxinas por Meio de Oxidação com Cloro*. Tese de Doutorado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Publicação PTARH.TD-06/10, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 121p.

## **CESSÃO DE DIREITOS**

AUTOR: Rogério Pinheiro Magalhães Carvalho.

TÍTULO: Remoção de Saxitoxinas por Meio de Oxidação com Cloro.

GRAU: Doutor

ANO: 2010

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta tese de doutorado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte dessa tese de doutorado pode ser reproduzida sem autorização por escrito do autor.

---

Rogério Pinheiro Magalhães Carvalho

rpmcarvalho@hotmail.com

“Ninguém pode voltar ao passado e fazer um novo começo, mas qualquer um pode recomeçar e fazer um novo fim.”

Francisco Cândido Xavier.

1910 – 2002

## **DEDICATÓRIA**

A Deus por mais essa oportunidade de aprender, à minha família e aos amigos.

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Cristina Celia Silveira Brandão pela orientação, pela contribuição na minha formação, pelo carinho e confiança em mim depositado.

Aos professores do PTARH pelo meu enriquecimento intelectual e exemplo de dedicação: Sérgio Kóide, Marco Antônio, Ariuska, Oscar, Ricardo, Nestor e Nabil.

À professora Cristina Paschoalato pelo auxílio e análises realizadas na UNAERP, sua valiosa contribuição foi fundamental para o desenvolvimento do trabalho.

À professora Dejanira Franceschi de Angelis pelas análises de toxicidade na UNESP, sua generosidade e contribuição permitiram o cumprimento de um dos objetivos do trabalho.

Aos amigos do PTARH: Alessandra Moraes, Orlandina, Maria Martins, Rosângela, Carol e Wellington pelas conversas, alegrias e incentivos.

Aos funcionários do Laboratório de Análise de Água: “Boy”, Júnior (“Joãozinho”) e Marcilene, esta última em especial pelos auxílios durante a realização dos ensaios.

Ao Adélias da Secretaria do PTARH pelo atendimento durante os pedidos de documentos.

Aos colegas e amigos da CAPES, que sempre me incentivaram durante o curso.

À CAPES pela licença concedida para frequentar o curso.

## RESUMO

### REMOÇÃO DE SAXITOXINAS POR MEIO DE OXIDAÇÃO COM CLORO

**Autor: Rogério Pinheiro Magalhães Carvalho**

**Orientadora: Cristina Celia Silveira Brandão**

**Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos**

**Brasília, julho de 2010.**

A eutrofização artificial de reservatórios pode ter como consequência a ocorrência de florações de cianobactérias tóxicas e, no Brasil, é crescente o número de relatos de florações da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* produtora de saxitoxinas. O tratamento constituído por coagulação, floculação, sedimentação e filtração não remove eficientemente as saxitoxinas e outras cianotoxinas dissolvidas, e uma das alternativas que se apresenta é a oxidação com cloro. A oxidação com cloro mostrou-se efetiva na remoção de microcistinas; porém, são escassos os estudos relativos a sua aplicação na remoção de análogos de saxitoxinas. Assim, este trabalho foi conduzido para determinar a efetividade do cloro na oxidação de saxitoxinas, focalizando três variantes desse grupo, a neoSTX, a dcSTX e a STX. Adicionalmente, foi avaliada a influência do pH na cinética de oxidação e a formação de subprodutos, além da realização de ensaios de toxicidade utilizando *D. similis* e *C. silvestrii*. Os ensaios foram desenvolvidos em escala de bancada, sendo utilizada água de estudo produzida a partir de compostos oriundos da lise de células de *C. raciborskii*, submetidos ou não a processo de semipurificação. As doses de cloro aplicadas variaram de 0,8 a 79 mg/L, os valores de pH variaram de 4 a 11 e o tempo de contato chegou a 90 minutos. A demanda de cloro foi elevada nas condições de pH ácidos, sendo maior na água de estudo que continha, além das saxitoxinas, outros produtos extracelulares. Na água de estudo contendo predominantemente saxitoxinas, ocorreram remoções significativas nas condições de pH básico ( $\text{pH} \geq 8$ ). Nessa condição, com dose de 8 mg/L, e concentração inicial de 68,3  $\mu\text{g/L}$  de neoSTX, 33,3  $\mu\text{g/L}$  de STX e de 16,3  $\mu\text{g/L}$  de dcSTX, após 15 minutos de tempo de contato, não foi mais detectada a presença das variantes neoSTX e STX; entretanto, a variante dcSTX se mostrou mais resistente à oxidação, não sendo detectada somente após o tempo de contato entre 60 e 90 minutos. A cinética da reação foi, portanto, influenciada pela variante de saxitoxina, pelo valor do pH e pela dose de cloro, não tendo sido possível estabelecer a ordem das reações. Para dose de cloro mais elevada (13 mg/L), foi verificada a formação de subprodutos (trialometanos, cloro hidrato, ácidos haloacéticos e haloacetoneitrilas), com maior concentração para os trialometanos em valor de pH básico (138,6  $\mu\text{g/L}$ ).

Palavras chave: tratamento de água, remoção de saxitoxinas, oxidação com cloro, subprodutos da cloração.

## ABSTRACT

The eutrophication of reservoirs may result in toxic cyanobacteria blooms. In Brazil, reports about *Cylindrospermopsis raciborskii* bloom with saxitoxins production is increasing. The water treatment consisting of coagulation, flocculation, sedimentation and filtration does not remove efficiently saxitoxins or other cyanotoxins, and one of the alternatives to cope with removal of saxitoxins is the oxidation with chlorine. Chlorine is largely used in the disinfection of drinking water and is effective in removing microcystins, however there are few studies reporting the use of chlorine for oxidation of the various analogs of saxitoxins. Thus, this work was conducted in order to evaluate the effectiveness of chlorine in the oxidation of saxitoxins, focusing on three variants (neoSTX, dcSTX and STX). Additionally, it was analysed the formation of oxidation byproducts and the effluent toxicity, both tested by bioassay methods with invertebrates (*D. similis* and *C. silvestrii*). The tests were conducted in bench scale, using water study produced from compounds derived from the lysis of *C. raciborskii* cells, submitted or not to semipurified process. The applied dosages of chlorine varied from 0.8 mg/L to 79 mg/L, pH values were between 4 and 11 and the contact time reached 90 minutes. Chlorine demand was higher in conditions of acid pH, being higher in the water study that contained, in addition to saxitoxins, other extracellular products. In the semipurified samples, there were significant removals under conditions of basic pH ( $\text{pH} \geq 8$ ). In this condition, with 8 mg/L, and initial concentration of 68.3  $\mu\text{g/L}$  of neoSTX, 33.3  $\mu\text{g/L}$  of STX and 16.3  $\mu\text{g/L}$  of dcSTX, after 15 minutes of contact time, it was no longer detected the presence of neoSTX and STX variants, however, the dcSTX variant was more resistant to oxidize. This toxin was not detected only after the contact time between 60 and 90 minutes. The kinetics of the reaction was, therefore, influenced by variation of saxitoxin, the value of pH and chlorine dose, and it was not possible to establish the order of reactions. For higher dose of chlorine (13 mg/L), there was the formation of byproducts (trihalomethanes, chlorine hydrate, haloacetic acids and haloacetonitriles) with a higher concentration for trihalomethanes in basic value pH (138.6  $\mu\text{g/L}$ ).

Keywords: water treatment, saxitoxins removal, chlorine oxidation, chlorination byproducts.

## SUMÁRIO

	Página
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 – OBJETIVOS.....	3
2.1 – OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 – CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS.....	4
3.1.1 – Aspectos Gerais.....	4
3.1.2 – Toxinas Produzidas pelas Cianobactérias.....	9
3.2 – TRANSFORMAÇÃO DAS VARIANTES DE SAXITOXINAS.....	15
3.3 – DETECÇÃO E TESTES DE TOXICIDADE DE CIANOTOXINAS.....	20
3.4 – REMOÇÃO DE CIANOTOXINAS PELO PROCESSO DE OXIDAÇÃO.....	24
3.4.1 – Subprodutos da Oxidação com Cloro.....	30
4 – METODOLOGIA.....	37
4.1 – ÁGUA DE ESTUDO E SOLUÇÃO DE CLORO.....	38
4.2 – DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.....	43
4.2.1 – Procedimento Geral para a Realização dos Ensaios de Oxidação.....	43
4.2.2 – Ensaios de Oxidação de Saxitoxinas em Presença de Outros Compostos Extracelulares (Etapas 1 e 2).....	46
4.2.2.1 – Etapa 1.....	46
4.2.2.2 – Etapa 2.....	48
4.2.3 – Ensaio de Oxidação de Saxitoxinas a partir de Extrato Semipurificado (Etapas 3 e 4).....	49
4.2.3.1 – Avaliação preliminar da cinética de oxidação de saxitoxinas (Etapa 3).....	49
4.2.3.2 – Avaliação de formação de subprodutos da oxidação (Etapa 4).....	51
4.2.3.3 – Ensaio de toxicidade (Etapa 4).....	53
4.3 – MÉTODOS ANALÍTICOS.....	56
4.3.1 – Detecção de Saxitoxinas.....	57
4.3.2 – Determinação de Subprodutos.....	61
4.3.2.1 – Determinação de trialometanos, cloro hidrato, cloropicrinas, haloacetonas e haloacetonitrilas.....	62

4.3.2.2 – Determinação de ácidos haloacéticos.....	64
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	66
5.1 – ENSAIOS DE OXIDAÇÃO DE SAXITOXINAS EM PRESENÇA DE OUTROS COMPOSTOS EXTRACELULARES (ETAPAS 1 E 2).....	66
5.1.1 – Etapa 1.....	66
5.1.2 – Etapa 2.....	70
5.2 – ENSAIO DE OXIDAÇÃO DE SAXITOXINAS USANDO ÁGUA DE ESTUDO AE2 (ETAPAS 3 E 4).....	82
5.2.1 – Avaliação Preliminar da Cinética de Oxidação de Saxitoxinas (Etapa 3) .....	82
5.3 – SUBPRODUTOS DA OXIDAÇÃO DAS SAXITOXINAS COM CLORO.....	96
6 – CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES .....	102
6.1 - CONCLUSÕES .....	102
6.2 - RECOMENDAÇÕES .....	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	105
APÊNDICES.....	121

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 3.1 – Vista panorâmica de uma lagoa com floração de cianobactérias (Azevedo, 1998)-----	5
Figura 3.2 – Gêneros de cianobactérias potencialmente nocivas (Figura retirada de <a href="http://www.cyanobacteria-platform.com/cyanobacteria.html">www.cyanobacteria-platform.com/cyanobacteria.html</a> ) -----	7
Figura 3.3 - Estruturas químicas das neurotoxinas: (A) anatoxina-a, (B) homoanatoxina-a, (C) anatoxina-a(s) e (D) estrutura geral das saxitoxinas (Chorus e Bartram, 1999). -----	12
Figura 3.4 – Efeito da atuação das saxitoxinas no canal de sódio (Carmichael, 1994) -----	14
Figura 3.5 – Estrutura da molécula de STX com as posições dos grupos N-OH (posição 1) e orto-sulfato nas posições 11 e 17, locais onde possivelmente tem início o processo de transformação das saxitoxinas (Vale, 2006). -----	17
Figura 3.6 – Influência do pH na estrutura da molécula de STX (Strichartz, 1984).-----	19
Figura 3.7 - Anatomia da Daphnia (Fêmea): (1)-Coração; (2)-Olho Composto; (3)-Antenas; (4)-Ocellus; (5)-Garras cuticulares em gancho (cerdas); (6)-Pernas; (7)-Abdómen (Figura retirada de <a href="http://www.caudata.org">www.caudata.org</a> ).-----	22
Figura 4.1 - Fluxograma das etapas da pesquisa -----	37
Figura 4.2 – Sala de cultivo instalada no LAA -----	39
Figura 4.3 – Procedimento para a obtenção das águas de estudo (AE1 e AE2) -----	40
Figura 4.4 – Membranas utilizadas no processo de filtração de amostras com saxitoxinas após o processo de gelo/degelo: (a) membrana de 8 µm, (b) membrana de 1 µm, (c) e membrana de 0,45 µm. -----	41
Figura 4.5 – Equipamento gerador de solução de cloro -----	42
Figura 4.6 – Experimento com saxitoxinas e controle de doses de solução oxidante -----	43
Figura 4.7 – Fluxograma dos procedimentos que foram realizados em cada sequência de ensaio com o cloro -----	44
Figura 4.8 – Aparelho de teste de jarros que foi utilizado nas etapas 1, 2 e 3 do trabalho, durante a realização dos ensaios de oxidação de saxitoxinas-----	45
Figura 4.9 – Esquema dos ensaios de oxidação para a Etapa 1 do planejamento-----	47
Figura 4.10 – Configuração de um ensaio de oxidação na Etapa 1 -----	47
Figura 4.11 – Planejamento dos ensaios de oxidação para a Etapa 2. -----	48

Figura 4.12 – Configuração dos ensaios realizados com água de estudo 2 na Etapa 3 -----	50
Figura 4.13 – Fluxograma dos ensaios de detecção de subprodutos da oxidação de saxitoxinas com cloro-----	52
Figura 4.14 – Configuração dos experimentos de toxicidade. -----	54
Figura 4.15 – Espectrofotômetro utilizado para medir cloro livre e cloro total-----	57
Figura 4.16 – Aparelho de CLAE para detecção de saxitoxinas-----	57
Figura 4.17 – Diagrama do sistema de CLAE com reator pós-coluna para a análise de saxitoxinas (Chen e Chon 2002, modificado). -----	59
Figura 4.18 – Cromatograma das amostras de padrões de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX). -----	60
Figura 4.19 – Cromatogramas no tempo zero (t = 0 hora) e ao final de 3 horas (t= 3 horas) da água de estudo 1 (AE1) -----	61
Figura 4.20 – Cromatógrafo a gás utilizado nas análises de subprodutos -----	62
Figura 4.21 - Cromatograma típico obtido na calibração de trialometanos, cloro hidrato, cloropicrinas, halocetonas e haloacetoneitrilas - ponto 3 (Apêndice E, Tabela E.1) -----	64
Figura 4.22 - Cromatograma típico de calibração de ácidos haloacéticos – ponto 7 (Apêndice E, Tabela E.2)-----	65
Figura 5.1 – Doses de cloro aplicadas e residuais de cloro livre e de cloro combinado em valores de pH 5,0 (a), 5,5 (b) e 6,0 (c) após um tempo de contato de 30 minutos.-----	68
Figura 5.2 - Concentrações iniciais e finais de saxitoxinas para diferentes doses de cloro e valores de pH 5,0 (a), 5,5 (b) e 6,0 (c) após um tempo de contato de 30 minutos -----	68
Figura 5.3 – Doses de cloro aplicadas, com respectivos residuais, em amostras de pH 4,0; 5,0; 6,0, 6,5; 7,0 e 8,0 após os tempos de contato de 30 e de 60 minutos.-----	72
Figura 5.4 – Doses de cloro aplicadas com respectivos residuais, em amostras de pH 8,5; 9,5; 10,0 e 11,0 após os tempos de contato de 30 e de 60 minutos. -----	73
Figura 5.5 - Concentrações iniciais e finais de saxitoxinas para diferentes doses de cloro e valores de pH 5,0, 7,0 e 9,0 nos tempos de contato de 30 e de 60 minutos. ---	75
Figura 5.6 – Cromatogramas de amostra sem cloro, amostra com cloro e padrão de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX)-----	80

Figura 5.7 – Amostras contendo saxitoxinas antes do contato do cloro (a) e após 30 minutos de tempo de contato (b), com aproximadamente 8 mg/L de cloro.-----	82
Figura 5.8 – Doses de cloro aplicadas à água de estudo 2 com valores de pH da água de 5,0; 7,0 e 9,0.-----	84
Figura 5.9 – Variação da concentração de neoSTX na AE2 em valores de pH ácido, neutro e básico para doses de cloro variando de 3,5 a 15 mg/L e ao longo do tempo de contato de 90 minutos.-----	85
Figura 5.10 – Variação da concentração de dcSTX na AE2 em valores de pH ácido, neutro e básico para doses de cloro variando de 3,5 a 15 mg/L e ao longo do tempo de contato de 90 minutos.-----	86
Figura 5.11 – Variação da concentração de STX na AE2 em valores de pH ácidos, neutro e básico para doses de cloro variando de 3,5 a 15 mg/L e ao longo do tempo de contato de 90 minutos.-----	87
Figura 5.12 – Estrutura molecular da neoSTX, evidenciando pontos adicionais de vulnerabilidade diante de um processo de oxidação (pontos 1 e 2)-----	93
Figura 5.13 - Estrutura molecular da STX, evidenciando ponto adicional de vulnerabilidade diante de um processo de oxidação (ponto 1)-----	93
Figura 5.14 – Estrutura molecular da dcSTX, onde nenhum ponto adicional de vulnerabilidade é apresentado, além dos já tradicionalmente existentes. -----	93
Figura 5.15 – Subprodutos resultantes do processo de oxidação de saxitoxinas com 8 mg/L de cloro, valores do pH da AE2 iguais a 5,0 e 9,0, temperatura de incubação de 25°C e tempo de contato de 24 horas -----	99
Figura 5.16 – Subprodutos resultantes do processo de oxidação de saxitoxinas com 13 mg/L de cloro, valores do pH da AE2 iguais a 5,0 e 9,0, temperatura de incubação de 25°C e tempo de contato de 24 horas -----	99

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 3.1 – Gêneros de cianobactérias que desenvolvem florações tóxicas (Sivonen e Jones,1999) -----	6
Tabela 3.2 – Exemplos de intoxicações de seres humanos com toxinas de cianobactérias (Carmichael, 1995) -----	8
Tabela 3.3 – Variantes de saxitoxinas já caracterizadas a partir de diferentes cepas de cianobactérias (Sivonen e Jones, 1999; Blanco <i>et al.</i> , 2003)-----	13
Tabela 3.4 – Processos de oxidação utilizados na remoção de diversos tipos de cianotoxinas-----	26
Tabela 3.4 – Processos de oxidação utilizados na remoção de diversos tipos de cianotoxinas (Continuação) -----	27
Tabela 3.5 - Principais subprodutos formados durante o processo de adição de um oxidante/desinfetante à água (Krasner,1999; Sanches <i>et al.</i> , 2003).-----	31
Tabela 3.6 – Efeitos do pH e do tempo de reação sobre a formação de subprodutos da desinfecção (Stevens et al., 1989)-----	34
Tabela 4.1 – Parâmetros avaliados, métodos e equipamentos utilizados no trabalho. -----	56
Tabela 4.2 – Condições que foram adotadas para a análise de saxitoxinas -----	58
Tabela 4.3 – Parâmetros e condições utilizadas na determinação de trialometas, cloro hidrato, cloropicrinas, haloacetonas e haloacetonitrilas-----	63
Tabela 4.4 – Parâmetros e condições utilizadas na determinação de ácidos haloacéticos -----	65
Tabela 5.1 – Condições de avaliação do ensaio de oxidação de saxitoxinas com cloro utilizando a água de estudo 1 (AE1) ajustada para os valores pH 5,0, 5,5 e 6,0 (Etapa 1)-----	66
Tabela 5.2 – Condições de realização dos ensaios de oxidação na AE1 utilizando cloro (Etapa 2)-----	71
Tabela 5.3 – Condições de realização dos ensaios de oxidação da AE2 utilizando cloro e valores de pH variando de 5,0 a 11,0 (Etapas 3 e 4) -----	83
Tabela 5.4 – Eficiências (%) de remoção de saxitoxinas após os tempos de contato de 30 e de 90 minutos em diferentes doses de cloro e valores de pH de 5,0 a 9,0. -----	90

Tabela 5.5 – Constante de velocidade (k) e coeficiente de ajuste linear ( $R^2$ ) das reações de ordem “n” para as variantes de saxitoxinas e doses de cloro variando de 3,5 a 15 mg/L----- 94

Tabela 5.5 – Constante de velocidade (k) e coeficiente de ajuste linear ( $R^2$ ) das reações de ordem “n” para as variantes de saxitoxinas e doses de cloro variando de 3,5 a 15 mg/L (Continuação)----- 95

Tabela 5.6 – Porcentagem de imobilidade da *D. similis* expostos a subprodutos da oxidação de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) com cloro durante o teste de toxicidade aguda. ----- 97

Tabela 5.7 – Porcentagem de imobilidade da *C. silvestrii* expostos a subprodutos da oxidação de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) com cloro durante o teste de toxicidade aguda. ----- 97

## LISTA DE SÍMBOLOS, NOMECLATURAS E ABREVIACÕES

AE.....	Água de estudo
AHA.....	Ácido haloacético
CH.....	Cloro Hidrato
CLAE.....	Cromatografia líquida de alta eficiência
cel .....	Células
C1 .....	C-toxina – análogo 1
C2 .....	C-toxina – análogo 2
COT .....	Carbono Orgânico Total
CONAMA.....	Conselho Nacional de Meio Ambiente
ClO <sub>2</sub> .....	Dióxido de cloro
dcSTX .....	Decarbamoilsaxitoxina
dcGTX .....	Decarbamoilgoniautoxina
DL <sub>50</sub> (i.p.) .....	Dose letal a 50% do grupo testado com injeção intraperitoneal
EPA.....	<i>Environmental Protection Agency</i>
ETA .....	Estação de Tratamento de Água
GTX .....	Goniautoxina
HAN.....	Haloacetona
HC.....	Haloacetona
HP.....	Halopirina
HOCl.....	Ácido Hipocloroso
i.p. ....	Intraperitoneal
kg.....	Quilograma
CLAE.....	cromatografia líquida de alta eficiência
LAA .....	Laboratório de Análise de Águas
M.....	Molar
MS .....	Ministério da Saúde
MON.....	Molécula Orgânica Natural
MOE.....	Matéria Orgânica Extracelular
neoSTX.....	Neosaxitoxina
ND.....	Não Detectado
nm .....	Nanômetro

OMS .....	Organização Mundial de Saúde
pH .....	Potencial Hidrogeniônico
PSP.....	Paralytic Shellfish Poison
POA.....	Processo Oxidativo Avançado
rpm.....	Rotação por Minuto
SPD.....	Subproduto da Desinfecção
STX .....	Saxitoxina
THM.....	Trihalometano
UFRJ.....	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UnB .....	Universidade de Brasília
USEPA.....	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
uT .....	Unidade de Turbidez
UV.....	Ultra Violeta
µm.....	Micrômetro
µg/L.....	Micrograma por litro
°C .....	Graus Celsius
VMP.....	Valor Máximo Permissível

# 1 – INTRODUÇÃO

O crescimento populacional e a intensa produção agrícola e industrial são fatores que favorecem o aporte de nutrientes aos corpos hídricos. Como consequência, as águas se tornam propícias à proliferação de algas e de cianobactérias.

Embora o enriquecimento de corpos de água com nutrientes tenha sido reconhecido como um fator preponderante para o crescimento de algas e de cianobactérias desde os anos de 1950, somente há pouco tempo as toxinas de cianobactérias (cianotoxinas) foram consideradas como um problema para a saúde humana.

A presença de cianotoxinas em águas para abastecimento humano já causou mortes no Brasil. O incidente mais divulgado e cientificamente comprovado aconteceu em Caruaru, Estado de Pernambuco, quando morreram aproximadamente 70 pacientes renais crônicos em uma clínica de hemodiálise. Entretanto, em 1993, evidências epidemiológicas apontaram a relação entre a morte de 88 pessoas, entre 2000 intoxicadas, em março e abril de 1988, e o consumo de água do reservatório de Itaparica, Estado da Bahia.

Estudos indicam que o tratamento convencional de água, constituído por coagulação, floculação, sedimentação e filtração rápida, não remove eficientemente as cianotoxinas. Dessa forma, os processos convencionais de tratamento de água são utilizados com a intenção de remover as células de cianobactérias antes que ocorra a lise celular e a liberação das cianotoxinas. Essa condição, porém, não elimina totalmente o problema, já que os procedimentos operacionais nas ETAs ou nos mananciais podem promover a liberação de toxinas, reforçando a necessidade de tratamentos alternativos ou complementares aos já existentes, para garantir a eficiente remoção das cianotoxinas.

Uma alternativa que se apresenta é a oxidação, utilizando-se, para isso, métodos químicos e físicos. Dentre os oxidantes químicos têm-se o cloro, o dióxido de cloro, as cloraminas, o permanganato de potássio, o ozônio e os processos oxidativos avançados (POAs). Quanto aos métodos físicos, pode-se citar a radiação ultravioleta e processos combinados (físico e químico). Contudo, mesmo diante de uma variedade de produtos que podem promover a

oxidação, há poucos estudos aprofundados sobre o efeito dos agentes oxidantes sobre as diferentes cianotoxinas, particularmente sobre as saxitoxinas.

Trabalhos envolvendo a utilização do cloro para a oxidação de saxitoxinas ainda são pouco relatados pela literatura especializada. Grande parte dos trabalhos ainda estão voltados para o estudo das microcistinas, toxina mais comumente encontrada nos mananciais em diferentes partes do mundo. Entretanto, os resultados obtidos com as microcistinas não podem ser estendidos para as demais cianotoxinas, particularmente para as saxitoxinas, pois se tratam de substâncias com estruturas químicas diferentes.

Há mais de 20 análogos de saxitoxinas identificadas, que diferem entre si tanto em termos de estrutura química como em termos de toxicidade. Esses análogos podem sofrer transformações devido a fatos diferentes, resultando em substâncias de menor ou maior toxicidade.

Os trabalhos que estudaram a oxidação de algumas variantes de saxitoxinas, com o cloro, demonstraram que a oxidação foi possível sob diferentes condições operacionais (pH e residual de cloro). Entretanto, esses estudos não se aprofundaram na avaliação da influência da dose de cloro e do valor do pH sobre a cinética do processo, além de não avaliarem a formação de subprodutos da oxidação com o cloro.

Este trabalho foi, portanto, conduzido com o objetivo de melhor entender o processo de oxidação das saxitoxinas, focando as variantes neoSTX, dcSTX e STX, e avaliar a formação de subprodutos da oxidação. A hipótese que balizou esse trabalho foi que a oxidação das saxitoxinas pode ocorrer no tanque de contato da estação de tratamento de água de forma concomitante com a pós-desinfecção com o cloro, porém com o risco de formação de subprodutos.

## **2 – OBJETIVOS**

### **2.1 – OBJETIVO GERAL**

Avaliar a remoção de saxitoxinas dissolvidas, neoSTX, dcSTX e STX, por meio da oxidação com cloro e a formação de subprodutos.

### **2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Os objetivos específicos foram:

- a) Estudar a influência da adoção de diferentes valores de pH na remoção de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) por meio de oxidação com cloro.
- b) Avaliar a influência de produtos da lise celular na oxidação de saxitoxinas.
- c) Avaliar a cinética da oxidação de algumas saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) com cloro em amostras com diferentes valores de pH.
- d) Avaliar a formação de trialometanos, ácidos haloacéticos e outros subprodutos no processo de oxidação de saxitoxinas e, de forma preliminar, a toxicidade desses subprodutos por meio de bioensaio com *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*.

## **3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1 – CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS**

#### **3.1.1 – Aspectos Gerais**

As cianobactérias são microrganismos que reúnem características comuns de bactérias e algas, pois apresentam células procariontes (bactérias sem membrana nuclear) e um sistema fotossintetizante (vegetais eucariontes).

A maioria das cianobactérias são aeróbias fotoautotróficas. A fotossíntese é o modo principal de energia para o metabolismo desses seres, contudo, no meio ambiente natural, é sabido que algumas espécies são capazes de sobreviver longos períodos em completa escuridão. Além do mais, certas cianobactérias mostram uma capacidade distinta para nutrição heterotrófica (Bartram *et al.*, 1999).

As cianobactérias possuem a capacidade de produzir toxinas (cianotoxinas) em larga escala, liberadas como metabólitos secundários. Duy *et al.* (2000) informam que em estudos sistemáticos, cerca de 25% a 70% das florações de cianobactérias mostraram ser potencialmente tóxicas, entretanto, não existe um método simples que distinga o grau de toxicidade desses seres, por isso, é preferível a prevenção de qualquer floração de cianobactérias para o controle da produção de cianotoxinas nas águas de abastecimento.

O principal mecanismo de proliferação de cianobactérias nos reservatórios de água é a eutrofização artificial, que promove mudanças na qualidade do curso da água, tais como: redução de oxigênio dissolvido, perda da harmonia paisagística, aumento do custo de tratamento e morte extensiva de peixes.

Azevedo (1998) relata que as florações de algas caracterizam-se pela intensa multiplicação e acumulação desses microrganismos na superfície da água, formando uma densa camada de células com vários centímetros de profundidade, com consequências relacionadas com a

saúde pública. Na Figura 3.1 é apresentado um curso hídrico com ocorrência de floração de cianobactérias.



Figura 3.1 – Vista panorâmica de uma lagoa com floração de cianobactérias (Azevedo, 1998)

Para Bartram *et al.* (1999), o fósforo é geralmente o fator limitante das ocorrências de florações de cianobactérias nas águas em muitas regiões do mundo, embora os compostos de nitrogênio sejam muitas vezes relevantes na determinação da quantidade de cianobactérias presentes. Contudo, ao contrário das algas planctônicas, algumas cianobactérias são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico. A falta de nitrato ou amônia, portanto, favorece o domínio dessas espécies. Assim, a disponibilidade de nitrato ou amônia é um fator importante no momento de determinar que espécie de cianobactéria torna-se dominante.

Sivonen e Jones (1999) já relatavam que ao menos 46 espécies de cianobactérias demonstraram efeitos tóxicos. A Tabela 3.1 menciona os gêneros de cianobactérias de águas continentais (doces e salobras) catalogadas em florações tóxicas com maior frequência em nível mundial. Destacam-se os gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Planktothrix*, *Cylindrospermopsis* e *Nodularia*, por sua ampla distribuição e pelos efeitos sobre outros organismos, devido à presença de toxinas.

Tabela 3.1 – Gêneros de cianobactérias que desenvolvem florações tóxicas (Sivonen e Jones,1999)

<b>Gêneros de cianobactérias potencialmente tóxicas</b>	
<i>Anabaena</i>	<i>Microcystis</i>
<i>Anabaenopsis</i>	<i>Nodularia</i>
<i>Aphanizomenon</i>	<i>Nostoc</i>
<i>Aphanocapsa</i>	<i>Phormidium</i>
<i>Coelosphaerium</i>	<i>Planktothrix</i>
<i>Cylindrospermopsis</i>	<i>Pseudanabaena</i>
<i>Gloeotrichia</i>	<i>Synechocystis</i>
<i>Gomphosphaeria</i>	<i>Synechococcus</i>

As cianobactérias podem apresentar forma unicelular, como nos gêneros *Synechococcus* e *Aphanothece*, unicelulares coloniais, como *Microcystis*, *Gomphospheria*, *Merispmopedium* ou apresentarem as células organizadas em uma unidade em série, os filamentos, como *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Nostoc* (Sivonen e Jones,1999).

Analogamente, as populações de cianobactérias podem ser dominadas por uma única espécie ou ser composta por uma variedade de espécies, algumas das quais podem não ser tóxicas, conforme já destacado. Mesmo dentro de uma floração de uma única espécie é possível que ocorra a geração de substâncias com tendências tóxicas e não tóxicas (Sivonen e Jones,1999).

Algumas variedades são muito mais tóxicas do que outras, às vezes por mais de três ordens de magnitude. Isso pode significar que uma variedade altamente tóxica, mesmo quando ocorrer em quantidade menor do que as variedades não tóxicas, pode resultar em um efluente tóxico (Bartram *et al.*, 1999). A Figura 3.2 mostra algumas representações das principais espécies nocivas de cianobactérias que podem estar em reservatórios próximos aos centros urbanos.

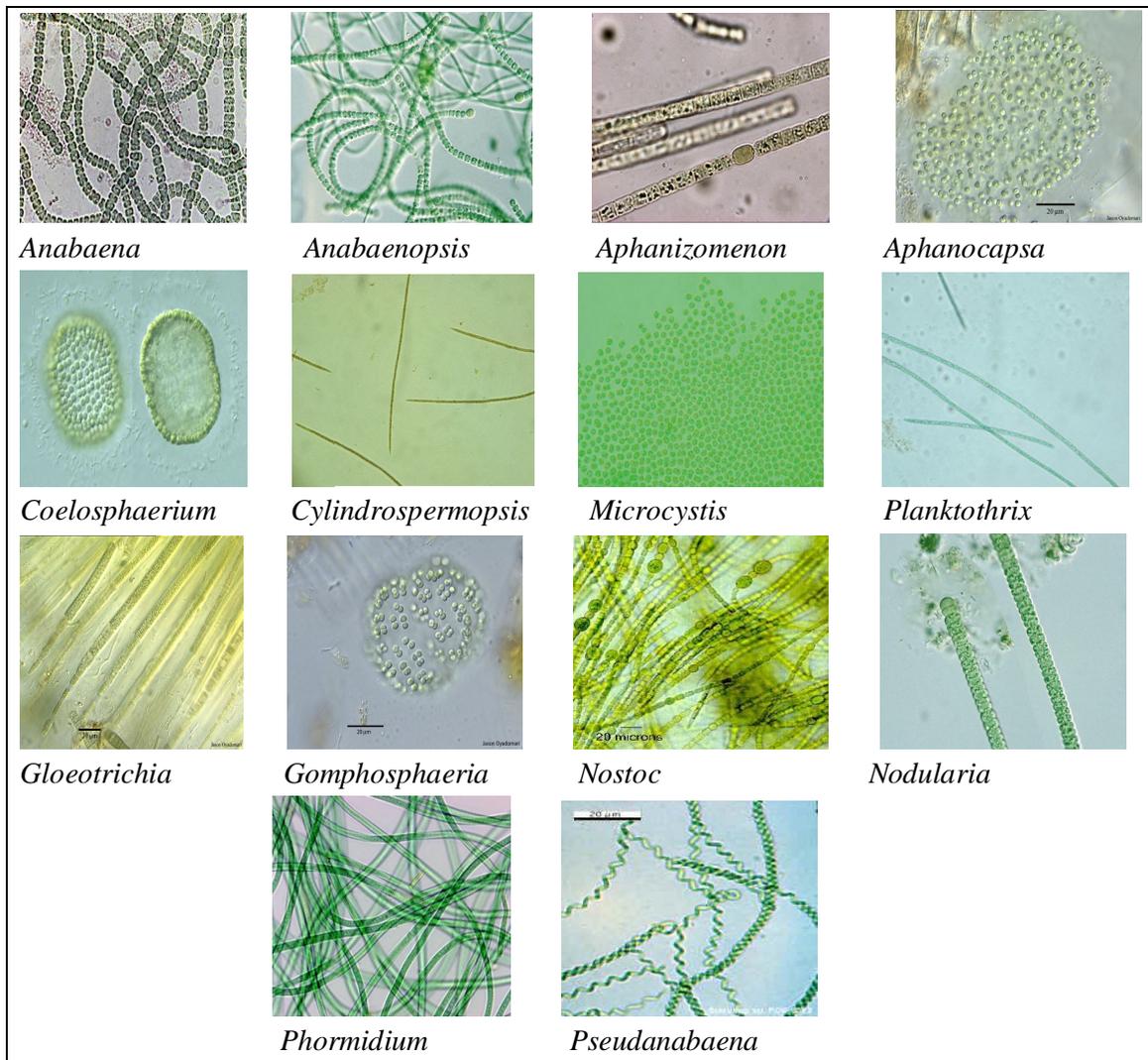


Figura 3.2 – Gêneros de cianobactérias potencialmente nocivas (Figura retirada de [www.cyanobacteria-platform.com/cyanobacteria.html](http://www.cyanobacteria-platform.com/cyanobacteria.html))

Diversas fontes de informação relatam os danos causados à saúde associados à presença de cianobactérias tóxicas em cursos de água (lagos e rios). Existem numerosos casos de intoxicação letal de animais por consumir água com a presença maciça de cianobactérias tóxicas. Codd *et al.* (1989) relatam que o primeiro caso documentado de uma intoxicação letal em bovinos, por consumir água de um lago altamente infestado com cianobactérias, foi publicado no século XIX, e desde então são reportados casos de contaminação de animais, incluindo ovelhas, cavalos, porcos, cães, peixes, roedores, anfíbios, aves aquáticas, morcegos, zebras e até rinocerontes.

Quanto aos efeitos causados em seres humanos, as informações oficiais têm se limitado a pacientes submetidos a tratamento de hemodiálise; entretanto, há relatos de danos à saúde a

partir de numerosos casos esporádicos de irritações de pele e/ou das membranas mucosas, e também a partir de casos documentados de enfermidades após a ingestão de água, assim como a ingestão acidental ou aspiração de espuma contendo cianobactérias (Carmichael, 1995). A Tabela 3.2 mostra alguns casos documentados de intoxicações por cianobactérias ocorridos desde a década de 1930 até a década de 1990.

Tabela 3.2 – Exemplos de intoxicações de seres humanos com toxinas de cianobactérias (Carmichael, 1995)

Ano	Casos atribuídos a cianotoxinas em água potável
1931	Um florescimento maciço de <i>Microcystis</i> nos rios Ohio e Potomac (ambos os rios localizados nos Estados Unidos da América) afetou entre 5.000 e 8.000 pessoas. O tratamento da água potável mediante sedimentação, filtração e cloração não foi suficiente para oxidar as toxinas.
1975	Em Washington DC, o florescimento de cianobactérias, em um reservatório de água potável, produziu um ataque endotóxico em 23 pacientes de diálise.
1979	Austrália: em Palm Island, o tratamento com sulfato de cobre em um reservatório de água potável, que apresentava um florescimento de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , produziu a liberação de toxinas na água, como consequência, ocorreu a hospitalização de 141 pessoas que se abasteceram desse reservatório.
1985	EEUU: Carmichael (1994) reuniu estudos de casos sobre: náuseas, vômitos, diarreia, febre, infecções nos olhos, ouvidos e garganta depois da exposição à presença maciça de cianobactérias.
1989	Inglaterra: dez, de vinte, soldados adoeceram depois de nadarem e praticarem canoagem em águas com florescimento de <i>Microcystis spp.</i> ; os soldados enfermos desenvolveram uma pneumonia severa atribuída à inalação da cianotoxinas e tiveram que ser hospitalizados, ingressando na unidade de cuidados intensivos.
1993	China: a incidência de câncer no fígado foi relacionada com fontes de água, sendo consideravelmente maior em populações que usaram águas superficiais infectadas com ocorrências de cianobactérias do que em águas subterrâneas.
1993	Itaparica – Brasil: evidências epidemiológicas indicaram a relação entre a morte de 88 pessoas, entre 2000 intoxicadas, e o consumo de água do reservatório de Itaparica, Estado da Bahia.
1996	Caruaru – Brasil: de um total de 130 pacientes expostos a microcistinas por meio da água usada em diálise, morreram aproximadamente 70 pessoas. Ao menos 44 destas vítimas mostraram os típicos sintomas relacionados com as microcistinas, atualmente denominada “Síndrome de Caruaru”, e o conteúdo de microcistinas no fígado correspondia a de animais de laboratórios que haviam recebido uma dose letal de microcistina.

A partir dos casos relatados por Carmichael (1995) sobre intoxicações com cianotoxinas, vários outros acontecimentos foram reportados. Atualmente, é cada vez mais freqüente os meios de comunicação noticiarem a interdição de determinado corpo d'água devido à presença de grande quantidade de toxinas oriundas de cianobactérias. Os sintomas reportados incluem dor abdominal, náuseas, vômitos, diarreia, dor de garganta, tosse seca, dor de cabeça, bolhas na boca, pneumonia atípica e elevado número de enzimas hepáticas, febre, enjoos, cansaço e irritações na pele e nos olhos. Esses sintomas podem ter diversas causas e incluir várias classes de toxinas e gêneros de cianobactérias.

Diante dos casos reportados, uma situação que pode colocar em risco a saúde da população é o abastecimento de água a partir de reservatórios com cianobactérias. Nesse caso, o tratamento convencional de água pode apenas evitar que células de cianobactérias cheguem à rede de abastecimento, não evitando a liberação das toxinas para a água que irá ser consumida. Assim, ainda que os peptídeos tóxicos (por exemplo, as microcistinas) encontrem-se habitualmente no interior das células, podendo ser eliminadas, em grande parte, por filtração, os alcalóides tóxicos, como a cilindrospermopsina e as neurotoxinas, caso sejam liberadas na água, podem atravessar os sistemas de filtração.

### **3.1.2 – Toxinas Produzidas pelas Cianobactérias**

Vários gêneros e espécies de cianobactérias que formam florações produzem toxinas. Evidências dos efeitos tóxicos das cianobactérias em animais foram relatadas por Codd *et al.* (1989), sendo que algumas dessas são caracterizadas por sua ação rápida, causando a morte de mamíferos por parada respiratória após poucos minutos de exposição. Essas toxinas são identificadas como alcalóides ou organofosforados neurotóxicos. Outras atuam menos rapidamente e são identificadas como peptídeos ou alcalóides hepatotóxicos.

Segundo Carmichael (1994), as toxinas produzidas são divididas, basicamente, em dois grupos: as citotoxinas e as biotoxinas.

As citotoxinas atuam sobre as células individuais e as biotoxinas atuam sobre organismos multicelulares. Nesse último grupo, podem ser encontradas as neurotoxinas, as hepatotoxinas e as toxinas irritantes ao contato (dermatotoxinas), conforme o efeito que produzem nos mamíferos. Esse grupo é, portanto, o de maior interesse sob o ponto de vista da saúde pública.

As hepatotoxinas atuam sobre o citoesqueleto, provocando a deformação dos hepatócitos e consequentes hemorragias intra-hepáticas, o que leva a um substancial incremento no peso do fígado. Nesse grupo de toxinas podem ser encontradas as nodularinas, que podem ser produzidas pelo gênero *Nodularia*, e as microcistinas, que podem ser produzidas pelos gêneros *Microcystis*, *Anabaena* e *Nostoc* (Sivonen *et al.*, 1990).

Apesar das intoxicações mais frequentes ocorrerem devido às hepatotoxinas, o objeto de estudo deste trabalho são as neurotoxinas, particularmente as saxitoxinas, razão pela qual essas toxinas são apresentadas com mais detalhes.

As neurotoxinas atuam sobre o sistema nervoso central e têm efeito muito rápido, entre alguns minutos a poucas horas, provocando a morte de animais intoxicados por parada respiratória. Elas são produzidas por espécies e cepas incluídas nos seguintes gêneros: *Anabaena*, *Aphanizomenom*, *Lyngbya*, *Oscillatoria* e *Cylindrospermopsis*. Esses gêneros de cianobactérias podem produzir vários tipos de neurotoxinas, conhecidas como: anotoxina-a, homoanotoxina-a, anotoxina-a(s), saxitoxinas e neosaxitoxinas (Carmichael e Fujiki, 1990).

A anotoxina-a simula o efeito da acetilcolina, em nível das transmissões nervosas, ligando-se aos receptores neurotransmissores das células musculares. Como não é degradada pela acetilcolinesterase, o estímulo mantém-se indefinidamente, provocando uma sobreestimulação, levando o músculo a uma situação de tétano, seguido de fadiga e paralisia. Quando isso ocorre nos músculos respiratórios, acontece a morte por asfixia. Essa toxina foi a primeira substância de cianobactéria a ser quimicamente e funcionalmente definida. Ela é produzida por espécies e cepas dos seguintes gêneros: *Anabaena*, *Aphanizomenom* e *Oscillatoria* (Carmichael, 1994).

De acordo com Carmichael (1992) e Falconer (1996), a dose letal em 50% (DL<sub>50</sub>) por injeção intraperitoneal (ip) em camundongos, para a anotoxina-a purificada, é de 200 µg/kg de peso corpóreo, com um tempo de sobrevivência de 1 a 20 minutos.

A homoanotoxina-a foi isolada pela primeira vez de uma cultura de *Planktothrix* (*Oscillatoria*); posteriormente, foi testada a atividade do extrato desta cepa na transmissão neuromuscular, obtendo-se como resultado que esta cianotoxina tem como alvo a junção

neuromuscular, agindo especificamente no receptor nicotínico pós-sináptico, diminuindo a sensibilidade deste para a acetilcolina. Assim, o mecanismo de toxicidade da homoanatoxina-*a* é semelhante ao da anatoxina-*a*, ou seja, age como um potente agente bloqueador neuromuscular (Rodríguez *et al.*, 2006).

A anotoxina-*a*(*s*) inibe a acetilcolinesterase, provocando um efeito semelhante à anatoxina-*a* e atua de forma análoga aos organofosfatos artificiais (Carmichael, 1994). No sistema nervoso central, a acetilcolinesterase desempenha um papel na função das junções neuromusculares periféricas. A DL<sub>50</sub> (ip) em camundongos é de 20 µg/kg de peso corpóreo, portanto, dez vezes mais potente que a anatoxina-*a*, porém não há registro de intoxicação humana por esta toxina. Devido à pouca ocorrência desse tipo de neurotoxina, ainda não foi estabelecido um limite máximo aceitável para consumo oral humano (Carmichael, 1994; Falconer, 1996). Entretanto, no Brasil já foi confirmada a inibição de acetilcolinesterase por florações de *Anabaena spiroides*, no Rio Grande do Sul (Monserrat *et al.*, 2001).

Rodríguez *et al.* (2006) lembram que o “s” do nome da anatoxina-*a*(*s*) deriva da excessiva salivagem viscosa observada em camundongos tratados com essa cianotoxina. Por essa razão, a letra “s” de salivagem foi adicionada ao nome do composto. Essa toxina é produzida por algumas cepas de *Anabaena flos-aquae* e *Anabaena lemmermannii*.

A saxitoxina (C<sub>10</sub>H<sub>17</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub>) é o nome genérico que se tem adotado para um grupo de neurotoxinas conhecidas como “venenos paralisantes de mariscos”, ou PSP (*Paralytic Shellfish Poisoning*) que foram primeiramente isoladas de dinoflagelados marinhos, responsáveis pela ocorrência de marés vermelhas (Bittencourt-Oliveira e Molica, 2003). A Figura 3.3 mostra as estruturas químicas das neurotoxinas já identificadas e a Tabela 3.3 mostra as variantes de saxitoxinas em função da substituição dos radicais R1 a R5 na estrutura geral deste grupo (Figura 3.3D).

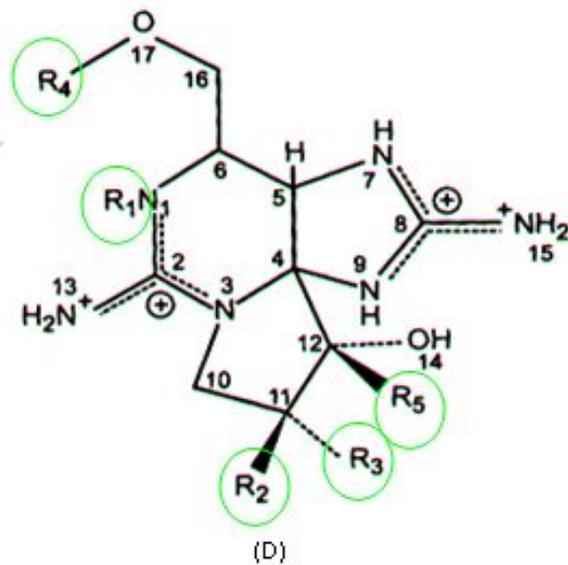
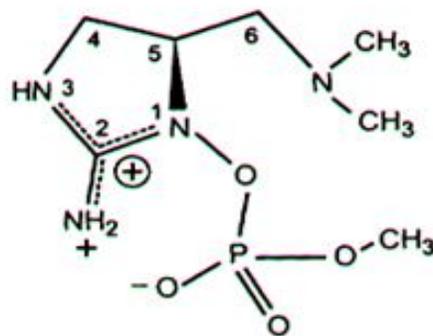
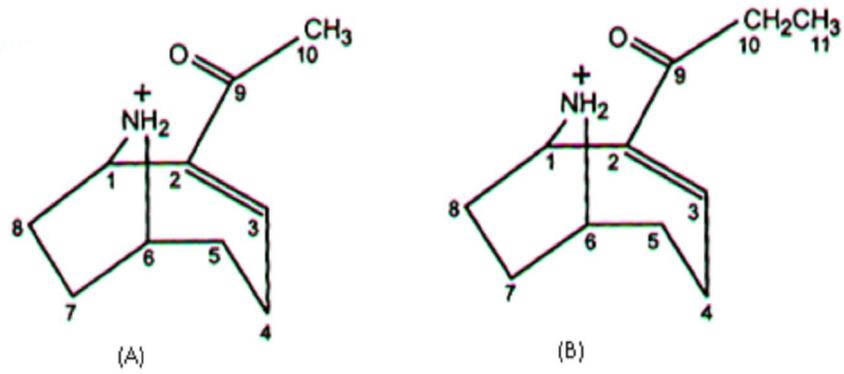


Figura 3.3 - Estruturas químicas das neurotoxinas: (A) anatoxina-a, (B) homoanatoxina-a, (C) anatoxina-a(s) e (D) estrutura geral das saxitoxinas (Chorus e Bartram, 1999).

Tabela 3.3 – Variantes de saxitoxinas já caracterizadas a partir de diferentes cepas de cianobactérias (Sivonen e Jones, 1999; Blanco *et al.*, 2003)

Nome da Toxina	Grupos químicos variáveis nas saxitoxinas				
	R1	R2	R3	R4	R5
STX	H	H	H	CONH <sub>2</sub>	OH
GTX2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONH <sub>2</sub>	OH
GTX3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONH <sub>2</sub>	OH
GTX5	H	H	H	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH
C1	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH
C2	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH
C3	OH	OSO <sub>3</sub>	H	COOHNOSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH
C4	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	COOHNOSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH
NeoSTX	OH	H	H	CONH <sub>2</sub>	OH
dcneoSTX	OH	H	H	OH	OH
GTX1	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CONH <sub>2</sub>	OH
GTX4	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	CONH <sub>2</sub>	OH
GTX6	OH	H	H	CONHSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH
dcSTX	H	H	H	H	OH
dcGTX1	OH	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	OH	OH
dcGTX2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	OH
dcGTX3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	H	OH
dcGTX4	OH	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OH	OH
LWTX1	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	COCH <sub>3</sub>	H
LWTX2	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	COCH <sub>3</sub>	OH
LWTX3	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	COCH <sub>3</sub>	OH
LWTX4	H	H	H	H	H
LWTX5	H	H	H	COCH <sub>3</sub>	OH
LWTX6	H	H	H	COCH <sub>3</sub>	H

Legenda:

STX: saxitoxina

GTX: goniautoxinas

C: C-toxinas

NeoSTX: neosaxitoxina

dcSTX: decarbamoilsaxitoxinas

dcGTX: decarbamoilgoniautoxinas

LWTX: toxinas de *Lyngbya wollei*

As saxitoxinas atuam nos canais de sódio, nos axônios, impedindo o fluxo de íons. A transmissão nervosa é interrompida e, por conseguinte, ocorre a liberação de acetilcolina. Os músculos sofrem paralisia por falta de estímulo nervoso, conduzindo também à morte por asfixia (Carmichael, 1994). A Figura 3.4 ilustra a atuação das saxitoxinas no canal de sódio.

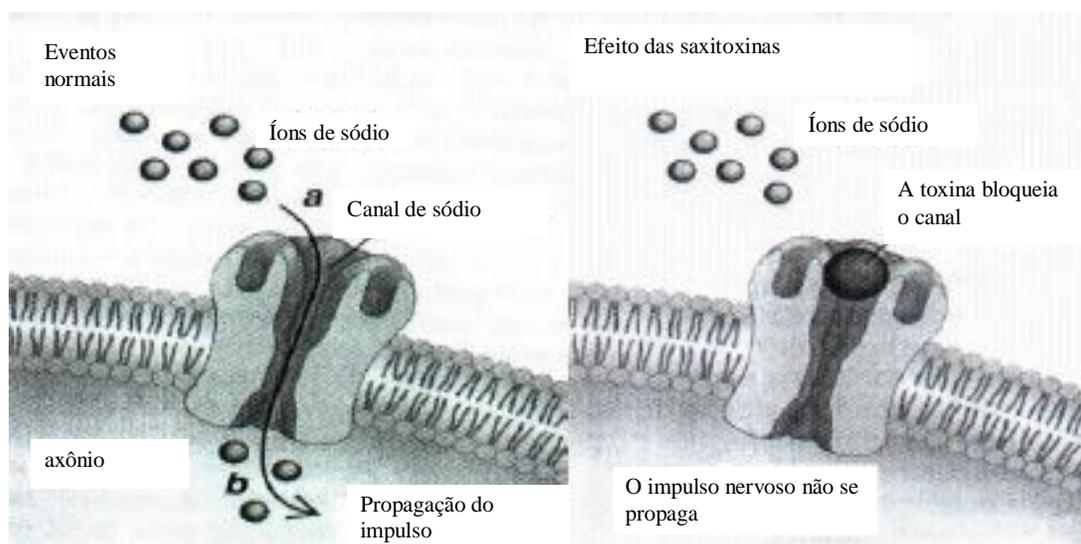


Figura 3.4 – Efeito da atuação das saxitoxinas no canal de sódio (Carmichael, 1994)

Segundo Sivonen e Jones (1999), das toxinas até então isoladas, a saxitoxina é a mais potente. A  $DL_{50}$  (ip) em camundongos para saxitoxina purificada é de  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corpóreo, enquanto que por consumo oral a  $DL_{50}$  é de aproximadamente de  $263 \mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corpóreo.

Os sinais clínicos de intoxicação humana por saxitoxina (STX) incluem tontura, adormecimento da boca e de extremidades, fraqueza muscular, náusea, vômito, sede e taquicardia. Os sintomas podem começar 5 minutos após a ingestão e a morte pode ocorrer entre 2 a 12 horas. Em casos de intoxicação com dose não letal, geralmente os sintomas desaparecem de 1 a 6 dias (Carmichael, 1994).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera que não há dados suficientes para o estabelecimento de um limite de concentração máxima aceitável para as saxitoxinas em água potável (Kuiper-Goodman *et al.*, 1999). Entretanto, uma análise dos dados de eventos de intoxicações humanas demonstrou que a maioria dos casos esteve associada ao consumo de aproximadamente  $200 \mu\text{g}$  de saxitoxinas (STX) por pessoa.

Baseado nesses dados e considerando 60 kg como peso corpóreo, 2 litros de água como consumo diário e fatores de incertezas para variações entre espécies distintas e entre organismos da mesma espécie, Fitzgerald *et al.*(1999) propuseram 3,0 µg/L como o limite máximo aceitável de saxitoxinas em água para consumo humano. Esse limite foi adotado pelas autoridades brasileiras na Portaria MS nº 518/2004.

