

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

**REMOÇÃO DE MICROCISTINAS E SAXITOXINAS POR  
MEIO DE OXIDAÇÃO COM HIPOCLORITO DE SÓDIO:  
AVALIAÇÃO EM ESCALA DE BANCADA**

**MARIANA SOUSA FREITAS**

**ORIENTADORA: CRISTINA CELIA SILVEIRA BRANDÃO**

**DISSERTAÇÃO DE  
MESTRADO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL  
E RECURSOS HÍDRICOS**

**PUBLICAÇÃO PTARH.DM -/07  
BRASÍLIA/DF, NOVEMBRO/2007**

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

**REMOÇÃO DE MICROCISTINAS E SAXITOXINAS POR  
MEIO DE OXIDAÇÃO COM HIPOCLORITO DE SÓDIO:  
AVALIAÇÃO EM ESCALA DE BANCADA**

**MARIANA SOUSA FREITAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL DA  
FACULDADE DE TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE  
BRASÍLIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA  
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE.**

**APROVADA POR:**

---

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

---

**Prof. Marco Antonio Almeida de Souza, PhD (ENC – UnB)  
(EXAMINADOR INTERNO)**

---

**Prof. Maurício Luiz Sens, PhD (UFSC)  
(EXAMINADOR EXTERNO)**

## FICHA CATALOGRÁFICA

FREITAS, MARIANA SOUSA

Remoção de Microcistinas e Saxitoxinas por Meio de Oxidação com Hipoclorito de Sódio: Avaliação em Escala de Bancada.

xiv, 107p., 210 x 297 mm (ENC/FT/UnB, Mestre, Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, 2007). Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília. Faculdade de Tecnologia.

Departamento de Engenharia Civil e Ambiental.

1. Oxidação

2. Microcistinas

3. Saxitoxinas

4. Hipoclorito de sódio

I. ENC/FT/UnB

II. Título (série)

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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, Publicação PTARH.DM-107/07, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 106p.

## CESSÃO DE DIREITOS

AUTOR: Mariana Sousa Freitas.

TÍTULO: Remoção de Microcistinas e Saxitoxinas por Meio de Oxidação com Hipoclorito de Sódio: Avaliação em Escala de Bancada.

GRAU: Mestre

ANO: 2007

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

---

Mariana Sousa Freitas

[marianasfreitas@gmail.com](mailto:marianasfreitas@gmail.com)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Sergio e Bete, por apoiar as minhas decisões e pela constante influência positiva, incentivando sempre os estudos, porém, de uma forma natural. Eles são e sempre serão um grande exemplo pra mim, não apenas na vida acadêmica, mas em todos aspectos da minha formação.

À professora Cristina Brandão pela orientação, amizade e carinho. Ter a professora como orientadora foi muito importante pra mim, pois seu conhecimento, clareza, paciência e incentivo foram determinantes para o desenvolvimento deste trabalho. Conviver e trabalhar com a professora Cristina foi marcante para a minha vida, me ajudou a crescer em todos os aspectos e eu agradeço muito por ter tido essa oportunidade.

Ao meu irmão Bruno, por ter sido sempre um exemplo pra mim e por ter me ensinado muito do que eu sei.

Agradeço muito aos meus tios, Sílvia e Maurício e primas Nara e Laís por terem me acolhido e cuidado de mim. Sem vocês aqui, as coisas teriam sido bem mais difíceis e muito menos divertidas.

Ao meu namorado, Vitor, por me agüentar e me ajudar nos piores momentos e por ter curtido os melhores momentos ao meu lado também, obrigada lindudo!

Agradeço ao meu amigo da engenharia civil da UFMS, Flavinho, por estar comigo, ajudando e tornando os dias difíceis de faculdade agradáveis e divertidos, até nas horas mais complicadas e ainda, por estar ao meu lado nos momentos alegres e difíceis após nos formarmos.

Aos amigos do mestrado, obrigada por toda ajuda e companheirismo sempre presente no nosso dia a dia e muito obrigada em especial à Flávia que sempre esteve ao meu lado, caminhando junto e sendo minha amiga para a vida toda!

Aos companheiros do laboratório Marcilene, Roseli, Boy, Carolzinha, Lilica, Yovanka e Junior, pelo apoio, paciência, por tornar os dias de trabalho e aprendizado no laboratório

tão divertidos e inesquecíveis.

Aos professores do PTARH, Marco Antônio, Koide, Nabil, Néstor e Ricardo pelos ensinamentos transmitidos.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro e à UnB pela disponibilização da estrutura necessária ao desenvolvimento deste trabalho.

## **RESUMO**

### **REMOÇÃO DE MICROCISTINAS E SAXITOXINAS POR MEIO DE OXIDAÇÃO COM HIPOCLORITO DE SÓDIO: AVALIAÇÃO EM ESCALA DE BANCADA**

**Autor: Mariana Sousa Freitas**

**Orientador: Cristina Celia Silveira Brandão**

**Programa de pós-graduação em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos  
Brasília, novembro de 2007.**

A eutrofização dos mananciais propicia o desenvolvimento de cianobactérias capazes de produzir e liberar toxinas que podem afetar a saúde de homens e animais. No Brasil há diversos relatos da ocorrência de florações tóxicas da espécie *Microcystis aeruginosa*, produtoras de microcistinas, em mananciais de abastecimento público, e tem se verificado o aumento da ocorrência de florações de *Cylindrospermopsis raciborskii*, produtoras de saxitoxinas. As etapas de coagulação, floculação, sedimentação e filtração do tratamento convencional, o mais utilizado no país, não são capazes de remover cianotoxinas dissolvidas, porém a oxidação no tanque de contato pode ser uma alternativa para a remoção desses compostos. Nesse sentido, o presente trabalho avaliou a eficiência de remoção de microcistinas e saxitoxinas por meio da oxidação utilizando cloro livre na forma de hipoclorito de sódio. Ensaios em escala de bancada foram realizados utilizando o equipamento de teste de jarros, tendo como águas de estudo material obtido a partir da lise de células cultivadas de *Microcystis aeruginosa* e de *Cylindrospermopsis raciborskii* diluídos em água deionizada e água do lago Paranoá. As águas estudadas continham, portanto, cianotoxinas e outros compostos orgânicos originados a partir da lise celular e, em alguns casos, compostos orgânicos naturalmente presentes na água. Os ensaios foram realizados em valores de pH de aproximadamente 5,0. Tanto no caso das águas contendo microcistinas como no caso de águas contendo saxitoxinas, a demanda de cloro foi elevada e remoções significativas de toxinas só ocorreram em dosagens elevadas de cloro. Nas condições estudadas, para a quase completa remoção de cerca de 80 µg/L de microcistinas da água de estudo, foram necessárias dosagens de cloro próximas a 11 mg/L. Entretanto, para reduzir a concentração de neoSTX de 73 µg/L para valores próximos a 31 µg/L foram necessários cerca de 20 mg/L de cloro. Além disso, os estudos com as variantes dcSTX e STX de saxitoxinas indicaram que estas variantes são mais estáveis com relação à oxidação do que a variante neoSTX. Os ensaios realizados com material da lise de *M. aeruginosa* diluída em água do lago Paranoá indicaram que as microcistinas e os demais produtos liberados pela lise celular são mais facilmente oxidadas do que os compostos presentes naturalmente na água do lago.

Palavras chave: Oxidação, hipoclorito de sódio, microcistinas, saxitoxinas.

## **ABSTRACT**

### **MICROCYSTINS AND SAXITOXINS REMOVAL BY OXIDATION USING SODIUM HYPOCHLORITE: BENCH SCALE STUDY**

**Author: Mariana Sousa Freitas**

**Supervisor: Cristina Celia Silveira Brandão**

**Environmental Technology and Water Resources Postgraduation Program**

**Brasília, novembro de 2007.**

The eutrophication of lakes and reservoirs may favor blooms of cyanobacteria species capable of producing and releasing toxins that can affect human and animal health. In Brazil there have been several reports about the occurrence of toxic blooms of *Microcystis aeruginosa* in waters supply reservoirs and the increasing of *Cylindrospermopsis raciborskii* blooms. It is known that the coagulation, flocculation, sedimentation and filtration steps of the conventional treatment are not able to remove dissolved cyanotoxins effectively, but oxidation in the contact tank may be an alternative for the removal of these compounds. In this context, the aim of this work was to study the removal of microcystins and saxitoxins by oxidation using sodium hypochlorite. Bench oxidation experiments using jarrest equipment were carried out at pH value around 5. The model waters used were obtained from the lysis of *Microcystis aeruginosa* and *Cylindrospermopsis raciborskii* cultivated cells, diluted in deionized water and Lake Paranoá water. Therefore, the model water studied containing cyanotoxins and other cell released organic compounds. Independently of the toxin studied, microcystins or saxitoxins, the chlorine demand was high and acceptable removal of toxins were only possible with high doses of chlorine. Under the condition studied, for a near total removal of 80 µg/L of microcystins, it was necessary to dose about 11 mg/L of chlorine. However, reducing 73 µg/L of neoSTX to a concentration around 31 µg/L was only obtained with a dose of 20 mg/L of chlorine. Moreover, results of experiments with two other variants of saxitoxins, STX and dcSTX, suggest that these variants are more resistant to oxidation with chlorine than the neoSTX. Oxidation experiments carried out with lysed material of *Microcystis aeruginosa* cells diluted in Paranoá lake water indicated that microcystins and other cell released compounds are easily oxidized than natural organic matter present in the lake water.

**Keywords:** Oxidation, sodium hypochlorite, microcystins, saxitoxins.

## SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - OBJETIVOS.....	3
3 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 - CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS.....	4
3.1.1 - Neurotoxinas.....	7
3.1.2 - Hepatotoxinas.....	14
3.1.3 - Relatos de ocorrência de cianobactérias e cianotoxinas em corpos d'água ...	17
3.1.4 - Métodos de detecção de cianotoxinas.....	20
3.2 - FUNDAMENTOS DA OXIDAÇÃO QUÍMICA.....	22
3.2.1 - Introdução.....	22
3.2.2 - Aspectos da química do cloro.....	25
3.3 - REMOÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS EM ÁGUAS PARA CONSUMO HUMANO.....	29
3.3.1 - Visão geral do tratamento de água para remoção de cianobactérias e cianotoxinas.....	29
3.3.2 - Oxidação de cianotoxinas.....	30
4 - METODOLOGIA.....	40
4.1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	40
4.2 - ÁGUA DE ESTUDO.....	40
4.2.1 - Cultivo de <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> e <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	41
4.2.2 - Produção de solução de cianotoxinas e preparação da água de estudo.....	42
4.3 - DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.....	44
4.4 - ENSAIOS REALIZADOS.....	48
4.4.1 - Ensaio prévios.....	48
4.4.2 - Ensaio com microcistinas.....	50
4.4.3 - Ensaio com microcistinas e água do Lago Paranoá.....	52
4.4.4 - Ensaio com saxitoxinas.....	53
4.5 - MÉTODOS ANALÍTICOS.....	54
4.5.1 - Detecção de saxitoxinas.....	55
4.5.2 - Detecção de microcistinas.....	59
5 - APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS:.....	61
5.1 - ENSAIOS PRÉVIOS COM ÁGUA DEIONIZADA E MICROCISTINAS.....	61



5.2 - ENSAIOS COM MICROCISTINAS E ÁGUA DEIONIZADA (ÁGUA DE ESTUDO TIPO I).....	65
5.2.1 - Etapa 1 .....	65
5.2.2 - Etapa 2.....	68
5.3 - ENSAIOS COM MICROCISTINAS E ÁGUA DO LAGO PARANOÁ.....	71
5.4 - ENSAIOS COM SAXITOXINAS .....	77
5.4.1 - Detecção de saxitoxinas.....	77
5.4.1.1 - Testes de extração.....	77
5.4.1.2 - Testes com tiosulfato e cloro .....	77
5.4.1.3 - Avaliação da degradação natural de saxitoxinas.....	78
5.4.2 - Apresentação e discussão dos resultados dos ensaios com saxitoxinas .....	78
6 - CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES.....	91
6.1 - CONCLUSÃO.....	91
6.2 - RECOMENDAÇÕES.....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	94
APÊNDICE A – RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS UTILIZANDO A ÁGUA DE ESTUDO AE1 .....	100
A.1 – RESULTADOS DOS ENSAIOS DA ETAPA PRÉVIA .....	100
A.2 – RESULTADOS DOS ENSAIOS DA ETAPA 1.....	101
A.3 – RESULTADOS DOS ENSAIOS DA ETAPA 2.....	102
APÊNDICE B – RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS UTILIZANDO A ÁGUA DE ESTUDO AE2.....	104
APÊNDICE C - RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS UTILIZANDO A ÁGUA DE ESTUDO AE3 .....	106

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Estrutura geral das saxitoxinas.....	8
Figura 3.2 - Estrutura geral das microcistinas.....	15
Figura 3.3 - Dissociação do HOCl em função do pH.....	26
Figura 4.1 - Sala de cultivo instalada no LAA.....	42
Figura 4.2 - Membranas após o processo de filtração da amostra de saxitoxinas (a) filtro com retenção de 8 $\mu\text{m}$ (b) filtro com retenção de 1 $\mu\text{m}$ (c) filtro com retenção de 0,45 $\mu\text{m}$ .....	43
Figura 4.3 - (a) Amostra bruta de microcistinas, (b) após filtração em membrana de 1 $\mu\text{m}$ de retenção (c) após filtração em membrana de 0,45 $\mu\text{m}$ de retenção.....	43
Figura 4.4 - (a) Amostra bruta de saxitoxinas, (b) após filtração em membrana de 8 $\mu\text{m}$ de retenção(c) após filtração em membrana de 1,0 $\mu\text{m}$ de retenção (d) após filtração em membrana de 0,45 $\mu\text{m}$ de retenção....	44
Figura 4.5 - Gerador de cloro.....	45
Figura 4.6 - Amostras contendo microcistinas e controles de dosagem durante o ensaio.....	46
Figura 4.7 - Fluxograma geral de atividades dos ensaios.....	47
Figura 4.8 - Controle de temperatura do ar.....	48
Figura 4.9 - Esquema das amostras submetidas aos ensaios prévios - 5 repetições.....	48
Figura 4.10- Esquema dos controles de dosagens submetidos aos ensaios prévios paralelamente às amostras - 5 repetições.....	49
Figura 4.11- Configuração dos ensaios da etapa prévia.....	49
Figura 4.12- Esquema das amostras submetidas aos ensaios da etapa 1 – 3 repetições.....	51
Figura 4.13- Esquema dos controles de dosagens submetidos aos ensaios da etapa 1 paralelamente às amostras – 3 repetições.....	51
Figura 4.14- Configuração dos ensaios da etapa 1.....	51
Figura 4.15- Configuração dos ensaios com microcistinas e água do Lago Paranoá.....	52

Figura 4.16-	Equipamento de CLAE e computador utilizados nas análises de saxitoxinas.....	57
Figura 5.1-	Concentração de cloro livre aplicado e cloro residual da etapa prévia.....	62
Figura 5.2-	Concentrações iniciais de microcistinas e residuais de microcistinas após tempos de contato 10 e 30 min com diferentes dosagens de cloro livre.....	64
Figura 5.3-	Concentração de cloro livre aplicadas e residuais de cloro após os tempos de contato 10 e 30 minutos.....	66
Figura 5.4-	Concentrações iniciais de microcistinas e residuais de microcistinas após tempos de contato 10 e 30 min com diferentes dosagens de cloro livre.....	67
Figura 5.5-	Concentração de cloro livre aplicadas e residuais de cloro após os tempos de contato 10 e 30 minutos.....	69
Figura 5.6-	Concentrações iniciais de microcistinas e residuais de microcistinas após tempos de contato 10 e 30 min com diferentes dosagens de cloro livre.....	70
Figura 5.8-	Valores de absorbância na água do Lago Paranoá e na amostras antes e após os tempos de contato com cloro.....	74
Figura 5.9-	Cloro residual nos controles de água do Lago Paranoá e na água de estudo após os tempos de contato 10 e 30 minutos.....	74
Figura 5.10-	Remoção de microcistinas diluídas em água do Lago, nos tempos de contato de 10 e 30 minutos nas diferentes dosagens aplicadas.....	78
Figura 5.11-	Cromatogramas do tempo zero e ao final do ensaio com saxitoxinas.	79
Figura 5.12-	Concentração de cloro livre aplicada e residual de cloro após os tempos de contato 10 e 30 minutos.....	80
Figura 5.13-	Amostras de saxitoxinas antes do contato com cloro (direita) e após 10 minutos de contato com cloro (direita).....	81
Figura 5.14-	Curva de calibração para dcSTX.....	81
Figura 5.15-	Curva de calibração para STX.....	82

Figura 5.16- Curva de calibração para neoSTX.....	82
Figura 5.17- Concentração de saxitoxinas após tempos de contato 10 e 30 minutos após a aplicação das dosagens de cloro livre (a) 0,6 mg/L (b) 1,2 mg/L.....	85
Figura 5.18- Concentração de saxitoxinas após tempos de contato 10 e 30 minutos com aplicação das dosagens de cloro livre (a) 2,2 mg/L (b) 5,3 mg/L (c) 11,6 mg/L.....	86
Figura 5.19- Cloro residual e consumido na amostra após o tempo de contato de 30 minutos.....	87
Figura 5.20- Cromatogramas do ensaio final de saxitoxinas com a aplicação das dosagens (a) 1,9 mg/L (b) 2,4 mg/L (c) 4,9 mg/L (d) 7,9 mg/L (e) 11,3 mg/L (f) 13,6 mg/L (g) 20,5 mg/L.....	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1-	Tipos de saxitoxinas caracterizadas a partir de diferentes cepas de cianobactérias (baseado em Sivonen e Jones, 1999).....	9
Tabela 3.2-	Resultados obtidos nos ensaios de Indrasena e Gill (2000).....	11
Tabela 3.3-	Tipos de microcistinas (Baseado em Sivonen e Jones, 1999).....	15
Tabela 3.4 -	Condições e resultados obtidos nos experimento com microcistinas dissolvidas e aplicação de cloro.....	33
Tabela 4.1-	Parâmetros avaliados e seus respectivos métodos e equipamentos.....	54
Tabela 4.2-	Condições adotadas para a análise de saxitoxinas (Arantes, 2004).	55
Tabela 4.3-	Modificações feitas com relação à metodologia descrita por Arantes (2004) para os testes de extração.....	58
Tabela 5.1-	Condições dos ensaios realizados.....	61
Tabela 5.2-	Valores de cloro total.....	63
Tabela 5.3-	Turbidez e absorvância da água do Lago Paranoá e água de estudo nos ensaios realizados.....	72
Tabela 5.4-	Aumento percentual na concentração de dcSTX e STX após ensaios com cloro.....	85

## LISTA DE SÍMBOLOS, NOMECLATURAS E ABREVIACÕES

AE	Água de estudo
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cel .....	Células
C1 .....	C-toxina – análogo 1
C2 .....	C-toxina – análogo 2
COT .....	Carbono Orgânico Total
dcSTX .....	Decarbamoilsaxitoxina
dcGTX .....	Decarbamoilgoniautoxina
DL <sub>50</sub> (i.p.) .....	Dose letal a 50% do grupo testado com injeção intraperitoneal
ETA .....	Estação de Tratamento de Água
GTX .....	Goniautoxina
i.p. ....	intraperitoneal
CLAE.....	cromatografia líquida de alta eficiência
LAA .....	Laboratório de Análise de Águas
MS .....	Ministério da Saúde
neoSTX	Neosaxitoxina
nm .....	Nanômetro
OMS .....	Organização Mundial de Saúde
pH .....	Potencial Hidrogeniônico
PROSAB .....	Programa de Pesquisa em Saneamento Básico
PSP .....	Paralytic Shellfish Poison
STX .....	Saxitoxina
TDI .....	Tolerable Daily Intake
UnB .....	Universidade de Brasília
uT .....	Unidade de Turbidez
°C .....	Graus Celsius

## 1 - INTRODUÇÃO

A contaminação dos recursos hídricos e dos mananciais de abastecimento público por rejeitos oriundos das atividades humanas, como atividades agrícolas e lançamentos de esgotos domésticos, constitui-se em fator de risco para a saúde da população. A maioria dos reservatórios do Brasil está sujeita a condições de temperatura e luminosidade que, associadas a altas concentrações de nutrientes, são propícias ao desenvolvimento de microalgas e cianobactérias durante o ano todo.

A principal preocupação com respeito à presença de cianobactérias em mananciais de abastecimento está na capacidade destes organismos produzirem e liberarem toxinas para os corpos de água, podendo afetar a saúde de homens e animais.

O primeiro caso comprovado de intoxicação fatal por cianotoxinas ocorreu no Brasil, em fevereiro de 1996. O uso de água proveniente de um reservatório com excessiva floração de cianobactérias, sem tratamento e clorada de maneira inadequada, provocou o desenvolvimento de doenças hepáticas em 126 pacientes de hemodiálise do Instituto de Doenças Renais (IDR) de Caruaru, Pernambuco, causando, à época, 60 mortes.

Esse incidente contribuiu para a inclusão de valores limites de concentração de cianotoxinas na Portaria MS nº 1469/00 que posteriormente foi substituída pela Portaria MS nº 518 (Brasil, 2004). Com a entrada em vigor dessa Portaria, os responsáveis pelo tratamento e fornecimento de água para consumo humano ficam obrigados a realizar o monitoramento da ocorrência de cianobactérias na água bruta do manancial utilizado para captação e de algumas cianotoxinas na água tratada.

A Portaria MS nº 518 (Brasil, 2004) adota o limite de concentração de 1,0 µg/L de microcistina em águas de abastecimento. Como não há dados suficientes para o estabelecimento de um limite de concentração máximo aceitável em água potável para as cilindrospermopsinas e saxitoxinas, a Portaria traz somente uma recomendação de um limite de cilindrospermopsina e saxitoxinas de 15,0 µg/L e 3,0 µg/L, respectivamente. Contudo, cresce no Brasil a preocupação com relação às saxitoxinas, pois se tem verificado

o aumento da ocorrência de *Cylindrospermopsis raciborskii*, produtoras de saxitoxinas, nos mananciais Brasileiros.

O tratamento convencional, composto por coagulação, floculação, sedimentação e filtração rápida é o processo predominante no Brasil. Estudos têm mostrado que este processo não é efetivo na remoção da fração dissolvida das cianotoxinas, por isso é necessário o conhecimento de tratamentos alternativos ou complementares ao convencional, que removam de maneira eficiente as cianobactérias e suas toxinas.

A oxidação tem se mostrado efetiva na destruição das toxinas, porém a maioria dos trabalhos relatados na literatura foi realizada com microcistinas purificadas e não existem estudos aprofundados sobre o efeito dos oxidantes sobre as saxitoxinas. Os resultados obtidos com microcistinas não podem ser extrapolados para saxitoxinas, pois se tratam de toxinas com estruturas químicas bastante diferentes.

Devido à crescente preocupação com as saxitoxinas e à atratividade da oxidação como alternativa para remoção dessas toxinas como complementação ao tratamento convencional, podendo-se inclusive aproveitar o tanque de contato já usado para a desinfecção, o presente trabalho avaliará a eficiência da oxidação utilizando cloro em águas contaminadas com saxitoxinas e microcistinas.



## **2 - OBJETIVOS**

O trabalho proposto tem como objetivo geral avaliar a capacidade do processo de oxidação com hipoclorito de sódio em remover cianotoxinas dissolvidas na água.

Em termos mais específicos, os objetivos são:

- 1 - Avaliar a capacidade de remoção de microcistinas utilizando hipoclorito de sódio como oxidante.
- 2 - Avaliar a capacidade de remoção de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) utilizando hipoclorito de sódio como oxidante.
- 3 - Verificar a influência da presença de outros compostos orgânicos oriundos da lise celular ou naturalmente presentes na água na oxidação de microcistinas e saxitoxinas.

### **3 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 - CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS**

A poluição dos recursos hídricos em geral e dos mananciais de abastecimento público por rejeitos oriundos das atividades humanas tem como uma das suas conseqüências, a eutrofização, resultado do enriquecimento artificial desses ecossistemas pelo aumento das concentrações de nutrientes na água, principalmente compostos nitrogenados e fosfatados.

A eutrofização resulta num aumento da produção biológica em rios, lagos e reservatórios produzindo mudanças na qualidade da água, incluindo a redução de oxigênio dissolvido, da biodiversidade aquática, a perda das qualidades cênicas, a morte extensiva de peixes e o aumento da incidência de floração de microalgas e cianobactérias (Azevedo e Brandão, 2003). As principais fontes de contaminação têm sido identificadas como sendo as descargas de esgotos doméstico e industriais dos centros urbanos e das regiões agriculturáveis.

As cianobactérias são microorganismos procariontes, entretanto, devido à coloração turquesa da maioria das florações e pela similaridade entre estes microorganismos e algas (ambos realizam fotossíntese), as cianobactérias eram chamadas de algas azuis. Essa denominação apesar de errada continua sendo utilizada por técnicos do setor de saneamento.

As cianobactérias possuem a característica de fixar o nitrogênio do ar. As espécies filamentosas convertem nitrogênio atmosférico em formas que plantas e animais podem usar em seus processos vitais. Dessa maneira, as cianobactérias são usadas na agricultura, na fertilização dos solos.

Algumas condições ambientais favorecem o crescimento e a floração das cianobactérias: ventos fracos ou moderados, água na temperatura de 15 a 30 graus Celsius, pH variando de 6 a 9 e abundância dos nutrientes fósforo e nitrogênio (Carmichael, 1994). Tais condições são encontradas na maioria dos reservatórios do Brasil e propiciam o desenvolvimento de cianobactérias durante o ano todo (Azevedo *et al.*, 1994).

As cianobactérias são encontradas em diversos ambientes marinhos e de água doce do mundo inteiro. Em algumas situações, as cianobactérias são de fácil percepção pelo aspecto visual e pelo odor que sua presença causa no corpo d'água. É possível observar florações de espécies plantônicas, escumas e biofilmes se formando na superfície da água quando há presença de cianobactérias.

Pelo menos um terço dos mais de 50 gêneros de cianobactérias encontradas em água doce apresentam produção de toxinas, chamadas cianotoxinas, mas não existe um método simples que distinga se as cianobactérias encontradas em um ambiente são tóxicas ou não-tóxicas. Pesquisadores geralmente concordam que 50 a 60% das florações de cianobactérias são tóxicas, por isso é preferível a prevenção de qualquer floração de cianobactérias para o controle da produção de cianotoxinas nas águas de abastecimento (Yoo *et al.*, 1995).

A ocorrência de toxinas de cianobactérias é um fenômeno global, não recente, relatado em diversas nações a partir da ocorrência de envenenamento de animais e impactos na saúde humana. Carmichael (1994) atribuiu o primeiro relato do potencial efeito letal produzido por cianobactérias em 1878 à George Francis, de Adelaide, Austrália. O estudo reporta cianobactérias da espécie *Nodularia spumigena* que se proliferaram no manancial tornando a água insalubre, causando mortes em animais que consumiram a água do manancial afetado.

Apesar da sua estrutura relativamente simples, as cianobactérias possuem estruturas e funcionamentos diferentes. Podem existir nas formas unicelulares, colônias de células unicelulares e formas filamentosas.

Algumas espécies possuem a capacidade de produzir células especiais, chamada heterocistos que contém as enzimas necessárias para fixar nitrogênio do ar e convertê-lo em uma forma que pode ser usada por suas células. Outras possuem a vantagem de regular sua posição na coluna d'água através do enchimento de vacúolos de gás, podendo assim, flutuar até a superfície onde há luz para a realização da fotossíntese.

Todas as espécies de cianobactérias possuem pigmentos chamados ficobilinas, que servem como acessório para a clorofila-a, permitindo que as cianobactérias absorvam luz em uma

ampla banda do espectro visível, fazendo com que elas tenham vantagem em relação à outras espécie fitoplanctônicas. A aparência azul-esverdeada das cianobactérias vem da mistura da cor azulada de uma classe de ficobilinas, chamada ficocianinas e o verde da clorofila-a (Yoo *et al.*, 1995).

Algumas cianobactérias produzem e liberam suas toxinas durante suas vidas, enquanto outras armazenam a maioria das toxinas no seu interior até que as células comecem a morrer. Quando as toxinas são liberadas, podem persistir por várias semanas e até meses. Isto porque, existem bactérias capazes de promover a degradação desta toxina na maioria das águas (Yoo *et al.*, 1995), mas este processo é lento e pode demorar semanas.

Ainda segundo Yoo *et al.* (1995), com relação à produção de toxinas, as cianobactérias respondem de maneiras diferentes a diferentes condições ambientais, como luz, temperatura, pH, concentrações de nitrogênio, fósforo e ferro. Pouca ou nenhuma generalização pode ser feita sem que esses fatores sejam levados em consideração.

Aparentemente, as cianobactérias não possuem a capacidade de se colonizarem, invadirem e crescerem nos corpos de animais e humanos, suas células e toxinas se desenvolvem em corpos d'água. Porém, existem muitas evidências de efeitos na saúde humana e de animais, associadas ao contato com células de cianobactérias e suas toxinas, variando de efeitos brandos até fatalidades (Codd *et al.*, 2005).

Um dos enigmas que envolvem a toxicidade das cianobactérias é a presença de diferentes toxinas em amostras retiradas de um único gênero ou de uma única espécie, em diferentes locais. Contrariamente, a presença da mesma toxina é encontrada em diferentes tipos de gêneros (Falconer, 1996).

A ocorrência de toxinas nas florações de cianobactérias preocupa e gera inúmeras questões aos fornecedores de água. O contato de humanos com as cianobactérias e suas toxinas pode causar gastroenterites, náusea, vômitos, febres, sintomas parecidos com os da gripe, dor de garganta, bolhas na boca, irritações nos olhos e ouvidos, erupções, dor nos músculos, dores abdominais, consolidação pulmonar, perturbações visuais, danos aos rins e ao fígado e ainda, tem sido relacionado com um aumento na incidência de câncer no fígado (Codd *et al.*, 2005).

Os efeitos ecológicos das cianotoxinas são focados no impacto sobre o zooplâncton. Obviamente, as cianobactérias apresentam uma enorme vantagem no ambiente aquático, pois suas toxinas agem tanto nas algas, que competem com elas por nutrientes, quanto sobre o zooplâncton que as utiliza como alimento (Yoo *et al*, 1995).

As cianotoxinas produzidas pelas cianobactérias se dividem em três grupos que diferem por suas estruturas químicas: os peptídeos cíclicos, os alcalóides e os lipopolissacarídeos. Quanto à sua toxicidade, podem ser divididas também em três grupos, neurotoxinas, hepatotoxinas e dermatotoxinas.

As neurotoxinas interferem no funcionamento do sistema nervoso e levam à parada respiratória, causando a morte em alguns minutos. As hepatotoxinas causam danos ao fígado, podendo levar a um choque circulatório fatal em poucas horas ou interferir no funcionamento normal do fígado, levando à morte em alguns dias (Carmichael, 1994). E finalmente, as dermatotoxinas, que agem irritando a pele, os olhos e causando asma quando ocorre exposição por meio de águas contaminadas por extratos de cianobactérias (Falconer, 1994).

### **3.1.1 - Neurotoxinas**

Segundo vários autores (Carmichael, 1992; Sivonen e Jones, 1999; entre outros), as neurotoxinas já identificadas podem ser agrupadas em três famílias:

- Anatoxina-a e homoanatoxina-a produzidas pela espécie *Anabaena flos-aquae*, *Aphanizomenon flos-aquae* e pela *Oscillatoria* sp.;
- Anatoxina-a(s) produzida pela espécie *Anabaena flos-quae*;
- Saxitoxinas, também conhecida como toxinas do tipo PSP (*Paralytic Shellfish Poisons*), produzida pelos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya* e *Cylindrospermopsis*, e por certos microrganismos marinhos.

