



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA – UEPB
PRÓ - REITORIA DE PÓS - GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

**AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA – LR NO TRATAMENTO
DE ÁGUA DE ABASTECIMENTO EM SISTEMA CONVENCIONAL SEGUIDO
POR PROCESSO OXIDATIVO AVANÇADO (POA)**

MARIA VIRGÍNIA DA CONCEIÇÃO ALBUQUERQUE

Linha de pesquisa: Tecnologias de Tratamento de Água e de Resíduos

CAMPINA GRANDE - PB

2017

MARIA VIRGÍNIA DA CONCEIÇÃO ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA – LR NO TRATAMENTO
DE ÁGUA DE ABASTECIMENTO EM SISTEMA CONVENCIONAL SEGUIDO
POR PROCESSO OXIDATIVO AVANÇADO (POA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de mestre.

ORIENTADOR: Prof^o Dr. WILTON SILVA LOPES

CO-ORIENTADOR: Prof^o. Dr. JOSIVANDRO DO NASCIMENTO SILVA

CAMPINA GRANDE - PB

2017

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

A345a Albuquerque, Maria Virgínia da Conceição.
Avaliação da degradação de microcistina-LR no tratamento de água de abastecimento em sistema convencional seguido por Processo Oxidativo Avançado (POA) [manuscrito] / Maria Virgínia da Conceição Albuquerque. - 2017.
126 p. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, 2017.

"Orientação: Prof. Dr. Wilton Silva Lopes, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental".

1. Tratamento de água. 2. Processo Oxidativo Avançado. 3. Microcistina-LR. I. Título.

21. ed. CDD 628.162

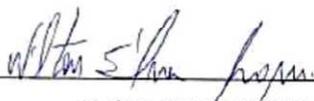
MARIA VIRGÍNIA DA CONCEIÇÃO ALBUQUERQUE

**AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA – LR NO TRATAMENTO
DE ÁGUA DE ABASTECIMENTO EM SISTEMA CONVENCIONAL SEGUIDO
POR PROCESSO OXIDATIVO AVANÇADO (POA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de mestre.

Aprovada em 20/06/2017

BANCA EXAMINADORA



Prof^o Dr. WILTON SILVA LOPES
(Orientador – Universidade Estadual de Paraíba – UEPB)



Dr. JOSIVANDRO DO NASCIMENTO SILVA
(Co - Orientador – Universidade Estadual de Paraíba – UEPB)



Prof^o Dr. MAURÍCIO LUÍZ SENS
(Examinador Externo – Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC)



Profa. Dra. BEATRIZ SUSANA OVRUSKI DE CEBALLOS
(Examinador Interno – Universidade Estadual de Paraíba – UEPB)

Dedicatória

Ao grandioso DEUS e a Virgem MARIA
por possibilitarem a minha existência e por
estarem presente em minha vida
iluminando-me em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus e a Virgem Maria, pela presença constante, fiel companhia, por me conduzir tão firmemente, não permitindo desistir, desanimar ou sequer fragilizar diante das dificuldades.

Aos meus pais, Josélia Albuquerque de Farias e Dorgival Cândido de Albuquerque, fonte de amor, força e coragem, por depositar toda confiança, acreditando em meus sonhos e objetivos.

Aos meus irmãos, Roberta Albuquerque, Dorgival Albuquerque e Danyllo Albuquerque pelo apoio, carinho, afeto, irmandade e companheirismo.

Ao meu nAMORado, Leonardo Martins pela paciência, amor, atenção, carinho, incentivo, ajuda efetiva (auxílio na construção do mapa e figuras) desta pesquisa.

Ao meu orientador, Wilton Silva Lopes, pela oportunidade, disposição, paciência e pelos conhecimentos transmitidos ao longo desses dois anos de orientação.

A Josivandro do Nascimento Silva, **co-orientador**, pela disponibilidade em ajudar, especialmente nas análises de CLAE-EM e gentileza em esclarecer qualquer dúvida.

A prof. Beatriz Ceballos, pelos ensinamentos, estímulos e conselhos, estando presente nas contribuições deste trabalho desde o início.

Ao técnico de laboratório, Vanderley Nascimento, por toda ajuda nas análises de COT e por estar por perto, auxiliando-me com equipamentos e materiais.

Aos alunos de iniciação científica: Josivaldo Sátiro e Suelly Fernandes por todo companheirismo e por toda ajuda ao longo desses dois anos. Em especial, a você meu amigo e irmão “Josis”, meu obrigado pela parceria.

A Railson de Oliveira: “Ramilson”, obrigada pelos ensinamentos, paciência, companheirismo no laboratório e toda na montagem do reator e filtro.

Aos meus colegas de turma 2015.2: Railson de Oliveira, Joelma Duarte, Renata Machado, Emanuelle Avelino, Roberta Milena Moura, Érica Bento e Bismarck Kushiator, as disciplinas cursadas ao lado de vocês foram fantásticas.

As Mestres: Geovânia Cordeiro, Yohanna Kafkle e Ysa Helena. **As mestrandas**: Ana Alice e Amanda Barbosa. **A Doutora**: Andreza Miranda, e **doutorandas**: Fernanda Patrício, Elaine Gurjão, Wilza Silva, Edilma Bento e Célia Maria companheiras de laboratórios, por ensinarem o valor e força de um grupo, pelas discussões de dados e troca de experiências.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba, em especial aos professores Valderi Leite e José Tavares e aos secretários Josemberg e Nadilma por sempre se dispor e ajudar.

À CAPES pela concessão da bolsa e **à FUNASA** por ter subsidiado a pesquisa.

“ Entre o desejo e o alcance, apenas dois
moradores: esforço e determinação ”

(Lavínia Lins)

RESUMO

Dentre os efeitos deletérios provocados pelo processo de eutrofização de águas naturais, importante destaque deve ser dado ao surgimento de florações de cianobactérias e a consequente geração de cianotoxinas de potente efeito hepatotóxico (ex. microcistina-LR). Em geral, tratamentos convencionais para potabilização da água se mostram ineficientes para a remoção destes micropoluentes, o que tem estimulado o estudo de novas alternativas de tratamento. Os processos oxidativos avançados têm sido uma alternativa de grande interesse devido ao seu potencial como alternativas ou complementos aos processos convencionais de tratamento de água, uma vez que os radicais hidroxila gerados são altamente reativos e pouco seletivos, podendo atuar na oxidação química de uma vasta gama de substâncias. Estes processos geralmente envolvem geração de espécies altamente oxidantes e não seletivas, como o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e, em alguns casos, o oxigênio, sendo assim, eficientes na remoção de diversos contaminantes. O principal objetivo deste trabalho foi verificar a potencialidade de dois processos oxidativos avançados: o UV/H₂O₂ e Fenton em relação ao tratamento de águas destinadas a abastecimento público contaminadas por microcistina-LR. Para isso, a pesquisa foi dividida em três etapas. No primeiro momento foi realizado a validação de método analítico por meio da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) para identificação e quantificação da toxina citada, descrito no capítulo 1. O capítulo 2 descreve a eficiência do tratamento convencional seguido do processo oxidativo avançado (UV/H₂O₂) em relação ao tratamento de água destinada a abastecimento público com ênfase na eficiência de um reator fotocatalítico de baixo custo para degradação de microcistina-LR. Em seguida, o terceiro e último capítulo apresenta a utilização de reagente Fenton como coagulante, seguido de floculação, sedimentação e filtração, com objetivo de remoção de turbidez, cor aparente e verdadeira e microcistina-LR também presente em água de abastecimento público.

Palavra-Chave: Tratamento de água. Processo Oxidativo Avançado. Microcistina-LR.

ABSTRACT

Among the deleterious effects caused by the process of eutrophication of natural waters, an important highlight should be the appearance of cyanobacterial blooms and the consequent generation of cyanotoxins with a potent hepatotoxic effect (eg microcystin-LR). In general, conventional treatments for water purification are inefficient for the removal of these micropollutants, which has stimulated the study of new treatment alternatives. The advanced oxidative processes have been an interesting alternative because of their potential as alternatives or complements to conventional processes of water treatment, since the hydroxyl radicals generated are highly reactive and not selective, and can act in the chemical oxidation of a wide range of substances. These processes generally involve the generation of highly oxidizing and non-selective species, such as the hydroxyl radical (\bullet OH) and, in some cases, oxygen, thus being efficient in the removal of various contaminants. The main objective of this work was to verify the potential of two advanced oxidative processes: UV/H₂O₂ and Fenton in relation to the treatment of water destined for public supply contaminated by microcystin-LR. For this, the research was divided into three stages. In the first stage, the validation of the analytical method was carried out using high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS) for identification and quantification of the toxin described in Chapter 1. Chapter 2 describes the efficiency of conventional treatment followed by the advanced oxidative process (UV/H₂O₂) in relation to the treatment of water intended for public supply with emphasis on the efficiency of a low cost photocatalytic reactor for microcystin-LR degradation. Then, the third and final chapter presents the use of Fenton reagent as coagulant, followed by flocculation, sedimentation and filtration, with the purpose of removing turbidity, apparent and true color and microcystin-LR also present in public water supply.

Keyword: Water treatment. Advanced Oxidative Process. Microcystin-LR

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Etapas envolvidas na SPE.....	36
Figura 2. Curva de calibração para microcistina-LR.....	38
Figura 3. Curva de calibração em matriz real.....	40
Figura 4. Função de densidade de probabilidade T de Student.....	46

CAPÍTULO 2

Figura 1. Estrutura geral da microcistina – LR.....	59
Figura 2. Cultivo da Cepa <i>Microcystis aeruginosa</i>	74
Figura 3. Mapa de localização do reservatório de estudo.....	76
Figura 4. Curva analítica para determinação do COT.....	78
Figura 5. Sistema experimental para tratamento de água com microcistina –LR	79
Figura 6. Filtro de areia.....	80
Figura 7. Estrutura do reator fotocatalítico. Em (A) Dimensões da estrutura externa do reator, (B) Dimensões do tubo de quartzo e lâmpada UV (C) reator com tubo de quartzo e lâmpada UV.....	81
Figura 8. Diagrama de coagulação com sulfato de alumínio em função da cor aparente para água de estudo.....	84
Figura 9. Variação do pH em função do tempo de oxidação no reator fotocatalítico utilizando (UV/H ₂ O ₂).....	87
Figura 10. Variação do potencial redox em função do tempo de oxidação no reator fotocatalítico utilizando (UV/H ₂ O ₂).....	88
Figura 11. Variação da concentração de microcistina-LR em função do tempo de oxidação no reator fotocatalítico utilizando (UV/H ₂ O ₂)	89
Figura 12. Variação do peróxido residual em função do tempo de oxidação no reator fotocatalítico utilizando (UV/H ₂ O ₂)	90
Figura 13. Concentração de Carbono Orgânico Total e Cor Verdadeira para as dosagens de utilizadas no reator fotocatalítico.....	91
Figura 14. Espectro da fragmentação da MC-LR obtido no Tratamento T6.....	92

CAPÍTULO 3

Figura 1. Cor aparente remanescente após oxidação Fenton, decantação e filtração...	116
Figura 2. Cor verdadeira remanescente após oxidação Fenton, decantação e filtração.	116
Figura 3. Turbidez remanescente após oxidação Fenton, decantação e filtração.....	117
Figura 4. Microcistina - LR remanescente após oxidação Fenton, decantação e filtração.....	118
Figura 5. Peróxido Residual remanescente após o processo de filtração.....	119
Figura 6. Espectro da fragmentação da MC-LR obtido no Tratamento.....	121

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Metodologias de EFS utilizadas para preparo de amostra de microcistina-LR	23
Tabela 2. Métodos de detecção da toxina desenvolvidos por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	24
Tabela 3. Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos.	28
Tabela 4. Recuperação do analito em função da concentração	33
Tabela 5. Descrição dos parâmetros utilizados na análise por CLAE/EM	34
Tabela 6. Concentrações dos padrões e valores médios das injeções	38
Tabela 7. Injeções para o cálculo da precisão	39
Tabela 8. Média e desvio padrão da série de injeções	40
Tabela 9. Médias e desvio padrão de cada concentração da série de injeções para os dados da que plotaram a curva da Figura 2.	40
Tabela 10. Cálculos de limite analítico na matriz de estudo 1	43
Tabela 11. Cálculos de limite analítico na matriz de estudo 2	43
Tabela 12. Valores de média, coeficiente de variação e T de Student	45

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Principais variáveis da microcistina	60
Tabela 2. Valores recomendados para os parâmetros hidráulicos da floculação	64
Tabela 3. Classificação dos sistemas típicos de processos oxidativos avançados	69
Tabela 4. Vantagens e desvantagens do processo fotocatalítico UV/H ₂ O ₂	73
Tabela 5. Composição das soluções do meio de cultura ASM-1	75
Tabela 6. Parâmetros analisados na caracterização da água de estudo e métodos utilizados	77
Tabela 7. Parâmetros de controle utilizados nos ensaios de coagulação, floculação e sedimentação	79
Tabela 8. Características do filtro de areia	80
Tabela 9. Parâmetros monitorados na operação do reator fotocatalítico	82
Tabela 10. Caracterização da água bruta e água de estudo	82
Tabela 11. Parâmetros analisados durante o tratamento convencional da água	85

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Relação do pH da solução e as espécies de ferro	108
Tabela 2. Parâmetros de caracterização da água de estudo e métodos utilizados.	112
Tabela 3. Dosagens de Fe ²⁺ e H ₂ O ₂ para cada tratamento testado.	114
Tabela 4. Caracterização da água de estudo.	115
Tabela 5. Principais fragmentos identificados com sua respectiva m/z.	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE – Água de Estudo

AD – Água decantada

AF – Água filtrada

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CAGEPA – Companhia de Água e Esgoto da Paraíba

CLAE/ EM – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

COT – Carbono orgânico total

CV- Coeficiente de variação

DP – Desvio Padrão

DPR – Desvio Padrão Relativo

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EFS – Extração de Fase Sólida

ETA – Estação de Tratamento de Água

EXTRABES – Estação Experimental de Tratamento Biológico de Esgotos Sanitários

FLA – Filtro de Laboratório de Areia

Gmf – Gradiente de velocidade médio de floculação

Gmr – Gradiente de velocidade médio mistura rápida

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INJ – Injeção

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LAQUISA – Laboratório de Química e Sanitária Ambiental

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

LR- Leucina-Arginina

MC – Microcistina

MIB – 2-metilisoborneol

pH – Potencial hidrogeniônico

POA – Processo Oxidativo Avançado

PVC - Policloreto de polivinila

RR - arginina-Arginina

STX – Saxitoxina

SFE – Extração de fase sólida

TAS – Taxa de aplicação superficial

Tf – Tempo de floculação

Tmr – Tempo de mistura rápida

UEPB – Universidade Estadual da Paraíba

VMP – Valor Máximo Permitido

Vs – Velocidade de sedimentação

WAC – poliidroxiclorosulfato de alumínio

YA- Tirosina-Alanina

YR -Tirosina-Arginina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO 1	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1. Detecção e quantificação de MC-LR por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM)	23
2.2. Validação do método analítico para a determinação da Microcistina-LR.....	25
2.2.1. Especificidade e Seletividade	25
2.2.2. Linearidade	26
2.2.3. Precisão	27
2.2.4. Intervalo	27
2.2.5. Repetitividade	28
2.2.6. Limite de Detecção (LD)	29
2.2.7. Limite de Quantificação (LQ)	30
2.2.8. Exatidão	31
2.2.9. Robustez	31
2.2.10. Recuperação e Incerteza de medição	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1.1. Especificidade – seletividade	37
4.1.2. Linearidade	37
4.1.3. Precisão	39
4.1.4. Limite de detecção (LD).	41
4.1.5. Limite de quantificação (LQ).	41
4.1.6. Intervalo.	44
4.1.7. Exatidão	45
5. CONCLUSÃO	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
CAPÍTULO 2	50
1. INTRODUÇÃO.	53
2. OBJETIVOS	54
2.1. GERAL	54
2.2. ESPECÍFICOS	54
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	55
3.1. Qualidade e eutrofização dos corpos hídricos	55
3.2. Cianobactérias e cianotoxinas	56
3.2.1. Cianotoxinas	58
3.3. Legislação: Padrões e limites nacionais para cianotoxinas	61
3.4. Tecnologias de tratamento de água e remoção de cianotoxinas	63
3.4.1. Coagulação e floculação	63
3.4.2. Sedimentação – Decantação	64
3.4.2.1. Decantador convencional de escoamento horizontal	65
3.4.2.2. Decantador convencional de escoamento vertical ascendente	65

3.4.2.3. Decantador de alta taxa	65
3.4.3. Filtração	66
3.4.4. Desinfecção	67
3.5. Processos Oxidativos Avançados (POAS) no tratamento de água	68
3.5.1. Processo Oxidativo Avançado UV/ H ₂ O ₂	70
4. MATERIAL E MÉTODOS	73
4.1. Local da Pesquisa	73
4.2. Cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i>	73
4.3. Extração da microcistina-LR	74
4.4. Coleta da Água Bruta (AB)	75
4.5. Preparação da água de estudo (AE)	76
4.6. Procedimento Experimental	78
4.6.1. Etapa I: Construção dos diagramas de Coagulação	79
4.6.2. Etapa II: Tratamento Convencional	80
4.6.3. Etapa III: Processo Oxidativo Avançado (POA) utilizando UV/ H ₂ O ₂	81
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
5.1. Caracterização da água bruta (AB) e água de estudo (AE)	82
5.2. Definição das condições ótimas de coagulação	83
5.3. Ensaio de coagulação, floculação, sedimentação e filtração direta	84
5.4. Processo Oxidativo Avançado (POA) utilizando UV/ H ₂ O ₂	86
5.4.1. Potencial Hidrogeniônico (pH)	87
5.4.2. Potencial Redox (mV)	87
5.4.3. Microcistina – LR.....	88
5.4.4. Peróxido Residual	90
5.4.5. Carbono orgânico total (COT) e Cor Verdadeira	90
5.5. Subprodutos formados nos processos da oxidação da Microcistina-LR	91
6. CONCLUSÃO	93
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
CAPÍTULO 3	102
1. INTRODUÇÃO	105
2. OBJETIVOS	106
2.1. GERAL	106
2.2. ESPECÍFICOS.....	106
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	107
4. MATERIAL E MÉTODOS	111
4.1. Local da pesquisa e descrição geral	111
4.2. Preparação e caracterização da água de Estudo (AE)	112
4.3. Ensaio de oxidação	113
4.4. Parâmetros de controle	114
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	114
5.1. Caracterização da água de estudo	114
5.2. Ensaio de oxidação seguidos de coagulação, floculação, sedimentação filtração.....	115
5.2.1. Cor Aparente e Verdadeira.....	115
5.2.2. Turbidez	117
5.2.3. Microcistina – LR.....	118
5.2.4. Peróxido Residual	119

5.3. Subprodutos formados nos processos da oxidação da Microcistina-LR.....	120
6. CONCLUSÃO	122
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
CONCLUSÃO GERAL	125

INTRODUÇÃO GERAL

Os impactos gerados sobre os recursos hídricos resultante das atividades antropogênicas constituem uma das grandes preocupações ecológicas dos últimos anos. A má gestão do uso do solo, aliada ao crescimento da população e a expansão industrial observada nas últimas décadas tem resultado no decréscimo da qualidade da água de rios, lagos e reservatórios.

Os reflexos dessas modificações têm sido constatados por meio do excesso de nutrientes nos ecossistemas aquáticos, especificamente o nitrogênio e o fósforo, que se apresentam como os principais responsáveis pelo processo de eutrofização dos corpos de água e tem como principal efeito, a proliferação excessiva de produtores primários tais como cianobactérias, microalgas e plantas aquáticas (DUPASA et al., 2015).

A maior expressão deste fenômeno se observa quando corpos aquáticos ficam cobertos por uma densa camada verde comumente denominada “floração” ou “bloom”. Nas florações, as cianobactérias atingem concentrações superiores à $10^5 - 10^7$ células.ml⁻¹, que junto com as microalgas e diversas bactérias afetam a qualidade da água do manancial e as etapas do tratamento de potabilização (WU e XANG, 2012).

No Brasil, as florações nos mananciais vêm aumentando em intensidade e frequência, com dominância de cianobactérias durante grande parte do ano. A expansão dessas florações, é atribuída a fatores como temperaturas constantemente elevadas e alta luminosidade, típicos de clima tropical no nordeste brasileiro. Por outro lado, embora a sazonalidade do clima subtropical atenuem estes fatores, as florações também são comuns no sul e sudeste do Brasil, sendo frequentemente observadas durante as estações mais quentes do ano (GÉLINAS et al., 2012).

A espécie *Microcystis aeruginosa* é uma das cianobactérias formadoras de florações comumente encontradas em ecossistemas de água doce e recebe grande atenção das pesquisas pela sua ampla distribuição geográfica em todos os continentes e pela frequente produção de microcistinas. Presentes em mananciais do Nordeste Brasileiro, esta espécie produz a toxina microcistina-LR - tipo de hepatotoxina constituída por sete aminoácidos, sendo cinco fixos e dois variáveis. Caracterizada também pelo arranjo dos seus aminoácidos, variação em nível de metilação e hidroxilação, sequência de peptídeos

(WELKER & VON DÖHREN, 2006) podem causar intoxicações agudas e crônicas, que dependendo da dose ingerida, possibilita a morte de animais em algumas horas ou dias.

A toxicidade das microcistinas, assim como sua ocorrência em águas superficiais destinadas ao abastecimento público, excitou a indicação do limite máximo de $1\mu\text{g.L}^{-1}$ em água para consumo humano pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Este valor corresponde ao valor máximo permitido das variantes de microcistinas nas formas intracelular e extracelular, ou dissolvida. Seguindo tal indicação, no Brasil, o monitoramento da qualidade da água de abastecimento, regido pela Portaria 2914/11 do Ministério da Saúde, estabeleceu o valor máximo permitido (VMP) de $1\mu\text{g.L}^{-1}$ para a soma das variantes de microcistinas em água de abastecimento.

A remoção de microcistinas da água de abastecimento a partir do tratamento do tipo convencional (comumente empregado) é considerada efetiva quando estas toxinas se encontram na forma intracelular. No entanto, o mesmo tratamento não é satisfatório no caso da cianotoxina se encontrar na forma dissolvida. A dificuldade de remoção de microcistinas dissolvidas pelos sistemas de tratamento usualmente empregado, tem intensificado a busca por tecnologias operacionalmente e economicamente viáveis para o efetivo cumprimento da legislação vigente no que tange a concentração de microcistinas na água de abastecimento (DI BERNARDO et al., 2010).

Os Processos Oxidativos Avançados (POAs), são tecnologias alternativas para degradação dos poluentes a substâncias mais facilmente degradáveis, alterando a estrutura química, tornando-as em substâncias inofensivas ou inertes, tais como dióxido de carbono e água. Estes processos caracterizam-se por serem diferentes sistemas reacionais em que o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) participa como principal agente oxidante. Este radical apresenta elevado poder oxidativo ($E^\circ = 2,8 \text{ V}$) que permite a completa mineralização de inúmeras espécies químicas de grande impacto ambiental, podendo reagir através de três mecanismos distintos: abstração de hidrogênio, transferência de elétrons ou adição radicalar (SIMONSEN et al., 2010; RIZZO, 2011; PONTES e PINTO, 2011), e ser gerados a temperatura ambiente, recorrendo-se a processos homogêneos ou heterogêneos, na presença ou não de radiação.

Os sistemas heterogêneos são caracterizados pelo uso de catalisadores sólidos, como a fotocatalise heterogênea que utiliza o dióxido de titânio (TiO_2) como catalisador, enquanto os sistemas homogêneos envolvem o uso de oxidantes como ozônio, ferro e

peróxido de hidrogênio (ABDESSALEM et al., 2010; KLAMERTH et al., 2011; NAVARRO et al., 2010; PONTES e PINTO, 2011). Enquanto os processos homogêneos, caracterizam-se por ocorrerem numa fase única. Dentro destes processos se faz a utilização de ozônio, peróxido de hidrogênio e do Reagente de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$) como geradores de radicais, na presença ou na ausência de irradiação luminosa.

O sistema fotocatalítico homogêneo UV/ H_2O_2 consiste na formação de radicais hidroxila obtidos através da fotólise do peróxido de hidrogênio pela radiação ultravioleta. O radical $\cdot\text{OH}$ é um forte agente oxidante, muito reativo e de reduzida seletividade, sendo eficiente na degradação de diferentes cianotoxinas (BRUNO, 2011). O mecanismo caracteriza-se pela clivagem homolítica de uma molécula de peróxido de hidrogênio, através da ação da radiação UV em comprimentos de onda menores que 280 nm, com formação de dois radicais hidroxila (Equação 1):



Para a fotólise do H_2O_2 utiliza-se normalmente lâmpadas a vapor de mercúrio de baixa ou media pressão. Cerca de 50% do consumo energético se perde na forma de calor ou de emissões abaixo de 185 nm, que são absorvidas pelo bulbo de quartzo que envolve a lâmpada. Como a absorção do H_2O_2 é máxima em 220 nm, seria conveniente utilizar lâmpadas de Xe/Hg. Porém, devido ao seu alto custo, normalmente lâmpadas com comprimento de onda 254 nm são normalmente utilizadas (FREITAS, 2008).

O uso deste processo oferece algumas vantagens: o H_2O_2 é um oxidante comercialmente acessível pelo baixo custo, termicamente estável e pode ser armazenado no próprio local, desde que os devidos cuidados sejam respeitados. Como possui altíssima solubilidade em água, não existem problemas de transferência de massa associados aos gases, como por exemplo, no caso do ozônio pois os produtos da oxidação são geralmente compostos oxigenados de baixo peso molecular que são facilmente biodegradados ou, em alguns casos, os compostos orgânicos são reduzidos a dióxido de carbono e água (SOUZA et al.; 2014).