### 3.2 – TRANSFORMAÇÃO DAS VARIANTES DE SAXITOXINAS

As saxitoxinas e seus análogos tetraidropurinas hidrossolúveis são um grupo de toxinas alcalóides. Essas toxinas apresentam mais de 20 análogos naturais divididos em quatro grupos: (i) N-sulfocarbamoil: C1, C2, C3, C4, GTX5 e GTX6; (ii) carbamato: as goniautoxinas (GTX1, GTX2, GTX3, GTX4), STX e a neoSTX; (iii) decarbamoil: dcGTX1, dcGTX2, dcGTX3, dcGTX4, dcSTX e dcneoSTX e (iv) desoxicarbamoil: doSTX, doneoSTX, doGTX1-doGTX4 (sic Oga *et al.*, 2008). Um aspecto importante das saxitoxinas é o fato de que, diferentemente das microcistinas, há transformações entre análogos ou variantes.

Os alcalóides, em geral, são substâncias tóxicas formadas por compostos heterocíclicos nitrogenados, de baixo peso molecular, sintetizados por plantas e bactérias. Sua estabilidade é muito variável e, em muitas ocasiões, sofrem transformações espontâneas que dão lugar a produtos com maior ou menor potencialidade tóxica em relação ao produto de origem. No caso do grupo alcalóide carbamato, a toxicidade varia e, como já dito, a saxitoxina é a mais potente (Sivonen e Jones, 1999).

Estudos realizados por Jones e Negri (1997), em um local escuro com temperatura ambiente, indicaram que as saxitoxinas sofrem uma série de reações lentas de hidrólise. As C-toxinas degradam-se, formando as goniautoxinas (GTX); enquanto que estas, junto com as saxitoxinas (STX) e a dcGTX, transformam-se em um produto ainda não identificado. O tempo médio das reações de degradação dura em torno de 1 a 10 semanas, necessitando mais de 3 meses para ocorrer mais de 90% da degradação das saxitoxinas.

Como as goniautoxinas são mais tóxicas que a C-toxinas, por um fator de 10 a 100, a toxicidade irá inicialmente aumentar, durante as primeiras semanas, período onde ocorrerá a transformação de C-toxinas em GTX e, somente decairá após 2 a 3 meses.

Shimizu (1988) *apud* Indrasena e Gill (1999) indica que a STX é muito estável em soluções ácidas, enquanto que a neoSTX não é, tendendo a decompor-se por segmentação redutiva no grupo N-hidroxila (N-OH) para dar STX. Um processo redutivo cria um ânion doador que transfere o excesso de carga para o poluente e, posteriormente, ele pode ser removido por oxidação.

Gárate-Lizárraga *et al.* (2004) reforçam que a STX e a dcSTX são os produtos finais detectáveis das várias C-toxinas e goniautoxinas (GTX), que sofrem ação química, segmentação redutiva (dessulfatação e deshidroxilação) e hidrólise (decarbamoilação e dessulfatação).

Para Kwong *et al.* (2006), a conversão da toxina pode ser conseguida por reações enzimáticas ou não-enzimáticas, incluindo a dessulfatação, a oxidação, a redução e a epimerização, alterando, assim, a toxicidade total das toxinas.

Segundo Vale (2006), as propriedades químicas das toxinas permitem algumas reações espontâneas. Um exemplo é a epimerização, que ocorre espontaneamente até atingir um equilíbrio nos análogos que tem um grupo orto-sulfato na posição 11. As toxinas que têm um grupo N-sulfocarbamoil na posição 17 são convertidas nos seus correspondentes análogos carbamato (por exemplo: GTX5 é parcialmente convertida em STX) quando em meio ácido forte, como ocorre na preparação dos tecidos de moluscos bivalves para análise por bioensaio. A transformação química no molusco bivalve pode ocorrer devido à presença de redutores naturais, como glutatona e cisteína, causando a eliminação do grupo N-OH, na posição 1, ou a eliminação do grupo orto-sulfato na posição 11. O molusco bivalve pode conter uma carbamoilase que catalisa a hidrólise das metades carbamato ou N-sulfocarbamoil, transformando as toxinas desses dois grupos nas do grupo decarbamoil. A Figura 3.5 mostra a estrutura da STX com os grupos N-OH (posição 1) e orto-sulfato nas posições 11 e 17, locais onde possivelmente tem início o processo de transformação das saxitoxinas.

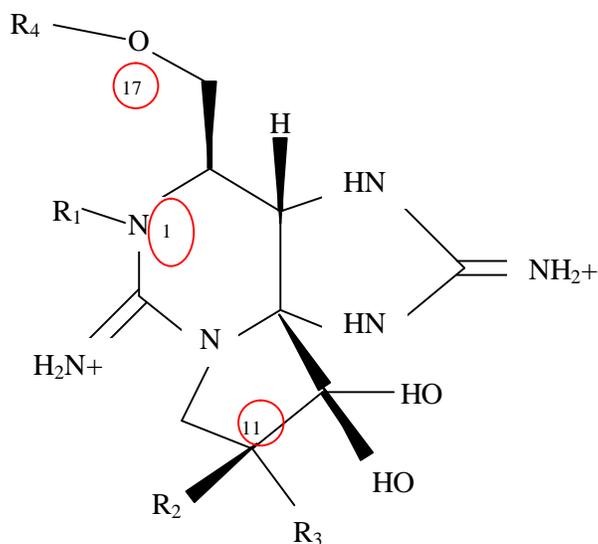


Figura 3.5 – Estrutura da molécula de STX com as posições dos grupos N-OH (posição 1) e orto-sulfato nas posições 11 e 17, locais onde possivelmente tem início o processo de transformação das saxitoxinas (Vale, 2006).

As constatações feitas por Vale (2006) foram confirmadas por Tao e Tian-Jiu (2008). Esses autores utilizaram uma solução de ácido clorídrico (HCl), 0,04 – 0,25 M, e observaram que os níveis de C1, C2 e GTX5 diminuíram drasticamente com o aumento da concentração de HCl. Quando em contato com um ácido forte, C1, C2, C3, C4 e GTX5 foram transformadas em GTX2, GTX3, GTX1, GTX4 e STX, respectivamente. A extração com 0,25 – 1,0 M de HCl mostraram que o conteúdo de C1 declinou exponencialmente de 141,0 µg/L para 33,0 µg/L. Entretanto, os níveis de GTX2 e de GTX3 aumentaram quando a concentração de HCl excedeu 0,5 e 0,4 M, respectivamente, indicando que o aumento dessas toxinas não coincide completamente com a diminuição de C1 e de C2.

Observação *in vitro* da glândula digestiva de moluscos mostrou que depois de 15 horas de incubação, a toxina N-sulfocarbamoil GTX5 foi inteiramente convertida para dcSTX, cerca da metade da STX e da neoSTX foram convertidas nos seus análogos do grupo decarbamoil, enquanto que a GTX2 e a GTX3 mostraram somente 25% de conversão (Artigas *et al.*, 2007).

Fast *et al.* (2006) realizaram estudo de transformação *in vitro* de saxitoxinas, com incubação de mistura de neoSTX e de STX. O resultado mostrou que houve 50% de decaimento tanto na concentração de neoSTX quanto de STX, acompanhado de formação de dcSTX. Isso indica a ocorrência do fenômeno da biotransformação durante o período de incubação de 24 horas.

O grupo N-sulfato pode ser removido por métodos químicos, assim as toxinas N-sulfocarbamoil são transformadas nos análogos carbamato. O grupo sulfato pode ser também eliminado da posição C-11 do 11-ésteres sulfato para produzir neoSTX, STX ou 11-OH-STX dos derivados de GTX. Essas técnicas de conversão envolvem a manipulação da temperatura, do pH e de outras condições de reação, conduzindo à remoção do sulfato pela hidrólise ou pela segmentação redutiva (Fast *et al.*, 2006).

Jaime *et al.* (2007) observaram, por meio de estudo *in vitro* de saxitoxinas, que as toxinas N-sulfocarbamoil foram convertidas em toxinas do grupo carbamato (GTX5 para STX, GTX6 para neoSTX, C1 para GTX2, C2 para GTX3, C3 para GTX1, C4 para GTX4) pelo tratamento com 0,1 N de ácido clorídrico. Para esses autores, as transformações redutivas das toxinas são caracterizadas por uma diminuição no grupo da toxina N-OH (GTX1-4, neoSTX) que é acompanhado de um aumento no grupo das toxinas N-H (GTX2-3, STX) assim como pela eliminação do grupo sulfato na posição C11 (GTX1-4 a neo, GTX2-3 a STX). Ambas as reações podem ser influenciadas por redutores de ocorrência naturais ou por qualquer outra ocorrência externa.

As toxinas do grupo N-sulfocarbamoil (C1, C2, C3, C4, GTX5 e GTX6) podem ser convertidas nos análogos do grupo carbamato (GTX2, GTX3, GTX1, GTX4, STX e neoSTX) em solução de pH  $\leq 7,0$  (Jaime *et al.*, 2007).

Alfonso *et al.* (1994), fazendo um estudo comparativo da estabilidade da STX e da neoSTX em soluções ácidas e em amostras liofilizadas, observaram que a neoSTX é instável, e este fato poderia ser devido à transformação em outras toxinas. Experimentos adicionais com *Pseudomonas sp* indicaram a conversão de neoSTX em STX em condições ácidas.

Essas considerações indicam que há certo grau de flexibilidade durante o processo de transformação dessas toxinas, pois, embora seja mais frequente a mudança de formas menos tóxicas para as formas mais tóxicas (Gárete-Lizárraga *et al.*, 2004), o caminho inverso também é possível acontecer, dependendo de certas condições específicas, como ocorreu no trabalho realizado por Garcia *et al.* (2009), que, ao analisar a transformação enzimática de toxinas no organismo humano, relatam que, dependendo do tempo em que essas toxinas permanecem no organismo, ocorre a transformação, por oxidação, da STX em neoSTX, particularmente no fígado, rins e pulmões. Mesmo tratando-se de uma transformação bioquímica, esse estudo indica ser possível uma mudança da toxina no sentido STX para neoSTX.

Strichartz (1984), estudando a estrutura química da molécula de STX e a influência do pH, informa que essa variante e todos os seus derivados, exceto a neoSTX, possuem estruturas tóxicas e cargas essencialmente constantes abaixo de pH 6,5. Para esse autor, a carga em dois grupos guanidinos pode ser a chave para se determinar a constância em termos de toxicidade e de carga da STX em valores de pH ácidos. Essa carga é devido à protonação desses grupos básicos e pode ser removida pelo aumento do pH. A Figura 3.6 mostra a influência do pH na estrutura da molécula de STX.

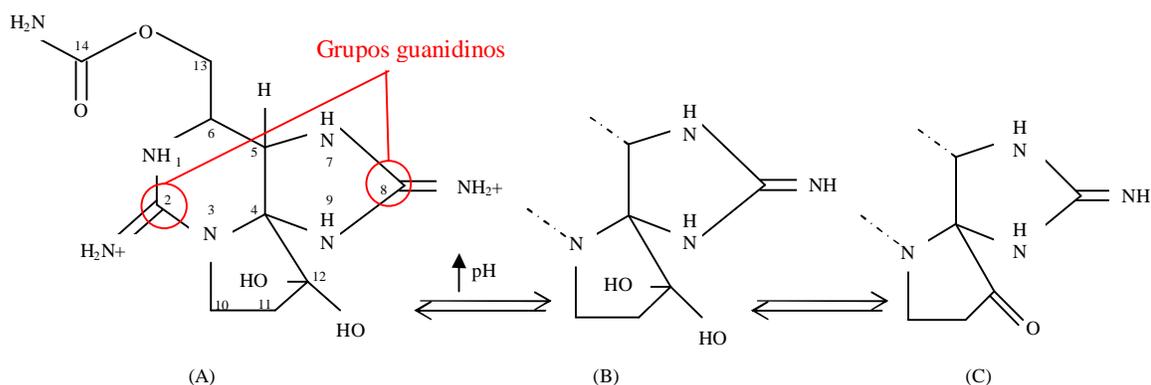


Figura 3.6 – Influência do pH na estrutura da molécula de STX (Strichartz, 1984).

Pela hipótese de Strichartz (1984), Figura 3.6, em pH 7,0, mais de 99% das toxinas estão como hidrato divalente (STX<sup>2+</sup>) (A). Em pH alto, o guanidino em C8 torna-se desprotonado ( $pK_a = 8,2$ ), resultando o hidrato monovalente (B), que existe em equilíbrio com a cetona não hidratada (C). A região da molécula, além das linhas descontínuas, permanece inalterada.

A potencialidade (tóxica e de carga) da STX é relativamente constante entre o pH 6,5 e 8,2, mas então cai rapidamente quando o valor do pH é elevado além desse intervalo. Isso consiste com o maior envolvimento da carga do guanidino C8 em bloquear o canal de reação. Em valores de pH acima de 10, a potencialidade da toxina cai mais de 98%, impedindo uma ação direta da carga em C2.

Em relação à neoSTX, Strichartz (1984) relata que essa variante é uma derivação da STX e tem um grupo ácido fraco de hidroxil em N ( $pK_a = 6,75$ ). A potencialidade absoluta dessa toxina é muito diferente da STX. Essa diferença de potencialidade aumenta mais em pH ácido, mas diminui muito em condições alcalinas. A potenciação da ação da neoSTX em pH ácido é devido a uma alteração de reversibilidade da estrutura da toxina. As duas toxinas (neoSTX e STX) são igualmente potentes em pH 7,7. Nesse pH, o hidroxil N da neoSTX é

92% do tempo desprotonado e a média de carga sobre a molécula de neoSTX é +1, enquanto que sobre a STX é +1,73. Alterar a protonação do hidroxil N faz mudar a potencialidade da neoSTX, embora a carga sobre uma molécula goniatóxina não seja a única causa determinante de sua potência.

Llewellyn (2006), ao confirmar os estudos realizados por Strichartz (1984), também observou que as saxitoxinas são muito estáveis em soluções ácidas e instáveis em soluções alcalinas. A STX possui dois pKa (8,22 e 11,28) que pertencem aos grupos guanidinos 7, 8, 9 e 1, 2, 3, respectivamente. Esta natureza polar das saxitoxinas explica a sua alta solubilidade em água e sua baixa solubilidade em álcoois, assim como sua insolubilidade em solventes orgânicos.

Para Oga *et al.* (2008), o grupo cetona diidróxi é essencial para a toxicidade dessas toxinas, as quais podem ser eliminadas por uma redução catalítica desse grupo com hidrogênio, formando um grupo monoidróxi. Com exceção dos componentes do grupo N-sulfocarbamoil, essas toxinas são termoestáveis em pH ácido, mas instáveis e facilmente oxidadas em pH básico.

O método de redução catalítica com hidrogênio (hidrogenação) é influenciado por vários fatores, incluindo catalisador, solvente, pureza do substrato, condições de reação. A temperatura, a pressão, a agitação e o catalisador influenciam tanto a velocidade como a seletividade da hidrogenação (Barcza, 2008).

Diante dos vários trabalhos realizados por diversos autores sobre o estudo das transformações das saxitoxinas, foi possível identificar que dois processos de transformações são citados com mais frequência: a epimerização e a redução do grupo OH-N (posição 1). Contudo, considerando que esses processos ocorrem simultaneamente e que são difíceis de serem medidos, torna-se necessário a realização de mais estudos que comprovem esses e outros fenômenos de transformação atuantes nas variantes de saxitoxinas, pois para algumas dessas ocorrências, como por exemplo, a transformação das toxinas GTX para STX, ainda não há comprovação científica (Blanco *et al.*, 2003), fato que necessita ser esclarecido. Ressalta-se que para uma molécula pequena, a STX exibe um número inesperado de variações naturais.

### **3.3 – DETECÇÃO E TESTES DE TOXICIDADE DE CIANOTOXINAS**

Segundo Brooks e Codd (1988), a detecção e quantificação de toxinas de cianobactérias podem ser realizadas através de métodos biológicos (bioensaios), químicos (Cromatografia

Líquida de Alta Eficiência – CLAE) e bioquímicos (ensaios de inibição das fosfatases e imunoenaios – teste ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

Os bioensaios com camundongos têm a vantagem de indicar um valor de toxicidade para mamíferos, e assim mais facilmente se pode prever os efeitos em nível humano, permitindo distinguir o tipo de toxina produzida devido aos diferentes sintomas e tempos de sobrevivência dos animais intoxicados. Estes ensaios são efetuados por injeção intraperitoneal (ip) de extratos de cianobactérias liofilizados, ou simplesmente de água contendo elevada densidade de cianobactérias sujeitas ao congelamento e ao descongelamento, promovendo a liberação de toxinas (Carmichael, 1992).

A relativa rapidez e facilidade com que se obtêm os resultados, além de não requerer equipamentos e técnicas complexas, constituem também argumentos favoráveis a esse tipo de ensaio. No entanto, para Carmichael (1992), existem várias razões que levam à necessidade de se procurar testes alternativos, como por exemplo, a questão ética, tendo em vista a manipulação com animais vivos, associado ao espaço requerido para instalar convenientemente esses animais, o que obriga, para os ensaios, utilizar um número reduzido de animais. Tais requisitos diminuem o rigor do resultado obtido, caso se deseje quantificar a toxicidade em termos de dose letal para 50% dos animais –  $DL_{50}$ .

Além de camundongos, outros seres vivos podem ser utilizados para se avaliar a toxicidade oriunda das cianobactérias, tais como: peixes e alguns invertebrados. Os peixes são organismos muito utilizados para testar a toxicidade de inúmeras substâncias sintéticas ou naturais, orgânicas ou inorgânicas. McKim (1977) descreve 56 testes com estados larvares de quatro espécies de peixes (*Pimephales promelas*, *Lepomis macrochivus*, *Salvelinus fontinalis*, *Jordanella floridae*) em que foram utilizados trinta e três compostos químicos diferentes, orgânicos e inorgânicos. O autor destaca que testes com estados larvares de peixes podem ser úteis na determinação da qualidade da água e na monitorização de um grande número de compostos.

O fato dos testes com estados embrio-larvares de peixes serem potenciais avaliadores dos efeitos dos materiais testados e, possivelmente, serem mais sensíveis aos compostos químicos do que os peixes adultos, leva a que estes tipos de organismos possam ser encarados como possível alternativa aos camundongos. Segundo Hellmann *et al.* (1988), esta possibilidade é ainda apoiada pelo fato de se terem encontrado receptores de substâncias tóxicas nos peixes semelhantes aos que existem nos mamíferos.

Em relação aos invertebrados, a *Artemia sp* e a *Daphnia* são organismos utilizados com frequência em bioensaios para determinação da qualidade da água e monitorização de tóxicos aquáticos.

A *Artemia sp*, também conhecida como camarão de salmora, é um microcrustáceo, braquiópoda, pertencente ao filo *Arthropoda*. Pereira (2001) relata que essa espécie está distribuída pelo mundo, sendo considerada cosmopolita e adaptada a um amplo alcance de ambientes. Em relação às espécies do gênero *Daphnia*, Ferrão-Filho *et al.* (2000) ressaltam que esses organismos têm grande participação na comunidade zooplancônica em todo mundo e que diferentes espécies, tais como *D. pulex*, *D. pulicaria*, *D. magna* e *D. similis* vêm sendo cultivadas em laboratório e utilizadas em ensaios ecotoxicológicos. A Figura 3.7 mostra a estrutura de uma *Daphnia*.

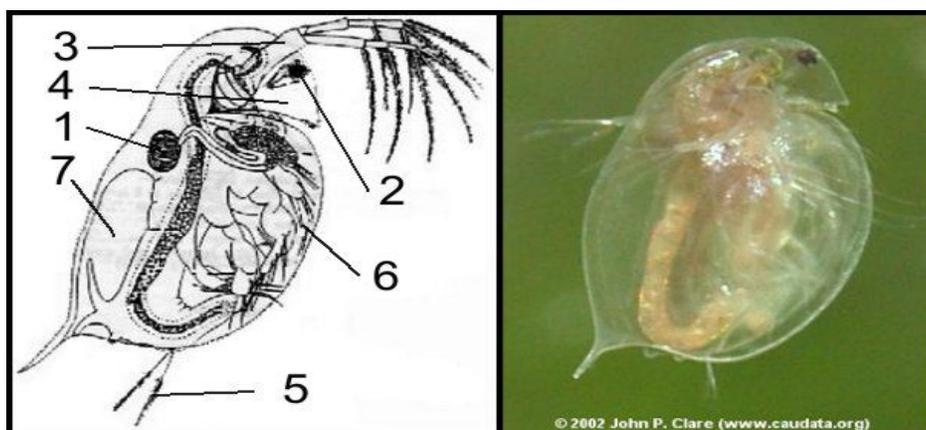


Figura 3.7 - Anatomia da *Daphnia* (Fêmea): (1)-Coração; (2)-Olho Composto; (3)-Antenas; (4)-Ocellus; (5)-Garras cuticulares em gancho (cerdas); (6)- Pernas; (7)-Abdômen (Figura retirada de [www.caudata.org](http://www.caudata.org).)

Ferrão-Filho *et al.* (2008) demonstraram que os movimentos natatórios de *D. pulex* e *M. micrura* foram rapidamente inibidos pela cepa T3 de *C. raciborskii*. No entanto, quando retirados do meio contendo a cianobactéria e colocados em meio contendo somente alimento nutritivo, os animais recuperaram a natação em um período de 24 a 48 horas. Para esses autores, a natação de cladóceros, como é o caso do gênero *Daphnia*, é feita basicamente pelos movimentos das segundas antenas, portanto, é provável que as saxitoxinas estejam agindo pelo bloqueio dos canais de sódio e impedindo a transmissão do impulso nervoso para os músculos desses apêndices.

Para Ferrão-Filho (2009) são poucos os estudos que empregaram cianotoxinas purificadas nos estudos de toxicidade, provavelmente devido ao alto custo destas. Mas o uso de toxinas purificadas pode fornecer evidências mais concretas dos efeitos das cianotoxinas sobre o zooplâncton. Nos poucos estudos realizados com cianotoxinas purificadas, as concentrações utilizadas foram relativamente elevadas, o que raramente ocorre na natureza, mesmo durante florações intensas.

Segundo Christofersen (1996), nos sistemas naturais, a concentração de toxinas dissolvidas é relativamente baixa (até 20,0 µg/L), portanto é mais provável que os organismos aquáticos estejam expostos a concentrações relativamente baixas de toxinas dissolvidas, exceto quando ocorre a senescência da floração.

O Brasil tornou obrigatório, por meio da Resolução CONAMA N<sup>o</sup>. 357/2005, o uso de testes ecotoxicológicos para a detecção de toxicidade de amostras de água. Nesse sentido, o desenvolvimento de testes específicos para detecção de cianobactérias tóxicas é de grande importância para o cumprimento da legislação.

O ELISA é uma técnica de detecção imunológica de fácil operação, rápido resultado e que confere uma grande sensibilidade, principalmente para as microcistinas, por possibilitar a detecção de valores muito baixos (Harada *et al.*, 1999). Levin (1992) relata sobre o desenvolvimento de um ELISA capaz de detectar de 50 a 100 µg/L de STX em tecidos de mariscos. Contudo, como desvantagem, esse método não distingue as toxinas presentes.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), também conhecida como HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) é a técnica mais utilizada para detecção de saxitoxinas (Harada *et al.*, 1999). Esse método requer a utilização de diferentes soluções (fase móvel) para analisar as toxinas (Oshima, 1995).

A CLAE permite detectar e quantificar a presença de toxinas em amostras pré-purificadas. A amostra injetada no sistema de cromatografia passa por uma coluna que contém gel de sílica. Ao passar nessa coluna, os compostos químicos presentes nas amostras vão sendo dispersos a velocidades diferentes, dependendo da proporção do solvente utilizado. A detecção é feita por meio de espectrofotômetro, utilizando-se um comprimento de onda diferente para cada toxina presente na amostra. Por exemplo, para as microcistinas, utiliza-se um comprimento de onda de 238 nm, enquanto que para a anatoxina-a, utiliza-se 227 nm. Para outras neurotoxinas, como as saxitoxinas, utiliza-se um detector de fluorescência. A presença das toxinas é

confirmada por comparação dos cromatogramas obtidos a partir de padrões. Pode ainda se fazer um espectograma do extrato correspondente ao pico de que se suspeita pertencer a toxina. A quantificação da toxina faz-se por integração dos picos correspondentes e comparação com os resultados obtidos para concentrações conhecidas de toxinas.

O pH e a temperatura da reação de oxidação influenciam na produção dos derivados fluorescentes de saxitoxinas, tendo interferência diferenciada para cada variante (Gago-Martinez *et al.*, 2001). Lawrence e Wong (1996) utilizaram a pré-oxidação e verificaram um aumento da produção de derivados fluorescentes de STX e de neoSTX quando a temperatura da reação aumentou de 20 para 90°C, e que o aumento do pH da reação de 8 para 10 leva a uma maior produção dos derivados fluorescentes de STX, neoSTX e GTX-2/3.

### **3.4 – REMOÇÃO DE CIANOTOXINAS PELO PROCESSO DE OXIDAÇÃO**

As sequências de tratamento de água que envolvem a coagulação podem promover alta eficiência de remoção de células de cianobactérias quando essas sequências são otimizadas. Entretanto, autores como Hoeger *et al.* (2004), Ho *et al.* (2006) e Ying *et al.* (2008) relatam que os processos convencionais de tratamento (Coagulação/floculação, sedimentação e filtração) precisam ser aperfeiçoados quanto à remoção de cianotoxinas, pois em testes realizados em estações de tratamento desse tipo, valores de concentrações de 17 µg/L de toxinas foram encontrados no efluente final.

A constatação de que os processos convencionais de tratamento necessitam ter seu desempenho otimizado não é atual, pois bem antes da constatação de Hoeger *et al.* (2004), outros pesquisadores já alertavam para esse fato. Por exemplo, os estudos realizados por Falconer *et al.* (1989), utilizando bioensaios em camundongos, detectaram redução de toxicidade de apenas 20% ao coagular, com sulfato de alumínio, uma água rica em neurotoxinas oriundas de uma floração de *Anabaena circinalis*, mesmo usando doses elevadas do coagulante (120 mg/L). A adição de diferentes polieletrólitos como auxiliar de floculação também não resultou em uma remoção satisfatória, pois não mostrou melhora na redução da toxicidade dessas neurotoxinas.

Nessa mesma linha de pesquisa, Keijola *et al.* (1988) também obtiveram baixas remoções de anatoxina-a em experimentos envolvendo a coagulação seguida de filtração e cloração. O cloreto férrico também foi avaliado para essa sequência de tratamento de água, sendo verificado que, para altas concentrações de toxinas (em torno de 200 µg/L), o uso dessa

substância como coagulante mostrou-se mais eficaz que o sulfato de alumínio; porém, para uma concentração de toxinas cerca de dez vezes menor, os dois coagulantes praticamente não apresentaram remoção.

Baseados em resultados de experimentos em escala de laboratório, Himberg *et al.* (1989) relatam que o tratamento conduzido por coagulação/floculação, filtração rápida e cloração também não foi capaz de promover a remoção significativa de hepatotoxinas oriundas de espécies tóxicas de *Microcystis e Oscillatoria*. Além disso, alguns experimentos dessa sequência de tratamento apresentaram remoção de toxina igual a zero ou negativa, sugerindo a liberação de toxinas durante a coagulação/floculação.

Diante dos resultados inexpressivos observados nos processos convencionais de tratamento em relação à remoção de cianotoxinas dissolvidas, uma técnica que merece ser explorada é a oxidação química. A restrição que necessita ser minimizada quanto ao uso dessa técnica é a preocupação com relação à aplicação direta de oxidantes em água bruta, que poderá ocasionar a lise da célula, liberação da toxina e a formação excessiva de subprodutos indesejáveis. Por isso, tem-se que analisar a ação dos oxidantes sobre as cianotoxinas considerando dois aspectos de tratamento: a pré-oxidação e a pós-oxidação (mais associada à desinfecção).

Do ponto de vista químico, uma reação de oxidação/redução é aquela que envolve transferência de elétrons entre os reagentes. Para que isso ocorra, deve-se ter um elemento que perde elétrons (se oxida), enquanto outro elemento ganha elétrons, ou seja, reduz-se. Sob uma ótica do tratamento de água, a oxidação química é uma forma de transformar moléculas ambientalmente indesejáveis em outras moléculas menos tóxicas, para que estas possam ser assimiladas de modo mais harmonioso nos ciclos da natureza.

A oxidação pode ser completa ou parcial. Algumas vezes, quando a oxidação se dá de modo incompleto, nem sempre se pode garantir que o subproduto (ou subprodutos) formado(s) será(rão) menos tóxico(s) que o composto de partida. Diante disso, o sucesso da oxidação química depende se o objetivo final do tratamento é a eliminação de uma espécie química em particular, redução da carga orgânica como um todo, remoção de cor ou redução de toxicidade. Na Tabela 3.4 são apresentados alguns trabalhos que foram realizados para eliminação de cianotoxinas, fazendo-se uso do processo de oxidação com componentes físicos e químicos.

Tabela 3.4 – Processos de oxidação utilizados na remoção de diversos tipos de cianotoxinas

<b>Processo de oxidação</b>	<b>Tipos de cianotoxinas</b>	<b>Autor</b>
Ozônio (O <sub>3</sub> )	Microcistina e anatoxina-a	Keijola <i>et al.</i> (1988)
Ozônio (O <sub>3</sub> )	Microcistina e anatoxina-a	Himberg <i>et al.</i> (1989)
Dióxido de cloro (ClO <sub>2</sub> )	Microcistina	Hart e Stott (1993)
Cloro (Cl)	Microcistina e nodularinas	Nicholson <i>et al.</i> (1994)
Cloro (Cl)	Microcistina	Lam <i>et al.</i> (1995)
Ozônio (O <sub>3</sub> ), Cloro (Cl), dióxido de cloro (ClO <sub>2</sub> ), peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) e permanganato de potássio (KMnO <sub>4</sub> ).	Microcistina e anatoxina-a	Hart <i>et al.</i> (1998)
Ozônio (O <sub>3</sub> ) e cloro (Cl)	Microcistina, Saxitoxinas (STX, GTX2, GTX3) e cilindropermopsina.	Hrudey <i>et al.</i> (1999)
Radiação ultravioleta e dióxido de titânio (TiO <sub>2</sub> )	Cilindropermopsina	Senogles <i>et al.</i> (2000)
Cloro (Cl)	Cilindropermopsina	Senogles <i>et al.</i> (2000)
Peróxido de Hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) e dióxido de titânio (TiO <sub>2</sub> )	Microcistina	Cornish <i>et al.</i> (2000)
Ozônio (O <sub>3</sub> )	Microcistina, Anatoxina-a, GTX2, GTX3, C1 e C2	Rositano <i>et al.</i> (2000)
Radiação ultravioleta	Microcistina	Alam <i>et al.</i> (2001)
Fenton	Microcistina	Gajdeck <i>et al.</i> (2001)
Dióxido de titânio (TiO <sub>2</sub> )	Microcistina	Shephard <i>et al.</i> (2001)
Cloro (Cl)	STX, dcSTX, GTX2, GTX3, C1 e C2	Nicholson <i>et al.</i> (2003)
Ozônio (O <sub>3</sub> ) e Cloro (Cl)	Cilindropermopsina, anatoxina-a, anatoxina-a(s), saxitoxinas (GTX2, dcGTX2, dcGTX3, C1 e C2)	Höger, (2003)
Cloro (Cl)	STX	Senogles-Derham <i>et al.</i> (2003)
Radiação Ultravioleta	Microcistina	Gajdeck <i>et al.</i> (2004)
Fenton e Foto-Fenton	Microcistina	Bandala <i>et al.</i> (2004)
Cloro (Cl)	Microcistina	Shi <i>et al.</i> (2005)
Carvão ativado, ozônio e peróxido de hidrogênio	C1, C2, GTX2, GTX3, GTX5, STX, dcGTX2 e dcGTX3	Orr <i>et al.</i> (2004)
Ozônio (O <sub>3</sub> ) e cloro (Cl)	Microcistina	Jurczak <i>et al.</i> (2005)
Radiação ultravioleta e peróxido e hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Microcistina	Qiao <i>et al.</i> (2005)

Tabela 3.4 – Processos de oxidação utilizados na remoção de diversos tipos de cianotoxinas (Continuação)

<b>Processo de oxidação</b>	<b>Tipos de cianotoxinas</b>	<b>Autor</b>
Cloro (Cl)	Microcistina	Acero <i>et al.</i> (2005)
Dióxido de titânio (TiO <sub>2</sub> )	Nodularina	Liu <i>et al.</i> (2005)
Radiação ultravioleta	Microcistina	Mazur-Marzec <i>et al.</i> (2006)
Ozônio (O <sub>3</sub> )	Microcistina	Brooke <i>et al.</i> (2006)
Cloro (Cl)	Microcistina	Ho <i>et al.</i> (2006)
Cloro (Cl), dióxido de cloro (ClO <sub>2</sub> ) e permanganato de potássio	Microcistina	Kuroda (2006)
Ozônio	STX, dcSTX, neoSTX, GTX1, GTX2, GTX3, GTX4, GTX5, dcGTX2 e dcGTX3	Mello Filho (2006)
Dióxido de Titânio (TiO <sub>2</sub> )	Microcistina	Yuan <i>et al.</i> (2006)
Ozônio (O <sub>3</sub> )	STX e neoSTX	Sens <i>et al.</i> (2006)
Processos avançados de oxidação (Foto-Fenton, UV, UVA, UVC, Peróxido de Hidrogênio – H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Anatoxina-a	Momani, (2007)
Ozônio (O <sub>3</sub> ), cloro (Cl), dióxido de cloro (ClO <sub>2</sub> ) e permanganato de potássio	Microcistina	Rodríguez <i>et al.</i> (2007)
Permanganato de potássio (KMnO <sub>4</sub> )	Microcistina	Rodríguez <i>et al.</i> (2007)
Hipoclorito de sódio	Microcistina e saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX)	Freitas, M. (2007)
Irradiação ultrassônica	Microcistina	Hudder <i>et al.</i> (2007)
Processos oxidativos avançados (Foto-Fenton, UV, UVA, UVC, Peróxido de Hidrogênio – H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Microcistina	Freitas, A. (2008)
Dióxido de cloro (ClO <sub>2</sub> )	Microcistina	Ying <i>et al.</i> (2008)
Ozônio (O <sub>3</sub> )	Microcistina	Miao e Tao (2008)
Cloro (Cl) e permanganato de potássio (KMnO <sub>4</sub> )	Microcistina	Rodríguez <i>et al.</i> (2008)
Processos avançados de oxidação (Foto-Fenton, UV, UVA, UVC, Peróxido de Hidrogênio – H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Microcistina	Momani <i>et al.</i> (2008)
Fenton	Microcistina	Zhong <i>et al.</i> (2009)
Carvão ativado em pó e cloro	neoSTX e STX	Viana-Veronezi <i>et al.</i> (2009)

A Tabela 3.4 mostra que a maioria dos trabalhos de oxidação realizados estão relacionados ao estudo das microcistinas. Vários oxidantes já foram testados e nota-se, mais recentemente, o aumento do interesse na utilização dos processos oxidativos avançados.

No que se refere à oxidação de microcistinas com os oxidantes químicos mais usuais (cloro, ozônio, dióxido de cloro, permanganato), a preocupação presente nos diferentes estudos é relativo ao rigoroso controle da dose de oxidante em função da competição/demanda exercida por outros compostos orgânicos presentes na água e a lise celular, quando se trata da pré-oxidação. A formação de subprodutos da desinfecção (SPD) é também objeto de preocupação, particularmente no caso do uso do cloro.

Melo Filho (2006) conduziu uma pesquisa tendo como espécie dominante na água bruta a *Cylindrospermopsis raciborskii* ( $7,06 \times 10^5$  e  $1,28 \times 10^6$  células/mL) e constatou que a água produzida na sequência de tratamento composta por pré-ozonização e filtração rápida descendente (filtração direta) foi capaz de reduzir um número significativo de cianobactérias. No entanto, mesmo com uma eficiência média superior a 99,6% em relação à remoção de cianobactérias, o valor da concentração de células encontrado foi alto e preocupante para uma condição de abastecimento público.

Quanto fez uso da pós-ozonização, Melo Filho (2006) observou que as doses de ozônio utilizadas não foram suficientes para atingir o desempenho dos ensaios com a pré-ozonização. Ele esperava constatar que a ozonização realizada numa água filtrada (pós-ozonização), com uma carga de matéria orgânica mais baixa, fosse capaz de remover as células de cianobactérias remanescentes da filtração, produzindo uma água com baixíssimos valores desses microrganismos, o que não aconteceu.

Em relação à presença de saxitoxinas no manancial estudado por Melo Filho (2006) (Lagoa do Peri, Estado de Santa Catarina), ele verificou que a concentração dessas toxinas sempre esteve baixa durante as investigações experimentais, em torno de 3,2 µg/L eq STX/L. Este fato contribuiu para que as concentrações na água tratada se aproximassem do limite de detecção do método de análise, o que prejudicou a avaliação da eficácia da pré e da pós-ozonização.

Com a percepção de que as microcistinas são as cianotoxinas mais estudadas e considerando a crescente ocorrência de florações de *Cylindrospermopsis raciborskii*, produtoras de saxitoxinas em mananciais brasileiros, o presente trabalho enfatiza os estudos relativos a esse grupo de neurotoxinas.

Nicholson *et al.* (2003), estudando o efeito das doses de cloro sobre diversas cianotoxinas, incluindo a dcSTX e a STX, utilizando o tempo de contato de 30 minutos, dose máxima de cloro de 18,5 mg/L e um pH variando de 5,0 e 9,0, encontraram remoção superior a 90% para

todas as toxinas em pH 9. Porém, esses autores relatam que os extratos de cianotoxinas foram semipurificados e preparados para conter uma alta toxicidade (3910 µg/g de peso seco de material celular ou 720 µg/g como saxitoxina equivalente). Para alcançar esse resultado, foi necessário manter um residual de cloro livre superior a 0,5 mg/L.

Para uma água de estudo semipurificada de saxitoxinas (STX), cuja concentração inicial foi 73 µg/L, Senogles-Derham *et al.* (2003) conseguiram alcançar uma remoção maior que 90%, estando a amostra em valor de pH 8,0 e utilizando doses de cloro livre maiores que 4 mg/L, geradas a partir do hipoclorito de sódio. O tempo de contato também foi 30 minutos e o residual de cloro mantido foi de 0,76 mg/L.

Apesar dos resultados satisfatórios alcançados na remoção de saxitoxinas com o cloro, tanto no trabalho de Nicholson *et al.* (2003) como no trabalho de Senogles *et al.* (2003), ainda há questionamentos sobre o processo de remoção das variantes de saxitoxinas que necessitam ser esclarecidos, como por exemplo, a utilização de outras combinações de variantes e a avaliação em uma faixa de pH ampla ou adequada às praticadas nas estações de tratamento de água.

Freitas (2007) fez um estudo preliminar sobre a remoção de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) com água de estudo oriunda de células de *C. raciborskii* lisada em valor de pH aproximadamente 5. Em todos os ensaios, o tempo de contato foi de 30 minutos, sendo utilizado o cloro como agente oxidante. Os resultados indicaram que a demanda de cloro foi elevada e que as remoções significativas de toxinas só ocorreram com doses elevadas de cloro, por exemplo, para reduzir a concentração de neoSTX de 73 µg/L para valores próximos a 31 µg/L foram necessários cerca de 20 mg/L. Adicionalmente, os estudos com as variantes dcSTX e STX de saxitoxinas indicaram que essas variantes são mais estáveis com relação à oxidação do que a variante neoSTX.

Mais recentemente, Viana-Veronezi *et al.* (2009) avaliaram a remoção de extrato de saxitoxinas (neoSTX e STX) proveniente da lise de células de *C. raciborskii* durante os tempos de contato de 30 e de 60 minutos e aplicações de doses de 0,9, 1,2 e 1,5 mg/L de cloro ativo. O pH do extrato foi ajustado para valores entre 6,0 a 7,0. Após os tempos de contato estabelecidos, os resultados indicaram que, para a concentração de saxitoxinas de  $15,80 \pm 0,20$  µg/L, depreendem-se diferenças pouco significativas entre os tempos de contato. Foi observado também um elevado percentual de remoção, superior a 80%, praticamente obedecendo ao valor máximo permissível recomendado pela Portaria MS 518/2004 (3,0 µg/L Eq de STX/L).

Os resultados alcançados com a oxidação de saxitoxinas indicam a necessidade de estudos adicionais, tendo em vista que ainda há lacunas deixadas pelos trabalhos realizados, como por exemplo, a avaliação da remoção de diferentes combinações de variantes de saxitoxinas em uma faixa de valores de pH mais amplo, pois é indicado por alguns autores que esse parâmetro tem forte influência na remoção de saxitoxinas. Além disso, são poucos os trabalhos até então realizados com o uso do cloro sobre saxitoxinas que avaliaram a cinética de reação, procurando estabelecer os parâmetros que podem influenciar diretamente no processo de remoção e a velocidade como essas reações acontecem.

Estudos de cinética realizados com outras cianotoxinas, microcistinas e nodularinas, por exemplo, indicaram alternância de predomínio de reações de primeira e de segunda ordem entre os trabalhos realizados (Acero *et al.*, 2005; Momani, 2007; Ying *et al.*, 2008; Zhong *et al.*, 2009). Diante desse fato, constata-se que mesmo para toxina mais estudada (microcistinas) há questões não totalmente esclarecidas; logo, para as saxitoxinas, há muito mais questionamentos que necessitam de respostas, a fim de estabelecer diretrizes seguras de remoção para os sistemas de tratamento de água potável. Diante disso, considerando-se as informações levantadas na revisão bibliográfica, tentou-se desenvolver uma metodologia de investigação que permitisse avaliar a oxidação de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) com cloro, como uma alternativa para ampliar o espectro dos processos de tratamento de águas com elevadas concentrações de cianotoxinas, observando as reações cinéticas em diferentes tempos de contato e os demais fatores intervenientes desse processo.

#### **3.4.1 – Subprodutos da Oxidação com Cloro**

A determinação dos subprodutos durante o pré e pós-tratamento da água tem se tornado importante para as concessionárias de tratamento e distribuição de água potável. Tal fato deve-se, principalmente, aos resultados das pesquisas envolvendo os processos de formação e remoção de substâncias indesejáveis para o abastecimento público, assim como novas descobertas a respeito do alto potencial carcinogênico destes compostos.

Krasner *et al.* (1989) relatam que durante os anos de 1988 e de 1989, um estudo realizado por 35 empresas públicas de vários países indicou que os trihalometanos representaram a classe de maior peso em relação aos produtos gerados pela desinfecção; a segunda maior fração foi em relação aos ácidos haloacéticos e a terceira maior fração foram os aldeídos, isto é, formaldeído e acetaldeído. Alguns dos principais SPD que podem ser formados estão listados na Tabela 3.5

Tabela 3.5 - Principais subprodutos formados durante o processo de adição de um oxidante/desinfetante à água (Krasner,1999; Sanches *et al.*, 2003).

Classe de SPD	SPD Individual	Fórmula Química
Trihalometanos (THM)	Clorofórmio	CHCl <sub>3</sub>
	Bromodiclorometano	CHCl <sub>2</sub> Br
	Dibromoclorometano	CHClBr <sub>2</sub>
	Bromofórmio	CHBr <sub>3</sub>
Ácidos Haloacéticos (AHA)	Ácido monocloroacético	CH <sub>2</sub> ClCOOH
	Ácido dicloroacético	CHCl <sub>2</sub> COOH
	Ácido tricloroacético	CCl <sub>3</sub> COOH
	Ácido monobromoacético	CH <sub>2</sub> BrCOOH
	Ácido dibromoacético	CHBr <sub>2</sub> COOH
	Ácido tribromoacético	CBr <sub>3</sub> COOH
	Ácido brocloacético	CHBrClCOOH
	Ácido bromodicloroacético	CBrCl <sub>2</sub> COOH
Haloacetoneitrilas (HAN)	Tricloroacetoneitrila	CCl <sub>3</sub> C≡N
	Dicloroacetoneitrila	CHCl <sub>2</sub> C≡N
	Bromocloroacetoneitrila	CHBrClC≡N
	Dibromoacetoneitrila	CHBr <sub>2</sub> C≡N
Haloacetonas (HC)	1,1-Dicloroacetona	CHCl <sub>2</sub> COCH <sub>3</sub>
	1,1,1-Tricloroacetona	CCl <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>
(Halopicrinas (HP)	Cloropicrina	CCl <sub>3</sub> NO <sub>2</sub>
Haleto Cianogênicos (HCN)	Cloreto cianogênico	ClC≡N
	Brometo cianogênico	BrC≡N
oxi-Haleto (oH)	Ion Clorito	ClO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
	Ion clorato	ClO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
	Ion bromato	BrO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Aldeídos	Fomaldeído	HCHO
	Acetaldeído	CH <sub>3</sub> CHO
Ácido carboxílico	Acetato	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>

De acordo com Tokmak *et al.* (2004), os subprodutos halogenados podem causar prejuízos à saúde humana, como por exemplo, a má formação embrionária e mutação. Estudos epidemiológicos indicam uma ligação entre o desenvolvimento de câncer de bexiga e subprodutos de desinfecção. Além disso, estudos em animais têm demonstrado que tumores

no fígado, rins e intestino estão associados à ingestão de água tratada com cloro e seus derivados.

Segundo a literatura especializada, a presença de subprodutos nas águas destinadas ao abastecimento público tem origem, principalmente, devido à reação de substâncias precursoras com produtos utilizados no pré e pós-tratamento da água. Pesquisas conduzidas a partir da década de 1970 por Babcock e Singer (1979), por exemplo, mostram que um desses produtos responsáveis pela formação de tais subprodutos é o cloro. Entre esses subprodutos estão os trialometanos (THM), que são potencialmente cancerígenos. Com os avanços das pesquisas, constatou-se que, além das substâncias húmicas e outras matérias orgânicas naturais (MON), as algas também se constituem em potenciais precursoras de trialometanos.

Morris e Baum (1978) foram os primeiros autores a publicarem sobre a possibilidade das algas serem precursores de THM. Esses autores demonstraram que a cloração de matéria orgânica proveniente das algas levou à produção de clorofórmio. Hoehn *et al.* (1980) levantaram a hipótese da existência de uma correlação entre a concentração de clorofila-a presente na água bruta e a concentração de THM na água tratada. Os resultados dos ensaios revelaram que tanto as células quanto a matéria orgânica extracelular (MOE) das algas eram importantes precursores de THM, sendo que a MOE contribui mais do que as células propriamente ditas; no entanto, a correlação entre clorofila-a e THM não foi confirmada.

Posteriormente, Graham *et al.* (1998) confirmaram a importância das algas e das cianobactérias como potenciais precursores de trialometanos. Esses autores estudaram a ocorrência de uma floração de *Anabaena flos-aquae* ( $10^6$  células/mL) e verificaram que a cloração levou à produção de até 1,1 mg/L de THM total, a partir das células viáveis, e de até 0,2 mg/L de THM total a partir de matéria orgânica extracelular. Os valores encontrados são significativamente superiores ao limite recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para água potável, que é 0,1 mg/L de trialometano total (WHO, 2008).

As algas são uma fonte de aminoácidos. Thehy e Bieber (1981) demonstraram que a cloração de certos aminoácidos, bem como de ácidos húmicos, resultam na formação de haloacetônitrilas (HAN), especificamente no subproduto individual dicloroacetônitrila (DCAN).

Segundo Muttamaro *et al.* (1995), o cloro pode formar THM quando em contato com substâncias húmicas, que incluem ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e ácidos himatomelâmicos, com materiais de algas, principalmente a clorofila, sua biomassa e produtos extracelulares.

Senogles-Derham *et al.* (2003) avaliaram a formação de trialometanos e de ácidos haloacéticos durante o processo de oxidação de extratos de microcistinas e de saxitoxina (STX) semipurificados. Os extratos com as duas toxinas foram ajustados para os valores de pH 6,0 e 8,0, respectivamente, e as doses de cloro aplicadas foram de 0,6 mg/L para microcistinas e maior que 4 mg/L para saxitoxina. Após 90 dias, o extrato com as microcistinas resultaram em 5 µg/L de THM e não foram detectados AHA. Para a saxitoxina (STX), foram detectados 4 µg/L de THM e 22 µg/L de AHA. Esses resultados indicaram que tanto a concentração de THM quanto de AHA formados em cada solução ficaram abaixo do recomendado pela WHO (2008); contudo, o tempo de duração de cada experimento foi muito elevado quando comparado com o tempo despreendido durante o processo de tratamento e de distribuição da água potável normalmente utilizados pelas companhias de saneamento.

Kuroda (2006) avaliou a formação de subprodutos halogenados em águas com diferentes concentrações de células de *Microcystis* submetidas à oxidação com cloro na forma de hipoclorito de cálcio. A primeira água de estudo com densidade de  $1,4 \times 10^6$  cel/mL e a segunda com  $5,5 \times 10^6$  cel/mL, ambas adicionadas na fase final do crescimento exponencial em água filtrada (sem cloração) da estação de tratamento de água de São Carlos, SP. As dosagens de cloro aplicadas variaram de 10 mg/L a 20 mg/L para água de estudo com menor concentração de células e de 50 mg/L a 75 mg/L para a água com maior concentração de células. Os resultados obtidos mostram que a capacidade máxima de formação de trialometanos em 3 e 7 dias foi de 0,6 e 31 µg/L para a água de estudo com menor concentração de células, e de 129 e 183 µg/L, para a água com maior concentração de células, podendo indicar uma relação entre a densidade de células e a formação de trialometanos.

A reação de formação de trialometanos inicia quando há o contato entre os reagentes (cloro e precursores) e pode continuar ocorrendo por muito tempo, enquanto houver reagente disponível (principalmente o cloro livre). A formação de subprodutos também depende de outros parâmetros, tais como: pH, temperatura, tempo de contato, dose de oxidante/desinfetante e residual. Para Singer (1994), a combinação de oxidantes, na pré e pós-desinfecção, influenciado pelos parâmetros relacionados, podem formar produtos secundários. A maioria dos compostos formados são ácidos que contêm radicais cetonas que podem causar a formação de halofórmios após a reação com o cloro.

Morris e Baum (1978) observaram que a taxa de reação de halofórmios é altamente afetada pelo primeiro tempo da reação que envolve a ionização do metil cetona. Esse procedimento ocorre em valor de pH alto. Os autores constataram ainda que a cloração de muitas substâncias orgânicas resultam na produção de clorofórmio em valores de pH altos. Posteriormente, Reckhow e Singer (1984) observaram um efeito similar de pH sobre a formação de clorofórmio e halogênio orgânico total (HOT). Adicionalmente, os resultados dessas pesquisas indicaram que a formação de ácido tricloroacético (ATCA) diminui significativamente em valor de pH básico.

Os efeitos do pH e do tempo de reação sobre a formação de subprodutos da desinfecção (SPD) foram avaliados por Stevens *et al.* (1989). Eles avaliaram a cloração com pH 5,0, 7,0 e 9,4 para o tempo de reação de 4, 48 e 144 horas, respectivamente. A Tabela 3.6 resume os resultados da avaliação realizada pelos pesquisadores, considerando os efeitos do pH e do tempo de reação sobre a formação de SPD.

Tabela 3.6 – Efeitos do pH e do tempo de reação sobre a formação de subprodutos da desinfecção (Stevens et al., 1989)

<b>Subprodutos da desinfecção (SPD)</b>	<b>pH 5,0</b>	<b>pH 7,0</b>	<b>pH 9,4</b>
Trihalometanos (THM)	Baixa formação	-	Alta formação
Ácido Tricloroacético (ATCA)	Formação similar		Baixa formação
Ácido Dicloroacético (ADCA)	Formação similar, talvez levemente mais alto em pH 7,0		
Tricloroacetaldeído (Cloro Hidrato)	Formação similar		Forma dentro de 4 horas; decai com o tempo.
Dicloroacetona (DCAN)	Alta formação	Forma dentro de 4 horas; então decai com o tempo	Baixa formação
Tricloroacetona (1,1,1-TCA)	Alta formação	Baixa formação	Não detectado

Os resultados mostrados pela Tabela 3.6 evidenciam que a formação de THM aumenta com o aumento de pH e, de acordo com os estudos de Stevens *et al.* (1989), esse aumento é mais percebido dentro das primeiras 48 horas. Quanto à formação de ácido haloacético (AHA), os autores observaram um aumento ao longo do tempo, com pH no intervalo de 5,0 a 9,4, não sendo significativo o efeito sobre a formação de ácido dicloroacético (ADCA), ao passo que a formação de ácido tricloroacético (ATCA) foi mais baixa em pH 9,4 do que em pH em nível baixo.

Outros trabalhos indicam que a influência do pH na formação de clorofórmio é maior quando o mesmo atinge o valor de 11,5; enquanto que essa formação parece ser menor em valor de pH 6,5 (Sanches *et al.*, 2003).

Stevens *et al.* (1976) estudaram os efeitos da temperatura sobre a taxa de reação de precursores presentes nas águas do Rio Ohio (EUA). A produção de clorofórmio, depois de 96 horas em pH 7,0, em temperatura de 3°C, 25°C e 40°C foi menor que 50 µg/L em torno 100 µg/L e maior que 200 µg/L, respectivamente. A média de formação de THM foi mais alta no verão e mais baixa no inverno. Além da flutuação da temperatura, isso também pode ser explicado pelas variações sazonais, que podem resultar em mudança na concentração de precursores de SPD, ou seja, na concentração de matéria orgânica natural (MON).

Sanches *et al.* (2003) afirmam que, como regra geral, aceita-se que quanto maior a temperatura maior será a probabilidade de formação de trihalometanos. Assim, existe uma correlação típica da temperatura que, a cada 10°C de incremento, eleva ao dobro a taxa de formação de THM. Dessa forma, as variações sazonais, no que se refere a produção de THM, observada em estações de tratamento que utilizam a mesma fonte de água, deve-se, em grande parte, ao efeito da temperatura.

A extensão da taxa e a distribuição de formação de SPD são afetadas pela dose de cloro. Por exemplo, altas doses e residuais favorecem a formação de AHA mais do que THM. Além disso, altas doses de cloro resultam em uma alta proporção de AHA trihalogenados, quando comparado com di- e mono-AHA halogenados. Adicionalmente, outros subprodutos são afetados (Reckhow *et al.*, 1986).

Reckhow *et al.* (1986) também constataram que a concentração de ácido tricloroacético (ATCA) aumenta mais do que a de ácido dicloroacético (ADCA) com o aumento da dose de cloro. Esses autores também observaram uma redução na concentração de 1,1,1-tricloroacetona e de dicloroacetonitrila com o aumento da dose de cloro, que pode ser o resultado da reação direta entre o cloro e estes dois SPD intermediários.