As neurotoxinas possuem farmacologias bem diferentes uma das outras. A toxicidade da anatoxina-a e homoanatoxina-a, que é um alcalóide, tem efeito semelhante ao do neurotransmissor acetilcolina, que auxilia na contração das células musculares e, para não haver uma estimulação exagerada dessas células, uma enzima chamada acetilcolinesterase promove a degradação da acetilcolina. A anatoxina-a é letal porque não pode ser degradada

pela enzima acetilcolinesterase, conseqüentemente, acontece a estimulação sem controle das células musculares, produzindo fadiga e paralisia. Se músculos respiratórios forem afetados, podem ocorrer convulsões pela falta de oxigênio no cérebro e morte por sufocamento. Apesar disso, a anatoxina-a pode ser uma boa ferramenta para cientistas, por ser semelhante à acetilcolina. Já a anatoxina-a(s), um composto organofosforado, age impedindo a formação de acetilcolinesterase e as saxitoxinas atuam por meio do bloqueio dos canais de sódio (Sivonen e Jones, 1999).

O DL<sub>50</sub>, intraperitonal, dose que cau sa a morte de 50% de camundongos, da anatoxina-a para camundongo é de 200µg/Kg de peso corpóreo para toxina purificada, com o tempo de sobrevivência de minutos. A dose oral que leva a morte é muito maior. O DL<sub>50</sub> intraperitonal de anatoxina-a(s) para camundongo é de 20µg/Kg de peso corpóreo, ou seja, dez vezes mais letal do que a anatoxina-a (Carmichael, 1992).

As saxitoxinas são um grupo de alcalóides carbamatos e decarbamoil que podem ser não sulfatados (saxitoxinas), com um único grupamento sulfato (G-toxinas) ou dois grupamentos sulfatados (C-toxinas). Do ponto de vista de toxicidade, as C-toxinas são menos tóxicas, as G-toxinas mais tóxicas e as saxitoxinas altamente tóxicas (Jones e Negri, 1997).

A Figura 3.1 apresenta a estrutura geral das saxitoxinas. Nessa figura as letras R1 a R5 correspondem a grupos químicos variáveis na molécula. Na Tabela 2.1 são mostrados os tipos de saxitoxinas já caracterizadas em diferentes cepas de cianobactérias.

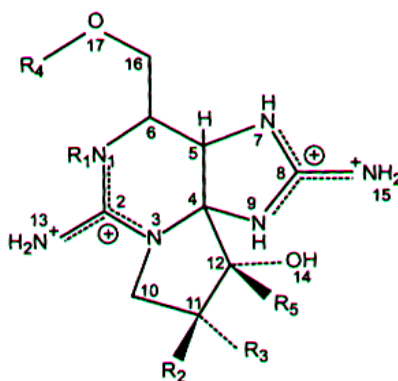


Figura 3.1 – Estrutura geral das saxitoxinas.

Tabela 3.1 -Tipos de saxitoxinas caracterizadas a partir de diferentes cepas de cianobactérias (baseado em Sivonen e Jones, 1999).

Nome da toxina	Grupos químicos variáveis nas toxinas				
	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
neoSTX	OH	H	H	CONH <sub>2</sub>	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
dcGTX2	H	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	OH
dcGTX3	H	OSO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	H	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

STX – saxitoxina                      dcSTX – decarbamoilsaxitoxinas                      GTX – goniautoxinas  
C – C-toxinas                              LWTX – toxinas de *Lyngbya wollei*                              neoSTX - neosaxitoxina

Embora, como já mencionado, as saxitoxinas sejam encontradas em cepas do gênero *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Lyngbya* e *Cylindrospermopsis*, essas toxinas são mais conhecidas como produto de dinoflagelados marinhos (algas marinhas), nesse caso normalmente chamadas de PSPs (Paralytic Shellfish Poison), responsáveis pelo fenômeno da maré vermelha. As saxitoxinas agem nas membranas dos axônios nervosos inibindo a condução nervosa por bloqueamento dos canais de sódio, impedindo que os íons de sódio

percorram pelos neurônios de modo que os impulsos sejam mandados para as outras células, assim as células musculares não recebem estímulo e se paralizam. Os sinais clínicos de intoxicação incluem tontura, adormecimento da boca e extremidades, fraqueza muscular, náusea, vômito, sede e taquicardia (Carmichael, 1994).

Há, portanto, um grande risco no consumo de peixe e marisco que acumularam as PSPs e existe um grande número de relatos de fatalidades humanas ligadas ao seu consumo. Uma importante diferença entre os riscos atribuídos ao consumo destes peixes e mariscos que acumularam PSPs e ao consumo de água com saxitoxinas produzidas pelas cianobactérias é o fato de ocorrer uma maior exposição no caso das toxinas marinhas, já que os mariscos são capazes de acumular uma alta concentração de PSPs (Yoo *et al.*, 1995).

Embora a Organização Mundial de Saúde (OMS) considere que ainda não há dados suficientes para o estabelecimento de um limite de concentração máximo aceitável para as saxitoxinas em água potável (Kuiper-Goodman, 1999), uma análise dos dados dos eventos de intoxicações humanas, demonstra que a maioria dos casos esteve associada ao consumo de aproximadamente 200µg de saxitoxinas por pessoa. Baseado nesses dados e considerando 60 Kg como peso corpóreo, 2L de água como consumo diário e fatores de incerteza para variações entre espécies distintas e entre organismos da mesma espécie, Fitzgerald *et al.* (1999) propuseram 3µg/L como o limite máximo aceitável de saxitoxinas em água para consumo humano.

A portaria nº 518/2004, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) recomenda que as análises para cianotoxinas incluam a determinação de saxitoxinas (STX), observando, o valor limite de 3,0 µg/L expressos em equivalentes de STX.

Com relação à degradação e persistência, a maioria das saxitoxinas degrada mais rapidamente quando aquecidas a altas temperaturas e com valores altos de pH por um longo período de tempo, entretanto podem ocorrer transformações durante estes processos com um potencial aumento da toxicidade em alguns casos.

A maioria das publicações que tratam da degradação das variantes de saxitoxinas em relação à temperatura se referem ao comportamento das toxinas após terem sido acumuladas por mariscos.



Indrasena e Gill (2000) avaliaram o comportamento de uma mistura de padrões de saxitoxinas parcialmente purificados, contendo as variantes STX, neoSTX, GTX 1-4 e GTX 2-3, quando aquecidas em diferentes temperaturas e variando os valores de pH. A tabela 3.2, mostra um resumo dos resultados obtidos após os ensaios.

Tabela 3.2 – Resultados obtidos nos ensaios de Indrasena e Gill (2000).

<b>Temperatura</b>	<b>C1/C2</b>	<b>GTX1-4</b>	<b>GTX2-3</b>	<b>STX</b>	<b>neoSTX</b>
<b>90 °C</b>	pH 3 a 7 houve degradação gradual, com a maior degradação no valor de pH 3.	pH 3 a 7 houve degradação gradual, com a maior degradação no valor de pH 7.	pH 3 a 5 houve aumento da concentração.  pH 7 houve redução.	pH 3 a 4 houve aumento da concentração.  pH 6 a 7 não houve mudança significativa.	A variante das saxitoxinas mais estável com relação à temperatura, com maior degradação em valores de pH 7.
<b>110°C/ 120°C</b>	pH 3 a 6 degradação gradual, com a maior degradação no valor de pH 3.  pH 7 houve aumento da concentração	pH 3 a 7 houve degradação gradual, com a maior degradação no valor de pH 7.	pH 3 a 4 degradou  pH 5 não houve mudança significativa	pH 6 a 7 houve degradação.  pH 3 a 4 houve aumento da concentração.	A variante das saxitoxinas mais estável com relação à temperatura, com maior degradação em valores de pH 7.

Nagashima *et al* (1991) analisaram a degradação das toxinas em diferentes temperaturas em meio aquoso. As análises de CLAE indicaram que as toxinas GTX 2-3 após serem aquecidas a 120°C durante 30 minutos produziram 5 picos, onde apenas dois correspondiam a GTX2 e GTX3 os outros três não foram identificados. Após 180 minutos todos os picos observados ficaram muito pequenos. Na avaliação do aquecimento de STX também apareceram picos não identificados, que não correspondiam a neoSTX.

Os mesmos autores também analisaram o comportamento das toxinas no corpo dos mariscos antes e após o aquecimento a 120°C durante 120 minutos. As toxinas presentes inicialmente eram as GTX1-4 em maior concentração e STX em menor concentração e os

picos dos cromatogramas praticamente desapareceram. Estes resultados foram coerentes com os valores de toxicidade que diminuíram quando houve o aquecimento das glândulas digestivas dos mariscos sob essas condições. No entanto, as análises de toxicidade realizadas por meio de bioensaios em ensaios realizados em partes comestíveis de ostras aquecidas a 100°C durante 30 e 60 minutos, mostraram que o valor da toxicidade dobrou no final dos ensaios.

Os aumentos nas concentrações podem ser explicados devido à co-eluição de algumas PSPs termicamente desnaturadas na reação ou devido à conversão de algumas toxinas presentes na mistura. Foram realizados bioensaios para avaliar a toxicidade das amostras após o aquecimento e apesar das possíveis conversões, a toxicidade diminuiu com o aumento da temperatura, tendo queda máxima nos valores de pH 6 e 7 e em valores de pH 3 e 4 não houve mudança significativa mesmo na temperatura mais alta.

O aumento inicial no valor da concentração de STX pode ser devido à conversão de GTX2/3 e neoSTX em STX. Na avaliação dos cromatogramas resultantes da análise de CLAE, a presença de picos não identificados entre a GTX 2 e a neoSTX e também após a STX podem ter ocorrido devido à destruição termal de derivados da toxina presentes na amostra, que contém uma mistura de compostos como nucleotídeos, aminas, aminoácidos, pigmentos e a uma variedade de outros grupos bioquimicamente ativos. Portanto, existem muitas possibilidades de interação dessas substâncias com compostos individuais das PSPs que levem a produção de derivados fluorescentes durante a análise de CLAE ou durante o aquecimento (Indrasena e Gill, 1999).

No trabalho de Shimizu e Yoshika (1981) é salientada a possibilidade de ocorrer transformações no grupo das saxitoxinas. Os autores relatam que as saxitoxinas são também uma manifestação de transferências metabólicas que ocorrem em organismos marinhos pela cadeia alimentar. Mariscos consomem dinoflagelados contendo saxitoxinas e acumulam estas toxinas em alguns tecidos do seu corpo. Em 1978 foi reportada a presença de toxinas marinhas na Bahia de Fundy, New Brunswick no Canadá e após algum tempo, a avaliação desta mesma região mostrou a presença de toxinas com maior toxicidade do que as encontradas antes. Este resultado conflitante indicou a possibilidade de ter ocorrido biotransformações nas toxinas dos mariscos. Estudos feitos com os tecidos destes mariscos sugeriram que estas toxinas sofriam transformações, tendo a saxitoxina

(STX) como produto final. As estruturas das goniautoxinas 2 e 3 são estabelecidas como eperimicos 11-hidroxisaxitoxina sulfatos, as da neoSXT como 1- hidroxisaxitoxina, as goniautoxinas 1 e 4 como epímeros 11-hidroxineosaxitoxina sulfatos e a conversão destas toxinas deve envolver um processo de redução, no caso, a redução do N-óxido e do grupo O-sulfato. A redução de N-óxidos é uma reação comum, mas a hidrogenólise dos grupos O-sulfato não é conhecida em sistemas biológicos, na realidade, o processo normal do metabolismo segue o caminho contrário.

A maioria das publicações com relação à transformação das variantes de saxitoxinas considera a ocorrência de transformação tendo como produto final as STX, porém, Sako *et al.* (2000) propôs uma transformação hipotética das STX em GTX5 e GTX2-3 e destas em C1-2. No trabalho de Castro *et al.* (2004) os resultados obtidos nos ensaios para o estudo do comportamento de cultivos de *Cylindrospermopsis raciborskii* indicam que a 19°C houve a transformação de STX em GTX2-3. Porém o autor reforça que não se deve ignorar o fato de que o cultivo de cianobactérias não é axênico e que pode ter ocorrido a influência de outras bactérias nos processos de biotransformações.

Jones e Negri (1997) estudaram o comportamento das saxitoxinas em água destilada a 25°C, pois pela falta de estudos do comportamento das saxitoxinas em temperaturas baixas não se tinha conhecimento da persistência destas toxinas em água naturais. A meia vida das toxinas C1 e C2 foi de 21 dias e das dc-GTX2/3 foi de 27 dias, as GTX2/3 persistiram por 46 dias. A transformação de C-toxinas em dc-GTXs, que degradam mais lentamente, fez com que a concentração de dcSTX fosse maior do que a inicial após 90 dias, mas mesmo assim a concentração total de toxinas ao final dos 90 dias foi de 30% do valor inicial, porém, cabe ressaltar que a toxicidade dobrou, pois as dc-GTXs são mais tóxicas do que das C-toxinas.

Mais um caso de ocorrência de possíveis transformações de saxitoxinas é relatado no trabalho de Oliveira (2005), que estudou o efeito do tempo de armazenamento do lodo produzido nos ensaios de sedimentação e flotação com *Cylindrospermopsis raciborskii*. Os resultados indicam a possibilidade da ocorrência de transformações de neoSTX em STX durante o armazenamento do lodo sedimentado, pois no decorrer do tempo houve um decaimento nas concentrações de neoSTX e um aumento na concentração de STX.

### 3.1.2 - Hepatotoxinas

As hepatotoxinas foram os primeiros tipos de toxinas a serem identificadas e por isso têm sido mais relatadas na literatura.

As hepatotoxinas podem ser divididas em dois grupos, os peptídeos cíclicos, produzidos geralmente por espécies do gênero *Microcystis* e *Nodularina* e os alcalóides, cilindrospermopsina, produzidos pela espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*. As toxinas dos peptídeos cíclicos podem ser heptapeptídeos similares chamados microcistinas e pentapeptídeos chamados nodularinas (Falconer, 1996).

As microcistinas são um grande grupo de peptídeos hepatotóxicos produzidos por diversos tipos de cianobactérias. Esse grupo de cianotoxinas é constituído por mais de 60 variantes de heptapeptídeos cíclicos, consistindo em sete aminoácidos com estrutura em forma de anel. Elas podem ser produzidas por diversas espécies do gênero planctônico: *Anabaena*, *Microcystis*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Nostoc* e *Anabaenopsis*, podem ser produzidas também pela espécie terrestre *Hapalosiphon hibernicus* (Sivonen e Jones, 1999), porém é mais comumente produzida pela espécie do gênero *Microcystis*, justificando assim, sua denominação.

A estrutura geral das microcistinas é D-Ala<sup>1</sup>-X<sup>2</sup>-D-MeAsp<sup>3</sup>-Z<sup>4</sup>-Adda<sup>5</sup>-D-Glu<sup>6</sup>-Mdha<sup>7</sup>, onde X e Z são L-aminoácidos variáveis, D-MeAsp é D-eritro ácido metilaspártico e Mdha é N-metildeidroalanina (Carmichael *et al.*, 1988). Adda é o ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienóico e é um dos responsáveis por conferir toxicidade a essas hepatotoxinas (Harada *et al.*, 1999). A Figura 3.2 apresenta a estrutura geral das microcistinas.

A nomenclatura das microcistinas foi proposta por Carmichael *et al.* (1988), e baseia-se nas variações qualitativas observadas nos dois L-aminoácidos da toxina. Atualmente, já se tem cerca de 60 análogos de microcistina caracterizados. Na tabela 3.3 estão expostas algumas das variáveis de microcistinas de acordo com as variações nos dois L-aminoácidos.

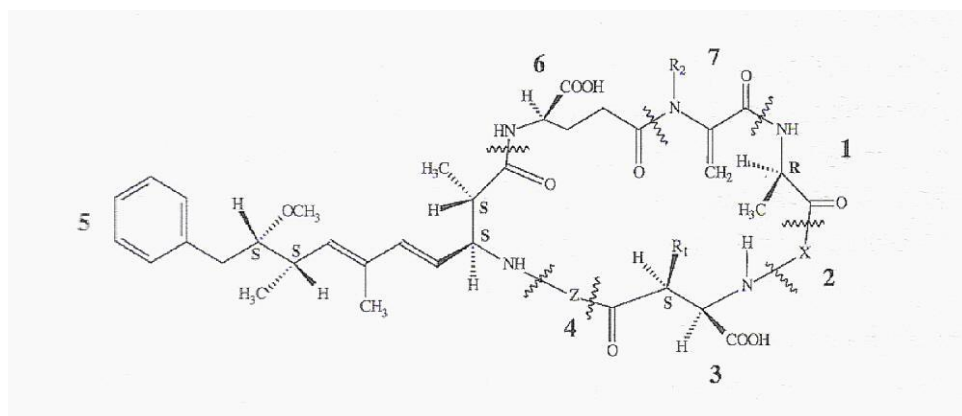


Figura 3.2. – Estrutura geral das microcistinas.

Tabela 3.3 – Tipos de microcistinas (Baseado em Sivonen e Jones, 1999).

Nome da toxina	L-aminoácido (X)	L-aminoácido (Y)
microcistina - LR	Leucina	Arginina
microcistina - RR	Arginina	Arginina
microcistina - LA	leucina	Alanina
microcistina – YR	tirosina	Arginina
microcistina – YA	tirosina	Alanina
microcistina - YM	tirosina	Metionina

A microcistina-LR, a mais tóxica entre os análogos de microcistinas, apresenta DL<sub>50</sub> (i.p.) em animais de laboratório entre 25 a 150 µg/kg de peso corpóreo e entre 5.000 e 10.900 µg/kg de peso corpóreo por administração oral (Sivonen e Jones, 1999).

As hepatotoxinas agem causando danos ao fígado, a razão disso está no fato da sua baixa capacidade de penetrar nas células e sua facilidade de concentração no mecanismo de transporte biliar. Isso restringe sua toxicidade às células do intestino e fígado (Falconer, 1994; Falconer, 1996).

De acordo com Carmichael (1994), as hepatotoxinas peptídicas promovem a diminuição dos hepatócitos (células do fígado) e conseqüentemente a perda do contato célula-célula dos capilares sinusoidais. Deste modo, o fígado perde seu arranjo ideal de células e surgem lesões internas graves, como hemorragia, pois a perda do contato entre as células cria espaços internos que são preenchidos pelo sangue que passa a fluir dos capilares para estes

locais.

A exposição prolongada deve ser considerada como um sério risco à saúde humana, pois as microcistinas são potenciais promotoras de tumores e, portanto, o consumo continuado de pequenas doses pode levar a uma maior incidência de câncer hepático na população exposta. Como consequência, é importante que os efeitos crônicos de exposições prolongadas por ingestão oral de baixas concentrações de cianotoxinas sejam avaliados tanto do ponto de vista epidemiológico como toxicológico (Azevedo e Brandão, 2003).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estudos com a microcistina-LR, chegaram a um valor de ingestão diária aceitável (TDI – *Tolerable Daily Intake*) de 0,04 µg/kg de peso corpóreo, cabe salientar que se levou em conta um fator de segurança contra variações entre espécies e variações numa mesma espécie, limitações de dados de toxicidades crônicas e produtores de tumor. A partir daí, obteve-se um limite máximo aceitável de 1 µg/L de microcistinas em água para consumo humano (WHO, 1998).

No Brasil, a portaria nº 518/2004, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) estabelece este valor, de 1µg/L como padrão de potabilidade para microcistinas nas águas de abastecimento, sendo aceitável a concentração de até 10 µg/L de microcistinas em até três amostras, consecutivas ou não, nas análises realizadas nos últimos doze meses. Adicionalmente, recomenda-se que a concentração de cilindrospermopsina não exceda 15µg/L.

De acordo com Harada *et al.* (1999), devido a sua estrutura peptídica cíclica as microcistinas são muito estáveis e resistentes a hidrólise química e oxidação, em pH próximo da neutralidade. Além disso, as microcistinas mantêm sua toxicidade mesmo após a fervura. Em condições naturais, no escuro, as microcistinas podem persistir por meses ou anos. Em temperatura elevada (40° C) e condições de pH alto ou baixo, foram observadas hidrólises lentas, sendo necessário aproximadamente 10 semanas em pH 1 e mais de 12 semanas em pH 9 para a degradação de cerca de 90% da concentração total das microcistinas.

Porém, segundo Sivonen e Jones (1999), já foi observada uma lenta degradação fotoquímica das microcistinas expostas à luz solar. A taxa desta reação é aumentada pela presença de pigmentos fotossintéticos hidrossolúveis, provavelmente ficobiliproteínas. Na

presença desses pigmentos, a degradação fotoquímica de 90% da concentração total das microcistinas pode variar de duas a seis semanas, dependendo da concentração de pigmentos e toxinas. A presença de substâncias húmicas também parece acelerar a degradação das microcistinas sob luz solar.

Ainda, em Sivonen e Jones (1999), os autores relatam que, embora as microcistinas sejam resistentes a muitas peptidases de eucariontes e bactérias, elas são suscetíveis à degradação por algumas bactérias encontradas naturalmente em rios e reservatórios. Bactérias capazes de degradar microcistinas já foram isoladas de vários ecossistemas aquáticos e também efluentes de esgotos. Este processo pode levar à degradação de 90% do total de microcistinas entre 2 a 10 dias, dependendo principalmente da concentração inicial dessas toxinas e da temperatura da água.

De acordo com ensaios pilotos relatados por Drikas *et al.* (2001), numa unidade de decantação, observou-se, após dois dias, a lise celular das cianobactérias *Microcystis aeruginosa* presentes no lodo, ocorrendo assim a liberação da toxina que estava outrora na forma intracelular. Cinco dias depois houve uma redução de 80% dessas cianotoxinas, atingindo a redução total após 13 dias. A degradação bacteriológica da microcistina-LR pode ter sido responsável por essa redução. Esse processo de degradação foi relatado no trabalho de Jones e Orr (1994), que observaram que nove dias após o tratamento químico num reservatório que apresente floração de *Microcystis aeruginosa*, ocorre a degradação bacteriológica da microcistina-LR.

### **3.1.3 - Relatos de ocorrência de cianobactérias e cianotoxinas em corpos d'água**

O primeiro caso relatado de impacto na saúde humana causado por cianobactérias e cianotoxinas ocorreu em agosto de 1975, em Sewickley, nos EUA. Cinco mil pessoas foram afetadas por doenças gastrointestinais, numa população total de 8000 pessoas. Depois deste acontecimento, a água de abastecimento foi analisada e foram encontradas e grandes quantidades de algas filamentosas flutuando na superfície e no fundo do reservatório de abastecimento. A possível causa da contaminação foi a aplicação de altas doses de sulfato de cobre durante o controle do crescimento das cianobactérias no manancial de abastecimento, o que pode ter ocasionado a liberação das toxinas para água (Falconer, 1994).

No trabalho de Falconer (1996) é relatado um surto de hepatoenterites, ocorrido em 1979, causada pela presença de cianobactérias na água de distribuição de ilha tropical ao nordeste da costa da Austrália. No caso, a água de distribuição era sujeita à aplicação de sulfato de cobre no manancial de abastecimento não recebia nenhum outro tipo de tratamento antes do consumo, exceto desinfecção com cloro. Em uma semana, 138 crianças da população que se abasteciam desta água ficaram gravemente doentes. Os sintomas eram relacionados com hepatite, danos ao fígado e ao intestino. O organismo causador foi identificado como *Cylindrospermopsis raciborskii*.

O primeiro relato da ocorrência de microcistinas provenientes de cepas do gênero *Microcystis aeruginosa* em águas de abastecimento Brasileiras foi em São Paulo, onde uma colônia deste gênero foi isolada da Lagoa de Garças. Nos bioensaios realizados com camundongos, o LD<sub>100</sub> (a dose letal que causa a morte de 100% da população de camundongos) das células liofilizadas foi de aproximadamente 31 µg/Kg (Azevedo *et al.*, 1994).

Com relação a impactos das microcistinas na saúde humana, o trabalho de Teixeira *et al.* (1993) descreve uma forte evidência de correlação entre a ocorrência de florações de cianobactérias, no reservatório de Itaparica (Bahia) e a morte de 88 pessoas, entre as mais de 2.000 intoxicadas, pelo consumo de água do reservatório, em 1988. A epidemia de gastroenterite ocorreu na região de Paulo Alonso, logo após o alagamento do reservatório de Itaparica e teve duração de aproximadamente dois meses. A análise da água revelou a presença de cianobactérias dos gêneros *Anabaena* e *Microcystis*, porém não foram realizadas análises nos órgãos das pessoas intoxicadas para confirmar a origem da epidemia.

Entretanto, a primeira epidemia reconhecida causada pela toxicidade fatal das microcistinas ocorreu em fevereiro de 1996, no Brasil, quando 123 pacientes renais crônicos, após terem sido submetidos a sessões de hemodiálise no Instituto de Doenças Renais (IDR) de Caruaru, Pernambuco, passaram a apresentar um quadro clínico compatível com uma grave hepatotoxicose. Desses 123 pacientes intoxicados, 60 vieram a falecer no período de 10 meses após o início dos sintomas (Azevedo, 1996).



O incidente ocorreu após um período de seca, que deixou muitas instituições residenciais e públicas sem abastecimento de água tratada. Cabe salientar que a hemodiálise representa um risco adicional neste caso, pois neste processo, as toxinas presentes na água entram diretamente na circulação, causando desde a falha do funcionamento do fígado até doenças neurotóxicas agudas, podendo levar o paciente à morte. Sendo assim, a hemodiálise foi provavelmente a via de contaminação, pois nenhum parente ou pessoas que entraram em contato com os pacientes foram afetados e ainda, as análises laboratoriais confirmaram a presença de microcistinas no carvão ativado utilizado no sistema de purificação de água da clínica, bem como em amostras de sangue e fígado dos pacientes intoxicados (Azevedo, 1996).

Apesar da predominância de *Microcystis aeruginosa* em água Brasileiras, pode se verificar então, um aumento da presença de *Cylindrospermopsis raciborskii* em diferentes regiões Brasileiras (Chellappa e Costa, 2003; Yunes *et al.*, 2003).

Devido ao aumento da frequência de florações de cianobactérias tóxicas nos reservatórios de abastecimento de água no Brasil, foi desenvolvido no ano de 1999, um programa de monitoramento pela CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo, incluindo medidas de toxicidade de organismos potencialmente prejudiciais à saúde. Durante os testes realizados como parte desse programa, foram identificadas três culturas que, por meio de ensaios com camundongos, se mostraram produtoras de toxinas letais potentes. Os sintomas eram similares aos causados por *paralytic shellfish poison* e as características taxonômicas se pareciam muito com as descritas como sendo de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Pela primeira vez, foi confirmada a produção de análogos de saxitoxinas por cianobactérias do gênero *Cylindrospermopsis raciborskii* no Brasil (Lagos *et al.*, 1999).

Yunes *et al.* (2003) realizaram um estudo da ocorrência de florações *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Anabaena spiroides* na região sul do Brasil. De acordo com os autores, florações de *Cylindrospermopsis* têm substituído florações sazonais de outras cianobactérias (*Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Anabaena*) por ocorrências permanentes em ambientes com acúmulo de água (represas, diques).

Silvestre *et al.* (1999), monitoraram a ocorrência de florações tóxicas de cianobactérias do gênero *Cylindrospermopsis raciborskii* nos mananciais de abastecimento de Pernambuco tanto do ponto de vista da análise quantitativa das populações, como da detecção de cianotoxinas. Como resultado, obteve-se a constatação de elevadas quantidades de cianobactérias. No manancial de abastecimento do município de Custódia, foi verificada a maior concentração dentre os mananciais estudados, a densidade variou de  $1,6 \times 10^4$  a  $1,6 \times 10^7$  cel/mL durante os meses de estudo e foram identificadas duas espécies de *Cylindrospermopsis* formando florações tóxicas: *C. Catemaco* e *C. raciborskii*. Em relação às cianotoxinas foram detectados vestígios de cilindrospermopsina por meio da análise com CLAE e por meio de bioensaios confirmou-se a presença de saxitoxinas.

No trabalho de Carvalho *et al.* (1999) também é relatada a ocorrência de florações da cianobactéria *Cylindrospermopsis* em mananciais do Pernambuco, em 39% dos mananciais avaliados houve floração deste gênero de cianobactéria.

Em 2004, foram realizadas análises da presença de cianotoxinas durante uma floração no reservatório de Tapacurá, em Recife, Pernambuco. As cianobactérias predominantes eram *A. spiroides*, *Pseudoanabaena*, *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*. Os bioensaios mostraram a presença de neurotoxinas e as análises dos extratos com CLAE-FLD revelaram a presença de saxitoxinas, neosaxitoxinas e dc-saxitoxinas (Molica *et al.*, 2004).

### **3.1.4 - Métodos de detecção de cianotoxinas**

Existem diversos métodos utilizados para detectar e quantificar cianotoxinas na água e em células de cianobactérias. Esses métodos podem variar bastante, tanto no grau de sofisticação quanto com relação ao tipo de informação que fornecem. Métodos relativamente simples e com baixo custo podem ser empregados para avaliar rapidamente o risco potencial e permitir que decisões sejam tomadas. Em contraste, técnicas analíticas altamente sofisticadas podem ser aplicadas para determinar precisamente o tipo e quantidade de cianotoxinas.

A escolha da metodologia a ser empregada dependerá da disponibilidade de equipamentos e de profissionais treinados, assim como do tipo de informação que se deseja obter. Além disso, a seletividade e sensibilidade são parâmetros importantes que devem ser levados em consideração na seleção de métodos para análise de cianotoxinas (Harada *et al.*, 1999).

Os bioensaios são baseados na bioatividade das toxinas, como por exemplo, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, atividade enzimática e interações imunológicas. O bioensaio em camundongos tem sido muito utilizado na determinação da toxicidade de florações. Este ensaio consiste na injeção intraperitoneal (i.p.) de uma amostra contendo toxinas obtidas da lise de células de cianobactérias no camundongo. O animal permanece em observação por um período de geralmente 24 horas, que pode ser estendido para sete dias, quando há suspeita da presença de cilindrospermopsina. Após o período da observação, é realizada uma autópsia no tecido do animal. De acordo com os sintomas observados e com os resultados da autópsia identifica-se a cianotoxina presente. A restrição deste método está na impossibilidade de detectar baixas concentrações de toxinas e a dificuldade de distinguir as diferentes variantes de cianotoxinas. Além disso, existe o desejo de minimizar a utilização de animais para testes laboratoriais. (Harada *et al.*, 1999).

Os métodos mais utilizados para detecção de microcistina são o CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), e o ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

O ELISA faz uma análise imuno-química da amostra. No mercado existem vários tipos de *kits* ELISA, como por exemplo, os qualitativos, onde a leitura pode ser feita visualmente, e os quantitativos, que são feitos em placas, necessitando de um espectrofotômetro específico para leitura no ELISA.

O método ELISA é mais sensível que o CLAE e possibilita a detecção de concentrações muito baixas. Porém, a metodologia para a detecção baseada no ELISA responde a uma variedade de microcistinas, mas não faz distinção das variantes de microcistina presentes na amostra (Yoo *et al.*, 1995). Essa é uma técnica adequada para a realização de uma varredura rápida da amostra, pois apresenta alta sensibilidade, especificidade, e sua realização é relativamente simples.

Existem, atualmente no mercado, *kits* ELISA para a análise de saxitoxinas, no entanto,

estes imunoenaios não detectam neoSTX e esta toxina é a que tem concentração predominante na cepa T3 de *Cylindrospermopsis raciborskii* cultivada no LAA, objeto de estudo do presente trabalho.