Caracterizado por induzir a redução catalítica em soluções aquosas de H_2O_2 e de Fe^{2+} (íons ferrosos) a Fe^{3+} (íons férricos) conforme (equação 2), o processo Fenton ($\text{Fe}^{2+} / \text{H}_2\text{O}_2$) também pode ser utilizado na degradação de cianotoxinas.



2

A facilidade de integração com processos existentes de tratamento de água (como a coagulação, filtração e oxidação biológica) melhoram a qualidade organoléptica da água, possibilitando o tratamento *in situ*, o custo e manuseio dos reagentes (ferro e H_2O_2) propiciam que o processo Fenton seja rentável e praticamente viável aumentando a eficiência da mineralização e a transformação de poluentes orgânicos em produtos não-tóxicos (BOKARE et al., 2014; BRITO, 2012; GAJDEK et al., 2001). A desvantagem deste processo reside no fato dele não possuir uma ação prolongada, cessando tão logo quando todo o peróxido se tenha decomposto. Além disso, o processo requer um pH específico (ácido $\text{pH} < 3,0$) para que ele ocorra com eficiência, o que muitas vezes, é difícil de ser obtido em matrizes ambientais ou pode causar perturbações ainda mais graves que a própria contaminação em si (BOKARE et al., 2014).

Assim sendo, esta dissertação apresenta a avaliação da eficiência da degradação de microcistina-LR em água de abastecimento, utilizando distintos processos oxidativos avançados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDESSALEM, A. K.; BELLAKHAL, N.; OTURAN, N.; DACHRAOUI, M.; Mehmet A. OTURAN, M. A. Treatment of a mixture of three pesticides by photo-and electro-Fenton processes. **Desalination**, v. 250, p. 450-455, 2010.

BRITO, N.N.; SILVA, V.B.M. Processo oxidativo avançado e sua aplicação ambiental. **Revista Eletrônica de Engenharia Civil**, v.3, p.36-47, 2012.

BRUNO, C.B. Contribuição para o estudo da utilização de materiais fotocatalíticos para degradação de cianobactérias e microcistinas em massas de águas naturais. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Ciência e Tecnologia. Lisboa, Portugal. 2011. 110p.

DI BERNARDO. L; MINILLO, A.; DANTAS. A.D.B. **Florações de algas e cianobactérias: suas influências na qualidade da água e nas tecnologias de tratamento**, São Carlos: LDIBE, 2010.

FREITAS, A. M. Utilização de processos oxidativos avançados para remediação de águas contaminadas por toxinas produzidas por cianobactérias. **Tese (Doutorado em Química)** – Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 132f. 2008.

GÉLINAS M, JUNEAU P, GAGNÉ, F. Early biochemical effects of *Microcystis aeruginosa* extracts on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B 161 261–267, 2012.

KLAMERTH, N.; MALATO, S.; MALDONADO, M. I.; AGÜERA, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. Modified photo-Fenton for degradation of emerging contaminants in municipal wastewater effluents. **Catalysis Today**, v. 161, p. 241-246, 2011.

NAVARRO, R. R.; ICHIKAWA, H.; TATSUMI, K. Ferrite formation from photo-Fenton treated wastewater. **Chemosphere**, v. 80, p. 404-409, 2010.

PONTES, R. F. F.; PINTO, J. M. Optimal synthesis of Fenton reactor networks for phenol degradation. **Chemical Engineering Research and design**, v. 89, p. 706-721, 2011.

SIMONSEN, M. E.; MUFF, J.; BENNEDSEN, L. R.; KOWALSKI, K. P.; SØGAARD, E. G. Photocatalytic bleaching of p-nitrosodimethylaniline and a comparison to the performance of other AOP technologies. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 216, p. 244-249, 2010.

SOUZA, I. D; FAZA, L.P; JUSTO, R. M. **Processos Oxidativos Avançados**. UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA. 2014.

WU, F.F.; XANG, X. Eutrophication Evaluation Based on Set Pair Analysis of Baiyangdian Lake, North China. **Procedia Environmental Sciences**, v. 13, p. 1030-1036, 2012.

Capítulo 1

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE MICROCISTINA- LR POR MEIO DA CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLAE-EM)

RESUMO

Existem diversos métodos analíticos utilizados para detectar e quantificar cianotoxinas dissolvidas (fração extracelular) na água e em células de cianobactérias (fração intracelular). Esses métodos podem variar quanto ao nível de sofisticação bem como ao grau de informações que eles fornecem. Métodos relativamente simples e com baixo custo podem ser usados para avaliar rapidamente o risco potencial da presença dessas toxinas em água e permitir a agilidade na tomada de decisões. Por outro lado, técnicas analíticas podem ser aplicadas para determinar com maior precisão, o tipo e a quantidade de cianotoxinas. Os testes cromatográficos são eficientes na separação e quantificação da toxina em amostras de águas. Por se tratar de um método analítico, estes testes necessitam ser validados para serem aprovados e registrados na Secretaria de Vigilância da Saúde. Os parâmetros normalmente utilizados para a validação de métodos quantitativos são: especificidade ou seletividade, linearidade, intervalo, precisão, repetitividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, robustez, recuperação e incerteza de medição. Sendo assim, este capítulo teve como objetivo validar o método analítico de determinação de MC-LR com uso de (CLAE-EM). A validação foi executada de acordo com a Resolução 889/2003 da ANVISA e normatização do INMETRO 2016. No estudo, os parâmetros avaliados apresentaram resultados considerados satisfatórios para validação do método para determinação de MC-LR pois estão dentro dos valores sugeridos das normativas. Obteve-se linearidade na faixa de 0,1 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($r > 0,99$). Os ensaios de recuperação estão dentro dos critérios estabelecidos para a faixa trabalhada, com recuperação entre 60 e 115%. A técnica de CLAE/EM se mostrou bastante sensível para detecção e quantificação do analito, obtendo-se valores de LD e LQ abaixo do valor máximo permitido na água de consumo humano ($<1 \mu\text{g L}^{-1}$) segundo prescrito pela legislação brasileira. A precisão foi avaliada pela determinação da repetibilidade (precisão intra-corrída) por concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação. O teste de % de recuperação em função da concentração média e o teste T de Student apresentaram concordância sobre a afirmação da exatidão da validação.

Palavras-Chave: Validação. CLAE-EM. Microcistina-LR

ABSTRACT

There are several analytical methods used to detect and quantify dissolved cyanotoxins (extracellular fraction) in water and in cyanobacteria cells (intracellular fraction). These methods can vary as to the level of sophistication as well as the degree of information they provide. Relatively simple and inexpensive methods can be used to quickly assess the potential risk of the presence of these toxins in water and allow agility in decision making. On the other hand, analytical techniques can be applied to more precisely determine the type and amount of cyanotoxins. Chromatographic tests are efficient in the separation and quantification of toxin in water samples. The parameters normally used for the validation of quantitative methods are: specificity or selectivity, linearity, interval, precision, repeatability, limit (LD), limit of quantification (LQ), accuracy, robustness, recovery and uncertainty of measurement. Thus, this chapter aimed to validate the analytical method for the determination of MC-LR with the use of (HPLC-EM). Validation was performed in accordance with ANVISA Resolution 889/2003 and INMETRO 2016 standardization. The parameters evaluated presented satisfactory results for validation of the method for the determination of MC-LR, since they are within the suggested values of the standards. Linearity was obtained in the range of 0.1 to 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($r > 0.99$). The recovery trials are within the established criteria for the worked range, recovering between 60 and 115%. The HPLC / MS technique proved to be very sensitive for the detection and quantification of the analyte, resulting in values of LD and LQ below the maximum value allowed in water for human consumption ($< 1 \mu\text{g.L}^{-1}$) as prescribed by Brazilian legislation. Precision was assessed by determining repeatability (intra-run precision) by agreement between the results within a short period of time, with the same analyst and the same instrumentation. The % recovery test as a function of the mean concentration and the Student's T test showed agreement on the affirmation of the validation accuracy.

Keywords: Validation. HPLC-MS. Microcystin-LR

1. INTRODUÇÃO

A eutrofização é apontada como um dos principais fatores responsáveis pelo aumento das florações de cianobactérias. Essas florações promovem a deterioração da qualidade da água e constituem um sério risco à saúde pública, sobretudo porque as cianobactérias produzem metabólitos tóxicos denominados cianotoxinas que podem causar graves irritações na pele, além de efeitos neurotóxicos e hepatóxicos.

Existem diversos métodos analíticos utilizados para detectar e quantificar cianotoxinas dissolvidas (fração extracelular) na água e em células de cianobactérias (fração intracelular). Esses métodos podem variar quanto ao nível de sofisticação bem como ao grau de informações que eles fornecem. Métodos relativamente simples e com baixo custo podem ser usados para avaliar rapidamente o risco potencial da presença dessas toxinas em água e permitir a agilidade na tomada de decisões. Por outro lado, técnicas analíticas sofisticadas podem ser aplicadas para determinar com maior precisão, o tipo e a quantidade de cianotoxinas. Tanto as técnicas quanto as metodologias podem ser selecionadas dependendo dos equipamentos e do grau de especificidade e do tipo de informação requerida.

As principais metodologias de detecção e quantificação de microcistinas em amostras de água dividem-se em físico-químicas (CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), bioquímicas (ensaio de inibição da fosfatase, ELISA, biologia molecular) ou biológicas (bioensaios, testes de toxicidade) (MCELHINEY E LAWTON, 2005).

Os testes cromatográficos constituem um método analítico de referência nas análises de microcistinas, eficiente na separação e quantificação dessas toxinas em amostras de águas. Contudo, por se tratar de um método analítico, os testes cromatográficos necessitam ser validados para serem aprovados e registrados na Secretaria de Vigilância da Saúde (BRASIL, 2006).

Assim, este capítulo teve como objetivo validar o método analítico de determinação de MC-LR por meio da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção por espectrometria de massas (CLAE-EM).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Detecção e quantificação de MC-LR por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM)

Grande parte dos estudos que quantificam a cianotoxina microcistina-LR por CLAE tem recorrido a EFS como etapa de preparo de amostras, especialmente em amostras com matrizes complexas. Na Tabela 1 apresenta as metodologias de EFS utilizadas para preparo de amostra de microcistina-LR.

Tabela 1. Metodologias de EFS utilizadas para preparo de amostra de microcistina-LR

Preparo de Amostra por Método de Extração em Fase Sólida (EFS)					
Cartucho	Condicionamento	Vazão da Amostra (mL.min⁻¹)	Clean up	Efluente	Autor
C18	10 mL MeOH + 10 mL MeOH 20%	1	MeOH: H ₂ O (10:90)	MeOH, clorofórmio e hexano	Ramanan, et al., (2000)
HLB	MeOH em Ácido Acético (0,1 M)	-	MeOH: H ₂ O (30:70) em Ácido Acético (0,1 M)	MeOH	Yuan, et al., (2006)
C18	10 mL MeOH + 10 mL H ₂ O	< 10	-	MeOH	Reilly e Codd (2007)
C18	10 mL ACN + 10 mL H ₂ O	5	H ₂ O	ACN	Momani et al. (2008)
C18	10 mL MeOH + 10 mL H ₂ O	5	MeOH: H ₂ O (90:10) em 0,1% TFA	MeOH	Mekebri et al. (2009)
HLB	10 mL MeOH 10% + 10 mL MeOH 20%	5	MeOH: H ₂ O (10:90) + MeOH: H ₂ O (20:80)	MeOH (80%)	Miao et al. (2010)
C18	10 mL MeOH	-	MeOH: H ₂ O (20:80)	MeOH	Pinho (2014)

Fonte: Autor, 2017.

Quando se necessita da confirmação e identificação da cianotoxina analisada, um método muito utilizado e sofisticado como o CLAE (Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas) pode ser empregado. Este método provê a melhor solução para

identificação, pois usa como ferramenta de detecção, além da prévia separação pela cromatografia a líquido, a identificação dos íons gerados pela fragmentação das moléculas sob estudo, produzindo um espectro de massas. Portanto, este método permite a separação e identificação simultânea de compostos (MSAGATI et al., 2006).

Através da cromatografia líquida, limites de quantificação relativamente baixos podem ser obtidos e subprodutos de degradação avaliados (PINHO, 2014). Assim, vários métodos de detecção da toxina foram desenvolvidos por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Tabela 2).

Tabela 2. Métodos de detecção da toxina desenvolvidos por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Quantificação de Microcistinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)								
Equipamento	Matriz	F.E	Volume de Injeção (µL)	F.M	Vazão F.M (mL min ⁻¹)	Temperatura (°C)	LD (µg L ⁻¹)	Autor
CLAE-EM	Meio reacional de AOP	Coluna C18 (300 x 3,9 mm d.i.)	20	MeOH: H ₂ O (90:10) em 0,1% TFA)	1	-	0,2	Mekebri et al., (2009)
CLAE-DAD	Meio reacional de AOP	Coluna C18 (150 x 2,1 mm d.i., 3,5µm)	-	Ácido Trifluoroacético 0,1% e Acetonitrila (35%:65%) (Eluição Isocrática	0,3	-	-	Miao et al., (2010)
CLAE-DAD	Extrato concentrado de cianobactérias	C18 (15 cm x 3,9 mm d.i., 5µm)	25	ACN: H ₂ O, ambos acidificados com TFA 0,1%	-	40	1	Pichardo e Pflugmacher (2011)
CLAE (detector de Espectrometria de Massas Ion Trap)	Biológica (plasma e bile de peixe)	C18 (100 x 2,1 mm d.i.)	10	0,05% Ácido Fórmico em Acetonitrila e 0,05% Ácido Fórmico em Água Ultra-pura (Eluição Gradiente)	0,2	40	6	Li et al., (2014)
CLAE - DAD	Meio reacional de AOP	C18 (25 cm x 4,6 mm d.i., 5µm)	20	MeOH: H ₂ O, ambos acidificados com TFA 0,1%	0,9	45	200	Pinho (2015)

Fonte: Autor, 2017. **Legenda:** (-). Não informado; F.E: Fase estacionária; F.M: Fase móvel; (λ) Comprimento de onda; (d.i): Diâmetro interno; LD: Limite de detecção.

2.2 Validação do método analítico para a determinação da microcistina-LR

A validação é realizada para garantir que a metodologia analítica seja exata, reprodutível e flexível numa faixa específica, em conformidade com as exigências legais ou com o fim proposto pelo método analítico.

A primeira etapa da validação é a definição de uma condição analítica proveniente de uma revisão da literatura e de um desenvolvimento prático. É necessário que a melhor condição esteja padronizada para se iniciar os testes de validação. Em relação aos métodos cromatográficos, esta padronização deve considerar a influência da variação causada pelo uso de diferentes lotes e/ou fabricantes de colunas, da variação da temperatura, da composição da fase móvel e do pH da fase móvel.

Os testes de validação envolvem a avaliação de diferentes parâmetros de desempenho do método, conhecidos como parâmetros de validação que são: especificidade ou seletividade, linearidade, intervalo, precisão, repetitividade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, robustez, recuperação e incerteza de medição (RIBANI et al., 2004; ALBUQUERQUE JUNIOR, 2007).

2.2.1 Especificidade e Seletividade

A especificidade e a seletividade estão relacionadas com o evento da detecção. A especificidade refere-se a um método específico a um único analito, enquanto a seletividade atribui a um método utilizado para vários analitos com capacidade de distinção entre eles (FIGUEIREDO, 2012).

Para obter a seletividade, pode-se por exemplo, analisar a matriz sem o analito, verificando que nenhum interferente acabe eluindo no tempo de retenção do analito de interesse, ou, se não houver possibilidade conseguir a matriz sem o analito, dopar a matriz com possíveis interferentes, ou utilizar análise estatística: podem ser aplicados os testes F (Snedecor) de homogeneidades de variâncias e o teste t (Student) de comparação de médias. Ou ainda se pode comparar as inclinações das curvas de adição de padrão, um grupo de amostras contendo a matriz e o outro grupo não incluindo a matriz. Se as curvas forem paralelas, o método é seletivo. A resposta de picos interferentes no tempo de retenção do analito deve ser inferior a 20% da resposta da concentração do limite inferior de quantificação (LIQ) (ANVISA, 2003).

Na técnica de CLAE para análises de microcistinas, por exemplo, a identificação do espectro de absorção UV no comprimento de onda de 238 nm, caracteriza a sua especificidade, pois produz resposta para a toxina de interesse. Além disso, a variação da fase móvel permite a eluição de diferentes variantes de microcistinas em diferentes tempos de retenção, permitindo a seletividade de cada variante (RAPALA et al., 2002; MCELHINEY E LAWTON, 2005).

2.2.2 Linearidade

A metodologia tem que provar que a resposta do analito é linearmente proporcional à concentração do mesmo na amostra, dentro de um intervalo especificado. De acordo com LEITE (2008), a linearidade é determinada por meio de curvas de respostas, para isso faz-se necessário a construção de um gráfico de resposta do equipamento em função de várias concentrações do analito em estudo. A equação da reta obtida que relaciona as duas variáveis utiliza a equação 1 abaixo:

$$y = ax + b \quad 1$$

No qual:

y: resposta medida (área do pico);

x: concentração;

a: coeficiente angular - expressa a inclinação da curva em relação aos eixos;

b: coeficiente linear - expressa a intersecção da curva com os eixos.

Ainda segundo LEITE (2008), pode-se verificar a relação linear por meio do coeficiente de correlação (r), que expressa a relação entre x e y na curva, onde os valores ideais esperados são 1 e -1, ou seja, quanto mais a relação se aproxima da unidade maior a probabilidade de existir uma relação linear definida. São consideradas no mínimo 5 níveis de concentração para detectar alguma faixa não linear, por exemplo, de 80 a 120% da concentração-alvo, ou de 0,05 a 2,5% em caso de concentrações baixas, em replicata (no mínimo, duplicata ou triplicata).

Para o estudo deste parâmetro nos ensaios cromatográficos, é necessário a construção de uma curva resposta que demonstre a relação entre a área do pico detectado e o padrão de referência em diferentes concentrações. Para métodos bioanalíticos, a

ANVISA (2003) sugere no mínimo 6 concentrações diferentes de padrões para construir a curva. Esse método é determinado como superposição de matriz, e é utilizado para compensar o efeito da matriz, ou de possíveis interferentes, sendo de grande importância em determinações quando a matriz pode interferir na pré- concentração, extração, separação ou detecção da substância de interesse (RIBANI et al., 2004).

Os resultados devem ser analisados por um método estatístico apropriado, como, por exemplo, a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Deve-se apresentar a curva obtida, o coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y e o desvio padrão relativo. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99, para métodos analíticos e 0,98 para métodos bioanalíticos (ANVISA, 2003).

2.2.3 Precisão

Denomina-se precisão à concordância entre os valores experimentais obtidos. Quanto mais próximos entre si estiverem os valores mais preciso é o método analítico (LEITE, 2008).

Este parâmetro determina o erro de uma medição analítica e são critérios primários para se avaliar a eficiência da técnica analítica. Pode ser determinada em condições de repetibilidade ou em condições de reprodutibilidade. Condições de repetibilidade são aquelas em que resultados independentes são obtidos usando o mesmo método, para a mesma amostra, no mesmo instrumento, pelo mesmo analista, no mesmo local e repetições em curto espaço de tempo. Condições de reprodutibilidade são aquelas em que os resultados são obtidos usando o mesmo método, para a mesma amostra, em diferentes equipamentos, diferentes locais e por diferentes analistas. A precisão pode expressa através do desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%) (RIBANI et al. 2004).

2.2.4 Intervalo

Normalmente é derivado do estudo de linearidade (Tabela 3), depende da aplicação pretendida do método e é estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequadas quando aplicados a amostras entre

a menor concentração e maior concentração de analito na amostra para o qual se demonstrou que o procedimento dentro do intervalo especificado (ICH, 2005).

Tabela 3. Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos.

Ensaio	Alcance
Determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% de concentração teórica do teste.
Determinação de impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas serem controladas.
Uniformidade de conteúdo	De 70% a 130 % da concentração teórica do teste.
Ensaio de dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo, o alcance do método deve incluir -20% sobre o menor valor e $+ 20\%$ sobre o maior valor.

Fonte: BRASIL,2003.

2.2.5 Repetitividade

As condições de repetitividade incluem o mesmo procedimento de medição, o mesmo observador, o mesmo instrumento de medição, utilizado nas mesmas condições, mesmo local e repetições em curto período de tempo. Na repetitividade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A precisão pode ser expressa como o desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a fórmula 2:

$$DPR = \frac{DP}{CMd} \times 100\%$$

2

Na qual:

DP: é o desvio padrão

CMD: a concentração média determinada

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 20%. (ANVISA, 2003).

2.2.6 Limite de Detecção (LD)

Correspondendo à menor quantidade de um analito na amostra que pode ser detectada pelo método, o limite de detecção pode ser determinado como a menor concentração do analito cujo sinal pode ser diferenciado do ruído do sistema. A exigência para se distinguir ruído de um sinal analítico varia entre laboratórios. Um critério comum é aceitar como limite de detecção (LD) a concentração do analito que gera sinal três vezes maior do que o ruído do sistema (LANÇAS, 2009).

Este parâmetro é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (ICH, 2005; NATA, 2013). No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. Pode ser determinado pela equação 3:

$$LD = \frac{DP_U}{IC} \times 3$$

3

Em que:

DPa: é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações próximas ao suposto limite de quantificação.

IC: é a inclinação da curva de calibração.

2.2.7 Limite de Quantificação (LQ)

É a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis. O limite de quantificação é um parâmetro determinado, principalmente, para ensaios quantitativos de impurezas, produtos de degradação e é expresso como concentração do analito (por exemplo, porcentagem p/p ou p/V, partes por milhão) na amostra (ICH, 2005).

O limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser expresso pela equação 4:

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad 4$$

Em que:

DP: é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação.

IC: é a inclinação da curva de calibração.

Também pode ser determinado por meio do ruído. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1 (INMETRO, 2016)

Outro critério, recomendado pela EC/657/2002 (EC, 2002), é por meio de uma curva analítica. Neste caso, o branco é fortificado com concentrações do analito próximas ao limite permitido pela legislação. Ao analisar as amostras fortificadas plota-se o sinal obtido, que corresponde à área, contra a concentração do analito adicionada. A concentração correspondente ao coeficiente linear da reta mais 2,33 vezes o desvio padrão é definida como LD, sendo 2,33 o valor-z (teste hipótese utilizado em estatística descritiva) com nível de confiança de 95%.

2.2.8 Exatidão

A exatidão de um método analítico, é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Este método deve ser determinado

após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. Através da relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente este método é avaliado.

É importante ressaltar que a recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete na quantidade de um determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. Este método analítico é expresso como um erro sistemático percentual, inerente ao processo, que por sua vez, pode ocorrer pela perda da substância devido à baixa recuperação da extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra.

2.2.9 Robustez

A medida da capacidade de o método não sofrer alterações devido a pequenas variações que podem ocorrer nos parâmetros durante as análises, é o que chamamos de robustez.

Os testes de robustez são importantes para que o analista saiba quais fatores devem ser controlados durante a execução de um método. Vários fatores devem ser avaliados: pH, força iônica, concentração da fase móvel, temperatura da coluna, vazão da fase móvel, diferentes colunas (diferentes lotes e/ou fabricantes), procedimentos envolvidos no preparo das amostras, etc. Se as alterações das condições de análise produzirem resultados dentro dos limites aceitáveis de seletividade, exatidão e precisão, o método pode ser considerado robusto e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento. Porém, constatando-se a susceptibilidade do método a tais variações, estas deverão ser adequadamente controladas, ou precauções deverão ser incluídas no procedimento (CASSIANO et al.,2009).

Na avaliação da robustez de um método são aplicados experimentos estatísticos conforme o tipo de influência de cada uma das variações na resposta do método estudado (INMETRO, 2016). Constatando-se a susceptibilidade do método às variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento. Segundo RIBANI et al (2004), para o método cromatográfico como

CLAE, a robustez pode ser avaliada, por exemplo, variando o conteúdo de metanol na fase móvel em $\pm 2\%$, o pH da fase móvel em 0,1 unidades de pH ou a temperatura da coluna em $\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$. Se estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento.

2.2.10 Recuperação e Incerteza de medição

O estudo da recuperação consiste na "fortificação" da amostra, ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. Calcula-se a quantidade percentual recuperada usando a fórmula 5:

$$Rec \% = \frac{[\text{valor obtido} - \text{valor real}] \times 100}{\text{valor real}} \quad 5$$

Neste método, são realizados testes de significância, utilizando o teste "t" de Student de acordo com a seguinte fórmula 6:

$$t = \frac{(Rec - 100)}{\frac{SRec}{\sqrt{n - 1}}} \quad 6$$

Na qual:

Rec: a média das recuperações obtidas para n repetições;

100: a recuperação percentual desejada;

n: número de determinações (trabalha-se com no mínimo 5 repetições);

SRec: desvio padrão das recuperações.