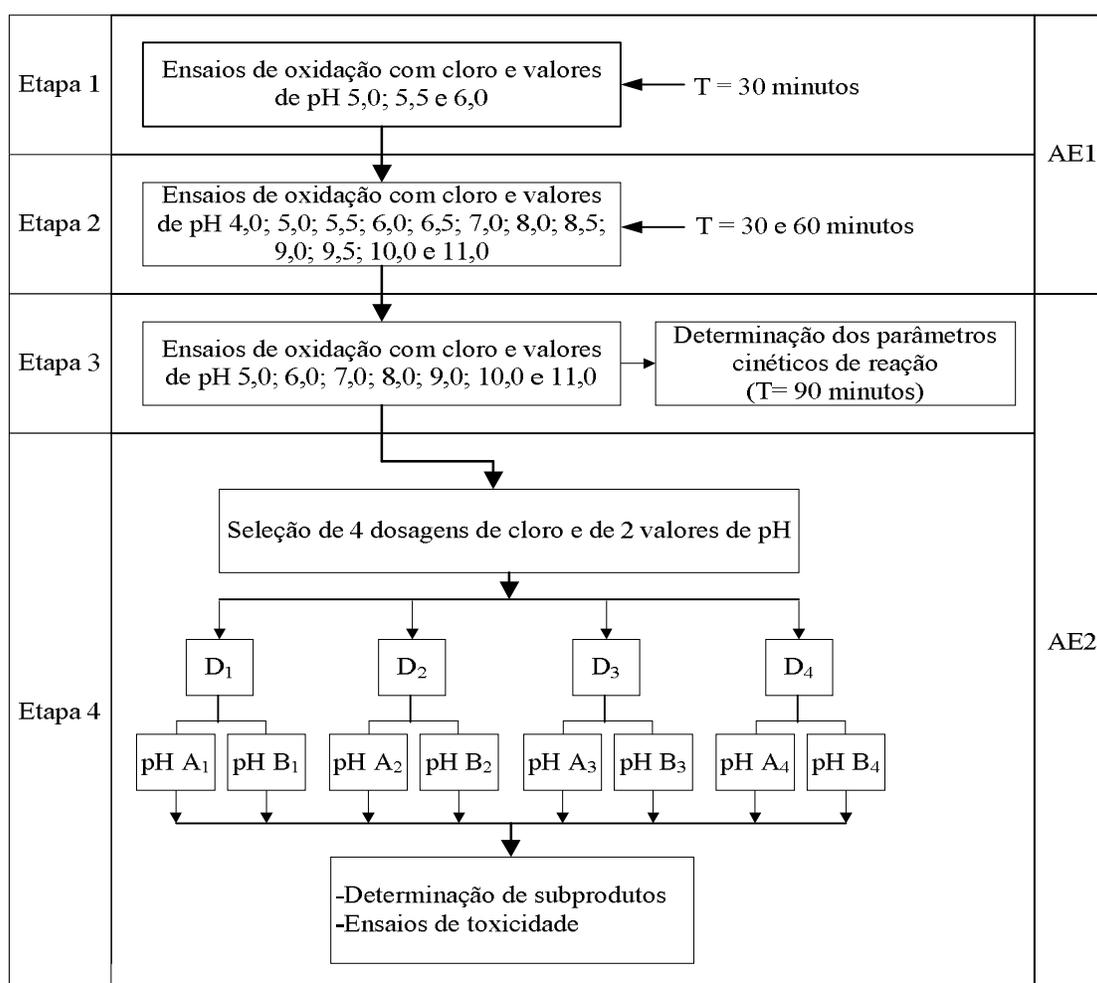
Na verdade, deve-se ter em conta que qualquer oxidante usado na pré e pós-tratamento da água poderá reagir com os produtos químicos já presentes na água bruta para formar outros produtos indesejáveis, que podem aparecer na água tratada. Por conseguinte, o fundamental, no processo de tratamento, é eliminar ao máximo os precursores antes da adição do oxidante para reduzir a demanda do desinfetante e a possível formação de subprodutos nocivos.

Considerando-se as informações levantadas na revisão bibliográfica, desenvolveu-se uma metodologia de investigação que permitisse avaliar a oxidação de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) com cloro como uma alternativa para ampliar o espectro dos processos de tratamento de águas com elevadas concentrações de cianotoxinas, observando as reações cinéticas em diferentes valores de pH, doses de cloro e tempos de contato, acompanhando os fatores intervenientes desse processo, como por exemplo, a avaliação da formação de subprodutos da cloração.

## 4 – METODOLOGIA

Para atingir os objetivos propostos, foi desenvolvido um trabalho experimental, fazendo-se uso das instalações e equipamentos do Laboratório de Análise de Água (LAA) da Universidade de Brasília, do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental.

O oxidante foi o cloro, gerado a partir da solução de hipoclorito de sódio. Foi analisada a oxidação das variantes de saxitoxinas (neoSTX, dcSXT e STX), produzidas a partir de cultivos de *Cylindrospermopsis raciborskii* (cepa T3). O trabalho envolveu quatro etapas resumidas na Figura 4.1.



Legenda: D = dose de cloro; A e B = valores de pH; AE = Água de Estudo; T = Tempo de Contato.

Figura 4.1 - Fluxograma das etapas da pesquisa

A Etapa 1 teve como objetivos a familiarização com os equipamentos do laboratório e o estabelecimento das primeiras faixas de doses de cloro e de pH que seriam utilizadas ao longo dos ensaios, sendo utilizado o tempo de contato de 30 minutos.

Os objetivos da Etapa 2 foram confirmar as doses de cloro utilizadas na etapa inicial, estabelecer novas faixas de doses de cloro e de valores pH e verificar a influência de um tempo de contato maior do que 30 minutos na remoção de saxitoxinas.

A partir dos ensaios realizados na Etapa 2, percebeu-se a necessidade de se utilizar uma água de estudo com toxinas purificadas, de modo a reduzir a influência dos produtos da lise celular durante a oxidação das saxitoxinas. Além disso, em cada sequência dos testes realizados nas duas primeiras etapas, a concentração inicial de saxitoxinas era sempre diferente. Assim, nas Etapas 3 e 4, utilizou-se a AE2 (extrato semipurificado) com uma concentração inicial constante de saxitoxinas. Cabe destacar que na Etapa 3, buscou-se determinar os parâmetros cinéticos de reação e, a partir dos resultados obtidos, delimitaram-se as doses de cloro e os valores de pH a serem usados na Etapa 4, para fins de determinação dos subprodutos da oxidação e realização dos ensaios de toxicidade.

#### **4.1 – ÁGUA DE ESTUDO E SOLUÇÃO DE CLORO**

As saxitoxinas utilizadas no presente trabalho foram obtidas a partir da lise do cultivo da cepa T3 de *Cylindrospermopsis raciborskii*.

A cepa T3 foi fornecida pelo Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactéria (LETC) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Para o cultivo da cepa, foi utilizada a sala de cultivo de cianobactérias do Laboratório de Análise de Água do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da UnB.

O cultivo realizado foi unialgal, em meio de cultura ASM-1 e os frascos contendo as culturas desses organismos foram mantidos em uma sala isolada, com controle da temperatura (em torno de 24°C), da intensidade luminosa (cerca de 40  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e do foto-período (12:12 h). Além desses cuidados, quando se produzia um grande volume de cultivo, foi utilizada uma aeração contínua, a fim de se manter as células em suspensão (Lagos *et al.*, 1999). A densidade e o aspecto das células foram monitorados periodicamente por meio de observações

em microscópio. A Figura 4.2 mostra a sala de cultivo instalada no Laboratório de Análise de Água (LAA).



Figura 4.2 – Sala de cultivo instalada no LAA

Para promover a lise celular e a liberação das toxinas para o meio líquido, o cultivo era submetido a processo de gelo/degelo por três vezes consecutivas, conforme recomendado por Azevedo e Magalhães (2006). O processo de gelo/degelo promove o rompimento da membrana celular e, conseqüentemente, a liberação de toxina e de outros compostos intracelulares para o meio líquido. O material resultante desse procedimento era armazenado em congelador até os procedimentos que precediam a preparação da água de estudo (AE).

De acordo com Lagos *et al.* (1999), Molica *et al.* (2004) e Pomati *et al.* (2004), a cepa T3 é capaz de produzir STX, neoSTX, dcSTX, dcneoSTX, C1, C2, GTX-2, GTX-3 e GTX-6. Neste trabalho foram estudadas as três primeiras variantes caracterizadas por esses autores, pelo fato de apresentarem maior grau de toxicidade, sendo que a neoSTX foi produzida em maior quantidade pela cepa T3.

As concentrações de saxitoxinas presentes nas águas de estudo variaram durante os experimentos nas Etapas 1 e 2. Foi adotada a base inicial dos valores de concentrações de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) determinadas por Silva (2005), cuja variação foi de 40 µg/L a 70 µg/L, produzidas a partir da lise de um cultivo com  $10^7$  cel/mL da cepa T3 de *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Dois tipos de água de estudo foram utilizados nos ensaios (AE1 e AE2), o que permitiu avaliar a influência dos produtos oriundos da lise celular na oxidação de saxitoxinas com cloro. A Figura 4.3 mostra, de forma geral, os procedimentos realizados para a obtenção das águas de estudo.

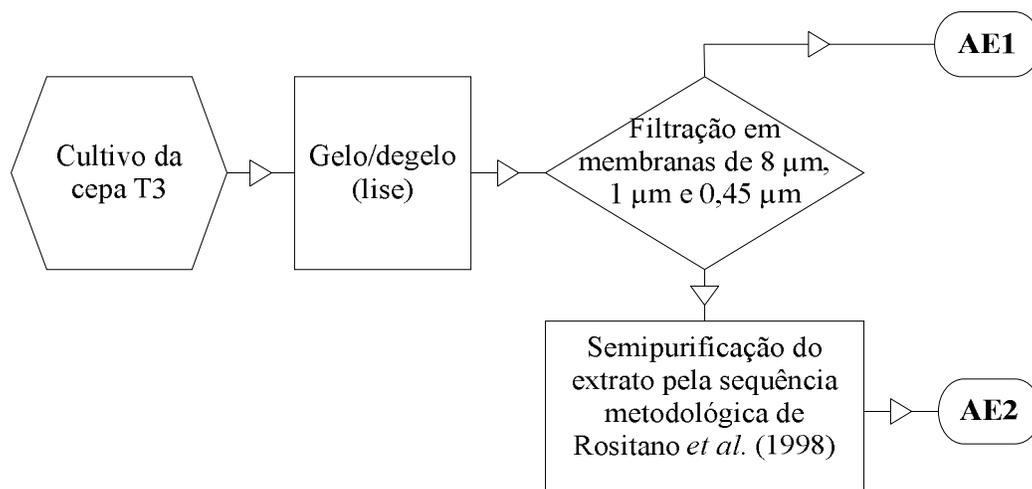


Figura 4.3 – Procedimento para a obtenção das águas de estudo (AE1 e AE2)

Para a realização das duas primeiras etapas do trabalho (Figura 4.1) foi utilizada a AE1, que consistia, basicamente, do material lisado (saxitoxinas e outros compostos intracelulares liberados a partir da lise) após filtração em membrana de retenção de 8 µm, seguida de membrana de microfibras de vidro de 1 µm e, finalmente, em membrana de éster de celulose de 0,45 µm, conforme apresentado na Figura 4.3. A sequência de filtração tinha como objetivo remover os fragmentos de células lisadas. A Figura 4.4 mostra as membranas de 8 µm (a), 1 µm (b) e 0,45 µm (c), antes e depois de terem sido utilizadas no processo de filtração, durante a preparação das águas de estudo.

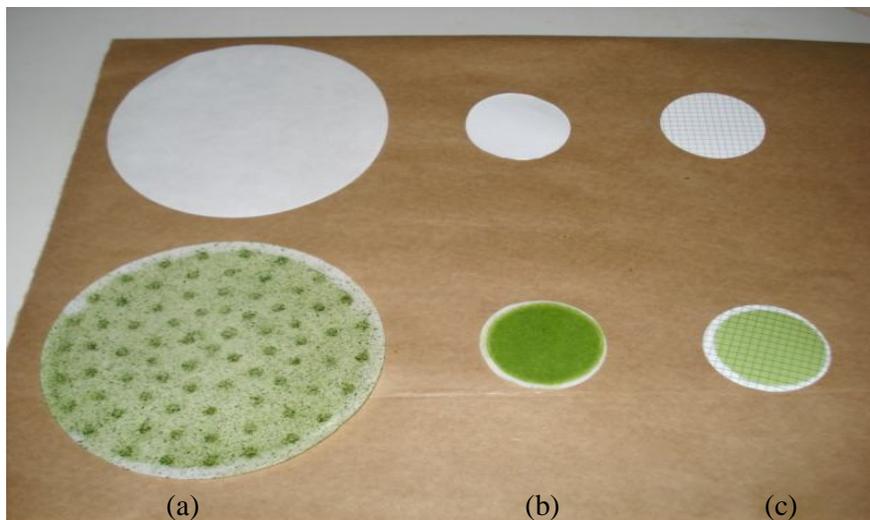


Figura 4.4 – Membranas utilizadas no processo de filtração de amostras com saxitoxinas após o processo de gelo/degelo: (a) membrana de 8  $\mu\text{m}$ , (b) membrana de 1  $\mu\text{m}$ , (c) e membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ .

Nas Etapas 1 e 2 do trabalho, optou-se, portanto, por utilizar como água de estudo a solução lisada e filtrada sem diluição com qualquer outro tipo de água, a fim de se garantir que houvesse uma alta concentração inicial de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX).

Dos resultados dos testes da Etapa 2 do trabalho, observou-se que a presença, na água de estudo, de outros compostos intracelulares liberados a partir da lise, gerava problemas na interpretação dos dados de oxidação das variantes de saxitoxinas estudadas, pois eles proporcionavam demanda de cloro, interferindo no resultado final do processo de oxidação. Assim, para o desenvolvimento das demais etapas do trabalho (Etapas 3 e 4, Figura 4.1), optou-se por proceder uma semipurificação do material lisado e filtrado. O procedimento de semipurificação adotado foi o descrito por Rositano *et al.* (1998) que, além de permitir a minimização das impurezas oriundas do processo de lise celular, gerava um extrato com elevada concentração de saxitoxinas.

Basicamente, o processo de semipurificação envolveu a passagem do material lisado (cerca de 200 mL a uma velocidade de 1 a 2 mL/min) em cartucho de extração em fase sólida, contendo carvão grafitizado (marca Alltech – 300 mg/8 mL) previamente condicionado. As saxitoxinas aderidas ao material adsorvente do cartucho eram, então, eluidas e os solventes utilizados para eluição (metanol 50% e ácido acético) eram posteriormente evaporados à baixa temperatura;

em seguida, o resíduo (saxitoxinas semipurificadas) era ressuspensão com ácido acético e armazenado em um congelador até o momento da utilização. Uma descrição detalhada desse processo de semipurificação é apresentada no Apêndice A.

Foi necessário produzir um volume de extrato que possibilitasse testar todos os valores de pH nas Etapas 3 e 4 do trabalho, com a mesma concentrações inicial de saxitoxinas. Em face da concentração elevada de saxitoxinas no extrato, para produzir a AE2 era realizada a diluição do extrato em água desionizada (Milli-Q).

Quanto à solução de cloro utilizada na realização dos ensaios de oxidação de saxitoxinas, ela foi produzida no próprio LAA, utilizando Gerador Dosador de Solução Oxidante, cuja marca comercial é Hidrogerox, modelo GE 25.

A solução produzida pelo gerador é produto da reação eletroquímica de cloreto de sódio, que se transforma em uma solução oxidante contendo basicamente hipoclorito de sódio e ácido hipocloroso, porém a maior parte é de hipoclorito de sódio (Paixão, 2000). Para o presente trabalho, as doses de cloro aplicadas referem-se, portanto, à concentração de cloro ativo. A Figura 4.5 mostra o equipamento gerador da solução de cloro que foi utilizado na pesquisa.



Figura 4.5 – Equipamento gerador de solução de cloro

Antes de se utilizar a solução produzida no equipamento mostrado na Figura 4.5, a concentração presente de cloro era determinada. Essa concentração chegava a valores superiores a 4000 mg/L de cloro ativo.

Para monitorar a dose aplicada, ainda na fase inicial do trabalho, fez-se uso do controle de dose, aplicando-a ao mesmo volume de solução oxidante da água de estudo em um volume de água desionizada. O controle da dose foi feito em duplicata e a média dos valores das concentrações de cloro medida nos frascos de controle passou a ser considerada como a dose aplicada. A Figura 4.6 mostra a realização de um dos experimentos com saxitoxinas e o controle de dose que, para efeito de identificação, foi chamado de branco “a” e de branco “b”.



Figura 4.6 – Experimento com saxitoxinas e controle de doses de solução oxidante

## 4.2 – DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.2.1 – Procedimento Geral para a Realização dos Ensaios de Oxidação

Antes de se iniciarem as etapas do trabalho, foram feitos ensaios iniciais (Etapa 1) com o objetivo de se familiarizar com os equipamentos e identificar as faixas de doses de cloro que poderiam ser avaliadas.

As doses de cloro adotadas inicialmente foram baseadas nos valores adotados em trabalhos de diversos autores (Newcombe e Nicholson, 2002; Nicholson *et al.*, 2003; Ho *et al.*, 2006;

Freitas, 2007 e Rodríguez *et al.*, 2008), que utilizaram doses de cloro variando de 0,5 mg/L a 34,1 mg/L na remoção de cianotoxinas, incluindo as saxitoxinas.

Posteriormente, com o avanço dos trabalhos, percebeu-se a necessidade de se aumentar as doses de cloro, pois as concentrações até então utilizadas não foram suficientes para oxidar completamente as saxitoxinas estudadas, particularmente em ensaios com água de estudo AE1 (material oriundo da lise). Para as Etapas 1 e 2 do trabalho (Figura 4.1), os ensaios com cloro foram realizados com doses variáveis de 0,8 mg/L até valores próximos a 80 mg/L.

Os ensaios de oxidação foram feitos em duplicata para a verificação da reprodutibilidade dos resultados, mas, eventualmente um terceiro ensaio era realizado quando a leitura dos dois primeiros ensaios era diferente. Além disso, houve o acompanhamento da temperatura do meio. A Figura 4.7 mostra o fluxograma dos ensaios de oxidação com o cloro.

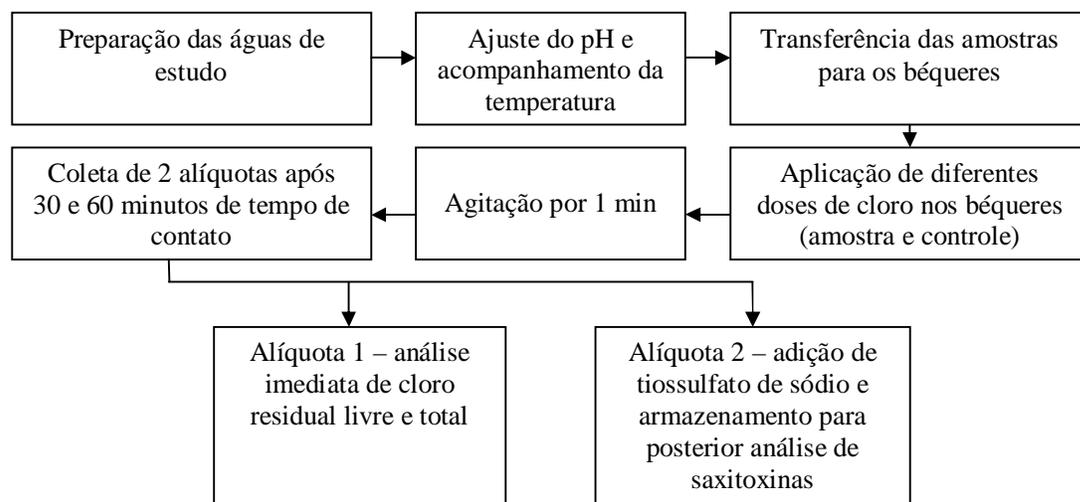


Figura 4.7 – Fluxograma dos procedimentos que foram realizados em cada sequência de ensaio com o cloro

Basicamente, o fluxograma mostrado pela Figura 4.7 foi utilizado em todas as etapas do trabalho, sendo modificado o tempo de agitação e o tempo de contato, que passaram para 90 minutos na Etapa 3 do trabalho, e o tipo de água de estudo, que passou a ser a AE2. Além disso, quando foi coletada amostra para análise de subprodutos, utilizou-se, por recomendação dos métodos da USEPA (1995), o ácido ascórbico como agente redutor para extinção do cloro residual, no lugar do tiosulfato de sódio. É importante destacar que para ajustar o pH para os valores mostrados na Figura 4.1, foi utilizado o ácido clorídrico (1 N), quando a intenção era

reduzir o valor do pH, e o hidróxido de sódio (1 N), quando a intenção era elevar o valor do pH.

A avaliação do tempo de contato de 30 minutos é relevante por ser o tempo de contato mínimo, após desinfecção, recomendado pela Portaria MS nº 518/2004. Quanto aos tempos de 60 e de 90 minutos, eles foram utilizados numa tentativa de se verificar se um tempo de contato maior resultaria em eficiência de remoção mais significativa de saxitoxinas.

Os experimentos de oxidação foram feitos utilizando-se os dispositivos de agitação de um equipamento para teste de jarros e recipientes de vidros (béqueres de 500 mL). Esse equipamento possui agitadores de aço inoxidável, do tipo paleta de eixo vertical, que medem 25 x 75 mm e fornece velocidade de agitação máxima de 2000 rpm. A Figura 4.8 mostra o equipamento de teste de jarros que foi utilizado na pesquisa.

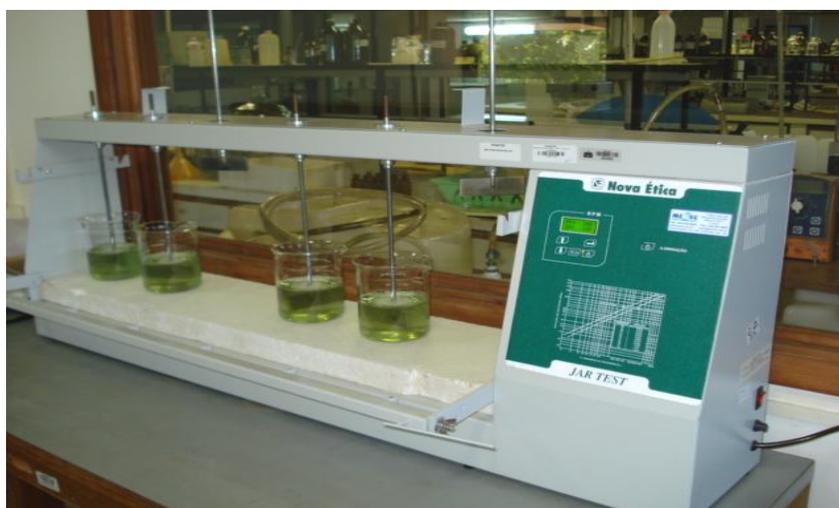


Figura 4.8 – Aparelho de teste de jarros que foi utilizado nas etapas 1, 2 e 3 do trabalho, durante a realização dos ensaios de oxidação de saxitoxinas

O volume de água de estudo e o controle utilizado nas etapas foi de 300 mL. Foi usada a agitação (50 rpm) no primeiro minuto de ensaio nas Etapas 1 e 2, com o intuito de homogeneizar o oxidante à amostra com saxitoxinas. Após esse tempo, os béqueres foram cobertos com papel alumínio para minimizar a perda de oxidante para a atmosfera. Para a Etapa 3, a agitação foi mantida constante em 50 rpm durante todo o período de realização dos ensaios, para controle durante a determinação dos parâmetros cinéticos.

A avaliação de uma possível perda ou transformação por degradação natural de toxinas foi feita por meio de um controle de toxinas, contendo apenas a água de estudo. Vale salientar que ambos os controles (controle da dose de cloro e controle da degradação das saxitoxinas) foram submetidos às mesmas condições das amostras durante os ensaios.

Dado o tempo necessário da reação, as amostras de água oxidada retiradas eram divididas em duas alíquotas. Com a primeira (25 mL), era realizada a determinação do cloro residual livre e total. Essas análises eram feitas imediatamente, pois caso contrário, o cloro permaneceria reagindo com os compostos presentes na água de estudo. Na segunda alíquota (25 mL), era adicionado 0,5 mL de tiosulfato de sódio na concentração de 1 N, a fim de que o cloro residual fosse totalmente consumido e, em seguida, a mesma era congelada para posterior análise da concentração de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX). É importante mencionar que, preliminarmente, foram feitos ensaios preparatórios para verificar qual a concentração de tiosulfato de sódio seria usada para a neutralização do cloro nas amostras, de modo que a reação de oxidação fosse finalizada nos tempos de contato estabelecidos.

#### **4.2.2 – Ensaios de Oxidação de Saxitoxinas em Presença de Outros Compostos Extracelulares (Etapas 1 e 2)**

##### **4.2.2.1 – Etapa 1**

Na Etapa 1, foram realizados 90 testes com a água de estudo AE1 (saxitoxinas e demais compostos liberados na lise) na presença de cloro, cujas doses variaram de 1,7 mg/L a 32,2 mg/L. Os valores de pH foram 5,0; 5,5 e 6,0 e procurou-se aproximar as doses de cloro aplicadas aos valores de 2 mg/L, 6 mg/L, 12 mg/L, 18 mg/L e 24 mg/L, que, a princípio, foram as concentrações previamente escolhidas para o trabalho.

Em todos os ensaios realizados na Etapa 1, o tempo de contato da oxidação foi de 30 minutos. A Figura 4.9 mostra o esquema de realização dessa etapa inicial.

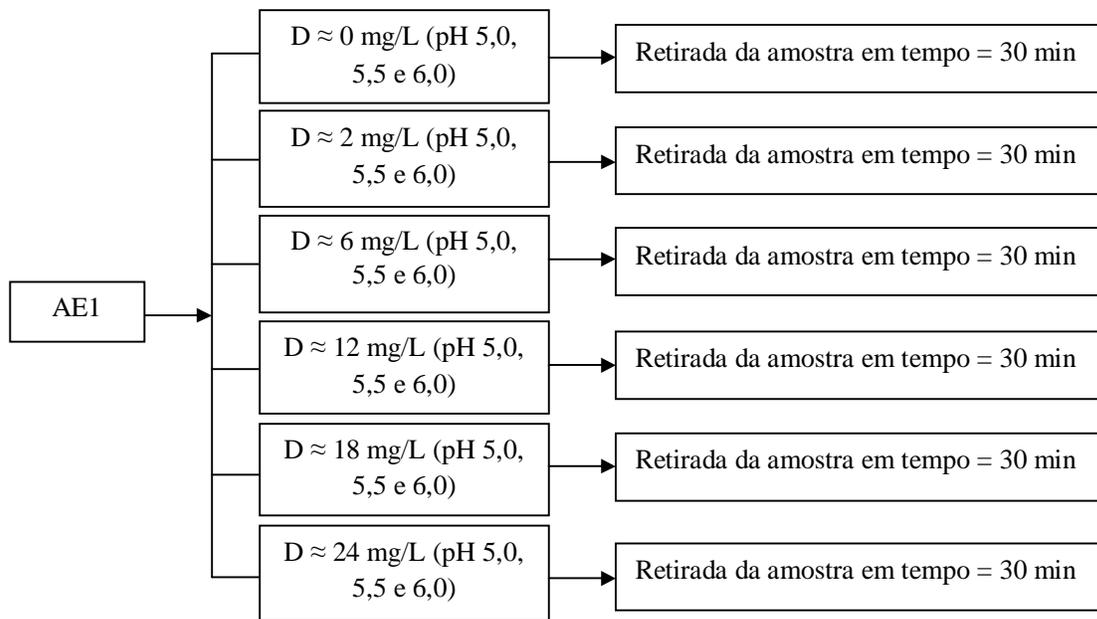


Figura 4.9 – Esquema dos ensaios de oxidação para a Etapa 1 do planejamento

Somente depois de realizados todos os procedimentos de ensaio com uma dose de cloro, passava-se para a análise da próxima dose, a fim de que não houvesse acúmulo de amostra, garantindo-se, assim, que as análises de cloro residual livre e total fossem realmente analisadas ao final do tempo de 30 minutos. Além disso, cada dose foi feita em duplicata. A Figura 4.10 mostra a configuração das doses aplicadas e seus respectivos controles.

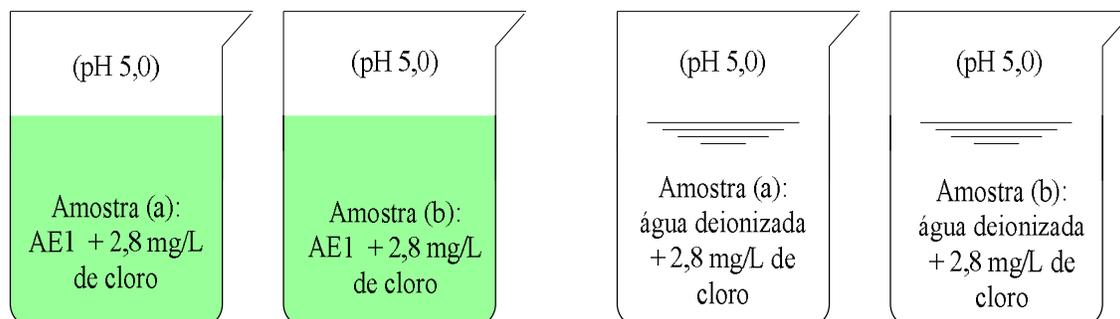


Figura 4.10 – Configuração de um ensaio de oxidação na Etapa 1

Como já mencionado, os frascos com água desionizada, denominadas “Branco (a)” e “Branco (b)” (Figura 4.10), foram utilizados para se determinar a dose de cloro efetivamente aplicada.

#### 4.2.2.2 – Etapa 2

O objetivo da Etapa 2 foi avaliar o efeito do tempo de contato e do valor de pH em uma faixa ampla na oxidação das saxitoxinas.

Os ensaios foram realizados com os tempos de contato de 30 e de 60 minutos, conforme o esquema mostrado na Figura 4.11.

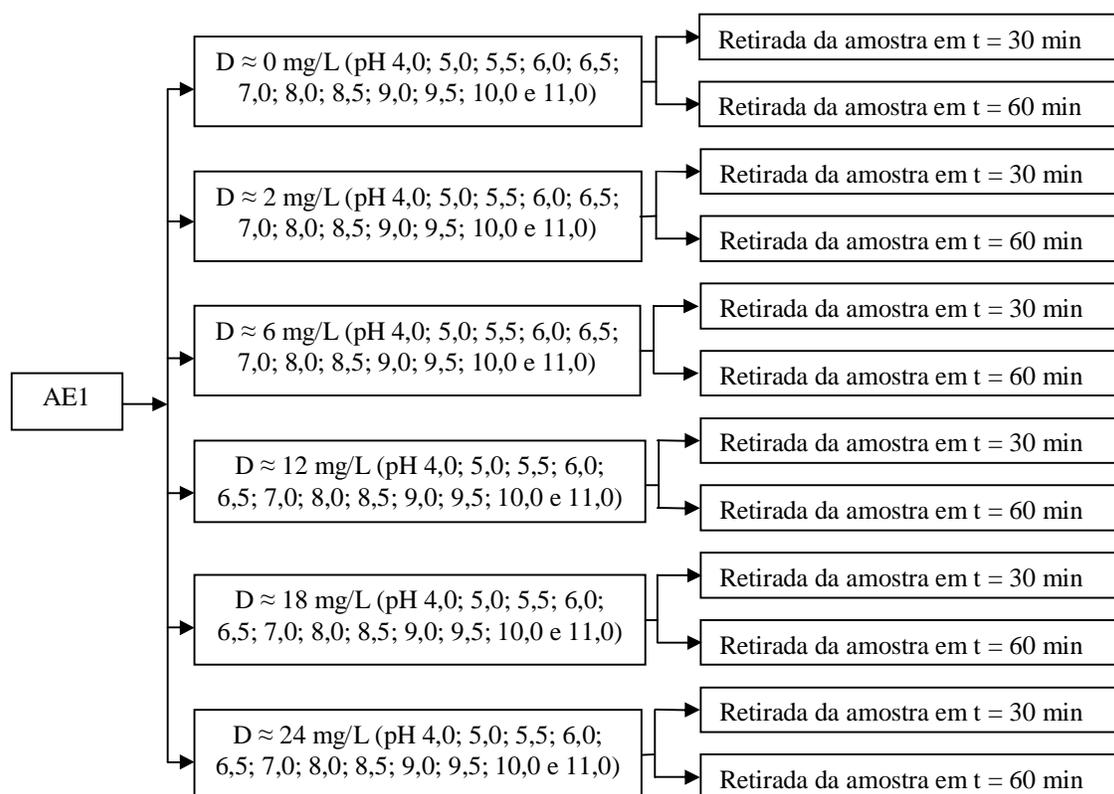


Figura 4.11 – Planejamento dos ensaios de oxidação para a Etapa 2.

O controle das doses de cloro efetivamente aplicada ocorreu de maneira análoga à Etapa 1, com aplicações de cloro em água desionizada.

É necessário lembrar que as doses de cloro mostradas nas Figuras 4.9 e 4.11 foram os valores inicialmente previstos, não foram, necessariamente, as doses de cloro aplicadas, porém, no início do trabalho, procurou-se atingir esses valores.

O total de ensaios realizados na Etapa 2 foi 1152 (incluindo as duplicatas), sendo utilizado 12 valores de pH e 48 doses de cloro. O acompanhamento de cada valor de pH com amostra de água de estudo sem adição de cloro ( $D = 0$  mg/L) também foi realizado. Esse procedimento foi padrão em todas as etapas do trabalho.

### **4.2.3 – Ensaio de Oxidação de Saxitoxinas a partir de Extrato Semipurificado (Etapas 3 e 4)**

#### 4.2.3.1 – Avaliação preliminar da cinética de oxidação de saxitoxinas (Etapa 3)

Nas Etapas 1 e 2 os ensaios realizados foram conduzidos com amostras de concentrações diferentes de saxitoxinas para cada sequência de ensaio. Já nesta etapa, os experimentos foram realizados com água de estudo preparada a partir de uma única solução estoque semipurificada de saxitoxinas (AE2), ou seja, a água de estudo apresentava a mesma concentração nos ensaios realizados com os vários valores de pH, doses de oxidante e tempos de contato, numa tentativa de se estabelecer melhor padrão de comparação entre os parâmetros analisados.

Nesta fase do trabalho, o tempo de contato total para reação com cada dose de oxidante foi ampliado para 90 minutos, sendo que a cada 15 minutos, duas alíquotas de amostras eram retiradas: uma para análise dos residuais de cloro e a outra para detecção da presença de saxitoxinas. Nas alíquotas destinadas às saxitoxinas, como nas etapas anteriores, foi adicionado o tiosulfato de sódio após cada tempo de reação e, em seguida, elas foram identificadas e armazenadas em congelador até o momento de análise em CLAE.

A coleta de alíquotas de água oxidada ao longo dos 90 minutos de ensaio objetivava a avaliação da cinética da oxidação. O intervalo de 15 minutos foi selecionado para viabilizar a detecção imediata dos residuais de cloro livre e de cloro total, pois, caso contrário, o oxidante permaneceria reagindo com as saxitoxinas. A Figura 4.12 ilustra o procedimento que foi adotado nesta fase da pesquisa.

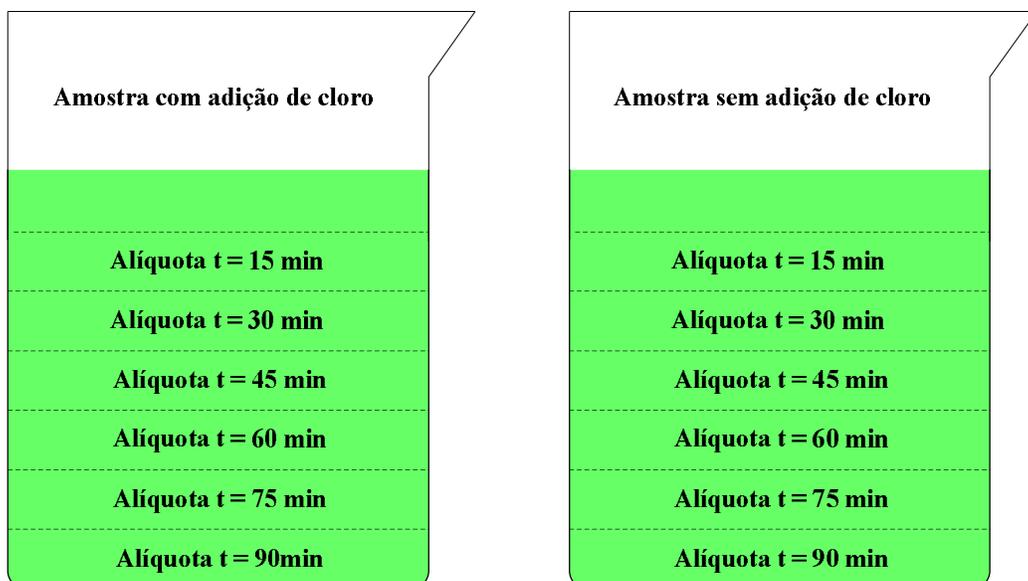


Figura 4.12 – Configuração dos ensaios realizados com água de estudo 2 na Etapa 3

As alíquotas retiradas a cada 15 minutos para as análises dos residuais de cloro e de saxitoxinas correspondiam aos volumes de amostra de 20 mL e de 10 mL, respectivamente, totalizando, ao final dos 90 minutos, um volume retirado de amostras de 180 mL, de um total 300 mL. Em cada dose de cloro avaliada, o ensaio foi realizado em duplicata, além disso, foi realizado o acompanhamento de uma possível degradação das saxitoxinas por meio de dois recipientes de controle (branco) com AE2 sem aplicação de cloro. A concentração inicial de saxitoxinas (somatório de STX, neoSTX e dcSTX) era cerca de 117,9 mg/L.

O total de ensaios realizados nesta etapa foi 672 (incluindo as duplicatas), sendo utilizado 7 valores de pH e 8 doses de cloro.

O controle de dose de cloro aplicada foi realizado do mesmo modo descrito nos itens 4.2.2.1 e 4.2.2.2 deste trabalho, ou seja, com a utilização de adição em água desionizada.

De modo a estudar a cinética de oxidação das saxitoxinas com cloro, foram testados os ajustes dos dados experimentais com a utilização da equação de ordem “n”. O objetivo desse estudo foi verificar a cinética na qual as reações ocorreram, a influência do valor do pH e da dose de cloro aplicada.

Para a determinação da cinética de ordem “n” foi utilizada a metodologia descrita por Levenspiel (1926), que usa o método do tempo de vida fracionária (F = 80%), cuja formulação é mostrada pela Equação 4.1.

$$t_F = \frac{(0,8)^{1-n} - 1}{k(n-1)} C_0^{1-n} \quad \text{Equação 4.1}$$

onde  $t_F$  é o tempo de vida fracionária,  $C_0$  é a concentração inicial do composto em estudo,  $k$  é a constante da cinética e  $n$  é a ordem da reação. A descrição desse método é apresentada no Apêndice B.

É importante ressaltar que durante os ensaios de oxidação, tendo como objetivo os estudos de cinética, buscou-se o controle da temperatura, que ficou em  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  para a temperatura ambiente e  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  para a temperatura da amostra, sendo medidas por meio de termômetro digital. O controle da temperatura foi importante para minimizar o efeito desse parâmetro nas reações de oxidação.

#### 4.2.3.2 – Avaliação de formação de subprodutos da oxidação (Etapa 4)

Foi avaliada a formação dos seguintes subprodutos: trihalometanos (THM), ácidos haloacéticos (AHA), haloacetoneitrilas (HAN), haloacetonas (HC), cloropicrina (CP) e cloro hidrato (CH) durante o processo de oxidação das saxitoxinas com o cloro.

Os métodos utilizados para extrações e análises dos subprodutos foram baseados nos procedimentos descritos pela USEPA 551.1 (1995) e USEPA 552.2 (1995), adaptados por Paschoalato (1995).

A Figura 4.13 mostra a sequência dos procedimentos que foram adotados nesta etapa do trabalho. Cabe destacar que a água de estudo utilizada foi a mesma, em termos de concentração inicial de saxitoxinas, da etapa dos ensaios de toxicidade.

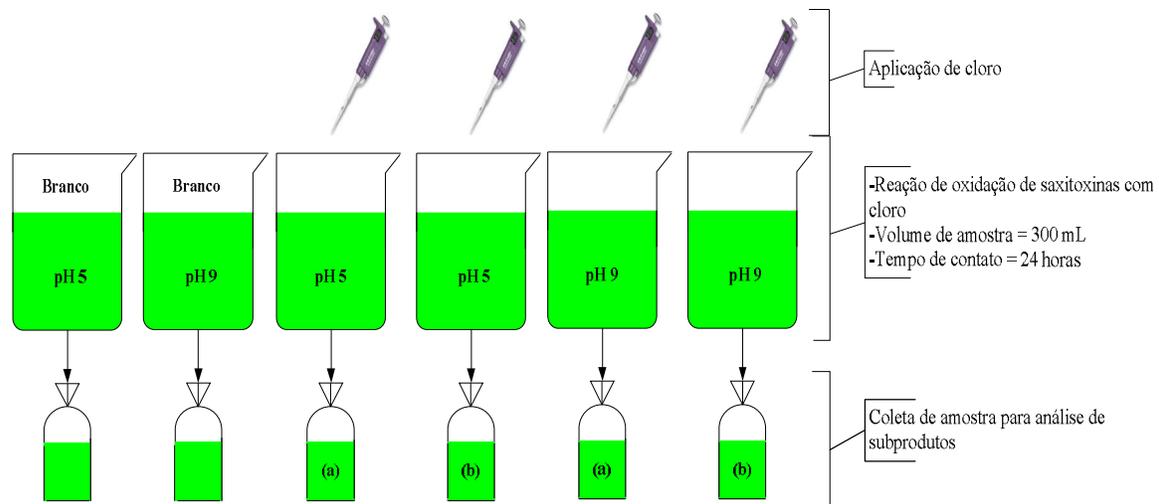


Figura 4.13 – Fluxograma dos ensaios de detecção de subprodutos da oxidação de saxitoxinas com cloro

O tempo de contato utilizado para a determinação de subprodutos foi de 24 horas. A escolha desse tempo baseou-se no trabalho realizado por Paschoalato *et al.* (2008), que estudando o potencial de formação de subprodutos com o uso do cloro (THM, AHA, HAN, HP e HC) no tempo inicial de 0,5 h e final 24 h, foi possível verificar a ocorrência do potencial de formação de subprodutos clorados.

Os ensaios destinados à avaliação de subprodutos foram realizados concomitantemente com os ensaios para avaliação da cinética, considerando os parâmetros estabelecidos para a etapa 4 (pH e doses de cloro). Dessa forma, somente depois de encerrado o ensaio cinético de oxidação das saxitoxinas, as amostras destinadas à detecção de subprodutos foram dispostas em frascos de vidro de cor âmbar, sendo estes incubados a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas. Após esse intervalo de tempo, foram efetuadas as análises de cloro residual livre e total e procedeu-se à descloração por meio da adição de ácido ascórbico (aproximadamente 1 g).

Conforme observado na Figura 4.13, a água de estudo 2 (AE2) teve seu pH ajustado para os valores 5,0 e 9,0 e, em seguida, foram aplicadas na mesma, dentro de um volume de 300 mL, três doses de cloro (1,5; 8 e 13 mg/L). As doses de 8 e 13 mg/L foram escolhidas com base nos ensaios realizados na etapa 3, onde se observou que após 30 minutos de tempo de contato, foi verificado um residual de 0,5 mg/L de cloro livre; enquanto que para a dose de 1,5 mg/L, o

residual de cloro livre não foi detectado. Dessa forma, optou-se por avaliar a formação de subprodutos considerando essas duas condições: com e sem presença de residual de cloro.

Com relação aos valores de pH adotados (pH 5,0 e 9,0), eles foram selecionados levando-se em consideração duas situações extremas: em pH 5 foi observado maior resistência à ação oxidativa sobre as saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX), sendo registrados valores de eficiências de remoção abaixo de 50%; por outro lado, em pH 9, as eficiências de remoção dessas variantes foram significativas (superiores a 99%). Devido a essas diferenças de eficiências de remoção, optou-se por esses valores de pH.

As amostras colhidas em frascos de vidro foram mantidas sob temperaturas de 4°C, em ambiente livre de gases orgânicos, para diminuição da cinética de reação de oxidação e geração de subprodutos. Destaca-se que o prazo máximo para as análises das amostras foi de 7 dias, contados a partir da data da coleta e preservação (EPA, 1995).

#### 4.2.3.3 – Ensaio de toxicidade (Etapa 4)

De acordo com o Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP, 2006), o zooplâncton constitui-se em um excelente mecanismo de biomonitoramento para cianotoxinas. No entanto, ainda não há protocolos de bioensaios padronizados para todos os organismos, de modo a se testar os efeitos específicos de amostras ambientais de corpos d'água contendo cianobactérias e suas várias toxinas. Dentre os organismos que têm o ensaio de toxicidade padronizado, está a *Daphnia similis*, estabelecido pela norma ABNT NBR 12713/2004. Portanto, esse organismo e a *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea, Cladocera) foram utilizados neste trabalho com o objetivo de se avaliar o efeito toxicológico da oxidação das saxitoxinas com o cloro.

Os ensaios de toxicidade com os dafnídeos *D. similis* e *C. silvestrii* foram realizados no Departamento de Bioquímica e Microbiologia da Universidade Estadual de São Paulo – UNESP, campus Rio Claro, e no Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, respectivamente.

Conforme orientação contida na ABNT NBR 12713/2004, para amostra na qual se pretende o resultado qualitativo, não são necessárias diluições; no entanto, devem ser utilizadas, no

mínimo, quatro replicatas, A Figura 4.14 mostra a configuração dos experimentos de toxicidade que foram realizados com os dafnínideos.

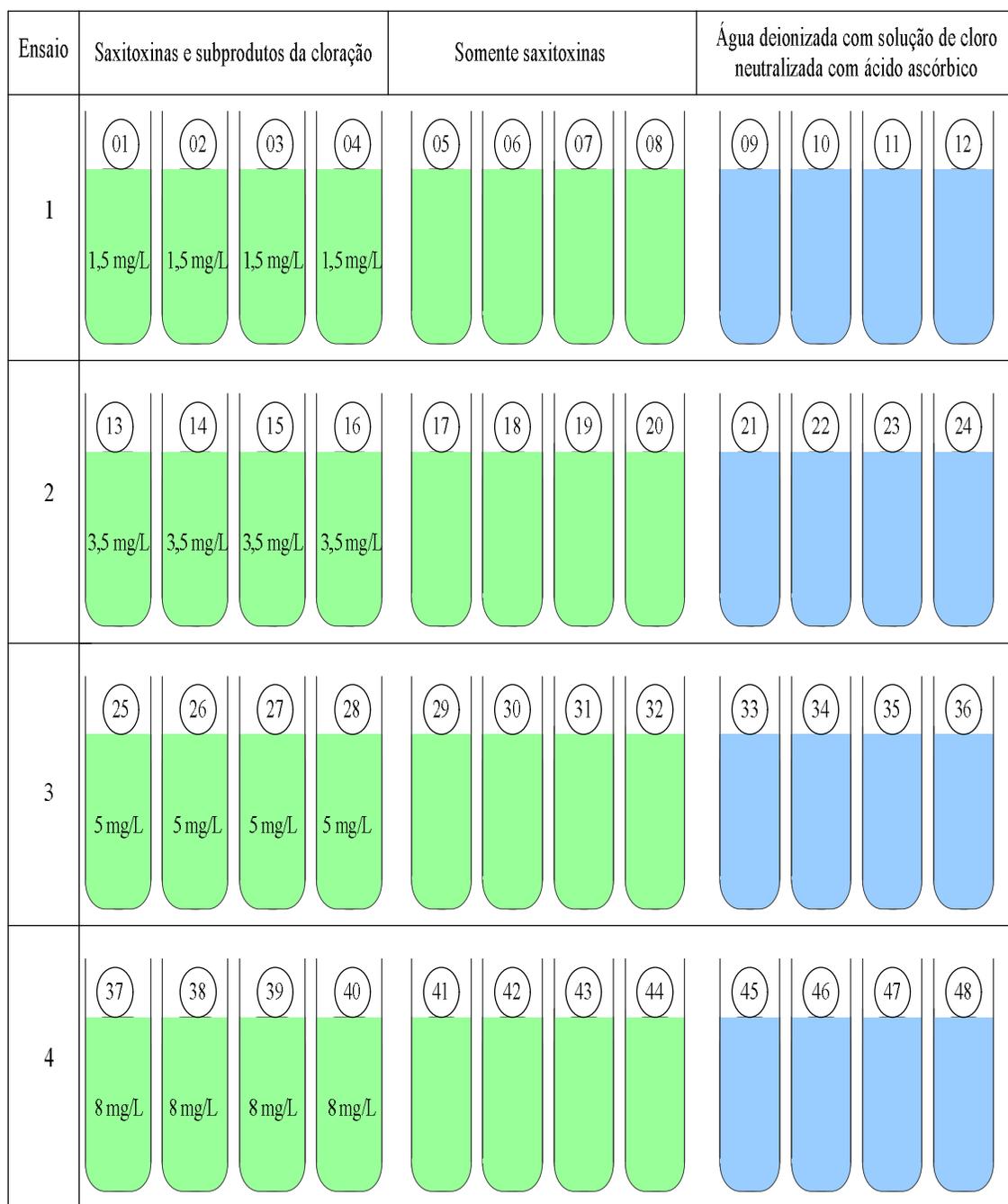


Figura 4.14 – Configuração dos experimentos de toxicidade.

Como pode ser observado na Figura 4.14, foi realizado o controle para cada valor de pH e para os subprodutos resultantes das doses de cloro aplicadas. Esse controle foi feito sem e com a presença de saxitoxinas, a fim de se constatar se a inativação dos organismos foi devida

à presença dessas cianotoxinas ou pelos componentes químicos utilizados no processo de oxidação. O grupo controle também foi feito com quatro réplicas.

Os ensaios de toxicidade foram realizados em amostra de AE2 submetidas à oxidação de doses de cloro de 1,5 mg/L; 3,5 mg/L; 5 mg/L e 8 mg/L, conforme arranjo mostrado na Figura 4.14. Essas doses de cloro foram aplicadas na AE2 ajustada para o valor de pH 5,0. Esse valor de pH foi adotado levando-se em consideração as condições de sobrevivência dos organismos utilizados nos ensaios, que não se adaptam à variação de pH, sendo necessário manter o valor do pH próximo à neutralidade. (ABNT NBR 12713/2004).

Considerando que os ensaios foram realizados com amostras sem diluição (amostras 01 a 48, Figura 4.14), os resultados foram expressos de forma qualitativa, ou seja, como “tóxico” ou “não tóxico”, confirmados por meio de análise estatística (teste de Fisher), método estatístico recomendado pela ABNT NBR 12713/2004, utilizando o programa computacional TOXSTAT 3.3 (Gulley *et al.*, 1991).

Após 24 e 48 horas de bioensaios com os organismos em teste, foi quantificada a taxa de sobrevivência para as quatro réplicas. Aqueles organismos que não foram capazes de realizar nenhum movimento natatório dentro de um intervalo de 15 segundos, após agitação suave do tubo, foram considerados imóveis (mortos).

Maiores detalhes de realização dos ensaios de toxicidade, tais como, cultivo e manutenção dos dafíniídeos, procedimento de realização do teste para determinação da sensibilidade dos organismos e procedimento do teste de toxicidade aguda são apresentados no Apêndice C.

É importante destacar que os resíduos de saxitoxinas produzidos em todas as etapas do trabalho (Etapas 1 a 4) foram oxidados com doses de cloro suficiente para gerar um residual de cloro livre acima de 5 mg/L, ao final de um tempo de detenção superior a 72 horas. Esse procedimento foi adotado para evitar a contaminação do Lago Paranoá, uma vez que esse manancial é utilizado para recreação da cidade de Brasília e entorno.

### 4.3 – MÉTODOS ANALÍTICOS

A Tabela 4.1 mostra, de forma resumida, os parâmetros avaliados, os métodos e os equipamentos utilizados durante a realização do trabalho.

Tabela 4.1 – Parâmetros avaliados, métodos e equipamentos utilizados no trabalho.

Característica	Método	Equipamento
Cloro residual livre e total (mg/L)	Colorimétrico DPD	Espectrofotômetro (HACH/DR-2010)
pH	Potenciométrico	pHmetro ORION/ MODELO 310
Subprodutos da cloração (µg/L)	THM, CH, CP, HAN, HC (USEPA 551.1)	Cromatógrafo a gás (CG), da marca Varian, modelo 3600CX
	AHA (USEPA 552.2)	
Saxitoxinas (µg/L)	Cromatografia líquida	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com derivatização pós-coluna e detecção de fluorescência (CLAE-DFL)
Temperatura (°C)	-	Termômetro de mercúrio e termômetro digital

O método utilizado para a determinação do cloro residual livre e cloro total foi o DPD colorimétrico com leituras em espectrofotômetro da marca HACH, modelo DR 2010, programa nº 80 com curva de calibração de DPD variando de 0,1 a 2,2 mg/L de concentração, em comprimento de onda de 530 nm em cubeta de vidro de 10 mL. Esse método equivale às diretrizes estabelecidas pelo *Standard Methods* para a determinação do cloro livre e do cloro total (APHA, AWWA, WPCF, 2005). A Figura 4.15 mostra o espectrofotômetro que foi utilizado para medir a presença de residual de cloro livre e de cloro total.



Figura 4.15 – Espectrofotômetro utilizado para medir cloro livre e cloro total

#### 4.3.1 – Detecção de Saxitoxinas

O método utilizado para a detecção das saxitoxinas foi a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), também conhecido como HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*). A Figura 4.16 mostra o aparelho que foi utilizado na pesquisa no momento da realização de um dos ensaios para a detecção de saxitoxinas.



Figura 4.16 – Aparelho de CLAE para detecção de saxitoxinas

As análises das variantes neoSTX, dcSTX e STX, em CLAE, foram baseadas na metodologia descrita por Oshima (1995), que envolve a oxidação pós-coluna e detecção por fluorescência. As principais características do método são apresentadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Condições que foram adotadas para a análise de saxitoxinas

<b>Parâmetro</b>	<b>Condição ou descrição</b>
Coluna	Coluna de fase reversa C-18
Fase móvel	
Vazão	0,8 mL/min
Composição	Heptanosulfonato de sódio (2 mM) em 30 mM de fosfato de amônia, pH 7,1 e 3% de acetonitrila.
Reagente oxidante	
Vazão	0,4 mL/min
Composição	7 mM de ácido periódico (HIO <sub>4</sub> ) em 10 mM de tampão fosfato de potássio, pH 11,0
Reação	Tube de Teflon (10 m, 0,5 mm d.i) aquecido a 85°C
Acidificante	
Vazão	0,4 mL/min
Composição	Ácido Acético
<i>Detecção</i>	
Excitação	330 nm
Emissão	390 nm

No método mostrado na Tabela 4.4, foi utilizada a coluna C-18 no lugar da coluna C-8, conforme proposto por Oshima (1995). Isso aconteceu pelo fato da coluna C-18 ter demonstrado uma maior capacidade de separação das frações cromatográficas, quando Arantes (2004) realizou testes no Laboratório de Toxinologia/UnB para análise de saxitoxinas a partir da cepa T3 de *Cylindrospermopsis raciborskii*.