De acordo com Oshima *et al.* (1995), o método analítico mais comumente utilizado para detecção de saxitoxinas é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE – *High Performance Liquid Chromatography*) com derivatização pós-coluna e detecção de fluorescência. O CLAE foi utilizado inicialmente para análises de saxitoxinas em organismos marinhos. Porém, tem se mostrado adequado para avaliações dessa toxina em cianobactérias (Harada *et al.*, 1999). Apesar disso, este método requer a utilização de três fases móveis diferentes para que se possa analisar todas as variantes de saxitoxinas presentes em uma amostra. Além disso, muitas vezes é necessário realizar a concentração e purificação da amostra previamente às análises, pois a presença de outros compostos pode dificultar a análise dos cromatogramas e o limite de detecção do aparelho impossibilita análises de concentrações menores do que 3 µg/L (no caso do equipamento utilizado neste trabalho).

A descrição dos métodos de análise utilizados no presente trabalho será apresentada com mais detalhes no Capítulo 4 – Metodologia.

## **3.2 - FUNDAMENTOS DA OXIDAÇÃO QUÍMICA**

### **3.2.1 - Introdução**

A oxidação química é um processo no qual o estado de oxidação de uma substância é aumentado. Inversamente, a redução química é um processo no qual o estado de oxidação é reduzido. Para reações de oxidação-redução (redox) inorgânicas simples, a oxidação é equivalente a uma perda de elétrons e a redução a um ganho de elétrons. Essa definição não é diretamente aplicada a reações orgânicas .

Originalmente Lavoisier descreveu oxidação como a adição de oxigênio a uma substância química para formar um óxido. Atribuiu-se a oxidação de compostos orgânicos às seguintes reações: adição de oxigênio, retirada de hidrogênio, retirada de elétrons. Definições mais atuais de reações redox incluem, em adição à transferência completa de

elétrons, o mecanismo alternativo de transferência de qualquer espécie de hidrogênio além do próton ou de qualquer espécie de oxigênio além de um óxido ou um íon hidróxido (Weber Jr., 1972).

Para ilustrar como o processo de oxidação envolve a perda e o ganho de elétrons, podemos considerar a oxidação de íons de ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) por ácido hipocloroso. O ácido hipocloroso é a espécie de cloro aquoso que predomina em valores de pH ácidos e neutros. Quando adicionado à água contendo íons de ferro, uma reação química rápida acontece:



Neste processo o ferro foi oxidado, aumentando seu número de oxidação de +2 para +3, enquanto o cloro foi reduzido, diminuindo seu número de oxidação de +1 para -1 (Glaze, 1996).

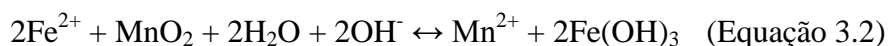
De acordo com Weber Jr.(1972), o propósito da oxidação no tratamento de água e de esgoto é o de converter espécies químicas indesejáveis em espécies não prejudiciais. Muito frequentemente não é prático, nem necessário, levar o processo de oxidação à sua conclusão completa. Por isso, definir a oxidação química em tratamento de água e de esgoto como um método para a modificação seletiva de substâncias indesejáveis e/ou substâncias tóxicas, possibilita uma visão mais realista do processo. Segundo esses autores, essas substâncias podem ser:

1. substâncias inorgânicas ( $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{CN}^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ );
2. substâncias orgânicas (fenóis, aminas, ácidos húmicos, compostos produzindo sabor, odor ou cor, bactérias e algas).

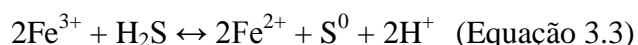
Ainda de acordo com Weber Jr. (1972), a aplicação correta dos processos de oxidação química nos tratamentos de água e esgoto requer, em adição ao conhecimento detalhado do sistema de tratamento, um conhecimento dos princípios químicos e físico-químicos envolvidos em reações de oxidação química em soluções aquosas.

Qualquer elemento que funciona como receptor de elétrons é um agente oxidante e um agente redutor é qualquer elemento que sirva como doador de elétron. Um mesmo

elemento pode assumir o papel de agente oxidante redutor, dependendo do seu estado de oxidação e das condições de reação. Por exemplo, o ferro é um agente redutor quando reage com o peróxido de manganês:



O ferro oxidiza o sulfeto de hidrogênio em enxofre elementar, como segue:



As taxas de reação química são afetadas por mudanças no pH da solução porque os agentes oxidantes são suscetíveis à mudança de forma ou mecanismo sob condições ácidas ou básicas. Por exemplo, o cloro pode existir em três principais formas em solução aquosa, dependendo do pH: cloro gasoso  $\text{Cl}_2$ , íon hipoclorito  $\text{ClO}^-$  e ácido hipocloroso  $\text{HOCl}$ . A reatividade dessas formas é diferente, então, efeitos diversos são observados em reações com o cloro sob diferentes condições de pH, conforme a mudança dessas três espécies. Da mesma maneira, a taxa de ozonização é altamente dependente do valor do pH. Com valores acima de 8 a 9, o ozônio se decompõe para formar o radical hidroxila  $\text{HO}\cdot$ , altamente reativo, assim, mudanças nas taxas de reação de ozonização são observadas em níveis elevados de pH.

Mudanças de temperatura também têm efeito importante nas taxas de reação química. Em geral, a constante da taxa de reação química aumentará com o aumento da temperatura. O efeito deste princípio é que em águas frias a taxa de reação será substancialmente retardada (Glaze, 1996).

O uso que se pretende fazer da água tratada impõe algumas restrições no tipo de agentes oxidantes que podem ser usados, com relação à resíduos tóxicos e outros efeitos indesejáveis, como a formação de subprodutos. Idealmente, nenhum resíduo de oxidante deve permanecer após o término do tratamento. Há também outros aspectos significantes que devem ser considerados na escolha do tipo de agente oxidante para tratamento de água e de águas residuárias:

1. efetividade do tratamento;
2. custo;

3. facilidade de manuseio;
4. compatibilidade com o tratamento precedente ou com o tratamento subsequente;

Existem apenas alguns agentes oxidantes que são capazes de preencher esses requisitos:

1. oxigênio ou ar;
2. ozônio;
3. peróxido de hidrogênio (uso muito limitado);
4. permanganato de potássio;
5. cloro (ou hipocloritos);
6. dióxido de cloro.

No item a seguir é apresentada, de forma resumida, apenas a química da oxidação com cloro, objeto de estudo deste trabalho.

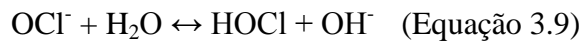
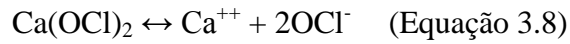
### 3.2.2 - Aspectos da química do cloro

O cloro é o oxidante mais comum usado em tratamento de água, por ter baixo custo e facilidade de aplicação e armazenamento e alto poder desinfetante nas condições adequadas. Está disponível na forma líquida ou gasosa (pressurizado em tanques de metal), como solução aquosa concentrada (hipoclorito de sódio) ou como sólido (hipoclorito de cálcio). Uma vez adicionado à água, a química de todas as formas de cloro é essencialmente a mesma.

Quando cloro puro é adicionado à água, rapidamente sofre uma desproporção para formar ácido hipocloroso (HOCl), que por sua vez se dissocia em íon hipoclorito (OCl<sup>-</sup>). Essas duas espécies de cloro são consideradas cloro livre (Connell, 1996) e a espécie de cloro presente na água dependerá da concentração total de cloro, do pH e da temperatura.



O cloro na forma de hipoclorito de cálcio se dissolve em água para formar o íon hipoclorito, que reage por sua vez com a água, formando o ácido hipocloroso:



A Figura 3.3 apresenta o gráfico que mostra a dissociação do HOCl em função do pH.

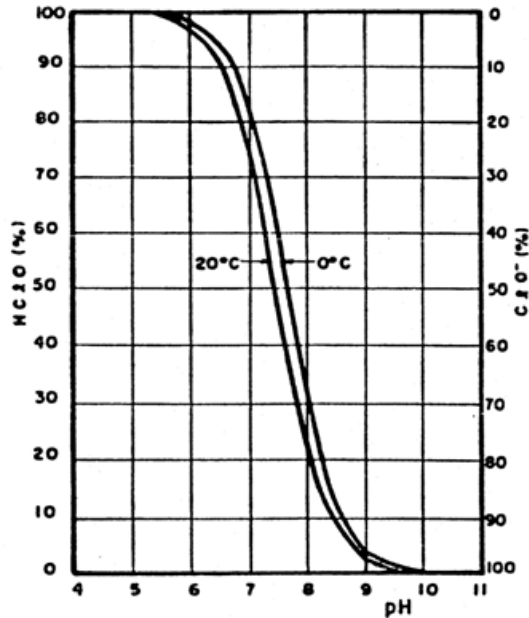


Figura 3.3 – Dissociação do HOCl em função do pH.

As porcentagens de HOCl e OCl<sup>-</sup> presentes na solução, são determinadas pelo valor do pH, pela concentração total de cloro e temperatura. Em outras palavras, não importa qual forma de cloro é adicionada à água, haverá formação de hipoclorito, ácido hipocloroso e cloro molecular (Glaze, 1996).

Existem muitas diferenças no funcionamento do cloro e seus derivados como oxidantes e desinfetantes. Por exemplo, enquanto a efetividade bactericida do cloro aumenta com a diminuição do pH, sua efetividade como oxidante para espécies como H<sub>2</sub>S, NO<sup>2-</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> e CN<sup>-</sup>, geralmente diminui com a diminuição do pH (Weber Jr., 1972).

O cloro aquoso é um dos oxidantes químicos mais versáteis. Seu uso inclui a oxidação do manganês, remoção de cor, controle de sabor e odor. Infelizmente, o cloro também forma subprodutos potencialmente cancerígenos e mutagênicos, principalmente quando usado em tratamento de águas superficiais. Subprodutos da cloração são formados quando o cloro reage com compostos orgânicos naturais presentes em alguns corpos d'água, por exemplo,



ácido húmico e fúlvico, clorofila e outros componentes de algas e bactérias que crescem em fontes de abastecimento de água municipais. Os trabalhos de Mondardo *et al.* (2006) e Kuroda (2006) relatam a formação de subprodutos a partir de células de cianobactérias.

Os principais subprodutos da cloração de preocupação do ponto de vista da saúde são clorofórmios, trihalometanos (clorofórmio, bromodiclorometano, dibromoclorometano, bromofórmio) ácidos dicloroacéticos e tricloroacéticos e acetonitrilas halogenadas. Um grande número de outros compostos é formado em pequenas quantidades, incluindo cetonas halogenadas têm sido usado para medir os níveis desses subprodutos halogenados. Os níveis de cetonas halogenadas nas águas cloradas dependem do nível de carbono orgânico total (COT) na água bruta, mas mudanças substanciais ocorrem dependendo da fonte de água e do pH no qual o cloro é aplicado (Glaze, 1996). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabelece valores limites para as variantes de trihalometanos, a saber:

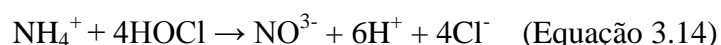
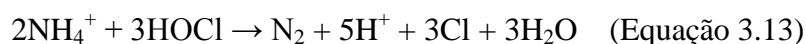
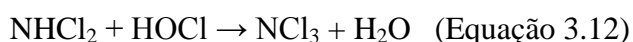
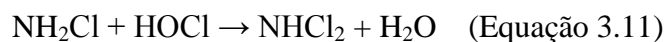
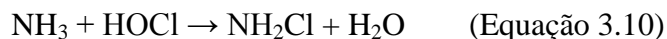
- clorofórmio – 0,2 mg/L
- bromodiclorometano – 0,06 mg/L
- dibromoclorometano – 0,1 mg/L
- bromofórmio – 0,2 mg/L

A Portaria n° 518 do Ministério da Saúde (Brasil, 2004) estabelece como padrão de potabilidade para trihalometanos um valor total de 0,1 mg/L. A OMS ressalta ainda que, os trihalometanos raramente são encontrados na água bruta, porém geralmente estão presentes na água após passar por tratamento em uma ETA e na maioria das vezes, a presença dominante é de clorofórmio.

Quando se adiciona cloro livre a uma água completamente pura, o residual de cloro será o mesmo que a quantidade adicionada inicialmente. Entretanto, se existir algum contaminante na água, o cloro reagirá com ele. Esses contaminantes podem ser microorganismos, compostos orgânicos e inorgânicos. A quantidade de cloro usada nessas reações é chamada demanda de cloro (Hager, 1997).

Segundo Glaze (1996), as cloroaminas são formadas pela reação da amônia com cloro aquoso. Isto pode ocorrer intencionalmente, com o propósito de preparar cloroaminas para agirem como desinfetantes, mas pode ocorrer durante o processo de cloração da água ou

esgoto quando há presença de amônia. Dependendo do pH e da quantidade de amônia e de cloro, a mistura resultante pode conter monocloraamina ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ), dicloroamina ( $\text{NHCl}_2$ ) e tricloroamina ( $\text{NCl}_3$ ), nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ):



Os tipos de cloroaminas mencionados são formas de cloro combinado, ou seja, as concentrações de cloro livre presentes numa água conjuntamente com cloro na forma de cloro combinado leva ao valor de cloro total.

Quando há presença de amônia na água a ser tratada com a cloração ocorre um fenômeno denominado reação de *breakpoint*. As cloraminas formadas são desinfetantes e oxidantes mais fracos quando comparados ao cloro livre. O uso do processo de *breakpoint* resulta na oxidação da amônia e na eliminação das cloraminas. A adição contínua de cloro em águas contendo amônia leva primeiramente à formação de monocloramias, que são convertidas em dicloroaminas e finalmente em tricloroaminas. Em certo ponto, a adição de uma maior concentração de cloro levará à redução da concentração de cloroaminas. Com a aplicação de concentrações de cloro ainda maiores poderá ocorrer a decomposição em nitrogênio e nitrato (Di Bernardo e Dantas, 2005).

Estudos em laboratório indicam, entretanto, que as cloroaminas são oxidantes fracos e não diminuem o potencial de formação de THMs (trihalometanos) e de compostos que produzem sabor e odor. Em geral, o valor das cloroaminas não está no seu papel como oxidante, mas sim como desinfetante.

### **3.3 - REMOÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS EM ÁGUAS PARA CONSUMO HUMANO**

#### **3.3.1 - Visão geral do tratamento de água para remoção de cianobactérias e cianotoxinas**

As algas e cianobactérias causam impacto na estética da água, tornando seu aspecto desagradável para os consumidores, isso é de grande importância, pois talvez os únicos critérios levados em conta pelo consumidor sejam sabor, odor e limpidez. Além disso, a presença de algas e cianobactérias podem causar problemas nas estações de tratamento, como: obstrução das canalizações, dificultarem os processos de coagulação, floculação e sedimentação e pode promover a colmatação dos filtros.

Em alguns países o desenvolvimento de estratégias para mitigar problemas relacionados com cianobactérias só é feito após ocorrer um caso de contaminação, afetando a saúde de homens e animais. Experiências nos EUA, Austrália e Brasil mostram a importância de estar preparado para medidas corretivas e preventivas (Codd *et al.*, 2005).

Estudos têm demonstrado que os processos convencionais removem parte das células de cianobactérias, no entanto, podem provocar a lise durante o tratamento e a consequente liberação das cianotoxinas para a água. Sabe-se que os processos convencionais de tratamento são pouco eficientes na remoção de cianotoxinas extracelular (Keijola *et al.*, 1988; Himberg *et al.*, 1989; Hart *et al.*, 1998, Chow *et al.*, 1999).

Segundo Azevedo e Brandão (2003), os processos e seqüências de tratamento de água para abastecimento público devem possuir a capacidade de remover as células viáveis (biomassa algal) e não de promover a lise dessas células e deve também, ser capaz de remover a fração dissolvida das cianotoxinas (extracelular).

No entanto, vêm crescendo o uso de coagulantes durante o tratamento de água, sua ineficácia na remoção de toxinas dissolvidas e ainda, a possibilidade de ocorrer liberação das cianotoxinas para a água após a aplicação de coagulantes, faz com que haja a necessidade de complementação ao tratamento convencional para que ocorra uma remoção eficaz das cianotoxinas.

A literatura, de um modo geral, indica a oxidação, juntamente com a adsorção em carvão ativado, como sendo as técnicas complementares ao tratamento convencional mais efetivas na remoção da fração dissolvida das cianotoxinas.

Muitos estudos têm sido realizados com o intuito de avaliar a eficiência na remoção de cianotoxinas após a aplicação do carvão ativado. Ensaio realizado por Keijola *et al.* (1988) evidenciam a boa remoção de cianotoxinas (microcistina e anatoxina-a) por filtração em carvão ativado granular. Por outro lado, trabalhos realizados por Falconer *et al.* (1989) e por Himberg *et al.* (1989) sugerem que os dois tipos de carvão ativados, tanto em pó quanto granular, são eficientes na remoção de cianotoxinas dissolvidas.

Estudos realizados por Yoo *et al.* (1995) mostram que a adsorção com carvão ativado leva a resultados satisfatórios. Os autores ressaltam que, a quantidade de carvão ativado em pó necessária pode ser maior do que a usada para remoção de odor e o carvão selecionado deve ser efetivo para a adsorção de toxinas.

Silva (2005) avaliou o processo de adsorção por carvão ativado em pó, com diferentes tipos de carvão produzidos no Brasil, na remoção de saxitoxinas produzidas pela espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*. Embora o percentual de remoção tenha sido insuficiente para garantir a eficiência do tratamento, as concentrações removidas foram bastante elevadas.

No capítulo a seguir a oxidação de cianotoxinas, assunto do presente trabalho será abordada com mais profundidade.

### **3.3.2 - Oxidação de cianotoxinas**

O cloro, por ser o desinfetante mais usado no tratamento de água é também o oxidante mais estudado para remoção de cianotoxinas.

Nos ensaios realizados por Nicholson *et al.* (1994), realizou-se a oxidação de microcistinas extraídas de extratos de células liofilizadas dissolvidas em água destilada, utilizando hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio. O cloro na forma de hipoclorito de cálcio, em concentrações variando de 1 a 16 mg/L. Com a aplicação da maior dosagem, foi atingida

uma remoção de 95% de toxinas, após um tempo de contato de 30 min. Os resultados com a utilização de hipoclorito de sódio atingiram 40% de remoção com a aplicação de uma dosagem de 1 mg/L e 80% de remoção utilizando 5 mg/L. As concentrações iniciais de microcistinas variaram de 130 a 330 µg/L, quantidade representativa de uma floração. Os autores suspeitaram de que os resultados obtidos nos ensaios com a utilização de hipoclorito de sódio foram devido às soluções de hipoclorito de sódio serem altamente alcalinas. Enquanto a quantificação da destruição das microcistinas era realizada, foram feitos também, bioensaios para avaliar a perda de hepatotoxicidade. Chegou-se à conclusão de que a toxicidade era eliminada com uma concentração de 0,5 mg/L de cloro residual, após um tempo de contato de 30 min. Não há informações a respeito das dosagens de cloro aplicadas, dessa maneira, não se sabe se as concentrações de cloro aplicadas tratam-se de cloro livre.

Hart *et al.* (1998) realizaram estudo sobre a oxidação de microcistina-LR dissolvida em água tratada, utilizando cloro. Os estudos foram feitos com a aplicação de uma dosagem de 1,7 mg/L de hipoclorito de sódio e tempos de contato de 30 minutos e 22 horas, com um valor de pH 5. Os autores concluíram que a efetividade do cloro era altamente dependente do valor do pH. Uma remoção de microcistina-LR de mais de 93% foi atingida, com um tempo de contato de 30 min. Com o valor de pH 7 e a mesma dosagem, nenhuma remoção significativa foi atingida após 30 min, apenas após 22h de contato a remoção foi próxima de 90%. Para um valor de pH 9, a redução de microcistina-LR foi significativamente baixa mesmo após 22h de contato. Cabe salientar que baixas concentrações de toxinas foram usadas nos ensaios, aproximadamente 7 µg/L para microcistina-LR e aproximadamente 1µg/L para anatoxina-a e os autores não explicitaram se as toxinas passaram previamente por algum processo de purificação.

Newcombe e Nicholson (2004) realizaram ensaios com a utilização de cloro com extratos liofilizados contendo microcistina-LR e microcistina-LA com concentração inicial de 192 µg/L. O tempo de contato foi de 30 minutos e os autores relataram que as microcistinas do extrato foram rapidamente destruídas pelo cloro. Mais uma vez a remoção das toxinas foi dependente do pH. A destruição das microcistinas foi também reduzida com o uso de valores de pH acima de 8 para hipoclorito de sódio e de cálcio e para cloro na forma de gás, a maior redução observada foi em valores de pH acima de 9. Esse comportamento reflete o efeito do pH no potencial de oxidação do ácido hipocloroso, que, sob condições

alcalinas está presente predominantemente na forma dissociada de íon hipoclorito, com menor poder de oxidação do que o ácido hipocloroso, a espécie que predomina sob condições neutras a ácidas. A maior dosagem aplicada de hipoclorito de sódio foi de 2 mg/L e uma remoção de 98% foi obtida após 30 minutos de tempos de contato. No entanto, não há informações no trabalho se essa concentração se tratava de cloro livre ou cloro aplicado e em que tipo de água as microcistinas foram dissolvidas.

Pegerer (2006) *apud* Di Bernardo (2007) utilizou hipoclorito de sódio para testar a remoção de microcistinas dissolvidas, a solução de microcistinas não passou por nenhum processo de purificação antes dos ensaios, porém a solução foi diluída em água Milli-Q, com o intuito de evitar a interferência de matéria orgânica proveniente de outras fontes que não a da solução contendo microcistinas. As concentrações iniciais foram da ordem de 100 µg/L e os valores de pH mantidos próximos à neutralidade. Os resultados mostram que após 30 minutos de contato utilizando uma dosagem de 1,6 mg/L de cloro foi atingida uma remoção de 79%. Aumentando a dosagem de cloro para 3 mg/L, aos 20 minutos de tempo de contato a remoção atingida foi de aproximadamente 90% e não houve mudança neste valor até completar os 30 minutos. Com 5 mg/L de cloro nos 10 primeiros minutos a remoção foi de aproximadamente 94% e ao final dos 30 minutos de contato atingiu os 96% de remoção de microcistinas. Assim, foi constatado que a eficiência de remoção aumentou com um incremento da concentração empregada, porém, na maioria dos casos este aumento não foi diretamente proporcional à dosagem.

A efetividade da remoção de hepatotoxinas pelo cloro registrada nos trabalhos mais recentes é contrária aos resultados reportados por Keijola *et al.*, (1988) e Himberg *et al.*, (1989). Comparando estudos mais recentes com os desenvolvidos por esses autores, pode-se concluir que concentrações insuficientes foram usadas nestes ensaios e que ainda, o cloro utilizado pode ter sido consumido por material orgânico presente na água.

Nos ensaios de Acero *et al.* (2005) à respeito da cinética da reação das microcistinas com cloro, as microcistinas utilizadas foram do tipo microcistina-LR, microcistina-RR e passaram por processo de purificação antes dos ensaios. Os autores relatam que a meia vida das microcistinas foi de apenas alguns minutos com valor de pH 6 e de horas, com valor de pH acima de 8. Sendo assim, os autores reforçam a conclusão de que na oxidação com cloro, para garantir uma remoção efetiva, o pH deve ser mantido sob condições neutras ou ligeiramente ácidas.

Ainda segundo Acero *et al.* (2005), a degradação de microcistinas por cloração não resultou em aumento de incidência de câncer em camundongos geneticamente predispostos aos efeitos de substâncias carcinogênicas, portanto, a cloração das microcistinas avaliadas parece não promover a formação de produtos nocivos.

A tabela 3.4 mostra uma visão geral das condições e resultados obtidos nos ensaios realizados com microcistinas dissolvidas após a aplicação de cloro.

Tabela 3.4 – Condições e resultados obtidos nos experimento com microcistinas dissolvidas e aplicação de cloro.

artigo	microcistinas	diluição	conc. inicial (µg/L)	cloro	dosagem de cloro (mg/L)	pH	tempo de contato (min)	remoção (%)
Nicholson <i>et al.</i> (1994)	extraídas de células liofilizadas*	água destilada	130 a 330	hipoclorito de sódio*	1	-	30	40
					5	-	30	80
Hart <i>et al.</i> (1998)	MC-LR dissolvidas*	água após tratamento	~7	hipoclorito de sódio*	1,7	5	30	93
						7	30	0
Newcombe e Nicholson (2004)	Extratos de células liofilizadas contendo MC-LR e MC-LA	-	192	hipoclorito de sódio*	2	<8	30	98
Pegorer (2006) <i>apud</i> Di Bernardo <i>et al.</i> (2007)	microcistinas sem purificação	água deionizada	100	hipoclorito de sódio*	1,6	~7	30	79
					3			90
					5			96

(\*) não foi informado se houve processo de purificação das microcistinas previamente aos ensaios e se as dosagens de cloro se referem à dosagem de cloro livre.

Os tipos de análogos de microcistinas presentes na amostra a ser oxidada também pode influenciar no resultado da oxidação. Com o intuito de avaliar esta influência, Ho *et al.* (2006) avaliou o comportamento de quatro tipos de análogos de microcistinas purificadas (MC-LA, MC-LR, MC-RR, MC-YR) em dois tipos de água tratadas e em água deionizada submetidas ao processo de oxidação com o uso de cloro. Na comparação entre dois tipos de microcistinas (MC-LR e MC-LA) em água deionizada não houve muita diferença na

remoção, com apenas uma pequena diferença para a microcistina-LA, que em todos os ensaios foi a de mais difícil remoção. Em todas as águas de estudo, uma dose de 1,5 mg/L de cloro com tempo de contato de 30 minutos foi suficiente para oxidar 90% das microcistinas. No entanto, quando as microcistinas estavam presentes em águas de duas estações de tratamento diferentes, as remoções obtidas foram diferentes tanto para um mesmo tipo de microcistina em águas diferentes quanto para diferentes tipos de microcistinas no mesmo tipo de água. Por isso, os autores ressaltam a importância de conhecer os análogos de microcistinas presentes na água de interesse, pois cada análogo pode oxidar em graus diferentes, dependendo das interações com os materiais presentes no meio.

Estudos sobre a cinética da oxidação com uso de permanganato foram realizados com três análogos de microcistinas: microcistina-LR, microcistina-RR e microcistina-YR. Os resultados mostraram uma diferença no comportamento de cada um destes análogos, sendo a MC-RR a de mais rápida oxidação seguida da MC-YR e finalmente a MC-LR (Rodríguez *et al.*, 2007).

Quando o oxidante é aplicado antes da remoção das células de algas e cianobactérias tóxicas no sistema de tratamento, é possível que o oxidante seja consumido nas reações com estes organismos, causando a lise das células e a conseqüente liberação da toxina. Sob essas circunstâncias, há o risco de que a concentração aplicada do oxidante não seja suficiente para posteriormente oxidar as toxinas liberadas. Por essa razão, a pré-oxidação deve ser avaliada com muita cautela.

Newcombe e Nicholson (2004) utilizaram 10 mg/L de cloro para oxidar uma cultura de *Microcystis aeruginosa*, com um tempo de contato de 30 minutos e obtiveram uma redução de 46 µg/L para menos de 1µg/L, ou seja, 98% de redução. Para células vivas de *Nodularina spumigena*, as nodularinas foram reduzidas de uma concentração de 440 µg/L para menos de 1µg/L em 30 minutos, a dosagem de cloro utilizada não foi relatada, apenas foi dito que houve um residual de cloro de 0,5 mg/L. Os bons resultados foram atribuídos ao fato do cloro provocar a lise das células vivas, liberando suas toxinas, que rapidamente reagiram com o oxidante.



Nicholson *et al.* (1994) avaliou a oxidação de extratos de microcistinas utilizando monoclóroamina a uma concentração de 20 mg/L não apresentou efeito significativo na remoção das toxinas após um tempo de contato de 5 dias. Com isso, os autores concluíram que o uso de cloroaminas na remoção de toxinas de algas não tem nenhum benefício, pois seu poder de oxidação é muito inferior ao poder de oxidação do cloro, o que é consistente com a química desses compostos.

Os ensaios realizados por Hart *et al.* (1998), incluíram a aplicação de dióxido de cloro em águas tratadas contaminadas com concentrações de aproximadamente 6 µg/L de microcistina-LR. Os resultados mostraram remoções de MC-LR, mas as doses requeridas para atingir a redução da concentração da toxina eram maiores do que 6 mg/L. Entretanto os autores alertam que esta dose não é recomendada por causa da possibilidade de formação de clorito e clorato, subprodutos considerados tóxicos.

Em se tratando da oxidação com a utilização de ozônio como agente oxidante, os resultados obtidos por Keijola *et al.* (1988), Hart *et al.* (1998) e Rositano *et al.* (2001) demonstram a efetividade deste oxidante na destruição de microcistinas, nodularinas e anatoxina-a, tanto intra quanto extra celular.

Nos estudos de Hart *et al.* (1998), foram realizados ensaios de oxidação utilizando microcistinas dissolvidas. Para a realização dos ensaios utilizou-se água bruta retirada de mananciais e água tratada. Os resultados obtidos mostraram que apenas o ozônio e o permanganato de potássio foram efetivos na remoção de microcistinas dissolvidas na água bruta, porém, segundo os autores, uma dosagem impraticável de 10 mg/L de permanganato de potássio foi requerida para obter uma remoção de 50% de concentração de toxinas. Já no caso dos ensaios realizados com microcistinas dissolvidas na água tratada, utilizando uma dosagem de apenas 2 mg/L, tanto para ozônio quanto para permanganato as concentrações de microcistinas foram reduzidas em 90%. O peróxido de hidrogênio não levou a resultados satisfatórios na oxidação das cianotoxinas. Cabe dizer que as concentrações de microcistinas dissolvidas iniciais foram de aproximadamente 6 µg/L. Vale ressaltar que, os valores de pH dos ensaios não foram fornecido pelos autores.

Na pesquisa desenvolvida por Yoo *et al.* (1995) também são apresentados resultados de ensaios com a utilização de diferentes oxidantes. O autor relata que com a utilização de 1 mg/L de permanganato de potássio, em uma concentração de microcistina-LR de 200µg/L

foi possível atingir uma remoção de 95%, em 30 minutos e com o aumento da dose aplicada foi possível remover toda concentração de microcistina-LR presente. Já com o uso de peróxido de hidrogênio em concentrações próximas de 20 mg/L e tempo de contato maior do que 60 minutos levou a resultados não significativos. Dessa forma, os autores contradizem os resultados obtidos por Hart *et al.* (1998), porém, a comparação consistente dos dados é complicada, pois não há nenhuma informação a respeito dos valores de pH utilizados nos ensaios e nem sobre a água em que as microcistinas foram diluídas.

No estudo da degradação da cilindrospermopsina com a utilização de cloro realizado por Senogles *et al.* (2000), foi encontrada uma menor remoção em valores de pH abaixo de 6. Aplicando-se uma dosagem de 3 mg/L de cloro livre em pH 6, houve uma remoção de 95%. Já com a aplicação da mesma dosagem e com valor de pH 5, a remoção caiu para 60% e com valor de pH 4 para 15%. No entanto, com o aumento da dosagem para 5 mg/L e valor de pH 5, pequenas concentrações da toxina foram detectadas. Diferentemente dos resultados obtidos para microcistinas, os melhores resultados para cilindrospermopsina foram obtidos em valores de pH acima de 6. Entretanto, ao avaliar os resultados de cloro residual em ensaios feitos com a mesma concentração de cloro e toxina, notou-se que em valores de pH acima de 7 houve um aumento no valor de cloro residual. Portanto, a dissociação dos íons de cloro não explica completamente o fato de a remoção ser limitada em valores de pH baixos. Os autores relataram que esse resultado pode ter sido devido ao fato da molécula de cilindrospermopsina ser mais estável em valores de pH baixos e assim seria necessário um aumento na concentração de cloro aplicada para que haja a degradação pretendida.