Se o valor de t obtido estiver enquadrado no intervalo estabelecido pelo valor tabelado, para n-1 graus de liberdade em dado nível de significância, então o método será considerado exato. Além de efetuar o teste "t" de Student, existem valores críticos aceitáveis de acordo com a concentração do analito em estudo. Esses valores são estimados considerando-se que análises de elementos majoritários costumam apresentar erros sistemáticos relativos muito inferiores àqueles obtidos para analitos em

concentrações muito pequenas. Tais valores, sugeridos pelo manual da Association of Official Analytical Chemists (AOAC) são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Recuperação do analito em função da concentração

Concentração do analito (%)	Intervalo de Recuperação Aceito (%)
≥ 10	98 - 102
≥ 1	97 - 103
$\geq 0,1$	95 - 105
$\geq 0,01$	90 - 107
$\geq 0,001 - \geq 0,0001$	80 - 110
$\geq 0,000001$	60 - 115
$\geq 0,0000001$	40 - 120

Fonte: BRITO, 2001

3. MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia adotada para implementação do método de detecção e quantificação de MC-LR utilizando CLAE-EM, foi realizada pela otimização dos parâmetros e das condições cromatográficas para validação do método. Inicialmente, tanto os parâmetros cromatográficos, quanto os parâmetros do espectrômetro de massas foram otimizados com base nos estudos de DAHLMANN *et al.* (2003) e MACHADO (2008). Os parâmetros utilizados no CLAE – EM estão apresentados na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5. Descrição dos parâmetros utilizados na análise por CLAE/EM

PARÂMETROS	DESCRIÇÃO
Pré –Coluna	Cartucho ULTRA C18 (3 x 2,1 mm)
Coluna	KINETEX C18 (2,6 µm x 100 mm x 2,1 mm)
Gradiente de concentração	50% H ₂ O e 50% de acetonitrila e 1% de ácido fórmico (isocrático)
Tempo total de análise	5 minutos
Volume de injeção da amostra	100 µL
Gases utilizados	Hélio e Nitrogênio
Temperatura do capilar	350 °C
Voltagem do detector	5 kV
Interface	Electrospray ionization (ESI) - modo positivo
Íons monitorados	Microcistina LR: m/z = 995,5560 (M+1) ⁺ no modo SIM
Intervalo de varredura m/z	0 até 5 minutos (800 a 1050). Monitoramento no modo positivo de ionização, varredura dos íons no modo FULLSCAN, e SIM para Microcistina LR: m/z = 995,5560 (M+H) ⁺
Tempo de acumulação de íons no octapolo	Microcistina-LR: 100 milisegundos
Temperatura do Forno da coluna	50 °C

Fonte: Autor, 2017

Para definição do método de análise da MC-LR as condições analíticas foram executadas conforme etapas descrita a seguir.

ETAPA 1: Implementação do método de detecção e quantificação de MC-LR

✓ Otimização dos parâmetros

A otimização é necessária para ajuste dos parâmetros dependente da fonte de ionização e do composto com o objetivo de maximizar a resposta do instrumento em relação ao composto. Nesta análise avaliou-se a necessidade de concentrar ou diluir a amostra-padrão para que fosse possível a detecção do analito.

✓ Otimização das condições cromatográficas

A avaliação da fase móvel foi realizada sob duas combinações de componentes orgânicos com o intuito de avaliar a sensibilidade na detecção de MC-LR. A primeira tentativa foi realizada usando o metanol e a segunda usando acetonitrila. Nos dois ensaios foram adicionados 0,1% de ácido fórmico.

✓ Validação

Os parâmetros incluídos no procedimento de validação do método foram selecionados com base na literatura analisada e principalmente pelos órgãos ANVISA, na Resolução nº 833 de 2003, e pelo INMETRO, no documento DOQCGCRE-008, de 2016.

ETAPA 2: Obtenção do analito em estudo

Após a extração (lise celular e subsequente a liberação das toxinas intracelulares para o meio de cultura) da cultura de *Microcystis aeruginosa*, o procedimento de separação da parte sólida e conservação da parte líquida (sobrenadante) do cultivo lisado, foi realizado com auxílio de uma centrífuga, marca Fanem - modelo 206, com rotação de 3.500 rpm e tempo de 10 min. O material centrifugado foi submetido à filtração através de membrana de microfibras de vidro com tamanho de poros 0,45 µm, para remover os fragmentos das células lisadas.

ETAPA 3: Concentração e semipurificação da microcistina-LR

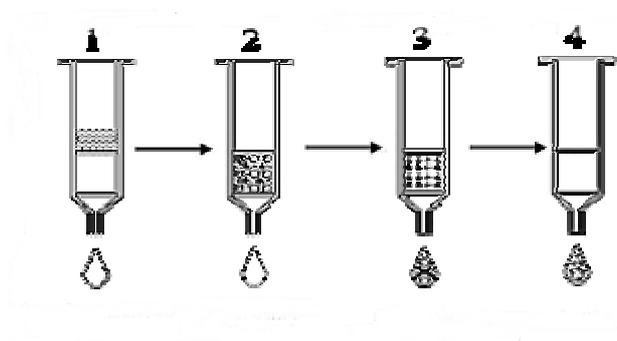
No procedimento de concentração e semipurificação da microcistina-LR, a amostra (após de submetida a segunda etapa) do cultivo de microcistina-LR foi colocada

em um cartucho de octadecilsilano tipo C18 e aspirada através dele pela aplicação de um pequeno vácuo, auxiliado por um manifold.

O cartucho tipo C18 utilizado foi previamente condicionado (lavado) com 6 mL de solução de metanol, seguido de 6 mL de água deionizada (Figura 1). Este condicionamento foi realizado com a vazão de 5 mL/min. O manifold permite a passagem do cultivo (percolação da amostra) (Figura 1) com um gotejamento contínuo na vazão de 5 mL/min, recomendada para que não ocorra perda dos analitos por carreamento. Com o término da passagem das amostras de água pelos cartuchos deixará a bomba a vácuo ainda ligado por cerca de 10 minutos para a secagem destes.

Em seguida, o analito concentrado no cartucho foi eluído (Figura 1) em 5 mL de metanol e acidificado com 0,1% de ácido fórmico, sob fluxo contínuo de aproximadamente 0,3 mL/min. Após a eluição com metanol, o eluato (extrato concentrado) foram recolhidos em frascos de vidro âmbar e armazenados na geladeira.

Figura 1. Etapas envolvidas na EFS.



1-Condicionamento; 2- Percolação da amostra; 3- Lavagem; 4 – Eluição

Do volume final, recolheu-se uma alíquota para determinação da concentração de microcistina-LR em CLAE-EM, sob as condições do método validado conforme Tabela 5. O extrato concentrado foi conservado em freezer até o momento de sua utilização nos ensaios experimentais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à validação do método para a detecção e quantificação de microcistina-LR, compreendem a otimização dos parâmetros do detector de massas e das condições cromatográficas, e em seguida a validação dos parâmetros do método analítico.

A otimização visou o ajuste dos parâmetros relativos à fonte de ionização do detector para maximização da resposta do instrumento, e para definir as condições cromatográficas. Duas composições da fase móvel foram testadas: água e metanol, e água e acetonitrila. Os parâmetros analisados para a validação dos métodos quantitativos foram: especificidade - seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, intervalo e exatidão, que a seguir serão apresentados.

4.1.1 Especificidade - seletividade

O termo especificidade, muitas vezes utilizado como sinônimo de seletividade, define a capacidade do método em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz. Já a seletividade refere-se à capacidade de detecção de substância.

O método foi considerado seletivo, pois obedece às recomendações da Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA, que considera a seletividade através da coleta do composto de interesse por técnica cromatográfica, ou com métodos e técnicas que são específicos para a estrutura da substância de interesse como, por exemplo, espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, espectroscopia no infravermelho ou bioensaios específicos.

4.1.2 Linearidade

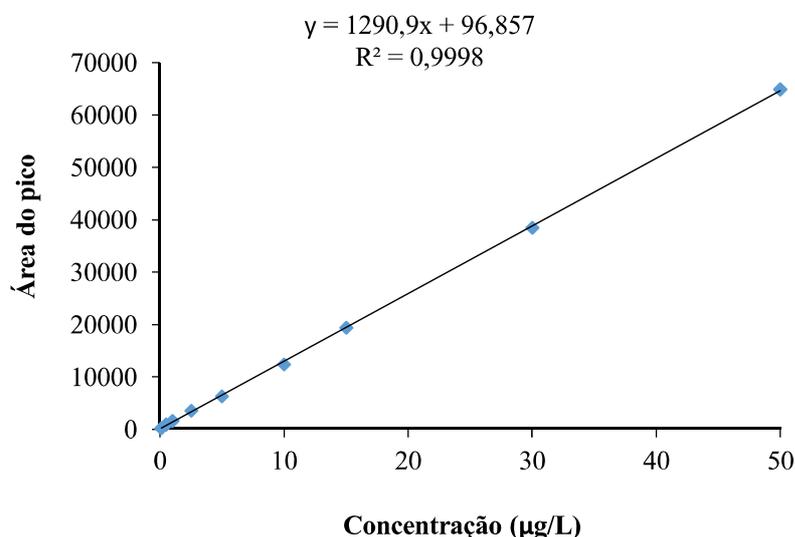
A linearidade de um método analítico consiste em obter resultados proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico. Este parâmetro pode ser determinado por estudos de gráficos de calibração, seguidos de um tratamento estatístico (CASS e DEGANI, 2001). Os métodos estatísticos são usados para determinar o coeficiente de correlação (r), intersecção com o eixo x , coeficiente angular e desvio padrão relativo (ANVISA, 2003).

Para construção da curva de calibração, foram feitas injeções em CLAE/EM de nove padrões de concentração de microcistina- LR. Para cada padrão, foram feitas 6 repetições no mesmo dia, sendo este procedimento executado três vezes, em três dias diferentes. Dessa forma, cada padrão foi injetado para análise 18 vezes. Com os dados da Tabela 6 foi construída a curva de calibração (Figura 2) para microcistina – LR.

Tabela 6: Concentrações dos padrões e valores médios das injeções

Concentração (µg/L)	Média para as 6 repetições por dia, durante 3 dias.
0,1	212
0,5	993
1	1692
2,5	3613
5	6315
10	12419
15	19442
30	38549
50	64933

Figura 2: Curva de calibração para microcistina-LR



A curva analítica obtida foi considerada linear, pois o coeficiente de correlação (r) foi de 0,99, indicando que a resposta do detector, nos intervalos analisados, é proporcional às concentrações dos padrões de MC-LR. De acordo com Agência Nacional de Vigilância Sanitária um coeficiente de correlação igual ou superior a 0,99 é aceitável.

4.1.3 Precisão

Baseando-se sobre o grau de dispersão de resultados quando o método é aplicado em várias amostras, em um mesmo laboratório, com o mesmo modo de preparo da e utilizando os mesmos equipamentos, a precisão é dividida em três categorias (ANVISA, 2003; INMETRO, 2016): repetibilidade (precisão intra-corrída), precisão intermediária (precisão inter-corrída) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial) e a concordância dos resultados obtidos em laboratórios diferentes ou instrumentação diferentes.

No presente estudo, a precisão foi avaliada pela determinação da repetibilidade (precisão intra-corrída) por concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e mesma instrumentação. A Tabela 7 apresenta os valores de injeções utilizados para o cálculo da precisão.

Tabela 7: Injeções para o cálculo da precisão

Concentração (µg/L)	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°
1	1086	968	1028	1455	998	1009	870
5	3421	3754	3709	3255	3996	3556	3579
10	6109	5644	6324	6381	6326	6026	5716
30	21712	21699	21697	21058	20614	20431	21533
50	44178	46672	26593	42474	44101	44654	47827

Sabendo que a precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. Assim temos:

$$DPR = \frac{DP}{CMd} \times 100\%$$

Em que:

DP: é o desvio padrão

CMd: a concentração média determinada.

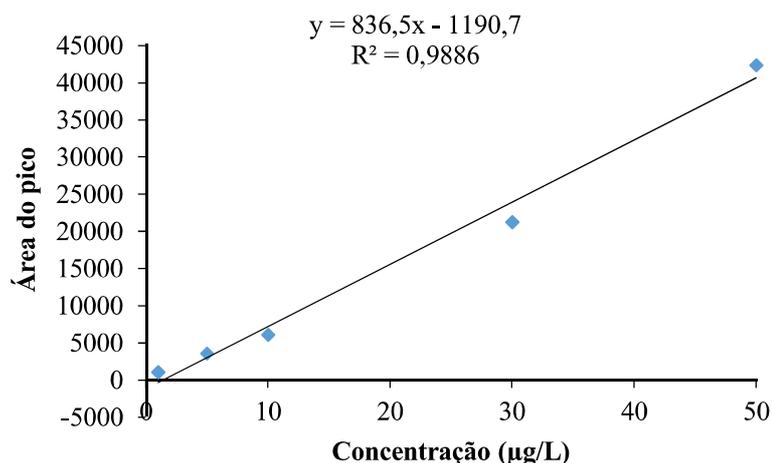
A Tabela 8 apresenta o valor médio e o desvio padrão para cada concentração dessa série de injeções para os dados da Tabela 7.

Tabela 8: Média e desvio padrão da série de injeções

Concentração (µg/L)	Média	DP	DPR (%)
1	1059	186,5	17,6
5	3610	239,8	6,6
10	6075	299,1	4,9
30	21249	548,8	2,6
50	42357	7172	16,9

A Figura 3 apresenta os dados referentes à curva de calibração obtida pela adição das concentrações (1,5,10, 30, 50 µg/L) em uma matriz real.

Figura 3: Curva de calibração em matriz real



Comparando com a precisão calculada com os padrões que geraram a curva da Figura 2 (padrões em água ultra-pura), obtive-se os resultados apresentados (Tabela 9).

Tabela 9: Médias e desvio padrão de cada concentração da série de injeções para os dados da que plotaram a curva da Figura 2.

Concentração (µg/L)	Média	DP	DPR (%)
1	1167,28	70,92	6,1
5	2830,36	191,32	6,7
10	4798,86	208,64	4,3
30	9396,71	343,71	3,6
50	14596,86	845,90	5,8

Foi observado valores inferiores de 20% de desvio padrão relativos em relação as concentrações estudadas. Desta forma, todas as faixas de concentração descritas apresentaram precisão aceitável. A ANVISA (2003) recomenda valores de coeficiente de variação (CV) iguais ou inferiores a 20%. Como todos os valores de CV obtidos foram menores que 20% (Tabela 8), o método proposto pode ser considerado preciso.

4.1.4 Limite de detecção (LD)

A menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas constitui o limite de detecção. No caso de métodos instrumentais (CLAE, CG, absorção atômica), a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. Podendo ser determinado pela seguinte equação:

$$LD = \frac{DP_U}{IC} \times 3$$

Em que: DP_U é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações próximas ao suposto limite de quantificação. IC: é a inclinação da curva de calibração. Assim:

$$LD = \frac{16,75}{1290,9} \times 3 = 0,038 \mu g/L$$

4.1.5 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas.

Logo, o limite de quantificação é estabelecido por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis, que pode ser expresso pela equação:

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC}$$

Em que: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação, e IC é a inclinação da curva de calibração. As equações obtidas em três dias diferentes foram:

$$y = 985,08x - 22,923 \quad R^2 = 0,9998$$

$$y = 1398,7x - 50,992 \quad R^2 = 0,9992$$

$$y = 1107,8x + 80,656 \quad R^2 = 0,9998$$

O desvio padrão do valor de b para as três equações é: 121,9 e IC: 1292,9 para a curva de calibração final.

Assim:

$$LQ = \frac{121,9}{1290,9} \times 10$$

LD= 0,94 $\mu\text{g/L}$ (para a curva de calibração de 1 – 50 $\mu\text{g/L}$). Enquanto para curva de 0,1 -50 $\mu\text{g/L}$, temos:

$$LQ = \frac{16,75}{1290,9} \times 10; \quad LQ= 0,13$$

Um outro método de se calcular LQ e LD é descrito por HARTMANN et al (1998) e LANÇAS (2004), no qual LD é a concentração do analito que produz um sinal três vezes maior que o ruído, e LQ corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão, que equivale a nove vezes o valor do ruído da linha de base. De acordo com INMETRO (2016), para a validação de um método analítico, é normalmente suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito (sinal analítico) pode ser distinguida do ruído.

RIBANI et al. (2004) relatam que apesar da relação sinal/ruído ser o método mais utilizado para técnicas analíticas em geral e técnicas analíticas de separação, como as cromatográficas e eletroforéticas, a medição do ruído é considerada às vezes subjetiva. Picos maiores aumentam a relação sinal-ruído, resultando em valores de LD e LQ mais baixos, pois a determinação é feita somente pela intensidade do sinal do detector e não pela área, afetando dessa forma tanto o LD quanto LQ.

Logo, das dez injeções realizadas, obteve-se valores aproximadamente dez vezes maiores que o desvio padrão do sinal gerado. Empregando-se um branco são aceitos como LQ, ou seja, aproximadamente três vezes o LD. A regulamentação da ANVISA recomenda que o LD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base, e o LQ é atribuído, em cromatografia, a picos com sinal/ruído maior que 10.

Os valores obtidos de LD e LQ referentes às respostas de área obtidas nos cromatogramas estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Cálculos de limite analítico na matriz de estudo 1

INJEÇÃO	S/N	LD	LQ
1	20,00	60	180
2	18,26	54,78	164,34
3	11,71	35,13	105,39
4	26,83	80,49	241,47
5	11,88	35,64	106,92
6	14,60	43,8	131,4
7	16,60	49,8	149,4
8	13,97	41,91	125,73
9	15,33	45,99	137,97
10	17,22	51,66	154,98

Os valores obtidos de LD e LQ são referentes as respostas de área obtidas nos cromatogramas. Os valores de concentração respectivos podem ser obtidos substituindo esses valores de área (y) na equação do gráfico da curva de calibração $y = 1290,9x + 96,857$, obtendo-se os valores da Tabela 11 a seguir.

Tabela 11. Cálculos de limite analítico na matriz de estudo 2

INJEÇÃO	S/N	LD	LQ
1	20,00	0,03	0,09
2	18,26	0,03	0,10
3	11,71	0,05	0,14
4	26,83	0,01	0,04
5	11,88	0,05	0,14
6	14,60	0,04	0,12
7	16,60	0,04	0,11
8	13,97	0,04	0,13
9	15,33	0,04	0,12
10	17,22	0,04	0,11

Como os valores médios obtidos pelo método sinal/ruído de LD e LQ foram 0,07 e 0,11, respectivamente. E pelo método da curva de linearidade obtive-se LD = 0,04 e LQ = 0,13, foi possível observar que os valores foram reativamente próximos.

4.1.6 Intervalo

De acordo com as recomendações do documento DOQCGCRE-008, de 2016 do INMETRO, o intervalo do método analítico corresponde à faixa do maior ao menor nível que possa ser determinado com precisão e exatidão, usando a linearidade do método. Geralmente, os analistas seguem o caminho inverso. Primeiro, selecionam o intervalo de trabalho (baseado no nível de concentração do analito que desejam estudar) e depois determinam se a relação sinal versus concentração é linear.

De acordo com as curvas obtidas para dois intervalos de contração: 0,1-50, e 1-50 determinados pelo LD e LQ, a relação de proporcionalidade entre a concentração do analito na amostra e a resposta do cromatogramas foram praticamente as mesmas, como observado nas funções a seguir:

Equação 1: da curva de 0,1 -50 µg/L

$$y = 1290,9x + 96,857 \quad R^2 = 0,9998$$

Equação 2: da curva de 1 -50 µg/L

$$y = 1292,9x + 31,693 \quad R^2 = 0,9998$$

A determinação quantitativa do analito, deve ter alcance de 80% a 120% da concentração teórica do teste. (Neste caso, foi adotado o valor da concentração máxima permitida pela portaria de controle da toxina na água). Considerando o valor estabelecido pela portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, a concentração é de 1 µg equivalente microcistina-LR.

$$1\mu g/l \times 80\% = 0,8$$

$$1\mu g/l \times 120\% = 1,2$$

Como os valores de intervalos exigidos 0,8 – 1,2 µg/L estão dentro da faixa de linearidade da curva, que vai de 0,1 – 50 µg/L, o método analítico apresenta intervalo especificado necessário para a análise.

4.1.7 Exatidão:

A exatidão se refere a quão próximo um valor de uma medida está do valor verdadeiro, e pode ser calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança (ANVISA, 2003).

Para avaliar o parâmetro de exatidão, realizou-se cálculos de média, coeficiente de variação, e T de Student. Na Tabela 12 estão apresentados os respectivos valores.

Tabela 12: Valores de média, coeficiente de variação e T de Student

Concentração (µg/L)	1°	2°	3°	Média	S	CV%	t calculado	t tabelado
10	97,68	100,23	98,71	98,87	1,28	1,30	-0,62085	4,303
30	94,62	93,72	95,83	94,72	1,06	1,12	-3,524	4,303
50	98,61	98,66	102,03	99,76	1,96	1,96	-0,08417	4,303

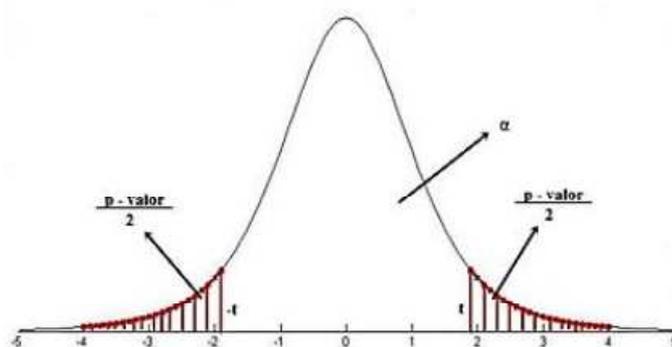
Para as três faixas de concentração desta determinação, 10, 30 e 50 µg/L, a concentração média pode ser obtida.

$$C_m = \frac{10 + 30 + 50}{3} = 30 \mu\text{g/L}$$

Transformando essa concentração média para concentração percentual massa/volume, obtém-se 3×10^{-8} kg/L, que equivale a 0,000003%. Observando a Tabela 6, de recuperação do analito em função da concentração, temos que $0,000003\% \geq 0,000001$, equivalendo a uma faixa aceitável de recuperação entre 60 – 115 %. É possível observar na Tabela 4, que a média das recuperações, para cada uma das três concentrações atenderam o intervalo de recuperação aceito.

Observando o teste T, onde de acordo com a literatura, para um intervalo de confiança de 95% e n-1 graus de liberdade, o valor de t calculado deve enquadrar-se no intervalo estabelecido pelo valor tabelado, em um dado nível de significância, então o método será considerado exato. Para 95% de confiança, temos 0,05 bilateral de uma distribuição normal 3-1 = 2 graus de liberdade. Assim, obteve-se o t tabelado, pela Tabela t de Student bicaudal. E esta comparação pode ser feita pelo acompanhamento da Figura 4 a seguir.

Figura 4: Função de densidade de probabilidade T de Student



Fonte: BERTHOUEX et al., 2011

A área em vermelho representa os valores de t calculados aceitos para que os dados sejam considerados exatos. O t tabelado foi de 4,303, ou seja, esse valor é o limite máximo (seja negativo ou positivo, devido a distribuição bicaudal) que o valor de t calculado pode assumir. Nos valores obtidos da Tabela 21 é possível observar que todos os valores t calculados foram inferiores ao valor t tabelado, e assim, os testes podem ser considerados exatos.

5. CONCLUSÃO

- Os parâmetros avaliados foram considerados satisfatórios para validação do método para determinação de microcistina-LR pois os resultados avaliados estão dentro dos valores sugeridos na literatura. Obteve-se linearidade para microcistina-LR na faixa de 0,1 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($r > 0,99$). Os ensaios de recuperação estão dentro dos critérios estabelecidos para a faixa trabalhada, com recuperação

entre 60 e 115%. O método também apresentou repetibilidade aceitável, com coeficiente de variação inferior a 20%;

- A técnica de CLAE/EM se mostrou bastante sensível para detecção e quantificação de microcistina-LR, obtendo-se valores de LD e LQ abaixo do valor máximo permitido na água de consumo humano ($<1 \mu\text{g L}^{-1}$) segundo prescrito pela legislação brasileira;
- Foi verificado que o teste de % de recuperação em função da concentração média, e o teste T de Student apresentaram concordância sobre a afirmação da exatidão da validação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE JÚNIOR. Use of solid-phase extraction, highperformanceliquid chromatography, and MALDI-TOF identification for [DLeu1] MCYST-LR analysis in treated water: Validation of the analytical methodology. **Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy**. V. 52, n. 1. 2007.

ANTONIOU, M. G.; CRUZ, A. A.; DIONYSIOU, D. D. Cyanotoxins: New Generation of Water Contaminants. **Journal of Environmental Engineering**. V. 131, p. 1239-1243, 2005.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

BRASIL, Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Diretoria Colegiada da Agência Nacional da Vigilância Sanitária**, Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRASIL. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, 212p, 2006.

CASSIANO, N.M; BARREIRO, J.C; MARTINS, L.R.R; OLIVEIRA, R.V; CASS, Q.B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**. 32, n4, p. 1-10, 2009.

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de Métodos Por HPLC Fundamentos, Estratégias e Validação**, Série Apontamentos. São Carlos: EDUFSCAR, p. 7, 2001.

FIGUEIREDO, T. M.P. Validação de métodos analíticos-Determinação do teor de açúcar numa amostra de produto alimentar. **Dissertação de mestrado**. Universidade de Coimbra, p.104,2012.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2016.

LEITE, F. **Validação em Análises Químicas**. 5ª edição-Editora Átomo, Campinas, SP, 357p, 2008.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos, SP: RiMa. 2004.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos, SP: RiMa, 46 p. 2009.

LI, W.; XIE, P.; CHEN, J.; HE, J.; GUO, X.; YU, D.; CHEN, L. Quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of microcystin-RR and its glutathione and cysteine conjugates in fish plasma and bile. **Journal of Chromatography B**. V. 963, p. 113–118, 2014.

MCELHINEY, J., LAWTON, L.A. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.203, p.219– 230. 2005.

MIAO, H-F.; QIN, F.; TAO, G-J.; TAO, W-Y; RUAN, W-Q. Detoxification and degradation of microcystin-LR and -RR by ozonation. **Chemosphere**. V. 79, p. 355–361, 2010.

MSAGATI, T. A.; SIAME, B. A. & SHUSHU, D. D. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. **Aquatic Toxicology**, v. 78: 382-397, 2006.

PICHARDO, S.; PFLUGMACHER, S. Study of the Antioxidant Response of Several Bean Variants to Irrigation with Water Containing MC-LR and Cyanobacterial Crude Extract. **Environmental Toxicology**. p. 300-306, 2011.

PINHO, L. X. Photocatalytic Degradation of Cyanobacteria and Cyanotoxins using Suspended and Immobilized TiO₂. **Tese** (Doutorado em Engenharia Química e Biológica). Universidade do Porto. Cidade do Porto, 2014.

RAMANAN, S.; TANG, J.; VELAYUDHAN, A. Isolation and preparative purification of microcystin variants. **Journal of Chromatography A**. V. 883, p. 103–112, 2000.