O sistema para análise de saxitoxinas consiste de uma bomba de alimentação da fase móvel (Shimadzu LC-20AT); um injetor de amostra com *loop* de 100 µL; uma coluna de fase reversa (Fusion-RP 80A, C-18, 150 x 4,6 mm, 4 microm – Phenomenex); duas bombas, sendo uma para injeção do ácido periódico em tampão fosfato de potássio e a outra para injeção do

ácido acético; um reator pós-coluna constituído de um tubo de Teflon (10 m de comprimento e 0,5 mm de diâmetro interno) aquecido a 80°C (Forno Shimadzu CTO-20A) e um detector de fluorescência (Shimadzu RF-551). A Figura 4.17 apresenta, de forma esquemática, o sistema de funcionamento da CLAE.

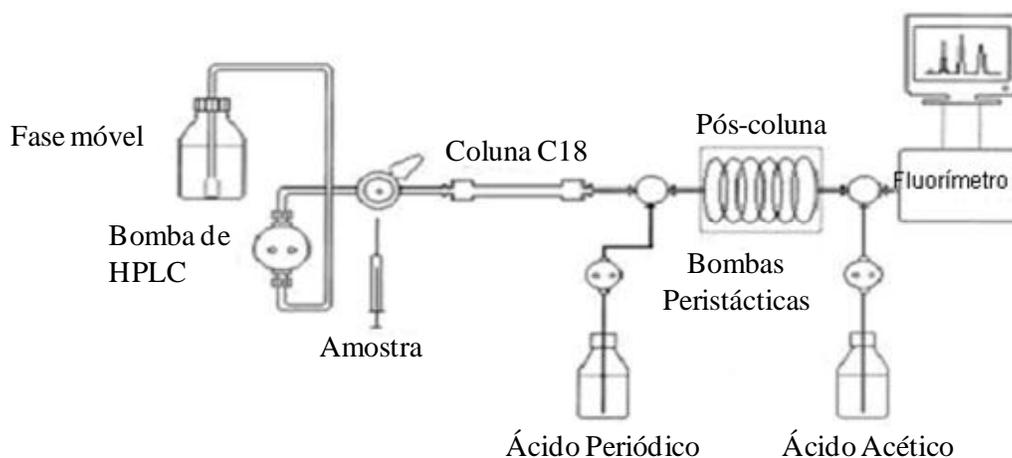


Figura 4.17 – Diagrama do sistema de CLAE com reator pós-coluna para a análise de saxitoxinas (Chen e Chon 2002, modificado).

Após passar pela coluna, a amostra recebia, continuamente, solução de ácido periódico em solução tampão de fosfato de potássio e durante a passagem pelo reator pós-coluna a mesma era oxidada, formando produtos que apresentavam fluorescência, permitindo a detecção das saxitoxinas no fluorímetro. Porém, antes de chegar ao fluorímetro, a amostra era acidificada com ácido acético com o objetivo de cessar a reação de oxidação. Por meio de um computador acoplado ao aparelho de CLAE, obtinha-se uma curva (cromatograma), cuja área abaixo da curva forneceu a concentração das saxitoxinas presentes na amostra.

A identificação da presença de cianotoxinas nas amostras foi feita por meio de comparação dos cromatogramas destas com as amostras de padrões, observando-se o tempo de retenção. A Figura 4.18 mostra o cromatograma das amostras dos padrões das variantes de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) utilizados neste trabalho.

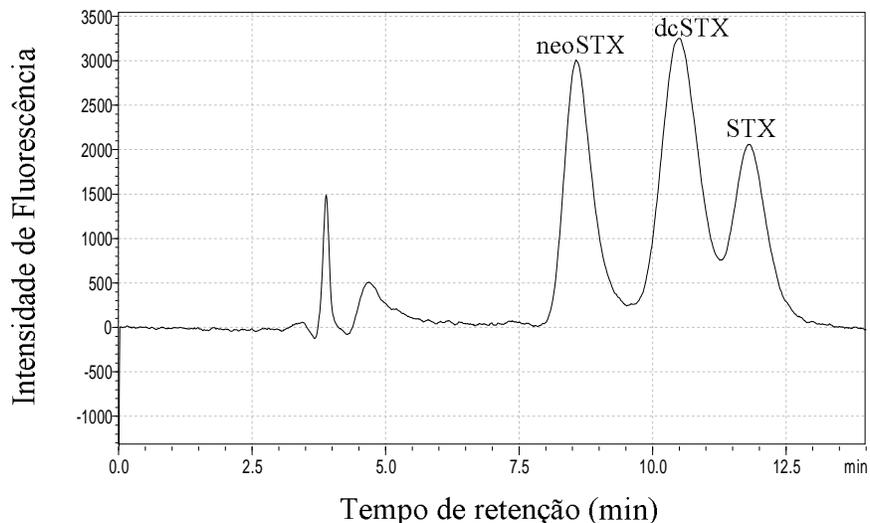


Figura 4.18 – Cromatograma das amostras de padrões de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX).

Os padrões de saxitoxinas utilizados na pesquisa foram adquiridos por meio de importação do *National Research Council Canada, Institute for Marine Biosciences, Halifax*.

A área da fração cromatográfica identificada como sendo cada variante de saxitoxina foi, então, quantificada a partir da curva de calibração específica para cada variante. No Apêndice D estão dispostas as curvas de calibração obtidas para as variantes neoSTX, dcSTX e STX, com ajuste linear e coeficiente de correlação ( $R^2$ ).

A ocorrência de degradação natural das saxitoxinas durante a duração dos testes foi também avaliada, tendo em vista que o procedimento geral, como preparação de vidrarias, preparação de soluções e demais controles para a realização de um ensaio, demorava, no mínimo, 3 horas para ser concluído. Assim, uma alíquota de 10 mL da água de estudo foi coletada no início do ensaio ( $t = 0$  hora), sendo imediatamente congelada para preservação até a análise em CLAE. Após 3 horas de ensaio, coletou-se uma nova alíquota de 10 mL da água de estudo e que foi também congelada para posterior análise. As alíquotas coletadas foram descongeladas ao mesmo tempo e analisadas em sequência. A Figura 4.19 mostra os cromatogramas referentes ao tempo zero ( $t = 0$  hora) e ao final de 3 horas dos ensaios ( $t = 3$  horas).

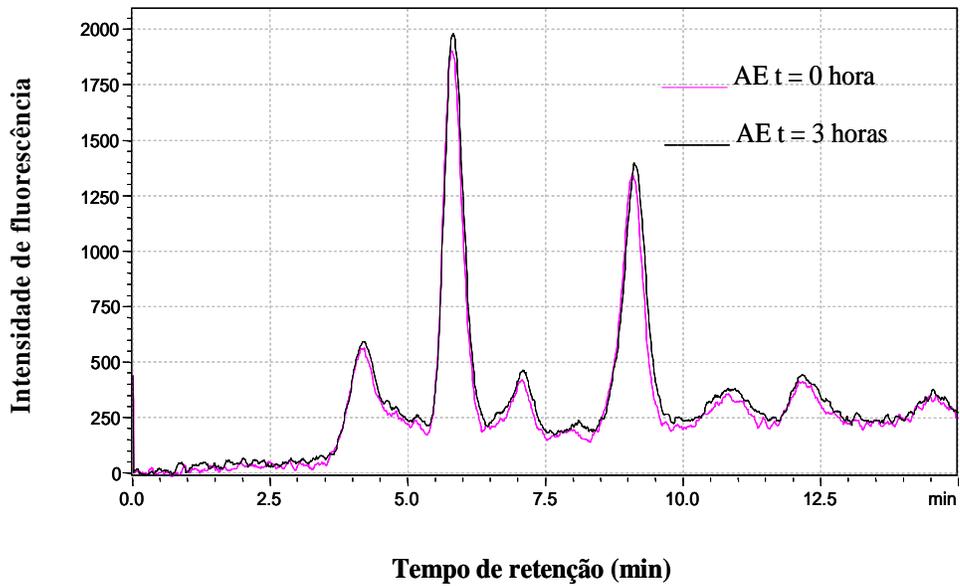


Figura 4.19 – Cromatogramas no tempo zero ( $t = 0$  hora) e ao final de 3 horas ( $t = 3$  horas) da água de estudo 1 (AE1)

A Figura 4.19 revela que não houve alteração da água de estudo ao longo de 3 horas, sendo descartada a possibilidade de degradação natural das saxitoxinas durante o tempo mínimo dos ensaios.

#### 4.3.2 – Determinação de Subprodutos

As análises para detecção e quantificação dos subprodutos foram realizadas no Laboratório de Recursos Hídricos da UNAERP, em Ribeirão Preto – SP, sob a responsabilidade da Professora Dra. Cristina F. P. R. Paschoalato. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a gás (CG), da marca Varian, modelo 3600CX, com detetor de captura de elétrons (DCE). A Figura 4.20 mostra o aparelho que foi utilizado nesta etapa da pesquisa.



Figura 4.20 – Cromatógrafo a gás utilizado nas análises de subprodutos

As metodologias de cromatografia utilizadas foram validadas por Paschoalato (2005). A utilização de procedimentos de extração são requisitos preliminares para as análises de compostos orgânicos por meio da técnica analítica de cromatografia gasosa. Para atender a proposta de realização deste trabalho, foi necessária a utilização de duas extrações distintas, uma para a determinação de trialometanos, cloro hidrato, haloacetoneitrilas, haloacetonas e cloropicrina e a outra para determinação de ácidos haloacéticos. Os extratos obtidos foram analisados por métodos distintos.

Foram realizados diversos ensaios de extração para a verificação da recuperação analítica e padronização do procedimento, pois a determinação do volume de amostra em função do volume de solvente utilizado é importante para a completa extração.

#### 4.3.2.1 – Determinação de trialometanos, cloro hidrato, cloropicrinas, haloacetonas e haloacetoneitrilas

Os métodos utilizados para a extração de trialometanos, cloro hidrato, cloropicrinas, haloacetonas e haloacetoneitrilas foram baseados no procedimento descrito pela USEPA 551.1 (1995).

As condições de operação do equipamento (Figura 4.20) não são idênticas e podem apresentar variações de um equipamento para outro. Devido a esse fato, houve a necessidade de se

adequar diversas condições na metodologia referenciada (Paschoalato, 2005). A Tabela 4.3 mostra os parâmetros e as condições utilizadas nas análises de trialometanos, cloro hidrato, cloropicrinas, haloacetonas e haloacetoneitrilas.

Tabela 4.3 – Parâmetros e condições utilizadas na determinação de trialometanos, cloro hidrato, cloropicrinas, haloacetonas e haloacetoneitrilas

<b>Parâmetro</b>	<b>Condição ou descrição</b>
Coluna	J & W-DBI, 30 m x 0,32 mm ID e 5 µm filme.
Vazão	Gás de arraste nitrogênio com vazão de 3,6 mL/min, 74 cm/s com pressão de 15 psi (1,071 atm).
Temperatura do injetor	160°C
Temperatura do detector	290°C
Temperatura inicial	40°C por 1 min, rampa de aquecimento até 125°C numa razão de 5°C/min, rampa de aquecimento até 150°C numa razão de 26°C/min e permanece em 150°C por 3 min.
Vazão de divisão de amostra	2 mL/min e sensibilidade 1
Tempo total aproximado	23 min para cada análise
Volume de extrato injetado	1 µL

Por este método foram determinados os seguintes compostos:

- Trialometanos (THM): clorofórmio, bromodiclorometano, dibromoclorometano, bromofórmio.
- Cloro hidrato (CH).
- Haloacetoneitrilas (HAN): dicloroacetoneitrila, tricloroacetoneitrila, dibromoacetoneitrila, tribromoacetoneitrila, bromocloroacetoneitrila.
- Halopicrina (HP): cloropicrina.
- Haloacetonas (HC): 1,1-dicloropropanona, 1,1,1-tricloropropanona.

O composto utilizado como padrão interno (PI) foi o diclorometano, grau cromatográfico, marca J.T. Baker e foram utilizados os seguintes padrões para calibração:

- Padrão misto de trialometanos, marca Supelco (48140-U) para THM.
- Padrão misto de halogenados voláteis (EPA 551 B), marca Supelco (48046), para haloacetoneitrilas, cloropicrina e haloacetonas.

- Padrão puro de cloro hidratado, marca Supelco (47335-U).

A Figura 4.21 mostra um cromatograma típico que se obteve quando da elaboração de um dos pontos da curva de calibração, especificamente o ponto 3, mostrado na Tabela resumo da curva analítica de calibração dos trialometanos, cloro hidratado, cloropicrinas, haloacetonas e haloacetoneitrilas. Detalhes adicionais sobre a extração e determinação de trialometanos, cloro hidratado, cloropicrinas, haloacetonas e haloacetoneitrilas são apresentados no Apêndice E.

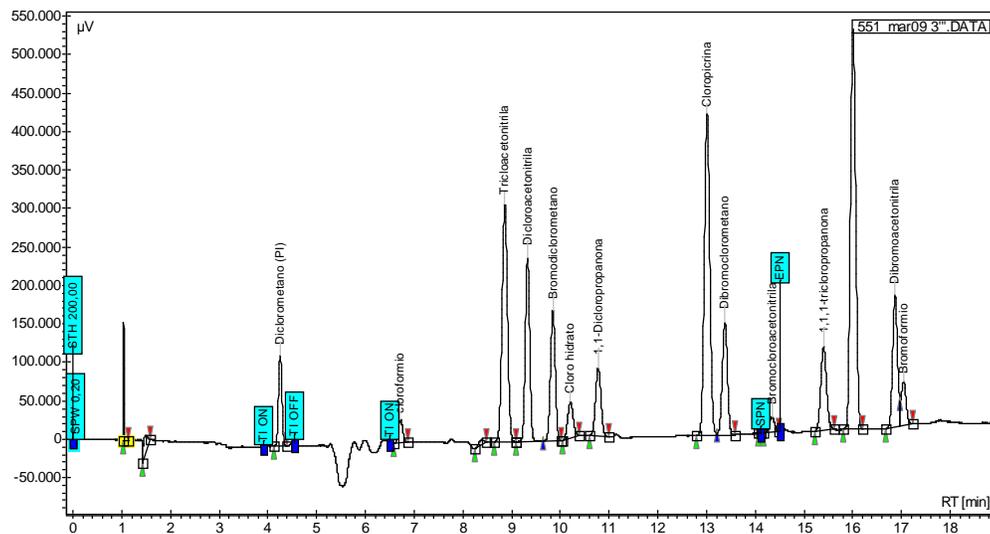


Figura 4.21 - Cromatograma típico obtido na calibração de trialometanos, cloro hidratado, cloropicrinas, haloacetonas e haloacetoneitrilas - ponto 3 (Apêndice E, Tabela E.1)

#### 4.3.2.2 – Determinação de ácidos haloacéticos

As extrações utilizadas para as determinações dos ácidos haloacéticos foram adaptadas do método USEPA 552.2 (1995). Uma reação de derivatização foi necessária para transformar os ácidos em ésteres e o procedimento foi efetuado por uma metilação ácida.

Embora o método utilizado para a determinação cromatográfica seja baseado nas recomendações da USEPA 552.2, as condições de operação do equipamento não são idênticas e podem variar de um equipamento para outro. Devido a esse fato, houve a necessidade de se adequar diversas condições que são variáveis na metodologia.

As condições cromatográficas otimizadas para a determinação dos AHA são mostradas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Parâmetros e condições utilizadas na determinação de ácidos haloacéticos

Parâmetro	Condição ou descrição
Coluna capilar	DB-1701, 30 m, 0,32 mm ID, 0,25 µm de filme
Gás de arraste	Nitrogênio
Temperatura do injetor	250°C
Temperatura do detector	300°C
Vazão	1,4 mL/min, velocidade de 29 cm/s em 6psi (0,428atm)
Sensibilidade	10 (sem divisão de amostra)
Temperatura isoterma	40°C por 3 min, aquecimento a 130°C numa razão de 4°C/min durante 2 min, aquecimento a 180°C numa razão de 10°C/min durante 5 min
Tempo total aproximado de corrida analítica	31,50 min

Para a elaboração da curva de calibração, foi utilizada uma mistura de padrões da marca Supelco (4-7787), originalmente dissolvido em meio MTBE com os seguintes compostos de ácidos haloacéticos (AHA): ácido monocloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético, ácido monobromoacético, ácido dibromoacético, ácido tribromoacético, ácido bromocloroacético, ácido bromodicloroacético e ácido dibromocloroacético. A Figura 4.22 mostra um cromatograma típico que se obteve quando da elaboração de um dos pontos da curva de calibração, especificamente o ponto 7, mostrado na Tabela resumo da curva analítica de calibração do ácidos haloacéticos (AHA), colocada no Apêndice E, onde é possível também obter detalhes adicionais sobre a determinação desses subprodutos.

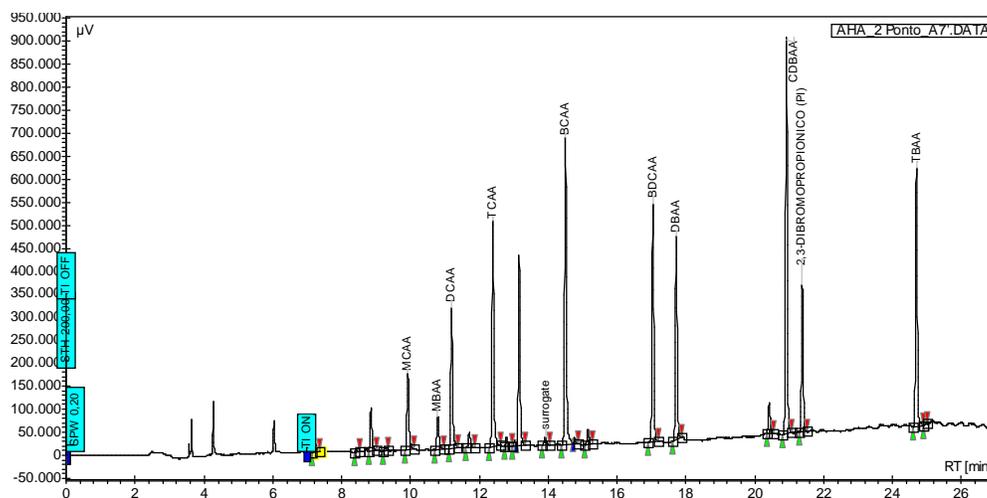


Figura 4.22 - Cromatograma típico de calibração de ácidos haloacéticos – ponto 7 (Apêndice E, Tabela E.2)

## 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 – ENSAIOS DE OXIDAÇÃO DE SAXITOXINAS EM PRESENÇA DE OUTROS COMPOSTOS EXTRACELULARES (ETAPAS 1 E 2)

#### 5.1.1 – Etapa 1

Para os ensaios de oxidação com cloro realizados na Etapa 1, optou-se, como descrito na metodologia, por utilizar apenas o tempo de contato de 30 minutos, sendo o cloro o agente oxidante. A Tabela 5.1 mostra as condições dos ensaios que foram realizados.

Tabela 5.1 – Condições de avaliação do ensaio de oxidação de saxitoxinas com cloro utilizando a água de estudo 1 (AE1) ajustada para os valores pH 5,0, 5,5 e 6,0 (Etapa 1)

N° do ensaio	Doses médias de cloro aplicadas (mg/L) (n = 2)	pH* da AE1	Concentrações iniciais médias de saxitoxinas (µg/L) (n = 2)		
			neoSTX	dcSTX	STX
1	2,8; 7,3; 16; 26 e 32	5,0	83,3	4,8	2,5
2	3,8; 8; 14; 21 e 29	5,5	86,2	6,6	ND
3	1,7; 5; 7,7; 13 e 18	6,0	73,7	ND	2,8

Legenda: ND = Não Detectado; n = número de amostras utilizadas; \* valor de pH ajustado

Nos ensaios realizados, procurou-se aproximar as doses de cloro aplicadas aos valores de referências de 2 mg/L, 6 mg/L, 12 mg/L, 18 mg/L e 24 mg/L, as quais foram as doses inicialmente propostas para este trabalho. No entanto, devido à alta concentração da solução de hipoclorito de sódio, e outras interferências externas, como a variação na pipetagem da solução, as doses resultaram em valores diferentes da proposta inicial. Assim, os valores das concentrações de cloro mostradas na Tabela 5.1 representam a média dos valores medidos nos frascos de controle de dose, chamado de “branco”, realizado em duplicata para cada valor aplicado.

Quanto à concentração das variantes de saxitoxinas, é possível observar na Tabela 5.1 que a mesma permaneceu sempre alta, particularmente a variante neoSTX, cuja concentração inicial foi superior a 20 vezes ao valor máximo recomendado pela Portaria n° 518/2004 para águas destinadas ao consumo humano, que é de 3,0 µg/L de equivalentes STX/L. As outras duas

variantes de saxitoxinas analisadas também se faziam presentes, mas em menores concentrações. Os valores apresentados das variantes de saxitoxinas representam a média de duas leituras realizadas por CLAE, sendo realizada uma terceira análise, eventualmente, para confirmação dos dois primeiros resultados. É importante destacar que os limites de detecção do equipamento para as três variantes de saxitoxinas foram 1,3 µg/L, 0,7 µg/L e 0,6 µg/L, respectivamente para a neoSTX, dcSTX e STX.

Os resultados da Etapa 1 do trabalho apresentaram alguma dispersão, pois se tratava de uma fase da pesquisa na qual os procedimentos metodológicos ainda estavam sendo ajustados (etapa preliminar).

Nesta etapa, em particular, os valores do pH na água de estudo 1 (AE1) variaram de 7,4 a 7,8, a temperatura do ar variou entre 22°C e 26°C e a temperatura da AE1 durante os ensaios variou entre 18°C e 25°C. O valor do pH da água de estudo, em cada ensaio, foi corrigido com solução de ácido clorídrico 1 N para 5,0; 5,5 e 6,0. Devido ao fato da temperatura da amostra ter apresentado uma variação de 7°C, foi necessário adotar um monitoramento mais rigoroso da temperatura ambiente e da amostra, para isso, foi necessária a utilização de uma sala climatizada que proporcionasse menos variação da temperatura. Essa sala foi utilizada durante as Etapas 3 e 4 do trabalho.

Como quase todas as doses do oxidante utilizado apresentavam concentrações elevadas de cloro, acima de 2 mg/L, houve a necessidade de se fazerem diluições nas amostras coletadas para medição do cloro residual, pois o limite superior do método usado para a detecção era de 2,2 mg/L, ocasionando atraso na análise. Conseqüentemente, para doses elevadas, o tempo de contato, para efeito de determinação do cloro residual, foi maior do que o originalmente previsto.

Apesar do contratempo da necessidade de diluições das amostras nas determinações do cloro residual, houve uma tendência de comportamento comum em todos os ensaios realizados. A Figura 5.1 mostra as concentrações de cloro livre e de cloro combinado depois de um tempo de contato de cerca 30 minutos, em relação à média aritmética simples da dose de cloro aplicada em cada sequência de ensaio. A Figura 5.2 mostra as variações das concentrações de saxitoxinas para as diferentes doses de cloro aplicadas e para os três valores de pH avaliados.

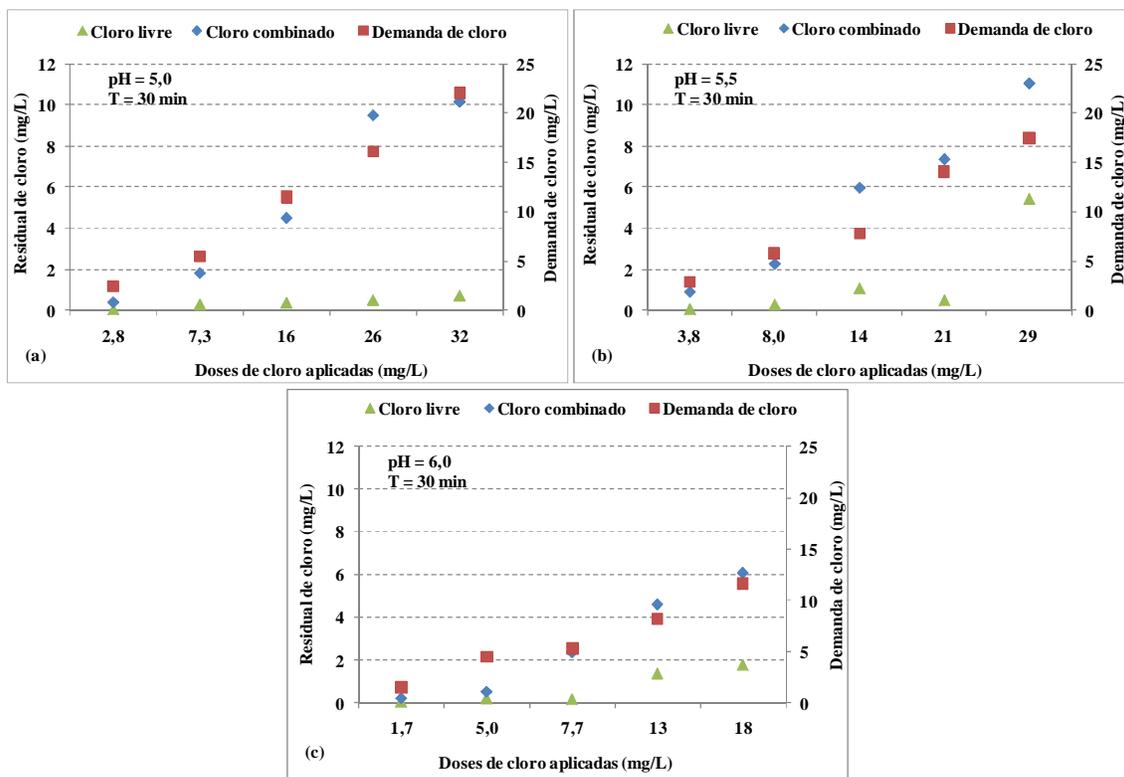


Figura 5.1 – Doses de cloro aplicadas e residuais de cloro livre e de cloro combinado em valores de pH 5,0 (a), 5,5 (b) e 6,0 (c) após um tempo de contato de 30 minutos.

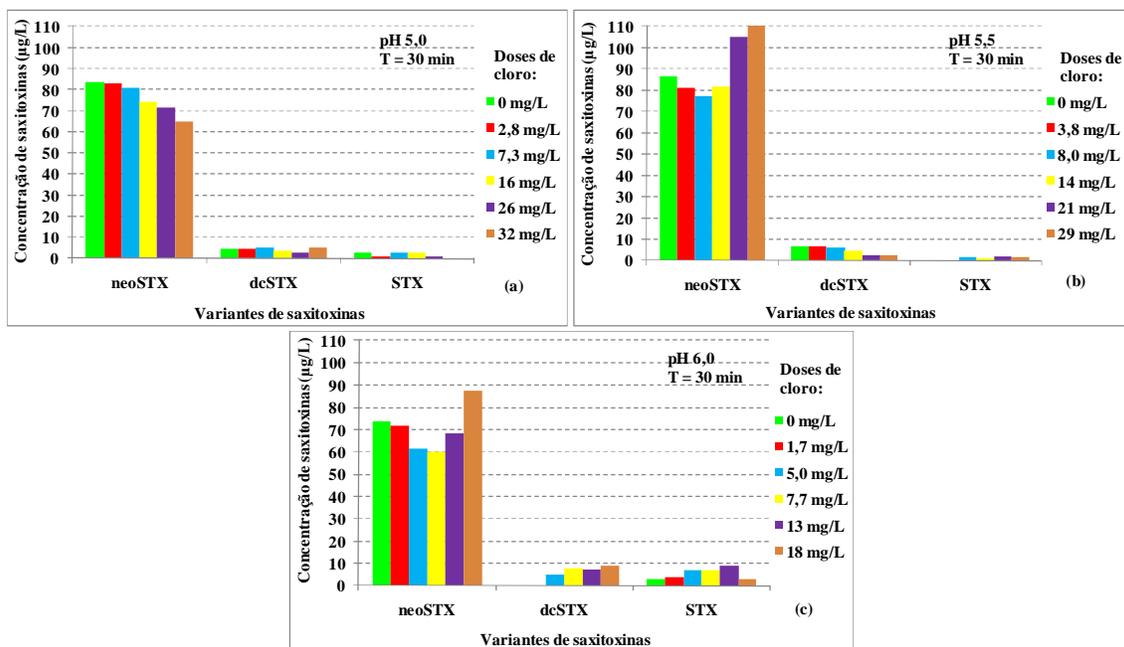


Figura 5.2 - Concentrações iniciais e finais de saxitoxinas para diferentes doses de cloro e valores de pH 5,0 (a), 5,5 (b) e 6,0 (c) após um tempo de contato de 30 minutos

De modo geral, ao aplicar uma dose entre 1,7 mg/L a 3,8 mg/L de cloro, ocorreu o consumo quase que total do cloro residual livre. Porém, com a adição de doses acima de 5 mg/L, foram observados residuais, chegando a valores maiores do que 4 mg/L para o cloro livre e de 10 mg/L para o cloro combinado.

Os valores das concentrações de cloro medidas nos frascos de controle (branco “a” e branco “b”), no tempo de contato 30 minutos, representaram as doses efetivamente aplicadas, de modo que a demanda de cloro observada foi atribuída às reações de oxidação entre as saxitoxinas e outros compostos intracelulares presentes na água de estudo. As demandas de cloro (Figura 5.1) foram calculadas através da diferença entre a dose aplicada e o residual de cloro em função do tempo de contato. Nesse caso, para todas as doses de cloro aplicadas, a demanda ficou acima de 50%; contudo, essa alta demanda de cloro não contribuiu para uma remoção satisfatória das saxitoxinas.

Ao adicionar dose de cloro maiores que 2 mg/L à solução contendo as três variantes (neoSTX, dcSTX e STX), observaram-se mudanças nos valores das concentrações dessas saxitoxinas, havendo reduções e aumentos no valor das variantes em função do valor do pH (Figura 5.2).

Dos resultados mostrados na Figura 5.2, é possível observar que a neoSTX, presente em elevada quantidade, não foi removida significativamente, mesmo com o uso de doses elevadas de cloro e presença de residual desse composto. De fato, no caso dos valores de pH 5,5 e 6,0, houve uma tendência inicial à redução da concentração com o aumento da dose de cloro, porém, com o uso de doses mais elevadas, a concentração de neoSTX voltou a crescer, sugerindo a possibilidade de transformação entre variantes ou alguma interferência de produtos oriundos da lise celular na detecção dessa toxina. O comportamento da dcSTX e da STX foi aleatório, porém com tendência ao aumento no valor de pH mais elevado (pH 6,0).

Esse comportamento aleatório da dcSTX e da STX, frente às diferentes concentrações de cloro, pode ser devido às transformações que ocorrem entre as variantes das saxitoxinas, conforme relatado em diversos trabalhos (Shimizu e Yoshika, 1991; Indrasena e Gill, 1999; Sako *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2004). Essa hipótese foi investigada nas etapas seguintes deste trabalho.

É importante ressaltar que, nas análises por CLAE, os limites das áreas formadas são determinados pelo analista, para que o programa possa calcular a área sob o pico. Isso pode levar a alguns erros no resultado das concentrações de saxitoxinas. Daí porque as análises da etapa inicial foram repetidas nas demais etapas da pesquisa, a fim de se confirmarem tais resultados.

Ainda na Etapa 1 do trabalho, cogitou-se a possibilidade de haver interferência do uso do tiosulfato de sódio como agente desclorante na detecção das variantes de saxitoxinas, quando da neutralização do cloro após o tempo de contato. Para avaliar uma possível interferência desse produto com o cloro na análise de saxitoxinas por CLAE, foram feitos testes acrescentando doses de cloro e, imediatamente após, o tiosulfato de sódio nas amostras de água de estudo, evitando-se a oxidação das saxitoxinas. Em seguida, a amostra da AE1 e as amostras de AE1 com cloro e com tiosulfato foram injetadas no CLAE, apresentando cromatogramas idênticos. Esse teste indicou não haver influência mensurável do tiosulfato de sódio na formação dos cromatogramas.

### **5.1.2 – Etapa 2**

Foram realizados ensaios com a água de estudo (AE1) contendo saxitoxinas e outros produtos provenientes da lise celular, de maneira análoga à Etapa 1, porém utilizando-se os tempos de contato de 30 e de 60 minutos e uma ampla faixa de valores de pH (4,0 a 11,0). Os testes consistiram em duas fases com a mesma configuração, sendo realizados em duplicata. A primeira fase consistiu em adotar as mesmas doses de cloro livre da etapa inicial, enquanto que a segunda fase consistiu em utilizar as doses que alcançavam melhor remoção, procurando otimizá-las de acordo com o pH da amostra e a concentração de saxitoxinas presentes. A Tabela 5.2 mostra as condições dos ensaios realizados nesta etapa da pesquisa.

Tabela 5.2 – Condições de realização dos ensaios de oxidação na AE1 utilizando cloro (Etapa 2)

N° do ensaio	Doses médias de cloro aplicadas (mg/L) (n = 2)	pH* da amostra	Concentrações médias iniciais de saxitoxinas (µg/L) (n = 2)		
			neoSTX	dcSTX	STX
01	10,1 e 32	4,0	76,7	31,5	31,8
02	9,3 e 31	5,0	58,7	12,3	19,7
	34,6 e 41		73,1	5,8	8,3
	54 e 78		60,2	13,1	17,9
03	26 e 34	6,0	35,0	2,2	2,7
	57 e 79		86,1	15	19,1
04	8 e 29	6,5	56,5	7,8	11,4
05	10,5; 36 e 57	7,0	51,8	2,9	4,4
	14 e 17		71,7	3,4	4,1
06	1,5 e 2,6	8,0	79,7	2,7	4,6
	5,4 e 7,9		46,6	4,2	6,2
	11 e 37		20,6	5,7	9,5
07	1,3 e 3,4	8,5	85,3	5,2	5,9
08	3,4; 6,9; 14; 19 e 28	9,0	116,3	5,4	7,4
	9,1 e 32		27,5	6,0	9,9
	4,9 e 8,2		51,9	7,9	10,0
	1,6 e 3,6		32,1	3,4	4,6
09	1,5 e 3,2	9,5	72,6	3,0	3,7
10	0,8 e 3,8	10,0	75,0	ND	ND
	9,2 e 30		95,1	2,1	1,8
11	0,9 e 2,9	11,0	56,5	ND	ND

Legenda: ND = Não Detectado; n = números de amostras utilizadas; \* valor de pH ajustado

Os ensaios com os dados de entrada mostrados na Tabela 5.2 foram realizados com a temperatura do ar variando entre 24°C a 27°C e a temperatura da AE1 variando entre 23°C a 26°C.

O pH natural da água de estudo variou de 6,1 a 8,1, portanto, para se conseguir os valores de pH apresentados na Tabela 5.2, fez-se uso do ácido clorídrico, quando a intenção era diminuir o valor do pH, e do hidróxido de sódio, quando a intenção era aumentar o valor do pH.

A rotina dos ensaios de oxidação nesta etapa da pesquisa foi a mesma da Etapa 1 (item 5.1.1), o que significa que, em cada experimento, tinha-se uma água de estudo com concentração inicial diferente de saxitoxinas para cada ensaio realizado.

Com relação ao comportamento do oxidante durante os ensaios, verificou-se uma grande variabilidade das doses aplicadas. As Figuras 5.3 e 5.4 mostram as doses de cloro aplicadas e os residuais obtidos.

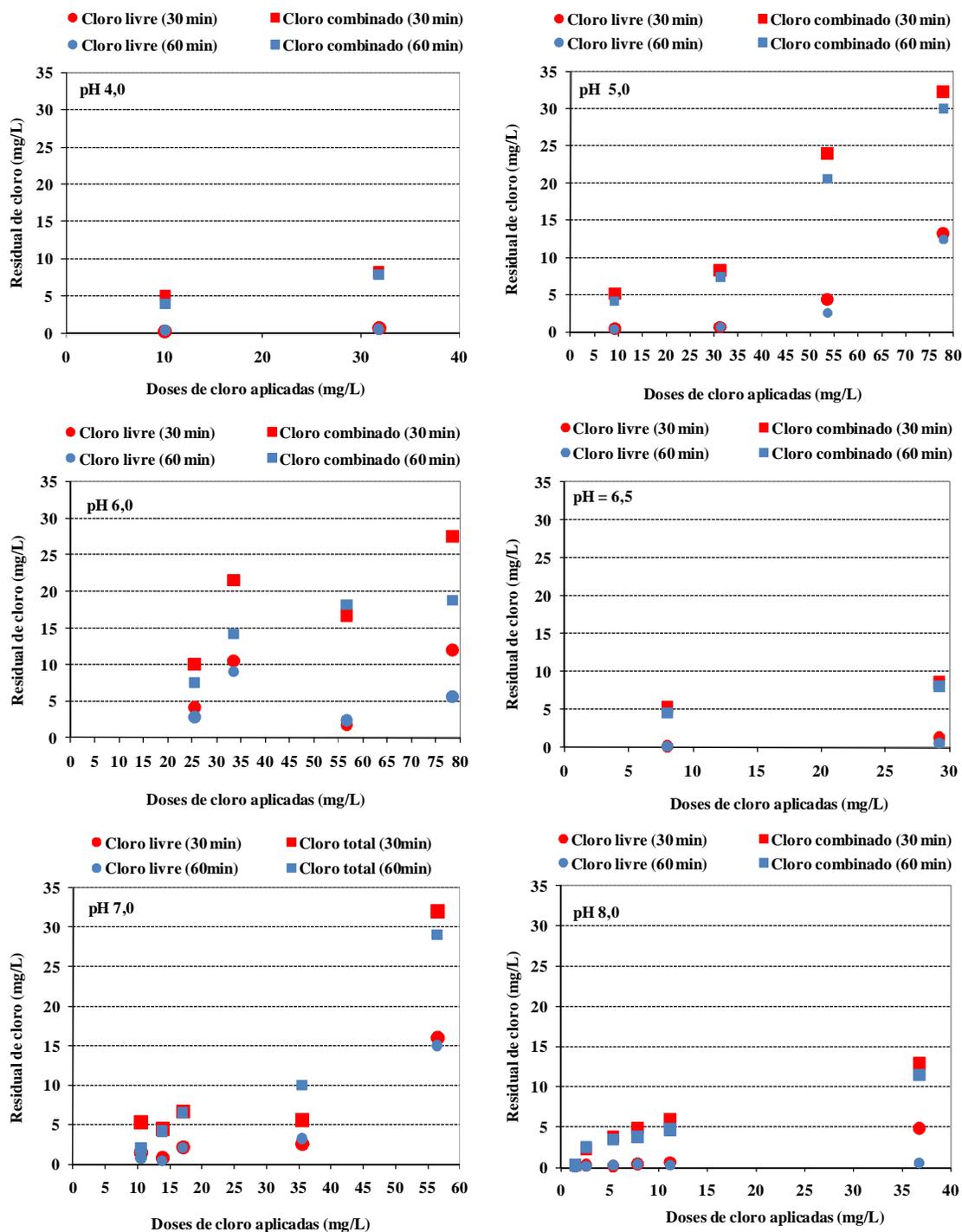


Figura 5.3 – Doses de cloro aplicadas, com respectivos residuais, em amostras de pH 4,0; 5,0; 6,0, 6,5; 7,0 e 8,0 após os tempos de contato de 30 e de 60 minutos.

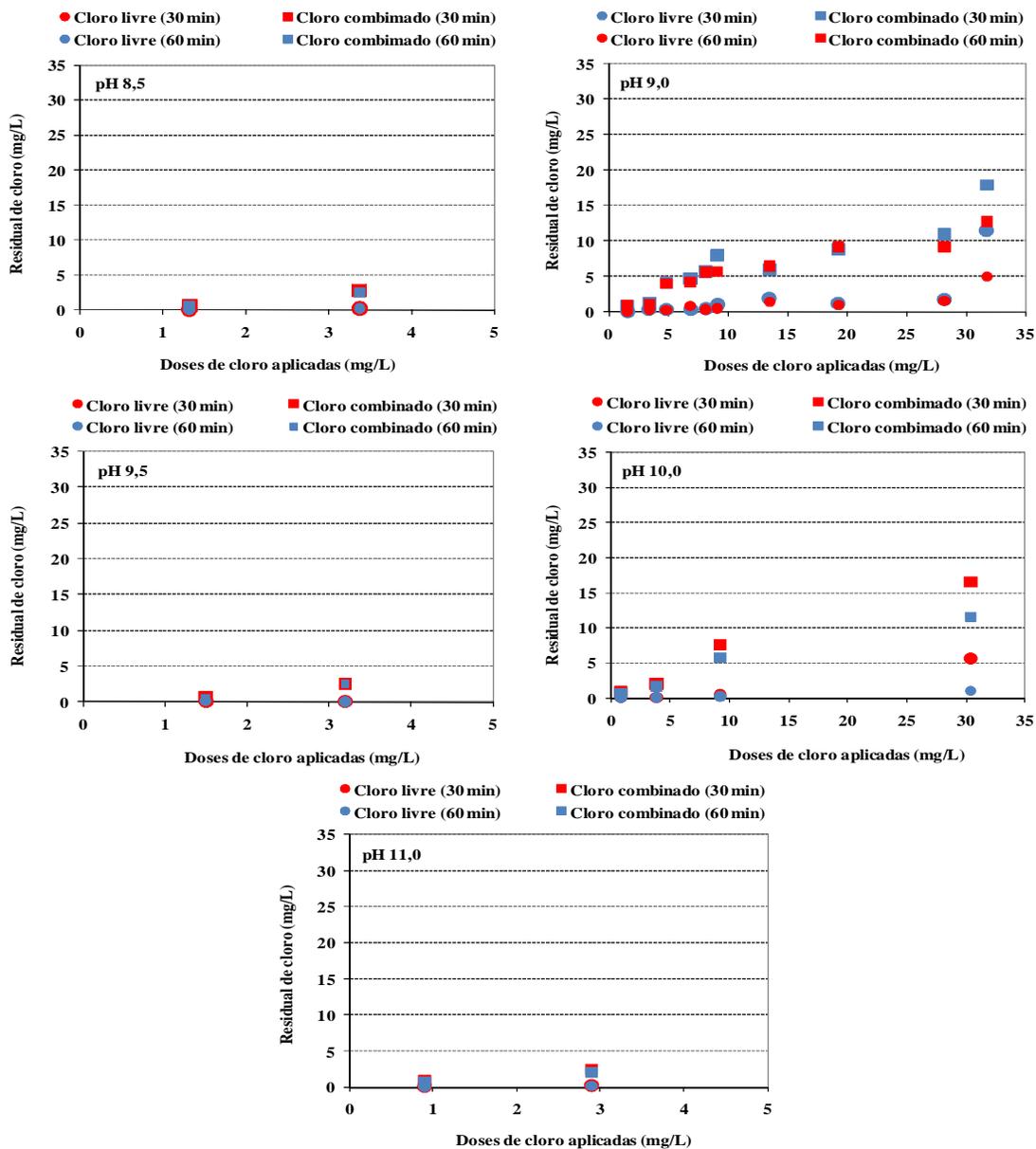


Figura 5.4 – Doses de cloro aplicadas com respectivos residuais, em amostras de pH 8,5; 9,5; 10,0 e 11,0 após os tempos de contato de 30 e de 60 minutos.

Descontando-se o valor do cloro residual livre do valor do residual total (determinados pelo método DPD), a determinação de cloro combinado, ao final do tempo de contato, indica a presença de cloraminas, mas não foram determinadas sob quais formas de cloraminas (monocloramina, dicloramina ou tricloramina) estavam presentes nas amostras. Entretanto, com base nos valores do pH em que os ensaios foram conduzidos, pode-se estimar a predominância de cada uma das formas de cloraminas presentes, conforme relatado por Symons *et al.* (1982). Em valores de pH acima de 8,5 há apenas monocloraminas; em pH 7, cerca de 50% é monocloramina e entre os valores de pH 4,4 e 5,0 há apenas dicloramina. As

quantidades de mono, di e tricloraminas assumem importância, tendo em vista que esses compostos apresentam entre si diferentes poderes de oxidação: as dicloraminas têm maior efeito oxidativo, seguida das monocloraminas, enquanto que as tricloraminas praticamente não apresentam nenhum efeito oxidante.

Provavelmente, o principal fator responsável pela formação de cloraminas (cloro combinado) tenha sido a presença dos compostos organo-nitrogenados presentes na AE1 (saxitoxinas e outros produtos da lise). Shang e Blatchley (2001) estudaram o destino e a distribuição do cloro em soluções aquosas de culturas de bactérias. As soluções foram submetidas à cloração em diferentes concentrações iniciais de cloro. Curvas de cloração ao *breakpoint* 'falso-positivas' foram observadas, provavelmente devido à formação de compostos cloro-organo-nitrogenados. Os resultados indicaram a existência de cloramina residual na forma de cloramina orgânica. Além disso, investigações confirmaram que as células das bactérias foram a fonte dos compostos orgânicos contendo nitrogênio. Ocorrência semelhante pode ter havido na oxidação das moléculas de saxitoxinas, tendo em vista a presença de nitrogênio na constituição química dessas substâncias e de várias outras liberadas pela lise celular e, portanto, presentes na AE1.

Os estudos de Strichartz (1984) e de Llewellyn (2006), sobre a molécula de saxitoxinas, indicam que um dos possíveis locais de reação de transformação ou oxidação está no grupo guanidino C8 (Figura 3.8). Esse local é formado por compostos de amina ligados ao átomo de carbono ( $C=NH_2$ ). Diante de um processo de oxidação, esse seria um possível local de quebra da molécula, que pode resultar em interconversão entre as variantes de saxitoxinas e outras transformações inesperadas, inclusive a formação de cloraminas.

De maneira análoga ao que ocorreu na Etapa 1 do trabalho, com a adição de doses elevadas de cloro, houve um elevado residual de cloro combinado, independentemente do valor do pH e do tempo de contato. Por outro lado, os valores de cloro livre resultantes não foram expressivos, inclusive diante da aplicação de doses próximas ao valor de 15 mg/L (Figuras 5.3 e 5.4). Nesse caso, a maioria do cloro livre residual medido ficou abaixo de 0,5 mg/L.

Observou-se que, após 30 min de tempo de contato, as maiores doses de cloro aplicadas (78 mg/L em pH 5 e 79 mg/L em pH 6), forneceram residuais de cloro combinado de 32 mg/L e 28 mg/L. Esses residuais elevados não são uma boa indicação no processo de tratamento de água potável, mesmo que tais aplicações resultassem na eliminação das saxitoxinas, pois podem ser um campo propício para o surgimento de outros subprodutos clorados prejudiciais à saúde.

Maiores residuais de cloro combinado foram medidos em amostras com o pH ácido, pois foi necessário utilizar doses maiores de cloro para remover as saxitoxinas. Contudo, como pode ser observado na Figura 5.4, à medida que se aumentou o valor do pH, reduziram-se as doses de cloro aplicadas, o que resultou, conseqüentemente, em residuais de cloro combinado mais baixos.

A Figura 5.5 mostra as concentrações iniciais e finais de saxitoxinas para diferentes doses de cloro aplicadas, sob a influência dos valores de pH 5,0; 7,0 e 9,0 e tempos de contato de 30 e de 60 minutos. As Figuras com as demais doses de cloro e valores de pH são apresentadas no Apêndice F.

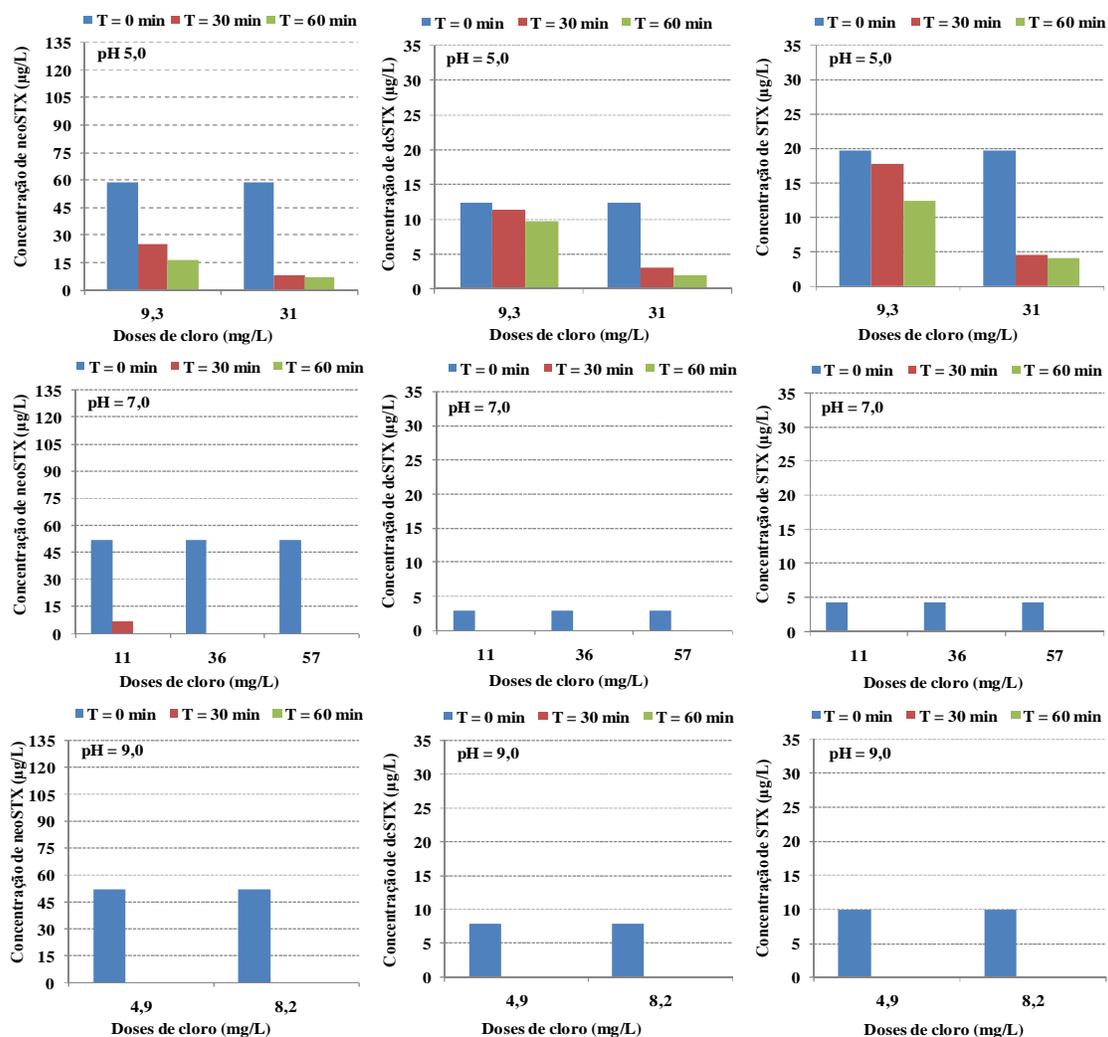


Figura 5.5 - Concentrações iniciais e finais de saxitoxinas para diferentes doses de cloro e valores de pH 5,0, 7,0 e 9,0 nos tempos de contato de 30 e de 60 minutos.

Na Figura 5.5, a dose máxima de cloro aplicada, quando se adotou o valor de pH 5,0 foi de 31 mg/L. As Figuras apresentadas no Apêndice F mostram doses adicionais de cloro utilizadas para oxidação, sendo possível observar que somente com doses mais elevadas ( $D > 50$  mg/L), foi possível remover as três saxitoxinas analisadas quando a água de estudo apresentava valor de pH ácido.

A Figura 5.5 mostra claramente que a remoção de neoSTX, dcSTX e STX é dependente do pH e das doses de cloro aplicadas. Considerando a água de estudo sob influência de três valores de pH (ácido, neutro e básico), observa-se que, para concentrações de neoSTX entre 50 e 60  $\mu\text{g/L}$  e doses de cloro praticamente na mesma ordem de grandeza, ocorreram remoções significativas de saxitoxinas à medida que o valor do pH da água de estudo foi colocado na condição de pH básico. Nessa condição, as doses de cloro aplicadas foram menores.

Em pH mais ácido (pH 4) e com doses de cloro em torno de 10 mg/L, ocorreram eficiências de remoção abaixo de 40% para todas as saxitoxinas estudadas neste trabalho. Porém, à medida que o pH tornava-se mais básico, com as doses de cloro praticamente no mesmo patamar, melhores eficiências foram obtidas; em alguns casos, como por exemplo, em valores de pH 8,0, 9,0 e 9,5, foram alcançadas eficiências significativas, particularmente para variantes dcSTX e STX, que não foram mais detectadas por CLAE.

Remião (2010), em comunicação pessoal, informou que, pelo fato das saxitoxinas serem um alcalóide, ou seja, terem característica básica, elas salificam quando em meio ácido (formam um sal por protonação de uma de suas aminas). Em meio básico, ficam na forma livre (não salificada) e é facilmente oxidada, muito provavelmente por oxidação dos grupos OH, tornando-se inativas. A mesma opinião é compartilhada por Vale (2010), que, em comunicação pessoal, destaca que as saxitoxinas são muito instáveis em pH elevado, mas conservam-se bem em pH baixo.

As considerações descritas podem explicar a melhor eficiência do cloro quando aplicado em amostras de saxitoxinas com pH básico. No entanto, deve ser observada a dose de oxidante aplicada, pois em pequenas concentrações, parece que o mesmo não é capaz de eliminar todas

as variantes de saxitoxinas. Pelo contrário, em alguns casos, mesmo em pH básico, a concentração de saxitoxinas pode aumentar.

O fato de ter ocorrido maior remoção de saxitoxinas em valores de pH básico, vai ao encontro dos trabalhos realizados por Strichartz (1984), Llewellyn (2006) e Oga *et al.* (2008), que relatam sobre a instabilidade da neoSTX, dcSTX e STX em valores de  $\text{pH} > 7$ , o que contribui para uma maior remoção dessas toxinas.