No caso das saxitoxinas, existem poucos estudos a respeito do seu comportamento na presença de oxidantes químicos, alguns trabalhos relatam ensaios com diversos tipos de tratamento para saxitoxinas e entre eles incluem o cloro, porém sem muito aprofundamento no assunto.

Melo Filho (2006) investigou a ozonização como método alternativo de pré ou pós-tratamento para a filtração direta descendente na remoção de cianobactérias e saxitoxinas. As dosagens de ozônio aplicadas foram de 2,0 mgO<sub>3</sub>/L e 4,5 mgO<sub>3</sub>/L para o tratamento aplicando a ozonização como pré-tratamento e na pós-ozonização as dosagens de ozônio aplicadas foram de 1,0 mgO<sub>3</sub>/L e 6,0 mgO<sub>3</sub>/L. Em relação à remoção de cianobactérias, o

melhor desempenho foi obtido com a pré-ozonização seguida de filtração direta descendente, atingindo uma taxa média de remoção de 99,6 %, reduzindo de uma concentração inicial de aproximadamente 1.300.000 cel/mL para 4700 cel/mL. À respeito da avaliação das saxitoxinas, a concentração destas toxinas presente na água de estudo obtida da Lagoa do Peri durante os experimentos era de aproximadamente 3,2 µg/L, uma concentração muito baixa, considerando o limite de detecção do equipamento de cromatografia líquida utilizado nas análises de saxitoxinas. Isto prejudicou a avaliação da eficácia da pré e pós-ozonização em composição com a filtração direta descendente. Mesmo assim, o autor concluiu que a pré-ozonização foi mais eficiente na remoção das saxitoxinas quando comparada com a pós-ozonização, sendo produzida uma água com concentrações de 0,02 µg/L eq. STX/L após o tratamento combinado da filtração direta descendente e a pré-ozonização

Newcombe e Nicholson (2002) realizaram ensaios para estudar a remoção de saxitoxinas por diferentes alternativas, entre elas, a cloração. Os autores observaram que a destruição das saxitoxinas com o uso do cloro também foi dependente do pH e da variante de saxitoxina. A ordem de facilidade de remoção foi STX>GTX3~C2>C1>GTX2. Entretanto, diferentemente da microcistina, a maior remoção foi conseguida com valor de pH 9, com um residual de 0,5 mg/L de cloro livre depois de 30 min de contato. A remoção como função do pH não foi linear, com o grau de remoção aumentando significativamente com pH em torno de 7,5. Esta remoção mais eficiente com pH elevado foi inesperada, já que o cloro nestas condições tem seu poder de oxidação reduzido. Entretanto, esse resultado pode ser devido ao fato de que, em valores de pH mais altos, as moléculas das toxinas se encontram na forma desprotonada, mais suscetível à oxidação. Bioensaios de toxicidade indicaram que a toxicidade foi removida pela cloração, o que sugere que os produtos formados durante os ensaios foram relativamente inócuos.

No trabalho de Nicholson *et al.* (2003), cianobactérias do gênero *A. circinalis* que produzem as variáveis de saxitoxinas, C1 e C2, GTX2 e 3 e STX e em quantidades menores produzem a GTX5 e dcSTX foram realizados ensaios de oxidação utilizando hipoclorito de sódio e cloro gasoso como oxidantes. As dosagens utilizadas nos ensaios foram de aproximadamente 17 mg/L, o necessário para produzir um residual de 0,5 mg/L de cloro após 30 minutos de tempo de contato. As toxinas sofreram um aumento de

remoção com o incremento do pH, porém esse aumento foi menor quando o pH variou de 5 a 7 do que quando houve a variação de 7 para 9.

Os ensaios foram feitos com material semi-purificado onde foi utilizada a oxidação pós-coluna nas análises e com material livre de células onde foi utilizada a oxidação pré-coluna, os resultados de remoção obtidos para os dois casos foram comparáveis. Por exemplo, para um pH 8,1, a degradação da STX no material semi-purificado, onde foi usada a oxidação pós-coluna foi de 89% e a degradação da STX no material livre de células utilizando oxidação pré-coluna foi de 85%.

A degradação das dcSTX e GTX5 determinadas no material livre de células ocorreu da seguinte maneira: com pH 7,6 houve uma degradação de 93% e 95% respectivamente, e a degradação das STX neste pH foi de 78%. No entanto quando o pH foi aumentado para 9, a degradação das dcSTX e GTX5 não sofreu mudanças significativas, enquanto as STX teve uma degradação de 95%. Isso mostra que as variáveis de saxitoxinas têm comportamentos diferentes durante a oxidação, umas têm mais facilidade de degradação que as outras. Não houve também, diferença nos valores de remoção com relação à fonte de cloro utilizada.

Vale ressaltar que as remoções foram acompanhadas de perda de toxicidade medidas através de bioensaios após os ensaios de oxidação, o que, poderia indicar que não houve transformações e o conseqüente aumento da toxicidade, mas ressaltou-se que essa possibilidade não poderia ser descartada, pois há chances de terem ocorrido transformações durante o processo de concentração das saxitoxinas.

Um fator importante a ser levado em conta no processo de oxidação de cianotoxinas é de que as algas podem ser precursoras na formação de subprodutos, tanto o material contido nas células quanto o material extracelular, inclusive suas toxinas.

No trabalho de Mondardo *et al.* (2006), foi avaliada a pré-oxidação utilizando cloro e ozônio como pré-tratamento da filtração direta descendente seguida de desinfecção com cloro para a avaliação da remoção de fitoplâncton e a formação de trihalometanos em mananciais. As espécies dominantes no período de monitoramento foram *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Pseudanabaena galeata*. Os ensaios realizados com pré-

ozonização quando comparados com os ensaios com pré-cloração, mostram que, para todas as dosagens de ozônio, a concentração de THM, após o tratamento completo (pré-oxidação - coagulação - filtração - desinfecção final com cloro), foi inferior a 40 µg/L. Quando a pré-oxidação e a desinfecção final foram feitas somente com cloro, a concentração de THM aumentou significativamente, mesmo para doses de cloro na ordem de 3,0 a 3,5 mg/L, alcançando valores superiores a 98µg/L. Este estudo mostra a importância do cloro na formação dos trihalometanos.

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 livre 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 água com maior concentração de células. Os resultados obtidos mostram que a capacidade máxima de formação de trihalometanos 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 trihalometanos.

## 4 - METODOLOGIA

### 4.1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Esse trabalho, de caráter experimental, foi desenvolvido em escala de bancada, no Laboratório de Análise de Água - LAA do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da UnB.

Para realização do trabalho foi usado cloro livre como agente oxidante. Foi avaliada a oxidação das variantes de saxitoxinas (neoSTX, dcSXT e STX) e a oxidação das microcistinas, produzidas, respectivamente, a partir de cultivos de *Cylindrospermopsis raciborskii* (cepa T3) e *Microcystis aeruginosa* (cepa NPLJ4), quando em contato com diferentes dosagens do agente oxidante.

### 4.2 - ÁGUA DE ESTUDO

Três tipos de água de estudo foram utilizados nos ensaios:

AE1 – Água deionizada com material obtido a partir da lise do cultivo de *Microcystis aeruginosa*.

AE2 – Água do Lago Paranoá com material obtido a partir da lise do cultivo de *Microcystis aeruginosa*.

AE3 – Água deionizada com material obtido a partir da lise do cultivo de *Cylindrospermopsis raciborskii*.

A utilização de água do Lago Paranoá na água AE2, em comparação com água de estudo AE1, preparada a partir de água destilada, serviu para permitir avaliar a influência da presença de outros compostos orgânicos, inorgânicos e microorganismos na eficiência de oxidação nas diferentes dosagens de oxidante avaliadas.

As concentrações de cianotoxinas presentes nas águas de estudo variaram durante os experimentos, de acordo com as necessidades. Tomou-se como base para início dos ensaios com microcistinas a adoção de um valor produzido a partir de uma densidade de células de cianobactérias da ordem de  $10^6$  cel/mL, o que, no caso dos cultivos de *Microcystis*

*aeruginosa* utilizados, corresponderia, segundo Sá (2004), a aproximadamente 80 µg/L de microcistinas. Com relação às saxitoxinas, tomou-se como base inicial valores de concentração de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX) determinadas por Silva (2005) variando de 40 µg/L a 70 µg/L, produzidos a partir da lise de um cultivo com 10<sup>7</sup> cel/mL da cepa T3 de *Cylindrospermopsis raciborskii*.

A escolha por se trabalhar com concentrações de cianotoxinas equivalentes a lise de o mínimo 10<sup>6</sup> cel/mL foi devido ao fato da Portaria n° 518 do Ministério da Saúde (Brasil, 2004), estabelecer em seu Capítulo 5, artigo 18, inciso 5º que “Sempre que o número de cianobactérias na água do manancial, no ponto de captação, exceder 20.000 células/mL, [...], será exigida a análise semanal de cianotoxinas na água na saída do tratamento e nas entradas das clínicas de hemodiálise e indústrias de injetáveis [...]” e existem relatos na literatura de ocorrência de densidades de cianobactérias iguais ou superiores a 10<sup>6</sup> cel/mL em águas naturais brasileiras (Yunes *et al.*, 2003).

O valor de 10<sup>6</sup> cel/mL considera ainda, a proposta de níveis de alerta para monitoramento e manejo de cianobactérias em reservatórios de abastecimento público mencionada por Azevedo e Brandão (2003), em que concentrações acima de 10<sup>5</sup> cel/mL caracterizam a presença de uma floração tóxica, com risco iminente para a saúde da população, podendo ser necessárias medidas emergenciais como alterar o sistema de tratamento ou implementar um fornecimento emergencial de água.

Vale ressaltar que apesar da possibilidade da formação de subprodutos da cloração a partir das cianotoxinas e do material intracelular liberado após a lise das células de cianobactérias, essa avaliação não foi objeto de estudo do presente trabalho.

#### **4.2.1 - Cultivo de *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa***

Para a realização deste trabalho, foi necessário cultivar células de cepas tóxicas de *Cylindrospermopsis raciborskii* (cepa T3) e *Microcystis aeruginosa* (cepa NPLJ4).

O cultivo das cianobactérias foi unialgal, em meio de cultura ASM-1. A sala de cultivo, instalada no Laboratório de Análise de Água – LAA, era mantida sob condições de máxima assepsia com controle da temperatura (mantida em torno de 24°C), da intensidade

luminosa (em torno de  $40\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e do foto-período (12:12 h). Além disso, dependendo do volume de cultivo, era utilizada aeração contínua para conservar as células em suspensão (Lagos *et al.*, 1999). A concentração e o aspecto das células eram monitorados por meio de observações periódicas utilizando-se de microscópio.

No intuito de aumentar o volume do cultivo, era feita a repicagem do mesmo a cada 15 dias, pois é quando se atinge a fase de crescimento exponencial das células. A proporção utilizada era de uma parte do cultivo de célula na fase exponencial para nove partes de meio de cultivo novo. Na Figura 4.1 é apresentada a sala de cultivo instalada do Laboratório de Análise de Água – LAA.



Figura 4.1 – Sala de cultivo instalada no LAA.

#### 4.2.2 - Produção de solução de cianotoxinas e preparação da água de estudo

Para obtenção das saxitoxinas e microcistinas, as células de *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa* foram submetidas ao processo de gelo/degelo por três vezes consecutivas (Arantes, 2004). Isso promove o rompimento da membrana celular (lise) e, conseqüentemente, a liberação de toxina e de outros compostos intracelulares para o meio líquido. Essa suspensão, com o material lisado, era armazenada no congelador até o momento da preparação da água de estudo.

Para a preparação da água de estudo, o material lisado era submetido à filtração em



membrana de 8  $\mu\text{m}$  de retenção (apenas para saxitoxinas), posteriormente em membrana de microfibras de vidro (retenção de 1  $\mu\text{m}$ ) e finalmente em membrana de éster de celulose (retenção de 0,45  $\mu\text{m}$ ), com o objetivo de remover os fragmentos das células lisadas.

Na Figura 4.2 pode-se observar as membranas de 8  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$  e 0,45  $\mu\text{m}$  respectivamente, após terem sido utilizadas no processo de filtração para a preparação da amostra.

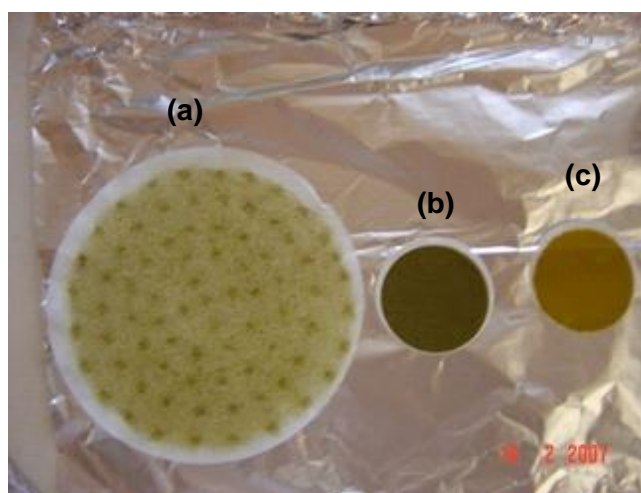


Figura 4.2– Membranas após o processo de filtração da amostra de saxitoxinas (a) filtro com retenção de 8  $\mu\text{m}$  (b) filtro com retenção de 1  $\mu\text{m}$  (c) filtro com retenção de 0,45 $\mu\text{m}$ .

Na Figura 4.3 e 4.4 podem ser vistos exemplos de amostras contendo microcistinas e saxitoxinas, respectivamente, após terem sido filtradas na membrana com retenção de 8  $\mu\text{m}$  (apenas para saxitoxinas), na membrana de microfibras de vidro com 1  $\mu\text{m}$  de retenção e após a filtração na membrana de éster de celulose com retenção de 0,45  $\mu\text{m}$ .

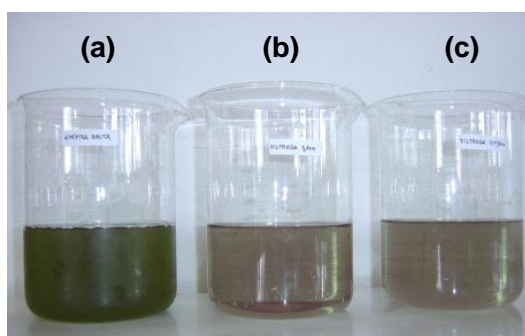


Figura 4.3 – (a) Amostra de material lisado contendo microcistinas, (b) após filtração em membrana de 1  $\mu\text{m}$  de retenção (c) após filtração em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de retenção.

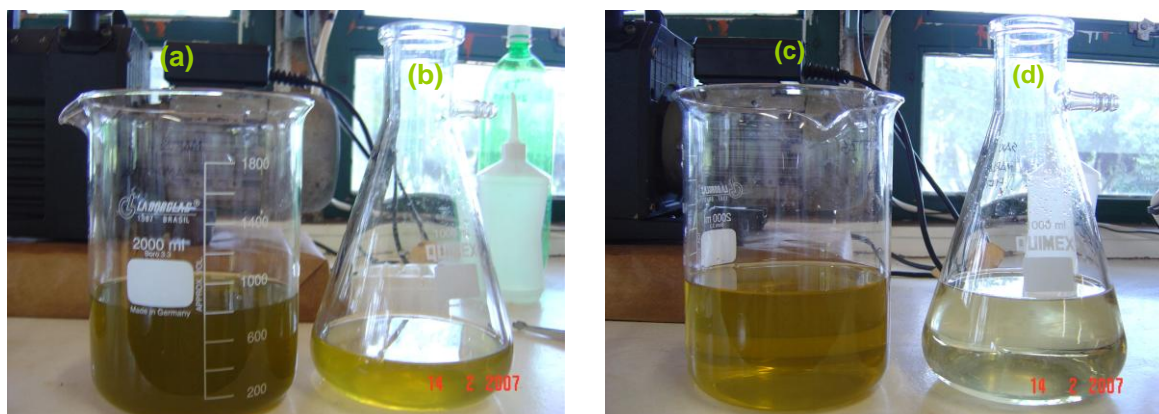


Figura 4.4 – Amostra de (a) material lisado contendo saxitoxinas, (b) após filtração em membrana de 8  $\mu\text{m}$  de retenção (c) após filtração em membrana de 1,0  $\mu\text{m}$  de retenção (d) após filtração em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de retenção

A água de estudo foi preparada a partir da água base (água destilada ou água do Lago Paranoá) inoculada com saxitoxinas extraídas de células *Cylindrospermopsis raciborskii* ou microcistinas extraídas de células *Microcystis aeruginosa*, dependendo da fase experimental a ser realizada. Devido à maneira que se procedia a extração a partir dos cultivos, além das cianotoxinas, a água continha também outros produtos orgânicos de origem intracelular.

A concentração de microcistinas presente no material obtido a partir da lise do cultivo de *Microcystis aeruginosa* era medida e assim, diluída de forma que a concentração final fosse aproximadamente a desejada (80  $\mu\text{g/L}$  ou 30  $\mu\text{g/L}$ ).

No caso das saxitoxinas, a concentração inicial não era conhecida, por este motivo, optou-se por utilizar como água de estudo AE3, uma solução constituída de material lisado e água deionizada na proporção 1:1, ou seja, uma parte de material da lise e uma parte de água deionizada.

#### 4.3 - DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

Os ensaios de oxidação foram realizados utilizando os dispositivos de agitação de um equipamento para testes de jarros e recipientes de vidro (béqueres) de 1000 mL. O

equipamento possui agitadores de aço inox, do tipo paleta de eixo vertical, que medem 25 x 75 mm<sup>2</sup> e fornece um gradiente de velocidade de 10 a 2000 s<sup>-1</sup>.

A agitação de 100 rpm foi utilizada apenas no primeiro minuto de ensaio no intuito de homogeneizar rapidamente o oxidante na amostra.

Nos ensaios foram avaliados o tempo de contato e a influência da concentração de oxidante na eficiência de remoção das toxinas. Além disso, no caso dos ensaios com a água de estudo AE3 foi avaliada a interferência dos compostos presentes naturalmente na água do Lago e ainda, a interferência dos compostos intracelulares presentes na água de estudo AE3, através da medida da absorbância em  $\lambda = 254$  nm.

O hipoclorito de sódio para a realização dos ensaios foi produzido no próprio LAA, através do Gerador Dosador de Solução Oxidante, que produz uma solução de hipoclorito de sódio por meio 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). Vale ressaltar que no presente trabalho as dosagens aplicadas se referem à concentração de cloro livre. Na Figura 4.5 é mostrada a foto do gerador utilizado na produção de cloro para os ensaios. O uso deste gerador no local dos ensaios facilitou os ensaios.



Figura 4.5 – Gerador de cloro.

A solução produzida era caracterizada e, a partir do seu teor de cloro livre, um volume de solução era adicionado à amostra para que a concentração final dosada fosse próxima a desejada. No entanto, durante a realização de ensaios preparatórios para ajuste de

dosagens, observou-se uma grande dificuldade em se obter a dosagem de cloro no valor previamente estabelecido. Isso ocorreu devido ao fato da solução gerada apresentar concentrações de cloro livre muito elevadas, com valores de aproximadamente 2000 mg/L. Para que fosse possível controlar de forma mais precisa a dosagem que estava sendo aplicada à amostra, fez-se uso de um controle de dosagem, composto de água deionizada e volume de solução igual à adicionada na amostra. O valor da concentração de cloro livre medida no controle passou a ser considerada a dosagem adicionada.

A avaliação de uma possível perda ou transformação por degradação natural de toxinas, também foi feita por meio de um controle de toxinas, contendo apenas a toxina e outros produtos da lise celular. Vale salientar que ambos controles eram submetidos às mesmas condições das amostras durante os ensaios.

A Figura 4.6, apresenta as amostras com cianotoxinas e os respectivos controles de dosagem durante o ensaio, ambos submetidos ao mesmo procedimento.

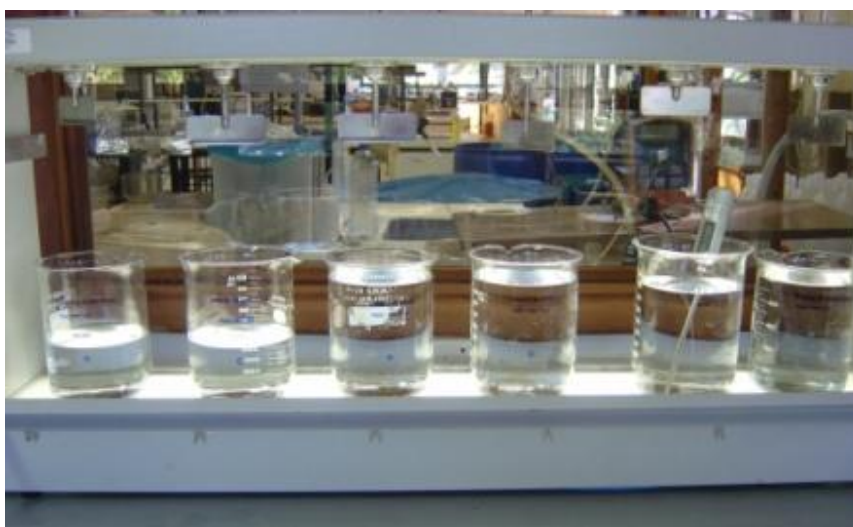


Figura 4.6 – Amostras contendo microcistinas e controles de dosagem durante o ensaio.

Foram feitos ensaios preparatórios para verificar qual a concentração de tiosulfato de sódio seria usada para a descloração da amostra, de maneira a assegurar o total consumo do oxidante e garantir o fim da reação de oxidação nos tempos de contato determinados.

As amostras para análise eram retiradas nos tempos de contato de 10 e 30 minutos. A avaliação do tempo de 30 minutos é de grande importância por ser o tempo de contato mínimo, após a desinfecção, recomendado pela Portaria MS nº 518/2004. As amostras

coletadas foram submetidas às análises de cloro residual, assim como o residual de cianotoxinas.

Cada amostra retirada era dividida em 2 sub-amostras. Numa sub-amostra de 50 mL era realizado, de imediato, a determinação de cloro livre. Na segunda sub-amostra era adicionado 0,5 mL de tiosulfato de sódio na concentração de 1N, para que o oxidante fosse totalmente consumido.

Além do residual de cianotoxinas, foram feitas as verificações de alguns parâmetros para avaliar possíveis influências na eficiência de remoção. Os exames adicionais realizados foram: pH, temperatura e cloro livre e absorvância em  $\lambda = 254$  nm. O fluxograma geral das atividades dos ensaios de oxidação com cloro livre é apresentado na Figura 4.7.

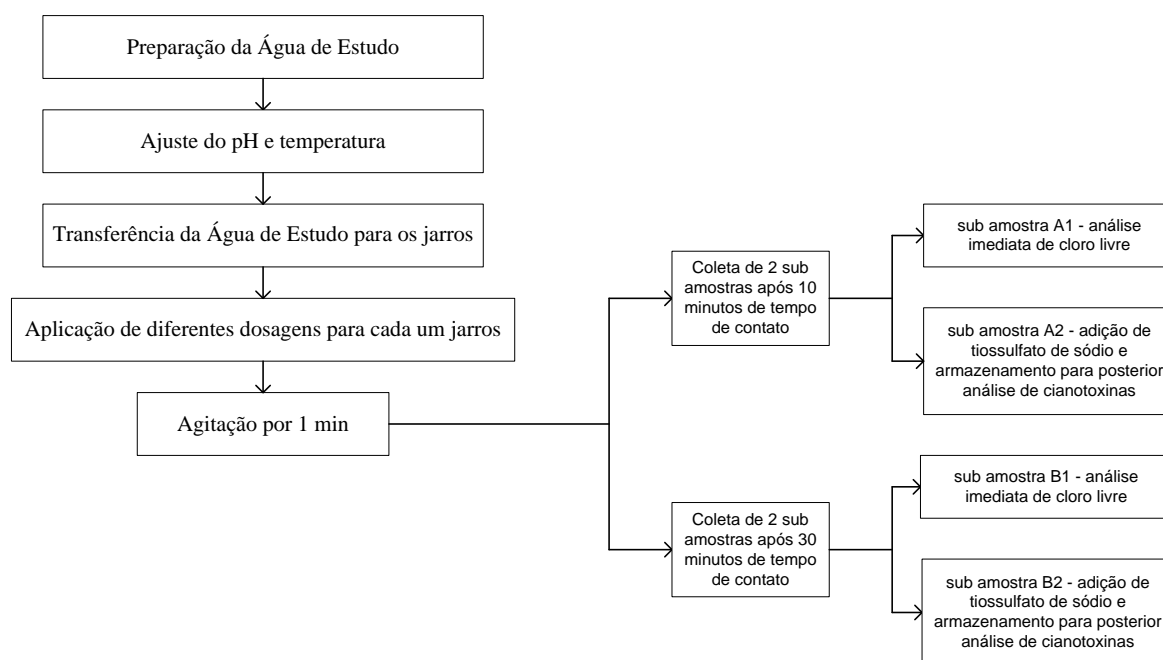


Figura 4.7 – Fluxograma geral de atividades dos ensaios.

As temperaturas do ar e da água foram monitoradas e mantidas constantes, minimizando assim, possíveis interferências dessas variáveis nos resultados dos ensaios. Na Figura 4.8, pode-se observar o dispositivo de monitoramento da temperatura do ar.

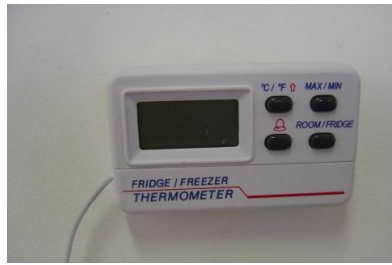


Figura 4.8 – Controle de temperatura do ar.

## 4.4 - ENSAIOS REALIZADOS

### 4.4.1 - Ensaios prévios

Para uma avaliação prévia do comportamento das toxinas na presença de cloro, foi realizado o ensaio de oxidação com a água de estudo AE1, composta de água deionizada inoculada com material da lise do cultivo contendo microcistinas. Os ensaios foram feitos com cinco repetições, para verificação do comportamento das microcistinas na presença de cloro e para que fosse possível fazer ajustes ou modificações nas concentrações tanto da toxina quanto do cloro, caso fosse necessário.

O esquema destes ensaios é exibido a seguir, nas Figuras 4.9 e 4.10 e a configuração dos ensaios desta etapa é mostrada na Figura 4.11.

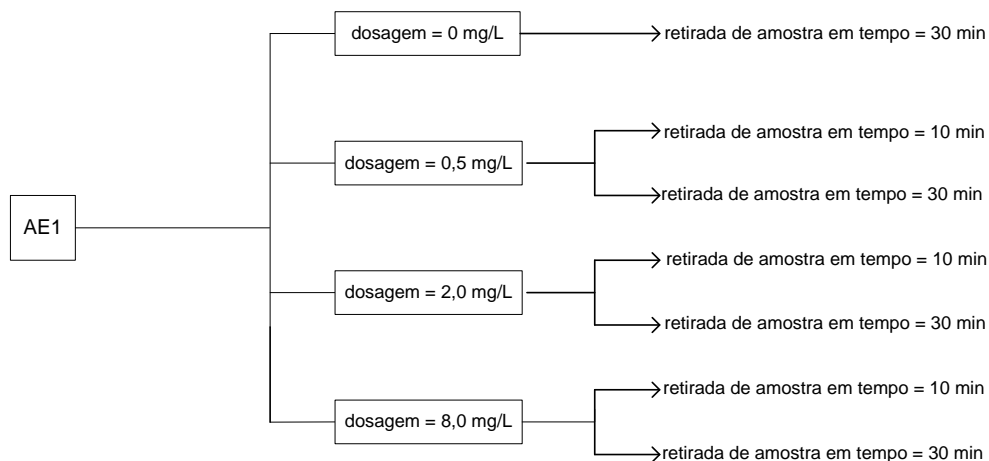


Figura 4.9 - Esquema das amostras submetidas aos ensaios prévios - 5 repetições.

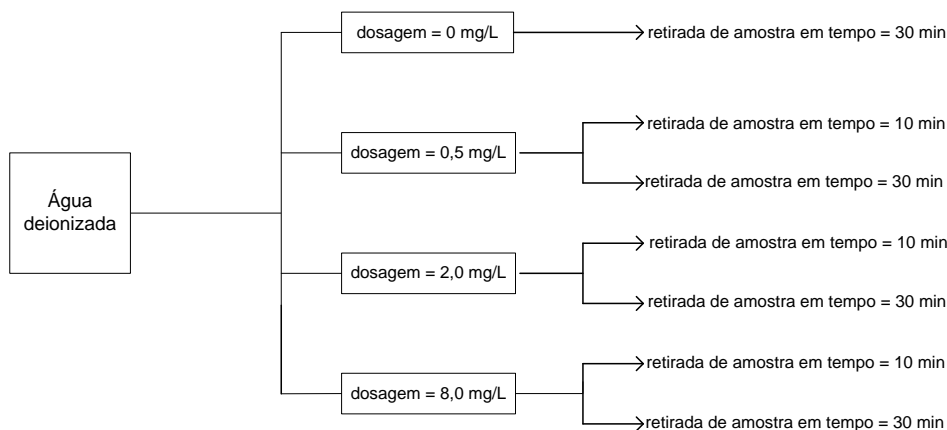


Figura 4.10 - Esquema dos controles de dosagens submetidos aos ensaios prévios paralelamente às amostras - 5 repetições.



Figura 4.11 – Configuração dos ensaios da etapa prévia.

Com base nos estudos realizados por Hart *et al.* (1998), foi adotado pH 5, por este valor ser apontado como o valor de pH que resultou em uma melhor remoção de microcistinas, utilizando hipoclorito de sódio como agente oxidante. As concentrações de cloro livre estabelecidas foram de 0,5, 2 e 8 mg/L.

O valor de 0,5 mg/L foi adotado por ser o residual de cloro livre exigido para garantir a eficiência do processo de oxidação (Nicholson *et al.*, 1994) e, além disso, ser o mínimo que a água deve conter após a desinfecção, segundo a Portaria MS nº 518/2004. A concentração de 2 mg/L foi baseada nos estudos feitos por Hart *et al.* (1998) com hipoclorito de sódio. Finalmente, a concentração de 8 mg/L foi adotada com base no trabalho de Newcombe e Nicholson (2004) em que foi usada uma dosagem de 10 mg/L em células vivas de *Microcystis aeruginosa* e se obteve uma remoção de 98% de microcistinas com um tempo de contato de 30 min. A concentração de microcistinas inicial foi de cerca de 80 µg/L.

#### 4.4.2 - Ensaios com microcistinas

Estas etapas de ensaios consistiram na seguinte configuração:

Etapa 1 : AE1 – cerca de 80  $\mu\text{g/L}$  de microcistinas diluídas em água deionizada, feito em triplicata.

Etapa 2 : AE1 – cerca de 30  $\mu\text{g/L}$  de microcistinas diluídas em água deionizada, feito em triplicata.

Etapa 3 (repetição da configuração da Etapa 2): AE1 – cerca de 30  $\mu\text{g/L}$  de microcistinas diluídas em água deionizada, feito em duplicata.

É importante lembrar que juntamente com as microcistinas adicionadas à água base, eram adicionados outros compostos intracelulares liberados para a solução no processo de lise descrito no Item 4.2.2.