RAPALA, J., ERKOMAA, K., KUKKONRM, K.S., LATHI, K. Detection of microcystin with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay: Comparison of methods. **Analytica Chimica Acta**. n.466, p.213-231. 2002.

REILLY, M.; CODD, G. A. **Laboratory analysis of microcystins in samples from environmental waters**. Universidade de Dundee, 2007.

RIBANI, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. vol.27, n.5, p. 771-780, 2004.

YUAN, M.; CARMICHAEL, W. W.; HILBORN, E. D. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. **Toxicon**. V. 48, p. 627–640, 2006.

Capítulo 2

DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINA – LR NO TRATAMENTO DE ÁGUA DE ABASTECIMENTO EM SISTEMA CONVENCIONAL SEGUIDO DE FOTOCATÁLISE HOMOGÊNEA (UV/H₂O₂)

RESUMO

A potabilização de águas eutrofizadas com alta densidade de cianobactérias e toxinas dissolvidas pela tecnologia convencional não assegura que a água produzida esteja dentro dos valores máximos permitidos de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistina (Portaria 2914/2011). Processos adicionais são necessários, e o uso de POA é método considerado eficaz na solução deste problema. Neste contexto, este capítulo apresenta a remoção de microcistina-LR em sistema convencional de tratamento de água seguido de fotocatalise homogênea (UV/H₂O₂) considerando a eficiência de um reator fotocatalítico de baixo custo na oxidação deste micropolvente. O experimento foi realizado em escala piloto e seguiu três etapas sequenciais. Na primeira etapa foi definida a melhor condição de coagulação através de diagramas de coagulação em função cor aparente remanescente. Foram realizados ensaios em Jar test variando as faixas de pH inicial (6,5 a 8,5) e as dosagens (12,5 a 75 mg.L⁻¹) do coagulante Sulfato de Alumínio (Al₂(SO₄)₃). (14-18) H₂O. Na segunda etapa foi realizado o tratamento convencional da água de estudo que seguiu os processos de coagulação, floculação, sedimentação e filtração. Após o tratamento convencional, a água de estudo foi conduzida ao reator fotocatalítico, para execução dos ensaios de oxidação da MC-LR, que constituiu a terceira e última etapa do estudo. No reator fotocatalítico foram realizados 6 ensaios adicionando diferentes dosagens 5, 25, 50, 100, 500 e 1000 mM de H₂O₂, e tempos de exposição de 0 a 60 min. A etapas de coagulação, floculação e sedimentação do método convencional mostraram-se eficientes na remoção de cor verdadeira (80%) e turbidez (97%) para dosagem de sulfato de alumínio de 50 mg.L⁻¹ e pH de coagulação de 6,8. Dos seis tratamentos realizados no reator, apenas aquele de concentração de 1000 mM (UV/H₂O₂) atingiu o valor máximo permitido pela Portaria 2419/2011 após 15 minutos de oxidação. Aos 60 minutos do processo houve uma remoção de 83,3% da microcistina, para esta mesma dosagem de H₂O₂ que atingiu o valor aproximado de $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR. O método empregado para análise da oxidação da microcistina-LR por CLAE – EM, mostrou-se altamente sensível e rápido na detecção de fragmentos resultantes da oxidação de (UV/H₂O₂) comprovando a eficácia do tratamento. A oxidação gerou 5 compostos com fórmulas químicas de C₄₉H₇₄N₁₀O₁₂, C₄₀H₆₃N₁₀O₁₁, C₂₉H₄₇N₉O₁₀, C₉H₁₄N₂O₄, C₆H₁₂N₄O, para a massa/carga de 995, 860, 681, 213 e 160 respectivamente.

Palavras-Chave: Processo Oxidativo Avançado. Microcistina-LR. Fotólise (UV/H₂O₂)

ABSTRACT

The potability of eutrophic waters with high density of cyanobacteria and toxins dissolved by the conventional technology does not ensure that the water produced is within the maximum allowed values of $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of microcystin (Ordinance 2914/2011). Additional processes are required, and the use of POA is a method considered effective in solving this problem. In this context in this chapter, it was evaluated the removal of microcystin-LR in a conventional water treatment system followed by homogeneous photocatalysis (UV / H_2O_2) considering the efficiency of a low cost photocatalytic reactor in the oxidation of this micropollutant. The experiment was carried out on a pilot scale and followed three sequential steps. In the first step, the best coagulation condition was defined through coagulation diagrams in function of remaining color. Jar assays were performed by varying the initial pH ranges (6.5 to 8.5) and the dosages (12.5 to $75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) of the Coagulant Aluminum Sulphate ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$). (14-18) H_2O . In the second stage the conventional treatment of the study water was performed, following the coagulation, flocculation, sedimentation and filtration processes. After the conventional treatment, the study water was conducted to the photocatalytic reactor, constituting the third and final stage for the execution of the oxidation tests. In the photocatalytic reactor 6 assays were performed adding different dosages 5, 25, 50, 100, 500 and 1000 mM H_2O_2 , and exposure times from 0 to 60 min. The coagulation, flocculation and sedimentation stages of the conventional method were efficient in the removal of true color (80%) and turbidity (97%) for aluminum sulfate dosage of $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and coagulation pH of 6,8. Of the six treatments in the photocatalytic reactor, only the one of 1000 mM concentration (UV / H_2O_2) reached the maximum value allowed by Ordinance 2419/2011 after 15 minutes of oxidation. At 60 minutes of the process, 83.3% of the microcystin was removed for the same dosage of H_2O_2 , which reached approximately $0.5 \mu\text{g} / \text{L}^{-1}$ of MC-LR. The method used to analyze the microcystin-LR oxidation by HPLC-MS was highly sensitive and rapid in the detection of fragments resulting from the oxidation of (UV / H_2O_2), proving the efficacy of the treatment. Oxidation generated 5 compounds with chemical formulas of $\text{C}_{49}\text{H}_{74}\text{N}_{10}\text{O}_{12}$, $\text{C}_{40}\text{H}_{63}\text{N}_{10}\text{O}_{11}$, $\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{N}_9\text{O}_{10}$, $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}$, for mass / filler of 995, 860, 681, 213 and 160 respectively.

Keywords: Advanced Oxidative Process. Microcystin-LR. Photolysis (UV / H_2O_2)

1. INTRODUÇÃO

O aumento do lançamento de nitrogênio e fósforo provenientes de diversas atividades antrópicas nas bacias hídricas, tem modificado as características dos corpos d'água. Uma consequência do aporte maior desses nutrientes no corpo d'água é o crescimento acelerado de microrganismos produtores, predominantemente as cianobactérias pela capacidade de assimilação de tais nutrientes. A alteração que ocorre nesse ambiente enriquecido é parte do processo de eutrofização que interfere na qualidade da água dos mananciais e caracteriza-se por elevada densidade de algas e cianobactérias (10^6 - 10^8 cel/mL).

A presença desses microrganismos em tais condições, dificulta e aumenta o custo do tratamento da água para o consumo humano, pois, comumente, produzem substâncias que conferem sabor e odor à água, além de se tornar produtoras de toxinas (cianotoxinas) de acordo com indeterminadas alterações ambientais, capazes de causar prejuízos à saúde humana dependendo da dosagem do tempo de exposição (AZEVEDO et al., 2002).

Estudos demonstram a eficiência do tratamento de remoção de cianobactérias por ciclo completo, adotado na maioria das Estações de Tratamento de Água que incluem a coagulação química, floculação, sedimentação e filtração rápida. Entretanto, diversos autores confirmam e ressaltam a possível lise de células de cianobactérias e consequente liberação de cianotoxinas, que só irá ser removida mediante tratamento específico (LIBÂNIO, 2010). A aplicação de tecnologias inovadoras pode ser solução alternativa para o tratamento das águas destinadas ao consumo humano, na redução ou eliminação da contaminação destes micropoluentes.

O processo fotocatalítico homogêneo UV/ H_2O_2 origina a formação de radicais hidroxila obtidos através da fotólise do peróxido de hidrogênio pela radiação ultravioleta. O radical $\cdot OH$ é um forte agente oxidante, muito reativo e de reduzida seletividade, sendo eficiente para degradação de diferentes poluentes, dentre eles as microcistinas.

Nesta perspectiva, este capítulo apresenta a avaliação da eficiência de um reator fotocatalítico de baixo custo para degradação de microcistina-LR em água de abastecimento, utilizando o processo (UV/ H_2O_2).

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a eficiência de um reator fotocatalítico de baixo custo para degradação de microcistina-LR em água de abastecimento, utilizando o processo UV/H₂O₂.

2.2 ESPECÍFICOS

- Identificar as condições ótimas de coagulação, utilizando sulfato de alumínio sob diferentes valores de pH, para remoção de cor e turbidez na água de estudo;
- Verificar a influência de diferentes concentrações de H₂O₂ e de tempo, na degradação de microcistina –LR em reator fotocatalítico;
- Identificar os subprodutos formados após o processo de oxidação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Qualidade e eutrofização dos corpos hídricos

A crescente demanda e múltiplos usos de recursos hídricos nas últimas décadas, combinada com as preocupações sobre as alterações no ambiente, têm estimulado numerosas pesquisas de avaliação da qualidade de água dos reservatórios superficiais destinados ao abastecimento humano.

O crescimento demográfico e a urbanização intensificaram as atividades antrópicas como a agricultura, a indústria, a mineração. O descarte de resíduos sólidos, esgoto sem tratamento ou inadequadamente tratados, efluentes industriais e agrícolas, produtos químicos como fertilizantes, são despejados diretamente nos corpos aquáticos alterando as características físico-químicas, biológicas e conseqüentemente limitando seus usos (ESTEVES, 2011). Estas ações favorecem o desequilíbrio do ecossistema aquático, ocasionando a transformação de ambientes oligotróficos ou mesotróficos em eutróficos. Esse processo chamado de eutrofização, resulta no aumento da atividade primária dos corpos de água e se expressa principalmente através do crescimento excessivo de componentes fitoplanctônicos, tais como microalgas, cianobactérias e macrófitas, sendo comumente denominados de florações ou “blooms” (WU e XANG, 2012).

Estudos em reservatórios brasileiros têm demonstrado a ocorrência de ambientes em condições de eutrofia e hipertrofia. Ambientes com concentrações de P-total entre 50-660µg/L, pH levemente à altamente alcalino (7,0 a 9,0); baixa profundidade (2,8 a 14 metros), temperatura da água relativamente alta (acima de 20 °C) e razão N/P total entre 2 e 19 são ambientes adequados para proliferação e manutenção de florações de cianobactérias (SANT’ANNA & AZEVEDO, 2000).

As florações de algas e cianobactérias exteriorizam-se como densas massas verdes nas camadas subsuperficiais do espelho de água e causam sombreamento nas camadas inferiores, que impede a entrada de luz na coluna de água e aumenta os processos de decomposição anaeróbia da matéria orgânica com a conseqüente depleção de oxigênio dissolvido que por sua vez causa mortandade de peixes e liberação de substâncias tóxicas (DIGNUM et al., 2005; WEIRICH et al., 2014).

3.2 Cianobactérias e cianotoxinas

Denominadas antigamente por cianofíceas ou algas azuis, as cianobactérias são microrganismos procariontes (desprovidos da membrana nuclear que reveste o material genético), classificadas no domínio *Bacteria* na classificação Carl Woese, que apresentam características semelhantes (bioquímica e estruturalmente) as bactérias Gram-negativas (CALIJURI et al., 2006; MADIGAN et al., 2012).

Compreendendo aproximadamente 150 gêneros com mais de 2.000 espécies identificadas, evidências moleculares e químicas indicam que as cianobactérias surgiram na Terra há cerca de 2,8 bilhões de anos e foram responsáveis pela oxigenação do planeta. A capacidade de produção de oxigênio molecular (O_2) na Terra originalmente anaeróbia, abriu caminho para a evolução das células aeróbias que poderiam utilizar o gás oxigênio O_2 como acceptor final de elétrons (CODD et al., 2005). Logo, as cianobactérias foram, provavelmente, responsáveis pela maior transformação evolutiva impulsionou e que precedeu o desenvolvimento do metabolismo aeróbio e subsequente surgimento das plantas superiores e animais, sendo essenciais para a formação da atual biosfera (WHITTON, 2000).

As cianobactérias possuem alta capacidade de adaptação, tornando-as colonizadoras de diversos ambientes, como solos e rochas, e até mesmo nos mais extremos, como as superfícies de neve em altas altitudes no Alasca (PINHO, 2014). Por sua vez, os ecossistemas aquáticos são os habitats de sua maior ocorrência, visto que a maioria das florações possuem crescimento ótimo em ambientes dulcícolas, com pH neutro a alcalino e temperatura entre 15 e 30 °C (SOARES et al., 2013).

Exibindo uma diversidade morfológica e heterogênea, estes microorganismos se apresentam de forma unicelular, colonial e filamentosa. As espécies que apresentam formas unicelulares possuem células esféricas, cilíndricas ou ovóides. As formas filamentosas são típicas da maioria dos gêneros deste grupo, que dependendo da espécie, pode crescer aderida, com filamentos livres (denominados tricoma) ou formando uma camada com aspecto de uma malha entrelaçada, com filamentos variando de retilíneos a espirais. Seus tamanhos celulares variam, apresentando de 0,5-1 μm a 40 μm de diâmetro para espécies unicelulares, enquanto as filamentosas com mais de 30 μm (PERCIVAL et al., 2004).

As propriedades fisiológicas diversificam de gênero para gênero, o que significa que as diferentes espécies também apresentam estratégias adaptativas distintas. Dentre essas estratégias, as principais são a capacidade de ajuste da flutuabilidade na coluna d'água (vesículas de gás), a formação de escumas, a de armazenamento de fósforo e fixação de nitrogênio atmosférico, habilidade de dormência e baixo índice de predação.

Os heterócitos são células muitas vezes cruciais para a classificação taxonômica de cianobactérias. Caracterizados por serem estruturas especiais que atuam na fixação de nitrogênio atmosférico, contribuindo para sua adaptação no ambiente e funcionam como reservas para células adjacentes. Alguns gêneros filamentosos como *Anabaena*, *Nostoc*, *Scytonema* e *Hapalosiphon* apresentam esta estrutura, o que favorecerá vantagens competitivas com outros organismos, ou mesmo em situações adversas (SHARMA, 2013). Entretanto, várias outras espécies apresentam uma proteína granular chamada cianoficina que é uma reserva de energia - produto de armazenamento de nitrogênio que, quando se torna deficiente no ambiente, é clivado e utilizado como fonte de energia (WHITTOM et al., 2012; MADIGAN et al., 2012).

Muitas espécies tóxicas de cianobactérias apresentam vesículas de gás ou aerótopos que lhes permitem regular sua flutuabilidade na coluna d'água, de forma a encontrar o melhor ambiente para seu desenvolvimento. Os aerótopos se tornam mais abundantes quando a luz é reduzida e o crescimento do organismo é mais lento. Do contrário, quando a luminosidade é muito elevada, o acúmulo de fotoassimilados (produtos da fotossíntese) torna as células túrgidas e provoca o colapso de uma porção das vesículas e conseqüentemente a perda da flutuabilidade (VISSER et al., 2005).

Devido a essa capacidade de flutuação na coluna d'água, alguns gêneros de cianobactérias formam grandes massas colônias que se acumulam na superfície da água. Sua proximidade com a superfície da água traz como benefício a maior incidência de luz e, dessa forma, maior taxa de fotossíntese e estoque de maiores quantidades de carboidratos. Além disso, a grande extensão das colônias reduz a disponibilidade de nutrientes para outros microrganismos competidores, reduzindo seu crescimento, que oferece proteção contra a predação (PAERL; HUISMAN, 2009). Mas, para o ambiente aquático, a perda da diversidade altera o ecossistema e ao longo da coluna de água são geradas condições anaeróbias que impedem a vida de peixes e outros indivíduos aquáticos que precisam de oxigênio; são favorecidos os processos de fermentação ou putrefação biológica com produção de gases tóxicos (PANOSO et al., 2007).

3.2.1 Cianotoxinas

A maior preocupação no que diz respeito às cianobactérias em corpos d'água não são as florações em si, mas sim a capacidade que algumas espécies têm de produzir metabólitos secundários tóxicos - cianotoxinas. Existem estudos que indicam que na mesma floração, pode haver tanto linhagens produtoras de toxinas como não produtoras, sendo que, até o presente momento, não há qualquer informação que explique o porquê deste fato (SCHEMBRI; NEILAN; SAINT, 2001).

Os fatores que levam à formação da toxina ainda não são conhecidos. Há fortes indícios de correlação entre a formação desta e a sazonalidade, radiação solar, temperatura da superfície da água, pH e porcentagem de saturação de oxigênio (HAIDER et al., 2003). As cianotoxinas, em sua maioria, são liberadas no meio aquático com a morte celular, ocasionando danos na biota aquática, desde intoxicação até a morte de animais e seres humanos (CODD et al., 2005; KARDINAAL et al., 2005; IBELINGS et al., 2007). São classificadas de acordo com sua estrutura química – apresentando peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos, ou conforme seu efeito toxicológico (ou sua biotoxicidade), sendo denominados dermatotóxicos, neurotóxicos ou hepatotóxicos (CALIJURI et al., 2006; APELDOORN et al., 2007).

Hepatotoxinas

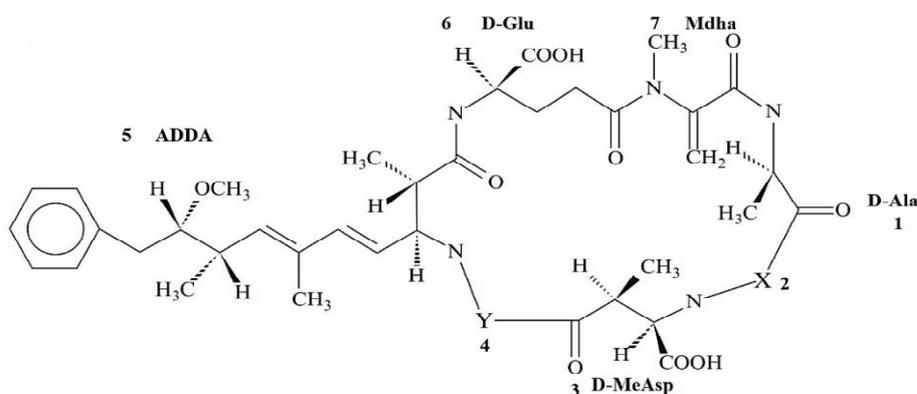
As hepatotoxinas constituem um grupo de cianotoxinas notavelmente estudada nos últimos anos devido ao seu efeito nocivo que pode acometer diversos órgãos e tecidos de mamíferos e outras espécies de animais trazendo consequências fisiológicas e dano celular dos hepatócitos (METCALF et al., 2012). Os principais tipos de hepatotoxinas são as nodularinas, as cilindrospermopsinas e as microcistinas.

Microcistinas

As microcistinas são as hepatotoxinas mais relatadas na literatura científica (NICHOLSON & BURCH, 2001; MEREL et al., 2013; SARMA, 2013). Ocorrências de microcistinas foram reportadas em grande parte do mundo, nomeadamente em vários países da Ásia, América do Norte, Leste da Europa e Norte de África (FRISTACHI & SINCLAIR, 2008).

Classificadas como heptapeptídeos cíclicos, os quais possuem em comum a estrutura cíclica, contendo cinco aminoácidos fixos, (-D-Ala1-X2-D-MeAsp3-Y4-Adda5-D-Glu6-Mdha7), sendo D-Alanina (posição 1), ácido D-metil-aspártico (posição 3), Adda (3-amino-9-metoxi-2-6,8-trimetil-10-fenil-4,6-ácido dienóico) (posição 5), Ácido D-glutâmico (posição 6) e N-metildehidroalanina (Mdha) (posição 7), e dois aminoácidos variáveis nas posições 2 (X) e 4 (Y), normalmente L-aminoácidos (BOTES *et al.*, 1984; MSAGATI *et al.*, 2006) que contribuem para as diferentes isoformas (SIVONEN & JONES, 1999; WELKER & VON DÖHREN, 2006). A estrutura geral da microcistina-LR está apresentada na Figura 1.

Figura 1. Estrutura geral da microcistina – LR



Fonte: METCALF *et al.*, 2012

A primeira identificação química desta hepatotoxina foi feita por BISHOP *et al.* (1959), que a isolou de uma cultura de *Microcystis aeruginosa*, daí a origem do nome. A nomenclatura das microcistinas foi proposta por CARMICHAEL *et al.* (1988) e compreende um heptapeptídeo monocíclico extremamente estável e resistente a agentes químicos, hidrólise ou oxidação em pH próximo de neutro podendo permanecer ativa mesmo em temperaturas acima de 100 °C (ŠEJNOHOVÁ *et al.*, 2012).

Um dos aspectos mais relevantes das microcistinas é o único aminoácido C20 (3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-trimetildeca-4,6-dienóico) abreviado como Adda (Figura 5), que embora ele sozinho não seja tóxico, a estereoquímica e a hidrofobicidade da sua cadeia desempenham um papel fundamental na atividade biológica de MC-LR. (ANTONIOU *et al.*, 2008). No entanto, a porção Adda é relatada como a principal responsável pela toxicidade da microcistina e a alteração da sua estrutura é um passo

fundamental para a redução da toxicidade das toxinas que a possuem. (ANDERSEN et al., 2014).

Existem mais de 90 análogos de microcistina diferenciadas pela constituição dos L-aminoácidos, nas posições “2” e “4” apresentando massa molar diferenciada (SCOTT et al., 2012). Dentre os análogos tóxicos mais frequentes destacam-se: MC– LR constituída dos aminoácidos leucina e arginina; MC–RR (arginina-arginina); MC–LA (leucina-alanina) e MC–YR (tirosina-arginina). A massa molecular das moléculas destas microcistinas variam de 1.038,20; 1.045,19; 995,17 e 910,06 para MC–RR, YR, LR e LA respectivamente, conforme se apresenta na Tabela 1.

Tabela 1: Principais variáveis da microcistina.

Variável	Massa molar (M)	Posição 4	Posição 2	Carga em pH 6,0-8,5
MC-YR	1045,19	Arginina	Tirosina	0 (--&++)
MC-RR	1038,20	Arginina	Arginina	-1 (--&+)
MC-LR	995,17	Arginina	Leucina	-1 (-- &+)
MC-LA	910,06	Alanina	Leucina	-2 (--)

Fonte: HO et al., 2011

As microcistinas possuem habilidade limitada em atravessar membranas na ausência de um transporte ativo, sua entrada nos hepatócitos se dá por meio dos transportadores de ácidos biliares, causando inibição das enzimas fosfatases 1 e 2A, com consequente hiperfosforilação das proteínas e desorganização do citoesqueleto. Esta desorganização leva à retração dos hepatócitos, o que, por sua vez, acarreta na retração dos capilares e aumento dos espaços intercelulares, ao passo que o sangue passa a fluir por estes espaços formados, o que é capaz de provocar lesões teciduais e hemorragia hepática (PEGRAM et al. 2008, JI et al. 2011).

Estas toxinas não atuam somente como promotoras, mas também como agentes iniciadores de tumores por sua capacidade genotóxica, como apresentada pela microcistina-LR (ZEGURA et al., 2011). Contudo, não se sabe ainda quais são os mecanismos envolvidos na indução tumoral, pois há falta de modelos celulares para estudos de toxicidade in vitro. Nos casos de exposição recreacional, podem ocorrer irritações cutâneas e problemas gastrintestinais, a exemplo de complicações no fígado.

Plantas aquáticas e terrestres também podem sofrer efeitos ao serem expostas à microcistinas, uma vez que nelas também há a presença das fosfatases 1 e 2A. Bittencourt-Oliveira et al. (2014) descreveram vários relatos de redução de biomassa em plantas aquáticas expostas a estas toxinas, assim como redução na produção das fosfatases, estresse oxidativos, redução na atividade fotossintética e até apoptose celular em plantas terrestres.

Outro aspecto relacionado à contaminação de plantas com microcistinas está ligado à sua capacidade de bioacumulação nestes organismos, e possível biomagnificação na cadeia trófica. Deste modo, plantas irrigadas com água contaminada se tornam mais uma preocupação em relação à saúde pública, revelando outra fonte de exposição às toxinas (BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2014).

No Brasil, o primeiro caso comprovado de presença de microcistinas ocorreu em um lago eutrófico na cidade de São Paulo, onde *Microcystis aeruginosa* foi coletada e isolada de uma floração ocorrida em junho de 1988. Observou-se que a cepa produzia duas variantes de microcistinas: LR e outra nova para a ciência (LF) - (AZEVEDO et al., 1994). Posteriormente, linhagens tóxicas de *Microcystis aeruginosa* foram reportadas em diversas regiões brasileiras (SÁ et al., 2010).

Estudos realizados por Macedo (2009) nos 20 principais açudes do Estado no âmbito do Programa de Longa Duração (PELD Caatinga) demonstraram a ocorrência de cianobactérias potencialmente toxigênicas em 18 deles, com predomínio de *Plankthotrix agardhii*, *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* e em 16, especialmente no período seco. Em 13 açudes foi observado a presença de microcistina em concentrações inferiores a $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ em 2 deles e em 11 os valores foram superiores a $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$. Considerando os mesmos 20 reservatórios, VASCONCELOS et al. 2011 observou que em 2006 as florações de cianobactérias se apresentavam em 3% deles enquanto que em 2009 a porcentagem de açudes com florações aumentou para 62%. Os autores atribuem o aumento da eutrofização nos seis anos decorridos aos impactos antropogênicos crescentes nas bacias estaduais.