Quando se compara as concentrações de saxitoxinas na AE1 da Etapa 1 com a da Etapa 2, em valor de pH 5,0 (Figuras 5.2 e 5.5), verifica-se que a neoSTX, cuja concentração inicial foi mais elevada que as demais toxinas, teve decaimento em ambas as condições; entretanto, na Etapa 1, mesmo com o aumento da dose de cloro, a concentração final ainda foi elevada, enquanto que na Etapa 2, a remoção foi mais acentuada. Essa diferença de comportamento pode ser devido ao fato de que a relação entre a quantidade de saxitoxinas e os demais compostos oriundos da lise depende de vários fatores, entre eles a idade do cultivo, a intensidade da luz e temperatura e a degradação no período de armazenamento do cultivo. Com isso, a hipótese é de que, em cada ensaio, a relação entre a concentração de saxitoxinas e dos demais compostos orgânicos seja diferente e, portanto, as demandas de cloro sejam diferentes e estejam influenciando na oxidação das saxitoxinas. Ainda com relação à Etapa 2, foi observado que o aumento do tempo de contato de 30 para 60 minutos resultou em uma maior remoção de neoSTX e das demais variantes (dcSTX e STX), mesmo na condição de pH ácido.

Apesar da concentração inicial de saxitoxinas ter sido diferente para cada valor de pH (Apêndice F), foi possível observar uma maior remoção das variantes de saxitoxinas quando a dose de cloro foi próxima ou acima de 30 mg/L, principalmente nas condições de pH ácido. No entanto, mesmo para as doses abaixo de 10 mg/L de cloro, percebe-se que houve um decaimento da concentração de saxitoxinas ao longo do tempo.

Embora a neoSTX estivesse sempre em maior quantidade, uma possível explicação para a menor eficiência de remoção dessa variante (Figura 5.5 e Apêndice F) esteja na competição pelo cloro entre as saxitoxinas e os demais produtos da lise celular.

Wetzel (2001) explica que durante a lise das cianobactérias, um grande número de compostos orgânicos são liberados para a água. Esses compostos solúveis podem incluir ácido glicólico, carboidratos, polissacarídeos, aminoácidos, peptídeos, fosfatos orgânicos, substâncias voláteis, enzimas, substâncias hormonais, inibidores e toxinas. Diante dessa variedade de substâncias, parte da dose de cloro aplicada atua sobre elas, indicando a influência desses compostos presentes na água de estudo durante o processo de oxidação, o que pode explicar a pouca eficiência de remoção, principalmente, das doses de cloro mais baixas.

Ao avaliar as remoções entre os tempos de contato de 30 e de 60 minutos, é possível perceber que não ocorreu um comportamento sistemático de remoção das toxinas durante esses períodos de tempo. Contudo, em algumas situações, tanto em valores de pH ácidos como básicos, foi observado um incremento das remoções das variantes neoSTX, dcSTX e STX ao longo do tempo.

Como a água de estudo em cada valor de pH adotado apresentava uma concentração de saxitoxinas diferente, uma análise mais aprofundada fica comprometida; contudo, foi possível estabelecer uma comparação de eficiência de remoção entre os tempos de contato (T) aplicados, dentro de uma mesma amostra utilizada, conforme mostrado na Figura 5.5 e no Apêndice F.

Tomando como referência a variante neoSTX, é possível observar que o aumento do tempo de contato de 30 para 60 minutos acarretou elevação da eficiência de remoção dessa toxina. Em testes realizados com concentrações variando de 20 µg/L a 60 µg/L, valores de pH 7,0; 8,0 e 9,0 e doses de cloro entre 4,9 mg/L a 57 mg/L, a eficiência de remoção de neoSTX ficou acima de 99% ao final do tempo de contato de 60 minutos.

Resultado diferente de eficiência de remoção de neoSTX foi obtida por Viana-Veronezi *et al.* (2009), ao estudar a oxidação das variantes neoSTX e STX, oriundas do extrato de saxitoxinas provenientes da lise celular, cuja concentração inicial foi em torno de 15,8 µg/L. Os ensaios foram conduzidos com pH ajustado para valores entre 6,0 e 7,0 com as doses de cloro ativo de 0,9, 1,2 e 1,5 mg/L, produzidas a partir do hipoclorito de cálcio. Nesse contexto, os tempos de contato de 30 e de 60 minutos não foram relevantes na remoção dessas saxitoxinas. Talvez as baixas doses de cloro aplicadas possam explicar a pouca eficiência, a exemplo do que aconteceu em alguns testes realizados nesta etapa da pesquisa.

Dos resultados dos ensaios em que a concentração de neoSTX era muito elevada nas amostras da AE1 e a dose de cloro aplicada era baixa, é possível observar a ocorrência de remoção negativa de neoSTX (Apêndice F), ou seja, a concentração dessa toxina aumentava em baixa dose de cloro. Comportamento similar foi observado com a dcSTX, apesar da concentração mais baixa dessa variante. Freitas (2007) relata também a ocorrência desse fenômeno.

Esse fenômeno pode ser devido ao fato de que, em baixas concentrações de cloro, a oxidação das moléculas foi parcial, promovendo a quebra de alguns radicais específicos das saxitoxinas e, conseqüentemente, a transformação entre variantes e não a quebra efetiva da molécula. Considerando a possibilidade levantada por Lagos *et al.* (1999), de que a cepa T3 é capaz de produzir as variantes C1, C2, dcneoSTX, GTX2, GTX3 e GTX6, além da neoSTX, dcSTX e STX, não é surpresa a possibilidade de transformações associadas tanto à adição do oxidante como da alteração do valor do pH da água de estudo.

Vários autores (Fast *et al.*, 2006; Jaime *et al.*, 2007; Vale, 2006; Tao e Tian-Jiu, 2008 entre outros) relatam transformações das saxitoxinas que contém radical N-sulfocarbamoil em seus análogos do radical carbamato na posição 17 da molécula, por meio da perda do sulfato do grupo N-sulfocarbamoil. Assim, as toxinas C1, C2 e GTX6, eventualmente presentes, perdem o sulfato do grupo N-sulfocarbamoil, transformando-se, respectivamente, em GTX2, GTX3 e neoSTX. Essas transformações foram geralmente relatadas em valores de  $\text{pH} \leq 7,0$ , porém, indicam a facilidade de quebra da molécula nesse radical (R4, posição 17) que, por sua vez, pode ser objeto da ação inicial do cloro sobre a molécula. Para comprovar essa hipótese, é necessário realizar ensaios com cada toxina purificada e não na mistura.

A hipótese de que uma outra variante se transforma em neoSTX é reforçada pela presença de um sinal desconhecido próximo ao sinal da neoSTX. A Figura 5.6 mostra cromatogramas típicos de análises de CLAE, onde é possível identificar os sinais e os tempos de saída das saxitoxinas caracterizadas no trabalho (neoSTX, dcSTX e STX) e os sinais “desconhecidos” com seus respectivos tempos de saída.

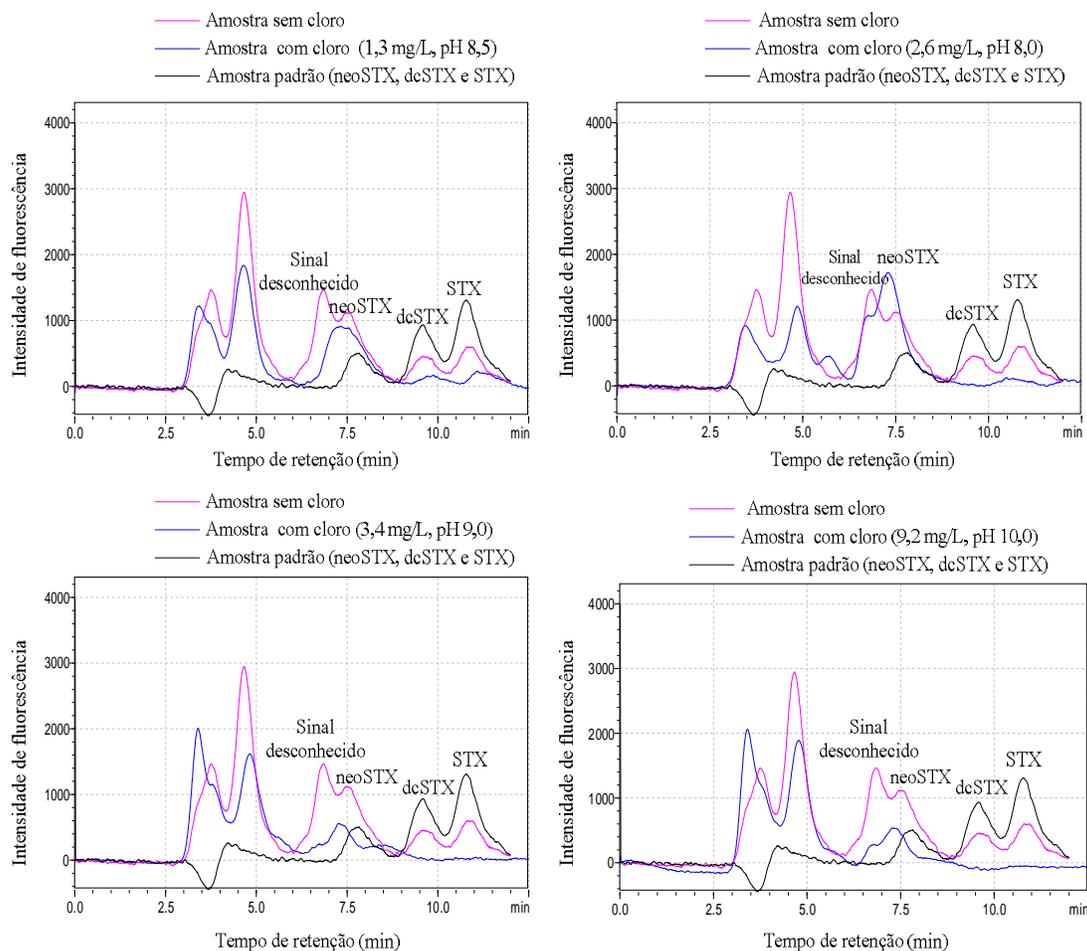


Figura 5.6 – Cromatogramas de amostra sem cloro, amostra com cloro e padrão de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX)

A Figura 5.6 mostra claramente que há um sinal, não identificado, aderido ao sinal da neoSTX. Após adicionada uma determinada dose de cloro (principalmente baixas doses), o sinal “desconhecido” tinha seu tamanho reduzido, enquanto o sinal da neoSTX aumentava.

Os aumentos das concentrações de saxitoxinas, observados na Figura 5.6, são bastante elevados, e não se pode descartar a hipótese de ter ocorrido um erro experimental. A ausência de purificação da amostra para a detecção das saxitoxinas dificultou, em alguns casos, a identificação precisa do início e fim do sinal relativo a cada saxitoxina, fator fundamental para definir a área do sinal e a concentração do composto.

De qualquer forma, tanto pelo desconhecimento dos tipos de variantes de saxitoxinas (e suas concentrações) presentes na AE1, como pelo fato das possíveis transformações ocorrerem tanto no sentido de formação de compostos mais tóxicos como no sentido menos tóxico (Gárete-Lizarraga *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2009), não se pode descartar a hipótese de que, sob determinadas condições de oxidação, pode ocorrer o risco de se aumentar a concentração de cianotoxinas por meio do uso de uma dose inadequada de um oxidante. Nesse sentido, há necessidade de mais estudos voltados para investigar, de forma sistemática, as interconversões possíveis quando diferentes variantes de saxitoxinas são submetidas à ação de agentes químicos.

Os dados de toxicidade relativa, apresentados por Oshima (1995), para neoSTX, dcSTX, STX e C2, são respectivamente, 0,924; 0,513; 1,000 e 0,096. Ou seja, a conversão de neoSTX em STX acarretaria em um pequeno aumento da toxicidade, porém, a conversão de C2 para dcSTX promove o aumento da toxicidade da amostra em aproximadamente 5 vezes. Isso demonstra a importância de se conhecer todas as variantes presentes em uma amostra, pois, dessa forma, pode-se estabelecer o grau de periculosidade de uma determinada água.

Preocupação adicional observada durante a realização da Etapa 2 do trabalho foi a formação de subprodutos do cloro. Os valores dos residuais de cloro mostrados nas Figuras 5.3 e 5.4 indicam a formação de cloro combinado após o tempo de contato do oxidante com as amostras de saxitoxinas e compostos liberados a partir da lise das células de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Diante de tais residuais, é possível a formação de subprodutos clorados, como os trihalometanos (THM), por exemplo, pois quanto maior a dose de cloro, maior será a probabilidade de formação de THM. Para Paschoalato (2005), a forma sob a qual o cloro se apresenta também é importante; o cloro livre tem maior poder de formação de THM do que o cloro combinado.

A água de estudo utilizada, resultante do processo de lise celular, apresentava uma intensa coloração com a presença de pigmentos esverdeados, ocorrendo mudança de coloração por ação da oxidação. A oxidação dos pigmentos pode ter resultado em subprodutos clorados prejudiciais. Para Ferreira Filho e Sakaguti (2008), é muito difícil a previsão do comportamento do cloro em meio aquoso, bem como a previsão da formação de subprodutos sem que sejam conduzidos ensaios experimentais específicos. Portanto, por ser um assunto de

relevante interesse sob o ponto de vista de saúde pública, a presença desses subprodutos é tratada em um item específico deste trabalho.

A Figura 5.7 exemplifica a aparência da AE1 antes (a) e depois (b) da aplicação de uma dose de cloro (8 mg/L) e após 30 minutos de tempo de contato. A mudança de coloração, mostrada na Figura 5.7, foi verificada quando foram aplicadas doses de cloro a partir de 4 mg/L. Esta perda de cor indica ação do oxidante e pode ter resultado na formação de subprodutos clorados.

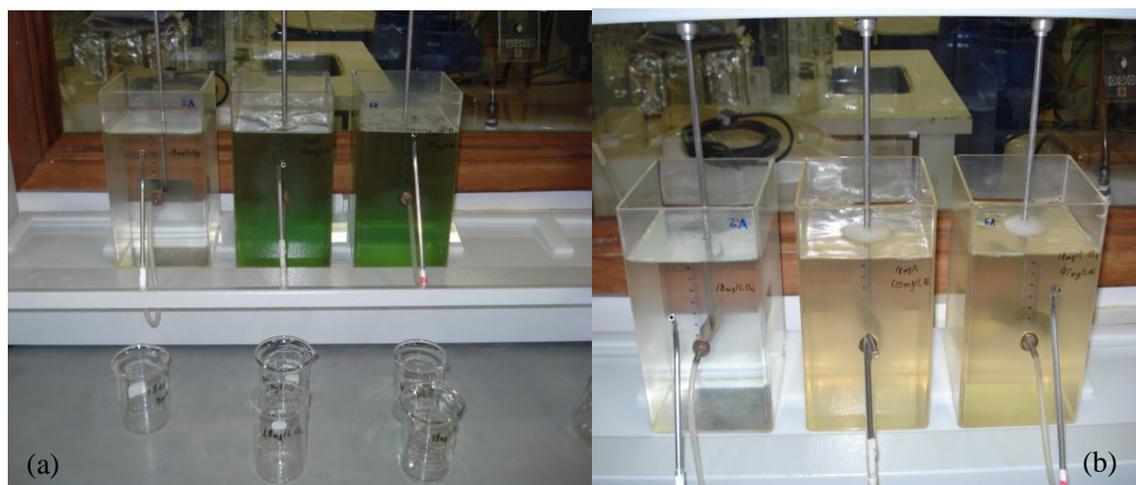


Figura 5.7 – Amostras contendo saxitoxinas antes do contato do cloro (a) e após 30 minutos de tempo de contato (b), com aproximadamente 8 mg/L de cloro.

## 5.2 – ENSAIO DE OXIDAÇÃO DE SAXITOXINAS USANDO ÁGUA DE ESTUDO AE2 (ETAPAS 3 E 4)

### 5.2.1 – Avaliação Preliminar da Cinética de Oxidação de Saxitoxinas (Etapa 3)

A fim de se testar a ação do cloro em amostras de saxitoxinas semipurificadas, ou seja, com menos compostos oriundos da lise das células de *Cylindrospermopsis raciborskii*, fez-se uso da água de estudo 2 (AE2), descrita no item 4.1. Portanto, nesta etapa do trabalho, utilizou-se água de estudo com a mesma concentração de saxitoxinas para a realização de todos os ensaios, com o objetivo de se buscar melhor compreensão da cinética de oxidação das saxitoxinas.

Como descrito na metodologia, nesta etapa o tempo total de duração de cada ensaio foi de 90 minutos e as coletas de alíquotas para detecção das saxitoxinas e dos residuais de cloro foram feitas em intervalos de 15 minutos. A Tabela 5.3 mostra as condições de realização desta etapa do trabalho.

Tabela 5.3 – Condições de realização dos ensaios de oxidação da AE2 utilizando cloro e valores de pH variando de 5,0 a 11,0 (Etapas 3 e 4)

Nº do ensaio	Doses de cloro aplicadas (mg/L) (n = 2)	pH* da amostra	Concentrações iniciais de saxitoxinas (µg/L)		
			neoSTX	dcSTX	STX
01	3,5	5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0 e 11,0	68,3	16,3	33,3
02	5				
03	6				
04	7				
05	8				
06	12				
07	14				
08	15				

Legenda: n = número de amostras utilizadas; \* valor de pH ajustado

É importante destacar que, nesta etapa do trabalho, foi utilizado o cloreto de sódio PA (Marca VETEC, padrão de pureza 99%) na produção da solução de hipoclorito de sódio, com o objetivo de minimizar a possibilidade de interferência das impurezas do sal comercial no processo de oxidação das saxitoxinas na formação de subprodutos.

A Figura 5.8 mostra um exemplo de doses de cloro utilizadas com seus respectivos residuais nos ensaios de oxidação da AE2 com valores de pH 5,0; 7,0 e 9,0. As Figuras com as demais doses de cloro e valores de pH são apresentadas no Anexo G.

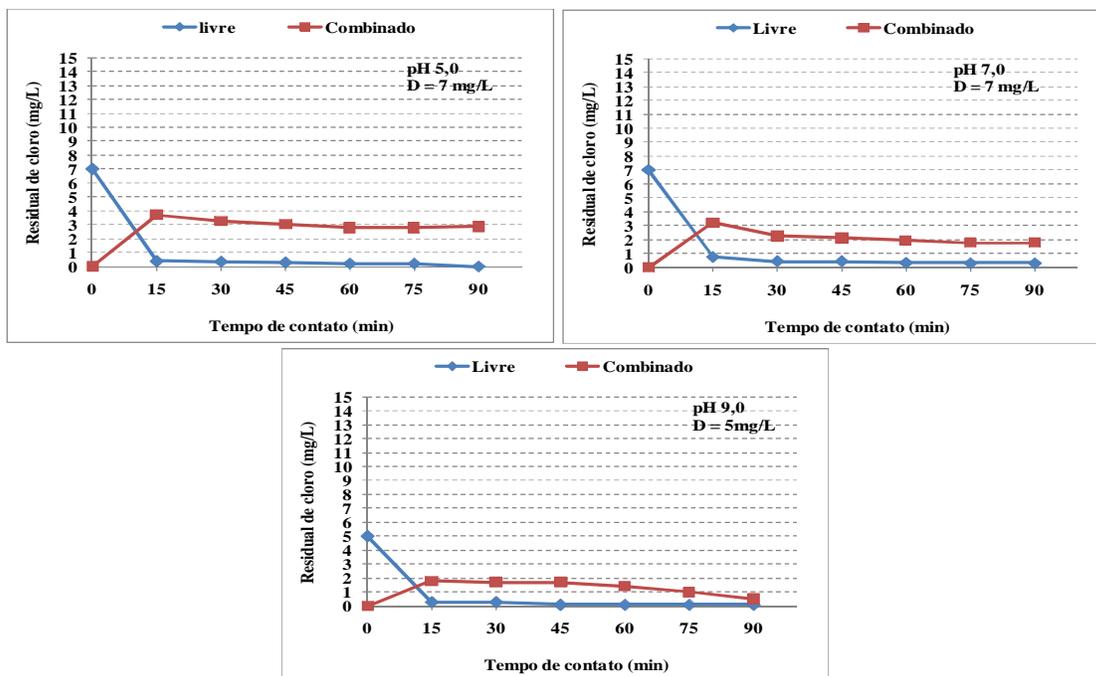


Figura 5.8 – Doses de cloro aplicadas à água de estudo 2 com valores de pH da água de 5,0; 7,0 e 9,0.

Como pode ser observado na Figura 5.8, a formação do cloro combinado foi acompanhada de um rápido consumo das doses de cloro logo nos 15 minutos iniciais de tempo de contato. Entretanto, ao longo dos 90 minutos, parece que o cloro combinado também participa do processo de oxidação, embora de forma secundária, pois sua concentração também diminui.

Quando foram aplicadas doses de cloro maiores do que 8 mg/L, os valores residuais de cloro combinado ficaram acima de 5 mg/L nos primeiros 30 minutos de tempo de contato, diminuindo no decorrer dos 90 minutos. O menor valor de cloro combinado residual foi de 1 mg/L, quando se aplicou a dose de cloro de 3,5 mg/L.

Os valores dos residuais de cloro livre ficaram abaixo de 2 mg/L para todas as doses testadas, diminuindo ao longo do tempo até alcançar o valor de 0,1 mg/L. Já nos primeiros 15 minutos de ensaio, mais de 85% do cloro foi consumido. Por outro lado, verificou-se, como já discutido, a formação de cloro combinado (Figura 5.8).

A molécula de saxitoxinas contém em sua estrutura vários grupos amina ( $\text{NH}_2$ ), composto químico derivado da amônia ( $\text{NH}_3$ ). Esse aspecto estrutural da molécula pode contribuir para a formação de cloro combinado ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ,  $\text{NHCl}_2$  e  $\text{NCl}_3$ ).

As Figuras 5.9, 5.10 e 5.11 mostram a oxidação da neoSTX, dcSTX e STX, respectivamente, em função dos valores de pH 5,0; 7,0 e 9,0, ao longo do tempo de contato de 90 minutos. O

Apêndice H apresenta a oxidação das três variantes para os demais valores de pH (6,0; 8,0; 10,0 e 11,0), sendo mostrada a oxidação das toxinas de forma conjunta.

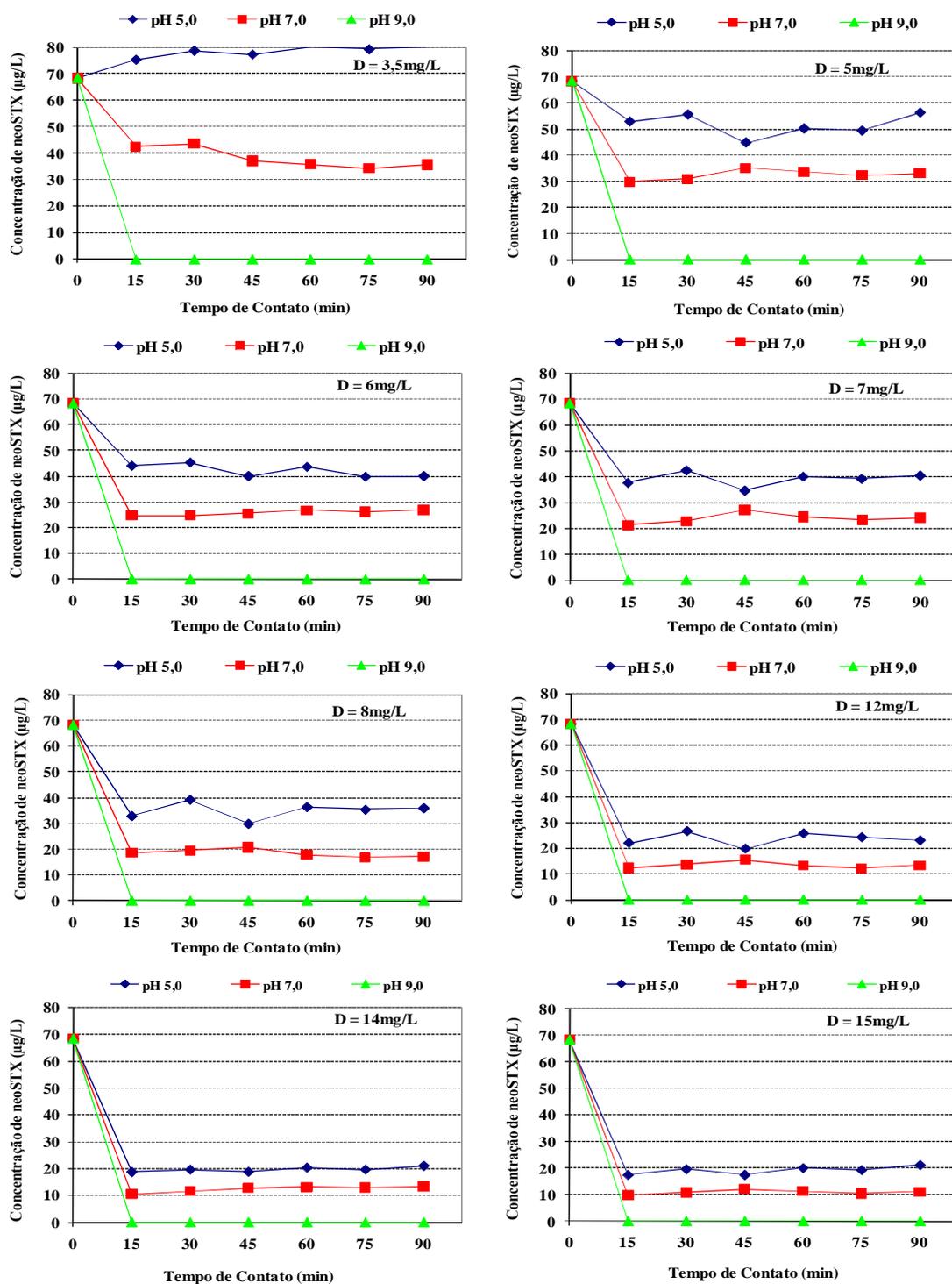


Figura 5.9 – Variação da concentração de neoSTX na AE2 em valores de pH ácido, neutro e básico para doses de cloro variando de 3,5 a 15 mg/L e ao longo do tempo de contato de 90 minutos.

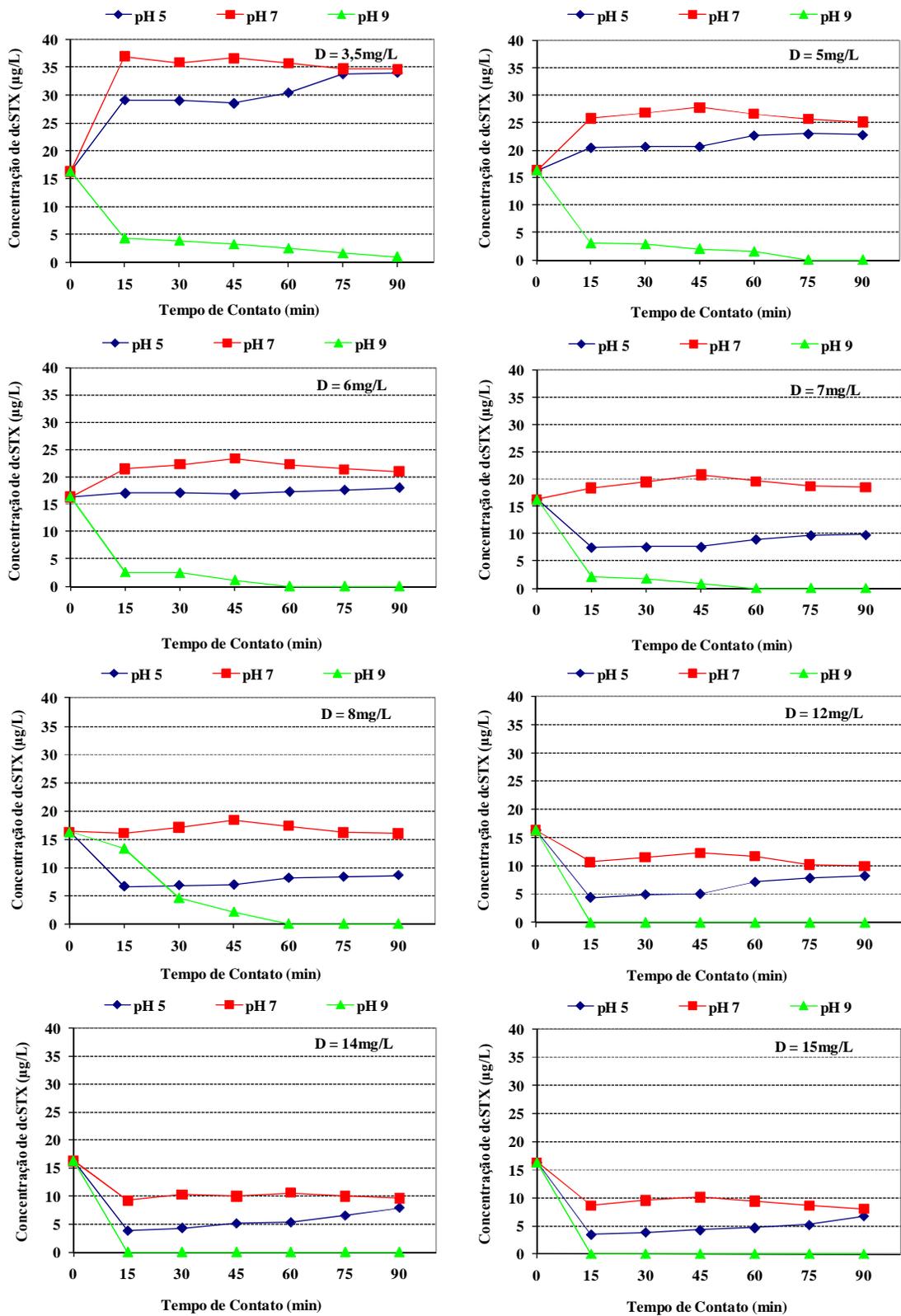


Figura 5.10 – Variação da concentração de dcSTX na AE2 em valores de pH ácido, neutro e básico para doses de cloro variando de 3,5 a 15 mg/L e ao longo do tempo de contato de 90 minutos.

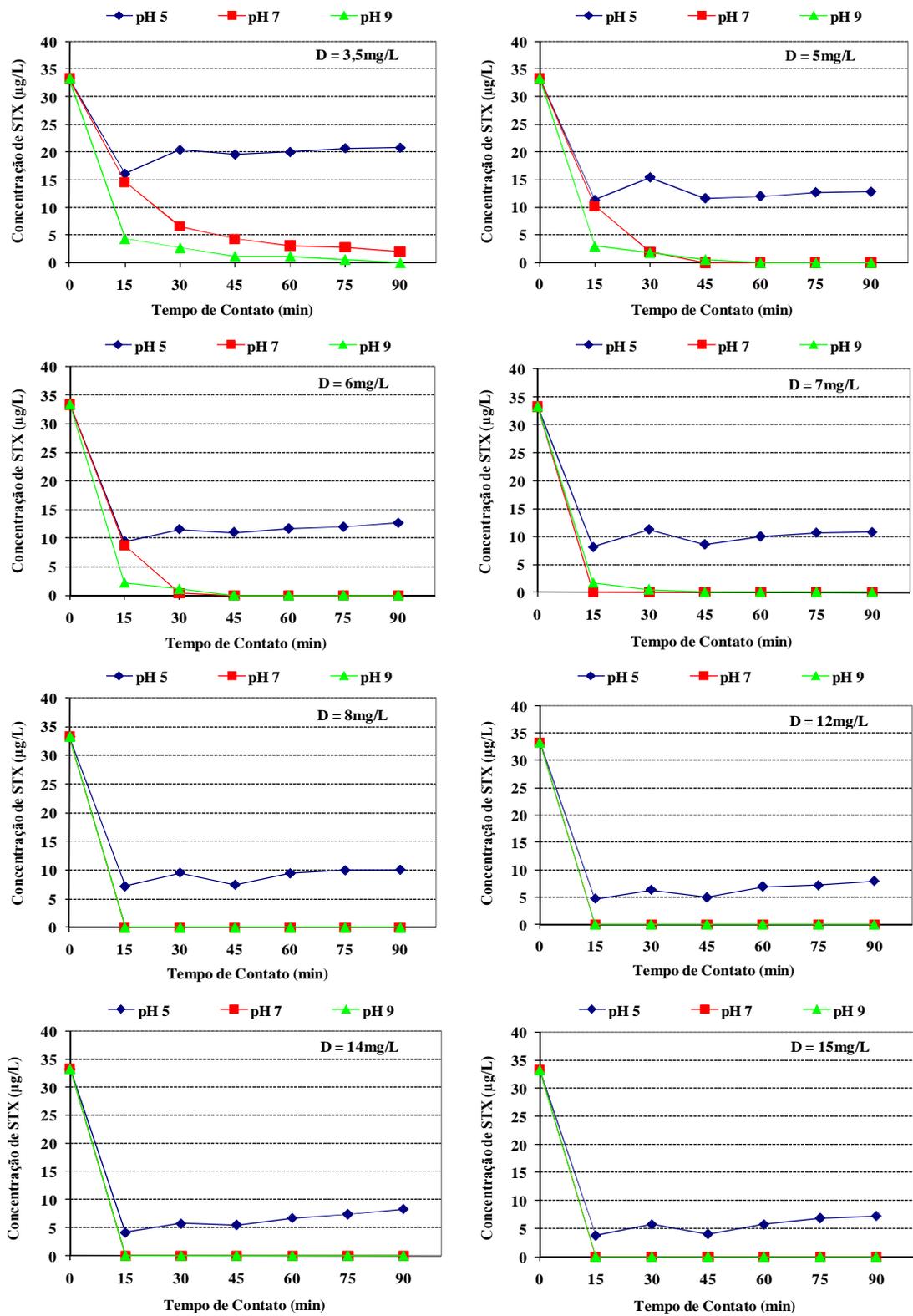


Figura 5.11 – Variação da concentração de STX na AE2 em valores de pH ácidos, neutro e básico para doses de cloro variando de 3,5 a 15 mg/L e ao longo do tempo de contato de 90 minutos.

Das Figuras 5.9, 5.10 e 5.11, verifica-se que parte significativa da oxidação das variantes neoSTX, dcSTX e STX ocorre nos primeiros 15 minutos de tempo de contato, o que pode justificar a maior formação de cloro combinado nesse mesmo intervalo de tempo (Figura 5.8). Contudo, até atingir o tempo final de contato estabelecido (90 minutos), o cloro combinado e o residual de cloro livre continuaram reagindo com as saxitoxinas, o que pode explicar o decaimento desses compostos.

O derivado clorado utilizado foi o hipoclorito de sódio que, em solução, encontra-se em equilíbrio com o ácido hipocloroso. Para Meyer (1994), a ação oxidante é controlada pelo ácido hipocloroso (HClO), sendo mais efetivo em valores de pH baixos, quando a presença de HClO é dominante ( $\text{pH} \leq 8,0$ ). A forma íon hipoclorito ( $\text{ClO}^-$ ) predomina em pH 10,0.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2008), em pH 8, tem-se aproximadamente 35% de ácido hipocloroso. Em pH 8,5; 9,0 e 9,5, tem-se aproximadamente 12%, 5% e 2% de ácido hipocloroso disponível, o que é insuficiente para o processo de desinfecção. Entretanto, a oxidação de saxitoxinas mostra-se mais efetiva em valores de pH básico, ou seja, com percentual baixo de HClO, indicando que a estabilidade das moléculas de saxitoxinas é mais determinante no processo de oxidação.

Tomando como base a variante neoSTX (Figura 5.10), cuja concentração inicial (68,3  $\mu\text{g/L}$ ) sempre foi maior do que as outras duas variantes, observa-se que, quando aplicadas doses de cloro menores que 7  $\text{mg/L}$ , a concentração final dessa variante resultou acima de 40  $\mu\text{g/L}$ , particularmente para a água de estudo (AE) ajustada para o pH 5,0, sendo, inclusive, verificada a elevação da concentração da toxina na dose de 3,5  $\text{mg/L}$  de cloro. Com o aumento da dose de cloro, houve redução da concentração dessa variante, porém, a concentração permanece acima de 10  $\mu\text{g/L}$  para AE2 ajustada para os valores de pH 5,0 e 7,0. Para a água de estudo ajustada para o valor de pH 9,0, observou-se a eliminação da neoSTX logo nos 15 minutos iniciais para todas as doses testadas, não sendo mais detectada a presença dessa toxina.

Em relação à variante dcSTX, cuja concentração inicial foi de 16,3 µg/L, é possível observar que a mesma apresenta comportamento bastante diverso. Ao contrário do que ocorreu com a neoSTX, mesmo em valores de pH básicos, a dcSTX foi detectada ao final do tempo de contato quando baixas doses de cloro foram aplicadas. Somente com doses de cloro superiores a 8 mg/L e valores de pH 8,0 e 9,0, foi possível alcançar eficiência de remoção superior a 99%, em tempos de contato menores que 60 minutos, conforme mostrado na Figura 5.10 e no Apêndice H. Contudo, à medida que os valores de pH foram elevados para 10,0 e 11,0, a remoção ocorreu nos primeiros 15 minutos de tempo de contato, não sendo, portanto, mais detectada a presença dessa toxina.

A concentração final de dcSTX, em valores de pH ácidos e neutro, ficou acima de 5,0 µg/L, mesmo quando foi utilizada a maior dose de cloro (15 mg/L), entretanto, é interessante observar o comportamento dessa toxina em pH 6,0 (Apêndice H). Nessa condição, ela apresentou decaimento crescente de sua concentração, mesmo quando se utilizaram baixas doses de cloro, ao contrário do que foi observado em valores de pH 5,0 e 7,0 (Figura 5.10).

De maneira análoga como aconteceu com as outras duas variantes em valor de  $\text{pH} \geq 9,0$ , a STX não foi detectada ao final de 90 minutos, independentemente da dose de cloro aplicada. Entretanto, a remoção total aconteceu nos primeiros 15 minutos de tempo de contato quando foram utilizadas doses de cloro maiores que 7 mg/L (Figura 5.11). Em valor de pH 5,0, a concentração de STX diminuiu com o aumento da dose de cloro; entretanto, mesmo com a maior dose aplicada (15 mg/L), a concentração final dessa toxina ainda foi elevada, maior que 5 µg/L. Contudo, foi possível observar certas particularidades diante das doses de cloro aplicadas. Para efeito de visualização dessas particularidades, a Tabela 5.4 mostra as eficiências de remoção de neoSTX, dcSTX e STX após os tempos os tempos de contato de 30 e de 90 minutos, considerando as doses de cloro aplicadas e valores de pH entre 5,0 a 9,0.

Tabela 5.4 – Eficiências (%) de remoção de saxitoxinas após os tempos de contato de 30 e de 90 minutos em diferentes doses de cloro e valores de pH de 5,0 a 9,0.

Tempo de contato (min)	Doses de cloro livre (mg/L)	Saxitoxinas (µg/L)	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,0	pH 9,0
30	3,5	neoSTX	0*	0*	36	100	100
		dcSTX	0*	0*	0*	0*	76
		STX	39	56	80	35	92
	5	neoSTX	19	30	55	100	100
		dcSTX	0*	23	0*	25	83
		STX	54	82	94	54	95
	6	neoSTX	34	44	64	100	100
		dcSTX	0*	40	0*	39	85
		STX	65	91	99	62	97
	7	neoSTX	38	51	66	100	100
		dcSTX	53	47	0*	48	89
		STX	66	95	100	69	98
	8	neoSTX	42	57	71	100	100
		dcSTX	58	55	0*	66	72
		STX	71	100	100	100	100
	12	neoSTX	71	100	77	100	100
		dcSTX	70	55	29	69	100
		STX	81	57	100	100	100
	14	neoSTX	71	100	83	100	100
		dcSTX	74	31	37	67	100
		STX	83	63	100	100	100
15	neoSTX	71	100	84	100	100	
	dcSTX	76	33	41	69	100	
	STX	83	66	100	100	100	
90	3,5	neoSTX	0*	0*	48	100	100
		dcSTX	0*	9	0*	12	94
		STX	38	79	94	48	100
	5	neoSTX	32	40	52	100	100
		dcSTX	0*	50	0*	40	100
		STX	62	100	100	61	100
	6	neoSTX	43	56	61	100	100
		dcSTX	0*	72	0*	69	100
		STX	62	100	100	76	100
	7	neoSTX	47	41	65	100	100
		dcSTX	40	74	0*	74	100
		STX	68	100	100	85	100
	8	neoSTX	47	46	75	100	100
		dcSTX	47	82	2	100	100
		STX	70	100	100	100	100
	12	neoSTX	66	100	80	100	100
		dcSTX	50	68	39	100	100
		STX	76	89	100	100	100
	14	neoSTX	69	100	80	100	100
		dcSTX	52	91	41	100	100
		STX	75	94	100	100	100
15	neoSTX	69	100	84	100	100	
	dcSTX	58	98	51	100	100	
	STX	78	97	100	100	100	

Legenda: \* Crescimento da concentração de saxitoxinas; 100% significa que as toxinas não foram detectadas

Apesar da tendência geral de que quanto maior o valor de pH, maior será a remoção de saxitoxinas e que, em valores de pH ácido, condição em que as saxitoxinas e seus derivados estão mais estáveis (Indrasena e Gill, 1999; Llewelly, 2006; Oga *et al.*, 2008), a remoção de algumas variantes é muito difícil. Os resultados mostrados nas Figuras 5.9, 5.10, 5.11 e Tabela 5.4 sugerem que cada variante tem uma condição específica de oxidação. Assim, enquanto a neoSTX não foi mais detectada em tempo de contato menor ou igual a 30 minutos para valores de pH  $\geq 8,0$ , independentemente da dose de cloro aplicada, a dcSTX e a STX apresentaram esse comportamento somente para valores de pH  $\geq 9,0$ .

Diferença particular de comportamento entre as toxinas, frente à oxidação, ocorreu com a água de estudo em pH neutro (pH 7,0). Enquanto a dcSTX apresentou crescimento ao longo do tempo, resultando em valores finais maiores que 8,0  $\mu\text{g/L}$ , a neoSTX e a STX apresentaram decaimento, mesmo com a aplicação de baixas doses de cloro. À medida que a dose de cloro foi elevada ( $D > 7 \text{ mg/L}$ ), o tempo de remoção da STX, em pH 7,0, foi reduzido para 15 minutos, indicando que a STX é mais afetada pelo valor do pH neutro do que as outras duas variantes, conforme mostrado nas Figuras 5.9, 5.10 e 5.11.

Quando se compara o comportamento das saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) na água de estudo 1 (AE1), preparada com material da lise das células de *C. raciborskii*, com a água de estudo 2 (AE2), preparada a partir de extrato semipurificado, ambas em valor de pH 6,0, por exemplo, observam-se duas situações distintas. Enquanto na AE1 as variantes de saxitoxinas avaliadas mostram tendência de aumento de concentração com o aumento da dose de cloro, na AE2 o comportamento é inverso, ou seja, a concentração de saxitoxinas diminui com a aplicação de cloro ao longo do tempo. Entretanto, não se pode atribuir unicamente à presença de produtos da lise celular à pouca efetividade do cloro em oxidar tais variantes. Outros fatores também podem contribuir para essa diferença de efetividade, como por exemplo, diferenças nas condições de realização dos experimentos (controle de temperatura, proporção das variantes de toxinas e proporção entre toxinas e produtos intracelulares).

Os dados mostrados nas Figuras 5.9, 5.10 e 5.11 e nas Figuras do Apêndice H, sugerem que a oxidação da variante neoSTX ocorre de forma mais rápida do que as demais variantes analisadas (dcSTX e STX). Esse comportamento pode estar associado tanto ao fato de serem possíveis transformações entre essas variantes durante a oxidação, como devido à diferença estrutural das mesmas.

A conversão de neoSTX para STX foi sugerida por Shimizu e Yohioka (1981), que verificaram que após 3 dias de armazenamento de amostras que continham GTX-1, GTX-2,

GTX-3, neoSTX e STX, havia um acréscimo de 56,3% de STX, enquanto as outras toxinas, GTX-1, GTX-2, GTX-3 e neoSTX, diminuíram em 12,2%, 15,3%, 4,1% e 18,2%, respectivamente. Para esses autores, a redução de neoSTX a STX ocorre pela perda do oxigênio de um agrupamento hidroxila. Cabe mencionar que essa transformação implica no aumento da toxicidade de aproximadamente 8% (Oshima, 1995).

Como já mencionado, além das variantes estudadas neste trabalho, outras toxinas também poderiam estar presentes na AE2, contribuindo para o processo de transformação, já que a cepa T3 de *C. raciborskii*, segundo Lagos *et al.* (1999), pode produzir uma grande variedade de toxinas, tais como, STX, neoSTX, dcSTX, dcneoSTX, C1, C2, GTX-2, GTX-3 e GTX-6, sendo que algumas dessas toxinas podem contribuir para a elevação da concentração de neoSTX, dcSTX e STX (Jaime *et al.*, 2007).

Em uma tentativa de se identificar algumas das toxinas produzidas pela cepa T3 de *C. raciborskii* na água de estudo semipurificada, injetou-se padrão de GTX-1, GTX-2, GTX-3 e GTX-4 em CLAE, utilizando-se a fase móvel usada para detectar neoSTX, STX e dcSTX. É sabido que essa condição não é a melhor opção para determinação dessas toxinas, que têm condições específicas de determinação, entretanto, foi possível identificar a presença de GTX-1, GTX-2, GTX-3 e GTX-4, sendo que, proporcionalmente, a GTX-4 apresentava maior concentração. Assim, essas variantes podem estar influenciando o processo de oxidação da neoSTX, dcSTX e STX neste trabalho, por meio das interconversões entre variantes.

A STX e a dcSTX são os produtos finais dos processos de transformação das variantes de saxitoxinas (Gárate-Lizárraga *et al.*, 2004). Em valores de pH ácido, essas variantes estão protonadas, portanto, mais estáveis do que a neoSTX, talvez pela presença de um grupo hidroxila (OH) adicional no radical R1 (Figura 3.6) na estrutura molecular dessa toxina.

Os resultados obtidos indicam que ao adicionar o cloro, em amostra com valor de pH ácido, pode ocorrer, primeiramente, a quebra das moléculas de neoSTX e de STX, pelo fato dessas variantes apresentarem mais pontos vulneráveis em suas moléculas. A neoSTX tem dois pontos vulneráveis a mais em sua estrutura molecular (Figura 5.12); a STX tem um (Figura 5.13), enquanto que a dcSTX (Figura 5.14) não apresenta vulnerabilidade adicional, além daquelas tradicionalmente existentes nas três variantes e já identificadas por alguns autores (Strichartz, 1984; Indrasena e Gill, 1999; Llewellyn, 2006; Vale, 2006; Artigas *et al.*, 2007). Essa condição pode ser uma explicação da persistência da concentração de dcSTX quando aplicadas doses variáveis de cloro em valores de pH ácido e neutro.

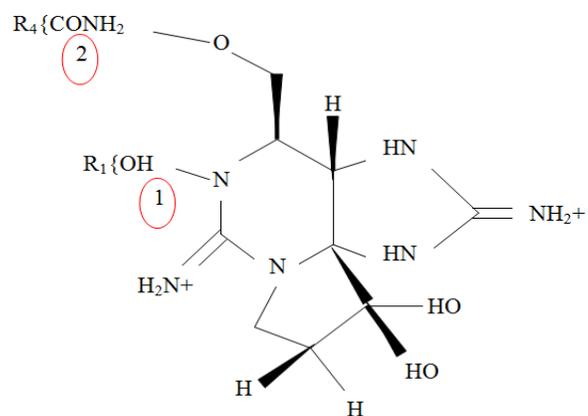


Figura 5.12 – Estrutura molecular da neoSTX, evidenciando pontos adicionais de vulnerabilidade diante de um processo de oxidação (pontos 1 e 2)

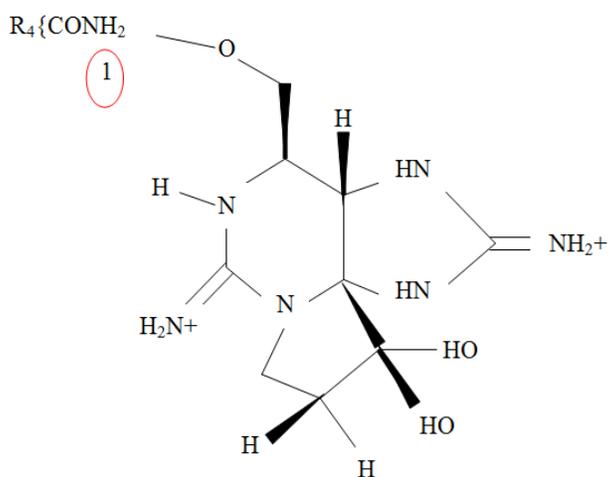


Figura 5.13 - Estrutura molecular da STX, evidenciando ponto adicional de vulnerabilidade diante de um processo de oxidação (ponto 1)

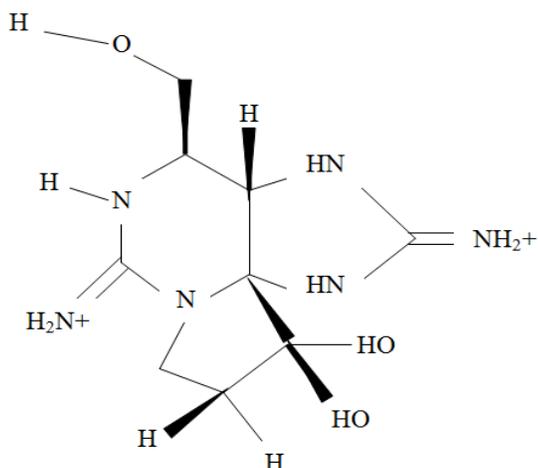


Figura 5.14 – Estrutura molecular da dcSTX, onde nenhum ponto adicional de vulnerabilidade é apresentado, além dos já tradicionalmente existentes.

Apesar da complexidade do processo de oxidação das saxitoxinas, que parece envolver reações paralelas de oxidação e transformação, buscou-se verificar se esse processo se desenvolve numa cinética específica em cada valor de pH. A Tabela 5.5 mostra os valores das constantes de velocidade (k), a ordem de reação (n) e o coeficiente de ajuste ( $R^2$ ) para diferentes valores de pH e doses de cloro aplicadas ao longo do tempo de contato de 90 minutos. Cabe destacar que a determinação dos parâmetros cinéticos foi feita para os ensaios onde foram observados decaimentos contínuos das concentrações das saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX), utilizando o procedimento descrito na metodologia.

Tabela 5.5 – Constante de velocidade (k) e coeficiente de ajuste linear ( $R^2$ ) das reações de ordem “n” para as variantes de saxitoxinas e doses de cloro variando de 3,5 a 15 mg/L

Saxitoxinas (µg/L)	Valores de pH	Doses de Cloro (mg/L)	Constante de velocidade (k) (µg/L.min)	Ordem de reação (n)	Coeficiente de ajuste ( $R^2$ )	
neoSTX	6,0	3,5	0,002	1,6	0,770	
	7,0		0,013	1,3	0,630	
dcSTX	9,0		0,002	2,6	0,780	
STX	6,0		0,006	1,3	0,770	
	7,0		0,003	1,8	0,650	
	9,0		0,040	1,1	0,650	
neoSTX	5,0	5	0,011	1,2	0,980	
	6,0		0,021	1,1	0,980	
	7,0		0,029	1,4	0,850	
dcSTX	6,0		0,057	1,1	0,880	
	8,0		0,017	1,3	0,930	
	9,0		0,002	2,5	0,650	
STX	5,0		0,001	2,4	0,600	
	6,0		0,057	1,2	0,640	
	8,0		0,006	1,9	0,780	
neoSTX	5,0		6	0,016	1,3	0,950
	6,0			0,031	1,4	0,850
	7,0			0,033	1,3	0,650
dcSTX	6,0	0,017		1,7	0,770	
	8,0	0,038		1,4	0,630	
STX	8,0	0,0104		1,7	0,760	

Tabela 5.5 – Constante de velocidade (k) e coeficiente de ajuste linear (R<sup>2</sup>) das reações de ordem “n” para as variantes de saxitoxinas e doses de cloro variando de 3,5 a 15 mg/L (Continuação)

Saxitoxinas (µg/L)	Valores de pH	Doses de Cloro (mg/L)	Constante de velocidade (k) (µg/L.min)	Ordem de reação (n)	Coeficiente de ajuste (R <sup>2</sup> )
neoSTX	5,0	7	0,020	1,2	0,750
	6,0		0,007	1,5	0,650
	7,0		0,007	1,3	0,640
dcSTX	6,0		0,005	1,9	0,660
	8,0		0,020	1,5	0,610
STX	8,0		0,040	1,5	0,680
neoSTX	5,0	8	0,004	1,2	0,640
	6,0		0,004	1,7	0,710
	7,0		0,009	1,6	0,700
dcSTX	6,0		0,022	1,6	0,920
STX	5,0		0,001	2,7	0,660
neoSTX	5,0		12	0,066	1,3
	7,0	0,019		1,6	0,650
dcSTX	7,0	0,020		1,3	0,760
STX	6,0	0,007		1,8	0,920
neoSTX	5,0	14	0,043	1,4	0,620
	7,0		0,002	2,2	0,630
dcSTX	7,0		0,019	1,4	0,820
neoSTX	5,0	15	0,029	1,5	0,600
	7,0		0,006	1,9	0,600
dcSTX	6,0		0,001	2,8	0,690
STX	6,0		0,001	2,5	0,660

Os resultados da Tabela 5.5 indicam que, para cada valor de pH e doses de cloro aplicadas, há uma ordem de reação diferente, evidenciado pelos valores de “n”. Esse fato reforça a hipótese de que as saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) têm comportamento diferenciado para cada valor de pH, situação observada nas etapas anteriores deste trabalho. O coeficiente de ajuste

linear ( $R^2$ ) ficou acima de 0,600, que, segundo Tobias (2010), para os valores de  $R^2$  iguais ou superiores a 0,600, diz-se que o ajuste linear apresenta boa qualidade.

Interessante destacar que, das 43 condições experimentais em que foi avaliada a cinética, a maioria apresentou ordem de reação acima de 1 e menor do que 2, portanto, entre a primeira e a segunda ordem. De certa forma, esse acontecimento é semelhante aos resultados relatados para a cinética das microscitinas (toxinas mais estudada), quando diferentes trabalhos indicam alternância entre a primeira e a segunda ordem de reação (Acero *et al.*, 2005; Momani, 2007; Ying *et al.*, 2008; Zhong *et al.*, 2009), dependendo, entretanto, dos valores de pH e das doses de oxidantes aplicadas.

Diante disso, fica clara a necessidade de estudos adicionais sobre a cinética de oxidação das cianotoxinas com o objetivo de se desenvolver modelos matemáticos que possibilitem estimar, com grau de significância satisfatório, a concentração final de cianotoxinas em qualquer tempo de contato, para um determinado valor de pH e dose de cloro. Além disso, os resultados obtidos neste trabalho apontam para a necessidade para o estudo individualizado de cada variante em intervalos de tempo menores e modelos de cinética mais representativos.