A partir dos resultados dos ensaios prévios, optou-se por aumentar o número de dosagens de cloro aplicadas, incluindo dosagens intermediárias às adotadas na etapa prévia. Portanto, nesta etapa as dosagens de cloro adotadas foram 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 2,0 mg/L, 4,0 mg/L e 8,0 mg/L e os ensaios foram feitos em triplicata.

Nesta etapa, e também nas seguintes, apenas uma dosagem era aplicada por ensaio, já em triplicata e os controles de dosagem seguiram o mesmo esquema. Nas Figuras 4.12 e 4.13 são apresentados os esquemas dessa etapa de ensaios e na Figura 4.14 a configuração dos ensaios.

A modificação no esquema de ensaios se fez necessária, pois na etapa prévia, em uma mesma ocasião, aplicavam-se diferentes dosagens, e isso dificultava o procedimento de análise de cloro livre, devido às diferentes diluições que necessitavam ser realizadas, pois o limite superior do aparelho utilizado na análise de cloro era de 2,5 mg/L. Estas diluições precisavam ser definidas e realizadas rapidamente, devido ao tempo de contato entre o cloro e as microcistinas.



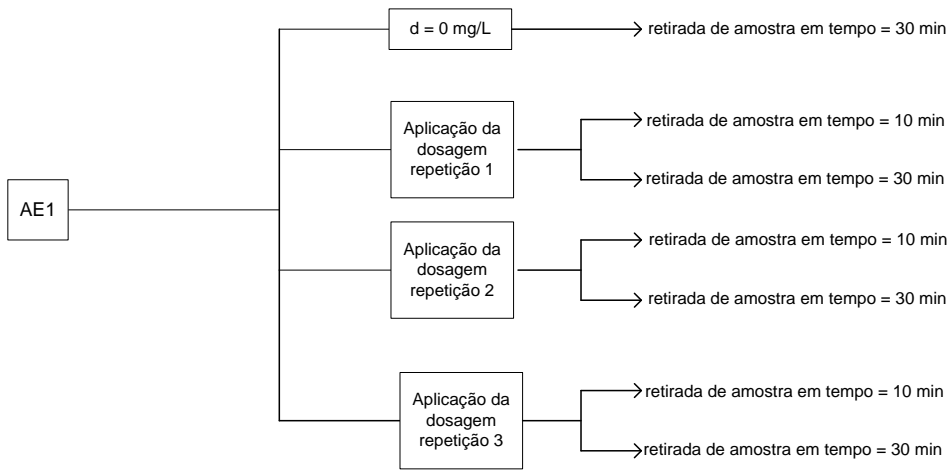


Figura 4.12 – Esquema das amostras submetidas aos ensaios da etapa 1 – 3 repetições.

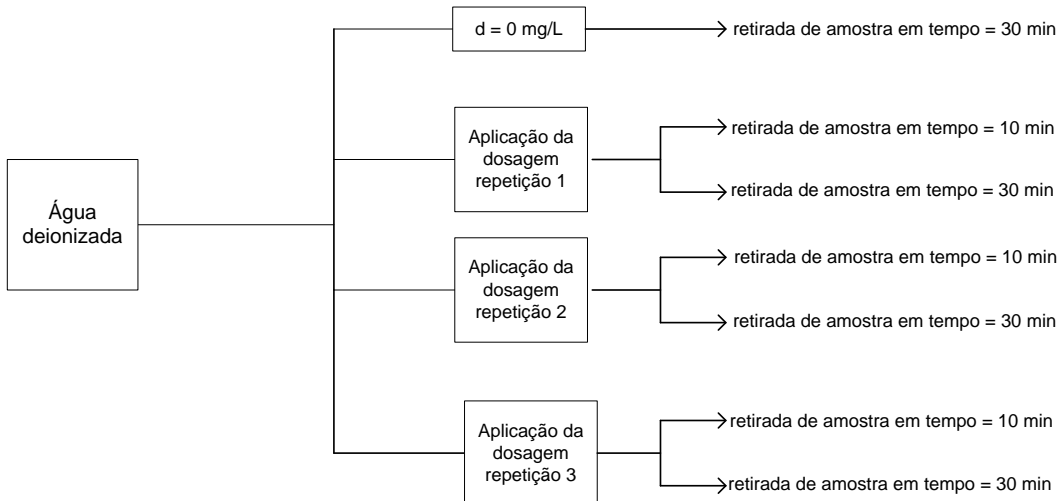


Figura 4.13- Esquema dos controles de dosagens submetidos aos ensaios da etapa 1 paralelamente às amostras – 3 repetições.



Figura 4.14 – Configuração dos ensaios da etapa 1.

#### 4.4.3 - Ensaios com microcistinas e água do Lago Paranoá

Nesta etapa foi prevista a aplicação das mesmas dosagens de cloro da etapa anterior: 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L. A concentração inicial de microcistinas também foi de 30 µg/L. Para o controle da possível interferência de compostos orgânicos na água do Lago Paranoá e também da interferência dos compostos intracelulares liberados a partir da lise do cultivo, foram feitas medidas de absorvância em  $\lambda = 254$  nm nas amostras, a saber:

- solução filtrada do material obtido a partir da lise do cultivo
- água do Lago Paranoá
- controle de água do Lago Paranoá , após a adição das dosagens de cloro, nos tempos de contato 10 e 30 minutos.
- água de estudo AE2
- água de estudo AE2 após a adição das dosagens de cloro, nos tempos de contato 10 e 30 minutos.

Análises de turbidez prévias aos ensaios também foram feitas na água do Lago Paranoá e nas águas de estudo contendo material obtido a partir da lise do cultivo já diluídas em água do Lago para que pudesse ser verificada a interferência dos compostos liberados a partir da lise do cultivo nos ensaios.

É importante ressaltar, portanto, que nesta etapa foram adotados dois controles, um com água do Lago e o outro com água deionizada. O intuito de incluir um controle composto por água do Lago submetido à adição da mesma dosagem de cloro livre foi avaliar a possível demanda deste oxidante por compostos já presentes nesta água.

Os ensaios foram feitos em duplicata de modo a seguir a configuração da Figura 4.15:



Figura 4.15 – Configuração dos ensaios com microcistinas e água do Lago Paranoá.

#### 4.4.4 - Ensaio com saxitoxinas

Os ensaios com saxitoxinas foram realizados com as mesmas dosagens previstas nos ensaios com microcistinas, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L, seguindo o mesmo esquema descrito no item 4.4.2, e os ensaios foram feitos em duplicata.

Os ensaios de oxidação de saxitoxinas com cloro livre foram realizados em duas etapas. Na primeira, os ensaios foram realizados sem o conhecimento prévio da concentração de saxitoxinas (neoSTX, dcSTX e STX), devido ao fato do equipamento de CLAE não estar montado na ocasião dos ensaios, como já mencionado. Tomou-se como base para a preparação da água de estudo valores de concentração de saxitoxinas determinados em estudo anterior (Silva, 2005), variando de 40 µg/L a 70 µg/L, com material produzido a partir da lise de um cultivo com  $10^7$  cel/mL da cepa T3 de *Cylindrospermopsis raciborskii*. Optou-se por utilizar como água de estudo AE3 uma solução de material lisado e filtrado diluído em água deionizada na proporção de 1:1, ou seja, um volume de material lisado e filtrado para um volume de água deionizada.

O valor do pH foi ajustado para 5, pois sabe-se que nesse pH o cloro está presente na forma de ácido hipocloroso (oxidante mais forte). Por outro lado, as saxitoxinas parecem mais suscetíveis à oxidação em pHs maiores do que 7, pois essas toxinas são moléculas com núcleos alcalóides e contém átomos de nitrogênio. Em pHs altos estes átomos estarão na forma desprotonada e aparentemente as moléculas estarão mais suscetíveis à oxidação (Nicholson *et al.*, 2003).

Apesar disso, optou-se por utilizar o mesmo valor de pH utilizado nos ensaios com microcistinas para que fosse possível verificar o comportamento das saxitoxinas nas mesmas condições que as microcistinas e, ainda, levou-se em consideração o fato de que a Portaria MS nº 518 (Brasil, 2004) recomenda que a cloração seja realizada em pH inferior a 8,0 e tempo de contato mínimo de 30 minutos.

Os ensaios com saxitoxinas necessitaram de maiores volumes de cultivo para produção da água de estudo, por serem menos diluídos do que as amostras de microcistinas. Além disso, o material produzido após a lise era mais viscoso do que no caso das microcistinas, fazendo com que o processo de filtração fosse mais difícil do que o usado para

microcistinas, sendo necessário realizar a filtração do material lisado em uma membrana de 8 µg/L previamente à filtração, utilizando as membranas de 1 µg/L e de 0,45 µg/L. Assim, considerando as dificuldades associadas ao trabalho com saxitoxinas, optou-se por alterar o procedimento utilizando uma única água de estudo para a realização dos ensaios com todas as dosagens.

Na segunda etapa, em função dos resultados da primeira etapa, aumentou-se o número de dosagens para que fosse possível verificar o comportamento das saxitoxinas em dosagens maiores do que as adicionadas anteriormente, porém não houve repetição dos ensaios.

#### 4.5 - MÉTODOS ANALÍTICOS

A Tabela 4.1 apresenta resumidamente os parâmetros avaliados, os métodos e os equipamentos empregados durante o desenvolvimento do trabalho.

Tabela 4.1 – Parâmetros avaliados e seus respectivos métodos e equipamentos.

<b>Parâmetro</b>	<b>Método para análise</b>	<b>Equipamento</b>
Cloro livre	Colorimétrico DPD	Espectrofotômetro (HACH/DR-4000)
Absorbância	medida de absorbância em $\lambda = 254\text{nm}$	Espectrofotômetro (HACH/DR-4000)
pH	Potenciométrico	pHmetro ORION/ MODEL 310
Temperatura (°C)		Termômetro digital
Saxitoxinas (µg/L)	Cromatografia Líquida	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com derivatização pós-coluna e detecção de fluorescência (CLAE-DFL)
Microcistinas (µg/L)	ELISA	Kit ELISA Envirologix® e leitora de ELISA BIO-RAD 550
Turbidez (uT)	Nefelométrico	Turbidímetro Nefelométrico(HACH/2100AN)

Os parâmetros avaliados durante os ensaios foram: pH, temperatura, residual de cloro,

turbidez, absorvância em  $\lambda = 254$  nm e detecção de saxitoxinas e microcistinas.

A determinação dos parâmetros cloro livre, pH e temperatura foi realizada empregando-se os métodos recomendados pelo *Standard Methods* (APHA, AWWA, WPCF, 1999).

#### 4.5.1 - Detecção de saxitoxinas

O método utilizado para analisar as saxitoxinas foi o da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As principais características do método são apresentadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Condições adotadas para a análise de saxitoxinas (Arantes, 2004).

Parâmetro	Condição ou descrição
<i>Coluna</i>	Coluna de fase reversa C-18
<i>Fase móvel (para saxitoxinas)</i>	
Vazão	0,8 mL/min
Composição	Heptanosulfonato de sódio (2mM) em 30mM de fosfato de amônia, pH 7,1 e 3% de acetonitrila.
<i>Reagente oxidante</i>	
Vazão	0,4 mL/min
Composição	7mM de ácido periódico em 10mM de tampão fosfato de potássio, pH 11,0
Reação	Tubo de Teflon (10m, 0,5mm d.i) aquecido a 80°C
<i>Acidificante</i>	
Vazão	0,4 mL/min
Composição	Ácido Acético
<i>Detecção</i>	
Excitação	330 nm
Emissão	390 nm

As análises por CLAE foram baseadas na metodologia descrita por Oshima (1995), com modificação da coluna cromatográfica adotada (Arantes, 2004). No método empregado foi utilizada a coluna C-18 ao invés da C-8, conforme proposto por Oshima (1995), pelo fato

da coluna C-18, ter demonstrado uma maior capacidade de separação das frações cromatográficas, quando testes foram realizados no Laboratório de Toxinologia/UnB para análise de saxitoxinas produzidas a partir da cepa T3 de *Cylindrospermopsis raciborskii* (Arantes, 2004).

O sistema para análise de saxitoxinas consistia de uma bomba de alimentação da fase móvel (Shimadzu LC-20AT); um injetor de amostra com *loop* de 20 $\mu$ L; uma coluna de fase reversa (Fusion-RP 80A, C-18, 150 x 4,6 mm, 4 micron - 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-20<sup>a</sup>) e um detector de fluorescência (Shimadzu RF-551).

Para realização da análise, injetava-se um volume de 20  $\mu$ L de amostra, previamente filtrada em filtro de nylon com 0,22  $\mu$ m de abertura (Filtro Millex), no equipamento de CLAE. A amostra era conduzida até a coluna por meio da fase móvel. As substâncias que constituem a fase móvel, que são apresentadas na Tabela 4.2, permitiam que as saxitoxinas e compostos interferentes adsorvessem na coluna, promovendo a separação desses compostos em um dado tempo de retenção, o que permitiu sua posterior detecção.

A amostra após passar pela coluna recebia continuamente solução de ácido periódico em solução tampão de fosfato de potássio e durante a passagem pelo tubo de Teflon era oxidada, formando produtos que apresentam fluorescência, o que permitiu a detecção das saxitoxinas no fluorímetro. Porém, antes de chegar ao fluorímetro, a amostra era acidificada com ácido acético. Por meio de um computador acoplado ao aparelho de CLAE, obtinha-se uma curva (cromatograma), cuja área abaixo da curva fornecia a concentração das saxitoxinas presentes na amostra. Na Figura 4.16 são exibidos o equipamento de CLAE-FLD e o computador utilizados na realização das análises de saxitoxinas.



Figura 4.16 – Equipamento de CLAE e computador utilizado nas análises de saxitoxinas.

Para quantificação das saxitoxinas, foi necessária a construção de curvas de calibração, utilizando-se padrões com concentrações conhecidas. Cada uma das concentrações apresenta uma fração cromatográfica no tempo de retenção da qual resulta uma área específica. A partir dos dados obtidos foi construída a curva de calibração.

A identificação da presença da toxina nas amostras foi feita por meio da comparação dos cromatogramas destas com os das toxinas padrões, observando-se o tempo de retenção. A área da fração cromatográfica identificada como sendo cada variante de saxitoxina é então quantificada a partir da curva de calibração específica para a variante.

Devido à dificuldade de detecção de pequenas concentrações de saxitoxinas e para que sejam eliminadas possíveis interferências devido à presença de impurezas nas amostras durante as análises, foi necessário realizar a purificação e concentração destas toxinas. Entretanto os métodos de extração e purificação não estão bem definidos na literatura. Arantes (2004) descreve uma metodologia de extração e concentração de saxitoxinas que utiliza carvão ativado em pó baseada no método desenvolvido por Pires Jr. *et al.* (2002) para purificação de tetrodotoxina, devido à semelhança em alguns aspectos entre estas toxinas e as saxitoxinas e também pela reconhecida efetividade do carvão ativado em pó em adsorver as saxitoxinas.

Para que fosse possível verificar a porcentagem de recuperação de saxitoxinas após a

aplicação do método descrito por Arantes (2004), foram feitos testes com as amostras coletadas nos ensaios em que foram aplicadas dosagens de cloro livre de aproximadamente 8 mg/L, devido ao fato de ser a maior dosagem utilizada nos ensaios e, portanto, esperar-se que, entre as dosagens aplicadas, esta resultaria numa menor concentração de saxitoxinas.

A metodologia utilizada para realizar a purificação e concentração de saxitoxinas foi a descrita por Arantes (2004), com algumas modificações no que se refere a quantidades de carvão e tempo de contato. O carvão ativado em pó utilizado foi da marca Merck para uso analítico.

O procedimento consistia em adicionar 1,0 g ou 2,0 g de carvão ativado em um volume de amostra de 250 mL e deixar sob agitação por 10 minutos e, após isso, o material era filtrado em um filtro contendo uma camada de 1,5 g de celite diluída em água que fazia o papel de membrana de filtração. A Tabela 4.3 mostra as modificações adotadas com relação à metodologia adotada anteriormente por Arantes (2004).

Tabela 4.3 – Modificações feitas com relação à metodologia descrita por Arantes (2004) para os testes de extração.

<b>Metodologia</b>	<b>Tempo de contato com carvão (min)</b>	<b>Massa de celite (g)</b>	<b>Massa de carvão (g)</b>	<b>Tempo de contato com solução eluente (min)</b>
<b>Arantes (2004)</b>	5	1,0	1,0	5
<b>Arantes (2004) com modificações</b>	10	1,5	1,0 ou 2,0	15

Para eluir a toxina adsorvida no carvão, utilizou-se uma solução de etanol 20% contendo 1% de ácido acético. O tempo de contato entre a solução eluente e o carvão foi de 15 minutos. O eluído era evaporado por meio de um rotoevaporador em circulação de água fria no condensador, acoplado a um banho-maria a 60°C e submetido à pressão negativa através de uma bomba a vácuo.

O resíduo completamente seco era ressuspendido em 2,5 mL de água deionizada. Após o procedimento, a concentração de saxitoxinas era cerca de 100 vezes a concentração



original.

Alguns outros testes de extração, utilizando a metodologia descrita anteriormente, foram realizados com o intuito de avaliar o efeito do cloro e do tiosulfato após a extração. Diferentes amostras foram preparadas para esses testes e foram submetidas à extração:

- Cultivo filtrado, diluído na proporção 1:2, com a adição de 4 mg/L de cloro livre e tempo de contato zero, 0,2 mL de tiosulfato de sódio na concentração de 1N.
- Cultivo filtrado, diluído na proporção 1:2, com a adição de 4 mg/L de cloro livre e tempo de contato de 10 minutos, 0,2 mL de tiosulfato de sódio na concentração de 1N.
- Cultivo filtrado, diluído na proporção 1:2, extraído diretamente sem adição de cloro ou tiosulfato.
- Água deionizada, com a adição de 4 mg/L de cloro livre e 0,2 mL de tiosulfato de sódio na concentração de 1N.

#### **4.5.2 - Detecção de microcistinas**

A detecção das microcistinas foi realizada com a utilização do método ELISA ( Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Optou-se por esse método pelo fato do equipamento de CLAE disponível no LAA não ser dotado do detector necessário para realização de análises de microcistinas. Entretanto, é importante dizer que o método ELISA tem como vantagem ser mais sensível que a CLAE, possibilitando a detecção de concentrações muito baixas sem necessidade de concentração das amostras. Além disso, a metodologia para a detecção baseada no ELISA responde a uma variedade de microcistinas, porém possui a desvantagem de não fazer distinção das variantes de microcistina presentes na amostra (Yoo *et al.*,1995). No entanto, essa desvantagem é minimizada neste caso, pelo fato da cepa NPLJ-4 produzir prioritariamente microcistina-LR (Sá, 2004).

O ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) faz uma análise imuno-química da amostra. Constitui-se na identificação de um antígeno por meio de anticorpos específicos fixos ao fundo de uma placa de 96 poços com capacidade para 200 µL cada. Cada poço é incubado com uma amostra contendo o antígeno e com um conjugado composto de antígeno ligado a enzima. O antígeno ligado a enzima e o não ligado (amostra) competem pela ligação com os anticorpos. Após a reação, a placa é lavada e somente os antígenos

com ou sem enzima que se ligaram aos anticorpos permanecem aderidos à placa. O substrato da enzima é adicionado aos poços e ocorre uma reação colorimétrica com a enzima, ou seja, quanto maior a intensidade de cor, menor a concentração de toxina presente na amostra. Os *kits* quantitativos, usados neste trabalho, que são feitos em placas, necessitam de um espectofotômetro específico para leitura da coloração nos poços da placa. Neste trabalho, foi utilizada a leitora de ELISA BIO-RAD 550 com filtro em 450 nm. É importante dizer que eram feitas diluições das amostras que seriam analisadas para que as concentrações se enquadrassem nos limites de detecção do *kit* (0,16 µg/L a 2,5 µg/L). A partir dos valores de intensidade de cor lidos e de uma curva de calibração constituída de padrões de microcistinas, encontram-se as concentrações das amostras submetidas à análise.

## 5 - APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS:

Neste Item são apresentados e discutidos os resultados obtidos nos ensaios de oxidação realizados utilizando as três águas de estudo, AE1, AE2 e AE3, a saber:

- AE 1 – água deionizada e material produzido a partir da lise de cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa*.
- AE 2 – água do Lago e material produzido a partir da lise de cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa*.
- AE 3 – água deionizada e material produzido a partir da lise de cepa tóxica de *Cylindrospermopsis raciborskii*.

Para cada tipo de AE, foi avaliada a influência do tempo de contato (10 minutos e 30 minutos) e da concentração de oxidante, hipoclorito de sódio, na eficiência de remoção das toxinas. A tabela 5.1 mostra as condições dos diferentes ensaios realizados.

Tabela 5.1 – Condições dos ensaios realizados.

Ensaio	C <sub>0</sub> microcistinas (µg/L)	Diluição	Dosagens de cloro livre (mg/L)	No de repetições
Etapa prévia (microcistinas)	80	água deionizada	0,9 - 3,4 - 15,9	5
Etapa 1 (microcistinas)	80	água deionizada	0,2 - 1,0 - 1,7 - 4,3 - 11,1	3
Etapa 2 (microcistinas)	30	água deionizada	0,3 - 0,7 - 1,8 - 4,3 - 8,7	3
microcistinas e água do lago	30	água do lago Paranoá	0,4 - 1,0 - 2,0 - 4,0 - 8,9	2
saxitoxinas	não era conhecida	água deionizada	0,6 - 1,2 - 2,2 - 5,3 - 11,6	2
saxitoxinas	não era conhecida	água deionizada	1,9 - 2,4 - 7,9 - 11,3 - 13,6 - 20,5	1

### 5.1 - ENSAIOS PRÉVIOS COM ÁGUA DEIONIZADA E MICROCISTINAS

Os ensaios prévios consistiram em 5 repetições de 3 dosagens e os resultados apresentaram alguma dispersão, pois se tratava de uma etapa prévia, na qual os procedimentos metodológicos ainda estavam sendo ajustados. O valor do pH de todas as etapas foi mantido próximo a 5. Nesta etapa, em particular, os valores de pH variaram de 4,7 a 5, a temperatura do ar variou entre 21°C e 22°C e a temperatura da água variou entre 22°C e 25°C.

Como pode ser observado na Figura 5.1, as dosagens de cloro efetivamente aplicadas dificilmente eram iguais às originalmente previstas na metodologia (2 mg/L, 5 mg/L e 8 mg/L) devido à erros provenientes da necessidade de se fazer sucessivas diluições da solução de hipoclorito de sódio para se obter as dosagens de estudo. Assim, o valor da

concentração de cloro livre adicionado à amostra foi adotado como a média dos valores de cloro medido nos frascos de controle de dosagem nas 5 repetições realizadas, pois dessa maneira, havia um controle dos erros que pudessem acontecer durante o acréscimo de cloro à amostra.

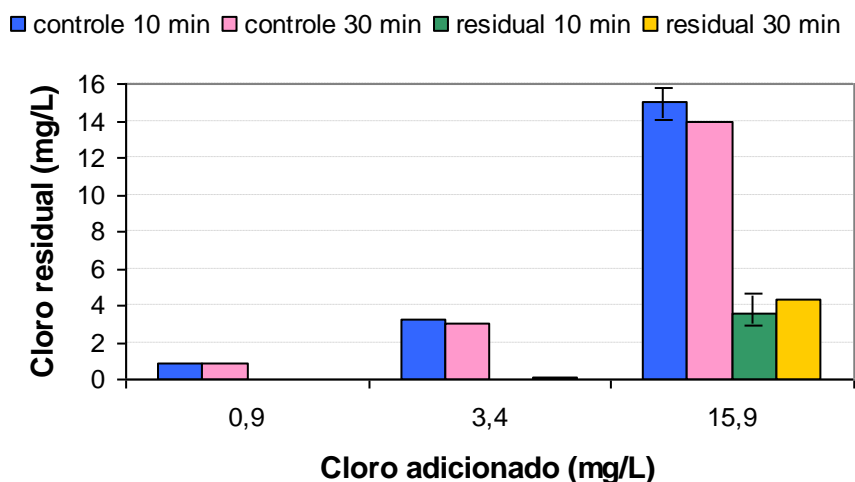


Figura 5.1 – Concentração de cloro livre aplicado e cloro livre residual da etapa prévia.

No momento da determinação das concentrações de cloro residual, foram encontradas algumas dificuldades. Devido ao tempo de contato ser importante na reação, o ideal seria não depender muito tempo para a execução desta análise. No entanto, como eram feitas determinações de várias amostras ao mesmo tempo, e havia a necessidade de diluições para algumas dosagens, pois o limite superior do método usado para a detecção de cloro residual era de 2,5 mg/L, ocorria um atraso. Observou-se, portanto, que, em alguns casos, o tempo de contato, para efeito da determinação de cloro residual, foi maior que o originalmente previsto.

Apesar das possíveis falhas de determinações do cloro residual e microcistinas, há uma tendência de comportamento comum em todas as repetições realizadas. Os resultados dos cinco ensaios realizados na etapa prévia são apresentados no Apêndice A.1. Na Figura 5.1 são apresentados os resultados de cloro residual das amostras de acordo com a dosagem de cloro livre adicionada após os tempos de contato de 10 minutos e 30 minutos e na Figura 5.2, as concentrações de microcistinas obtidas para estas condições. Os valores serão expressos por meio das médias das concentrações obtidas nas repetições e os respectivos

desvios padrões.

De modo geral, ao aplicar-se uma dosagem entre 0,9 mg/L e 3,2 mg/L de cloro livre, ocorria o consumo quase total do cloro. Porém, com a adição de 15 mg/L houve um residual significativo de cloro, chegando a valores maiores do que 4 mg/L.

Os valores de cloro nos frascos de controle de dosagem de cloro nos tempos de contato de 10 e 30 minutos foram próximos em todos os ensaios, indicando que não havia perda de cloro significativa durante os ensaios, de modo que o consumo de cloro observado é atribuído às reações de oxidação entre as microcistinas e outros compostos intracelulares presentes na água de estudo.

Vale ressaltar que foram realizadas algumas medidas aleatórias de cloro total durante os ensaios com o intuito de verificar se havia a formação de cloro combinado após o contato do cloro com a amostra contendo microcistinas e compostos liberados a partir da lise das células. A tabela 5.2 mostra os valores de cloro total obtidos após 30 minutos de tempo de contato.

Tabela 5.2 – Valores de cloro total.

Dosagem de cloro aplicada (mg/L)	Cloro livre (mg/L)	Cloro total (mg/L)
0,16	0,01	0,01
0,7	0,02	0,01
1,5	0,02	0,03
1,92	0,01	0,02
2,1	0,02	0,01
2,1	0,02	0,03
4,8	0,01	0,02
10,4	0,02	0,02

Os valores de cloro livre e cloro total são muito próximos, entretanto, como foram realizadas apenas algumas medidas de controle de cloro total não se pode afirmar que não houve formação de cloro combinado durante os ensaios.

Com relação às microcistinas (Figura 5.2), a concentração inicial foi de aproximadamente 65 µg/L. Ao adicionar uma concentração de cloro livre de 0,9 mg/L, a concentração de microcistinas aumentou de 66 µg/L para valores próximos de 100 µg/L. No entanto, com o incremento da dosagem de cloro livre para valores acima de 3,4 mg/L, com uma

concentração inicial de 66 µg/L, as concentrações diminuíram para 52 µg/L e 29 µg/L, após os tempos de 10 minutos e 30 minutos, respectivamente.

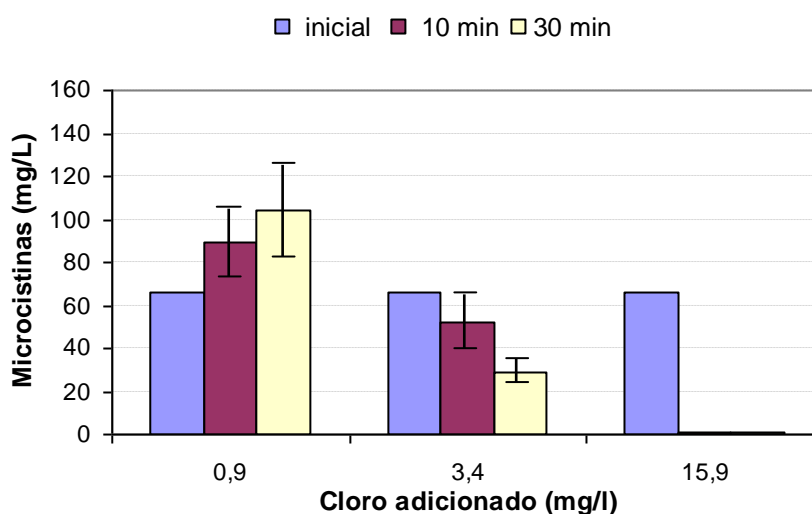


Figura 5.2 – Concentrações iniciais de microcistinas e residuais de microcistinas após tempos de contato 10 e 30 min com diferentes dosagens de cloro livre.

Com o aumento da dosagem aplicada para 15,9 mg/L a remoção atingida foi de aproximadamente 99%. A elevada remoção é consistente com os valores de residuais de cloro livre, pois, para esta dosagem, houve um residual de cloro maior do que 4 mg/L, mostrando que o cloro nessa dosagem foi aplicado em excesso, ou seja, numa quantidade maior do que a demanda pelas microcistinas e os outros compostos intracelulares presentes na água de estudo avaliada.

Na Figura 5.2 chama a atenção o aumento do valor das concentrações de microcistina quando foi adicionada uma baixa concentração de oxidante (média de 0,9 mg/L de cloro livre). A princípio, atribuiu-se esse comportamento a falhas de procedimento na análise de microcistinas. Entretanto, com o desenvolvimento dos vários ensaios verificou-se que o comportamento se reproduzia de forma sistemática, não parecendo falha do analista.

De acordo com Harada *et al.* (1999) o anticorpo M8H5 pode reagir com alguns ésteres monometílicos não tóxicos das microcistinas produzindo um resultado falso positivo. Por analogia, tem-se como hipótese que esse aumento pode ter ocorrido devido à formação de

produtos da oxidação do material intracelular liberado após a lise das células de *Microcystis aeruginosa* ou da própria microcistina e esses produtos podem ter levado à resultados falso-positivos durante a análise, ou seja, valores superestimados de microcistinas quando baixas concentrações de oxidante são usadas.

Devido ao intervalo entre as dosagens de cloro livre ser muito grande, sentiu-se a necessidade de conhecer o comportamento das microcistinas na presença de cloro livre em dosagens intermediárias às adotadas previamente. Então, para as etapas seguintes houve algumas modificações na metodologia dos ensaios que estarão expressas no próximo Item.

## **5.2 - ENSAIOS COM MICROCISTINAS E ÁGUA DEIONIZADA (ÁGUA DE ESTUDO TIPO I)**

### **5.2.1 - Etapa 1**

Nesta etapa, os ensaios foram feitos conforme a metodologia descrita no Item 4.4.2. O número de dosagens aplicadas foi aumentado, tendo como meta os valores de 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L e 8 mg/L. Considerando o número de repetições e de dosagens de cloro, houve a dificuldade de preparar as águas de estudo com mesma concentração inicial de microcistinas para todas as dosagens. Para a realização de todos os ensaios com uma água de estudo com as mesmas características, seria necessário preparar um volume de 60 L (4 L de amostra x 5 dosagens x 3 repetições). Devido à dificuldade de armazenar este volume de amostra de maneira que não houvesse risco de ocorrer degradação, optou-se por preparar a água bruta de trabalho na ocasião de cada ensaio separadamente. Porém, houve também a modificação da metodologia em relação à maneira que as dosagens seriam aplicadas, como está descrito no Item 4.4.2. As dosagens foram acrescentadas à amostra com suas respectivas réplicas numa mesma ocasião, portanto para cada dosagem havia um valor inicial de concentração de microcistinas.