3.3 Legislação: padrões e limites nacionais para cianotoxinas

No Brasil, o primeiro relato de intoxicação por cianotoxinas ocorreu em 1988,

quando, ao que tudo indica, cerca de 200 pessoas foram contaminadas por microcistina (MC) advinda de uma floração de cianobactérias presente na água do reservatório de Itaparica, na Bahia, levando 88 pessoas ao óbito (TEIXEIRA et al.,1993). A segunda tragédia em território nacional foi relatada em Caruaru, no estado de Pernambuco, onde se registrou a presença de MC na água utilizada para a lavagem dos aparelhos de hemodiálise do Instituto de Doenças Renais e também a presença de cilindropermopsina (CYN) no carbono e resinas desses aparelhos. Esta água foi retirada da represa Tabocas, onde havia floração de cianobactérias. Este triste episódio resultou na morte de 52 pacientes dos 101 que sofreram intoxicação (CARMICHAEL et al., 2001).

Esses incidentes contribuíram para alterações dos padrões de potabilidade com recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) culminando com a inserção de compostos novos como parâmetro de controle da qualidade para água de consumo humano, tendo em vista os riscos aos diversos efeitos tóxicos que esses compostos representam para a saúde pública. Seguindo os guias da OMS, no mundo todo, a determinação de microcistina (MC) é mais um parâmetro obrigatório de controle da qualidade da água para consumo humanos e ainda diversos países já incorporaram outras cianotoxinas; no Brasil a situação é semelhante e a microcistina passou a ser um parâmetro obrigatório de análise na água de consumo, na Portaria 1469/2000 do Ministério da Saúde, que foi sucedida pela Portaria 518 de 29 de março de 2004 e por sua vez foi substituída pela Portaria 2914 de 12 de dezembro de 2011

A Portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde *dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade* determina o Valor Máximo Permitido (VMP) de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC, sendo que este valor inclui o somatório das concentrações de todas as variantes de microcistinas na água para consumo humano e também determina o valor de $3 \mu\text{g}$ equivalente STX.L⁻¹ para saxitoxina (BRASIL, 2011).

A referida portaria estabelece o monitoramento mensal de microcistinas no reservatório quando o número de células de cianobactérias for inferior ou igual a $10.000 \text{ cel.mL}^{-1}$ e monitoramento semanal quando este valor exceder $20.000 \text{ cel.mL}^{-1}$. Se houver cianotoxinas no manancial devesse realizar análise e identificar os gêneros de cianobactérias, no ponto de captação do manancial superficial, assim como comunicar imediatamente às clínicas de hemodiálise e às indústrias de injetáveis.

3.4 Tecnologias de tratamento de água e remoção de cianotoxinas

O sistema de tratamento de água instalado numa ETA tem como objetivo produzir água de qualidade adequada para consumo humano, ou seja, que cumpra a legislação em vigor, com os menores custos de implantação, manutenção e operação possíveis. Denominado “convencional” ou de ciclo completo que inclui as etapas de coagulação, floculação, sedimentação, filtração em areia e desinfecção (LIBÂNIO, 2010). Esse tratamento possibilita a remoção de grande parte das células intactas de algas e cianobactérias, porém é ineficiente para remoção de cianotoxinas dissolvidas (DI BERNARDO et al., 2010).

Dados do IBGE (2008), apontam que no Brasil a maior parte do volume de água potável distribuída (69,2%) é tratada utilizando o processo convencional empregado em maiores proporções nas Regiões Nordeste, Sudeste e Sul. Na Região Norte o tratamento convencional é feito em menos da metade (40,8%) da água distribuída sendo que 31,7% do tratamento da água é feito por processos não convencionais e 27,4% por simples desinfecção. Verificou-se ainda, que o tratamento convencional é mais utilizado nos municípios com mais de 100 mil habitantes. No entanto, nos municípios com menos de 20 mil habitantes o tratamento é apenas uma simples desinfecção. As etapas do tratamento aplicada normalmente em uma ETA, serão a seguir apresentados.

3.4.1 Coagulação e floculação

O termo coagulação é normalmente aplicado ao mecanismo de desestabilização de partículas coloidais, promovido por agitação da água de modo a dispersar o coagulante. O objetivo principal de um processo de coagulação é através de um coagulante promover a agregação de colóides em suspensão, de modo que adquiram densidade suficiente para precipitar, em tempo útil, num decantador, num flotor, ou para serem capturados num processo de filtração e assim serem removidos (BRITO et al. 2012).

Nas ETAs do Brasil, o coagulante mais utilizado é o sulfato de alumínio devido sua praticidade, preço de aquisição e a operacionalidade, todavia, a principal desvantagem diz respeito ao residual de alumínio total em água, concentrações acima da norma (0,2 mg/L) podem produzir ressuspensão na água e causar danos à saúde humana e grupos vulneráveis (como portadores de doenças renais) (FREITAS, 2001).

O pH de coagulação é influenciado pela alcalinidade, dosagem do coagulante e pelas características físicas e químicas da solução, representando um parâmetro importante por estar relacionado em diversos processos químicos como a precipitação de íons e metais pesados, assim como na solubilidade de nutrientes, atua diretamente na fisiologia das diversas espécies aquáticas e na prevalência das espécies hidrolisadas do coagulante quando a coagulação se efetua com sais de alumínio ou de ferro, independente do mecanismo predominante (LIBÂNIO, 2010).

A floculação é uma operação complementar ao processo de coagulação. Na floculação, as partículas formadas pela adição do coagulante se aglomeram, formando flocos de dimensões mais significativas. Em escala de bancada, a floculação ocorre no próprio equipamento de jar teste. Na escala real, a floculação ocorre nas câmaras de floculação, ou floculadores.

Pela cinética da floculação, quanto maior o gradiente de velocidade, maior será a chance de ocorrer contato entre as partículas, o que é necessário para possibilitar a agregação dos flocos, visando o aumento do tamanho. Contudo, gradientes de velocidade maiores também provocam maior ruptura dos flocos já formados. Portanto, na unidade de floculação ocorrem dois fenômenos que se opõem: a agregação e a ruptura dos flocos. Na prática, tem-se observado que o valor do gradiente de velocidade médio ótimo diminui à medida que aumenta o tempo de floculação (PÁDUA, 2006). A Tabela 2 apresenta valores recomendados para os parâmetros hidráulicos da floculação.

Tabela 2: Valores recomendados para os parâmetros hidráulicos da floculação

Tempo de Mistura Lenta (Tml)	
Hidráulico	Mecanizado
20 min < Tml < 30 min	30 min < Tml < 40 min
Gradiente (G)	
10 s-1 < G < 70 s-1	

Fonte: BRAGA, 2014.

3.4.2 Sedimentação – Decantação

Durante este processo, podem ser removidas areias, matéria particulada e flocos químicos provenientes de processos de coagulação-floculação. As partículas em suspensão na água tendem a sedimentar por ação da gravidade. Contudo, a velocidade de

sedimentação é afetada pelo tamanho, forma e massa volúmica das partículas, bem como pelas propriedades físicas da água. O termo decantação é aplicado, normalmente, quando o objetivo é a obtenção de um líquido clarificado, enquanto o termo sedimentação é usado quando se pretende concentrar lodos (BRITO et al, 2012). A seguir, estão descritos os principais tipos de decantadores usualmente utilizados e encontrados nas ETAs.

3.4.2.1 Decantador convencional de escoamento horizontal

São os tipos de unidades mais comumente utilizados no Brasil e em vários países, respondendo por 60 a 70% da área da estação de tratamento. Frequentemente, os decantadores convencionais de escoamento horizontal apresentam-se na forma retangular em planta, mais podendo ser facilmente ajustado ao lay-out das estações (LIBÂNIO, 2008).

3.4.2.2 Decantador convencional de escoamento vertical ascendente

Os decantadores convencionais de escoamento vertical ascendente, geralmente, são unidades industrializadas, providas ou não de equipamentos para remoção de lodo. Quando a entrada é feita na zona de lodo, tais unidades são denominadas “decantadores de manto de lodo” e trabalham com taxas de escoamento horizontal, pois a água bruta deve apresentar turbidez sempre superior a 50 uT, o que nem sempre acontece (DI BERNARDO e SABOGAL PAZ, 2008).

3.4.2.3 Decantador de alta taxa

Por possibilitarem maior TAS (Taxa de Aplicação Superficial), os decantadores de alta taxa permitem reduzir o espaço físico ocupado pelas ETAs. Entretanto, quando é necessária a aplicação de produtos químicos que necessitam maior tempo de contato, os decantadores de alta taxa podem ser inadequados, em virtude do tempo de detenção neste tipo de unidade em geral ser inferior a 60 minutos, enquanto nos decantadores convencionais é de 2 a 4 horas (PÁDUA, 2006).

3.4.3 Filtração

A filtração é uma combinação de processos físicos, químicos e, em alguns casos, biológicos, que viabiliza a separação de partículas suspensas, coloidais, e de microrganismos presentes na água. Ocorre em meio granular no qual as partículas são retidas nos vazios do meio granular sendo resultado da interação dos mecanismos de transporte, aderência e desprendimento (LIBÂNIO, 2010).

Para realização deste processo, os filtros geralmente são compostos de areia apresentando granulometria diferenciada ficando sobreposta na camada suporte que é geralmente constituída de cascalho e pedregulho.

Quando não há a coagulação química é essencial à utilização da filtração lenta, com ou sem unidades de pré-tratamento em função das características da água bruta, como por exemplo a FiMe – filtração em múltiplas etapas (pré-filtração dinâmica, filtração grossa em pedregulho e filtração lenta em areia), e aquelas que utilizam a coagulação química, pode-se exemplificar o tratamento em ciclo completo (coagulação, floculação, decantação ou flotação e filtração rápida descendente), filtração direta descendente e ascendente, dupla filtração e floto-filtração (DI BERNARDO & DANTAS, 2005).

Entre as tecnologias disponíveis de tratamento de água com uso de coagulante, a filtração direta é a que apresenta o menor custo de implantação, pois, além de dispensar algumas unidades operacionais, utiliza também menor quantidade de coagulante, o que resulta em uma menor produção de lodo (DI BERNARDO et al. 2003). A filtração direta descendente (FDD) é uma tecnologia de tratamento de água que não necessita da sedimentação ou flotação e pode ser realizada apenas de duas formas (PROSAB, 2003):

Filtração direta descendente sem pré-floculação: apresenta um sistema com unidades de mistura rápida e direciona a água coagulada para o filtro.

Filtração direta descendente com pré-floculação: apresenta unidades de mistura rápida, de floculação, decantação e de filtro.

De acordo com DI BERNARDO et al. (2003), comparada ao tratamento de ciclo completo (coagulação, floculação, decantação ou flotação e filtração), a filtração direta descendente apresenta as seguintes vantagens: (1) Custo de construção de 30% a 50% menor; (2) Redução dos custos de operação e manutenção, uma vez que se tem menor

consumo de coagulante e de energia elétrica; (3) São eliminados os equipamentos de remoção de lodo dos decantadores e, também, algumas vezes, os equipamentos de floculação; (4) Menor produção de lodo; (5) Facilidade no tratamento de água bruta com baixa cor, turbidez e algas, e que não apresentam variações bruscas de qualidade.

Dentre as desvantagens, destacam-se: (1) Necessidade de controle mais rigoroso da dosagem de produtos químicos aplicados, principalmente quando não se tem a pré-floculação; (2) Dificuldades no tratamento de água bruta com turbidez ou cor verdadeira altas; (3) Tempo de detenção total da água no sistema é relativamente curto para oxidação de substâncias orgânicas presentes na água que chega ao sistema; (4) Tempo de detenção em todo o tratamento é bastante curto, necessitando de ação rápida nas mudanças de dosagens de produtos químicos durante a mudança da qualidade da água bruta.

Para o desempenho efetivo da filtração direta descendente é de extrema relevância a realização de estudos prévios, para definir as condições de coagulação (tipo e dosagem dos produtos químicos), as condições de mistura rápida (tempo e gradiente de velocidade) e a eventual necessidade de unidades de pré-tratamento, como também para se conseguir uma maior precisão na especificação do material filtrante.

3.4.4 Desinfecção

A desinfecção consiste na destruição ou morte de microorganismos, entre eles os patogênicos, através de um agente químico (cloro, ozônio, iodo, permanganato de potássio) ou de um agente físico (calor, ou radiação ultravioleta). Torna-se necessária porque não é possível assegurar a remoção total dos microorganismos pelos processos físico-químicos usualmente utilizados no tratamento de água.

O processo da desinfecção depende basicamente da natureza do desinfetante e do tipo e quantidade de organismos que se pretende inativar, além das características químicas da água como pH, temperatura, entre outras. Algumas espécies, como esporos, cistos e vírus, são muito mais resistentes do que as bactérias e as formas de trofozoítos dos protozoários (RICHTER, 2009).

As estações de tratamento de água geralmente usam cloro gasoso como agente desinfetante. Uma das grandes características do cloro é formar compostos que permanecem na água, proporcionando um residual desinfetante ativo e, assim, permitindo que haja

inativação de microorganismos após o ponto de aplicação, por exemplo, seja ao longo das tubulações da rede de distribuição ou mesmo nos reservatórios domiciliares dos pontos de consumo (LIBÂNIO,2008). A adoção por etapas de pré e pós-oxidação tem demonstrado resultados satisfatórios quanto à remoção de cianobactérias, mas apresentam problemas pela facilidade em promover a lise celular desses organismos, permitindo a liberação das cianotoxinas (SENS et al., 2006).

Dessa forma, torna-se necessário uma tecnologia de tratamento de água complementar que possa atuar em conjunto visando a otimização do processo. Várias tecnologias têm se destacado nos últimos anos na remoção de microcistina-LR, entre elas, oxidação química (CHANG et al., 2015), microfiltração (SORLINI et al., 2013; HUANG et al., 2015), ultrafiltração (LEE et al., 2008), nanofiltração (TEIXEIRA et al., 2005), osmose reversa (VILLACORTE et al., 2015), adsorção utilizando carvão ativado (HO et al., 2011) e os Processos Oxidativos Avançados.

3.5 Processos Oxidativos Avançados (POAS) no tratamento de água

Segundo ANTONOPOULOU et al., 2014, a combinação de um processo oxidativo avançado (POA) com processos físico-químicos convencionais aplicados ao tratamento de água de um reservatório, possibilita uma solução tecnológica eficaz e segura para obtenção de água potável. A eficiência de remoção de cianobactérias e cianotoxinas pelos processos oxidativos convencionais é altamente dependente dos produtos químicos utilizados, variando suas concentrações durante o tratamento de água de acordo com a quantidade das cianotoxinas entrando no sistema de tratamento. Os parâmetros físicos da água, tais como o pH ou parâmetros operacionais e o tempo de contato influenciam na eficiência do processo (JURCZAK et al., 2005).

Os processos oxidativos avançados (POAs) constituem uma classe especial de técnicas de oxidação apontadas como promissoras, produzindo radicais livres de hidroxilas (OH.), os quais são tradicionalmente considerados como espécies ativas, responsáveis pela reação rápida de moléculas orgânicas, dando início à uma série de reações de degradação que podem culminar em espécies inóculas, tipicamente dióxido de carbono e água (JARDIM; TEIXEIRA, 2004; RIZZO et al., 2009; MAHMOUD; FREIRE, 2007; OLLER et al., 2011), ou seja, transformando-os em subprodutos menos

tóxicos e possibilitando até a completa mineralização desses subprodutos (SHARMA et al., 2012; FOTIOU et al., 2014).

Os POAs dividem-se em sistemas homogêneos e heterogêneos, onde o radical hidroxila é gerado com ou sem irradiação. Os processos com a presença de catalisadores sólidos são chamados de heterogêneos e aceleram a velocidade da reação até atingir um equilíbrio químico sem sofrerem alteração química (NOGUEIRA, 2007), os demais são conhecidos como homogêneos. Na Tabela 3 é apresentado a classificação dos sistemas típicos de processos oxidativos avançados.

Tabela 3. Classificação dos sistemas típicos de processos oxidativos avançados.

Sistemas Homogêneos		Sistemas Heterogêneos	
Com Radiação	Sem Radiação	Com Radiação	Sem Radiação
H ₂ O ₂ /UV	O ₃	Feixe de elétrons	Eletrofenton
O ₃ /UV	Fe ²⁺ /H ₂ O ₂ (Fenton)	TiO ₂ /O ₂ /UV	Processos eletroquímicos
Foto-Fenton (H ₂ O ₂ /Fe ²⁺ /UV)	O ₃ /H ₂ O ₂	TiO ₂ /H ₂ O/UV	
O ₃ /H ₂ O ₂ /UV	O ₃ /OH ⁻		

Fonte: FIOREZE et al., 2014.

Estas técnicas avançadas para o tratamento de poluentes, apresentam inúmeras vantagens (CHIRON et al., 2000; ANTONOPOULOU, et al., 2014), dentre elas:

- ✓ Apresentam-se como principais aplicações no tratamento de água e efluentes, remediação de solos e água subterrâneas, desinfecção e remoção de odores;
- ✓ Pode ser aplicado de forma isolada - principalmente na utilização para degradação de substâncias de águas pouco contaminadas, como é o caso, por exemplo, de águas poluídas com compostos organohalogenados (hidrocarbonetos clorados) e defensivos agrícolas;
- ✓ No caso de efluentes com grau de poluição mais elevado ou complexo, o dispêndio na etapa de oxidação pode ser consideravelmente reduzido através de uma combinação com outras etapas de tratamento como, por exemplo, o biológico e/ou coagulação/floculação/sedimentação;

- ✓ Apresentam rápidas velocidades de reação, além da oxidação não seletiva, o que permite que vários contaminantes sejam tratados ao mesmo tempo pelo mesmo reagente;
- ✓ Caracterizam-se serem um tipo de tratamento destrutivo, ou seja, o contaminante não é simplesmente transferido de fase, mas sim degradado através de uma seqüência de reações químicas;
- ✓ A sua inespecificidade viabiliza a sua utilização para a degradação de substratos de qualquer natureza química, sendo destaque a degradação de contaminantes refratários e tóxicos, cujo tratamento biológico pode ser viabilizado através da oxidação avançada parcial;
- ✓ Oferecem variadas maneiras possíveis para a produção de radicais OH• além de outros radicais, permitindo assim uma melhor conformidade com os requisitos específicos de um determinado tratamento;

Dentre as condições que limitam sua aplicabilidade, se destacam (DOMÈNECH et al., 2001; FREIRE et al., 2000):

- ✓ Nem todos os processos estão disponíveis em escala adequada;
- ✓ Os custos podem ser elevados, principalmente devido ao consumo de energia;
- ✓ Há formação de subprodutos de reação, os quais em alguns casos são tóxicos;
- ✓ Apresentam restrições de aplicação em condições de elevada concentração dos poluentes;

Os contaminantes orgânicos podem ser oxidados pelo radical hidroxil de acordo com diferentes mecanismos básicos. Estes mecanismos dependem da estrutura do contaminante orgânico, sendo estes: a) abstração de átomo de hidrogênio; b) transferência eletrônica; e c) adição eletrofílica (BRITO & SILVA, 2012; NOGUEIRA et al., 2007).

3.5.1 Processo Oxidativo Avançado UV/ H₂O₂

Segundo ANDREOZZI et al. (2000) e ANDREOZZI et al. (2003), unindo-se o mecanismo de degradação por fotólise com radiação UV ao mecanismo químico oxidati-

vo com H₂O₂, o tratamento híbrido H₂O₂/UV fornece, em geral, uma degradação maior do que a obtida com a aplicação dos processos separadamente.

O peróxido de hidrogênio, por ser um oxidante enérgico, a reação indireta é muito mais eficiente porque o potencial de oxidação do radical hidroxila (E°=+2,80 V) é mais elevado que o do peróxido de hidrogênio molecular (E°= +1,78V). Assim, o emprego do peróxido de hidrogênio combinado com a radiação ultravioleta (UV) (reação indireta) gera o radical hidroxila que é um agente químico com alto poder de oxidação (eq. 1).



A fotólise do peróxido de hidrogênio é capaz de gerar radical hidroxila que pode ser sequestrado pelos compostos orgânicos para ocorrer à oxidação e recombinar com outras espécies de radical hidroxila, formando peróxido de hidrogênio ou iniciando uma reação de degradação em cadeia (ARAÚJO et al., 2006), como mostra as equações abaixo.



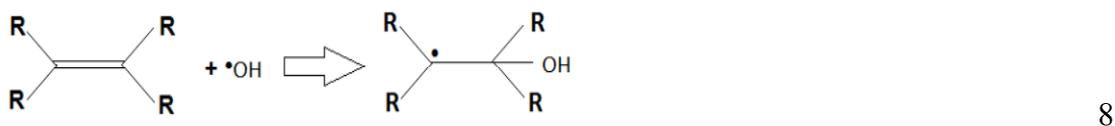
As reações descritas acima se referem ao comportamento dos radicais hidroxila, onde a equação (2), demonstra a quebra de uma molécula de H₂O₂, gerando dois radicais hidroxila na reação de fotólise, mas existe uma forte possibilidade de ocorrer a recombinação desses radicais formando peróxido de hidrogênio novamente. Já as equações (3) a (4) descrevem o consumo de OH• e a diminuição da velocidade da reação de oxidação dos poluentes (TAMBOSI et al., 2010).

É importante destacar que a taxa de adição de H₂O₂ pode influenciar na mineralização, pois possui variação da sua estabilidade de acordo com as características do meio, como pH, temperatura e a presença de espécies reativas. O pH com valores baixos entre 2 e 5 e também entre 3 e 5 são preferidos para o processo de tratamento com H₂O₂/UV, por não apresentar efeitos de capturadores de radicais, especialmente íons como carbonatos e bicarbonatos (GOGATE e PRANDIT, 2004).

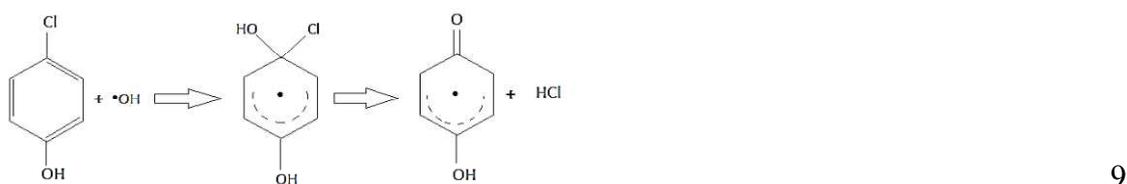
Os radicais orgânicos são formados a partir da oxidação de compostos orgânicos por abstração de hidrogênio, causada pelos radicais hidroxil (Equação 6) (NOGUEIRA et al., 2007; MARTINS, 2011). Posteriormente, o radical peróxido é formado através da adição de oxigênio molecular (Equação 7), é o intermediário que inicia as reações térmicas em cadeia levando à degradação à CO₂, água e sais orgânicos (BRITO & SILVA, 2012). Este tipo de reação ocorre geralmente com hidrocarbonetos alifáticos.



A adição eletrolítica ocorre em compostos orgânicos que contêm ligações π , sendo que os resultados dessas reações são os radicais orgânicos. (NOGUEIRA et al., 2007; MARTINS, 2011). Essas reações ocorrem geralmente com hidrocarbonetos insaturados ou aromáticos (Equação 8).



Os íons cloretos podem ser formados quando ocorre uma rápida descloração de clorofenóis (Equação 9).



As reações de transferência eletrônica ocorrem em hidrocarboneto clorado. A transferência de elétrons é normalmente encontrada em reações entre radicais de íons hidroxila e inorgânicos (Equação 10) (NOGUEIRA et al., 2007; BRITO, 2012).



O processo UV/ H₂O₂ pode ser aplicado no tratamento e purificação das águas de abastecimento e águas residuárias, sendo utilizado em processos de degradação de compostos recalcitrantes e também para eliminar a coloração persistente de efluentes pós tratamento biológicos, permitindo a degradação de uma série de contaminantes.

Dentre os contaminantes estudados utilizados neste processo podem-se citar: pesticidas e herbicidas, contaminantes farmacêuticos, aditivos para gasolina como o MTBE (methyl tertiary butyl ether), corantes têxteis, cianotoxinas entre outros. As principais vantagens e desvantagens desse sistema estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Vantagens e desvantagens do processo fotocatalítico UV/H₂O₂.

Vantagens	Desvantagens
Solubilidade do H ₂ O ₂ em água	Custo do processo
Geração de radicais OH por molécula de H ₂ O ₂ fotolisada	H ₂ O ₂ funciona como “capturador” de radicais de hidroxilas
Estabilidade química	Taxa de oxidação química do poluente é limitada pela taxa de formação das radicais hidroxilas
Procedimento de operação simples	
Inexistência de problemas de transferência de massa	Baixo coeficiente de absorvidade do H ₂ O ₂ , em 254 nm

Fonte: SOUZA, 2014.

Alguns autores e colaboradores como CORNISH et al., (2000), Svrcek & Smith, 2004, QUIAO et al., (2005), LI et al., (2009), HE et al., (2011), ZONG et al., (2013), HE et al., (2015) e WANG et al., (2015) utilizaram este processo no tratamento e purificação das águas de abastecimento e obtiveram excelentes resultados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da Pesquisa

O estudo experimental foi desenvolvido no Laboratório de Química Sanitária e Ambiental (LAQUISA), localizado na Estação Experimental de Tratamento Biológico de

Esgotos Sanitários – EXTRABES, que foi concedida a Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), situado no bairro do Tambor, município de Campina Grande – PB, Brasil.

4.2 Cultivo de *Microcystis aeruginosa*

A cepa de *Microcystis aeruginosa* (Word Data Center Microorganisms 835) foi conservada na sala de cultivo de cianobactérias - LAQUISA em quantidades satisfatórias para a execução dos ensaios.

Inicialmente as células de *Microcystis aeruginosa* foram repicadas em volumes pequenos de 10 mL em tubos de ensaios e posteriormente em volumes maiores de 250 mL até chegar em um volume 2 L. As culturas foram mantidas em sala climatizada (24 °C) com fotoperíodo de 12 h sob iluminação de intensidade luminosa em torno de 1200 LUX, fornecidas por lâmpadas fluorescentes de 40W e 12 h sem iluminação. Os cultivos acima de 2000 mL foram aerados com auxílio de compressor de ar utilizados na aeração de aquário (Figura 2).

Figura 2: Cultivo da Cepa *Microcystis aeruginosa*



Fonte: Autor, 2017.