No caso das saxitoxinas, os resultados obtidos indicam que a adoção de medidas em intervalos de tempo inferior a 15 minutos é o ponto de partida para a realização de novos estudos cinéticos, pois, conforme pode ser observado nas Figuras 5.9, 5.10 e 5.11, os primeiros 15 minutos de tempo de contato foram quando a oxidação das saxitoxinas ocorreram com mais intensidade. Outro aspecto importante é avaliar a utilização de modelos de taxa de oxidação que considere a constante de reação, para um determinado valor de pH, dependente da dose do oxidante, a exemplo da lei de Chick-Watson para inativação de microrganismos.

### **5.3 – SUBPRODUTOS DA OXIDAÇÃO DAS SAXITOXINAS COM CLORO**

O cloro pode reagir com compostos orgânicos sintéticos e naturais, formando substâncias potencialmente tóxicas. Como uma tentativa de se estimar o grau de toxicidade dos subprodutos formados, foram realizados testes de toxicidade com *Daphnia* (*D. similis* e *C. silvestrii*), conforme a metodologia descrita no item 4.2.3.3 e no Anexo J deste trabalho.

Os resultados do teste de toxicidade aguda realizado com *D. similis* e *C. silvestrii*, para verificar a toxicidade de subprodutos da oxidação de saxitoxinas com cloro, estão

apresentados nas Tabelas 5.6 e 5.7. Os valores de pH mostrados nessas tabelas foram, efetivamente, os utilizados nas aplicações das doses de cloro. Testes de sensibilidade dos organismos usados foram também realizados, indicando que esses organismos estavam adequados para serem utilizados nos testes de toxicidade aguda. Os resultados do teste de sensibilidade ao NaCl estão apresentados no Apêndice J.

Tabela 5.6 – Porcentagem de imobilidade da *D. similis* expostos a subprodutos da oxidação de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) com cloro durante o teste de toxicidade aguda.

Amostras	Tempo	Réplicas (organismos imóveis/organismos expostos)				Total (organismos imóveis/organismos expostos)	% imobilidade
		1	2	3	4		
Controle (pH 5,0)	24h	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0 (V)
	48h	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0 (V)
Branco (Saxitoxinas) (pH 5,0)	24h	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	100*
	48h	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	100*
pH 5,0 1,5 mg/L	24h	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	100*
	48h	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	100*
pH 5,0 8 mg/L	24h	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	100*
	48h	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	100*

Legenda: V = teste válido (porcentagem de organismos imóveis no controle não excedeu 10%); IC = intervalo de confiança (95%). \*amostras tóxicas: diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Fisher (p = 0,05).

Tabela 5.7 – Porcentagem de imobilidade da *C. silvestrii* expostos a subprodutos da oxidação de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) com cloro durante o teste de toxicidade aguda.

Amostras	Tempo	Réplicas (organismos imóveis/organismos expostos)				Total (organismos imóveis/organismos expostos)	% imobilidade
		1	2	3	4		
Controle (pH 5,0)	24h	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0 (V)
	48h	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0 (V)
Branco (Saxitoxinas) (pH 5,0)	24h	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	100*
	48h	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	100*
pH 5,0 3,5 mg/L	24h	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	100*
	48h	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	100*
pH 5,0 5 mg/L	24h	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	100*
	48h	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	100*

Legenda: V = teste válido (porcentagem de organismos imóveis no controle não excedeu 10%); IC = intervalo de confiança (95%). \*amostras tóxicas: diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Fisher (p = 0,05).

A amostra com água desionizada e cloro, neutralizada com ácido ascórbico, e denominada de “controle” (Tabela 5.6 e 5.7), não causou imobilidade nos organismos-teste. Cabe ressaltar que, antes dessa amostra ser utilizada nos ensaios de toxicidade, foram corrigidos os valores de pH, dureza e condutividade, para as condições exigidas pelos organismos (ABNT NBR 13373/2005).

Os resultados de toxicidade indicaram que as saxitoxinas (68,3 µg/L, 16,3 µg/L e 33,3 µg/L, respectivamente para a neoSTX, dcSTX e STX) e os subprodutos formados durante o processo de oxidação foram capazes de causar imobilidade nos organismos. Contudo, diante dos residuais de saxitoxinas medidos depois de 90 minutos de tempo de contato, considerando a dose de cloro de 8 mg/L, em valor de pH 5, pode-se dizer que a imobilidade causada nos organismos foi devida, principalmente, à presença dos residuais de saxitoxinas, os quais foram: neoSTX (36,1 µg/L), dcSTX (8,6 µg/L) e STX (10 µg/L). Devido à baixa tolerância à determinadas substâncias químicas e até mesmo a pequenas alterações nos valores de pH, pode ser que a *D. similis* e a *C. silvestrii* não sejam os melhores organismos para os tipos de testes realizados (resposta inespecífica), sendo necessário, portanto, a utilização de outro tipo de ensaio de toxicidade ou outro organismo indicador.

Como visto no item anterior, as reações que envolvem o cloro e as saxitoxinas são complexas, uma vez que essas toxinas apresentam uma elevada diversidade de grupos funcionais aromáticos, carboxílicos, fenólicos, bem como duplas e triplas ligações, que são passíveis de serem atacadas pelo agente oxidante, podendo dar origem a diversos subprodutos.

A formação de subprodutos a partir da reação do cloro com as saxitoxinas pode acontecer pela quebra da molécula de cada variante e a substituição ou introdução do halogênio em sua estrutura molecular. Os resultados dos ensaios experimentais para a avaliação da formação de subprodutos orgânicos halogenados a partir da cloração da AE2, após o tempo de contato de 24 horas, estão apresentados no Apêndice I e as condições de realização dos ensaios foram descritas no item 4.2 deste trabalho. As Figuras 5.15 e 5.16 exemplificam o comportamento geral dos resultados obtidos.

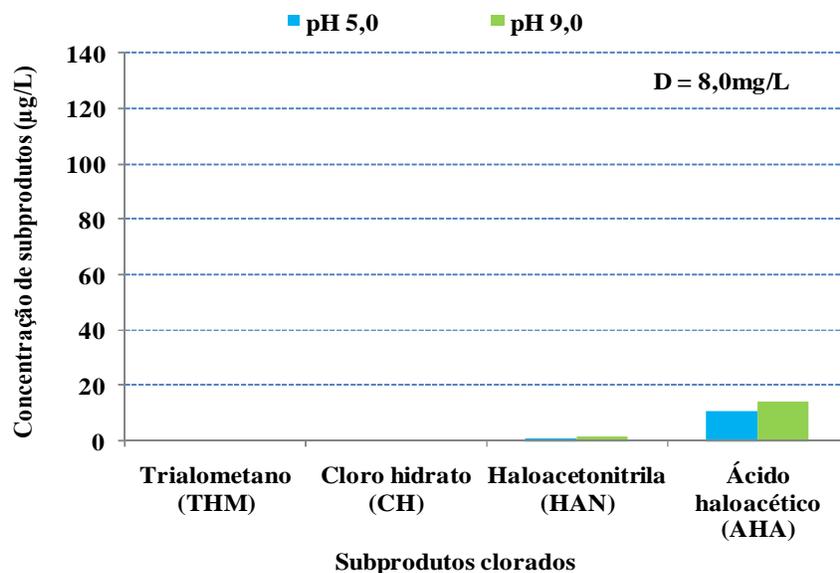


Figura 5.15 – Subprodutos resultantes do processo de oxidação de saxitoxinas com 8 mg/L de cloro, valores do pH da AE2 iguais a 5,0 e 9,0, temperatura de incubação de 25°C e tempo de contato de 24 horas

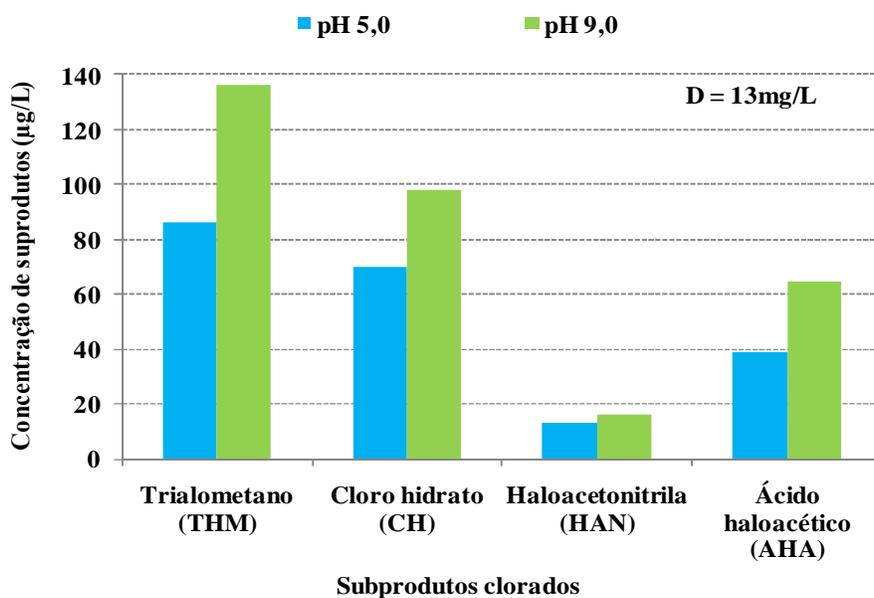


Figura 5.16 – Subprodutos resultantes do processo de oxidação de saxitoxinas com 13 mg/L de cloro, valores do pH da AE2 iguais a 5,0 e 9,0, temperatura de incubação de 25°C e tempo de contato de 24 horas

Quando foi aplicada a dose de cloro de 1,5 mg/L, após 24 horas de tempo de contato, os valores de THM ficaram abaixo de 0,1 µg/L, valor limite de detecção do cromatógrafo utilizado nos ensaios. Os mesmos resultados foram alcançados para o cloro hidratado, cloropicrina, haloacetonas e ácidos haloacéticos. Contudo, com o aumento da dose ( $D > 1,5$  mg/L), foi possível detectar alguns subprodutos.

Para a dose de 8 mg/L, foi detectada a presença de haloacetoneitrilas (valor médio de 0,7 µg/L, em pH 5,0, e 1,3 µg/L, em pH 9,0) e de ácidos haloacéticos (valor médio de 10,9 µg/L, em pH 5,0, e 14,1 µg/L, em pH 9,0). Dentre os compostos de haloacetoneitrilas, ocorreu a formação de dicloroacetoneitrila, sendo maior em valor de pH 9,0. Em relação aos ácidos haloacéticos (AHA), apenas o dicloro ácido acético (DCAA) foi detectado, e mais uma vez a concentração foi maior em valor de pH 9,0.

Quando foi aplicada a dose de cloro de 13 mg/L, foi possível perceber um aumento expressivo de formação de subprodutos. Após 24 horas, dentre os subprodutos formados, foram detectados: trialometanos (valor médio de 86,2 µg/L, em pH 5,0, e 136,5 µg/L, em pH 9,0), cloro hidratado (valor médio de 70,2 µg/L, em pH 5,0, e 98,2 µg/L, em pH 9,0), haloacetoneitrila (valor médio de 13,2 µg/L, em pH 5,0, e 16,4 µg/L, em pH 9,0), ácido haloacético (valor médio 38,9 µg/L, em pH 5,0, e 64,9 µg/L, em pH 9,0).

Para a dose de 13 mg/L, os valores de trialometanos resultaram acima do recomendado pela legislação brasileira (0,1 mg/L ou 100 µg/L). Dentre os compostos que formam o grupo dos trialometanos analisados, o maior valor obtido, após 24 horas, foi de clorofórmio (concentração média de 138,6 µg/L, em valor de pH 9,0). Esses resultados de THM podem ser considerados previsíveis, mesmo se tratando de saxitoxinas, já que a reação de oxidação dessas toxinas com o cloro ocorreu em pH elevado (pH 9,0), e nessa condição, há maior possibilidade de formação de THM.

Resultados semelhantes são relatados por Borges (2002) em investigação sobre o efeito da variação do valor do pH em amostras de soluções de ácido húmico. Os experimentos foram realizados com doses de cloro variando entre 5 e 15 mg/L, valores de pH iguais a 6,0 e 9,0 e tempo de contato de 7 dias, com temperatura da água variando entre 20 e 25°C. Os resultados indicaram incremento nas concentrações de subprodutos, de 55 a 93%, para o maior valor de pH, quando comparado com o menor valor.

O segundo maior subproduto obtido quando da aplicação da dose de 13 mg/L de cloro foi o cloro hidrato, que chegou ao valor médio de 98,1 µg/L, em pH 9,0, sendo quase o dobro dos compostos do grupo dos ácidos haloacéticos, cuja concentração média foi de 64,9 µg/L, conforme apresentado na Figura 5.16. A norma brasileira (Portaria 518/2004) não faz menção sobre o valor de cloro hidrato e outros subprodutos nas águas de abastecimento, entretanto, esse subproduto tem se destacado nas reações de oxidação de substâncias húmicas quando se utilizaram oxidantes como o cloro, dióxido de cloro, ozônio e peroxônio (Paschoalato *et al.*, 2005; Paschoalato *et al.*, 2008). Kuroda *et al.* (2007) também observaram a formação de cloro hidrato nas reações de oxidação de microcistinas (13,5 µg/L), chegando a obter valor superior a 100 µg/L para esse subproduto. Diante desses fatos, é importante conceder também atenção ao cloro hidrato (CH) nas águas destinadas ao abastecimento público, procurando conhecer os seus efeitos sobre a saúde pública.

Os compostos de haloacetoneitrilas foram o quarto maior em concentração, com concentração média de 16,4 µg/L, em valor de pH 9,0 e dose de cloro de 13 mg/L, conforme apresentado na Figura 5.16 e no Apêndice I. Considerando que esses subprodutos apresentam átomos de nitrogênio em suas estruturas moleculares, pode ser que os resultados obtidos também possam estar contribuindo para a formação dos residuais de cloro (detectados pelo método DPD), particularmente quando utilizadas doses de cloro mais elevadas ( $D \geq 13$  mg/L), de modo semelhante como ocorre com a estrutura molecular das saxitoxinas.

Considerando os resultados obtidos, fica claro que em águas em que a concentração de saxitoxinas é elevada e se faz necessário o uso do cloro em altas concentrações para garantir a oxidação desses compostos, o risco de formação de subprodutos é também elevado. Cabe destacar que, embora somente os trihalometanos tenham valor regulamentado na legislação brasileira para as águas destinadas ao abastecimento público, alguns dos demais subprodutos encontrados têm toxicidade comprovada para os seres humanos. Entre as nove espécies de ácidos haloacéticos de interesse, contendo cloro e bromo, duas apresentam a carcinogenicidade comprovada, são eles: o ácido dicloroacético – DCAA e o ácido tricloroacético – TCAA (Parnell *et al.*, 1986; Ward *et al.*, 2000).

Assim, a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA) classifica o DCAA e o TCAA como prováveis carcinogênicos e indicam o limite máximo admissível de 60,0 µg/L para o somatório de cinco espécies de AHA (USEPA, 2006). A WHO (2008) estabelece o valor limite de 50 µg/L para o ácido dicloroacético (DCAA) e de 100 µg/L para o ácido tricloroacético (TCAA) em água potável.

## 6 – CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

### 6.1 - CONCLUSÕES

Dos resultados do trabalho desenvolvido, utilizando-se água de estudo produzida a partir da lise de *Cylindrospermopsis raciborskii* produtora de saxitoxinas e água de estudo produzida a partir de extratos semipurificados do material lisado, tendo o cloro como agente oxidante, pode-se delinear as seguintes conclusões em relação ao processo de oxidação de saxitoxinas:

- em amostras de água produzida como material oriundo do processo da lise de células de *Cylindrospermopsis raciborskii*, a ação do oxidante sobre as saxitoxinas sofreu interferência devido à presença de outros compostos intracelulares, sendo necessário utilizar doses elevadas de cloro (acima de 20 mg/L) para se conseguir remoção de saxitoxinas;

- para um mesmo valor de pH, a aplicação de doses similares de cloro em amostras de água contendo concentrações distintas de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX), não resultou em remoção proporcional desses compostos. No entanto, o fato de cultivos com concentrações próximas de células liberarem, a partir da lise, concentrações diferentes de compostos orgânicos intracelulares, pode explicar essa falta de proporcionalidade observada nos ensaios realizados com água produzida a partir da lise de células de *C. raciborskii*;

- a remoção de neoSTX, dcSTX e STX revelou-se dependente do valor do pH e das doses de cloro aplicadas. Ocorreram remoções significativas das variantes dessas toxinas à medida que o valor do pH da água de estudo foi ajustado para valores básicos. Nessa situação, as doses de cloro aplicadas foram menores. A ordem de remoção das variantes de saxitoxinas foi neoSTX > STX > dcSTX;

- em uma água de estudo com concentração inicial de neoSTX (68,3 µg/L), dcSTX (16,3 µg/L) e STX (33,3 µg/L), na ausência de outros compostos oriundos da lise, após a adição de doses de cloro maiores que do 8 mg/L, em valores de pH  $\geq 8$ , não foram detectadas presenças significativas dessas saxitoxinas no efluente final após o tempo de contato de 30 minutos;

- em valores de pH baixos ( $\text{pH} < 8$ ) e doses de cloro baixas, verificou-se o aumento da variante dcSTX, indicando que a oxidação parcial da molécula pode levar a transformações entre variantes, podendo gerar produtos mais tóxicos;

- a concentração de cloro combinado foi maior nos primeiros 30 minutos, diminuindo com o tempo, indicando possível participação na oxidação das saxitoxinas em tempos de contato mais elevados;

- a cinética de oxidação das saxitoxinas indicou ser dependente da variante (neoSTX, dcSTX e STX) e condicionada pelo valor do pH e pela dose de cloro aplicada. Neste trabalho, 86% das ordens de reação calculadas foram maiores do que 1 e menores do que 2, o percentual restante ficou acima de 2. Esse resultado é semelhante aos obtidos para as microcistinas que, segundo a literatura especializada, apresentam cinética de oxidação com cloro que oscilam entre 1ª e 2ª ordem de reação.

- a formação de subprodutos resultantes do processo de oxidação das saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) foi maior com o aumento da dose de cloro aplicada. Para a dose de 1,5 mg/L, os valores dos 21 subprodutos analisados, incluindo trialometanos, cloro hidratado, haloacetoneitrilas e ácido haloacéticos, ficaram abaixo de 0,1  $\mu\text{g/L}$ ; entretanto, com o aumento da dose de cloro de 8 para 13 mg/L, em valor de pH 9,0, ocorreram aumentos de mais 100% na concentração desses subprodutos, e, no caso dos trialometanos, a concentração resultante ficou acima do recomendado pela legislação brasileira;

- os resultados de toxicidade sugerem que as *Daphnias* não parecem ser os organismos indicados para avaliar o efluente resultante da oxidação de saxitoxinas com cloro, pois não foi possível inferir se a causa da imobilidade dos organismos (*D. similis* e *C. silvestrii*) foi devido à presença das saxitoxinas ou dos subprodutos da cloração formados.

No Brasil, sabe-se que o tratamento convencional, ou de ciclo completo, é predominante, tanto em termos do número de unidades de tratamento quanto em termos do volume de água produzido. Contudo, estudos têm demonstrado que os processos convencionais de tratamento não são capazes de remover as cianotoxinas já identificadas e, para resolver esse problema, alguns autores indicam a oxidação como sendo uma das técnicas complementares ao tratamento para a remoção da fração dissolvida das cianotoxinas. Neste trabalho, a avaliação da utilização do cloro no processo de oxidação de saxitoxinas dissolvidas (neoSTX, dcSTX e STX) apresentou indicações claras de eficiência de remoção dessas toxinas. No entanto,

também ficou evidente que, para conseguir a eliminação de modo seguro, a técnica de oxidação exige condições específicas, como por exemplo, o valor do pH maior ou igual a 8,0. Dessa forma, fica clara a necessidade de um controle operacional rigoroso das condições de desinfecção no tanque de contato, para atender conjuntamente ao objetivo de eliminar patógenos, oxidar saxitoxinas e minimizar a formação de subprodutos.

## **6.2 - RECOMENDAÇÕES**

Considerando a carência de informações que ainda persiste sobre a remoção das diferentes variantes de saxitoxinas com o cloro e com o uso de outros agentes oxidantes, é fundamental dar continuidade a essa linha de pesquisa. Dessa forma, os seguintes estudos no campo do tratamento de água são sugeridos:

- estudar, de forma sistemática, o processo de interconversões possíveis quando as saxitoxinas são submetidas à ação de diferentes agentes oxidantes, tais como o cloro, dióxido de cloro, ozônio etc. Esses estudos devem ser realizados em diferentes valores de pH em função da estabilidade da molécula em relação ao valor do pH da água de estudo;
- considerando os conhecimentos sobre as interconversões entre variantes, realizar estudos cinéticos detalhados sobre oxidação das saxitoxinas, usando intervalos de tempo menores e modelos de cinética mais representativos;
- estudar o processo de oxidação de saxitoxinas inoculadas em diferentes tipos de água, de modo a simular as condições reais encontradas no ambiente natural;
- a utilização do cloro e de outros oxidantes (ozônio, dióxido de cloro, permanganato de potássio e POA) na remoção de diferentes combinações de variantes de saxitoxinas e de outros grupos de cianotoxinas;
- realização de estudos detalhados sobre o potencial de formação de subprodutos da oxidação de outros grupos de saxitoxinas quando utilizados diferentes agentes oxidantes. Esses estudos se justificam na medida em que representam balisadores para os legisladores responsáveis pela incorporação de novos parâmetros e limites de tolerâncias de substâncias para as leis de controle e de qualidade das águas destinadas ao abastecimento público.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT (2004). NBR 12713 – *Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea, Cladocera)*. Associação Brasileira de Normas Técnicas, Rio de Janeiro, Brasil, 21p.
- ABNT (2005). NBR 13373 – *Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica – Método de ensaio com Ceriodaphnia spp (Cladocera, Crustacea)*. Associação Brasileira de Normas Técnicas, Rio de Janeiro, Brasil, 15p.
- Acero, J. L., Rodriguez, E., Meriluoto, J. (2005). “Kinetics of reaction between chlorine and the cyanobacterial toxins microcystins.” *Water Research*, 39: 1628-1638p.
- Alfoso, A., Louzao, M. C., Vieytes, M. R., Botana, L. M. (1994). “Comparative study of the stability of saxitoxin and neosaxitoxin in acidic solutions and lyophilized samples.” *Toxicon*, 32, 1593 – 1598.
- An, J. e Carmichael, W. W. (1994). “Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins.” *Toxicon*, 32, 1495-1507.
- Alam, Z. B., Otaki, M., Furumai, H., Ohgaki, S. (2001). “Direct and indirect inactivation of microcystis aeruginosa by UV-radiation. *Water Research*, v. 35(4), 1008-1014p.
- American Public Health Association (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21ª ed. Washington, APHA/AWWA/WPCF.
- Amorim, F. F. (2007). *Remoção dos Contaminantes Orgânicos  $\beta$ -estradiol e Saxitoxinas (STX, neoSTX e dcSTX) por meio de Nonofiltração: Avaliação em Escala de Bancada*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Publicação PTARH. DM-109/07, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 133p.
- Artigas, M. L., Vale, P. J. V., Gomes, S. S., Botelho, M. J., Rodrigues, S. M., Amorim, A. (2007). “Profiles of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish from Portugal explained by carbamoylase activity”. *Journal of Chromatography A*, 1160, 99-105.
- Arantes, C. (2004). *Uso da Filtração Lenta para a Remoção de Cylindrospermopsis raciborskii e Saxitoxinas*. Dissertação de Mestrado, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade de Brasília, DF.
- Azevedo, S.M.F.O. (1998). “Toxinas de cianobactérias: causas e conseqüências para a saúde pública”. *Med On line*. 1(3).

- Azevedo, S. M. F. O e Magalhães, V. F. (2006). Metodologia para Quantificação de Cianotoxinas. In: Pádua, V. L. (coord.) *Contribuição ao estudo da remoção de cianobactérias e microcontaminantes orgânicos por meio de técnicas de tratamento de água para consumo humano*. ABES/PROSAB, 504p.
- Babcock, D. B., Singer P. C. (1979). “Chlorination and coagulation of humic and fulvic acids.” *Journal of the American Water Works Association*; 71(3), 149.
- Bandala, E. R., Martínez, D., Martínez, E., Dionysioiu, D. D. (2004). “Degradation of microcystin-LR toxin by fenton and photo-fenton processes.” *Toxicon*, 43, 829-832p.
- Barcza, M. V. (2008). Hidrogenação e desidrogenação – processos unitários orgânicos. [www.dequi.eel.usp.br/~barcza/HidrogenacaoEDesidrogenacao.pdf](http://www.dequi.eel.usp.br/~barcza/HidrogenacaoEDesidrogenacao.pdf). Acesso em 02/02/2009.
- Bartram, J., Carmichael, W. W., Chorus, I., Jones, G e Skulberg, O. (1999). “Introduction.” In: Chorus, I. e Bartram, J. (eds) *Toxic Cyanobacteria in Water – A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. E&FN Spon, London, England, 1-40p.
- Bittencourt-Oliveira, M. C. e Molica, R. (2003). “Cianobactéria Invasora”. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 30, 82-90p.
- Borges, J. T. (2002). *A Utilização da Técnica de MIMS na Determinação de Trihalometanos em Águas de Abastecimento e a Influência do Íon Brometo, da Amônia e de Algas na Formação desses Compostos*. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Campinas – Unicamp.
- Blanco, J., Reyero, M. I., Franco, J. (2003). “Kinetics of accumulation and transformation of paralytic shellfish toxins in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*”. *Toxicon*, 42, 777-784p.
- Brasil (2004). Ministério da Saúde. “Portaria nº 518: Procedimentos e responsabilidades reativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade”. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo*, Brasília, DF.
- Brooke, S., Newcombe, G., Nicholson, B., Klass, G. (2006). “Decrease in toxicity of microcystins LA and LR in drinking water by ozonation. *Toxicon*, 48, 1054-1053p.
- Brooks, W. P. e Codd, G. A. (1986). “Extraction and purification of toxic peptides from natural blooms and laboratory isolates of the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*.” *Lett Appl. Microbiol*, 3, 1-3.
- Brooks, W. P. e Codd, G. A. (1988). “Immunoassay of hepatotoxic cultures and water blooms of cyanobacteria using *Microcystis aeruginosa* peptide toxin polyclonal antibodies.” *Environmental Technology*, 91: 1343-1348p.

- Campbell, D. L., Lawton, L. A., Beattie, K. A. & Codd, G. A. (1994). "Comparative assessment of the specificity of the Brine Shrimp and Microtox assays to hepatotoxic (Microcystin-LR-containing) cyanobacteria." *Environmental Toxicology. And Water Quality: An Internat.* 9: 71-77p.
- Carmichael, W. W. e Fujiki, H. (1990). "Inhibition of proteim phosphatase by microcystis and nodularin associated with hepatotoxicity." *Journal Cancer Research Clinic Oncology.*
- Carmichael, W. W. (1992). "Cyanobacterial secondary metabolites. A review." *Journal Applied Bacteriology.* 72: 000
- Carmichael, W. (1994). "The toxins of cianobactéria". *Scientific American*, 64-72p.
- Carmichael, W. (1995). "Toxic microcystis and the environment". In: Watanabe, M., Harada, K., Carmichael, W., Fujiki, H. (eds.), *Toxic Microcystis.* 1-12, CRC Press, Boca Ratón, Nueva York, Londres, Tokio. 262p.
- Castro, D., Vera, D., Lagos, N., García, C. e Vasquez, M. (2004). "The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanoacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10." *Toxicon.* 44, 483-489p
- Chen, C. Y. and Chou, H. N. (2002). "A modified high-performance liquid chromatography metod for analysis of PSP toxins in dinoflagellate, *Alexandrium minutum*, and shellfish from Taiwan." *Food Research International*, 35, 715-720p.
- Chorus, I. e Bartram, J. (1999). "Toxic cyanobacteria in water". *E&FN Spon*, London, 416p.
- Christoffersen, K. (1996). "Ecological implications of cyanobacterial toxins en aquatic food webs." *Phycologia*, 35: 42-50p.
- Chu, F.S., Huang, X., Wei, R. D., Carmichael, W. W. (1989). "Production and characterization of antibodies against microcystins". *Applied and Environmental Microbiology*, 55(8), 1928-1933p.
- Codd, G. A., Bell, S. G., Brooks, W. P., (1989). "Cyanobacterial toxins in water." *Water Scence. Technological.* 21:1-13p.
- Cornish, B. J. P. A., Lawton, L. A., Robertson, P. K. J. (2000). "Hydrogen peroxide enhanced photocatalytic oxidation of microcystin-LR using titanium dioxide." *Applied Catalysis B: Environmental*, 25, 59-67p.
- Environmental Protection Agency – EPA (1995). Method 524.2 - Measurement of Purgeable Organic Compounds in Water by Capillary Column Gas Chromatography/Mass Spectrometry. [S.I.]. United States.
- Dahlmann, J., Rühl, A., Hummert, C., Liebezeit, G., Carlsson, P. & Graneli, E. (2001). "Different methods for toxin analysis in the cyanobacterium *Nodularia spumigena* (Cyanophyceae)". *Toxicon*, 39, 1183-1190p.

- Doménech, X., Jardim, W. F., Litter, M. I. (2001). "Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes." In: *Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogênea*. Cap. 1, Rede CYTED, La Plata.
- Duy, T. N., Lam, P. K. S., Shaw, G. R., Connell, D. W. (2000). "Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water". *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 163, 113-186p.
- Erhard, M., Döhren, H. & Jungblut, P. (2001). "Rapid typing and elucidation of new secondary metabolites of intact cyanobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry". In Chorus, I. (Ed), 2001. *Cyanotoxins: occurrence, causes, consequences*. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. 344-353p.
- Fast, M. D., Cembella, A. D., Ross, N. W. (2006). "In vitro transformation of paralytic shellfish in the clams *Mya arenaria* and *Protothaca staminea*." *Harmful Algae*, 5, 79-90p.
- Falconer, I. R., Runnegar, M. T. C., Buckley, T., Huyn, V. L., Bradshaw, P. (1989). "Using activated carbon to remove toxicity from drinking water containing Cyanobacterial blooms." *Journal of The American Water Association*, 81(2), 102-105p.
- Falconer, I.R. (1996). "Potencial impact on human health of toxic cyanobacteria." *Phycologia*, 35(6), 6-11p.
- Ferrão-Filho, A. S., Azevedo, S. M. F. O., Demott, W. R. (2000). "Effects of toxic and nontoxic cyanobacteria on the life history of tropical and temperate cladocerans." *Freshwater Biology*, 43: 1-19p.
- Ferrão-Filho, A. S., Costa, S. M., Ribeiro, M. G. L., Azevedo, S. M. F. O. (2008). "Effects of a saxitoxin-producer strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) on the swimming movements of cladocerans." *Environmental Toxicology*, 23: 161-168p.
- Ferrão-Filho, A. S. (2009). "Bioacumulação de cianotoxinas e seus efeitos em organismos aquáticos." *Oecologia Brasiliensis*, 13(2): 272-312p.
- Ferreira Filho, S. S. e Sakaguti, M. (2008) "Comportamento cinético do cloro livre em meio aquoso e formação de subprodutos da desinfecção". *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental / Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental*, 13(2): 198-206p.
- Fitzgerald, D.J.; Cunliffe, D.A. e Burch, M.D. (1999). "Development of health alerts for cyanobacteria and related toxins in drinking water in South Australia." *Environmental Toxicology*, 14(1), 203-207p.
- Freire, S. R., Pelegrini, R., Kubota, L., Duran, N., Peralta-Zamora, P. (2000). "Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas." *Química Nova*, 23: 504-511p.

- Freitas, M.S. (2007). *Remoção de Microcistinas e Saxitoxinas por Meio de Oxidação com Hipoclorito de Sódio: Avaliação em Escala de Bancada*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, DF.
- Freitas, A. M. (2008). *Utilização de Processos Oxidativos Avançados para Remediação de Águas Contaminadas por Toxinas Produzidas por Cianobactérias*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, 93p.
- Freitas, M. S. e Brandão, C. C. S. (2008). “Remoção de microcistinas e saxitoxinas por meio de oxidação com hipoclorito de sódio: avaliação em escala de bancada.” *XXXI Congresso Interamericano AIDIS*, Santiago, Chile.
- Gago-Martínez, A., Moscoso, S. A., Martins, J. M. L., Vásquez, J. A. R., Niedzwiadek, B., Lawrence, J. F. (2001). “Effect of pH on the oxidation of paralytic shellfish poisoning toxins for analysis by liquid chromatography”. *Journal of Chromatography A*, 905, 351-357p.
- Gajdek, P., Lechowski, Z., Bochnia, T., Kepczynski, M. (2001). “Decomposition of microcystin-LR by fenton oxidation.” *Toxicon*, 39, 1575-1578p.
- Gajdek, P., Bober, B., Mej, E., Bialczk, J. (2004). "Sensitised decomposition of microcystin-LR using UV radiation." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 76, 103-106p.
- García, C., Rodríguez-Navarro, A., Díaz, J., Torres, R., Lagos, N. (2009). “Evidence of in vitro glucuronidation and enzymatic transformation of paralytic shellfish toxins by healthy human liver microsomes fraction.” *Toxicon*, 53, 206-213.
- Gárate-Lizárraga, I., Bustillos-Guzmán, J. J., Alonso-Rodríguez, R., Luckas, B. (2004). “Comparative paralytic shellfish toxin profiles in two marine bivalves during outbreaks of *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) in the Gulf of California.” *Baseline/Marine Pollution Bulletin*, 48, 378-402p.
- Gehring, P., Eschweiler, H., Fieldler, H. (1995). “Ozone-electron beam treatment for groundwater remediation.” *Radiation Physic Chemistry*, 46(4-6): 1075-1078p.
- Getoff, N. (1989). “Advancements of radiation induced degradation of pollutants in drinking and waste water.” *Application Radiation Isot.*, 40(7): 585-594p.
- Gordon, G., and Rosenblatt, A. A. (1995). “Gaseous chlorine-free chlorine dioxide for drinking water”. In: *Proc. 1995 AWWA Water Quality Technology Conference*. Denver, Colo.: American Water Works Association.
- Graham N. J. D., Wardlaw, V. E., Perry, R., Jiang, J. Q. (1998). “The significance of algae as trihalomethane precursors”. *Water Science & Technology*, 37(2):83-89p.

- Griese, M. H., Hauser, K., Berkemeier, M. and Gordon, G. (1991). "Using reducing agents to eliminate chlorine dioxide and  $\text{ClO}_2^-$  ion residuals in drinking water". *Journal AWWA*, 83(5), 56-61p.
- Gulley, D. D., Boetter, A. M., Bergman, H. L. (1991). Toxstat 3.3, Computar Program.
- Hamilton, M. A., Russo, R. C., Thurfton, R. B. (1977). "Trimmed Spearman-Karber methods for estimating median lethal concentration in toxicity bioassay". *Environmental Science and Technology*, 11: 714-719p
- Harada, K., Suzuki, M. e Watanabe, M. F. (1994). "Structural Analysis of Cyanobacterial Toxins". In *Detection Methods for Cyanobacterial Toxins*. G. A. Codd, T. M. Jefferies, C. W. Keevil and E. Potter (Eds). The Royal Society of Chemistry, Cambridge: 24-33p.
- Harada, K., Kondo, F., Lawton, L. (1999). "Laboratory analysis of cianotoxinas". In: Chorus, I. e Bartram, J. (eds) *Toxic Cyanobacteria in Water – A Guide to their Public Consequences, Monitoring and Management*. E & FN Spon, Londres, Inglaterra, 369-405p.
- Hart, J., Stott, P. (1993). "Microcystin-LR removal from water". *FWR Report N° 0367*. The Foundation for Water Research, Liston Road, Marlow, Bucks.
- Hart, J., Fawell, J. K. and Croll, B., Marsalek, B., Dolejs, P., Sládecková, A., Bruchet, A., Bernazeau, F., Baudin, I. and Pieronne, I. (1998). "Algal toxins in surface waters: origins and removal during drinking water treatment processes." *Water Supply*, Vol. 16, Nos ½, 611-623p.
- Hellmann, L. J., Sheen, Y-Y., Bigelow, S. W. and Nebert, D. W. (1988). "Trout P-450 1A1: cDNA and deduced prorein". *Sequence, expression in liver and evolutionary significance DNA*. 7:379-387p.
- Himberg, K., Keijola, A. M., Hiisvirta, L., Oyysalo, H., Sivonen, K. (1989). "The effect of water treatment processes on the removal of hepatotoxins from Microcystis and Oscillatoria cyanobacteria: A laboratory study." *Water Research*; 23(8), 979-984p.
- Ho, L., Onstad, G., Von Gunten, V., Rinck-Pfeihher, S., Graig, K., Newcombe, G. (2006). "Differences in the chlorine reactivity of four microcystin analogues.", *Water Research*, 40, 1200-1209p.
- Hoehn, R. C., Grizzard, T. J., Shaffer, P. T. B. (1980). "Algae as source of trihalomethane precursors". *Journal of The American Water Works Association*; 72(6):344-50p.
- Hoeger, S. J., Shaw, G., Hitzfeld, B. C., Dietrich, D. R. (2004). "Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in two Autralian drinking water treatment plants." *Toxicon*, 43, 639-649p.

- Höger, S. J. (2003). *Problems during Drinking Water Treatment of Cyanobacterial-Loaded Surface Waters: Consequences for Human Health*. Zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften an der Universität Konstanz Fakultät für Biologie. 161p.
- Hrudey, S, Burch, M., Drikas, M. and Gregory, R. (1999). "Remedial Measures". In: *Toxic Cyanobacteria in Water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. Ingrid Chorus and Jamie Bartram. E & FN Spon. London
- Hudder, A., Song, W., O'Shea, K. E., Walsh, P. J. (2007). "Toxicogenomic evaluation of microcystin-LR treated with ultrasonic irradiation." *Toxicology and Applied Pharmacology*, 220, 357-364p.
- Indrasena, W.M., Gill, T.A. (1999). "Thermal degradation of paralytic shellfish poisoning toxins in scallop digestive glands." *Food Research International*, 32, 49-57p.
- Jacangelo, J. G., Patania, N. L., Reagan, K. M., Aida, E. M., Krasner, S. W. and McGuire, M. J. (1989). "Ozonation: assessing its role in the formation and control of disinfection by-products". *Journal AWWA*, 81(8):74-84p.
- Jaime, E., Gerdts, G., Luckas, B. (2007). "In vitro transformation of PSP toxins by different shellfish tissues." *Harmful Algae*, 6, 308-316p.
- Jones, G. J. e Negri, A. P. (1997). "Persistence and degradation of cyanobacterial paralytic shellfish poison (PSP) in freshwaters." *Water Research*, 31 (3), 525-533p.
- Jurczak, T., Tarczynska, M., Izydorczyk, K., Mankiewicz, J., Zalewski, M., Meriluoto, J. (2005). "Elimination of microcystins by water treatment processes – examples from Sulejom Reservoir, Poland." *Water Research*, 39, 2394-2406p.
- Keijola, A. M., Himberg, K., Esala, A. L., Sivonen, K., Hiisvirta, L. (1988). "Removal of cyanobacterial toxins in water treatment processes: Laboratory and pilot scale experiments." *Toxicity Assessment International Journal*; 3, 643-656p.
- Krasner, S. W., McGuire, M. J., Jacangelo, J. G., Patania, N. L., Reagan, K. M. and Aieta, E. M. (1989). "The occurrence of disinfection by-products in US drinking water". *Journal AWWA*, 81 (8):41-53p.
- Krasner, S. W. (1999). *Chemistry of Disinfection By-Product Formation*. In: *Formation and Control of Disinfection By-Products in Drinking Water*. Ed.: Singer, P. C., American Water Association, 411p.
- Kuiper-Goodman, T., Falconer, I. e Fitzgerald, J. (1999). "Human Health Aspects." In: Chorus, I. e Bartram, J. (eds.) *Toxic Cyanobacteria in Water*. E&FN Spon, Londres, 113-153p.

- Kuroda, E. K. (2006). *Remoção de Células e Subprodutos de Microcystis spp por Dupla Filtração, Oxidação e Adsorção*. Tese de Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 217p.
- Kuroda, E. K., Paschoalato, C. F. P. R e Di Bernardo, L. (2007). “Formação de subprodutos da oxidação em águas contendo cianobactérias”. 24º Congresso de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES, Belo Horizonte, Minas Gerais.
- Kwong, R. W. M., Wang, W. X., Lam, P. K. S., Yu, P. K. N. (2006). "The uptake, distribution and elimination of paralytic shellfish toxins in mussels and fish exposed to toxic dinoflagellates". *Aquatic Toxicology*, 80, 82-91p.
- Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P. A., Andrinolo, D., Azevedo, S. M. F. O., Oshima, Y. (1999). “The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil”. *Toxicon*, 37, 1359-1373p.
- Lam, A. K. Y., Prepas, E. E., Spink, D., Hruday, S. E. (1995). “Chemical control of hepatotoxic phytoplankton blooms: implication for human health”. *Water Research*; 29(8): 1845-54p.
- Lawrence, J. F e Wong, B. (1996) “Development of a manganese dioxide solid-phase reactor for oxidation of toxins associated with paralytic shellfish poisoning”. *Journal of Chromatography A*, 755, 227-233p.
- Llewellyn, L. E. (2006). “Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors.” *The Royal Society of Chemistry*, 23, 200-222p.
- Levenspiel, O. (1926). *Engenharia das Reações Químicas*. Tradução: Calado, V. M. A., Tavares, F. W. (2000). Edgard Blücher, São Paulo.
- Levin, R. E. (1992). “Paralytic Shellfish toxins: their origin, characteristic and methods of detection: a review”. *Journal of Food Biochemistry*, 15, 405-417p.
- Liu, I., Lawton, L. A., Bahnemann, D. W., Robertson, P. K. J. (2005). "The photocatalytic destruction of the cyanotoxin, nodularin using TiO<sub>2</sub>." *Applied Catalysis B: Environmental*, 60, 245-252p.
- Mazur-Marzec, H., Meriluoto, J., Plinski, M. (2006). "The degradation of the cyanobacterial hepatotoxin nodularin (NOD) by UV radiation." *Chemosphere*, 65, 1388-1395p.
- Mckim, J. M. (1977). “Evaluation of testes with early life stages of fish for predicting long-term toxicity”. *J. Fish. Res. Board. Can.* 34:1148-1154p.
- Melo Filho, L. C. (2006). *Avaliação da Ozonização como Pré ou Pós-Tratamento à Filtração Direta Descendente na Remoção de Cianobactérias e Saxitoxinas*. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Santa Catarina – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Florianópolis. 263p.

- Miao, H., Tao, W. (2008). "The mechanism of ozonation on cyanobacteria and its toxins removal." *Separation and Purification Technology*, 9396, 7p.
- Meyer, S. T. (1994). "Chlorine use in water disinfection, trihalomethane formation, and potential risks to public health. *Caderno Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 10 (1), 99-110p.
- Molica, R. J., Oliveira, E. J. A., Carvalho, P. V. V. C., Costa, A. N. S. F., Cunha, M. C. C., Melo, G. L. e Azevedo, S. M. F. O. (2004). "Ocurrence of saxitoxins and anatoxin-a (s) – like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply." *Harmful Algae*, 4(4), 743-753.
- Momani, F. A. (2007). "Degradation of cyanobacteria anotoxin-a by advanced oxidation processes." *Separation and Purification Technology*, 57: 85-93p.
- Momani, F. A., Smith, D. W., El-Din, M. G. (2008). "Degradation of cyanobacteria toxin by advanced oxidation processes." *Journal of Hazardous Materials*, 150: 238-249p.
- Monserrat, J. M., Yunes, J. S., Bianchini, A. (2001). "Effects of Anabaena spiroides (cyanobactéria) aqueous extracts on the acetylcholinesterase activity of aquatic species". *Environmental Toxicology and Chemistry*; 20 (6). In Press.
- Moore, R. E., Ohtani, I., Moore, B. S., De Koning, C. B., Yoshida, W. Y., Runnegar, M. T. C. e Carmichael, W. W. (1993). "Cyanobacterial toxins". *Gazzeta Chimica Italiana*. 123: 329-336p.
- Morris, J. C., Baum, B. (1978). "Precursors of Haloform Formation inthe Chlorination of Water Supplies". In: Jolley, R. L., Gorchev, H. and Hamilton, D. H. Jr *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, Vol. 2, (Eds.). Proceedings of a Conference, October 31-November 4, 1977, Gatlinburg, Tennessee. p 29-48. EPA.
- Muttamaro, S., Sales, C. I., Gazali, Z. (1995). "The formation of trihalometanos from chemical disinfectantes and humic substances in drinking water". *Water Supply*, 13(2), 105-17p.
- Nagata, S., Soutome, H., Tsutsumi, T., Hasegawa, A., Sekijima, M., Sugamata, M., Harada, K., Sukanuma, M. e Ueno, Y. (1995). "Novel monoclonal antibodies against microcystin and their protective activity for hepatotoxicity". *Natural toxins*. 3: 78-86p.
- Newcombe, G and Nicholson, B. C. (2002). "Treatment options for the saxitoxin class of cyanotoxins". *Water Science and tecnologia: Water Supply*, 2(5-6), 271-275p.
- Newcombe, G. and Nicholson, B. C. (2004). "Water treatment options for dissolved cyanotoxins." *Journal of Water Supply and Tecnology – AQUA*, 52(4): 227-239p.
- Nicholson, B. C., Rosinato, J. and Burch, M. D. (1994). "Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine". *Water Research* . 28, 1297 – 1303p.

- Nicholson, B. C., Shaw, G. R., Morrall, J., Senogles, P. J., Woods, T. A., Papageorgiou, J., Kapralos, C., Wickramasinghe, W., Davis, B. C., Eaglesham, G. K., Moore, M. R. (2003). "Chlorination for degrading saxitoxins (paralytic shellfish poison) in water." *Environmental Technology*, 24, 1341-1348p.
- NRC Certified Reference Materials Program (2006), CD Institute for Marine Biosciences.
- Oga, S., Camargo, M. M. A., Batistuzzo, J. A. O. (2008). *Fundamentos de Toxicologia*. 3ª edição. Atheneu Editora. São Paulo.
- Orr, P. T., Jones, G. J., Hamilton, G. R. (2004). "Removal of saxitoxins from drinking water by granular activated carbon, ozone and hydrogen peroxide – implications for compliance with the Australian drinking water guidelines." *Water Research*, 38: 4455-4461p.
- Oshima, Y. (1995). "Post-column derivatization HPLC methods for paralytic shellfish poisons". In: Hallegraef GM, Anderson, D.M., Cembella, A. D. (eds), *Manual on harmful Marine Microalgae, IOC Manuals and Guides n° 33, United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization*, Paris, 81 – 94p.
- Paixão, K. V. (2000). *Aplicabilidade da Solução Oxidante Gerada a partir da Eletrólise do Cloreto de Sódio na Inativação de Microrganismos Utilizando como Indicadores de Contaminação Escherichia coli e Colifagos*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, DF.
- Parnell, M. J., Koller, L. D., Exon, J. H., Arnzer, J. M. (1986). "Trichloroacetic acid effects on rat liver peroxisomes and enzyme-altered foci". *Environmental Health Perspectives*, 69: 73-70p.
- Paschoalato, C. F. P. R. (1995). *Efeito da Pré-Oxidação, Coagulação, Filtração e Pós-Cloração na Formação de Subprodutos Orgânicos Halogenados em Águas Contendo Substâncias Húmicas*. Tese de Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, SP.
- Paschoalato, C. F. P. R., Wiecheteck, G. K., Ferreira, J. F., Trimailovas, M., Di Bernardo, L. (2005). "Avaliação do dióxido de cloro como pré-oxidante alternativo ao cloro aplicado em águas contendo substâncias húmicas". 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental – ABES, Campo Grande, Mato Grosso do Sul.
- Paschoalato, C. F. P. R., Trimailovas, M. R., Di Bernardo, L. (2008). "Formação de subprodutos orgânicos halogenados nas operações de pré-oxidação com cloro, ozônio e peroxônio e pós-cloração em água contendo substância húmica." *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, 13(3): 313-322p.
- Pereira, G. L. S. (2001). *Artemia sp.* <http://br.geocities.com/artemiafranciscana/index.htm>. Acesso em 06/12/2006.

- Pomati, F., Moffitt, M., Cavaliere, R. e Brett, A. A. (2004). "Evidence for differences in the metabolismo of saxitoxin and C1+2 toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3." *Biochimical et Biophysica Acta*, 1674, 60-67.
- Qiao, R., Qi, X., Wang, Q., Zhuang, Y. (2005). "Degradation of microcystin-RR by UV radiation in the presence of hydrogen peroxide." *Toxicon*, 45, 745-752p.
- Reckhow, D. A. and Singer, P. C. (1984). "The removal of organic halide precursors by preozonation and alum coagulation". *Journal AWWA*, 76(4):151-157p.
- Reckhow, D. A., Legube, B. and Singer, P. C. (1986). "The Ozonation of Organic Halide Precursors: Effect of Bicarbonate". *Water Research.*, 20(8), 987-998p.
- Remião, F. (2010). Comunicação pessoal por meio de troca de e-mails em 15/03/2010.
- Richardson, S. D.; Thruston, JR. and Coellette, T. (1994). "Multispectral Identification of Chlorine Dióxide Desinfection Byproducts in Drinking Water". *Environmental Science e Technology*, 28(4).
- Rodríguez, V., Moura, S., Pinto, E., Pereira, C. M. P., Braga, R. C. (2006). "Aspectos toxicológicos e químicos da anatoxina-a e seus análogos". *Química Nova*, 29(6), 1-x.
- Rodríguez, E., Onstad, G. D., Kull, T. P. J., Metcalf, J. S., Acero, J. L., von Gunten, U. (2007). "Oxidative elimination of cyanotoxins: comparison of ozone, chlorine, chlorine dioxide and permanganate. *Water Research*, 41, 3381-3393p.
- Rodríguez, E. M., Acero, J. L., Spooft, L., Meriluoto, J. (2008). "Oxidation of MC-LR and RR with chlorine and potassium permanganate: toxicity of the reaction products." *Water Research*, 42, 1744-1752p.
- Rook, J., Evans, S. (1974). "Removal of trihalometanos precursors from surface water using weak resins". *Journal American Water Works Association – AWWA*, 9, p 520 – 524.
- Rositano, J., Nicholson, B.C., Heresztyn, T., and Velzeboer, R.M.A. (1998). "Characterisation and determination of PSP toxins in neurotoxic cyanobacteria and methods for their removal from water." *Research Report*, 148, Urban Water Research Association of Australia
- Rositano, J., Newcombe, G., Nicholson, B., Sztajn bok, P. (2000). "Ozonation of nom and algal toxins in four treated waters." *Water Research*, 35(1), 23-32p.
- Russel, J. B. (1994). *Química Geral*. Vol. 2, Makron Books, São Paulo, Brasil.
- Sako, Y., Yoshida, T., Uchida, A., Arakawa, O., Noguchi, T., Ishida, Y. (2000). "Purification and characterization of a sulfotransferase specific to N-21 of saxitoxin and gonyautoxin 2+3 from the toxic dinoflagellate *Gymnodinium Catenatum* (Dinophyceae)." *Journal of Phycology*, 37, 1044-1051p.

- Sanches, S. M., Amarante Jr, O. P., Campos, S. X., Vieira, E. M. (2003). “Formação de trihalometanos em Água de Abastecimento Público”. *Anais Associação de Química*, 52(2), 51-56p.
- Schechter, D. S. and Singer, P. S. (1995). “Formation of aldehydes during ozonation”. *Ozone: Science and Engineering*, 17(1):53-69p.
- Seawright, A. A., Nolan, C. C., Shaw, G. R., Chriswell, R. K., Norris, R. L., Moore, M. R., Smith, M. J. (1999). “The oral toxicity for mice of the tropical cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Wolosznska)”. *Environmental Toxicology*; 14:135-42p.
- Senogles, P., Shaw, G., Smith, M., Norris, R., Chiswell, R., Mueller, J., Sadler, R., Eaglesham, G. (2000). “Degradation of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin, from *Cylindrospermopsis raciborskii*, by chlorination”. *Toxicon*, 38, 1203 – 1213.
- Senogles-Derham, P. J., Seawright, A., Shaw, G., Wickramasingh, W., Shahin, M. (2003). “Toxicological aspects of treatment to remove cyanobacterial toxins from drinking water determined using heterozygous P53 transgenic mouse model.” *Toxicon*, 41: 979-988p.
- Shang, C. e Blatchley, E. R. (2001). “Chlorination of pure bacterial cultures in aqueous solution.” *Water Research*, 35(1): 244-254p.
- Shaw, G, Seawright, A., Shahin, M., Senogles, P., Mueller, J., Moore, M. (2000). “The cyanobacterial toxic, *Cylindrospermopsis*: Human health risk assessment” . *Report from the National Research Center for Environmental Toxicology*. Australia. Queensland: National Research Center for Environmental Toxicology.
- Sens, M. L., Melo Filho, L. C., Mondardo, R. I., Proença, L. A. O. (2006). “Ozonização: uma alternativa para o tratamento de água com cianobactérias.” *Revista de Ciência & Tecnologia*, 13(25/26), 47-54p.
- Shephard, G. S., Stockenström, S., de Villiers, D., Engelbrecht, W. J., Wessels, G. F. S. (2001). "Degradation of microcystin toxins in a falling film photocatalytic reactor with immobilized titanium dioxide catalyst.”. *Water Research*, 36: 140-147p.
- Shi, H. X., Qu, J. H., Wang, A. M., Ge, J. T. (2005). "Degradation of microcystins in aqueous solution with in situ electrogenerated active chlorine.” *Chemosphere*, 60, 326-333p.
- Shimizu, Y., Yoshioka, M. (1981). “Transformation of paralytic shellfish toxins as demonstrated in scallop homogenates.” *Science*, 212 (1), 547-549.
- Silva, A.S. (2005). “Avaliação da capacidade de Remoção de Saxitoxinas por Diferentes Tipos de Carvão Ativado em Pó (CAP) Produzidos no Brasil.” Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Publicação PTARH.DM-083/05, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 113p.