Com base nos resultados dos ensaios prévios em relação aos valores de cloro residual nos controles de dosagem após os tempos de contato 10 e 30 minutos, nesta etapa, só foi feita a leitura de cloro residual para o tempo de contato de 30 minutos e este foi considerado como o valor da concentração de cloro aplicada à amostra. Os valores de pH variaram de 4,8 a 5,1, a temperatura do ar variou entre 21°C e 22°C e a temperatura da água variou

entre 22°C e 25°C.

Na Figura 5.3 estão os resultados de cloro residual para cada dosagem aplicada à amostra para os tempos de contato 10 e 30 minutos. A Figura 5.4 mostra as concentrações residuais de microcistinas em relação às dosagens de cloro livre aplicadas nos tempos de contato 10 e 30 minutos. Os resultados apresentados são valores médios e seus respectivos desvios padrões, os resultados das três repetições desta Etapa são apresentados no Apêndice A.2.

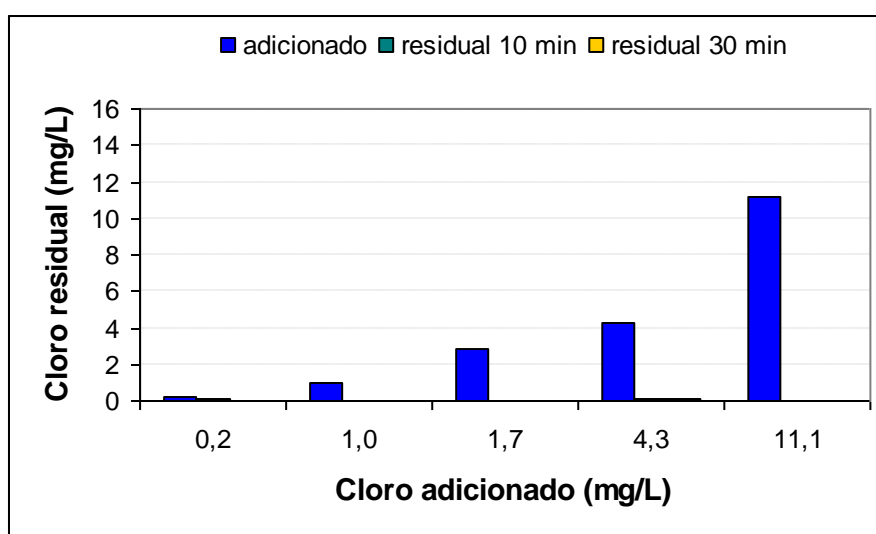


Figura 5.3 – Concentração de cloro livre aplicadas e residuais de cloro após os tempos de contato 10 e 30 minutos.

Nesta etapa de ensaios, o cloro foi quase totalmente consumido em todas as dosagens aplicadas e não houve valor significativo de residual de cloro, nem mesmo na dosagem 11,1 mg/L, a mais alta aplicada. A presença de um residual de cloro poderia indicar que o oxidante está presente em excesso no meio (como ocorreu na dosagem de 15 mg/L na etapa anterior), ou seja, que o cloro aplicado foi suficiente para oxidar toda microcistina e outros compostos orgânicos presentes na amostra.

Com relação às microcistinas, na Figura 5.4 pode-se notar que novamente houve um aumento da concentração de microcistinas entre as dosagens de 0,2 mg/L e 4,3 mg/L de cloro livre aplicadas à amostra, reproduzindo o que ocorreu na etapa prévia de ensaios. E mais uma vez, a concentração dessas toxinas na presença do oxidante tendeu a diminuir a partir de uma dosagem aplicada mais elevada, de 4,3 mg/L de cloro após 30 minutos.



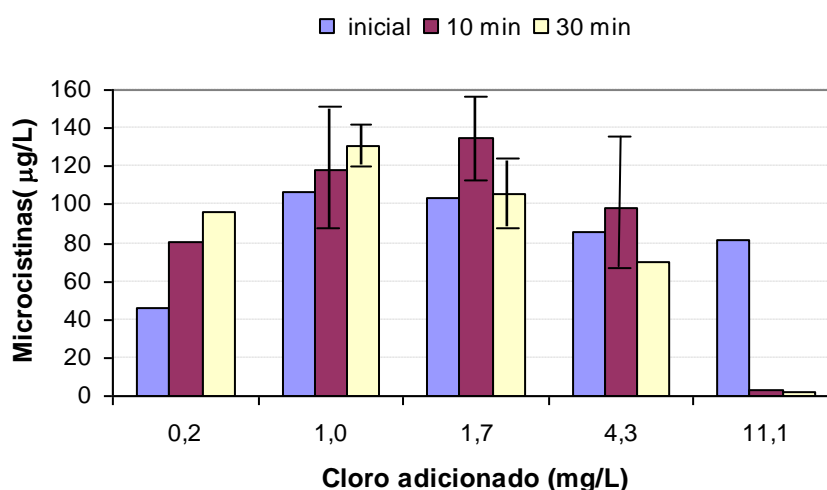


Figura 5.4 – Concentrações iniciais de microcistinas e residuais de microcistinas após tempos de contato 10 e 30 min com diferentes dosagens de cloro livre.

Pegorer (2006), *apud* Di Bernardo *et al.* (2007), realizou ensaios de oxidação com valor de pH próximos à neutralidade e microcistinas sem processo de purificação diluídas em água deionizada. Ao aplicar uma dosagem de 1,6 mg/L de cloro, houve uma remoção de 79% de microcistinas, após 30 minutos, para uma concentração inicial de cerca de 100µg/L. Embora o estudo de Pegorer e o presente trabalho tenham sido realizados em condições similares (material de lise diluído em água deionizada), exceto pelo valor do pH da solução, os resultados não são convergentes. No presente trabalho não se observa remoção quando 1,7 mg/L de cloro são adicionados e há consumo total de cloro, mostrando a influência dos outros compostos intracelulares presentes nas águas de estudo no processo de oxidação. Para avaliar se a diferença pode ser explicada por uma demanda de cloro associada à outros compostos intracelulares, seria necessário saber o comportamento do cloro residual no trabalho de Pegorer.

Ao avaliar as remoções entre os tempos de contato de 10 e 30 minutos, não ocorre um comportamento sistemático, portanto, não foi observado o incremento das remoções ao longo do tempo.

Com a adição de uma dosagem de 11,1 mg/L, a concentração de microcistinas reduziu de um valor inicial de aproximadamente 80 µg/L a valores em torno de 2 µg/L indicando a

eficiência do cloro livre na remoção dessas toxinas.

Hart *et al.* (1998), com concentração de cloro de aproximadamente 1,7 mg/L, próxima a usada por Pegorer (2006) *apud* Di Bernardo *et al.* (2007), e valor de pH 5 obtiveram 93 % de remoção de microcistina-LR após 30 minutos de tempo de contato. No entanto, as concentrações iniciais de microcistinas utilizadas nos ensaios eram muito baixas, em torno de 7 µg/L, o que pode explicar a eficiência de remoção obtida.

Já Nicholson *et al.* (1994), usando hipoclorito de sódio, com concentração de 5 mg/L obtiveram uma remoção de 80% para uma água contendo de 130 a 330 µg/L de microcistinas extraídas de extratos de células liofilizadas, dissolvidas em água destilada. No presente trabalho, a remoção de microcistinas, usando dosagens próximas de 5 mg/L de cloro livre, não excedeu 18% após 30 minutos de tempo de contato. Entretanto, nessa comparação, um fator que deve ser levado em conta é que no trabalho de Nicholson *et al.* (1994) não há informações há respeito de como as microcistinas foram preparadas para os ensaios e se foram submetidas à algum processo de purificação. Esta informação é de extrema importância, pois no presente trabalho não houve nenhum tipo de purificação prévia de microcistinas, ou seja, há uma demanda de cloro pelos outros compostos extracelulares.

A discrepância de valores de eficiência entre os diferentes trabalhos pode estar associada às diferentes condições experimentais adotadas, porém, deve-se levar em conta que as interferências de outros compostos formados durante o processo de oxidação a partir do material liberado da lise cultivo podem estar “mascarando” o resultado.

Considerando-se a ausência de cloro residual na faixa aplicada e a importância dessa informação para uma melhor compreensão dos fenômenos, tomou-se a decisão de realizar novos ensaios com uma menor concentração inicial de microcistinas mantendo a mesma faixa de dosagem anterior.

## **5.2.2 - Etapa 2**

Os ensaios da etapa 2 foram realizados conforme a metodologia descrita no Item 4.4.2. Na etapa 2 os ensaios foram feitos em triplicata e a concentração inicial de microcistinas foi na

faixa de 30 µg/L. Os valores de pH variaram de 4,2 a 5,3, a temperatura do ar variou entre 21°C e 22°C e a temperatura da água variou entre 22 °C e 25 °C.

A Figura 5.5 mostra os valores das dosagens aplicadas e os respectivos valores de cloro residual nos tempos de contato de 10 e 30 minutos. Os residuais de microcistinas equivalentes em cada tempo de contato são apresentados na Figura 5.6. Os resultados apresentados são valores médios e seus respectivos desvios padrões, os resultados das três repetições desta Etapa são apresentados no Apêndice A.3. Novamente verifica-se uma elevada demanda de cloro com presença de residuais somente para a dosagem mais elevada.

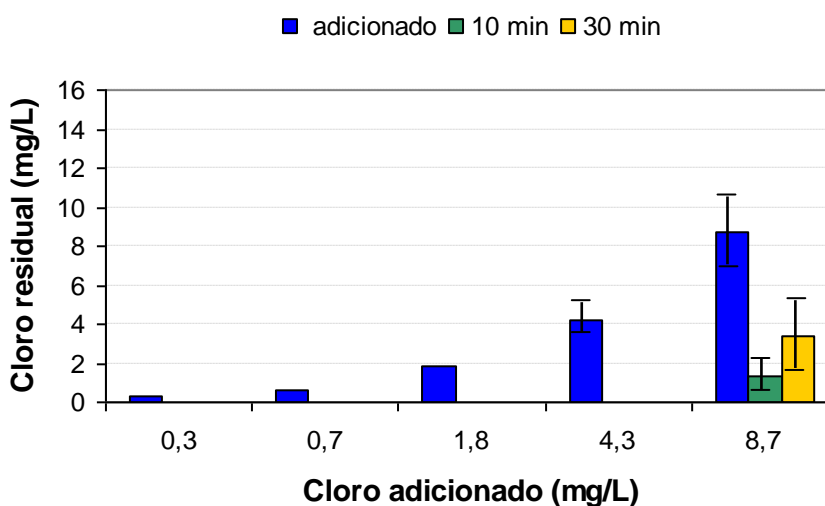


Figura 5.5 – Concentração de cloro livre aplicada e residuais de cloro após os tempos de contato 10 e 30 minutos.

Mais uma vez, como pode ser observado na Figura 5.6, a concentração de microcistinas obtida após a aplicação de dosagens de cloro livre entre 0,3 mg/L e 1,8 mg/L foram superiores às concentrações iniciais de microcistinas.

A degradação de microcistinas é observada com a adição de 4,3 mg/L de cloro livre à amostra. Com a aplicação desta dosagem em uma concentração inicial de 49,3 µg/L de microcistinas, após 10 minutos de tempo de contato, a concentração de microcistinas chegou a valores médios próximos à 22,5 µg/L.

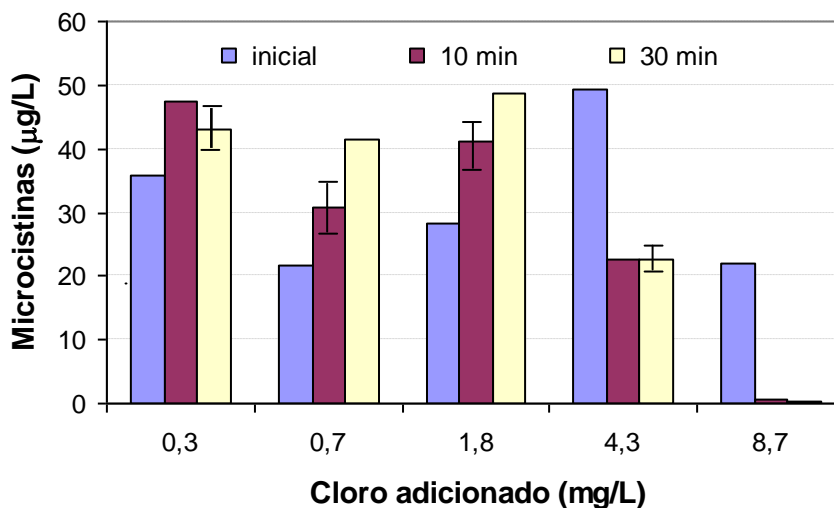


Figura 5.6 – Concentrações iniciais de microcistinas e residuais de microcistinas após tempos de contato 10 e 30 min com diferentes dosagens de cloro livre.

Com relação às remoções obtidas, se os resultados da etapa 1 forem comparados com os resultados da etapa 2, verifica-se que com uma menor concentração inicial de microcistinas e a aplicação das mesmas dosagens de cloro, não há um aumento proporcional na eficiência de remoção. Os resultados e discussões estão explícitos a seguir.

Com a adição de uma dosagem de 4,3 mg/L de cloro livre em uma solução com concentração inicial de 86 µg/L de microcistinas, a concentração de microcistinas foi reduzida a 70 µg/L após 30 minutos. Ao adicionar aproximadamente a mesma dosagem à uma solução com concentração de microcistinas de aproximadamente 50 µg/L, se houvesse uma proporcionalidade, o resultado esperado seria uma concentração próxima a 34 µg/L, no entanto, a concentração de microcistinas obtida a partir dessas condições foi de 23 µg/L.

No trabalho de Pegorer (2006) *apud* Di Bernardo *et al.* (2007) foi observado o aumento da eficiência de remoção com um incremento da concentração de cloro empregada, porém, na maior parte dos casos, o aumento da remoção não foi diretamente proporcional à dosagem. Comportamento similar parece ocorrer no presente trabalho quando se avaliam as

remoções de microcistinas com a adição das mesmas dosagens de cloro livre e com diferentes concentrações iniciais de microcistinas.

Acero *et al.* (2005) analisaram a cinética das reações de cloro com microcistinas e verificaram uma proporcionalidade de remoção para um mesmo CT em  $\text{mgL}^{-1}\text{min}$  (concentração de cloro em  $\text{mg/L}$  x tempo de contato em minutos) aplicado em concentrações iniciais diferentes de microcistinas, fenômeno que não foi observado no presente trabalho. Porém, deve se levar em conta que os ensaios realizados por Acero e colaboradores utilizavam microcistinas purificadas, ou seja, a demanda de cloro por outros compostos era inexistente. No trabalho de Pegorer (2006) *apud* Di Bernardo *et al.* (2007), por sua vez, também realizado com material de lise de células de *M. aeruginosa*, foi observado o aumento da eficiência de remoção com o incremento da concentração de cloro empregada, porém, na maior parte dos casos, o aumento da remoção não foi diretamente proporcional ao aumento de dosagem. Comportamento similar parece ocorrer no presente trabalho quando se avaliam as remoções de microcistinas com a adição das mesmas dosagens de cloro livre e com diferentes concentrações iniciais de microcistinas.

Na análise de dados de oxidação, ou mesmo de outros processos, obtidos a partir de águas preparadas com material da lise de um cultivo de cianobactérias, deve ser observado o efeito de competição que há entre as cianotoxinas e os demais compostos liberados como parte da lise das células. A relação entre a quantidade de cianotoxinas e os demais compostos 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 concentração de microcistinas e dos demais compostos orgânicos seja diferente e, portanto, as demandas de cloro sejam diferentes e estejam influenciando na oxidação das microcistinas. Essa hipótese poderia ser uma explicação para a falta de proporcionalidade encontradas nos estudos de Pegorer (2006) *apud* Di Bernardo *et al.* (2007) e no presente trabalho, quando comparados com o trabalho de Acero *et al.* (2005).

### **5.3 - ENSAIOS COM MICROCISTINAS E ÁGUA DO LAGO PARANOÁ**

Nesta etapa de ensaios, foi avaliado o comportamento das microcistinas em contato com cloro diluídas na água do Lago Paranoá. O intuito de trabalhar com águas naturais é avaliar

a possível interferência de outros compostos orgânicos na oxidação das toxinas. A concentração inicial de microcistinas adotada variou entre 30 µg/L e 40 µg/L e os valores de pH da água foram ajustados para valores próximos de 5. A temperatura do ar variou entre 21°C e 22°C e a temperatura da água variou entre 22 °C e 25 °C. A água do Lago Paranoá era coletada e usada nos ensaios no mesmo dia.

Conforme proposto na metodologia (Item 4.4.3), a turbidez e a absorvância em  $\lambda = 254$  nm foram determinadas na água do Lago Paranoá e na amostra composta por água do Lago Paranoá e material obtido a partir da lise do cultivo. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Turbidez e absorvância da água do Lago Paranoá e água de estudo nos ensaios realizados.

Data	Água do Lago Paranoá		Água de Estudo	
	turbidez (uT)	absorvância (cm <sup>-1</sup> )	turbidez (uT)	absorvância (cm <sup>-1</sup> )
<b>Coleta 1</b>	2,35	0,033	2,42	0,036
<b>Coleta 2</b>	2,02	0,044	2,68	0,048
<b>Coleta 3</b>	2,31	0,034	3,05	0,059

Tanto a turbidez quanto a absorvância em  $\lambda = 254$  nm analisadas nas águas de estudo têm valores superiores aos obtidos para a água do Lago Paranoá, confirmando a presença do material intracelular obtido após a lise do cultivo.

Cabe dizer que, nesta etapa, os ensaios foram feitos em duplicata e os valores exibidos nas figuras serão das médias e desvios padrões equivalentes, quando estes forem significativos e os valores das duas repetições realizadas são apresentados no Apêndice B.

Como foi dito na Metodologia no Item 4.4.3, para o controle da possível interferência de compostos orgânicos presentes naturalmente na água do Lago Paranoá e também da interferência dos compostos intracelulares liberados a partir da lise do cultivo, foram feitas medidas de absorvância em  $\lambda = 254$  nm nas seguintes amostras, a saber:

- solução do material obtido a partir da lise do cultivo após processo de filtração
- água do Lago Paranoá

- controle de água do Lago Paranoá, após a adição das dosagens de cloro, nos tempos de contato 10 e 30 minutos
- água de estudo AE2
- água de estudo AE2 após a adição das dosagens de cloro, nos tempos de contato 10 e 30 minutos

Lembrando que nesta etapa havia dois frascos de controle de dosagem de cloro, um contendo água deionizada e o outro água do Lago Paranoá. A Figura 5.7 apresenta os valores de absorvância em  $\lambda = 254$  nm obtidos.

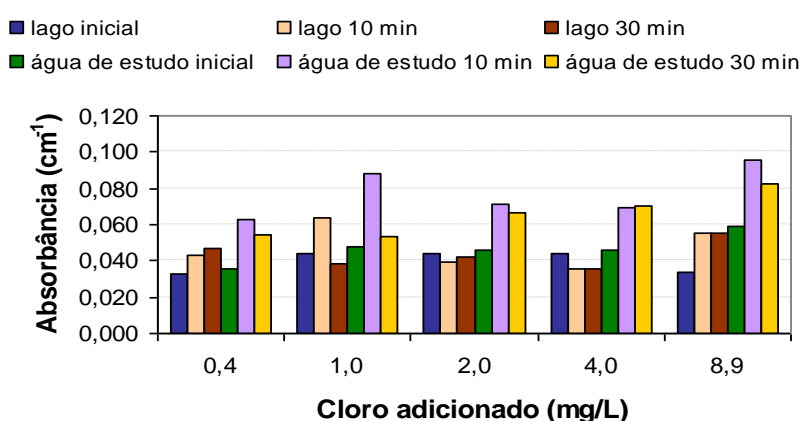


Figura 5.7 – Valores de absorvância na água do Lago Paranoá e na amostras antes e após os tempos de contato com cloro.

Analisando os resultados da Figura 5.7, nota-se que os valores de absorvância em  $\lambda = 254$  nm em todas as amostras têm tendência a aumentar com a adição de cloro após os tempos de contato de 10 e 30 minutos. Uma hipótese é que este aumento pode ter ocorrido devido à formação de subprodutos do cloro que absorvem mais luz ultravioleta do que os originalmente presentes. Os aumentos de absorvância nas águas de estudo são maiores dos que os aumentos obtidos nos valores de absorvância da água do Lago Paranoá, isto também é um indício de que na água de estudo há interferência dos compostos intracelulares liberados a partir da lise do cultivo e das microcistinas nas reações de oxidação. Porém, a hipótese de aumento da absorvância devido à formação de subprodutos do cloro deve ser avaliada com cuidado, pois, segundo Ferreira Filho (2001), com relação à formação de compostos orgânicos halogenados, subprodutos da desinfecção, os resultados de COT e absorvância em  $\lambda = 254$  nm devem ser analisados, preferencialmente, de forma conjunta.

A Figura 5.8 apresenta os valores obtidos nos frascos de controle de água do Lago Paranoá após 10 minutos e 30 minutos, no frasco de controle de água deionizada após o tempo de contato 30 minutos e os valores de cloro residual presentes água de estudo (AE2) após os tempos 10 e 30 minutos. Na Figura 5.9 são apresentados os resultados das concentrações de microcistinas obtidas para estas condições.

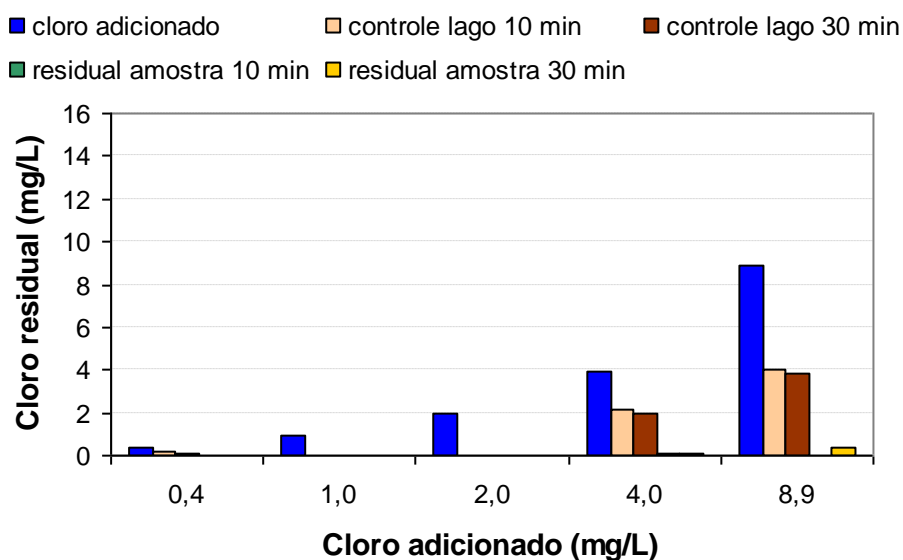


Figura 5.8 – Cloro residual nos controles de água do Lago Paranoá e na água de estudo após os tempos de contato 10 e 30 minutos.

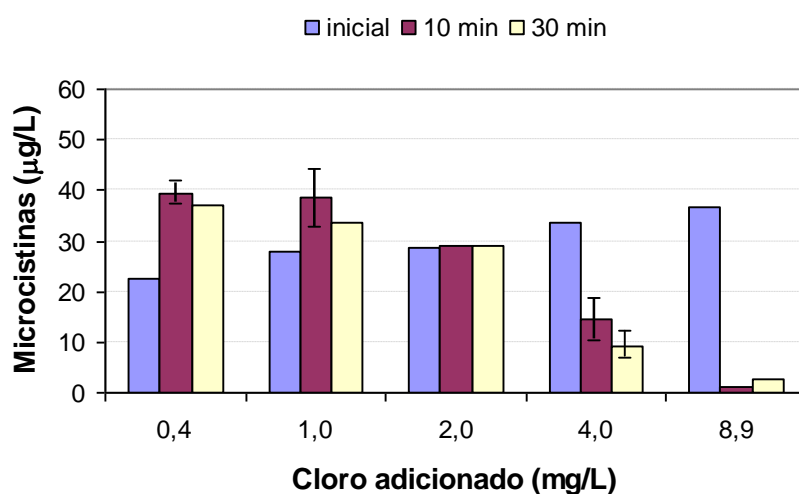


Figura 5.9 – Remoção de microcistinas diluídas em água do Lago, nos tempos de contato de 10 e 30 minutos nas diferentes dosagens aplicadas.



O cloro foi totalmente consumido pela água do Lago Paranoá e pela amostra contendo material obtido a partir da lise do cultivo de *Microcystis aeruginosa* diluído na água do lago, quando as dosagens de cloro livre aplicadas foram 0,4 mg/L, 1 mg/L e 2 mg/L, nos dois tempos de contato. O consumo de cloro pela água do Lago indica a forte presença de compostos orgânicos presentes naturalmente na água do Lago Paranoá que competirão com as microcistinas e os compostos liberados a partir da lise do cultivo nas reações de oxidação.

Para as dosagens mais elevadas, ao comparar os residuais de cloro para uma mesma dosagem aplicada de cloro livre nos controles do Lago e na amostra, pode-se notar que o cloro consumido nas amostras é o dobro ou um pouco mais do que o cloro consumido pela água do lago. Isto indica que nas amostras houve o consumo conjunto tanto dos orgânicos presentes naturalmente na água do Lago Paranoá quanto das microcistinas e compostos intracelulares.

A partir da dosagem aplicada de 4 mg/L, o controle de água do Lago apresentou valor de cloro livre residual de 2 mg/L, o que indica que esta dosagem é mais do que suficiente para realizar a oxidação de todos compostos presentes naturalmente na água do Lago Paranoá. Com a aplicação dessa dosagem houve uma redução na concentração de microcistinas de 33 µg/L para 9 µg/L após 30 minutos, ou seja, uma remoção de 24 µg/L de microcistinas.

No entanto, na etapa 2, onde a água de estudo era composta por material da lise de células de *Microcystis aeruginosa* diluído em água deionizada, com a aplicação de uma dosagem de cloro livre de aproximadamente 4 mg/L, houve a diminuição da concentração de microcistinas de 49 µg/L para 23 µg/L e, portanto, uma remoção de 26 µg/L.

Essa redução de concentração similar observada com e sem a presença de matéria orgânica original da água do Lago Paranoá, sugere que os compostos da lise, incluindo as microcistinas, são oxidados mais facilmente ou mais rapidamente do que os compostos naturalmente presentes na água do Lago Paranoá. Ou seja, na competição pelo cloro, as microcistinas e outros compostos oriundos da lise celular têm vantagem em relação aos compostos orgânicos presentes na água do Lago. Este resultado é importante para a prática do tratamento de água, pois, a depender da qualidade da água a ser tratada, os compostos presentes naturalmente podem não interferir de maneira significativa na oxidação das

microcistinas, no caso em que a adição de cloro tenha como objetivo remover microcistinas.

Com o aumento da dosagem aplicada de cloro livre para 8,9 mg/L, o residual de cloro também aumenta para 4 mg/L. A aplicação desta dosagem nas amostras diluídas com água do Lago Paranoá, resultou na redução da concentração de microcistinas de 37 µg/L para 3 µg/L, ou seja, 34 µg/L de microcistinas foram oxidados. Nos ensaios com a água de estudo contendo água deionizada e material da lise de células de *Microcystis aeruginosa*, com a aplicação de uma dosagem de cloro livre de 8,7 e residual também próximo de 4, a concentração de microcistinas diminuiu de 22 µg/L para 0,4 µg/L.

Ho *et al.* (2006) avaliaram o comportamento de quatro tipos de análogos de microcistinas (MC-LA, MC-LR, MC-RR, MC-YR) em dois tipos de água após o tratamento. Quando as microcistinas estavam presentes em águas de duas estações de tratamento diferentes, as remoções obtidas foram diferentes tanto para um mesmo tipo de microcistina em águas diferentes quanto para diferentes tipos de microcistinas no mesmo tipo de água. Já nos ensaios com água deionizada, não houve diferença significativa no comportamento da remoção. Por isso, foi ressaltada a importância de conhecer os análogos de microcistinas presentes na água de interesse, pois cada análogo pode oxidar em graus diferentes, dependendo das interações com os materiais presentes no meio. Essa observação pode explicar o fato do valor de microcistinas não chegar a zero mesmo na presença de residuais expressivos de cloro.

Nesta etapa de ensaios (ver Figura 5.10), ocorreu, mais uma vez, o aumento das concentrações de microcistinas com a aplicação de dosagens de cloro livre de até 2 mg/L. Como foi dito anteriormente, existe a hipótese de terem ocorrido resultados superestimados no ELISA em baixas concentrações, devido à formação de compostos resultantes da oxidação parcial do material intracelular liberado após a lise das células ou das próprias microcistinas, e esses produtos podem ter reagido com os anticorpos, gerando resultados falsos positivos, promovendo valores superestimados de concentrações de microcistinas durante a análise.

## **5.4 - ENSAIOS COM SAXITOXINAS**

### **5.4.1 - Detecção de saxitoxinas**

#### 5.4.1.1 - Testes de extração

Como foi mencionado no Item 3.4.1, foram realizados testes para verificar a recuperação das concentrações de saxitoxinas nos procedimentos de extração que geralmente precedem as análises por CLAE. Foram avaliados os valores das concentrações das variantes de saxitoxinas de uma amostra bruta injetada diretamente no CLAE e os valores das concentrações das mesmas variantes de saxitoxinas desta mesma amostra, após ser feita a extração pelo método convencional, descrito por Arantes (2004), com algumas modificações descritas no Item 4.4.1.1. Dessa maneira, foi possível verificar os valores da recuperação obtida após o procedimento. Vale ressaltar que este procedimento foi realizado em triplicata.

Foi observado que as amostras e variantes de saxitoxinas possuíam recuperações distintas e essas recuperações não eram constantes quando se utilizavam águas de estudo com características diferentes, o que impossibilitaria a comparação entre dados, pois, para cada valor de concentração obtida haveria um erro diferente embutido, proveniente da extração. Assim, como as amostras que foram injetadas diretamente no CLAE, sem nenhum processo de purificação ou concentração, levaram à formação de cromatogramas em que era possível determinar as concentrações de toxinas desejadas e ainda, observar outros comportamentos que serão discutidos no Item 4.6.1, optou-se por não realizar o processo de extração nas amostras a serem analisadas por CLAE.

#### 5.4.1.2 - Testes com tiosulfato e cloro

Para avaliar uma possível interferência do produto formado pela reação do cloro com tiosulfato de sódio (utilizado para extinguir o cloro após o tempo de contato) na análise de saxitoxinas por CLAE, foram feitos testes em que foi acrescentado cloro e, imediatamente após, o tiosulfato de sódio na mostra de água de estudo. A amostra bruta e esta amostra teste foram injetadas no CLAE e seus cromatogramas foram idênticos, indicando que não havia influência do produto formado pelo cloro e tiosulfato de sódio na formação dos

cromatogramas.

#### 5.4.1.3 - Avaliação da degradação natural de saxitoxinas durante os ensaios

Com o intuito de verificar a ocorrência de degradação natural das amostras ao longo do período de execução dos ensaios (30 minutos), foi também realizado um controle específico.

Uma alíquota de 10 mL da água de estudo foi retirada de um frasco de controle no início do ensaio ( $t = 0$ ). Essa alíquota foi imediatamente congelada para preservação até análise em CLAE. A parcela restante foi mantida sob as mesmas condições das amostras submetidas ao ensaio de oxidação (tempo, temperatura e agitação inicial), e ao final do ensaio realizado coletou-se uma nova alíquota de 10 mL da AE ( $t = 30$  minutos) e imediatamente congelou-se esta alíquota. As alíquotas foram descongeladas juntas e analisadas em seqüência. A Figura 5.10 mostra os cromatogramas referentes ao tempo zero e ao final dos ensaios e pode-se notar que não houve alteração do comportamento, descartando assim, a possibilidade de degradação natural durante o tempo de duração dos ensaios.