O meio de cultura utilizado para manutenção do cultivo foi o ASM-1 líquido modificado de GORHAM et al., (1964) e ZAGATTO & ARAGÃO (1992). Esse meio contém os nutrientes necessários para o desenvolvimento da biomassa de cianobactérias. As soluções que compõem o meio ASM-1 (A, B, C e D) foram diluídas em 1.000 mL de água deionizada, posteriormente o pH do meio de cultura foi ajustado para 7,4 e esterilizado em autoclave à 121 °C durante 20 min.

A esterilização da vidraria e do meio de cultura utilizado seguiu as etapas: (1) imersão da vidraria em solução de ácido clorídrico (5%) durante 24 h; (2) autoclavagem à 121 °C e pressão de 1 atm durante 20 min e (3) radiação UV durante 30 min do meio,

respectivamente. O repique foi realizado em câmara de fluxo laminar com toda vidraria já esterilizada. A composição de cada uma das soluções que fazem parte do meio de cultura ASM-1 é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5: Composição das soluções do meio de cultura ASM-1

Soluções Estoque	Nutrientes	Quantidade (g)
Solução A	NaNO ₃	8,5000
	MgSO ₄ + 7H ₂ O	2,4500
	MgCl ₂ + 6H ₂ O	2,0500
	CaCl ₂ + 2H ₂ O	1,4500
Solução B	KH ₂ PO ₄	8,7000
	Na ₂ HPO ₄ + 12H ₂ O	17,8000
Solução C	H ₃ BO ₃	28,4000
	MnCl ₂ + 4H ₂ O	13,9000
	FeCl ₂ + 6H ₂ O	10,8000
	ZnCl ₂	3,3500
	CoCl ₂ + 6H ₂ O	0,1900
	CuCl ₂ + 2H ₂ O	0,0140
Solução D	EDTA titriplex	18,6000

Fonte: Autor, 2017.

Os repiques foram realizados a cada 15 dias, quando o cultivo apresentava o crescimento exponencial, na ordem de 10^6 cel.mL⁻¹. A densidade celular foi quantificada através da contagem de células utilizando microscópio invertido e aplicando-se o método de sedimentação de UTHERMÖHL (1958).

4.3 Extração da microcistina-LR

Após a cultura atingir a fase exponencial, com densidade celular na ordem de 10^6 cel.mL⁻¹, a microcistina-LR foi extraída pelo método de congelamento/descongelamento do cultivo por três vezes consecutivas, de modo que ocorresse a lise celular e subsequente a liberação das toxinas intracelulares para o meio de cultura (BROOKE et al., 2006; WANG et al., 2007).

4.4 Coleta da Água Bruta (AB)

A água bruta (AB) utilizada para constituição da água de estudo (AE) com a qual se realizaram os experimentos foi proveniente do Reservatório Saulo Maia, localizado no

município de Areia – Paraíba. O município de Areia (Figura 3), integra o bioma dos Brejos de Altitude do Planalto da Borborema, apresenta o clima tropical chuvoso, quente e úmido com chuvas de outono-inverno. “As Koppen”, com precipitação média anual de 1.200mm e temperaturas médias anuais de 21° C, o relevo apresenta vales profundos e estreitos dissecados, está localizado na microrregião do brejo paraibano, entre as coordenadas geográficas 6°51’47” e 7°02’04”S, e 35°34’13” e 35°48’28”W, numa área de 269,4Km², sua população é de aproximadamente 23.829 habitantes e sua densidade demográfica é de 88,42 hab./Km² (CPRM, 2005 e IBGE, 2015).

Figura 3. Mapa de localização do reservatório de estudo.



Fonte: AESA, 2017.

Após a coleta, a água bruta (AB) foi transportada em bombonas de plástico para o LAQUISA e armazenada em caixa de fibra de vidro com capacidade de 500 L, não exposta à luz solar, e preservada em temperatura ambiente.

4.5 Preparação da água de estudo (AE)

Para a preparação da água de estudo (AE) foi necessário quantificar a microcistina-LR na suspensão de células lisadas utilizando o método detecção e quantificação de MC-LR por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM), conforme descrito no capítulo 1. Com base nos

resultados dessa quantificação, verificou-se que a média de concentração de microcistina-LR após a lise era de 44 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Inicialmente foram preparados 12 L de água de estudo (AE), para isto, utilizou-se 9,2 L da água bruta do reservatório Saulo Maia com adição 2,8 L do cultivo lisado de *Microcystis Aeruginosa* para obter concentração final na água de estudo de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR. No entanto, não foi possível obter essa concentração devido ao efeito de matriz da amostra em estudo. Por ser uma água que apresenta concentração elevada de matéria orgânica adicionada a restos de células de cianobactérias. Logo, a matriz da amostra apresentou componentes que interferiram no desempenho da medição, esses interferentes reduziram o sinal, comprometendo o resultado.

Realizou-se a caracterização da água de estudo para os parâmetros de pH, temperatura, alcalinidade total, dureza total, turbidez, cor aparente, cor verdadeira, carbono orgânico total, clorofila-a e microcistina -LR conforme métodos preconizados por APHA (2012), exceto carbono orgânico total e microcistina – LR, conforme mostrados na Tabela 6.

As medições de pH, turbidez, cor aparente, cor verdadeira, clorofila-a foram realizadas com os seguintes equipamentos: pHmetro (Tecnal Tec 3MP), turbidímetro (DLT-WV) e espectrofotômetro (COLEMAN 35-D) respectivamente.

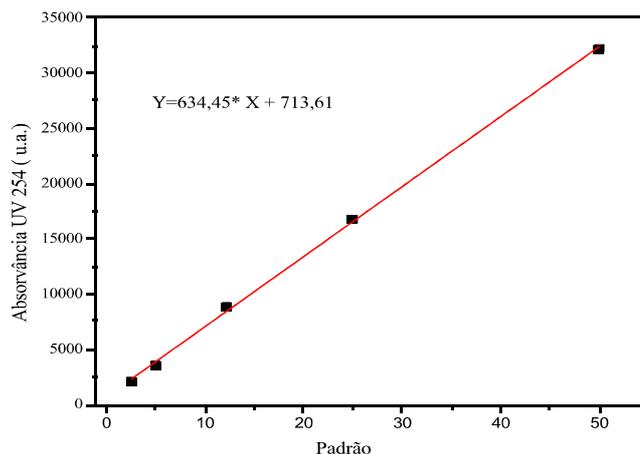
Tabela 6. Parâmetros analisados na caracterização da água de estudo e métodos utilizados.

PARÂMETROS	MÉTODOS APHA, (2012).
pH	Eletrométrico 4500 B
Temperatura	Eletrométrico 4500 B
Alcalinidade Total ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)	Titulométrico 2320 B
Dureza Total ($\text{mg.L}^{-1} \text{CaCO}_3$)	Titulométrico 2340 C
Turbidez (uT)	Nefelométrico 2130 B
Cor aparente e verdadeira (uH)	Espectrofotométrico 2120 C
Clorofila (mg/L)	Metanol à frio 10200 H
COT (mg/L)	TOC DIFF
Microcistina – LR ($\mu\text{g/L}$)	CLAE - EM

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

O carbono orgânico total (COT) foi determinado com o método TOC DIFF em um analisador de carbono da marca Analytik Jena MC 3100. Os padrões para a curva analítica para determinação do COT foram feitos com solução de biftalato de potássio, utilizados padrões de concentração de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 mg/L verificado na (Figura 4).

Figura 4. Curva analítica para determinação do COT.



4.6 Procedimento Experimental

A Funasa, por meio do Departamento de Engenharia de Saúde Pública (Densp), financia a implantação, ampliação e/ou melhorias em sistemas de abastecimento de água nos municípios com população de até 50.000 habitantes. Esta ação tem como objetivo fomentar a implantação de sistemas de abastecimento de água para controle de doenças e outros agravos, com a finalidade de contribuir para a redução da morbimortalidade – provocada por doenças de veiculação hídrica – e para o aumento da expectativa de vida e da produtividade da população (FUNASA, 2012).

Nesta perspectiva o sistema experimental de estudo (Figura 5) foi constituído em escala piloto compreendendo as etapas do Tratamento convencional (coagulação (Elaboração de diagramas de coagulação) / floculação/ sedimentação/ filtração) e processo oxidativo avançado - UV/H₂O₂, para tratamento de água como microcistina – LR.

Figura 5. Sistema experimental para tratamento de água com microcistina –LR



Legenda:

- 1- Recipiente da água de estudo
- 2- Filtro de Areia
- 3- Recipiente da água filtrada
- 4- Reator fotocatalítico

Fonte: Autor, 2017.

4.6.1 Etapa I: Construção dos diagramas de Coagulação

Com a Água de Estudo (AE) constituída pelo cultivo lisado de *Microcystis Aeruginosa* diluída em água bruta, foram realizados ensaios de coagulação, floculação e sedimentação em *Jar test* para determinar o pH ótimo e as melhores condições de coagulação e sedimentação. O equipamento utilizado é da marca *PoliControl* e apresentou gradientes de velocidade até 1000 s^{-1} . Os parâmetros de controle utilizados na coagulação/floculação e sedimentação estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7: Parâmetros de controle utilizados nos ensaios de coagulação, floculação e sedimentação.

PARÂMETRO	VALOR
Tempo de Mistura rápida (T_{mr})	60 s
Gradiente médio de mistura rápida (G_{mr})	120 s^{-1}
Tempo de floculação (T_f)	20 min
Velocidade de sedimentação (V_s)	$1,40 \text{ cm.min}^{-1}$

Fonte: SANTIAGO (2008).

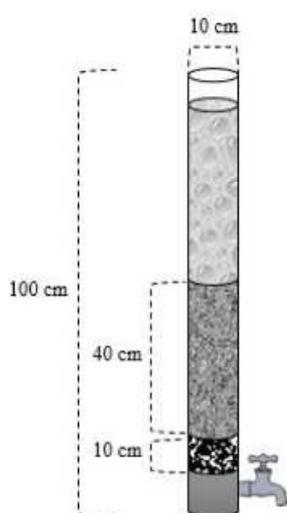
Foram realizados ensaios variando as faixas de pH inicial (6,5 a 8,5) e as dosagens (12,5 a 75 mg.L⁻¹) do coagulante Sulfato de Alumínio (Al₂(SO₄)₃). (14-18) H₂O. Esses ensaios objetivaram identificar a eficiência de remoção de cor aparente em função das dosagens utilizadas.

4.6.2 Etapa II: Tratamento Convencional

Com a dosagem ótima de Sulfato de Alumínio (50 mg.L⁻¹) e pH inicial (7,5) de coagulação definido pelo diagrama de coagulação, deu-se início a realização dos ensaios que simularam o tratamento convencional da água. Foi adicionado 24 mL de Sulfato de Alumínio em 12 L da água de estudo (AE), que seguiu as etapas coagulação, floculação e sedimentação.

O processo de filtração foi realizado com um filtro de areia, confeccionado em tubo de plástico PVC apresentando cerca de 1,0 m de comprimento e 0,1 m de diâmetro interno, com sistema de retrolavagem (Figura 6). O filtro foi operado em fluxo descendente com taxa de filtração de 143,25 m³/m²d, preenchido com meio filtrante composto por 40 cm de areia disposto, com granulométrica entre 0,42 e 0,6 mm e 10 cm de pedregulhos em coluna (Tabela 8), objetivando manter a pressão necessária, para produzir melhores resultados em termos da qualidade da água filtrada.

Figura 6. Filtro de areia



Fonte: Autor, 2017

Tabela 8. Características do filtro de areia

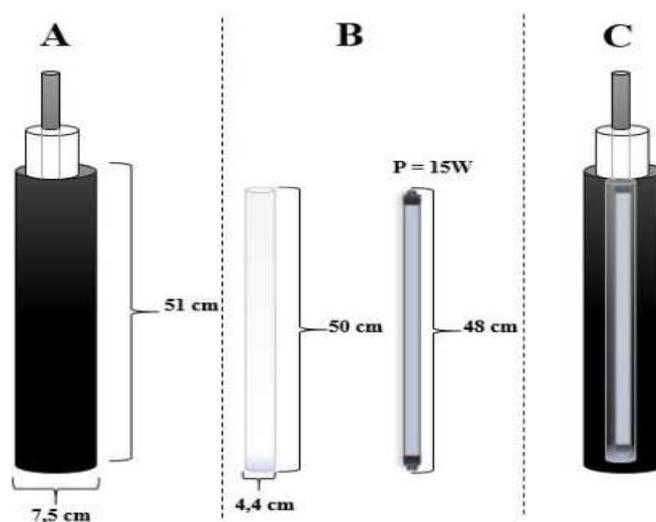
CARACTERÍSTICA	VALOR
Tamanhos dos grãos de areia	0,42-0,6 mm
Taxa de filtração	143m ³ /m ² d
Altura da câmara filtrante	40 cm

Fonte: Autor, 2017.

4.6.3 Etapa III: Processo Oxidativo Avançado (POA) utilizando UV/ H₂O₂

Após o tratamento convencional, a água de estudo (AE) foi conduzida ao reator fotocatalítico para realização dos ensaios de oxidação. O reator era composto de um cano de PVC, um tubo de quartzo e uma lâmpada UVC (A). O tubo de quartzo foi acoplado no interior do reator (B) por um orifício situado na extremidade superior, a lâmpada funcionou emitindo radiação através do tubo de quartzo dentro do reator (C) (Figura 7). As dimensões do reator apresentam 51 cm de altura e 7,5 cm de diâmetro. Na parte superior foi feita uma abertura em círculo com diâmetro de 4,5 cm para entrada do tubo de quartzo que apresentou 50 cm de altura e 4,4 cm de diâmetro. A lâmpada utilizada, foi do tipo germicida, com 15 w de potência e comprimento de 48 cm, conforme também se observa na Figura 7.

Figura 7: Estrutura do reator fotocatalítico. Em (A) Dimensões da estrutura externa do reator, (B) Dimensões do tubo de quartzo e lâmpada UV (C) reator com tubo de quartzo e lâmpada UV.



Fonte: Autor, 2017.

O reator operou em sistema de “fluxo contínuo”, em que a água de estudo foi adicionada diretamente no reator e conduzida por mecanismo de recirculação com auxílio de uma bomba de pulso. O efluente tratado foi recolhido por uma válvula superior e realizado o monitoramento dos parâmetros descritos na Tabela 9 a seguir.

Tabela 9: Parâmetros monitorados na operação do reator fotocatalítico

PARÂMETROS	MÉTODOS APHA, (2012).
pH	Eletrométrico 4500 B
Turbidez (uT)	Nefelométrico 2130 B
Cor aparente e verdadeira (uH)	Espectrofotométrico 2120 C
Potencial Redox (mV)	Eletrométrico 2510 B
Peróxido Residual (H ₂ O ₂)	Espectrofotométrico (RAMOS, et al., 2016)
COT (mg/L)	TOC DIFF
Microcistina – LR (µg/L)	CLAE - EM

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

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da água bruta (AB) e água de estudo (AE)

A água bruta coletada no reservatório Saulo Maia e água de estudo (AE) foram previamente caracterizadas antes de todos os ensaios. As médias dos resultados estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Caracterização da água bruta e água de estudo.

PARÂMETROS	AB	AE
médias		
pH	7,4	7,2
Temperatura (°C)	27	25,6
Alcalinidade Total (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	60,8	52
Dureza Total (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	23	30
Turbidez (uT)	20,5	26,9
Cor aparente (uH)	41,6	50
Cor verdadeira (uH)	20	25
Clorofila (mg/L)	49,03	60,65
COT ((mg/L)	3,06	9,9
Microcistina – LR (µg.L ⁻¹)	3	3,6

Com base nos resultados da Tabela 10, os valores para alcalinidade total, tanto na água bruta como na água de estudo situaram acima de 50 mg L⁻¹ CaCO₃.

O pequeno acréscimo de turbidez, cor aparente e verdadeira foi favorecido quando adicionado à água bruta o extrato de células lisadas de *Microcystis aeruginosa*, que apresenta uma concentração bastante elevada de matéria orgânica, pigmentos e restos celulares de cianobactérias.

A concentração do carbono orgânico total (COT) na água de estudo (AE) foi 3 vezes maior que a água bruta (AB), fato resultante também da adição de microcistina-LR. O valor do COT indica a concentração de matéria orgânica natural no ambiente aquático, sendo resultado da presença de compostos orgânicos que são derivados principalmente da decomposição de resíduos de vegetais e animais (SILLANPÄÄ et al., 2015).

A água bruta (AB) apresentou uma concentração de microcistina –LR bastante elevada em relação à Portaria 2914/2011, sendo um valor encontrado com frequência em ambientes lênticos eutrofizados e indica riscos sérios à saúde humana. Devido ao efeito de matriz do parâmetro de seletividade pelo método analítico de identificação por CLAE-EM para MC-LR, a água de estudo (AE) não apresentou aumento significativo com a adição de microcistina-LR.

5.2 Definição das condições ótimas de coagulação

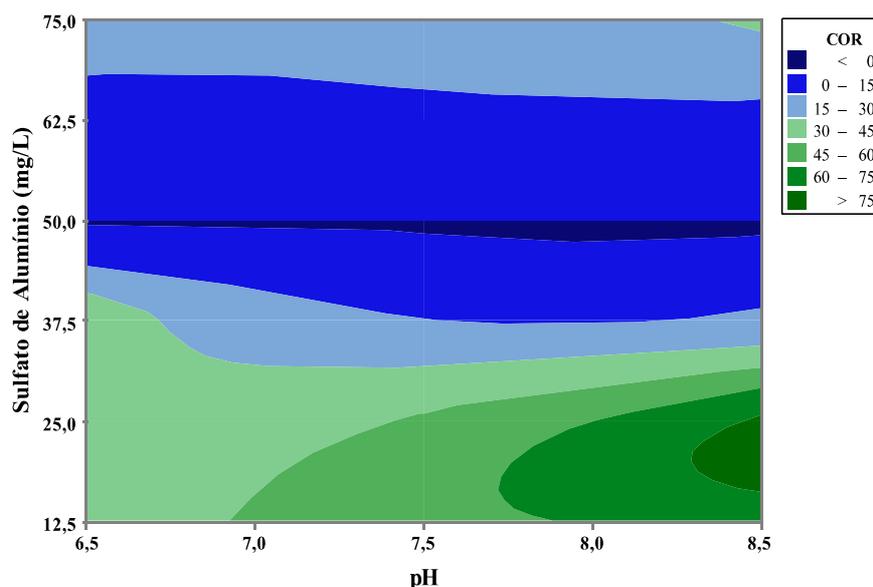
A partir dos seis ensaios de *Jar Test* realizados, aplicando-se os parâmetros mencionados na Tabela 7, foram elaborados diagramas de coagulação utilizando como coagulante o Sulfato de Alumínio.

Sabe-se que para a escolha da melhor dosagem é necessário obter uma menor concentração do coagulante, ajustado a um pH o mais próximo possível do natural. Assim, os ensaios foram realizados com pH inicial de 6,5, 7,5, e 8,5, avaliando dosagens de 12,5 até 75 mg.L⁻¹ (em intervalos de 12,5 mg.L⁻¹) de Sulfato de Alumínio (Al₂(SO₄)₃). (14-18) H₂O.

A remoção de cor verdadeira, a partir dos dados apresentado no diagrama através da Figura 8, mostrou faixas pontuais de remoção com dosagem de Sulfato de Alumínio com valores de 50 e 62,5 mg.L⁻¹ na faixa de pH inicial de 6,5 a 8,5. Dosagens

entre 12,5 a 37,5 mg.L⁻¹ resultaram em valores (30 e 75 uH) de cor aparente remanescente acima do VMP pela Portaria 2419/11. O percentual de remoção da cor aparente foi de 100% para dosagem de 50 mg.L⁻¹ do coagulante e pH inicial de coagulação de 7,5 respectivamente.

Figura 8. Diagrama de coagulação com sulfato de alumínio em função da cor aparente para água de estudo.



5.3 Ensaios de coagulação, floculação, sedimentação e filtração

Sabendo que a eficiência da ação do coagulante depende da aplicação da dosagem apropriada e do pH de coagulação, que, por sua vez, dependem dos parâmetros de qualidade da água bruta, principalmente alcalinidade, pH e turbidez, entre outros, foram repetidos os melhores resultados obtidos a partir do diagrama de coagulação (Figura 8).

Com dosagem de sulfato de alumínio (50 mg.L⁻¹) e pH inicial (7,5) de coagulação foi realizado novamente ensaios de coagulação, floculação, sedimentação. Após este processo a água de estudo (AE) foi conduzida ao filtro de areia para realização do tratamento convencional da água. Na Tabela 11 apresenta a caracterização da água de estudo em relação a coagulação, decantação e filtração utilizada na repetição dos ensaios com a melhor dosagem.

Tabela 11. Parâmetros analisados durante o tratamento convencional da água

PARÂMETROS	AE	AC	AD	AF
médias				
pH	7,5	6,8	6,7	6
Alcalinidade Total (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	52	36,6	41,8	36,8
Dureza Total (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	30	38	40	32
Turbidez (uT)	26,9	44,4	18,4	0,8
Cor aparente (uH)	50	55	45	25
Cor verdadeira (uH)	25	30	24	5
Clorofila (mg/L)	60,65	22,56	16,85	10,03
COT ((mg/L)	9,9	4,15	3,42	2,88
Microcistina – LR (µg. L ⁻¹)	3,0	3,6	3,6	3,5

Legenda: AE: água de estudo. AC: água coagulada. AD: água decantada. AF: água filtrada

A Tabela 11 mostra que os valores médios dos parâmetros analisados apresentaram variações significativas. O valor médio de turbidez na água de estudo (AE) foi de 26,9 uT e após os processos de coagulação, floculação e sedimentação, esse valor reduziu para 18,4 uT (AD). Nas condições de coagulação utilizadas, observou-se que a remoção de turbidez foi superior à da cor verdadeira, indicando que, provavelmente, se deve à presença de algas ou outros componentes orgânicos passíveis de conferir cor à água.

Após a passagem pelo filtro de areia, a turbidez remanescente apresentou o valor 0,8 uT, o que promoveu um percentual de remoção de 97% para a dosagem de 50 mg.L⁻¹ de sulfato de alumínio e pH de coagulação de 6,8.

A filtração direta descendente surgiu principalmente da dificuldade em se tratar águas com turbidez e cor relativamente baixas. Devido à baixa quantidade de partículas suspensas, é necessária uma grande dosagem de coagulante para a formação de grandes quantidades de precipitados do metal do coagulante (alumínio ou ferro). Nesse mecanismo ocorre a neutralização das cargas das partículas presentes na água bruta, não havendo necessidade de se formar flocos grandes e sim de desestabilizar as partículas para que estas sejam mais eficientemente retidas nos filtros (SANTOS, et al., 2007).

Houve diferenças significativas entre os valores de cor aparente e cor verdadeira. Tal fato se dá devido a um transpasse de células de microalgas, cianobactérias e matéria orgânica, as quais ficam retidas no meio filtrante. Após a filtração direta descendente o efluente filtrado apresentou valores de cor verdadeira inferior a 15 uH em conformidade com o padrão de potabilidade vigente, significando uma remoção de 80% para o valor final de 5 uH.

A concentração de biomassa algal, representada pela clorofila-a apresentou redução de 82,3 % após o processo de filtração e a matéria orgânica, determinado pelo carbono orgânico total (COT) reduziu cerca de 70 % ao final do tratamento.

Não foi satisfatória a remoção da microcistina –LR pelos processos de coagulação, floculação, sedimentação. O filtro de areia com taxa de filtração de 143 m³/m²d também não promoveu remoção deste contaminante, corroborando com diversos estudos, uma vez que a literatura afirma que os tratamentos convencionais para potabilização da água se mostram ineficientes para a remoção destes micropoluentes.

5.4 Processo Oxidativo Avançado (POA) utilizando UV/ H₂O₂

Com finalidade de verificar a influência de diferentes concentrações de H₂O₂ e tempo, na degradação de microcistina –LR. Após o tratamento convencional, a água de estudo foi conduzida ao reator fotocatalítico para execução dos ensaios de fotocatalise homogênea utilizando (UV/H₂O₂).

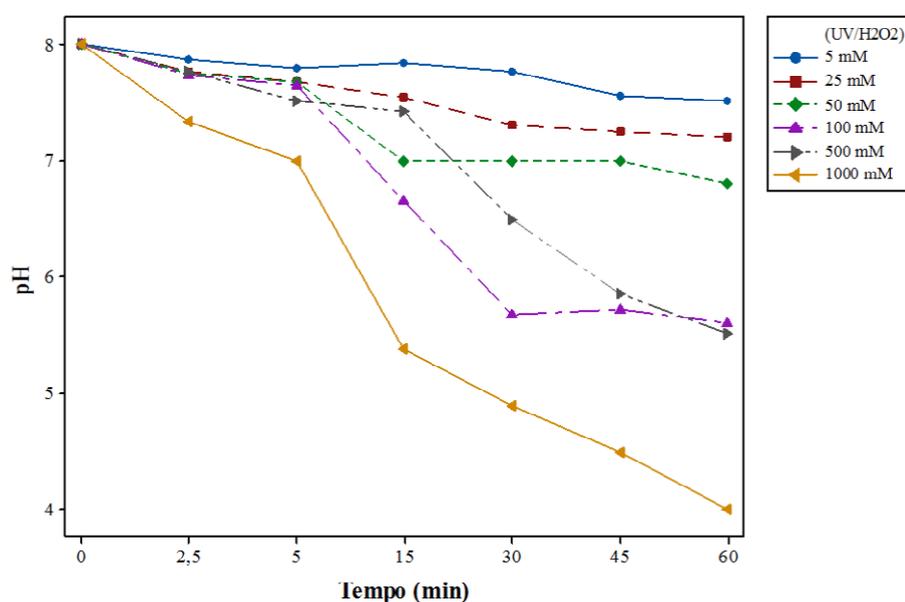
No reator foram realizados 6 ensaios, aplicando-se dosagens de 5, 25, 50, 100, 500 e 1000 mM de H₂O₂ e tempos de oxidação de 0, 2,5, 5, 15, 30 45 e 60 min.