- Singer, P. C., Robinson, K. and Elefritz, R. A. (1990). "Ozonation at belle glade, Florida: a case history". *Ozone: Science and Engineering*, 12(2):199-215.
- Singer, P. C. (1994). "Control of disinfection by-products in drinking water". *Jour. of Env. Eng.*, 120(4):727.
- Sivonen, K. e Jones, J. (1999). "Cyanobacterial toxins". In: Chorus, I. e Bartram, J. (eds): *Toxic Cianobacteria in Water: a Guide to Public Health Significance, Monitoring an Management*. E&FN Spon, Londres, Inglaterra, 41-111p.
- Sivonen, K., Niemela, S. I., Niemi, R. M., Lepisto, L., Luoma, T. H., Rasamen, L. A. (1990). *Toxic cyanobacteria (blue-gree algae) in Finís fresh and coastal waters*. *Hydrobiologia*; 190:267-75.
- Speitel Jr, G. E. (1999). "Control of disinfection by-product formation using formation". In: Singer, P. C. *Formation and Control of Disinfection By-Products in Drinking Water*. American Water Association, 411p.
- Stevens, A. A., Slocum, C. J., Seeger, D. R., Robeck, G. G. (1976). "Chlorination of organics in drinking water". *Journal of the American Water Works Association*, p.615-620.
- Stevens, A. A., Moore, L. A. and Miltner, R. J. (1989). "Formation and control of non-trihalomethane disinfection by-products". *Journal of the American Water Works Association*, 81(8), 54p.
- Strichartz, G. (1984). *Structural Determinants of the Affinity of Saxitoxin for Neuronal Sodium Channels – Electrophysiological Studies on Frog Peripheral Nerve*. Anesthesia Research Laboratories, Department of Pharmacology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts.
- Symons, J. M., Stevens, A. A., Clark, R. M., Geldreich, E. F., Love Jr, O. T. and DeMarco, J. (1982). *Treatment Techniques for Controlling Trihalomethanes in Drinking Water*. American Water Works Association, Denver, Colorado.
- Tao, J. e Tian-Jiu, J. (2008). "Investigation of extraction method for paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish." *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 36(11), 1460-1464p.
- Teixeira, M. G. L. C., Costa, M. C. N., Carvalho, V. L. P., Pereira, M. S., Hage, E. (1993). "Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica, Bahia, Brazil". *Bulletin of PAHO*.
- Teixeira, C. P. A. B., Jardim, W. F. (2004). *Processos Oxidativos Avançados – Conceitos Teóricos. Caderno Temático*. Instituto de Química, Laboratório de Química Ambiental, Universidade Estadual de Campinas, 3: 83p.

- Trehy, M. L. and Bieber, T. I. (1981). "Detection, identification and quantitative analysis of dihaloacetonitriles in chlorinated natural waters". In: Mich, A. A. *Advances in the Identification & Analysis of Organic Pollutants in Water*. Vol. 2. Ann Arbor Science Publishers.
- Tobias, A. C. B. (2010). "Métodos quantitativos aplicados a custos, análise estatística como um auxiliar valioso nas decisões". Cavalcante Consultores, *Up-To-Date*<sup>®</sup> - Nº 257.
- Tokmak, B., Capar, G., Dilek, F. B., Yetis, U. (2004). "Trihalomethanes and associated potential cancer risks in the water supply in Ankara, Turkey". *Environmental Research*, 96: 345-352p.
- United States Environmental Protection Agency-Usepa (1995). Method 551.1. *Determination of chlorination disinfection byproducts, chlorinated solvents, and halogenated pesticides/herbicides in drinking water by liquid-liquid extraction and gas chromatography with electron-capture detection*. CD-ROM Revisão 1. Set.1995, Ohio, USA.
- United States Environmental Protection Agency-Usepa (1995). Method 552.2. *Determination of haloacetic acids and dalapon in, in drinking water by liquid-liquid extraction, derivatization and gas chromatography with electron-capture detection*. CD-ROM Revisão 1. Set.1995, Ohio, USA.
- United States Environmental Protection Agency-Usepa (2006). Edition of the drinking water standards and health advisories". EPA 822-R-06-013. Office of Water U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Vale, P (2006). "Implementação de técnicas de HPLC e LC-MS para estudo de perfis de biotoxinas marinhas em plâncton e em bivalves". *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 101, 163-180p.
- Vale, P. (2010). Comunicação pessoal por meio de troca de e-mails em 15/03/2010.
- Vasconcelos, V. M. (1995). *Toxicologia de cianobactérias. Distribuição de cianobactérias tóxicas e as suas toxinas doces portuguesas. Bioacumulação em bivalves*. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Ecologia Aplicada apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Porto. 137p.
- Viana-Veronezi, M., Giani, A., Melo, C. S., Gomes, L. L., Libânio, M. (2009). "Avaliação da remoção de saxitoxinas por meio de técnicas de tratamento das águas de abastecimento." *Engenharia Sanitária e Ambiental / Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental*, 14(2): 193-204p.
- Ward, K. W., Rogers, E. H., Hunter, E. S. (2000). Comparative of haloacetic acid and protein kinase inhibition embryotoxicity in mouse whole embryo culture". *Toxicological Sciences*, 53: 118-126p.

- Wetzel, R. G. (2001). *Limnology – Lake and Rivers Ecosystems*. Third Edition. Academic Press. San Diego, California, USA.
- World Health Organization – WHO. (2008). *Guidelines for drinking-water quality*. 3rd ed. Geneve.
- Ying, J., Juan-li, H., Jiao, F., Ming-song, W., Chong-wei, C. (2008). “Degradation of microcystin-RR in water by chlorone dioxide.” *Journal of China University of Mining & Technology*, 18: 623-628p.
- Yuan, B., Li, Y., Huang, X., Liu, H., Qu, J. (2006). “Fe (VI) – assisted photocatalytic degradating of microcystin-LR using titanium dioxide.” *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 178, 106-111p.
- Zhong, Y., Jin, X., Qiao, R., Qi, X., Zhuan, Y. (2009). “Destruction of microcystin-RR by fenton oxidation.” *Journal of Hazordous Materials*, 1016(10): 16p.

**Referencia bibliográfica citada em *apud***

Shimizu, Y. (1988). "Paralytic shellfish poisons". In: Herz, W., Grisebach, H., Kirby, G. H. Progress in the chemistry of organic natural products. Wien Springer Verlag, New York. 236 – 264p.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A – DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO DE SEMIPURIFICAÇÃO DO EXTRATO LISADO DE SAXITOXINAS

Em geral, o procedimento de semipurificação e concentração de saxitoxinas seguiu a seguinte sequência (Rositano *et al.*, 1998):

1 – Corrigiu-se a solução de ácido heptanosulfônico (0,1 M; 5 mL para cada amostra utilizada) para pH 2,0 com ácido fosfórico.

2 – Adicionou-se ao volume de amostra (200 mL) o ácido heptanosulfônico (5 mL; 0,1 M). Em seguida, corrigiu-se o pH da amostra para 2,0 com ácido fosfórico.

3 – Passou-se a amostra por um cartucho de carvão (cartucho de extração em fase sólida, contendo carvão grafitizado – marca Alltech – 300 mg/8mL), com:

a) metanol (10 mL);

b) água Milli-Q (20 mL);

c) solução de ácido heptanosulfônico corrigida para pH 2,0 (5 mL). A Figura A.1 mostra o processo de passagem da amostra de saxitoxinas pelo cartucho de carvão grafitizado.



Figura A.1 – Etapa do processo de passagem da amostra lisada de saxitoxinas pelo cartucho de carvão grafitizado

4 – Passou-se a amostra (200 mL) pelo cartucho a uma velocidade de 1 a 2 mL/min.

5 – Eluiu-se o cartucho com carvão em tubos separados com:

a) 50% metanol e 50% água Milli-Q (10 mL);

b) ácido acético 0,5M (10 mL). A Figura A.2 mostra a etapa de eluição das amostras com metanol e com ácido acético.



Figura A.2 – Etapa do processo de eluição com metanol e com ácido acético

6 – Transferiu-se a fração 5b (ácido acético 0,5 M) para um balão de 25 mL e evaporou-se essa solução em um rotavapor à secura total. Adicionou-se a fração 5a (metanol 50%) ao mesmo frasco e evaporou-se à secura total (Manteve-se a temperatura do banho-maria entre 45-55°C). A Figura A.3 mostra o aparelho de rotavapor que foi utilizado na evaporação do ácido acético e do metanol durante o processo de semipurificação das amostras de saxitoxinas.



Figura A.3 – Aparelho de rotavapor que foi utilizado na evaporação do ácido acético e do metanol durante o processo de semipurificação das amostras de saxitoxinas

7 – Reconstituiu-se o extrato em 40 mL de ácido acético 0,5 M e armazenou-se em um refrigerador até o momento da utilização.

## APÊNDICE B – PROCEDIMENTO PARA OBTENÇÃO DA CINÉTICA DE ORDEM N

Foi utilizado o método do tempo de meia vida fracionária, com  $F = 80\%$ , cuja formulação descrita por Levenspiel (1926) é mostrada pela Equação B.1.

$$t_F = \frac{(0,8)^{1-n} - 1}{k(n-1)} C_0^{1-n} \quad \text{Equação B.1}$$

Em seguida, obtêm-se os logaritmos mostrados pela Equação B.2.

$$\underbrace{\log t_f}_y = \log \left( \underbrace{\frac{0,8^{1-n} - 1}{k(n-1)}}_{\substack{\text{uma constante} \\ a}} \right) + \underbrace{(1-n)}_{bx} \log C_0 \quad \text{Equação B.2}$$

O procedimento consiste nos seguintes passos:

- Faz-se um gráfico acurado dos dados de Concentração (C) em função de tempo.
- Desenha-se uma curva suave (mais importante) para representar os dados, como mostrado pela Figura B.1.

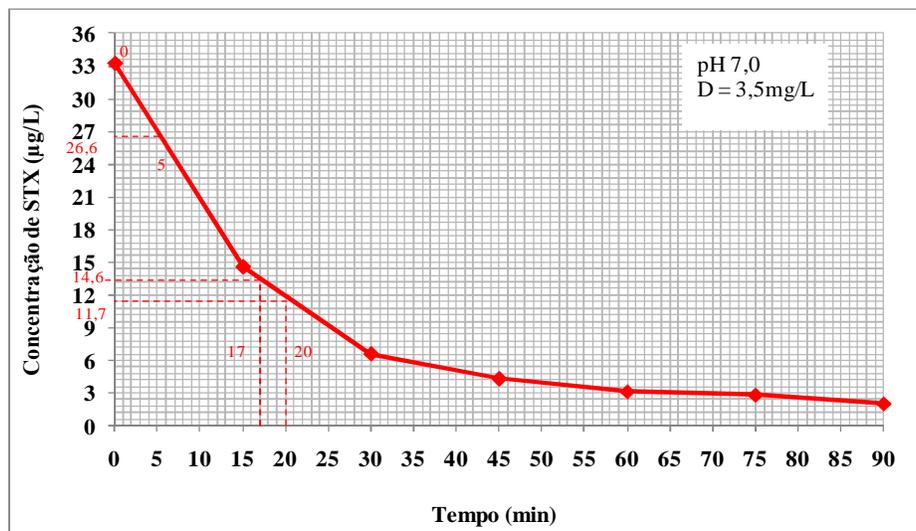


Figura B.1 – Curva suave da concentração de STX (Concentração) em função tempo (min)

- Escolhem-se os pontos da concentração de STX (C) que torne a curva suave (Figura B.1) e, em seguida, preenche-se a tabela a partir da Figura B.1.

STX					
D = 3,5 mg/L					
pH 7,0					
Tempo (min)	C <sub>o</sub> (Inicial) (µg/L)	C <sub>final</sub> (= 0,8C <sub>o</sub> )	Tempo (T <sub>f</sub> , min)	Log T <sub>f</sub>	Log C <sub>o</sub>
0	33,3	26,6	(5 - 0) = 5	0,7	1,5
15	14,6	11,7	(20 - 17) = 3	0,5	1,2
30	6,6	5,3	(45 - 33) = 12	1,1	0,8
45	4,3	3,4	(75 - 65) = 10	1,0	0,6
60	3,1	2,5	(89 - 52) = 37	1,6	0,5

A partir da curva e não dos dados

- Como próxima etapa, faz-se um gráfico de Log T<sub>f</sub> em função de Log C<sub>o</sub>, como mostrado na Figura B.2.

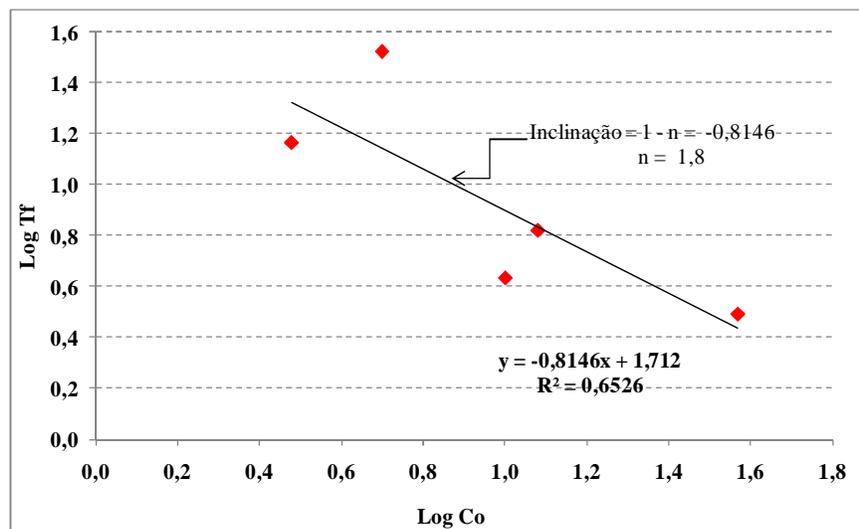


Figura 4.2 – Log T<sub>f</sub> em função C<sub>o</sub>

- Agora, tem-se a ordem da reação. Para avaliar a constante de taxa, considera-se qualquer ponto da curva de Concentração (C) *versus* Tempo, por exemplo, para C<sub>o</sub> = 33,3 µg/L, que corresponde a T<sub>f</sub> = 5 min. Coloca-se todos esses valores na Equação B.1, resultando em:

$$5 = \frac{(0,8)^{1,8} - 1}{k(1,8 - 1)} 33,3^{1,8}$$

$$k = 0,003$$

- Consequentemente, a taxa de reação que representa a Equação B.1 é:

$$-r_C = \left( 0,003 \frac{L^{0,4}}{\mu g^{0,4} \cdot \text{min}} \right) C^{1,8}, \quad \frac{\mu g}{L \cdot \text{min}}$$

## APÊNDICE C - CULTIVO E MANUTENÇÃO DOS DAFINÍDEOS, PRECEDIMENTO DE REALIZAÇÃO DO TESTE DE SENSIBILIDADE DOS ORGANISMOS E PROCEDIMENTO DO TESTE DE TOXICIDADE AGUDA

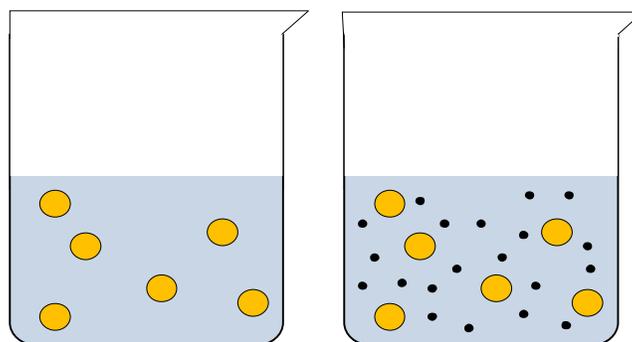
### C.1 – CULTIVO E MANUTENÇÃO DOS DAFINÍDEOS

Para o cultivo e manutenção das espécies *D. similis* e *C. silvestrii* Daday, em laboratório, foram seguidas normas padronizadas da ABNT (2005). Assim, os organismos foram cultivados em água reconstituída (com dureza total de 40 – 48 mgCaCO<sub>3</sub>/L, pH 7,0 – 7,6) em béquer de 2 L, com um máximo de 120 organismos, mantidos em incubadora a 25°C e fotoperíodo de 16 h luz/8 h escuro. A renovação da água de cultivo das culturas-estoque foi realizada três vezes por semana.

Os organismos foram alimentados com composto e suspensão de alga clorofíceas. O alimento composto consiste de uma mistura de partes iguais de leveduras (fermento biológico seco Fleishmann® dissolvido em água destilada) e de ração para peixe fermentada (Tetramin®), sendo adicionados 0,02mL por organismo. A alga clorofícea utilizada foi a espécie *Pseudokirchneriella subcapitata* em fase exponencial de crescimento, cultivada em meio CHU-12, sob iluminação e aeração constantes. A concentração fornecida ao cultivo foi de  $1 \times 10^5$  células por organismo.

Um dia antes do início de cada teste, um lote de fêmeas ovígeras de dafinídeos foi separado das culturas, utilizando-se pipeta com bordas arredondadas. O lote foi colocado em um béquer de vidro de 2 L com a água de cultivo e alimentado com a alga clorofícea.

Após 18 horas, os filhotes de dafinídeos foram separados das fêmeas. Em seguida, aguardou-se mais 6 horas para serem usados nos testes, garantindo-se, com esse procedimento, o uso de filhotes com idade mínima de 6 horas e no máximo de 24 horas. A Figura C.1 ilustra o processo de obtenção de filhotes dos organismos utilizados nos testes de toxicidade.



Representação de fêmeas de *Daphnias* em um béquer de 2L

Amostra com fêmeas e filhotes de *Daphnias*. As fêmeas adultas foram retiradas, ficando os filhotes recém eclodidos.

Figura C.1 - Dosemo esquemático de obtenção de filhotes de dafínídeos para a utilização em testes de toxicidade

## C.2 - TESTE PARA DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOS CLADÓCEROS

O controle de sensibilidade dos organismos, por meio da realização periódica de ensaios com determinadas substâncias de referência, é um procedimento que permite maior precisão e confiabilidade nos resultados obtidos ao longo do tempo por um mesmo laboratório ou entre laboratórios. Recomenda-se que a sensibilidade das culturas seja avaliada dentro de 14 dias antes ou após a realização dos ensaios de toxicidade, ou ainda, paralelamente a estes. Os organismos de uma cultura estarão aptos para serem submetidos à avaliação de toxicidade se estiverem dentro de uma faixa de sensibilidade específica para uma substância de referência.

Como substância de referência, foi utilizado o cloreto de sódio (NaCl), tanto para a *D. similis* como para a *C. silvestri*, sendo que a faixa de concentração testada variou entre 0,6 a 2,2 g/L. Para a realização do teste de sensibilidade, cinco neonatas, com idade inferior a 24 h, foram colocadas em recipientes plásticos atóxicos contendo 10mL de solução de cloreto de sódio (NaCl), em diferentes concentrações: 0 (controle); 0,6; 1,0; 1,3; 1,6 e 2,2 g/L, em quatro réplicas. As concentrações foram preparadas a partir de uma solução estoque (10 g/L de NaCl), utilizando-se água de cultivo como água de diluição.

Durante o período de exposição (48 h), os organismos foram mantidos em incubadora a 25° C, sem iluminação e sem alimentação. Foram medidos: pH, condutividade elétrica e dureza no

início e ao final do teste. Após 24 h e 48 h, registrou-se o número de indivíduos imóveis ou mortos em cada concentração. Com estes dados, calculou-se a  $CE(I)_{50 - 48h}$ , concentração efetiva mediana que causa efeito agudo (imobilidade) a 50% dos organismos em 48h de exposição, utilizando-se o programa estatístico Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton *et al.*, 1977). Os organismos são considerados adequados quando o valor da  $CE_{50 - 48h}$  está dentro da faixa de sensibilidade estabelecida (ABNT, 2004; 2005), que para a *D. similis* e a *C. silvestrii* situa-se entre 1,06 a 1,64 g/L de NaCl. Se a porcentagem de organismos imóveis no controle exceder 10%, o resultado é considerado inválido, o que não ocorreu nesse experimento.

### **C.3 - TESTES DE TOXICIDADE AGUDA**

Os testes de toxicidade aguda foram realizados de acordo com normas padronizadas (ABNT, 2004), utilizando-se os dafnídeos *D. similis* e *C. silvestrii* como organismos-teste.

Nos testes, cinco neonatas, com idade inferior a 24 h, foram colocadas em recipientes plásticos atóxicos com 10 mL da amostra, em quatro réplicas para cada amostra. Para o controle, foi utilizado o mesmo número de réplicas e de neonatas, que foram expostas somente à água de cultivo.

Durante o período de exposição (48 h), os organismos foram mantidos em incubadora a 25°C, sem iluminação e sem alimentação. Foram medidos: pH, condutividade elétrica e dureza no início e ao final dos testes. Após 24 h e 48 h, registrou-se o número de indivíduos imóveis ou mortos para cada amostra.

**APÊNDICE D – CURVAS DE CALIBRAÇÃO OBTIDAS PARA AS VARIANTES neoSTX, dcSTX e STX**

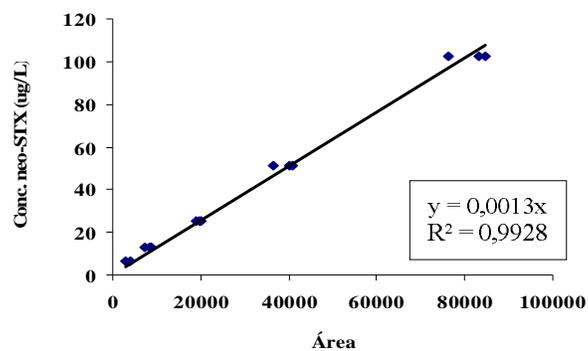


Figura D.1 - Curva de calibração para neoSTX

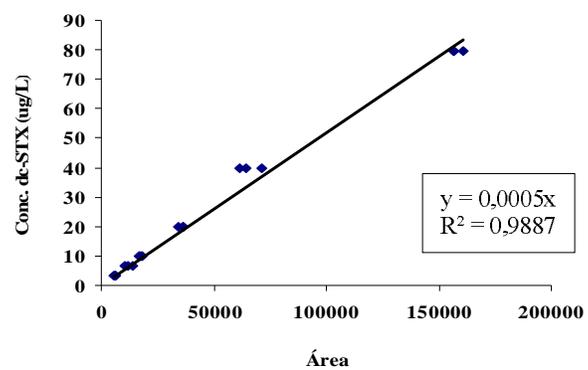


Figura D.2 - Curva de calibração para dcSTX

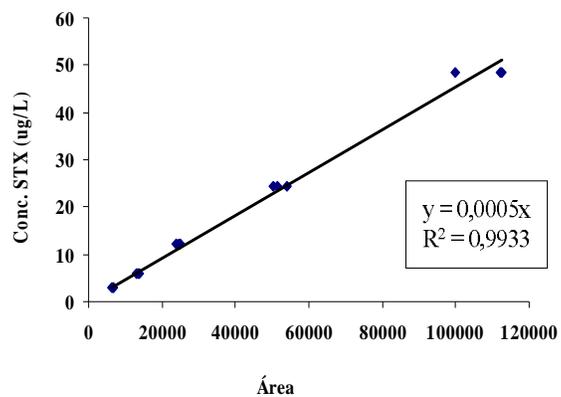


Figura D.3 - Curva de calibração para STX

## APÊNDICE E – DETERMINAÇÃO DE SUBPRODUTOS

### APÊNDICE E.1 – DETALHES ADICIONAIS SOBRE O MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE TRIALOMETANOS, CLORO HIDRATO, CLOROPICRINAS, HALOACETONAS E HALOACETONITRILAS (USEPA 551.1, 1995).

Uma alíquota de 10 mL de amostra armazenada a 4°C foi rapidamente coletada e inserida em um frasco do tipo *vial* de 25 mL, ao qual foi adicionado um volume de 10 µL de diclorometano 1% (o diclorometano foi o padrão interno (PI) do método e foi introduzido em todas as amostras, padrões da curva de calibração e brancos).

A seguir, foram adicionados no *vial*, 10 mL de Metil-Terc Butilico Éter (MTBE), mantido a 4°C, e aproximadamente 1,0 g ± 1,0 de sulfato de sódio puro, agente secante da fase orgânica.

O frasco *vial* foi agitado vigorosamente por 30 minutos e imediatamente acondicionado em freezer à -4°C. Duas fases, bem definidas, separam-se dentro do frasco *vial*: a fase orgânica superior, chamada de extrato e a fase inferior, chamada de fase aquosa. A fase orgânica foi retirada e transferida para um frasco tipo *vial* de 10 mL, acondicionada em freezer e conservada para análise em CG-DCE por um período máximo de 7 dias. A fase aquosa foi descartada.

Como a concentração original dos padrões é elevada, uma diluição e mistura foi efetuada com acetona de pureza grau cromatográfica (J.T. Baker). A partir dessa diluição e mistura, foram preparadas as diluições para elaboração de uma curva analítica de calibração.

A curva analítica de calibração foi diluída em meio aquoso, utilizando-se balões volumétricos aferidos de 10 mL. A água utilizada para diluição dos padrões (meio aquoso) foi previamente purificada, partindo de um volume de 5 litros de água ultrapura, obtida em um purificador Milli-Q. Para garantir a isenção de compostos voláteis, cloro e matéria orgânica, a água ultrapura passou pelo seguinte procedimento:

- adição de carvão ativado e filtração em 0,45 µm;
- fervura por 10 minutos;
- exposição à radiação UV por 1 minuto;

- borbulhamento de nitrogênio por 5 min;
- resfriamento e acondicionamento em frasco de vidro escuro a 4°C.

Em cada balão, foram adicionados volumes excedentes de 10 µL de padrão interno, diclorometano 1%, inclusive em um branco, seguido de uma leve agitação. Posteriormente, um volume de 4 mL de MTBE (a 4°C) foi adicionado para extração líquido-líquido, seguido de forte agitação por 5 minutos e decantação a temperatura de -4°C.

Durante todo o procedimento de manipulação com padrões e solventes para diluição e preparo da curva de calibração, teve-se o cuidado de colocar gelo em uma bandeja plástica onde os reagentes e vidrarias em uso permaneceram apoiados para evitar perdas por evaporação.

Na Tabela E.1 está apresentado um resumo da curva de calibração do método 551.1 USEPA para determinação de trialometanos, clorohidrato, haloacetoneitrilas, haloacetonas e cloropicrina.

Tabela E.1 - Resumo da curva de calibração para trialometanos, haloacetoneitrilas, haloacetonas, clorohidrato e cloropicrina em µg/L.

Compostos	Tempo retenção (min)	Pontos da curva de calibração (µg/L)						
		1	2	3	4	5	6	7
Padrão Interno (PI)	4,26	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL	10µL
Clorofórmio	6,73	10	20	30	40	50	60	80
Tricloroacetoneitrila	8,87	10	20	30	40	50	60	80
Dicloroacetoneitrila	9,34	10	20	30	40	50	60	80
Bromodiclorometano	9,85	10	20	30	40	50	60	80
Cloro hidrato	10,21	10	20	30	40	50	60	80
1,1-Dicloropropanona	10,79	10	20	30	40	50	60	80
Cloropicrina	13,02	10	20	30	40	50	60	80
Dibromoclorometano	13,39	10	20	30	40	50	60	80
1,1,1-Tricloropropanona	14,35	10	20	30	40	50	60	80
Bromocloroacetoneitrila	15,40	10	20	30	40	50	60	80
Dibromoacetoneitrila	16,89	10	20	30	40	50	60	80
Bromofórmio	17,07	10	20	30	40	50	60	80

## **E.2 – DETALHES ADICIONAIS SOBRE A DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS HALOACÉTICOS**

Uma alíquota de 50 mL foi retirada do frasco de 250 mL, contendo a amostra desclorada e transferida para um balão volumétrico de 50mL. Imediatamente, foi adicionado um volume de 50 µL de padrão Interno (2,3-ácido dibromopropiônico, 10 mg/L). Em seguida, a amostra foi acidificada com 1 mL de ácido sulfúrico concentrado e, acrescentou-se 2 g de sulfato de cobre e 16g de sulfato de sódio. O frasco foi tampado e agitado por 10 min, sendo, em seguida, resfriado em geladeira até temperatura de 4°C.

Como este procedimento gera uma reação exotérmica, o resfriamento é muito importante para evitar perdas dos compostos voláteis. Após completa dissolução e resfriamento da amostra, foram adicionados 4 mL de MTBE (gelado). Manteve-se uma agitação por 30min seguido de repouso para separação das fases. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta, transferiu-se 1,5 mL da fase orgânica para um tubo de vidro com tampa rosqueável, no qual foi adicionado 1 mL de solução ácida de metanol 10%. Após fechamento do frasco, o mesmo foi mantido sob aquecimento imerso em banho de água à 50°C por 2 h.

Finalmente, o frasco foi resfriado e adicionou-se 4 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio em incrementos de 1 mL.

O extrato obtido foi transferido para um frasco *vial* de 4 mL e armazenado em temperatura de -4°C; esse extrato tem validade analítica de 14 dias; um volume de 1 µL foi injetado no cromatógrafo.

As soluções com concentrações variadas foram obtidas a partir de diluição da mistura original em meio MTBE. Em seguida, seis balões volumétricos e aferidos foram utilizados para elaboração de 5 pontos de diferentes concentrações e 1 branco de calibração. A curva analítica foi diluída em meio aquoso com água isenta de compostos orgânicos voláteis, e cada ponto da curva foi derivatizado por metilação ácida. Na Tabela E.2 está apresentado um resumo da curva analítica 552 de calibração, a concentração original de cada composto da mistura padrão e a variação de concentração obtida.

Tabela E.2- Resumo da curva analítica de calibração para ácidos haloacéticos (AHA).

Compostos	Tempo de retenção (min)	Curva de Calibração (µg/L)						
		P1	P 2	P 3	P 4	P5	P6	P7
MCAA	9,93	0,6	1,2	2,4	3,6	4,8	6	12
MBAA	10,81	0,4	0,8	1,6	2,4	3,2	4	8
DCAA	11,20	0,6	1,2	2,4	3,6	4,8	6	12
TCAA	12,39	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2	4
surrogate	13,25	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2	4
BCAA	14,50	0,4	0,8	1,6	2,4	3,2	4	8
BDCAA	17,03	0,4	0,8	1,6	2,4	3,2	4	8
DBAA	17,72	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2	4
CDBAA	20,90	1	2	4	6	8	10	20
PI	21,37	1	1	1	1	1	1	1
TBAA	24,68	2	4	8	12	16	20	40

PI: 2,3-ácido dibromopropionico

**APÊNDICE F - CONCENTRAÇÕES INICIAIS E FINAIS DE SAXITOXINAS PARA DIFERENTES DOSES DE CLORO E DE pH NOS TEMPOS DE CONTATO DE 30 E DE 60 MINUTOS (AMOSTRAS LISADAS E FILTRADAS)**

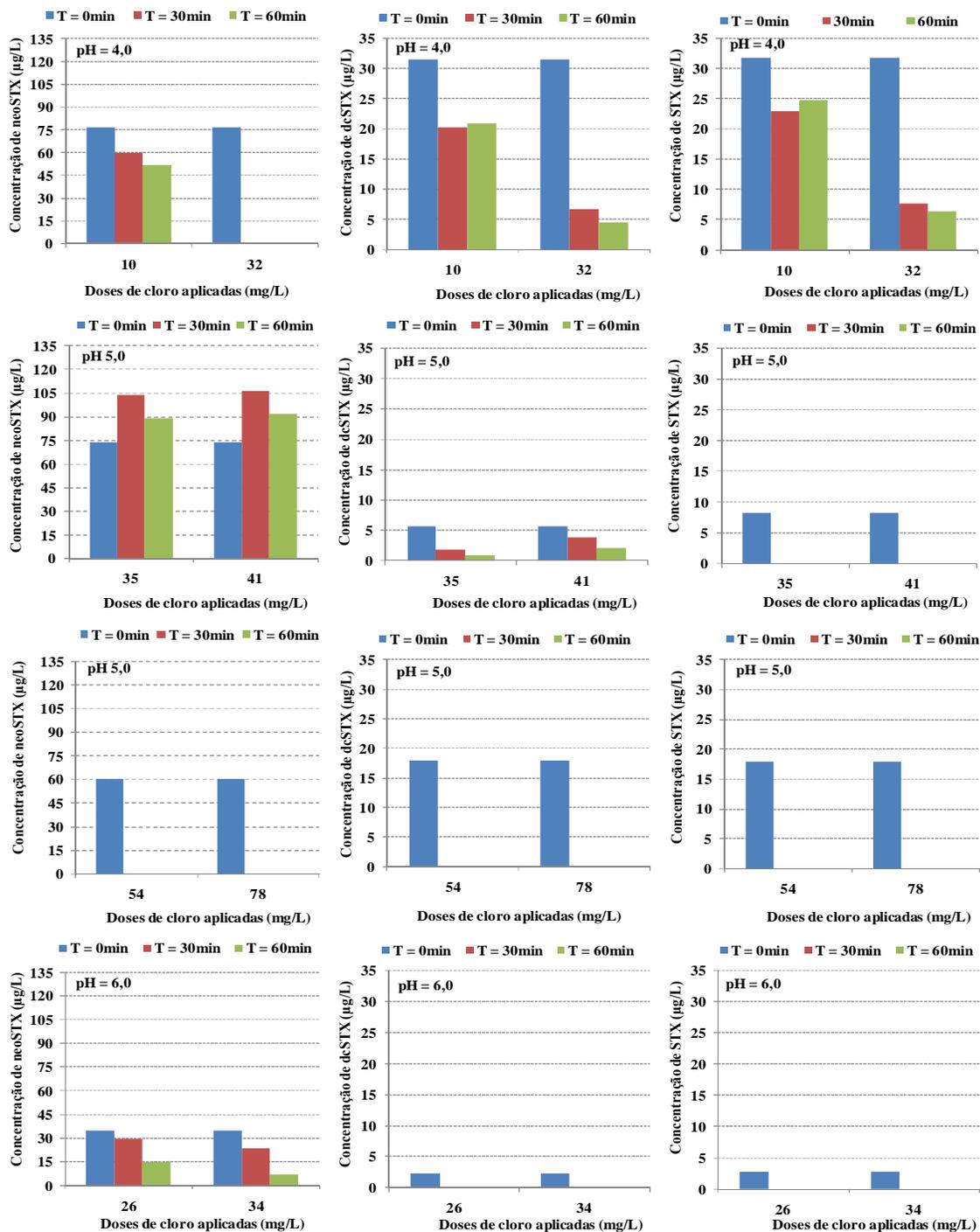


Figura F.1 – Concentrações iniciais e finais de saxitoxinas para diferentes doses de cloro e valores de pH 4,0, 5,0 e 6,0 nos tempos de contato (T) de 30 e de 60 minutos.

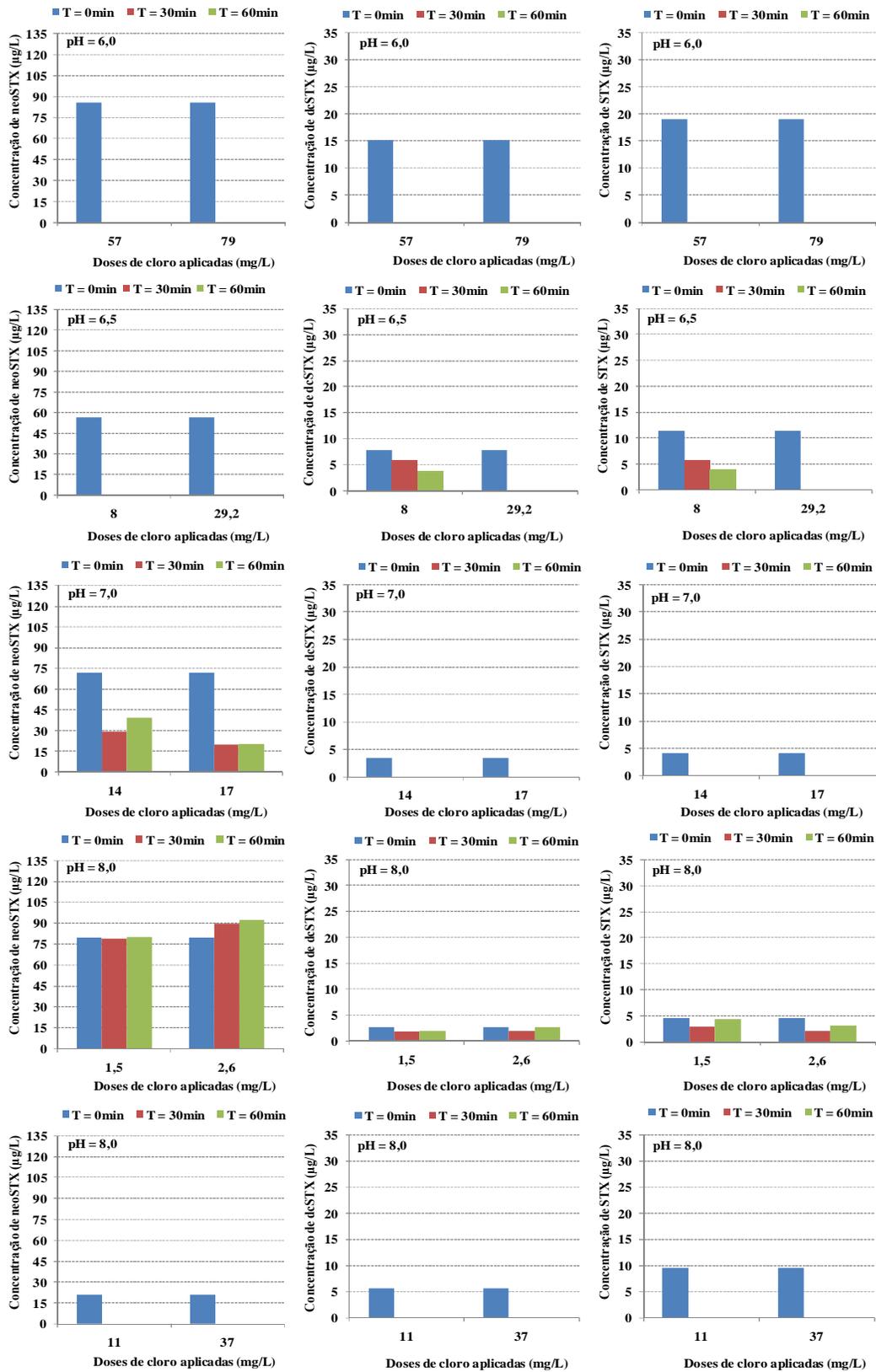


Figura F.2 - Concentrações iniciais e finais de saxitoxinas para diferentes doses de cloro e valores de pH 6,0, 6,5, 7,0 e 8,0 nos tempos de contato (T) de 30 e de 60 minutos.

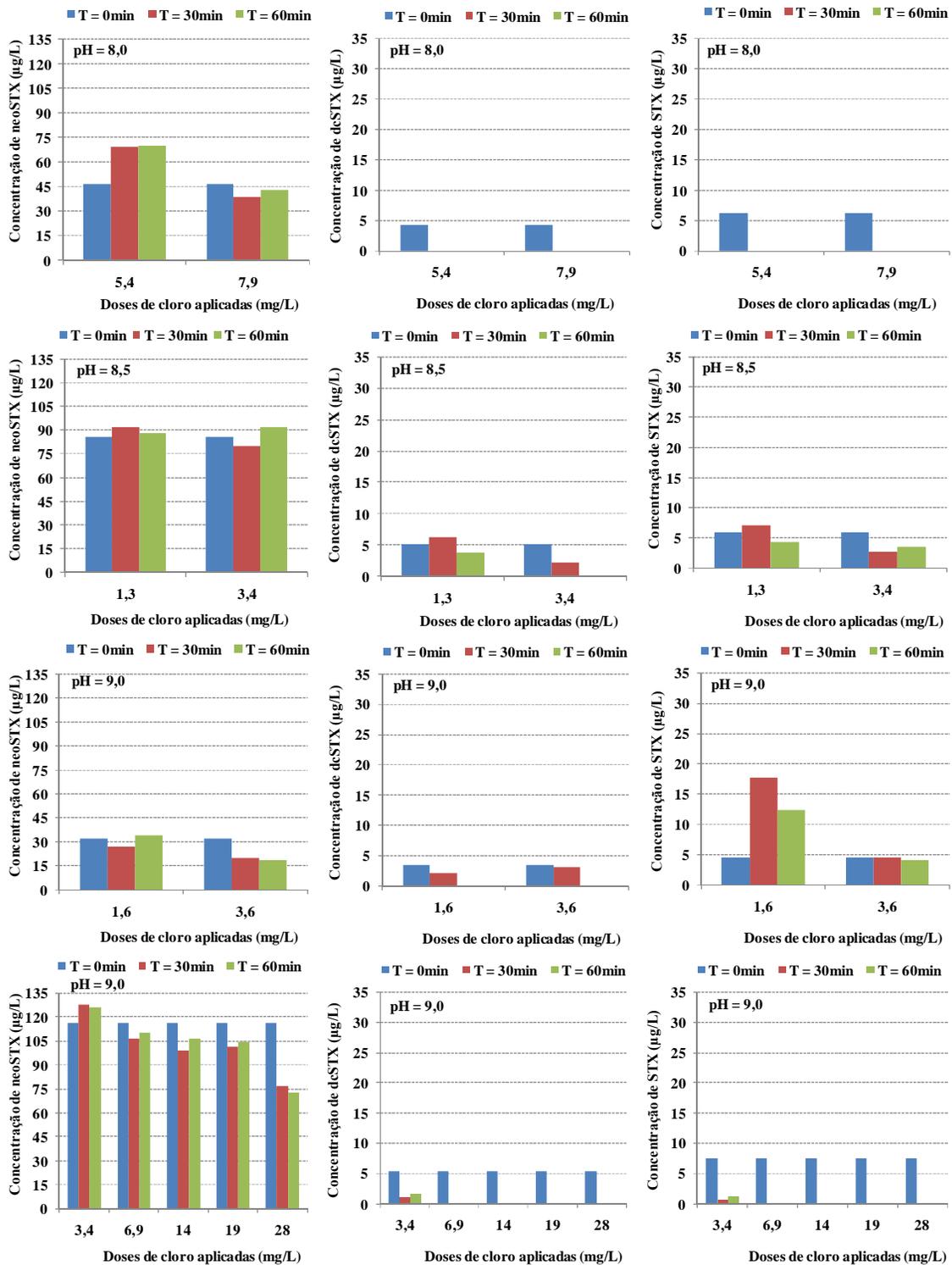


Figura F.3 - Concentrações iniciais e finais de saxitoxinas para diferentes doses de cloro e valores de pH 8,0, 8,5 e 9,0 nos tempos de contato (T) de 30 e de 60 minutos.

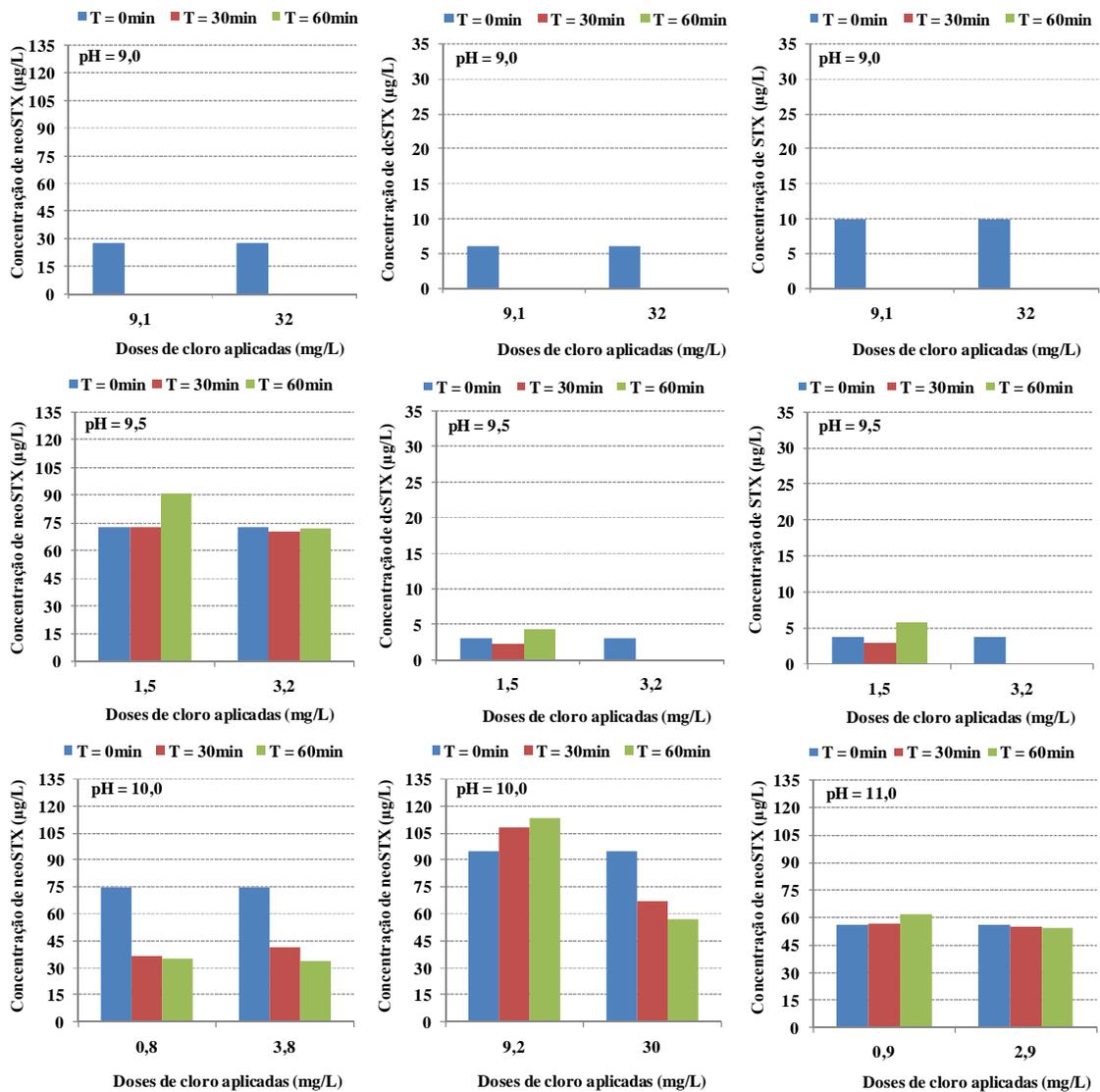


Figura F.4 - Concentrações iniciais e finais de saxitoxinas para diferentes doses de cloro e valores de pH 9,0, 9,5, 10,0 e 11,0 nos tempos de contato (T) de 30 e de 60 minutos.

**ANEXO G – DOSES DE CLORO, COM SEUS RESPECTIVOS RESIDUAIS, APLICADAS À ÁGUA DE ESTUDO 2 COM VALORES DE pH VARIANDO DE 5,0 A 11,0.**

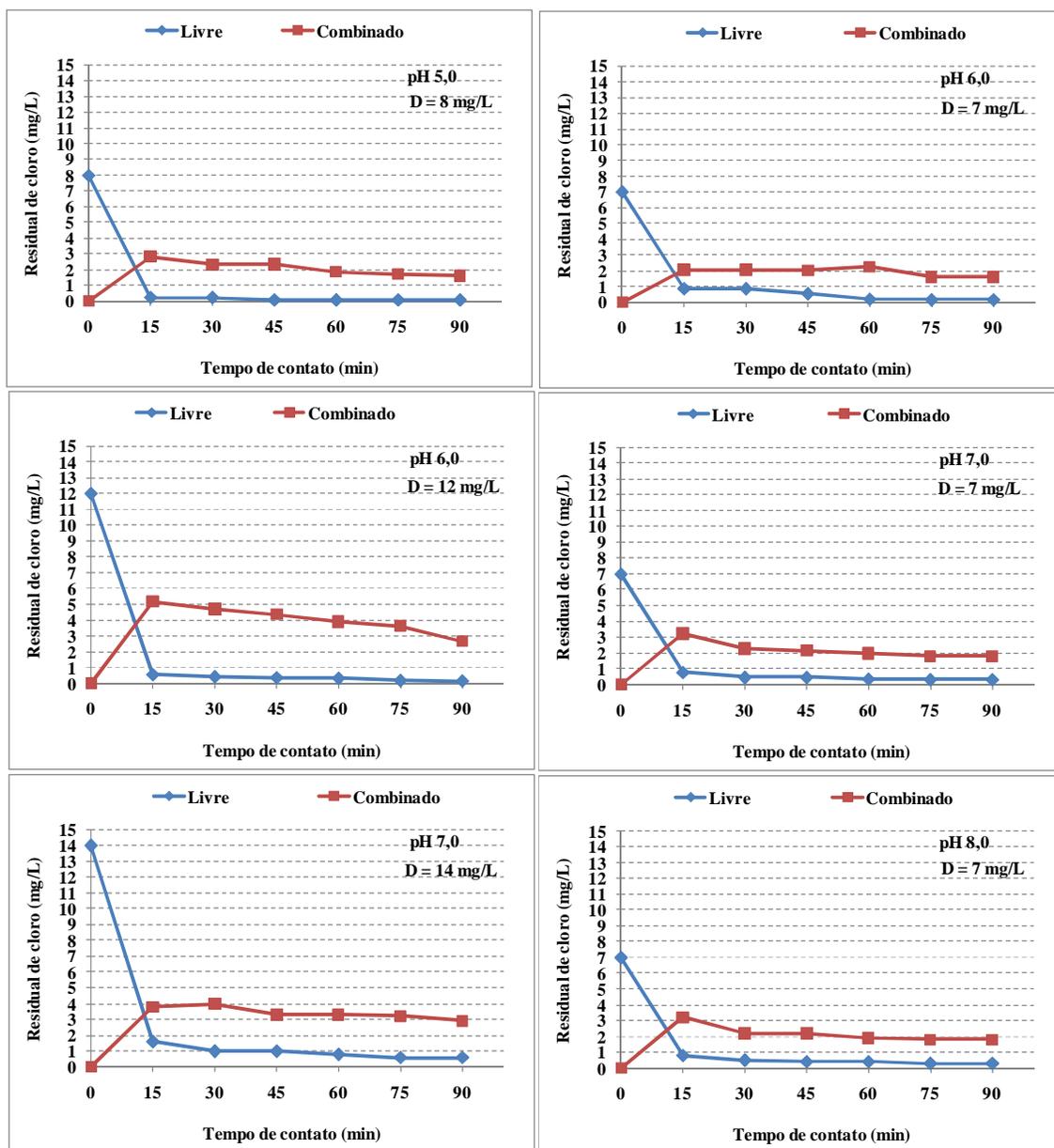


Figura G.1 – Doses de cloro, com seus respectivos residuais, aplicadas à água de estudo 2 com valores de pH 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0.

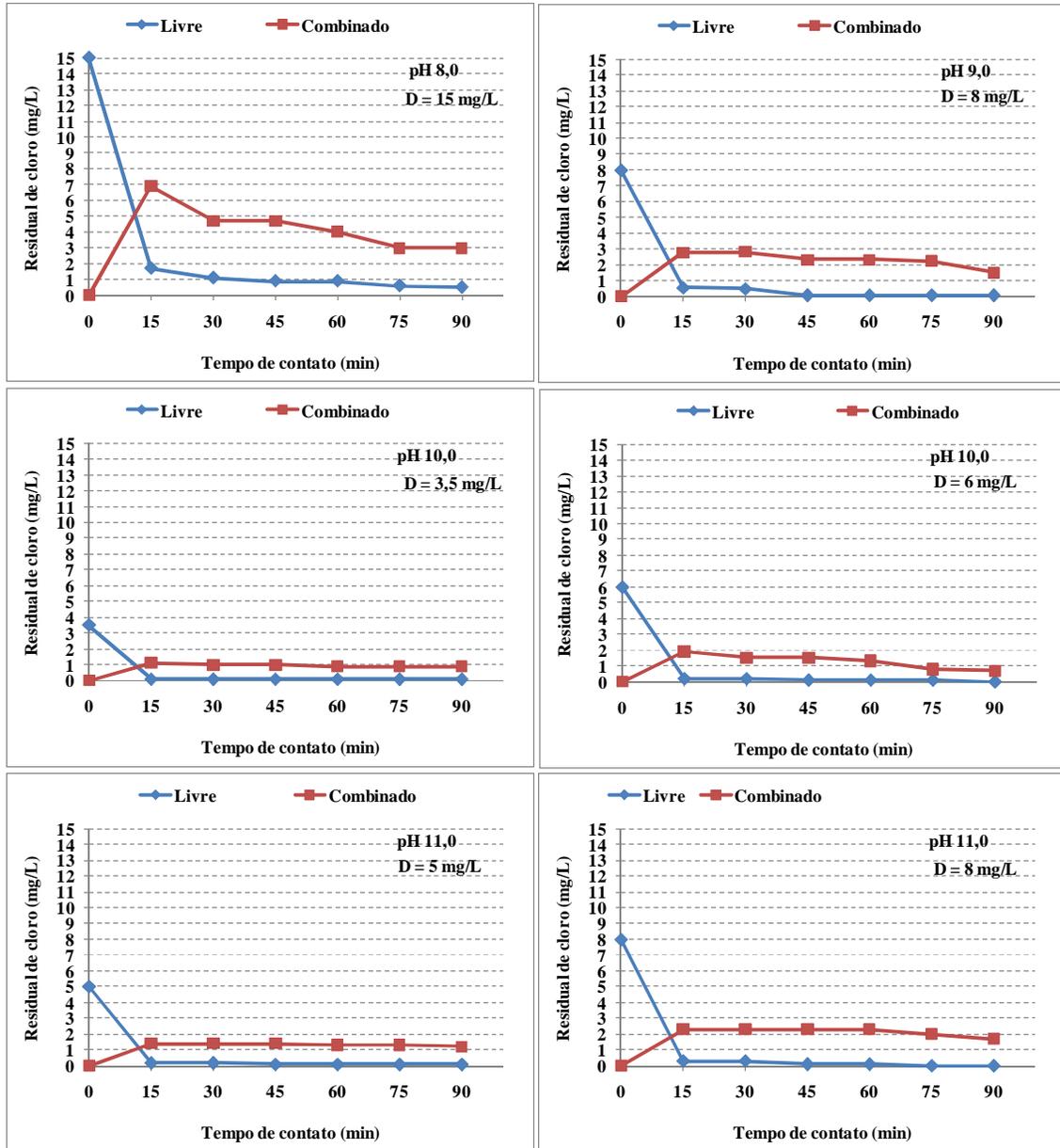


Figura G.2 – Doses de cloro, com seus respectivos residuais, aplicadas à água de estudo 2 com valores de pH 8,0, 9,0, 10,0 e 11,0.