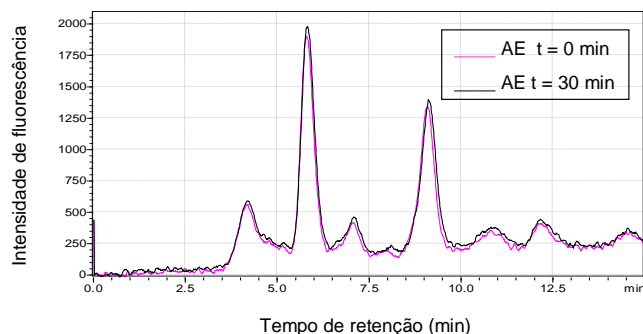


Figura 5.10 – Cromatogramas do tempo zero e ao final do ensaio com saxitoxinas.

#### 5.4.2 - Apresentação e discussão dos resultados dos ensaios com saxitoxinas

Foram realizados ensaios com a água de estudo AE3 (água deionizada contendo saxitoxinas e outros produtos provenientes da lise celular). Os ensaios consistiram em duas etapas com a mesma configuração e feitos em duplicata. Os dados apresentados são as médias entre os dois ensaios e seus respectivos valores estão no Apêndice C.

Diferentemente dos ensaios feitos com microcistinas, nos primeiros ensaios com saxitoxinas não se tinha conhecimento prévio da concentração de saxitoxinas no material de lise utilizado na preparação das amostras de AE3, pois o equipamento CLAE (utilizado nas análises) estava em fase de teste e o método de detecção em fase de implementação no LAA. A rotina dos ensaios de oxidação foi a mesma adotada para os ensaios com microcistinas, portanto para cada dosagem obtinha-se uma água de estudo com concentração inicial diferente.

Para a produção da água de estudo, adotou-se uma diluição de apenas 1:2 (uma parte de material da lise com saxitoxinas e uma parte de água deionizada), de modo a garantir que houvesse concentração suficiente para que fossem feitas as devidas análises após a oxidação das toxinas. Os tempos de contato avaliados foram de 10 e 30 minutos, o pH foi ajustado para valores próximos de 5 e as dosagens adotadas foram similares às usadas nos ensaios com microcistinas, na faixa de 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 2,0 mg/L, 4,0 mg/L e 8,0 mg/L. As temperaturas variaram entre 21°C e 23°C para o ar e entre 20°C e 21°C para água.

Com relação ao comportamento do oxidante após os ensaios, verificou-se, como mostrado na Figura 5.11, que o cloro foi totalmente consumido em todas as dosagens aplicadas após os dois tempos de contato.

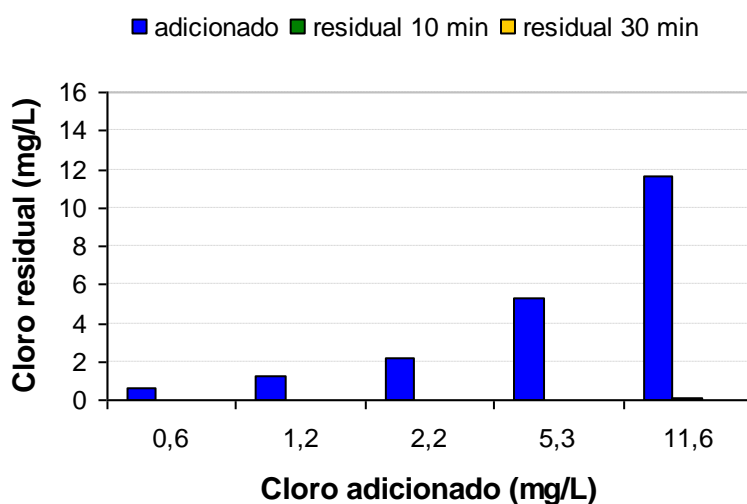


Figura 5.11 – Concentração de cloro livre aplicada e residual de cloro após os tempos de contato 10 e 30 minutos.

A água de estudo 3, preparada com material lisado do cultivo de *Cylindrospermopsis raciborskii* era menos diluída que a água de estudo 1, preparada com material lisado do cultivo de *Microcystis aeruginosa*, e assim, observava-se presença de cor nas amostras. A Figura 5.12 exemplifica o comportamento das amostras antes da aplicação do cloro e após 10 minutos de contato com aproximadamente 8 mg/L do oxidante.



Figura 5.12 – Amostras contendo saxitoxinas antes do contato com cloro (direita) e após 10 minutos de contato com aproximadamente 8 mg/L de cloro livre (esquerda).

Após a aplicação de cloro livre, a partir da dosagem 4 mg/L, puderam ser verificadas mudanças na coloração. As amostras imediatamente após a adição de cloro ficavam mais claras, praticamente sem nenhuma cor. Esta perda de cor significa que alguns compostos que estavam presentes na amostra, responsáveis por essa coloração foram oxidados durante os ensaios.

Como foi salientado no Item 3.4.1, foram construídas curvas de calibração para as 3 variantes de saxitoxinas. As Figuras 5.13, 5.14 e 5.15 apresentam as curvas de calibração obtidas para as variantes dcSTX, STX e neoSTX, respectivamente, com ajuste linear e coeficiente de correlação ( $R^2$ ).

O limite de detecção do equipamento para as três variantes de saxitoxinas foi de 3  $\mu\text{g/L}$ . As concentrações de dcSTX, STX e neoSTX foram calculadas com o uso da equação de ajuste da curva de calibração para cada toxina identificada, a partir das áreas medidas nos cromatogramas obtidos para cada amostra analisada.

Nos resultados da análise de saxitoxinas realizadas nos trabalhos de Oliveira (2005) e Silva (2005) desenvolvidos com cultivo da cepa T3 de *Cylindrospermopsis raciborskii*, era observada a presença de um pico não identificado entre os tempos de detenção relativos a neoSTX e a STX. Levantou-se a hipótese de que o pico se tratava da variante dcSTX, porém, devido à falta de padrão para esta toxina, esta hipótese não foi confirmada.

No presente trabalho, de posse do padrão para a variante dcSTX, pode ser feita a comparação do tempo de retenção obtido a partir da injeção do padrão e o tempo de retenção do pico, até então, não identificado. Pode-se então verificar que se tratava de fato da dcSTX. Portanto, confirmou-se a habilidade da cepa T3 da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* em produzir também essa variante de saxitoxinas.

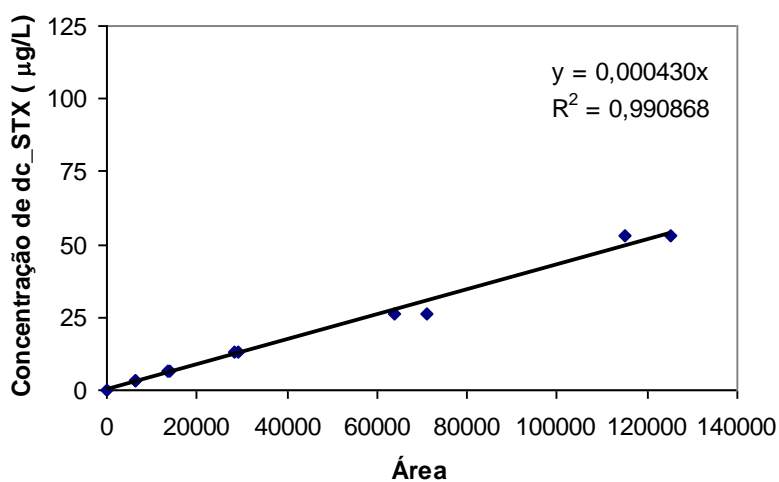


Figura 5.13 – Curva de calibração para dcSTX.

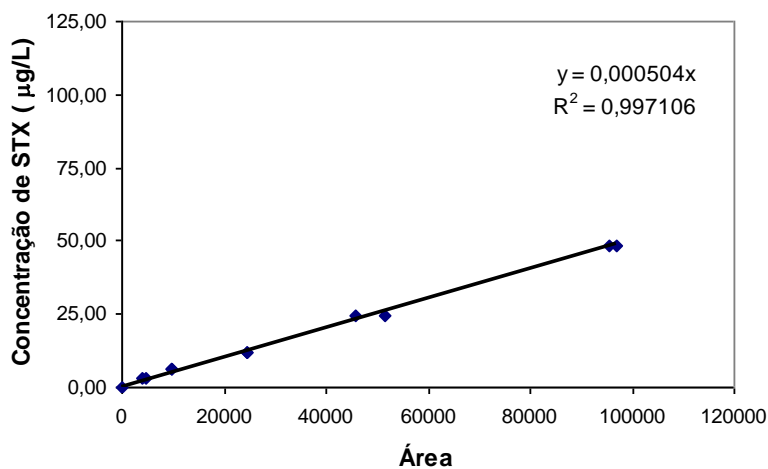


Figura 5.14 – Curva de calibração para STX.

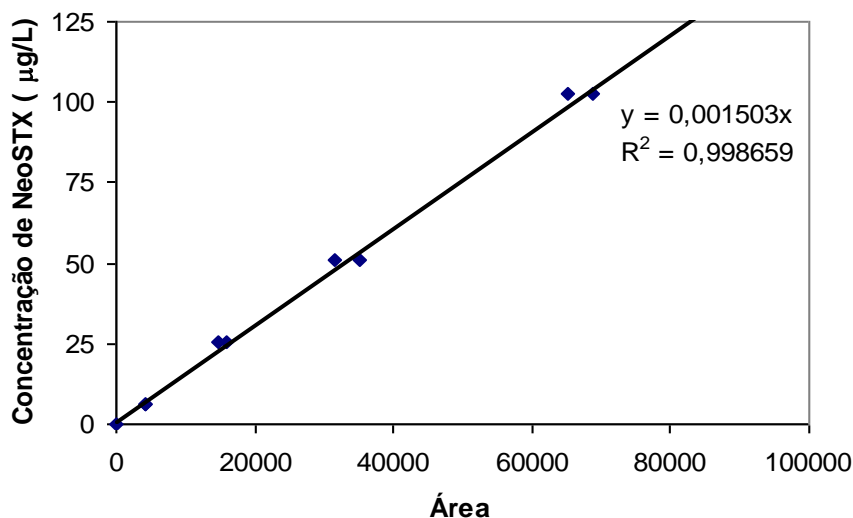


Figura 5.15 – Curva de calibração para neoSTX.

Os resultados de cada dosagem aplicada e suas respectivas concentrações de saxitoxinas após os tempos de contato são apresentados nas Figuras 5.16 e 5.17.

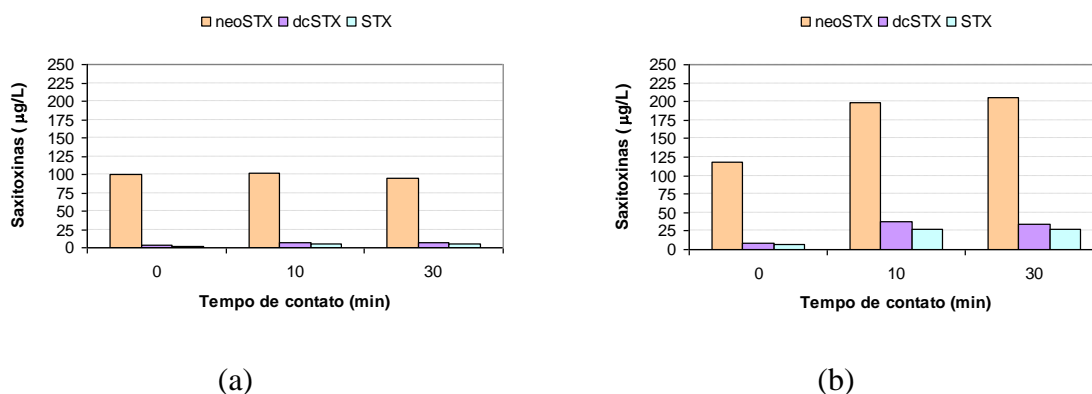


Figura 5.16 - Concentração de saxitoxinas após tempos de contato 10 e 30 minutos após a aplicação das dosagens de cloro livre (a) 0,6 mg/L (b) 1,2 mg/L.

Na avaliação do comportamento das saxitoxinas quando em contato com 0,6 mg/L de cloro após tempos de contato de 10 e 30 minutos, pode-se dizer que não houve mudança significativa nos valores de neoSTX, variando de 99 µg/L para 102 µg/L. É importante dizer que após a análise das amostras no 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 e devido ao fato de ter sido feita a opção de não fazer a concentração de purificação da amostra, os picos formados, em algumas amostras não são bem definidos, devido à interferência de outros materiais liberados a partir da lise do cultivo.

No que se refere as concentrações de STX e dcSTX, verificou-se (ver Figura 5.16) um aumento nas concentrações para as duas toxinas, aumentando de valores próximos de 3 µg/L para em torno de 6 µg/L.

Já com a aplicação de 1,2 mg/L de cloro livre, pôde ser observado aumento significativo em todas as variantes de saxitoxinas. Os aumentos podem ter ocorrido devido a transformações que ocorrem entre as variantes das saxitoxinas, conforme relatado em diversos trabalhos (Shimizu e Yoshika, 1981; Indrasena e Gill, 1999; Sako *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2005), tendo como produto final as STX. Os trabalhos citados se referem à degradação e conseqüente transformação das saxitoxinas, por meio do aquecimento das amostras e quando estas são avaliadas ao longo do tempo. Entretanto, por analogia, podem-se explicar alguns comportamentos ocorridos no presente trabalho.

Oliveira (2005) registra que a cepa T3 é capaz de produzir STX, neoSTX, dcSTX, dcneoSTX, C1 e C2. Essa caracterização das variantes produzidas pela cepa T3 de *Cylindrospermopsis raciborskii* foi obtida por outros autores, com base em análises com a utilização da técnica de cromatografia líquida e espectrometria de massa, e foi repassada para Oliveira (2005) por meio de comunicação pessoal. Entretanto, essa caracterização ainda não foi publicada.

Sabe-se que as C-toxinas podem ser as precursoras das dcSTX, pois o padrão de dcSTX do Institute for Marine Biosciences (NRC, 2006) é preparado a partir de uma cultura de *Alexandrium tamarense* e a principal toxina produzida pela cepa utilizada é a C2, que após sua extração e purificação, é quimicamente convertida em dcSTX.

Portanto, considerando a possibilidade da presença de C-toxinas na cepa T3 e as considerações feitas a respeito das transformações das C-toxinas em dcSTX, esta poderia ser uma explicação para a ocorrência dos aumentos das concentrações de dcSTX. Porém,

essa hipótese não pôde ser verificada, tendo em vista a não disponibilidade de padrões para a variante C-toxinas no LAA.

Os dados de toxicidade relativa apresentados por Oshima (1995) para STX, neoSTX, dcSTX e C2, são respectivamente, 1; 0,924; 0,513; 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.

Os aumentos de concentração observados na Figura 5.16 (b) são bastante elevados, e não se pode descartar a hipótese de ter ocorrido um erro experimental. Mas, ao mesmo tempo, tanto pelo desconhecimento dos tipos de variantes de saxitoxinas (e suas concentrações) presentes nas amostras oxidadas, como pelo fato das possíveis transformações ocorrerem no sentido de formação de compostos mais tóxicos, não se pode descartar a hipótese de que, sob condições não adequadas de oxidação com cloro (baixas dosagens), ocorre o aumento do risco pelo consumo da água. Nesse sentido, sugere-se a realização de trabalhos voltados para investigar, de forma sistemática, as interconversões possíveis quando diferentes variantes de saxitoxinas são submetidas à ação do cloro.

A Figura 5.17 apresenta os resultados obtidos para as outras dosagens de cloro livre aplicadas nesta etapa de ensaios.

Verifica-se que as concentrações iniciais de neoSTX nas amostras da cepa T3 são muito maiores das que as concentrações de dcSTX e STX. Avaliando as concentrações de neoSTX ao longo do tempo de contato com a aplicação de diferentes dosagens de cloro livre, observa-se uma tendência geral de redução da concentração dessa variante, particularmente quando são usadas dosagens mais elevadas. Ao mesmo tempo verifica-se o aumento da concentração das outras variantes analisadas (dcSTX e STX).

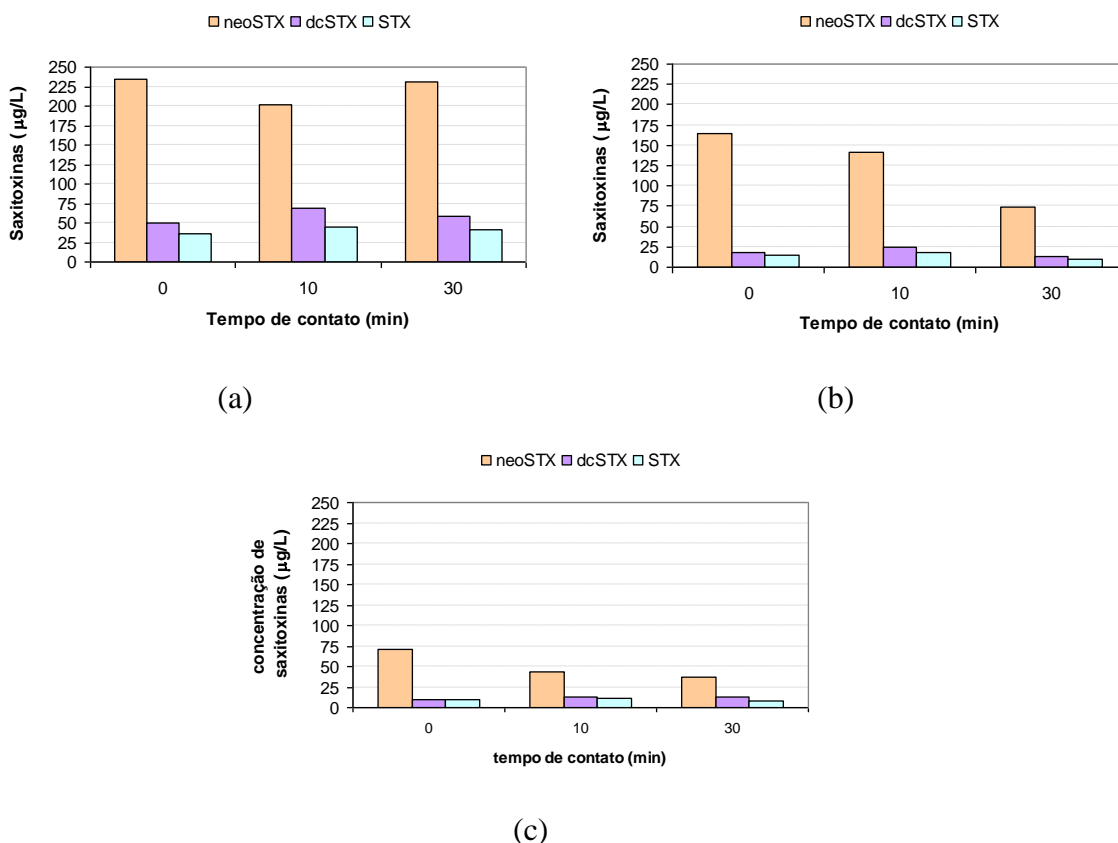


Figura 5.17 – Concentração de saxitoxinas após tempos de contato 10 e 30 minutos com aplicação das dosagens de cloro livre (a) 2,2 mg/L (b) 5,3 mg/L (c) 11,6 mg/L.

A Tabela 5.4 apresenta os valores de concentração inicial e final (30 minutos de tempo de contato) das outras variantes de saxitoxinas determinadas nesse ensaio, e as porcentagens de aumento das concentrações de dcSTX e de STX conforme as dosagens aplicadas.

Tabela 5.4 – Aumento percentual na concentração de dcSTX e STX após ensaios com cloro.

cloro (mg/L)	dcSTX inicial	dcSTX final	STX inicial	STX final	% aumento dcSTX	% aumento STX
0,6	3	6	3	5	141	99
1,2	8	34	7	27	341	305
2,2	51	59	37	41	17	12
5,3	18	13	15	11	0	0
11,6	10	12	10	8	18	0

Os percentuais de aumento foram variados, não apenas pelo fato das concentrações iniciais de saxitoxinas das águas de estudo para cada dosagem de cloro livre terem sido diferentes, como, principalmente, pela concentração de cloro livre disponível para a oxidação ser diferente. Entretanto, pode-se observar que os maiores percentuais de aumento ocorreram

nos casos em que a dosagem de cloro livre é mais baixa.

Para verificar as tendências de comportamento observadas na etapa anterior de ensaios, foi realizado um segundo ensaio com algumas mudanças na metodologia.

Foi utilizada uma água de estudo com a mesma concentração inicial de saxitoxinas para todas as dosagens e foi adotada uma faixa mais ampla e com maior número de dosagens e o tempo de contato avaliado foi apenas de 30 minutos, pois na etapa anterior observou-se que não havia alteração significativa ao longo do tempo (entre 10 e 30 minutos). A Figura 5.18 apresenta as concentrações de cloro residual na água de estudo.

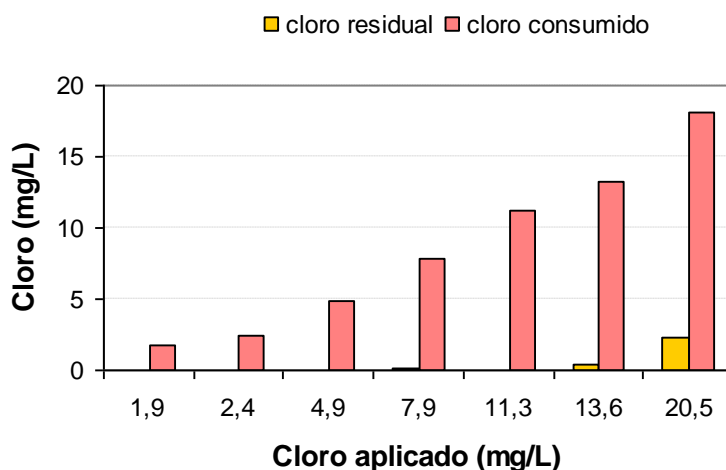


Figura 5.18 – Cloro residual e consumido na amostra após o tempo de contato de 30 minutos.

Cabe ressaltar que o valor de pH utilizado nos ensaios foi em torno de 5,7 e a temperatura do ar foi 23°C e da água 20°C e as concentrações iniciais das variantes de saxitoxinas foram 73 µg/L para neoSTX e 8 µg/L e 9 µg/L para dcSTX e STX, respectivamente.

Com relação ao consumo de cloro nas diferentes dosagens, pode-se dizer que o oxidante foi praticamente totalmente consumido até a dosagem de 13,6 mg/L, na qual se verifica um pequeno residual de 0,3 mg/L. Com um incremento da dosagem para 20,5 mg/L o residual de cloro chega a 2,3 mg/L. Estes resultados mostram a demanda de cloro exercida pelas saxitoxinas e os compostos extracelulares das *Cylindrospermopsis raciborskii*.

A mudança de cor após a oxidação da água de estudo ocorreu da mesma maneira que nos ensaios anteriores, imediatamente após a aplicação das maiores dosagens, a partir da dosagem de 5 mg/L de cloro livre aproximadamente.

As concentrações das variantes de saxitoxinas para as diferentes dosagens de cloro livre estão apresentadas na Figura 5.19.

Com relação à concentração de neoSTX verifica-se que com uma dosagem de cloro livre de 20,5 mg/L, houve a redução da concentração de neoSTX de 73 µg/L para 31 µg/L, ou seja, uma remoção de neoSTX de cerca de 43 %.

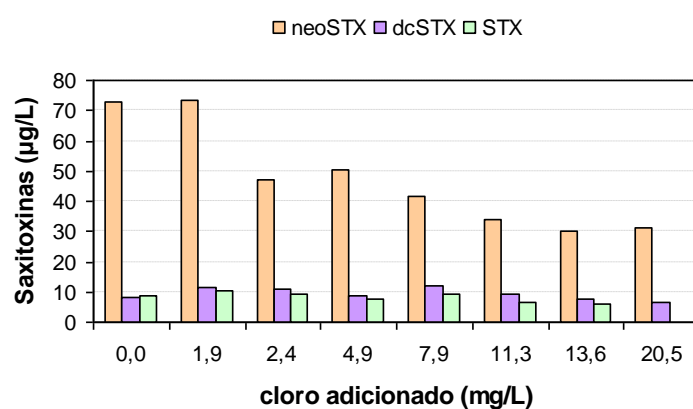


Figura 5.19 - Concentração de saxitoxinas após o contato com diferentes dosagens de cloro livre.

Quanto às variantes dcSTX e STX, mais uma vez, observa-se que há um aumento da concentração dessas toxinas quando foi aplicada a menor dosagem de cloro, 1,9 mg/L, nas amostras. Entre as dosagens de cloro livre de 1,9 mg/L e 11,3 mg/L, as concentrações dessas toxinas permanecem aproximadamente constantes e somente apresentaram uma tendência de redução com a aplicação de 20,5 mg/L de cloro livre. Nessa dosagem, a concentração de dcSTX foi reduzida de 8 µg/L para 7 µg/L e a STX não foi detectada.

Nicholson *et al.* (2003) realizaram ensaios utilizando saxitoxinas e cloro nas formas de hipoclorito de sódio e cloro gasoso. As saxitoxinas foram semi-purificadas previamente, diluídas em água natural, e as concentrações de STX iniciais foram de aproximadamente 10 µg/L. A remoção obtida para STX com pH de 5,6 foi de aproximadamente 55% utilizando uma dosagem de cloro próxima de 16 mg/L. No presente trabalho, para uma

concentração inicial de cerca de 9 µg/L, após a aplicação de uma dosagem de cloro livre de 20,5 mg/L, a STX não foi detectada. No entanto, não seria válido fazer comparações de resultados, pois as condições de cada trabalho foram diferentes, uma vez que no trabalho de Nicholson *et al.* (2003) estavam presentes compostos orgânicos naturalmente presentes na água enquanto no presente trabalho a competição era com os demais compostos oriundos da lise celular.

Nas Figuras 5.20a até 5.20g, podem-se observar os cromatogramas desta etapa de ensaios.

Sabe-se que as algas e cianobactérias podem ser precursoras na formação de subprodutos, tanto as células como a matéria orgânica extracelular das algas, inclusive suas toxinas (Di Bernardo *et al.*, 2007).

É provável que durante o processo de oxidação tenha ocorrido formação de subprodutos a partir do material intracelular liberado após a lise, pois foi possível notar um novo pico (pico 3) que não estava presente na água de estudo inicialmente (Figura 5.19). O pico numerado como pico 3 aumentou a partir do incremento da dosagem de cloro livre, podendo indicar que com mais cloro havia formação de uma maior concentração de subprodutos.

Nos cromatogramas verifica-se a ocorrência de um pico (pico 2) muito bem definido e de área maior do que todos outros picos formados na ocasião da análise das amostras. A área deste pico diminui sistematicamente com a aplicação das dosagens de cloro livre de 1,9 mg/L e 2,4 mg/L. Com a adição de 7,9 mg/L de cloro livre esse pico apresenta ainda diminuição, porém menor do que na dosagem de 2,4 mg/L e a partir daí, com a aplicação das dosagens 11,3 mg/L a 20,5 mg/L, o pico 2 apresenta aumento. Esse comportamento pode indicar a ocorrência de interconversões.

Oliveira (2005) realizou testes preliminares para avaliar a produção de GTXs pelo cultivo de *C. raciborskii*. O autor obteve cromatogramas com pequenos picos com os mesmos tempos de retenção dos padrões de GTX-1, GTX-2, GTX-3 e GTX-4. No presente trabalho, optou-se então por verificar se o pico 2 se tratava de alguma das variantes de GTX. Para tal foram realizadas injeções de padrões específicos de variantes de GTX, usando a fase móvel utilizada na detecção de STX.

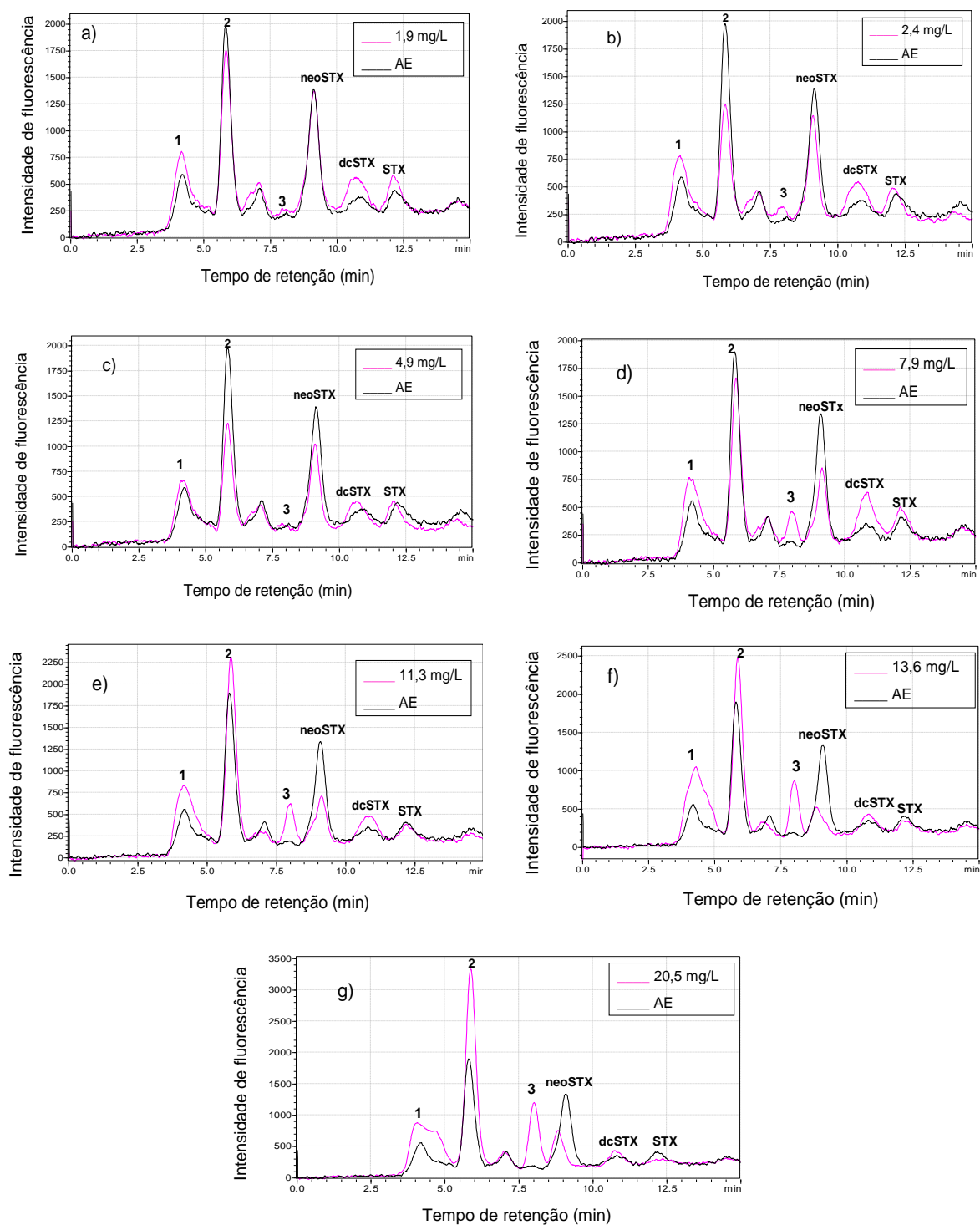


Figura 5.21 – Cromatogramas do ensaio final de saxitoxinas com a aplicação das dosagens  
 (a) 1,9 mg/L (b) 2,4 mg/L (c) 4,9 mg/L (d) 7,9 mg/L (e) 11,3 mg/L (f) 13,6 mg/L  
 (g) 20,5 mg/L.