A literatura descreve que o processo UV/ H₂O₂ ocorre com maior taxa de conversão em pH básico (ALVAREZ et al., 2016), desta forma, o pH inicial para todos ensaios foi ajustado em 8 com adição de solução de NaCl 0,1 N. Os parâmetros monitorados após o tratamento da água foram: pH, potencial redox, concentração de microcistina –LR, concentração de peróxido residual, carbono orgânico total e cor, que serão descritos a seguir.

5.4.1 Potencial Hidrogeniônico (pH)

Conforme observa-se na Figura 9, houve variação significativa do pH em função do tempo avaliado. Após 30 min de oxidação, os ensaios utilizando as maiores dosagens (100, 500 e 1000 mM de H₂O₂) no reator fotocatalítico obtiveram pH ácido. A dosagem de 1000 mM de H₂O₂ adicionada na água de estudo, apresentou maior eficiência de redução do pH em 60 min.

Figura 9. Variação do pH em função do tempo de oxidação em reator fotocatalítico utilizando (UV/H₂O₂)



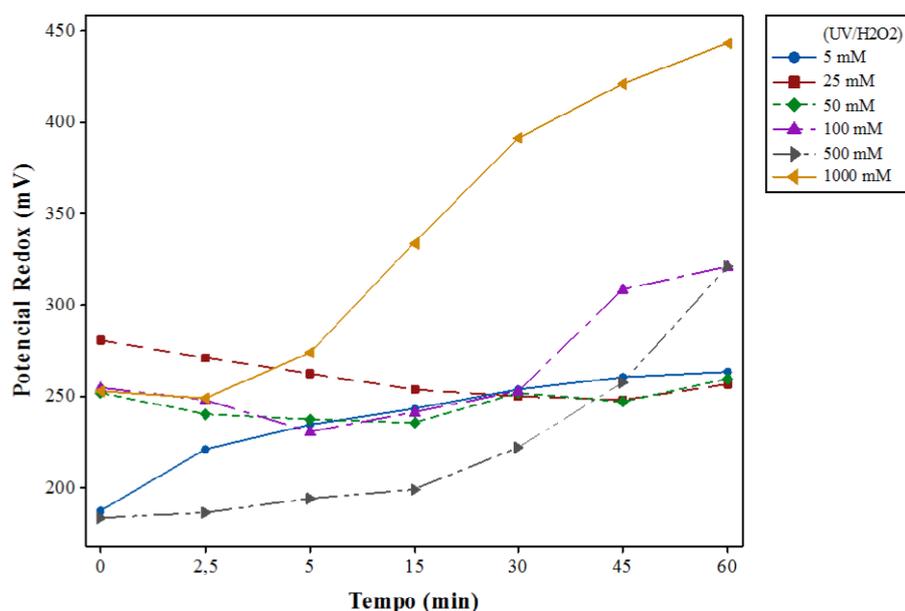
Estes resultados são próximos aos do estudo realizado por LI et al., 2009, no qual se observou alta taxa de degradação de MC-LR quando uma concentração de 3 mM de H₂O₂ foi utilizada. Os autores relataram que em condições de pH neutro e ácido foram mais apropriadas para a degradação da MC-LR.

5.4.2 Potencial Redox (mV)

O potencial redox é um importante indicador para reações de oxidação, uma vez que, ele indica a tendência de reação redox no meio. SOUSA (2010) descreve que, quanto maior o potencial redox no meio reacional, maior será a capacidade deste meio para oxidação de matéria orgânica.

Na Figura 10, verifica-se que as reações da fotólise de peróxido de hidrogênio apresentaram o valor máximo de geração de radicais OH^\bullet aos 60 min de reação com dosagem de 1000 mM de H_2O_2 .

Figura 10. Variação do potencial redox em função do tempo de oxidação no reator fotocatalítico utilizando (UV/ H_2O_2)

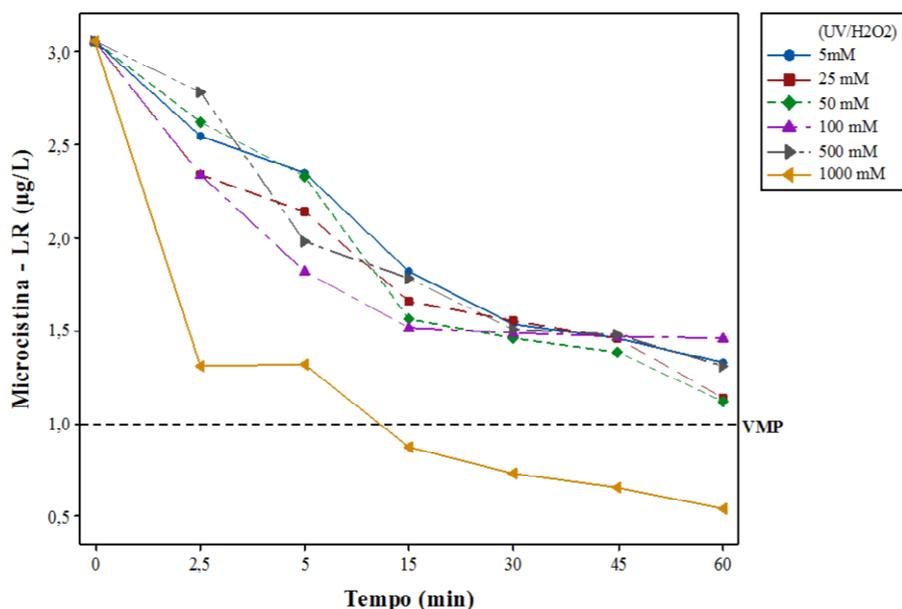


O decréscimo do potencial redox ocorreu nos primeiros minutos avaliados nas dosagens de 25 e 50 mM de H_2O_2 . Este fato deve ter sido ocasionado devido ao consumo dos radicais hidroxilas nas reações de oxidação, diminuindo o potencial redox do meio.

5.4.3 Microcistina – LR

O reator fotocatalítico mostrou-se eficiente na degradação de microcistina – LR. Contudo, dos seis tratamentos realizados, apenas com a adição de 1000 mM de H_2O_2 na água, após 15 minutos de oxidação (Figura 11) conseguiu atingir o valor de $1 \mu\text{g}/\text{L}^{-1}$ exigido pela Portaria 2419/2011. Aos 60 min do processo oxidativo a fotólise (UV/ H_2O_2) promoveu uma remoção de 83,3% da microcistina, para esta mesma dosagem de H_2O_2 que apresentou o valor final de aproximadamente $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MC-LR.

Figura 11. Variação da concentração de microcistina-LR em função do tempo de oxidação no reator fotocatalítico utilizando (UV/H₂O₂)



Em estudo similar, HE et al., 2011 utilizaram uma concentração inicial de 1 mM de MC-LR e obteve uma remoção de 93,9%, sob influência de radiação UV de 80 mJ/cm² e uma concentração de H₂O₂ de 882 mM.

Estes mesmos autores, em 2015 investigaram a degradação das variantes LR, RR, YR e LA de microcistina presentes em água por processos apenas UV, UV/H₂O₂, UV / S₂O₈⁻² e UV / HSO₅. Foi constatado que a fotólise direta (254 nm) limitou a degradação de MCs, enquanto que a adição de um oxidadante melhorou significativamente a eficiência de degradação com uma ordem de UV / H₂O₂ > UV / S₂O₈⁻² > UV / HSO₅ para 3 µg/L⁻¹ de MC-LR e 1 mM de H₂O₂. A remoção de MC-LR por UV/ H₂O₂ pareceu ser mais rápida. Ainda, foi demonstrado neste estudo que os aminoácidos variáveis na estrutura das MCs influenciaram não apenas a cinética de degradação mas também os mecanismos de reação preferíveis para a oxidação.

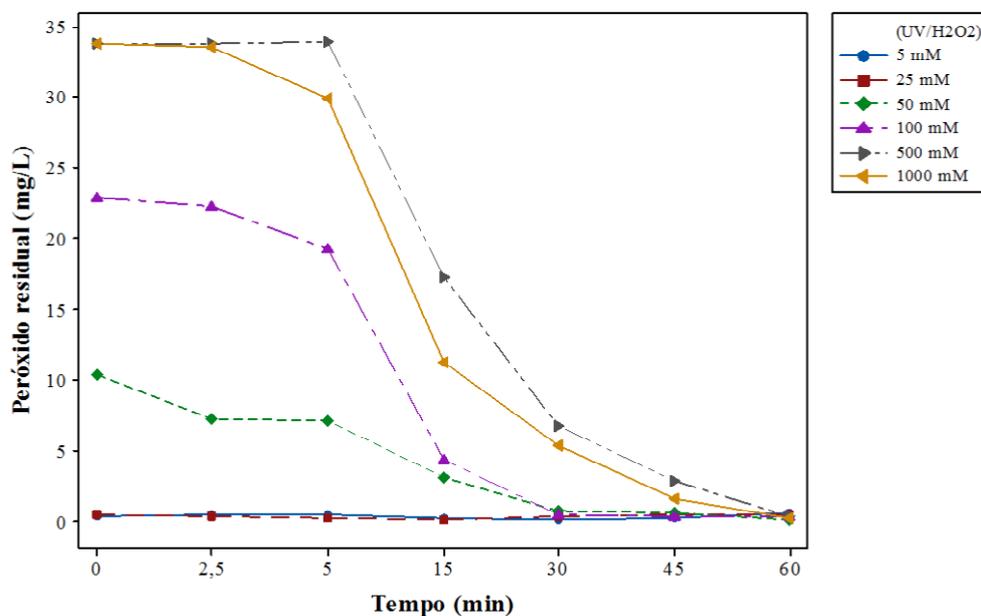
Comparando a eficiência de remoção de microcistinas pelos processos H₂O₂/UV e TiO₂ /UV/ H₂O₂, CORNISH et al. 2000, constataram que o processo H₂O₂/UV foi capaz de degradar a microcistina-LR embora a uma taxa muito mais lenta do que a encontrada para TiO₂ /UV/ H₂O₂. Os resultados indicaram que apenas 18% de mineralização ocorreu com o sistema TiO₂ /UV/ H₂O₂. Em concentrações mais elevadas, verificou-se que o H₂O₂ concorre com a MC-LR para locais de superfície no catalisador.

5.4.4 Peróxido Residual

SIVRACEK & SMITH (2004), utilizando processo (UV/H₂O₂) avaliaram fatores como diferentes dosagens de H₂O₂, concentração de matéria orgânica e alcalinidade em água com MC-LR. A degradação de toxina foi superior a 90% em 30 min, o que originou uma elevada concentração de H₂O₂ residual, que não é desejável para água potável, sendo necessário um controle constante deste oxidante. Os autores relatam que deve ser adicionada uma quantidade suficiente de H₂O₂, de forma que seja absorvida em aproximadamente 30% de radiação UV, com comprimentos de onda entre 200 e 300 nm.

No estudo, ao fim dos 60 min de oxidação (Figura 12), as leituras de peróxido residual para as dosagens avaliadas, indicaram valores abaixo do limite de quantificação do método, que é 2,17 mg/L, equivalente a 0,016 mM.

Figura 12. Variação do peróxido residual em função do tempo de oxidação no reator fotocatalítico utilizando (UV/H₂O₂)



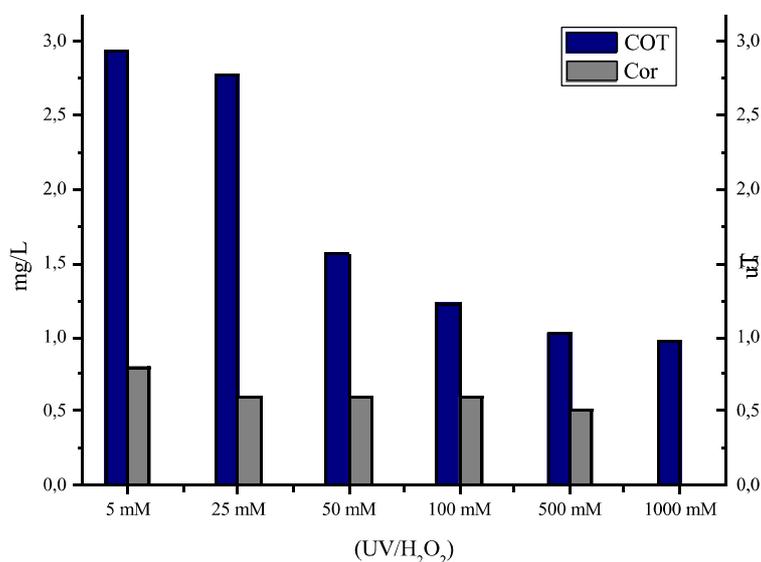
5.4.5 Carbono orgânico total (COT) e Cor Verdadeira

Durante os ensaios de degradação, a concentração de matéria orgânica (MO) foi monitorada por análise de carbono orgânico total (COT) que permitiu avaliar a capacidade de oxidação de matéria orgânica.

Como esperado, com aumento da concentração de H_2O_2 adicionada no reator, a matéria orgânica remanescente foi reduzida gradativamente. O COT da água de estudo apresentou uma concentração inicial de 9,9 mg/L (Tabela 11) e após 60 min de degradação no reator, o tratamento T6 [1000mM (UV/ H_2O_2)] reduziu a 0,98 mg/L (Figura 13), ocasionando assim, uma remoção de 90,1% de COT. Em resultados de HE et al., 2011, a presença de alcalinidade com concentração (89,6-117,8 mgCaCO₃/L⁻¹) e MO de ~ 9,5 mg/L – representada pelo COT, contribuíram para uma diminuição significativa na taxa de degradação de MC-LR.

A cor verdadeira também foi monitorada após cada ensaio realizado. Conforme Figura 13, verificou-se que o tratamento oxidativo promoveu uma remoção de 100% ao final do T6. Segundo MARTÍN et al., 2001 o processo UV/ H_2O_2 é eficiente na remoção de cor em águas contaminadas, sendo relacionado a sua remoção com a redução do COT. Isto realmente pôde ser observado, pois nos experimentos quando houve a redução de Cor também reduziu a concentração de COT, demonstrando ser um processo realmente eficaz de degradação de compostos orgânicos.

Figura 13. Concentração de Carbono Orgânico Total e Cor Verdadeira para as dosagens de utilizadas no reator fotocatalítico



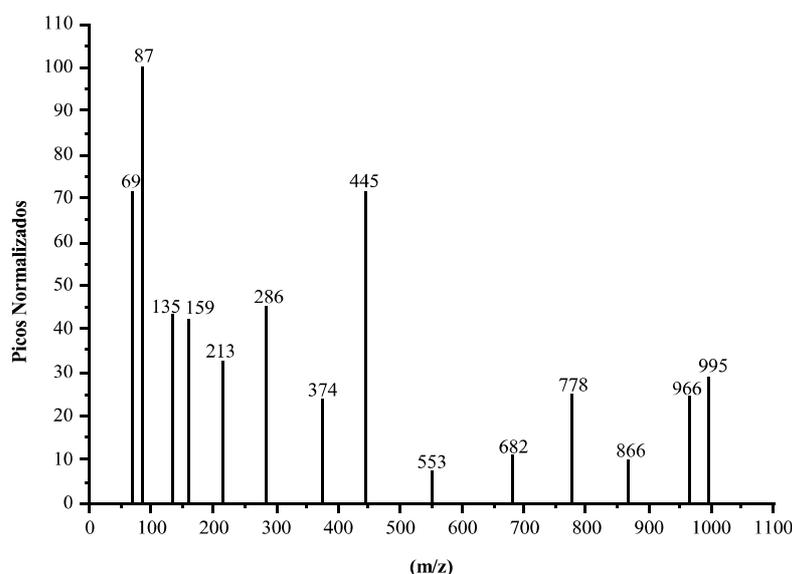
5.5 Subprodutos formados nos processos da oxidação da Microcistina-LR

A microcistina-LR é uma molécula relativamente grande e apresenta vários grupos funcionais em diversas posições e cada grupo apresenta suscetibilidade para rompimento das ligações gerando os subprodutos da degradação (SILVA, 2015).

A reação do radical hidroxila com a MC-LR pode ocorrer através de várias vias incluindo o anel benzeno, ligações dieno e abstração de átomos de hidrogênio alifáticos. A degradação dos radicais hidroxila induzida pela MC-LR ocorre predominantemente através da oxidação do grupo Adda, o que resulta na perda de atividade biológica da molécula (SONG et al., 2009).

No estudo, a degradação da MC-LR foi confirmada através de varredura no modo “FULL MS2” realizada no espectrômetro de massas possibilitando a identificação dos fragmentos da molécula. Os fragmentos identificados apresentaram massa/carga (m/z) de 69; 87; 135, 159; 213; 286; 374; 445; 553; 558; 682; 778; 866; 967 e 995 e se mostraram presentes com pequenas variações de intensidade relativa nos 6 tratamentos realizados. A Figura 14 apresenta o espectro da fragmentação da molécula de microcistina – LR obtido no tratamento T6 representado pela dosagem de 1000 mM de H₂O₂, o qual promoveu a remoção de 83% da toxina estudada.

Figura 14. Espectro da fragmentação da MC-LR obtido no Tratamento T6.



Os subprodutos formados após a oxidação gerou 5 compostos com fórmulas químicas de C₄₉H₇₄N₁₀O₁₂, C₄₀H₆₃N₁₀O₁₁, C₂₉H₄₇N₉O₁₀, C₉H₁₄N₂O₄, C₆H₁₂N₄O, para a

massa/carga de 995,860, 681, 213 e 160 respectivamente. Foi verificado ainda que a maior parte dos intermediários tinha a estrutura cíclica intacta e ao decorrer da degradação os intermediários foram sendo linearizados e os peptídeos com massa molar mais baixos puderam ser identificados pela clivagem da porção MeAsp e L-Arg.

Em inferência, ZONG et al., 2013 observaram os subprodutos formados após a oxidação de MC-LR exposta a também a UV/H₂O₂, e obtiveram sete tipos de MC-LR-OBPs, com as fórmulas químicas de C₄₉H₇₄N₁₀O₁₃, C₄₉H₇₆N₁₀O₁₄, C₄₉H₇₈N₁₀O₁₆, C₄₉H₇₆N₁₀O₁₅, C₃₇H₅₈N₁₀O₁₂, C₃₃H₅₄N₁₀O₁₂ e C₃₄H₅₄N₁₀O₁₂. O anel aromático e o dieno conjugado em Adda e a ligação C-C em Mdha foram os principais locais alvo de oxidação.

WANG et al., 2015 avaliaram os efeitos combinados da radiação UV-C e H₂O₂ em *Microcystis aeruginosa* sobre suas estruturas fisiológicas e morfológicas bem como sua toxicidade. Com concentrações de 60, 150, 240 e 300 mM de H₂O₂ associado a uma lâmpada UV-C de mercúrio de baixa pressão (253,7 nm) nos tempos 20, 40, 80 e 120 minutos, respectivamente. A radiação UV-C atuou diretamente sobre os componentes da membrana intracelular. O H₂O₂ induziu um forte efeito oxidativo sobre os lipídios da membrana, promovendo sua degradação. Foi comprovado eficiência na remoção de MC-LR extracelular e intracelular, demonstrando que este tratamento é um método adequado para o controle da floração de cianobactérias em relação à destruição e eficiência de purificação.

6. CONCLUSÃO

- A coagulação, floculação e sedimentação mostraram-se eficientes, com remoção em 80% de cor verdadeira e 97% de turbidez para dosagem de 50 mg.L⁻¹ de Sulfato de Alumínio e pH de coagulação de 6,8.
- Não foi satisfatória a remoção da microcistina-LR pelos processos de coagulação, floculação, sedimentação. O filtro de areia apresentando taxa de filtração de 143 m³/m²d também não promoveu remoção deste contaminante.

- A dosagem de peróxido de hidrogênio influenciou o processo de oxidação, tendo-se obtido melhores eficiências de remoção em uma determinada concentração de oxidante. Com uma aplicação de 1000 mM de H₂O₂ em 60 min de irradiação UV em um reator cilíndrico, o processo UV/H₂O₂ apresentou eficiência de remoção de 100 % de cor verdadeira, 90% de COT e 83,3% de microcistina – LR, evidenciando a degradação da toxina em estudo.
- O método empregado para análise da oxidação da microcistina-LR utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a *Espectrometria de Massas* mostrou-se uma técnica altamente sensível e rápida na detecção de fragmentos resultantes da oxidação de (UV/H₂O₂) comprovando a eficácia do tratamento. Os principais fragmentos apresentaram m/z de 69, 87, 135, 159, 213, 186, 374, 445, 553, 558, 682, 778, 866, 967 e 995.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ B. L., VILLEGAS-GUZMAN, P., Degradation of a Toxic Mixture of the Pesticides Carbofuran and Iprodione by UV/H₂O₂: Evaluation of Parameters and Implications of the Degradation Pathways on the Synergistic Effects, **Water Air Soil Pollut**, 227-215, 2016.

ANDERSEN, J. et al. Revealing the degradation intermediates and pathways of visiblelightinduced NF-TiO₂ photocatalysis of microcystin-LR, **Applied Catalysis B: Environmental** 154–155 259–266, 2014.

ANDREOZZI, R., CAPRIO, V., INSOLA, A., et al. The oxidation of metol (n-methyl-p-aminophenol) in aqueous solution by UV/H₂O₂ photolysis, **Water Research**, v. 34, n. 2, pp. 463-472, 2000.

ANDREOZZI, R., CAPRIO, V., MAROTTA, R., et al. “Paracetamol oxidation from aqueous solutions by means of ozonization and UV/H₂O₂ system”, **Water Research**, v. 37, n. 5, pg 993-1004, 2003.

ANTONIOU, M.G.; SHOEMAKER, J.A.; CRUZ, A.A.; DIONYSIOU, D.D. LC/MS/MS structure elucidation of reaction intermediates formed during the TiO₂ photocatalysis of microcystin-LR. **Toxicon**, v.51, p.1103-1118, 2008.

ANTONOPOULOU, M. A review on advanced oxidation processes for the removal of taste and odor compounds from aqueous media. **Water research**, v.53, p.215-234, 2014.

APHA, A. W. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22 ed. Washington, DC. American Public Health Association. American Water Works Association, Water Pollution control Federation, 2012.

APELDOORN, M.E.V.; EGMOND, H.P.V.; SPEIJERS, G.J.A. **Toxins of cyanobacteria**. *Molecular Nutrition & Food Research*, v.51, p.7-60, 2007.

ARAUJO, F. V. F.; YOK, L.; TEIXEIRA, L. A. C. Remoção de cor em soluções de corantes reativos por oxidação com H₂O₂/UV. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 11-14, 2006.

BISHOP, C. T.; ANET, E. F. L. J. & GORHAM, P. R. Isolation and identification of the fast-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37: 453-471, 1959.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; HEREMAN, T. C.; CORDEIRO-ARAÚJO, M. K.; MACEDO-SILVA, I.; DIAS, C. T.; SASAKI, F. F. C.; MOURA, A. N. Phytotoxicity associated to microcystins: a review. *Brazilian Journal of Biology*. V. 74, n. 4, p. 753-760, 2014.

BOTES, D. P.; TUIMAN, A. A.; WESSELS, P. L.; VILJOEN, C. C.; KRUGER, H.; WILLIAMS, D. H.; SANTIKARN, S.; SMITH, R. J. & HAMMOND, S. J.. The structure of cyanoginosin-LA, a cyclic peptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, v. 1: 2311-2318, 1984.

BRAGA, F. P. **Avaliação de desempenho de uma estação de tratamento de água do município de Juiz de Fora – MG**. UFJF, Juiz de Fora –MG, 2014.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília: **Diário Oficial da União**, 2011.

BRITO A. Tratamento de água para consumo humano e uso industrial, *Publindustria, Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 11-14, 2012.

BRITO, N.N.; SILVA, V.B.M. Processo oxidativo avançado e sua aplicação ambiental. *Revista Eletrônica de Engenharia Civil*, v.3, p.36-47, 2012.

BRUNO, C.B. Contribuição para o estudo da utilização de materiais fotocatalíticos para degradação de cianobactérias e microcistinas em massas de águas naturais. **Dissertação de Mestrado** – Faculdade de Ciência e Tecnologia. Lisboa, Portugal. 2011. 110p.

CALIJURI, M.; ALVES, M.S.A.; SANTOS, A.C.A. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. São Carlos: Rima Editora, 2006.

CARMICHAEL, W. W. The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*, v. 270: 78-86, 1994.

CARMICHAEL, W.W.; AZEVEDO, S.M.F.O.; AN, J.S.; MOLICA, R.J.R.; JOCHIMSEN, E.M.; LAU, S.; RINEHART, K.L.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM, G.K. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*, v. 109, n. 7, p. 663-668, 2001.

CHANG, J.; CHEN, Z.L.; WANG, Z.; KANG, J.; CHEN, Q.; YUAN, L.; SHEN, J.M. Oxidation of microcystin-LR in water by ozone combined with UV radiation: The removal and degradation pathway. **Chemical Engineering Journal**. v.276, p.97-105, 2015.

CHIRON, S. Pesticide chemical oxidation: State-of-the-art, **WaterRes**. 34(2), 366-377,2000.

CODD, G.A.; AZEVEDO, S.M.F.O.; BAGCHI, S.N.; BURCH, M.D.; CARMICHAEL, W.W.; HARDING, W.R.; KAYA, K.; UTKILEN, H.C. South and Central America: Toxic cyanobacteria. In: Codd, G.A. *et al.* (ed.) **Cyanonet: a global network for cyanobacterial bloom and toxin risk management**. Paris: IHP UNESCO, p.115-126, 2005.

CODD, G.A.; LINDSAY, J.; YOUNG, F.M.; MORRISON, L.F.; METCALF, J.S. Harmful Cyanobacteria. In: HUISMAN, J.; MATTHIJS, H.C.P.; VISSER, P. M. (Org.) **HARMFUL CYANOBACTERIA. Aquatic Ecology Series**. v.3, 2005.