**APÊNDICE H – VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SAXITOXINAS (neoSTX, dcSTX e STX) NA AE2 EM VALORES DE pH ÁCIDOS E BÁSICOS.**

Tabela H.1 – Variação da concentração de neoSTX para valores de cloro entre 3,5 a 15 mg/L e valores de pH de 6 a 11 durante o tempo de contato de 90 minutos

D = 3,5 mg/L					D = 5 mg/L				
neoSTX					neoSTX				
pH					pH				
Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11	Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11
0	68,3	68,3	68,3	68,3	0	68,3	68,3	68,3	68,3
15	69,0	0,0	0,0	0,0	15	48,3	0,0	0,0	0,0
30	68,1	0,0	0,0	0,0	30	47,8	0,0	0,0	0,0
45	70,0	0,0	0,0	0,0	45	50,1	0,0	0,0	0,0
60	65,6	0,0	0,0	0,0	60	45,8	0,0	0,0	0,0
75	66,8	0,0	0,0	0,0	75	46,3	0,0	0,0	0,0
90	60,3	0,0	0,0	0,0	90	40,7	0,0	0,0	0,0

D = 6 mg/L					D = 7 mg/L				
neoSTX					neoSTX				
pH					pH				
Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11	Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11
0	68,3	68,3	68,3	68,3	0	68,3	68,3	68,3	68,3
15	40,3	0,0	0,0	0,0	15	34,5	0,0	0,0	0,0
30	38,3	0,0	0,0	0,0	30	33,8	0,0	0,0	0,0
45	40,0	0,0	0,0	0,0	45	42,2	0,0	0,0	0,0
60	34,4	0,0	0,0	0,0	60	35,6	0,0	0,0	0,0
75	34,0	0,0	0,0	0,0	75	36,8	0,0	0,0	0,0
90	29,9	0,0	0,0	0,0	90	40,2	0,0	0,0	0,0

D = 8 mg/L					D = 12 mg/L				
neoSTX					neoSTX				
pH					pH				
Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11	Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11
0	68,3	68,3	68,3	68,3	0	68,3	68,3	68,3	68,3
15	30,2	0,0	0,0	0,0	15	0,0	0,0	0,0	0,0
30	29,4	0,0	0,0	0,0	30	0,0	0,0	0,0	0,0
45	33,8	0,0	0,0	0,0	45	0,0	0,0	0,0	0,0
60	29,2	0,0	0,0	0,0	60	0,0	0,0	0,0	0,0
75	31,7	0,0	0,0	0,0	75	0,0	0,0	0,0	0,0
90	36,6	0,0	0,0	0,0	90	0,0	0,0	0,0	0,0

D = 14 mg/L					15 mg/L				
neoSTX					neoSTX				
pH					pH				
Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11	Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11
0	68,3	68,3	68,3	68,3	0	68,3	68,3	68,3	68,3
15	0,0	0,0	0,0	0,0	15	0,0	0,0	0,0	0,0
30	0,0	0,0	0,0	0,0	30	0,0	0,0	0,0	0,0
45	0,0	0,0	0,0	0,0	45	0,0	0,0	0,0	0,0
60	0,0	0,0	0,0	0,0	60	0,0	0,0	0,0	0,0
75	0,0	0,0	0,0	0,0	75	0,0	0,0	0,0	0,0
90	0,0	0,0	0,0	0,0	90	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela H.2 – Variação da concentração de dcSTX para valores de cloro entre 3,5 a 15 mg/L e valores de pH de 6 a 11 durante o tempo de contato de 90 minutos

D = 3,5 mg/L				
dcSTX				
pH				
Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11
0	16,3	16,3	16,3	16,3
15	20,9	18,1	0,0	0,0
30	18,6	17,6	0,0	0,0
45	18,1	14,4	0,0	0,0
60	17,4	14,8	0,0	0,0
75	15,3	14,6	0,0	0,0
90	14,9	14,4	0,0	0,0

D = 5 mg/L				
dcSTX				
pH				
Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11
0	16,3	16,3	16,3	16,3
15	14,6	12,7	0,0	0,0
30	12,6	12,3	0,0	0,0
45	12,1	10,1	0,0	0,0
60	11,4	10,4	0,0	0,0
75	9,3	10,0	0,0	0,0
90	8,2	9,7	0,0	0,0

D = 6 mg/L				
dcSTX				
pH				
Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11
0	16,3	16,3	16,3	16,3
15	11,8	10,6	0,0	0,0
30	9,7	10,0	0,0	0,0
45	9,0	8,3	0,0	0,0
60	8,6	7,6	0,0	0,0
75	5,9	6,8	0,0	0,0
90	4,6	5,1	0,0	0,0

D = 7 mg/L				
dcSTX				
pH				
Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11
0	16,3	16,3	16,3	16,3
15	10,4	9,1	0,0	0,0
30	8,6	8,4	0,0	0,0
45	8,1	7,3	0,0	0,0
60	7,8	6,5	0,0	0,0
75	5,3	5,1	0,0	0,0
90	4,2	4,2	0,0	0,0

D = 8 mg/L				
dcSTX				
pH				
Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11
0	16,3	16,3	16,3	16,3
15	9,1	10,9	0,0	0,0
30	7,3	5,6	0,0	0,0
45	7,0	2,3	0,0	0,0
60	6,3	0,0	0,0	0,0
75	4,1	0,0	0,0	0,0
90	2,9	0,0	0,0	0,0

D = 12 mg/L				
dcSTX				
pH				
Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11
0	16,3	16,3	16,3	16,3
15	20,4	10,0	0,0	0,0
30	16,7	5,0	0,0	0,0
45	13,5	2,7	0,0	0,0
60	10,1	0,0	0,0	0,0
75	8,7	0,0	0,0	0,0
90	5,2	0,0	0,0	0,0

D = 14 mg/L				
dcSTX				
pH				
Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11
0	16,3	16,3	16,3	16,3
15	17,5	8,6	0,0	0,0
30	11,3	5,3	0,0	0,0
45	8,0	2,5	0,0	0,0
60	5,0	0,0	0,0	0,0
75	3,0	0,0	0,0	0,0
90	1,5	0,0	0,0	0,0

D = 15 mg/L				
dcSTX				
pH				
Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11
0	16,3	16,3	16,3	16,3
15	16,3	8,0	0,0	0,0
30	11,0	5,0	0,0	0,0
45	7,5	2,0	0,0	0,0
60	4,1	0,0	0,0	0,0
75	2,4	0,0	0,0	0,0
90	0,3	0,0	0,0	0,0

Tabela H.3 – Variação da concentração de STX para valores de cloro entre 3,5 a 15 mg/L e valores de pH de 6 a 11 durante o tempo de contato de 90 minutos

D = 3,5 mg/L				
STX				
pH				
Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11
0	33,3	33,3	33,3	33,3
15	20,9	22,9	0,0	0,0
30	14,7	21,7	0,0	0,0
45	10,8	18,8	0,0	0,0
60	9,4	18,0	0,0	0,0
75	8,1	18,4	0,0	0,0
90	7,0	17,2	0,0	0,0

D = 5 mg/L				
STX				
pH				
Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11
0	33,3	33,3	33,3	33,3
15	16,9	16,0	0,0	0,0
30	6,0	15,2	0,0	0,0
45	2,4	14,3	0,0	0,0
60	1,1	14,0	0,0	0,0
75	0,0	14,6	0,0	0,0
90	0,0	13,1	0,0	0,0

D = 6 mg/L				
STX				
pH				
Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11
0	33,3	33,3	33,3	33,3
15	14,1	13,3	0,0	0,0
30	3,1	12,6	0,0	0,0
45	0,8	11,5	0,0	0,0
60	0,0	10,8	0,0	0,0
75	0,0	9,8	0,0	0,0
90	0,0	8,1	0,0	0,0

D = 7 mg/L				
STX				
pH				
Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11
0	33,3	33,3	33,3	33,3
15	12,1	11,4	0,0	0,0
30	1,6	10,2	0,0	0,0
45	0,0	9,3	0,0	0,0
60	0,0	8,5	0,0	0,0
75	0,0	6,9	0,0	0,0
90	0,0	5,1	0,0	0,0

D = 8 mg/L				
STX				
pH				
Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11
0	33,3	33,3	33,3	33,3
15	10,6	0,0	0,0	0,0
30	0,0	0,0	0,0	0,0
45	0,0	0,0	0,0	0,0
60	0,0	0,0	0,0	0,0
75	0,0	0,0	0,0	0,0
90	0,0	0,0	0,0	0,0

D = 12 mg/L				
STX				
pH				
Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11
0	33,3	33,3	33,3	33,3
15	15,6	0,0	0,0	0,0
30	14,2	0,0	0,0	0,0
45	12,6	0,0	0,0	0,0
60	10,0	0,0	0,0	0,0
75	5,9	0,0	0,0	0,0
90	3,7	0,0	0,0	0,0

D = 14 mg/L				
STX				
pH				
Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11
0	33,3	33,3	33,3	33,3
15	13,4	0,0	0,0	0,0
30	12,2	0,0	0,0	0,0
45	10,6	0,0	0,0	0,0
60	8,0	0,0	0,0	0,0
75	3,9	0,0	0,0	0,0
90	2,0	0,0	0,0	0,0

D = 15 mg/L				
STX				
pH				
Tempo (min)	pH 6	pH 8	pH 10	pH 11
0	33,3	33,3	33,3	33,3
15	12,5	0,0	0,0	0,0
30	11,2	0,0	0,0	0,0
45	9,6	0,0	0,0	0,0
60	7,3	0,0	0,0	0,0
75	3,4	0,0	0,0	0,0
90	1,1	0,0	0,0	0,0

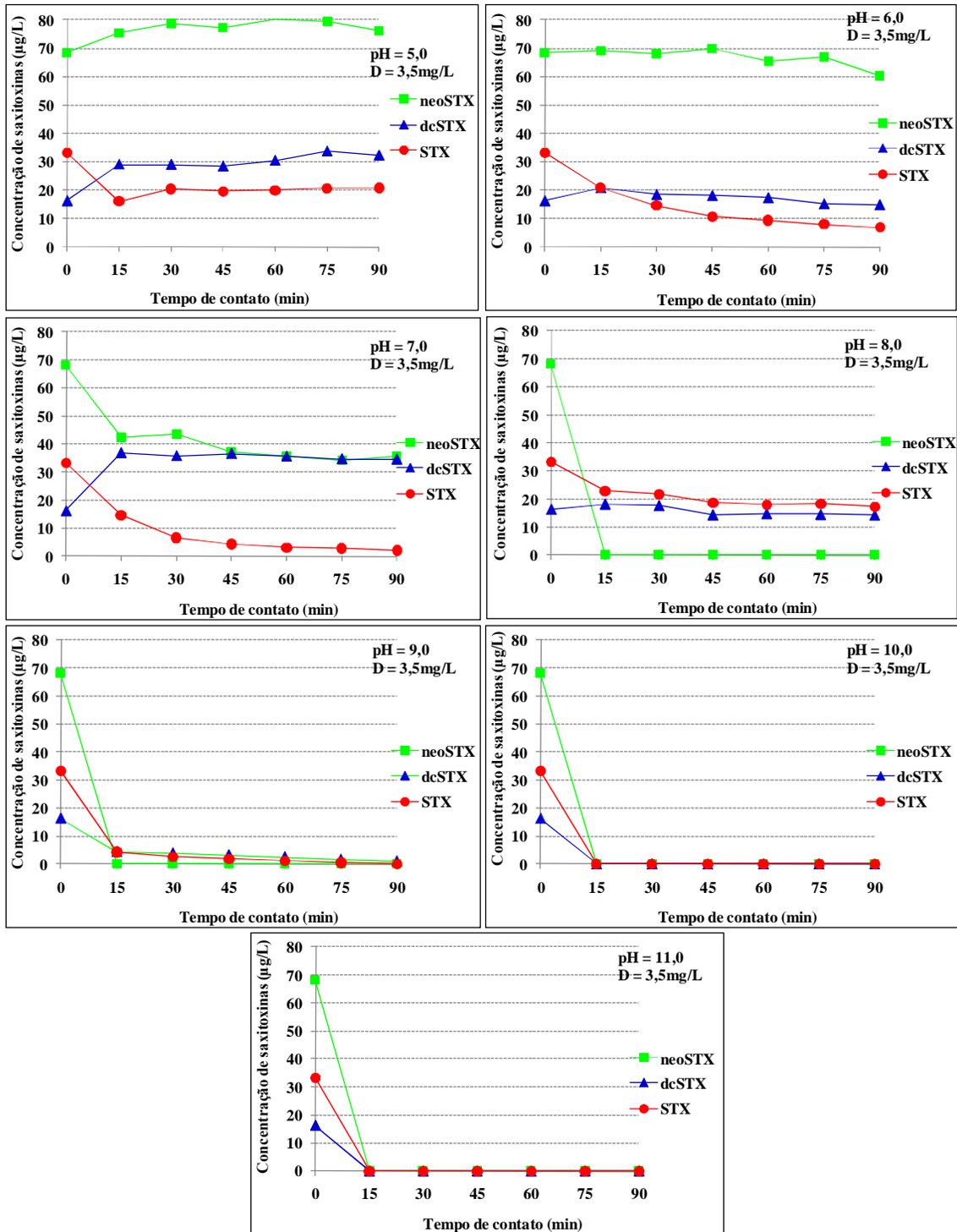


Figura H.1 – Variação de remoção de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) com valores de cloro de 3,5 mg/L, em amostras com diferentes valores de pH e tempo de contato de 90 minutos.

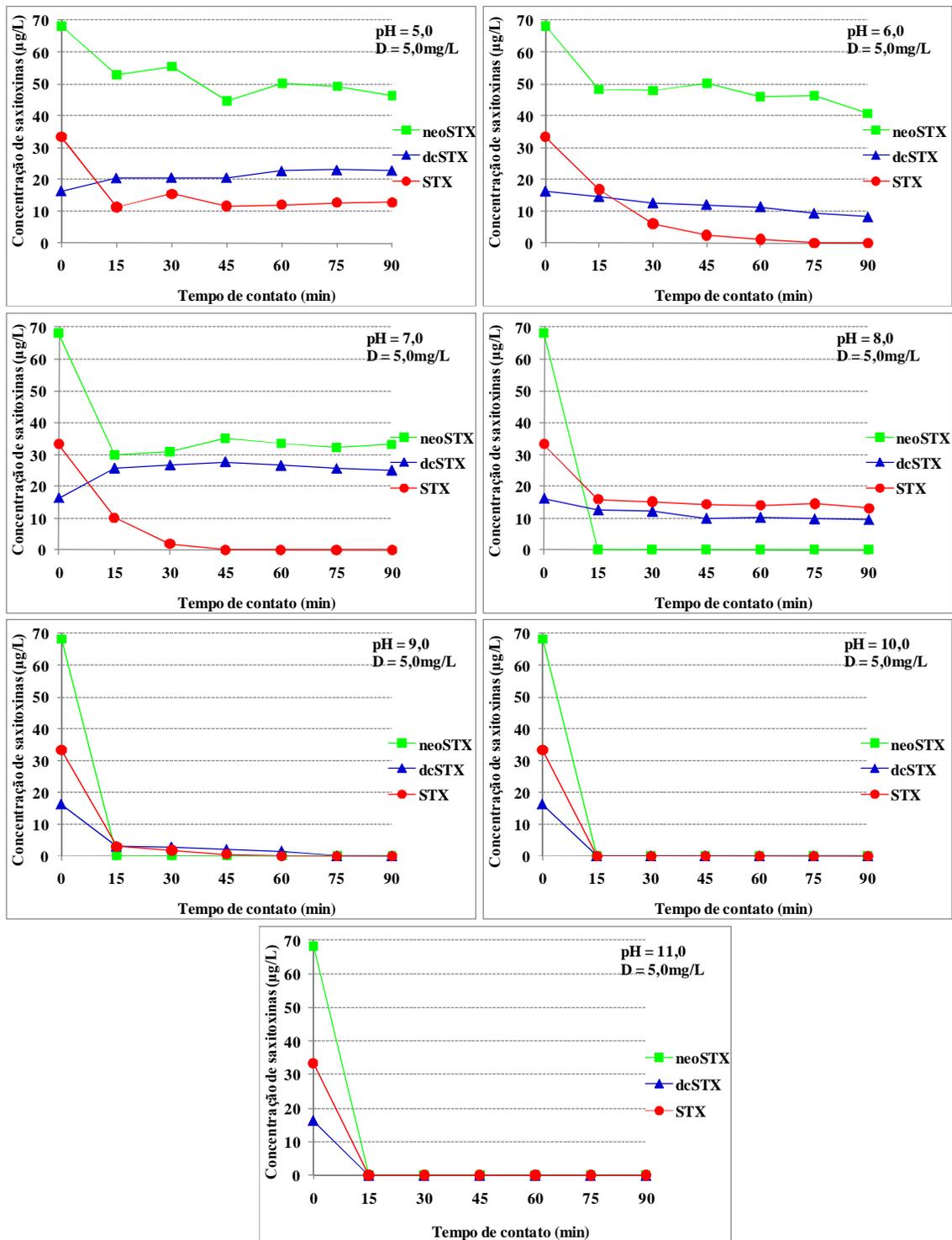


Figura H.2 – Variação de remoção de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) com valores de cloro de 5 mg/L, em amostras com diferentes valores de pH e tempo de contato de 90 minutos.

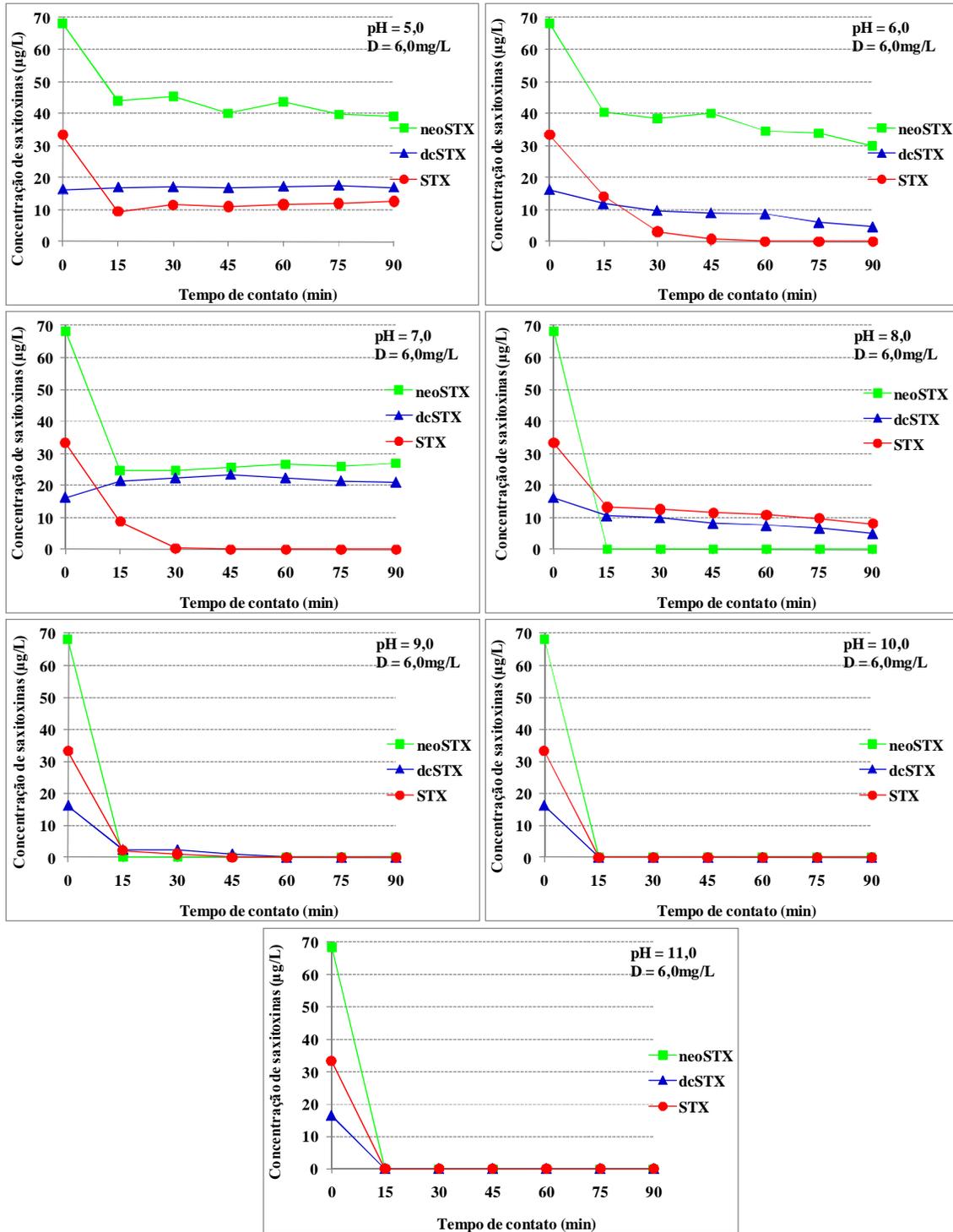


Figura H.3 – Variação de remoção de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) com valores de cloro de 6 mg/L, em amostras com diferentes valores de pH e tempo de contato de 90 minutos.

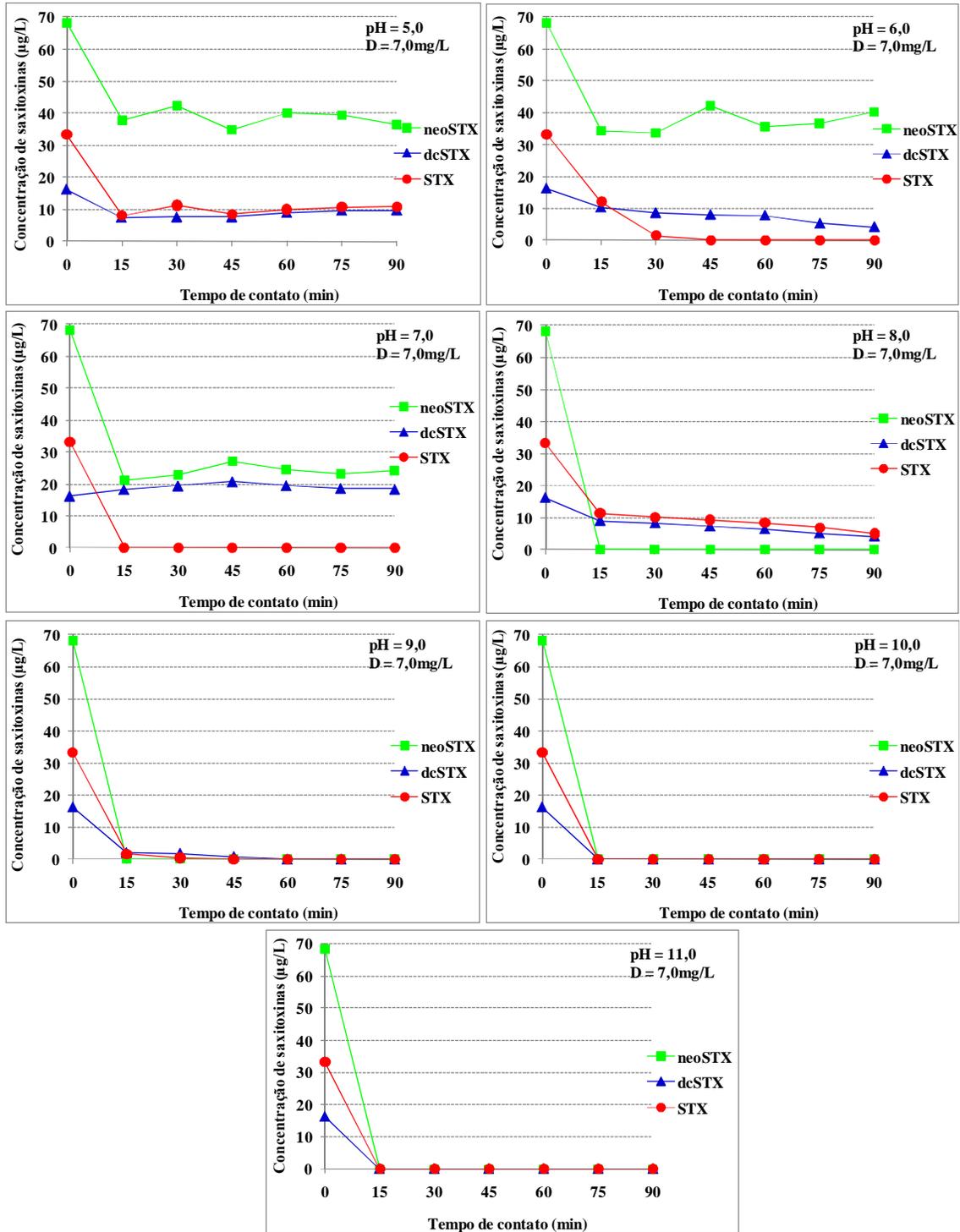


Figura H.4 – Variação de remoção de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) com valores de cloro de 7 mg/L, em amostras com diferentes valores de pH e tempo de contato de 90 minutos.

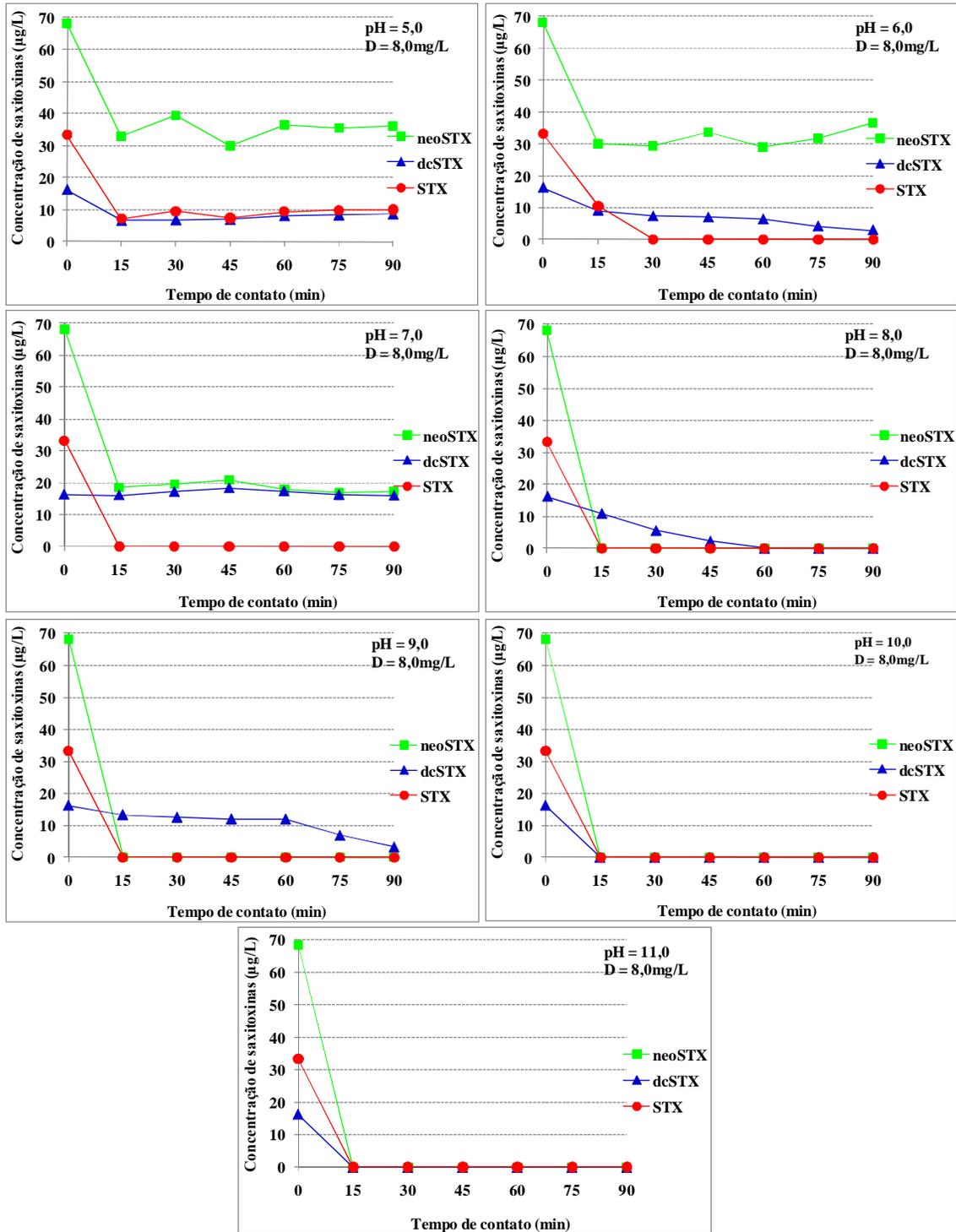


Figura H.5 – Variação de remoção de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) com valores de cloro de 8 mg/L, em amostras com diferentes valores de pH e tempo de contato de 90 minutos.

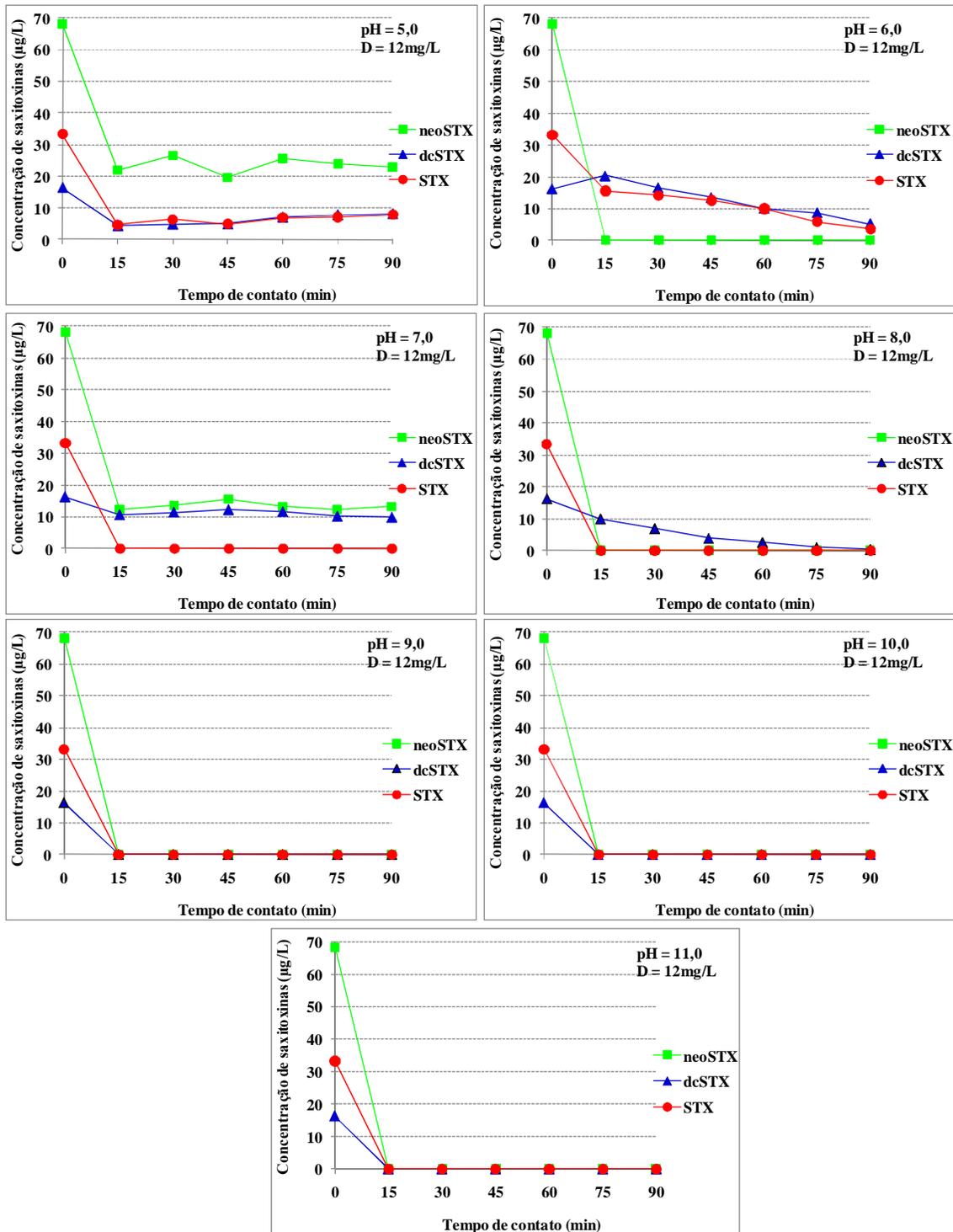


Figura H.6 – Variação de remoção de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) com valores de cloro de 12 mg/L, em amostras com diferentes valores de pH e tempo de contato de 90 minutos.

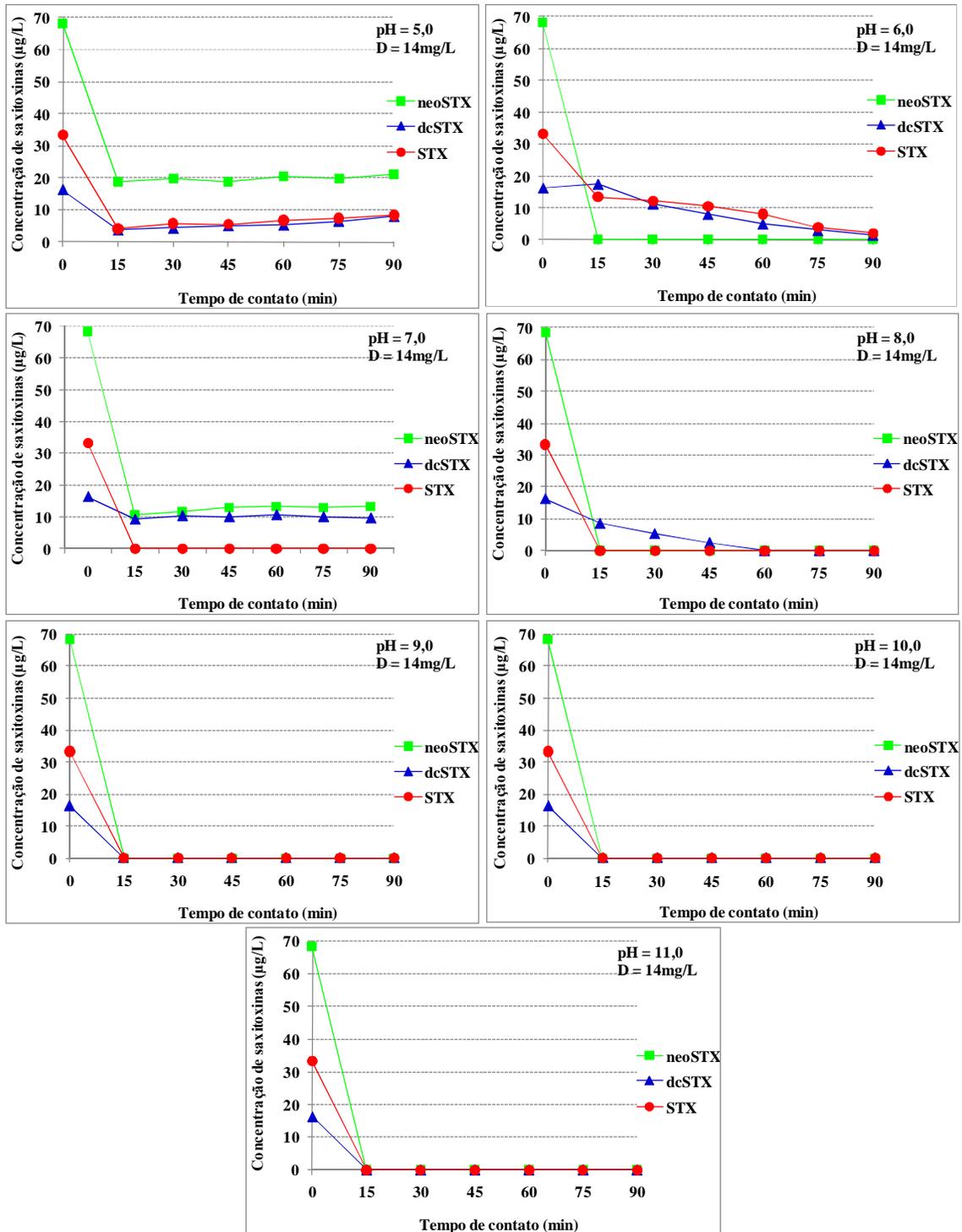


Figura H.7 – Variação de remoção de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) com valores de cloro de 14 mg/L, em amostras com diferentes valores de pH e tempo de contato de 90 minutos.

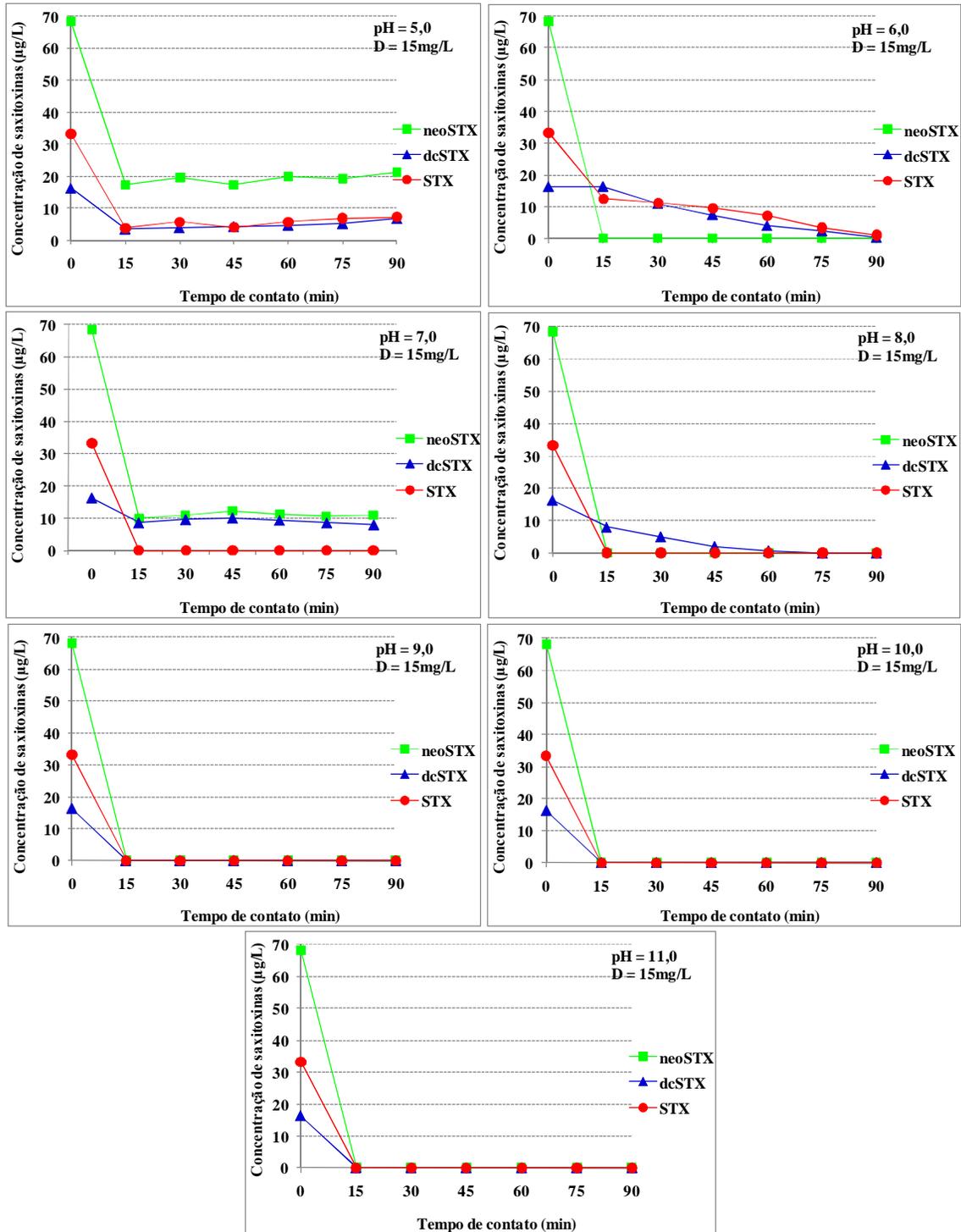


Figura H.8 – Variação de remoção de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) com valores de cloro de 15 mg/L, em amostras com diferentes valores de pH e tempo de contato de 90 minutos.

**APÊNDICE I – SUBPRODUTOS RESULTANTES DA OXIDAÇÃO DE SAXITOXINAS (neoSTX, dcSTX e STX) COM CLORO**

Tabela I.1 – Subprodutos resultantes da oxidação de saxitoxinas (neoSTX – 68,3 µg/L, dcSTX – 16 µg/L e STX – 33,3 µg/L) com cloro (1,5 mg/L), valor do pH da AE2 igual a 5,0, incubação a 25°C e tempo de contato de 24 horas.

Subprodutos Método USEPA 551.1	Resultados expressos em µg/L		
	Branco (Sem cloro)	Saxitoxinas (Amostra - A)	Saxitoxinas (Amostra - B)
<b>Trialometanos - THM:</b>			
Clorofórmio	<0,1	<0,1	<0,1
Bromodiclorometano	<0,1	<0,1	<0,1
Dibromoclorometano	<0,1	<0,1	<0,1
Bromofórmio	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Total de THMs</b>	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Cloro hidratado - CH</b>	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Cloropicrina - CP</b>	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Haloacetoneitrilas - HAN:</b>			
Tricloroacetoneitrila	<0,1	<0,1	<0,1
Dicloroacetoneitrila	<0,1	<0,1	<0,1
Dibromoacetoneitrila	<0,1	<0,1	<0,1
Bromocloroacetoneitrila	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Total HANs</b>	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Haloacetonas - HC:</b>			
1,1,1-tricloropropanona	<0,1	<0,1	<0,1
1,1-dicloropropanona	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Método USEPA 552.2</b>			
<b>Ácidos haloacéticos</b>			
Monocloro ácido acético - MCAA	<0,1	<0,1	<0,1
Monobromo ácido acético - MBAA	<0,1	<0,1	<0,1
Dicloro ácido acético - DCAA	<0,1	<0,1	<0,1
Tricloro ácido acético - TCAA	<0,1	<0,1	<0,1
Bromocloro ácido acético - BCAA	<0,1	<0,1	<0,1
Bromodicloro ácido acético - BDCAA	<0,1	<0,1	<0,1
Dibromo ácido acético - DBAA	<0,1	<0,1	<0,1
Clorodibromo ácido acético - CDBAA	<0,1	<0,1	<0,1
Tribromo ácido acético - TBAA	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Total de AHAs</b>	<0,1	<0,1	<0,1

Tabela I.2 – Subprodutos resultantes da oxidação de saxitoxinas (neoSTX – 68,3 µg/L, dcSTX – 16 µg/L e STX – 33,3 µg/L) com cloro (1,5 mg/L), valor do pH da AE2 igual a 9,0, incubação a 25°C e tempo de contato de 24 horas.

Subprodutos Método USEPA 551.1	Resultados expressos em µg/L		
	Branco (Sem cloro)	Saxitoxinas (Amostra - A)	Saxitoxinas (Amostra - B)
<b>Trialometanos - THM:</b>			
Clorofórmio	<0,1	<0,1	<0,1
Bromodiclorometano	<0,1	<0,1	<0,1
Dibromoclorometano	<0,1	<0,1	<0,1
Bromofórmio	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Total de THMs</b>	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Cloro hidratado - CH</b>	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Cloropicrina - CP</b>	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Haloacetoneitrilas - HAN:</b>			
Tricloroacetoneitrila	<0,1	<0,1	<0,1
Dicloroacetoneitrila	<0,1	<0,1	<0,1
Dibromoacetoneitrila	<0,1	<0,1	<0,1
Bromocloroacetoneitrila	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Total HANs</b>	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Haloacetonas - HC:</b>			
1,1,1-tricloropropanona	<0,1	<0,1	<0,1
1,1-dicloropropanona	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Método USEPA 552.2</b>			
<b>Ácidos haloacéticos</b>			
Monocloro ácido acético - MCAA	<0,1	<0,1	<0,1
Monobromo ácido acético - MBAA	<0,1	<0,1	<0,1
Dicloro ácido acético - DCAA	<0,1	<0,1	<0,1
Tricloro ácido acético - TCAA	<0,1	<0,1	<0,1
Bromocloro ácido acético - BCAA	<0,1	<0,1	<0,1
Bromodicloro ácido acético - BDCAA	<0,1	<0,1	<0,1
Dibromo ácido acético - DBAA	<0,1	<0,1	<0,1
Clorodibromo ácido acético - CDBAA	<0,1	<0,1	<0,1
Tribromo ácido acético - TBAA	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Total de AHAs</b>	<0,1	<0,1	<0,1

Tabela I.3 – Subprodutos resultantes da oxidação de saxitoxinas (neoSTX – 68,3 µg/L, dcSTX – 16,3 µg/L e STX – 33,3 µg/L) com cloro (8 mg/L), valor do pH da AE2 igual a 5,0, incubação a 25°C e tempo de contato de 24 horas.

Subprodutos Método USEPA 551.1	Resultados expressos em µg/L		
	Branco (Sem cloro)	Saxitoxinas (Amostra - a)	Saxitoxinas (Amostra - b)
<b>Trialometanos - THM:</b>			
Clorofórmio	<0,1	<0,1	<0,1
Bromodiclorometano	<0,1	<0,1	<0,1
Dibromoclorometano	<0,1	<0,1	<0,1
Bromofórmio	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Total de THM</b>	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Cloro hidratado - CH</b>	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Cloropicrina - CP</b>	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Haloacetoneitrilas - HAN:</b>			
Tricloroacetoneitrila	<0,1	<0,1	<0,1
Dicloroacetoneitrila	<0,1	0,8	0,6
Dibromoacetoneitrila	<0,1	<0,1	<0,1
Bromocloroacetoneitrila	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Total HAN</b>	<0,1	0,8	0,6
<b>Haloacetonas - HC:</b>			
1,1,1-tricloropropanona	<0,1	<0,1	<0,1
1,1-dicloropropanona	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Método USEPA 552.2</b>			
<b>Ácidos haloacéticos</b>			
Monocloro ácido acético - MCAA	<0,1	<0,1	<0,1
Monobromo ácido acético - MBAA	<0,1	<0,1	<0,1
Dicloro ácido acético - DCAA	<0,1	10,2	11,5
Tricloro ácido acético - TCAA	<0,1	<0,1	<0,1
Bromocloro ácido acético - BCAA	<0,1	<0,1	<0,1
Bromodicloro ácido acético - BDCAA	<0,1	<0,1	<0,1
Dibromo ácido acético - DBAA	<0,1	<0,1	<0,1
Clorodibromo ácido acético - CDBAA	<0,1	<0,1	<0,1
Tribromo ácido acético - TBAA	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Total de AHAs</b>	<0,1	10,2	11,5

Tabela I.4 Subprodutos resultantes da oxidação de saxitoxinas (neoSTX – 68,3 µg/L, dcSTX – 16,3 µg/L e STX – 33,3 µg/L) com cloro (8 mg/L), valor do pH da AE2 igual a 9,0, incubação a 25°C e tempo de contato de 24 horas.

Subprodutos Método USEPA 551.1	Resultados expressos em µg/L		
	Branco (Sem cloro)	Saxitoxinas (Amostra - a)	Saxitoxinas (Amostra - b)
<b>Trialometanos - THM:</b>			
Clorofórmio	<0,1	<0,1	<0,1
Bromodiclorometano	<0,1	<0,1	<0,1
Dibromoclorometano	<0,1	<0,1	<0,1
Bromofórmio	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Total de THM</b>	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Cloro hidratado - CH</b>	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Cloropicrina - CP</b>	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Haloacetoneitrilas - HAN:</b>			
Tricloroacetoneitrila	<0,1	<0,1	<0,1
Dicloroacetoneitrila	<0,1	1,2	1,3
Dibromoacetoneitrila	<0,1	<0,1	<0,1
Bromocloroacetoneitrila	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Total HAN</b>	<0,1	1,2	1,3
<b>Haloacetonas - HC:</b>			
1,1,1-tricloropropanona	<0,1	<0,1	<0,1
1,1-dicloropropanona	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Método USEPA 552.2</b>			
<b>Ácidos haloacéticos</b>			
Monocloro ácido acético - MCAA	<0,1	<0,1	<0,1
Monobromo ácido acético - MBAA	<0,1	<0,1	<0,1
Dicloro ácido acético - DCAA	<0,1	15,7	12,4
Tricloro ácido acético - TCAA	<0,1	<0,1	<0,1
Bromocloro ácido acético - BCAA	<0,1	<0,1	<0,1
Bromodicloro ácido acético - BDCAA	<0,1	<0,1	<0,1
Dibromo ácido acético - DBAA	<0,1	<0,1	<0,1
Clorodibromo ácido acético - CDBAA	<0,1	<0,1	<0,1
Tribromo ácido acético - TBAA	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Total de AHAs</b>	<0,1	15,7	12,4

Tabela I.5 – Subprodutos resultantes da oxidação de saxitoxinas (neoSTX – 68,3 µg/L, dcSTX – 16,3 µg/L e STX – 33,3 µg/L) com cloro (13 mg/L), valor do pH da AE2 igual a 5,0, incubação a 25°C e tempo de contato de 24 horas.

Subprodutos Método USEPA 551.1	Resultados expressos em µg/L		
	Branco (Sem cloro)	Saxitoxinas (Amostra - A)	Saxitoxinas (Amostra - B)
<b>Trialometanos - THM:</b>			
Clorofórmio	<0,1	86,4	84,7
Bromodiclorometano	<0,1	<0,1	<0,1
Dibromoclorometano	<0,1	0,45	0,71
Bromofórmio	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Total de THMs</b>	<0,1	86,9	85,4
<b>Cloro hidratado - CH</b>	<0,1	71,4	68,9
<b>Cloropicrina - CP</b>	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Haloacetoneitrilas - HAN:</b>			
Tricloroacetoneitrila	<0,1	<0,1	<0,1
Dicloroacetoneitrila	<0,1	12,3	14,1
Dibromoacetoneitrila	<0,1	<0,1	<0,1
Bromocloroacetoneitrila	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Total HANs</b>	<0,1	12,3	14,1
<b>Haloacetonas - HC:</b>			
1,1,1-tricloropropanona	<0,1	<0,1	<0,1
1,1-dicloropropanona	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Método USEPA 552</b> Ácidos haloacéticos			
Monocloro ácido acético - MCAA	<0,1	14,9	11,8
Monobromo ácido acético - MBAA	<0,1	<0,1	<0,1
Dicloro ácido acético - DCAA	<0,1	21,4	23,7
Tricloro ácido acético - TCAA	<0,1	2,9	3,1
Bromocloro ácido acético - BCAA	<0,1	<0,1	<0,1
Bromodicloro ácido acético - BDCAA	<0,1	<0,1	<0,1
Dibromo ácido acético - DBAA	<0,1	<0,1	<0,1
Clorodibromo ácido acético - CDBAA	<0,1	<0,1	<0,1
Tribromo ácido acético - TBAA	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Total de AHA</b>	<0,1	39,2	38,6

Tabela I.6 – subprodutos resultantes da oxidação de saxitoxinas (neoSTX – 68,3 µg/L, dcSTX – 16,3 µg/L e STX – 33,3 µg/L) com cloro (13 mg/L), valor do pH da AE2 igual a 9,0, incubação a 25°C e tempo de contato de 24 horas.

Subprodutos Método USEPA 551.1	Resultados expressos em µg/L		
	Branco (Sem cloro)	Saxitoxinas (Amostra - A)	Saxitoxinas (Amostra - B)
<b>Trialometanos - THM:</b>			
Clorofórmio	<0,1	133,8	138,6
Bromodiclorometano	<0,1	<0,1	<0,1
Dibromoclorometano	<0,1	0,58	<0,1
Bromofórmio	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Total de THMs</b>	<0,1	134,4	138,6
<b>Cloro hidratado - CH</b>	<0,1	108,8	87,3
<b>Cloropicrina - CP</b>	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Haloacetoneitrilas - HAN:</b>			
Tricloroacetoneitrila	<0,1	<0,1	<0,1
Dicloroacetoneitrila	<0,1	18,8	13,9
Dibromoacetoneitrila	<0,1	<0,1	<0,1
Bromocloroacetoneitrila	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Total HAN</b>	<0,1	18,8	13,9
<b>Haloacetonas - HC:</b>			
1,1,1-tricloropropanona	<0,1	<0,1	<0,1
1,1-dicloropropanona	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Método USEPA 552.2</b>			
Ácidos haloacéticos			
Monocloro ácido acético - MCAA	<0,1	23,3	25,9
Monobromo ácido acético - MBAA	<0,1	<0,1	<0,1
Dicloro ácido acético - DCAA	<0,1	34,2	39,6
Tricloro ácido acético - TCAA	<0,1	3,4	3,4
Bromocloro ácido acético - BCAA	<0,1	<0,1	<0,1
Bromodicloro ácido acético - BDCAA	<0,1	<0,1	<0,1
Dibromo ácido acético - DBAA	<0,1	<0,1	<0,1
Clorodibromo ácido acético - CDBAA	<0,1	<0,1	<0,1
Tribromo ácido acético - TBAA	<0,1	<0,1	<0,1
<b>Total de AHAs</b>	<0,1	60,9	68,9

## APÊNDICE J – RESULTADO DOS ENSAIOS DE TOXICIDADE DOS SUBPRODUTOS DA OXIDAÇÃO DE SAXITOXINAS COM CLORO

Tabela J.1 – Porcentagem de imobilidade e valores de CE<sub>50</sub>, 24 h e 48 h, para os dafinídeos *D. similis* e *C. silvestrii* (Crustacea, Cladocera) expostos a diferentes concentrações de NaCl (g/L) e valores de pH, condutividade elétrica e dureza, monitorados durante o teste de sensibilidade.

Concentrações (g/L)	Tempo	Réplicas (organismos imóveis/organismos expostos)				Total (organismos imóveis/organismos expostos)	% imobilidade	pH		Condutividade (µS.cm <sup>-1</sup> )		Dureza (mgCaCO <sub>3</sub> /L)	
		1	2	3	4			i	f	i	f	i	f
Controle	24h	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0 (V)	7,28	7,60	97,5	128,8	46	46
	48h	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0 (V)						
0,6	24h	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0	7,35	7,82	676	642	42	42
	48h	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0						
1,0	24h	0/5	0/5	0/5	0/5	0/20	0	7,28	7,86	1.030	1.000	44	44
	48h	2/5	3/5	3/5	1/5	9/20	45						
1,3	24h	3/5	1/5	0/5	1/5	5/20	25	7,28	7,96	1.265	1.243	44	38
	48h	4/5	3/5	3/5	4/5	14/20	70						
1,6	24h	4/5	4/5	4/5	3/5	15/20	75	7,29	8,06	1.569	1.583	40	40
	48h	4/5	5/5	5/5	4/5	18/20	90						
2,2	24h	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	100	7,27	8,12	2.030	2.060	40	38
	48h	5/5	5/5	5/5	5/5	20/20	100						
CE <sub>50</sub>	24h	1,45 (1,36 – 1,56)											
(IC 95%)	48h	1,06 (0,95 – 1,17)											

Legenda: V = teste válido (porcentagem de organismos imóveis no controle não excedeu 10%); i = inicial; f = final; IC = intervalo de confiança (95%)