O pico formado pelo conjunto das variantes de GTX injetadas apresentou tempo de

retenção similar ao pico 2, indicando a presença de GTX na amostra. Entretanto, esse procedimento não permite distinguir quais variantes são refletidas no pico 2 e tampouco sua quantificação, que só seria possível com uso da fase móvel apropriada. Segundo Shimizu e Yoshika (1981) variantes de GTX podem ser precursoras de STX, explicando os aumentos na concentração de STX observados nas dosagens de cloro intermediárias.

No trabalho de Nicholson *et al.* (2003), as remoções de saxitoxinas foram acompanhadas de perda de toxicidade avaliadas por meio de bioensaios em camundongos após os ensaios de oxidação. Este resultado, poderia indicar que não houve transformações durante o processo de oxidação, mas os autores ressaltam que esta possibilidade não pode ser descartada pois há chances de ter ocorrido perda das frações mais tóxicas durante o processo de concentração utilizado previamente à detecção. Vale lembrar que no presente trabalho as amostras não foram submetidas a processos de concentração e diferenças de comportamento podem ser esperadas.

Os resultados obtidos apontem para duas linhas de pensamento. As variantes dcSTX são somente oxidadas em dosagens muito elevadas em função de estarem sendo continuamente formadas como produto da oxidação de outras variantes ou porque de fato são moléculas de mais difícil oxidação. Ou seja, os compostos intracelulares liberados a partir da lise de *Cylindrospermopsis raciborskii* e as outras variantes de saxitoxinas são oxidadas primeiro e só então a dcSTX e STX serão oxidadas. Essa última hipótese parece ser mais plausível, uma vez que Nicholson e colaboradores (2003) indicam que a dcSTX degrada um pouco mais rápido que a STX em valores de pH próximos de 7,5, mas em valores de pH mais baixo essas toxinas serão mais estáveis e de mais difícil oxidação. Entretanto, a princípio não se pode descartar a possibilidade de ter ocorrido interconversões.



## 6 - CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES

### 6.1 - CONCLUSÃO

Com relação à oxidação de microcistinas, houve um aumento da concentração desse composto quando baixas dosagens de cloro livre eram aplicadas, entre aproximadamente 0,2 mg/L e 3,4 mg/L, a depender da concentração inicial de microcistinas. Com a aplicação de dosagens de cloro livre superiores, as concentrações de microcistinas diminuíram na água de estudo. Em uma água de estudo com concentração inicial de microcistinas de aproximadamente 81 µg/L, após a adição de 11 mg/L de cloro livre, a concentração diminuiu para valores em torno de 2 µg/L.

Uma hipótese para explicar os aumentos de concentração de toxinas ocorridos nos ensaios com água de estudo contendo microcistinas e compostos intracelulares, quando era adicionada uma baixa concentração de cloro livre, é a de ter ocorrido a formação de produtos parcialmente oxidados e esses produtos terem promovido resultados falsos positivos no ELISA, com conseqüente superestimação dos valores obtidos. A elevada demanda de cloro observada nos ensaios realizados com água de estudo contendo material da lise diluído em água deionizada revela a significativa influência desses compostos no processo de remoção de microcistinas.

Verificou-se também que os resultados de remoção ao aplicar dosagens próximas de cloro livre em concentrações iniciais diferentes de microcistinas não seguiram um comportamento proporcional, 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.

Ao avaliar os resultados de absorvância em  $\lambda = 254$  nm medidos nas águas de estudo e nos frascos de controle de água do lago Paranoá antes e após a oxidação com cloro, notou-se que os valores de absorvância obtidos em todas as águas analisadas aumentaram após os tempos de contato de 10 e 30 minutos. Acredita-se que esse aumento possa ter ocorrido devido à formação de subprodutos da cloração que absorvem mais luz ultravioleta do que os originalmente presentes nas águas analisadas.

A comparação entre os experimentos realizados com as águas de estudo diluídas em água deionizada e as águas de estudo em água do lago Paranoá indicaram que apesar da água do lago Paranoá apresentar elevada demanda de cloro, isso não parece interferir na eficiência de remoção de microcistinas quando dosagens similares são aplicadas, indicando assim, que as microcistinas e os compostos intracelulares parecem ser mais facilmente oxidados do que a matéria orgânica presente no lago Paranoá.

Nos ensaios realizados com material contendo saxitoxinas e outros compostos obtidos a partir da lise do cultivo de *Cylindrospermopsis raciborskii* diluído em água deionizada, durante as análises das amostras por CLAE, de posse do padrão específico para a variante de saxitoxinas dcSTX, foi confirmada a capacidade da cepa T3 de *Cylindrospermopsis raciborskii* cultivada no LAA produzir a variante dcSTX.

Ao analisar as concentrações de saxitoxinas após a oxidação com concentrações crescentes de cloro livre, verificou-se a sistemática redução das concentrações da variante neoSTX. Por outro lado, as variantes dcSTX e STX só apresentaram níveis de remoção mensuráveis com a adição de cerca de 20 mg/L de cloro livre. Esse resultado sugere que, nos valores de pH utilizados, a variante neoSTX é mais suscetível à oxidação com cloro do que as demais variantes analisadas.

No entanto, ao se aplicar baixas dosagens de cloro livre, verificou-se o aumento das concentrações de dcSTX e STX, indicando a possível ocorrência de transformações entre as variantes. Os cromatogramas formados após a análise por CLAE reforçaram esse comportamento. Os aumentos observados em alguns casos foram demasiadamente elevados e não se deve descartar a hipótese de ter ocorrido um erro experimental. Mas pelo fato de não se conhecer todas as variantes de saxitoxinas presentes nas amostras oxidadas e pelo fato das possíveis transformações ocorrerem no sentido de formação de compostos mais tóxicos, não se pode descartar a hipótese de que a aplicação de baixas dosagens de cloro pode levar ao aumento do risco no consumo da água.

## 6.2 - RECOMENDAÇÕES

O fato das concentrações iniciais em grande parte dos ensaios, tanto de microcistinas quanto de saxitoxinas, não terem sido as mesmas para todas as dosagens aplicadas, dificultou a comparação entre as remoções obtidas quando dosagens próximas foram aplicadas às águas de estudo. Recomenda-se que em estudos futuros, os ensaios e suas repetições sejam realizados a partir de uma mesma água de estudo e que as condições de armazenamento e realização dos ensaios seja cuidadosamente avaliadas para minimizar a degradação da água de estudo.

Considerando as grandes demandas de cloro observadas para se obter remoções significativas tanto de microcistinas como de saxitoxinas, recomenda-se a realização de estudos detalhados sobre o potencial de formação de subprodutos da oxidação dessas toxinas e dos demais compostos intracelulares liberados para água no processo de lise.

Pela popularização do método ELISA na quantificação de microcistinas em águas tratadas, recomenda-se também um estudo minucioso dos efeitos do cloro livre e dos seus subprodutos no método de quantificação para avaliação de ocorrência de falsos positivos.

Finalmente, recomenda-se a realização de estudos pormenorizados para investigar as interconversões de saxitoxinas sob ação do cloro. Esses estudos devem ser realizados em diferentes valores de pH em função da estabilidade variável da molécula em relação ao valor do pH.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acero, J. L., Rodriguez, E. e Meriluoto, J. (2005). "Kinetics of reactions between chlorine and the cyanobacterial toxins microcystins". *Water Research*, **39**, 1628-1638.
- 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, 109p.
- APHA, AWWA, WPCF (1999). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20ª edição, Washington, E.U.A.
- Azevedo S.M.F.O. (1996) "Toxic Cyanobacteria and the Caruaru Tragedy." *IV Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia*, 83-84.
- Azevedo, S.M.F.O., Evans, W. R., Carmichael, W.W. e Namikosi, M. (1994). "First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*.", *Journal Applied Phycology*, **6**, 261-265.
- Azevedo, S.M.F.O e Brandão, C.C.S.B. (2003). "Cianobactérias Tóxicas na Água para Consumo Humano na Saúde Pública e Processos de Remoção em Água para Consumo Humano." *FUNASA*.
- Brasil (2004). Ministério da Saúde. "Portaria nº 518: Procedimentos e responsabilidades relativos 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, 25 de março de 2004.
- Bernardo, Luiz Di; Dantas, A. D. B. "Métodos e Técnicas de Tratamento de Água." 2. ed. São Carlos: Rima Editora, 2005. v. 2. 1584 p.
- Carmichael W. W., Beasley V. R., Bunner D. L., Eloff J. N., Falconer I., Gorham P., Harada K. I., Krishnamurthy T., Yu M. J., Moore R. E., Rinehart K., Runnegar M., Skulberg O. M., Watanabe M. (1988). "Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green alga)." *Toxicon*, **26**, 971-973.
- Carmichael, W. W. (1992). "A Status Report on Planktonic Cyanobacteria (Blue-Green Algae) and Their Toxins. EPA/600/R-92/079, Ohio, EUA., 141p.
- Carmichael, W. W. (1994). "The toxins of cyanobacteria." *Scientific American*. **270**(1), 78-86.
- Carvalho, P.V.V.C., Silvestre, A.N. e Moura, E.B.A. (1999). "Ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas do gênero *Cylindrospermopsis* em mananciais de

- abastecimento público do estado de Pernambuco/Brasil – Abordagem Preliminar.” *Anais do 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, Rio de Janeiro, Brasil, 3775-3783.
- 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 cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10.” *Toxicon*, **44**, 483-489.
- Chellapa, N.T. e Costa, M.A.M. (2003). “Dominant and co-existing species of Cyanobacteria from a Eutrophicated reservoir of Rio Grande do Norte State, Brazil.” *Acta Oecologica International Journal of Ecology*, **24**, S3-S10.
- Chorus, I. e Bartram, J. (1999). *Toxic Cyanobacteria in Water*. E&FN Spon, Londres, 416p.
- Chow, C.W.K., House, J., Velzeboer, R.M.A., Drikas, M., Burch, M.D. e Steffensen, D.A. (1998). “The effect of ferric chloride flocculation on cyanobacterial cells”. *Water Research*, **32**(3), 808-814.
- Codd, G. A., Morrison, L. F. e Metcalf, J.S. (2005). “Cyanobacterial toxins: risk management for health protection.” *Toxicology and Applied Pharmacology*, **203**(3), 264-272.
- Drikas, M., Chow, C.W.K., House, J., Burch, M.D. (2001). “Using coagulation, flocculation, and settling to remove toxic cyanobacteria.” *Journal of American Water Works Association*, **93**(2), 100-110.
- Falconer, I.R., Runnegar, M.T.C., Buckley, T., Huyn, V.L. e Bradshaw, P. (1989). “Using Activated Carbon to Remove Toxicity from Drinking Water Containing Cyanobacterial Blooms. *Journal of American Water Works Association*, **81**(2), 102-105.
- Falconer, I.R. (1994). “*Health Implications of Cyanobacterial (Blue-green algal) Toxins*”. Toxic Cyanobacteria current Status of Research and Management.
- Falconer, I.R. (1996). “Potencial impact on human health of toxic cyanobacteria.” *Phycologia*, **35**(6), 6-11.
- Ferreira Filho, S. S. (2001) “Remoção de compostos orgânicos precursores de subprodutos da desinfecção e seu impacto na formação de trihalometanos em águas de abastecimento.” *Engenharia Sanitária e Ambiental*, **6** (1), 53-60.
- Fitzgerald, D. J., Cunliffe, D.A., Burch, M.D. (1999) “Development of Health Alerts for Cyanobacteria and Related Toxins in Drinking Water in South Austrália.” *Environmental Toxicology*, **14**, 203-207.

- Glaze, W.H. (1997). "Chemical Oxidation" In: Pontius, F.W. (ed.) *Water Quality and Treatment, a Handbook of Community Water Supplies*, AWWA.
- Harada, K., Kondo, F., Lawton, L. (1999). "Cyanobacterial toxins." In: Chorus, I. e Bartram, J. (eds.) *Toxic Cyanobacteria in Water*. E&FN Spon, Londres, 348-367.
- Hart J., Fawell, J. K, Marsalek, B. Croll, B., Dolejs, P., Sládecková, A., Bruchet, A., Bernazeau, F., Pieronne, I. Baudin, P. (1998). "Algal toxins in surface waters: origins and removal during drinking water treatment processes." *Water Supply*, **16** (½), 611-623.
- Himberg, K., Keijola, A.M., Hiisvirta, L., Pyysalo, H. e Sivonen, K. (1989). "The effect of Water Treatment Processes on *Microcystis* e *Oscillatoria* Cyanobacteria: A Laboratory Study." *Water Research*, **23**(8), 979-984.
- Ho, L., Onstad, G., Gunten, U., Rick-Pfeiffer, S., Craig, K., Newcombe, G. (2006). "Differences in the chlorine reactivity of four microcystin analogues." *Water Research*, **40**, 1200-1209.
- Indrasena, W.M., Gill, T.A. (1999). "Thermal degradation of paralytic shellfish poisoning toxins in scallop digestive glands." *Food Research International*, **32**, 49-57.
- Indrasena, W.M., Gill, T.A. (2000). "Thermal degradation of partially purified paralytic shellfish poison toxins at different times, temperatures, and pH." *Journal of Food Science*, **65** (6), 948-953.
- Jones, G. e Negri, A. P. (1997). "Persistence and Degradation of Cyanobacterial Paralytic Shellfish Poisons (PSPs) in Freshwaters." *Water Research*, **31**, 525-533.
- Jones, G. e Orr, P.T. (1994). "Release and Degradation of Microcystins Following Algicide Treatment of a *Microcystis aeruginosa* Bloom in a Recreational Lake, as Determined by CLAE and Protein Phosphatase Inhibition Assay." *Water Research*, **28**(4), 871-876.
- Keijola, A.M., Himberg, K., Esala, A.L., Sivonen, K. e Hiisvirta, L. (1988). "The Removal of Cyanobacterial Toxins in Water Treatment Processes: Laboratory and Pilot-Scale Experiments." *Toxic Assessment: An International Journal*, **3**, 643-656.
- Kuiper-Goodman, T., Falconer, I., Fitzgerald, J. (1999). "Cyanobacterial toxins." In: Chorus, I. e Bartram, J. (eds.) *Toxic Cyanobacteria in Water*. E&FN Spon, Londres, 113-147.
- 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.

- Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P.A., Andrinolo, D., Azevedo, S.M.F.O. e Oshima, Y. (1999). "The first evidence of paralytic shellfish toxins in the fresh water cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil." *Toxicon*, **37**, 1359-1373.
- Melo Filho, L.C. (2006). "Avaliação da ozonização como pré ou pós tratamento à filtração direta descendente na remoção de cianobactérias e saxitoxinas." Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de pós-graduação em engenharia ambiental, 263 p.
- Molica, R.J.R., 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. (2005). "Occurrence of saxitoxins and an anotoxina(s)-like anticholinesterase in a Brazilian drinking water supply." *Harmful Algae*, **4**(4), 743-753.
- Mondardo, R.I., Sens, M.L., Melo Filho, L.C. (2006). "Pré-tratamento com cloro e ozônio para remoção de cianobactérias." *Engenharia Sanitária e Ambiental*, **11**, 337-342.
- Nagashima, Y., Noguchi, T., Tanaka, M. e Hashimoto, K. (1991), "Thermal degradation of paralytic shellfish poison." *Journal of Food Science*, **56** (6), 1572 – 1575.
- Newcombe, G. e Nicholson, B.(2002). "Treatment Options for the saxitoxin class of cyanotoxins." *Water Science and Technology: Water Supply*, **2**(5-6), 271-275.
- Newcombe, G. e Nicholson, B. (2004). "Water treatment options for dissolved cyanotoxins." *Journal of Water Supply : Research and Technology – AQUA*, **53**(4).
- Nicholson, B. C., Rositano, J. e Burch, M. D. (1994). "Destruction of Cyanobacterial Peptide Hepatotoxins by Chlorine and Chloramine." *Water Research*, **28**(6), 1297-1303.
- 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**, 1341-1348.
- NRC Certified Reference Materials Program (2006), CD Institute for Marine Biosciences.
- Oliveira, J.M.B. (2005). "Remoção de *Cylindrospermopsis raciborskii* por meio de sedimentação e de flotação: avaliação em escala de bancada." Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Publicação PTARH.DM-085/05, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 122p.
- Oshima, Y. (1995). "Post-Column derivatization CLAE methods for Paralytic Shellfish

- Poisons.” In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M. e Cembella, A.D. (eds.) *Manual on Harmful Marine Microalgae*, IOC Manuals and Guides n° 33, United Educational, Scientific and Cultural Organization (UNESCO), Paris, 81-94.
- Pires Jr. OR, Sebben A, Schwartz EF, Largura SWR, Bloch Jr. C, Morales RAV, Schwartz CA (2002) “Occurrence of tetrodotoxin and its analogues in the Brazilian frog *Brachycephalus ephippium* (Anura: Brachycephalidae)”. *Toxicon*, **40**, 761-766.
- Rodríguez, E., Sordo A., Metcalf, J. S., Acero, J. L. (2007). “Kinetics of the oxidation of cylindrospermopsin and anatoxin-a with chlorine, monochloramine and permanganate.” *Water Research*, **41**, 2048-2056.
- Rositano, J., Newcombe, G., Nicholson, B. e Sztajn bok, P. (2001). “Ozonation of NOM and algal toxins in four treated waters.” *Water Research*, **35**(1), 23-32.
- Sá, J.C. (2004). *Aplicabilidade do processo de filtração lenta no tratamento de água contendo *Microcystis aeruginosa* e microcistina – Estudo de parâmetros de projeto e operação visando otimização da eficiência de remoção*. Exame de Qualificação para Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Brasília, DF, 115p.
- 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**, 1044-1051.
- 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.
- 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.
- Silvestre, A.P.N., Carvalho, P.V.V.D.B.C.M., Andrade, E. B. e Oliveira, M.S. (1999). “Florações Tóxicas de Cianobactérias do Gênero *Cylindrospermopsis* em Mananciais de Abastecimento.” *Anais do 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*, Rio de Janeiro, Brasil.



- Sivonen, K. e Jones, G. (1999). "Cyanobacterial toxins." In: Chorus, I. e Bartram, J. (eds.) *Toxic Cyanobacteria in Water*. E&FN Spon, Londres, 41-111.
- Teixeira, M.G.L.C., Costa, M.C.N., Carvalho, V.L., Pereira, M.S e Hage, E. (1993). "Epidemia de gastroenterite na área da barragem de Itaparica, Bahia." *Bulletin of the Pan American Health Organization*, **27** (3).
- Weber, W.J. (1972). *Physicochemical Processes for Water Quality Control*. Wiley-interscience, New York, 640p.
- WHO – World Health Organization (1999) *Guidelines for drinking-water quality - Addendum to volume 1*. WHO, Genebra, 2a. Edição, 36 p.
- Yoo, R.S., Carmichael, W. W., Hoehn, R. C. e Hrudey, S. E. (1995). *Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins: A Resource Guide*. American Water Works Association Research Foundation and American Water Works Association. EUA, 229 p.
- Yunes, J.S., Cunha, N.T., Barros, L.P., Proença, L.A.O. e Monserrat, J.M. (2003). "Cyanobacterial Neurotoxins from Southern Brazilian freshwaters." *Commnets on Toxicology*, **9**, 103-115.

## APÊNDICE A – RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS UTILIZANDO A ÁGUA DE ESTUDO AE1

### A.1 – RESULTADOS DOS ENSAIOS DA ETAPA PRÉVIA

Tabela A.1 – Resultados da primeira repetição dos ensaios de oxidação da Etapa Prévia com AE1.

cloro livre (mg/L)	tempo de contato (min)	cloro residual (mg/L)	microcistinas (µg/L)
0,0			82
0,2	10	0,01	9
2,8	10	0,04	23
13,0	10	3,82	1
0,0	30	0,49	77
2,4	30	0,07	37
13,0	30	3,60	0

Tabela A.2 – Resultados da segunda repetição dos ensaios de oxidação da Etapa Prévia com AE1.

cloro livre (mg/L)	tempo de contato (min)	cloro residual (mg/L)	microcistinas (µg/L)
0,0			66
0,9	10	0,01	8
3,1	10	0,02	9
14,5	10	4,28	1
0,9	30	0,01	61
2,6	30	4,38	11
13,4	30	0,07	0

Tabela A.3 – Resultados da terceira repetição dos ensaios de oxidação da Etapa Prévia com AE1.

cloro livre (mg/L)	tempo de contato (min)	cloro residual (mg/L)	microcistinas (µg/L)
0,0			87
0,8	10	0,01	102
3,2	10	0,09	45
15,8	10	2,73	< 0,16
0,9	30	0,02	45
2,9	30	0,05	25
14,3	30	4,96	1

Tabela A.4 – Resultados da quarta repetição dos ensaios de oxidação da Etapa Prévia com AE1.

cloro livre (mg/L)	tempo de contato (min)	cloro residual (mg/L)	microcistinas (µg/L)
0,0			40
0,9	10	0,02	78
3,3	10	0,05	20
16,6	10	14,88	0
0,8	30	0,01	116
3,5	30	0,08	33
13,9	30	4,32	1

Tabela A.5 – Resultados da quinta repetição dos ensaios de oxidação da Etapa Prévia com AE1.

cloro livre (mg/L)	tempo de contato (min)	cloro residual (mg/L)	microcistinas (µg/L)
0,0			71
0,8	10	0,40	87
3,6	10	0,36	59
15,3	10	14,24	2
0,9	30	0,02	93
3,5	30	0,05	29
15,0	30	4,32	1

## A.2 – RESULTADOS DOS ENSAIOS DA ETAPA 1

Tabela A.6 - Resultados da primeira repetição dos ensaios de oxidação da Etapa 1 com AE1.

cloro livre (mg/L)	cloro residual (mg/L)		microcistinas -10 min (µg/L)	microcistinas - 30 min (µg/L)
	10 min	30 min		
0,0				46
0,3	0,2	0,02	89	82
0,2	0,1	0,01	92	109
0,3	0,1	0,01	60	33

Tabela A.7 - Resultados da segunda repetição dos ensaios de oxidação da Etapa 1 com AE1.

cloro livre (mg/L)	cloro residual (mg/L)		microcistinas -10 min (µg/L)	microcistinas - 30 min (µg/L)
	10 min	30 min		
0,0				106
1,5	0,0	0,0	147	138
0,7	0,0	0,0	85	60
0,8	0,0	0,0	121	124

Tabela A.8 - Resultados da terceira repetição dos ensaios de oxidação da Etapa 1 com AE1.

cloro livre (mg/L)	cloro residual (mg/L)		microcistinas -10 min (µg/L)	microcistinas - 30 min (µg/L)
	10 min	30 min		
0,0				<b>104</b>
2,1	0,7	0,0	112	117
2,4	0,0	0,0	153	94
2,1	0,0	0,0	141	150

Tabela A.9 - Resultados da quarta repetição dos ensaios de oxidação da Etapa 1 com AE1.

cloro livre (mg/L)	cloro residual (mg/L)		microcistinas -10 min (µg/L)	microcistinas - 30 min (µg/L)
	10 min	30 min		
0,0				<b>86</b>
4,8	2,0	0,0	74	70
4,8	0,2	0,1	88	138
3,2	0,1	0,1	133	70

Tabela A.10 - Resultados da quinta repetição dos ensaios de oxidação da Etapa 1 com AE1.

cloro livre (mg/L)	cloro residual (mg/L)		microcistinas -10 min (µg/L)	microcistinas - 30 min (µg/L)
	10 min	30 min		
<b>0,0</b>				<b>81</b>
10,4	0,1	0,1	3	2
12,2	0,0	0,0	4	2
10,9	0,1	0,1	2	2

### A.3 – RESULTADOS DOS ENSAIOS DA ETAPA 2

Tabela A.11 - Resultados da primeira repetição dos ensaios de oxidação da Etapa 2 com AE1.

cloro livre (mg/L)	cloro residual (mg/L)		microcistinas - 10 min (µg/L)	microcistinas - 30 min (µg/L)
	10 min	30 min		
0,0				<b>36</b>
0,6	0,02	0,02	49	39
0,2	0,02	0,02	50	40
0,3	0,03	0,02	44	49

Tabela A.12 - Resultados da segunda repetição dos ensaios de oxidação da Etapa 2 com AE1.

cloro livre (mg/L)	cloro residual (mg/L)		microcistinas - 10 min (µg/L)	microcistinas - 30 min (µg/L)
	10 min	30 min		
0,0				<b>22</b>
0,7	0,02	0,02	39	41
0,6	0,01	0,02	26	39
0,7	0,01	0,02	27	44

Tabela A.13 - Resultados da terceira repetição dos ensaios de oxidação da Etapa 2 com AE1.

cloro livre (mg/L)	cloro residual (mg/L)		microcistinas - 10 min (µg/L)	microcistinas - 30 min (µg/L)
	10 min	30 min		
0,0				<b>28</b>
1,9	0,04	0,02	49	48
1,7	0,05	0,01	40	48
1,9	0,04	0,01	35	50

Tabela A.14 - Resultados da quarta repetição dos ensaios de oxidação da Etapa 2 com AE1.

cloro livre (mg/L)	cloro residual (mg/L)		microcistinas - 10 min (µg/L)	microcistinas - 30 min (µg/L)
	10 min	30 min		
0,0				<b>49</b>
4,1	0,31	0,07	23	25
5,1	0,72	0,04	25	25
3,6	1,96	0,03	20	18

Tabela A.15 - Resultados da quinta repetição dos ensaios de oxidação da Etapa 2 com AE1.

cloro livre (mg/L)	cloro residual (mg/L)		microcistinas - 10 min (µg/L)	microcistinas - 30 min (µg/L)
	10 min	30 min		
0,0				<b>22</b>
2,8	0	0,27	1	0
7,4	0	1,13	1	0
9,9	0	2,22	1	0

## APÊNDICE B – RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS UTILIZANDO A ÁGUA DE ESTUDO AE2

Tabela B.1 - Resultados da primeira repetição dos ensaios de oxidação com AE2.

cloro livre(mg/L)	controle lago Paranoá (mg/L)		cloro residual (mg/L)		microcistinas -10 min (µg/L)	microcistinas - 30 min (µg/L)
	10 min	30 min	10 min	30 min		
0,0						23
0,4	0,4	0,1	0,0	0,0	37	37
0,4	0,1	0,1	0,0	0,0	42	37

Tabela B.2 - Resultados da segunda repetição dos ensaios de oxidação com AE2.

cloro (mg/L)	controle lago Paranoá (mg/L)		cloro residual (mg/L)		microcistinas -10 min (µg/L)	microcistinas - 30 min (µg/L)
	10 min	30 min	10 min	30 min		
0,0						28
0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	30	33
1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	47	35

Tabela B.3 - Resultados da terceira repetição dos ensaios de oxidação com AE2.

cloro (mg/L)	controle lago Paranoá (mg/L)		cloro residual (mg/L)		microcistinas -10 min (µg/L)	microcistinas - 30 min (µg/L)
	10 min	30 min	10 min	30 min		
0,0						28
2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	29	29
1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	29	29

Tabela B.4 - Resultados da quarta repetição dos ensaios de oxidação com AE2.

cloro (mg/L)	controle lago Paranoá (mg/L)		cloro residual (mg/L)		microcistinas -10 min (µg/L)	microcistinas - 30 min (µg/L)
	10 min	30 min	10 min	30 min		
0,0						34
3,7	2,2	1,8	0,1	0,1	20	15
4,2	2,0	2,2	0,1	0,1	9	4

Tabela B.5 - Resultados da quinta repetição dos ensaios de oxidação com AE2.

cloro (mg/L)	controle lago Paranoá (mg/L)		cloro residual (mg/L)		microcistinas -10 min (µg/L)	microcistinas - 30 min (µg/L)
	10 min	30 min	10 min	30 min		
0,0						37
8,0	3,7	3,7	0,1	0,6	2	1
9,8	4,4	4,1	0,6	0,3	0	5

Tabela B.6 – Resultados de absorvância em  $\lambda = 254$  nm medidos na água do Lago Paranoá e na água de estudo AE2.

cloro livre (mg/L)	Abs 254nm (cm <sup>-1</sup> ) - água do lago Paranoá			Abs 254nm (cm <sup>-1</sup> ) - água de estudo		
	inicial	10 min	30 min	inicial	10 min	30 min
<b>0,35</b>	0,033	0,043	0,054	0,036	0,061	0,054
<b>0,41</b>	0,033	0,044	0,039	0,036	0,064	0,055
<b>0,89</b>	0,044	0,062	0,032	0,048	0,092	0,057
<b>1,03</b>	0,044	0,065	0,044	0,048	0,084	0,05
<b>1,94</b>	0,044	0,042	0,043	0,046	0,067	0,067
<b>1,98</b>	0,044	0,037	0,042	0,046	0,076	0,066
<b>3,69</b>	0,044	0,036	0,038	0,046	0,068	0,07
<b>4,23</b>	0,044	0,035	0,033	0,046	0,07	0,07
<b>8,00</b>	0,034	0,057	0,055	0,059	0,099	0,083
<b>9,84</b>	0,034	0,054	0,055	0,059	0,093	0,082

## APÊNDICE C - RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS UTILIZANDO A ÁGUA DE ESTUDO AE3

Tabela C.1 - Resultados da primeira repetição dos ensaios de oxidação com AE3.

cloro livre (mg/L)	cloro residual (mg/L)		saxitoxinas -10 min (µg/L)			saxitoxinas - 30 min (µg/L)		
	10 min	30 min	neoSTX	dcSTX	STX	neoSTX	dcSTX	STX
0,0						99	3	3
0,6	0,0	0,0	99	5	4	93	6	5
0,7	0,0	0,0	106	9	7	96	7	6

Tabela C.2 - Resultados da segunda repetição dos ensaios de oxidação com AE3.

cloro livre (mg/L)	cloro residual (mg/L)		saxitoxinas -10 min (µg/L)			saxitoxinas - 30 min (µg/L)		
	10 min	30 min	neoSTX	dcSTX	STX	neoSTX	dcSTX	STX
0,0						118	8	7
1,1	0,0	0,0	95	5	5	208	36	28
1,4	0,0	0,0	198	37	28	203	33	26

Tabela C.3 - Resultados da terceira repetição dos ensaios de oxidação com AE3.

cloro livre (mg/L)	cloro residual (mg/L)		saxitoxinas -10 min (µg/L)			saxitoxinas - 30 min (µg/L)		
	10 min	30 min	neoSTX	dcSTX	STX	neoSTX	dcSTX	STX
0,0						234	51	37
2,0	0,0	0,0	170	68	45	242	64	45
2,4	0,0	0,0	184	70	44	219	55	37

Tabela C.4 - Resultados da quarta repetição dos ensaios de oxidação com AE3.

cloro livre (mg/L)	cloro residual (mg/L)		saxitoxinas -10 min (µg/L)			saxitoxinas - 30 min (µg/L)		
	10 min	30 min	neoSTX	dcSTX	STX	neoSTX	dcSTX	STX
0,0						118	8	7
5,1	0,0	0,0	142	24	18	147	27	21
5,5	0,1	0,0	140	25	18			

Tabela C.5 - Resultados da quinta repetição dos ensaios de oxidação com AE3.

cloro livre (mg/L)	cloro residual (mg/L)		saxitoxinas -10 min (µg/L)			saxitoxinas - 30 min (µg/L)		
	10 min	30 min	neoSTX	dcSTX	STX	neoSTX	dcSTX	STX
0,0						99	3	3
10,6	0,1	0,1	38	12	10	40	12	6
12,6	0,1	0,1	47	13	11	35	12	11