CORNISH, B.J.P.A.; LAWTON, L.A.; Robertson, P.K.J. Hydrogen peroxide enhanced photocatalytic oxidation of microcystin-LR using titanium dioxide. **Applied Catalysis B: Environmental**, v.25, p.59-67, 2000.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A.D.B. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. v.1, 2.ed. São Carlos: Rima, 2005.

DI BERNARDO. L; MINILLO, A.; DANTAS. A.D.B. **Florações de algas e cianobactérias: suas influências na qualidade da água e nas tecnologias de tratamento**, São Carlos: LDIBE, 2010.

DI BERNARDO, L.; SABOGAL PAZ, L. P. **Seleção de tecnologias de tratamento de água**. São Carlos: Editora LDIBE LTDA, 2008. Volume 1.

DIGNUM, M.; MATTHIJS, H.C.P.; PEL, R.; LAANBROEK, H.J.; MUR, L.R. Nutrient limitation of freshwater cyanobacteria. In: HUISMAN, J.; MATTHIJS, H.C. P.;

DOMÈNECH, X., JARDIM, W. F., LITTER, M. I. Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. In: **Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogênea**. Cap. 1, Rede CYTED, La Plata, 2001.

ESTEVES, F.A. **Fundamentos de limnologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.

FIGLIOLINI, M.; SANTOS, E.P.; SCHMACHTENBERG, N. Processos oxidativos avançados: fundamentos e aplicação ambiental. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.18, p.79-91, 2014.

FREITAS, M. B. Tratamento de Água para Consumo Humano. Especialização em Engenharia Sanitária e Controle Ambiental. Rio de Janeiro: FIOCRUZ/ENSP, 2001.

FRISTACHI, A. & SINCLAIR, J. Occurrence of cyanobacterial harmful algal blooms: workgroup report. In: Hudnell, H. Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs. 1ª Ed., Vol. 619. Nova Iorque, EUA: **Springer**, 45-103, 2008.

FUNASA-Fundação Nacional de Saúde. **Cianobactérias Tóxicas na Água para Consumo Humano na Saúde Pública e Processos de Remoção em Água para Consumo Humano**. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2003, 56p.

GOGATE, P. R., PANDIT, A. B., “A review of imperative technologies for wastewater treatment II: hybrid methods”. **Advances in Environmental Research**, v.8, pp. 553-597, 2004.

HE, X.; DE LA CRUZ, A.A.; HISKIA, A.; KALOUDIS, T.; O’SHEA, K.; DIONYSIOU, D.D. Destruction of cyanotoxin microcystins by UV-254 nm based direct photolysis and advanced oxidation processes (AOPs): Influence of variable amino acids on the degradation kinetics and reaction mechanisms. **Water Research**, v.74, p.227-238, 2015.

HE, X.; PELAEZ, M.; WESTRICK, J.A.; O’SHEA, K.E.; HISKIA, A.; TRIANTIS, T.; KALOUDIS, T.; STEFAN, M.I.; DE LA CRUZ, A.A.; DIONYSIOU, D.D. Efficient removal of microcystin-LR by UV-C/H₂O₂ in synthetic and natural water samples. **Water research**, v.46 p.1501-1510, 2012.

IBELINGS, B.W.; CHORUS, I. Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: A review. **Environmental Pollution**, v.150 p.177-192, 2007.

JARDIM, F. A.; MACHADO, J. N. A.; SCHEMBRI, M. C. A. C.; AZEVEDO, S. M. F. O. & SPERLING, E. V. A experiência da COPASA no monitoramento, detecção e adoção de medidas mitigadoras para as cianobactérias tóxicas em estações de tratamento de água - Minas Gerais - Brasil. In, CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, Porto Alegre, RS (Brasil), pp. 1-1, 2000.

JARDIM, F. A. & VIANA, T. H. Análise de algas - Cianobactérias e cianotoxinas como parâmetro de controle do tratamento da água para abastecimento. In, Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, n. 22, Joinville, pp. 30, 2003.

JARDIM, W. F.; TEIXEIRA, C. P. A. B. Processos Oxidativos Avançados. **Caderno Temático**, v. 3, p. 1-9, 2004.

JI, Y., LU, G., CHEN, G., HUANG, B., ZHANG, X., SHEN, K. & WU, S. Microcystin-LR Induces Apoptosis via NF-κB /iNOS Pathway in INS-1 Cells., *Int. J. Mol. Sci.* , v. 12(7), 4722-4734. 2011

JURCZAK, T.; TARCZYNSKA, M.; IZYDORCZYK, K.; MANKIEWICZ, J.; ZALEWSKI, M.; MERILUOTO, J. Elimination of microcystins by water treatment processes - examples from Sulejow Reservoir, Poland. **Water Research**, v.39, p.2394-2406, 2005.

KARDINAAL, W.E.A.; VISSER, P.M. Dynamics of cyanobacterial toxins. In: HUISMAN, J.; MATTHIJS, H.C.P.; VISSER, P.M. (Org.) **HARMFUL CYANOBACTERIA. Aquatic Ecology Series**, v.3, 2005.

LEE, J.; WALKER, H.W. Mechanisms and factors influencing the removal of microcystin-LR by ultrafiltration membranes. **Journal of Membrane Science**. v.320, p.240-247, 2008.

LI, L.; GAO, NAI-YUN; DENG, Y.; YAO, JUAN-JUAN; ZHANG, KE-JIA; LI, HAI-JUN; YIN, DI-DI; OU, HUA-SE; GUO, JIAN-WEI. Experimental and model comparisons of H₂O₂ assisted UV photodegradation of Microcystin-LR in simulated drinking water. **Journal of Zhejiang University SCIENCE**, v.10, p.1660-1669, 2009.

LIBÂNIO, M. **Fundamentos de qualidade e tratamento da água**. Campinas: Átomo, 3ed. 2010.

LIBÂNIO, M. **Fundamentos de qualidade e tratamento da água**. Campinas: Átomo, 2 ed.2008.

MACEDO, D.R.G. Microcistina na água e biomagnificação em peixes de reservatórios de abastecimento público do Estado da Paraíba. **Dissertação** (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - PRODEMA, Universidade Federal da Paraíba - Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa – PB, 2009.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; STAHL, D.; CLARK, D.P. **Microbiology Brock**. 13. ed. Pearson Education, p. 2012.

MAHMOUD, A.; FREIRE, R. S. Métodos emergentes para aumentar a eficiência do ozônio no tratamento de águas contaminadas. **Química Nova**, v. 30, n.1, p. 198-205, 2007.

MARTÍN, C. A., ALFANO, O. M., CASSANO, A. E. Water decolorization using UV radiation and hydrogen peroxide: a kinetic study. **Water Science and Technology**. V 44 (5), p.53-60. 2001.

MEREL, S.; WALKER, D.; CHICANA, R.; SNYDER, S.; BAURÈS, E. & THOMAS, O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. **Environ Int**, 59: 303-327, 2013.

METCALF, J.S.; CODD, G.A. Cyanotoxins. In Freshwater Benthic Environments. In: WHITTON, B.A. (Org.) **Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time**, New York: **Springer**, p.1-13, 2012.

NEILAN, B.A.; PEARSON, L.A.; MOFFITT, M.C.; MIHALI, K.T.; KAEBERNICK, M.; KELLMANN, R.; POMATI, F. The genetics and genomics of cyanobacterial toxicity. In: HUDNELL, H. **Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs**. New York: **Springer**, 2008. chap. 17, p. 417-452.

NICHOLSON, B. & BURCH, M. Evaluation of Analytical Methods for Detection and Quantification of Cyanotoxins in Relation to Australian Drinking Water Guidelines. Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment Endorsed, 64, 2001.

NOGUEIRA, R.F.P. Fundamentos e aplicações ambientais dos processos fenton e foto-fenton. **Química Nova**, v.30, n.2, p.400-408, 2007.

PÁDUA, V. L. DE; FERREIRA, A. C. DA S. Qualidade da água para consumo humano. In: Abastecimento de água para consumo humano. Belo Horizonte: UFMG. p. 153-221,2006.

PAERL, H. W.; HUISMAN, J. Blooms like it hot. **Science**, v. 320, p. 57-58, 2009.

PEGRAM, R. A.; HUMPAGE, A. R.; NEILAN, B. A.; RUNNEGAR, M. T.; NICHOLS, T.; THACKER, R. W.; PFLUGMACHER, S.; ETHERIDGE, S. M. & LOVE, A. H. . Cyanotoxins Workgroup Report. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 619: 317-381.2008

QIAO, R.P; LI, N.; QI, X.H.; WANG, Q.S.; ZHUANG, Y.Y. Degradation of microcystin-RR by UV radiation in the presence of hydrogen peroxide. **Toxicon**, v.45, 745-752, 2005.

RICHTER, C. A. R **Água: Métodos e Tecnologia de Tratamento** Editora: EDGARD BLUCHER, 2009.

SÁ, L. L. C.; VIEIRA, J. M. S.; MENDES, R. A.; PINHEIRO, S. C. C.; VALE, E. R.; ALVES, F. A. S.; JESUS, I. M.; SANTOS, E. C. O. & COSTA, V. B. Occurrence of toxic cyanobacterial bloom in the left margin of the Tapajós river, in the Municipality of Santarém (Pará State, Brazil). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1: 159-166, 2010.

SANT'ANNA, C. L. & AZEVEDO, M. T. P. Contribution to the knowledge of potentially toxic Cyanobacteria from Brazil. **Nova Hedwingia**, 71 (3-4), 359-385, 2000.

SANT'ANNA, C.L; AZEVEDO, M.T.P.; WERNER, V.R.; DOGO, C.R.; RIOS, F.R.; CARVALHO, L.R. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. **Algol Studies**. v.126, p.251-265, 2008.

SANTOS, P.C.C.S; TEIXEIRA, A.R; ALMEIDA, C.P; LIBÂNIO, M. PÁDUA, V.L. Estudo de coagulação aplicada a filtração direta descendente. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. V.12, N 4. P 361-370. 2007.

ŠEJNOHOVÁ, L.; MARŠÁLEK, B. Microcystis. In: WHITTON, B.A. (Org.) Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time, New York: **Springer**, p.1-13, 2012.

SENS, M. L.; DALSSASSO, R. L.; MONDARDO, R. I.; MELO FILHO, L. C. Filtração em Margem. In: Prosab 4 – Contribuição ao estudo da remoção de cianobactérias e microcontaminantes orgânicos por meio de técnicas de tratamento de água para consumo humano. Belo Horizonte: ABES. p. 173-236. 2006.

SCHANTZ, E.J.; GHAZAROSSIAN, V.E.; SCHNOES, H.K.; STRONG, F.M.; SPRINGER, J.P.; PEZZANITE, J.O.; CLARDY, J. The structure of saxitoxin. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 97, p. 1238-1239, 1975.

SCHEMBRI, M.A; NEILAN, B. A; SAINT, C. P. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindropermopsis raciborskii*. **Environmental Toxicology**, Hoboken, v. 16, p. 413-421, 2001.

SCOTT, A.J.T.; MARCARELLI, M. Cyanobacteria. In Freshwater Benthic Environments. In: WHITTON, B.A. (Org.) *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*, New York: **Springer**, p.271-289, 2012.

SHARMA, V. K. et al. Destruction of microcystins by conventional and advanced oxidation processes: a review. **Separation and Purification Technology**, v. 91, p. 3-17, 2013.

SILVA, A. G. Avaliação do pH de oxidação do processo fenton na remoção de microcistina-LR de água de abastecimento. **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Campina Grande. 2015.105p.

SIMONSEN, M. E.; MUFF, J.; BENNEDSEN, L. R.; KOWALSKI, K. P.; SØGAARD, E. G. Photocatalytic bleaching of p-nitrosodimethylaniline and a comparison to the performance of other AOP technologies. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 216, p. 244-249, 2010.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I.& BARTRAM, J. (ed.). **Toxic cyanobacteria in water**. London: E & FN Spon. p.41-111. 1999.

SOARES, M.C.S.; HUSZAR, V.L.M.; MIRANDA, M.N.; MELLO, M.M.; ROLAND, F.; LÜRLING, M. Cyanobacterial dominance in Brazil: distribution and environmental preference. **Hydrobiologia**, 717:1–12. 2013

SORLINI, S.; GIALDINI, F.; COLLIVIGNARELLI, C. Removal of cyanobacterial cells and Microcystin-LR from drinking water using a hollow fiber microfiltration pilot plant. **Desalination**, v.309, p.106-112, 2013.

SOUZA, I. D; FAZA, L.P; JUSTO, R. M. POA Processos Oxidativos Avançados. UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA. 2014.

TAMBOSI, J. L YAMANAKA, L. Y., MOREIRA, R. F. P. M., JOSÉ, H. J. SCHRÖDER, H. F. R. Recent research data on the removal of pharmaceuticals from sewage treatment plants (STP). **Química Nova**, v. 33. p. 411-420. 2010.

TEIXEIRA, M.G.L.; COSTA, M.C.N.; CARVALHO, V.L.P.; PEREIRA, M.S.; HAGE, E. Epidemia de gastroenterite área da barragem de Itaparica, Bahia. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v.114, p.502-512, 1993.

TEIXEIRA, M.R.; ROSA, M.J. Microcystins removal by nanofiltration membranes. **Separation and Purification Technology**, v.46, p.192-201, 2005.

- UTHERMÖHL, H. On the perfecting of quantitative phytoplankton method. *Int. Ass. Theor. Appl. Limnol Commun.* v.9. 1958
- VASCONCELOS, J.F.; BARBOSA, J.E.L.; DINIZ, C.R.; CEBALLOS, B.S.O. Cianobactérias em reservatórios do Estado da Paraíba: ocorrência, toxicidade e fatores reguladores. **Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia**, n.2, v.39, p.1-20, 2011.
- VILLACORTE, L.O.; TABATABAI, S.A.A.; ANDERSON, D.M.; AMY, G.L.; SCHIPPERS, J.C.M.; KENNEDY, D. Seawater reverse osmosis desalination and (harmful) algal blooms **Desalination**, v.360, p.61-80, 2015.
- VISSER, P. M. (Org.) HARMFUL CYANOBACTERIA. **Aquatic Ecology Series**, v.3, 2005.
- VON SPERLING, M. 2006. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 3. ed., DESA-UFMG, Belo Horizonte.
- WANG, B; WANG, X; HU, Y; CHANG, M; BI, W; HU, B. The combined effects of UV-C radiation and H₂O₂ on *Microcystis aeruginosa*, a bloom-forming cyanobacterium. **Chemosphere**. V. 141. p 1-10, 2015.
- WEIRICH, C.A.; MILLER, T.R. Freshwater Harmful Algal Blooms: Toxins and Children's Health. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v.44, p.2-24, 2014.
- WHITTON, B.A.; POTTS, M. Introduction to the Cyanobacteria. In: **WHITTON, B.A.; POTTS, M. (Ed). The ecology of Cyanobacteria. Their diversity in time and space.** Dordrecht: Kluwer Academic, Cap. 1, p. 1-11.2000
- WHITTON, B.A.; POTTS, M. Introduction to the Cyanobacteria. In: **WHITTON, B.A. (Org.) Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time**, New York: Springer, p.1-13, 2012.
- WU, F.F.; XANG, X. Eutrophication Evaluation Based on Set Pair Analysis of Baiyangdian Lake, North China. **Procedia Environmental Sciences**, v. 13, p. 1030-1036, 2012.
- ZAGATTO, P. A.; ARAGÃO, M. A.; DOMINGUES, D. F.; BURATINI, S. V. & ARAUJO, R. P. A. Avaliação ecotoxicológica do reservatório do Guarapiranga, SP, com ênfase à problemática das algas tóxicas e algicidas. In: Congresso Latino-Americano de Ficologia, Anais do Congresso Latino-Americano de Ficologia, São Paulo, SP, pp. 63-81, 1998.
- ZEGURA, B.; STRASER, A. & FILIPIC, M. Genotoxicity and potential carcinogenicity of cyanobacterial toxins - a review. **Mutat Res**, v. 727: 16-41.2011
- ZONG, W; SUN, F.; SUN, X. Oxidation by-products formation of microcystin-LR exposed to UV/H₂O₂: Toward the generative mechanism and biological toxicity. **Water Research**, v 47. p 1-9, 2012.

Capítulo 3

REMOÇÃO DE MICROCISTINA-LR DE ÁGUA DESTINADA A ABASTECIMENTO PÚBLICO, UTILIZANDO REAGENTE FENTON, SEGUIDO DE COAGULAÇÃO, SEDIMENTAÇÃO E FILTRAÇÃO

RESUMO

Este capítulo apresenta a avaliação em escala de bancada da oxidação da microcistina-LR presentes em água destinada a abastecimento público utilizando reagente Fenton, seguido de coagulação, sedimentação e filtração. Para tanto, a água de estudo foi preparada com 0,5 L de extrato semi-purificado de MC-LR obtido pela extração em fase sólida (por cartucho C18) acrescido em 1,6 L de água bruta, que correspondeu à concentração final aproximada de $4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR. Nos ensaios de oxidação, coagulação/floculação e sedimentação as dosagens de peróxido de hidrogênio foram três vezes o requerido na estequiometria (3E) da reação Fenton sendo esta relação usada para todas as dosagens do sulfato ferroso. Pode-se verificar que o reagente Fenton apresentou-se como ótimo oxidante e coagulante. A concentração da microcistina-LR remanescente apresentou valores inferiores a $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ em dosagens (10, 15 e 20 mM Fe^{2+} : 3 H_2O_2) e tempo de oxidação de 10 min, garantindo um efluente com concentração inferior ao valor máximo permitido exigido pela Portaria 2914/11 do Ministério da Saúde. A melhor dosagem utilizada na água em estudo foi de 20 mM de Fe^{+2} + 60 mM de H_2O_2 que contribuiu para a redução de todos os parâmetros de cor, turbidez, microcistina – LR analisados. O método empregado para análise de microcistina-LR após a oxidação foi a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a *Espectrometria de Massas*, que se mostrou uma técnica rápida na detecção de fragmentos resultantes da oxidação no processo reagente Fenton comprovando sua eficiência. A maior parte dos intermediários identificados no estudo, tinha a estrutura cíclica intacta e ao decorrer da degradação os intermediários foram sendo linearizados, os peptídeos com massa molar mais baixos puderam ser identificados pela clivagem da porção MeAsp e L-Arg.

Palavras-chave: Cianotoxina. Microcistina – LR. POA. Tratamento de água. Fenton.

ABSTRACT

This chapter presents the bench scale evaluation of the oxidation of microcystin-LR present in water intended for public supply using Fenton reagent, followed by coagulation, sedimentation and filtration. To do so, the study water was prepared with 0,5 L of semi-purified extract of MC-LR obtained by extraction of solid phase (in C18 cartridge) plus 1,6 L of raw water, which corresponded to the final approximate concentration of $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of MC-LR. In the oxidation, coagulation / flocculation and sedimentation assays the hydrogen peroxide dosages were three times as required in the stoichiometry (3E) of the Fenton reaction and this ratio was used for all ferrous sulfate dosages. It can be verified that the Fenton reagent presented as a good oxidant and coagulant. The concentration of the remaining microcystin-LR had values lower than $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in dosages (10, 15 and 20 mM Fe^{2+} : 3 H_2O_2) and oxidation time of 10 min, guaranteeing an effluent with a concentration below the maximum value Permitted by Ministry of Health Ordinance 2914/11. The best dosage used in the study water was 20 mM Fe^{+2} + 60 mM H_2O_2 , which contributed to the reduction of all parameters analyzed. The method used for the analysis of microcystin-LR after oxidation was the High Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry, which proved to be a rapid technique in the detection of fragments resulting from oxidation in the Fenton reagent process, proving its efficiency. Most of the intermediates identified in the study had the cyclic structure intact and in the course of the degradation the intermediates were being linearized, the peptides with lower molar mass could be identified by the cleavage of the MeAsp and L-Arg portion.

Keywords: Cyanotoxin. Microcystin-LR. POA. Water Treatment. Fenton.

1. INTRODUÇÃO

O processo de eutrofização pode levar, dentre outras consequências, ao desenvolvimento excessivo de microalgas e cianobactérias, favorecendo o aparecimento de florações ou blooms. Tal fenômeno é uma preocupação mundial, dada a capacidade das cianobactérias em produzir metabólitos secundários capazes de conferir sabor e odor à água (como MIB e geosmina) e toxicidade para organismos vivos (cianotoxinas) (PÁDUA, 2009).

A presença das cianotoxinas nos corpos hídricos trazem inconvenientes de saúde pública e uma série de problemas nas estações de tratamento convencionais como dificuldades nos processos de coagulação e floculação, com o consequente aumento na dosagem de produtos químicos, ocasionando redução na eficiência de sedimentação e ainda diminuição da taxa de filtração dos filtros de areia que ficam rapidamente colmatados pela alta concentração de células e de partículas em suspensão.

Considerando que mais de 95% das cianotoxinas produzidas são intracelulares (NEWCOMBE, 2002), a maior preocupação reside em evitar que as mesmas sejam liberadas para a água, o que pode ocorrer naturalmente, em virtude do estado de senescência dos microrganismos ou artificialmente, muitas vezes associada à aplicação de algicidas (LAVOIE et al., 2007; WESTRICK et al., 2010). Quando a liberação da toxina é inevitável, torna-se necessária a adoção de processos capazes de permitir sua degradação ou a retenção dessas substâncias durante os processos de potabilização.

As tecnologias avançadas de oxidação apresentam grande eficiência na degradação e desintoxicação de cianotoxinas em relação aos tratamentos convencionais (PANTELIC et al., 2012). O processo Fenton utiliza íons ferrosos (Fe^{2+}) ou férricos (Fe^{3+}) como catalisadores, em meio ácido, para promover a decomposição de H_2O_2 e, assim, gerar radicais hidroxila (HO^\bullet). Este tem a capacidade mineralizar a matéria orgânica liberando subprodutos simples como H_2O e CO_2 minimizando as cargas poluidoras e sua toxicidade, além de apresentar vantagens como alta eficiência, baixo custo e baixa produção de resíduos.

Este capítulo apresenta um estudo sobre a eficiência da oxidação da microcistina-LR presentes em água destinada a abastecimento público, utilizando Reagente Fenton, seguido de coagulação, sedimentação e filtração em teste de bancada.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a eficiência da oxidação da microcistina–LR de água destinada a abastecimento público, utilizando Reagente Fenton, seguido de coagulação, sedimentação e filtração.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a melhor dosagem de Reagente Fenton para remoção de turbidez, cor aparente e verdadeira e microcistina-LR;
- Detectar os fragmentos moleculares remanescentes da oxidação da microcistina – LR.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Descoberto pelo engenheiro químico Henry John Horstman Fenton (1854-1929), o processo Fenton ocorre através da decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) catalisado por íons ferrosos (Fe^{2+}) em meio ácido gerando radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$) (Equação 1), que tem potencial de oxidação de 2,8 V (TEIXEIRA e JARDIM, 2004; CHOI, 2014).



O radical hidroxila reage fortemente com a maioria das substâncias orgânicas através da abstração de hidrogênio ou da adição eletrofílica de ligações duplas. O radical peroxila pode também ser formado através da reação entre os radicais livres com o oxigênio molecular, dando início a uma sequência de reações de degradação oxidativa, que pode levar à completa mineralização do contaminante. O radical $\text{HO}_2\cdot$ livre e sua forma conjugada $\text{O}_2\cdot^-$ também contribuem para a degradação dos compostos contaminantes, porém estes radicais apresentam reatividades menores do que os radicais hidroxilas livres (CHIRON et al., 2000).

Várias reações secundárias podem ocorrer durante a reação Fenton. O íon férrico pode ser regenerado voltando ao ciclo através da redução do íon ferroso gerando também um radical hidroperoxila ($\text{HO}_2\cdot$) e um próton (H^+), (Equação 2).



Os íons ferrosos estão presentes como complexos em solução aquosa, em condições de baixo pH, na ausência de ligantes. A posição na série de potencial de oxidação do radical hidroxila é inferior apenas à do flúor (TEIXEIRA et al., 2004). A reação de oxidação do íon férrico com o radical hidroxila produz íon ferroso e um íon hidroxila como mostra a Equação 3.



O peróxido de hidrogênio pode ser produzido voltando ao ciclo através da reação entre dois radicais hidroxila (Equação 4).



Quando o peróxido de hidrogênio está em concentrações altas pode reagir com o radical hidroxila produzindo água e radical hidroperoxila causando efeito negativo na degradação dos poluentes (GULKAYA et al., 2006) (Equação 5).



O pH é um parâmetro relevante na reação Fenton, por estar diretamente relacionado com a velocidade de degradação de compostos orgânicos. O valor do pH eficiente na degradação de compostos orgânicos situa-se entre 2,5 e 3,0 (BOKARE et al., 2014). Valores de pH acima de 3,0 contribuem para a formação de precipitado de Fe(OH)₃ diminuindo drasticamente sua interação com peróxido de hidrogênio e, conseqüentemente, a produção de OH[•] (KANG, 2002). Em solução alcalina (pH 11) o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio reagem para formar um óxido e um íon de peróxido (ASGHAR et al., 2015). A relação entre as espécies químicas predominante do íon Fe⁺² e o pH são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Relação do pH da solução e as espécies de ferro.

pH	Espécie química predominante
1,0	[Fe(H ₂ O) ₆] ²⁺ ₍₂₎
2,0	[Fe(H ₂ O) ₅ OH] ⁺ ₍₂₎
4,0	[Fe(H ₂ O) ₄ (OH) ₂]

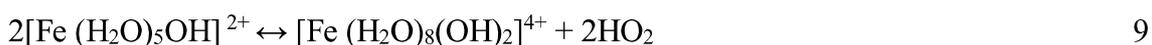
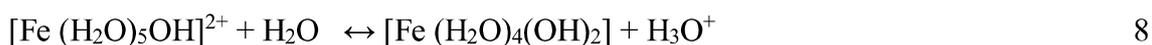
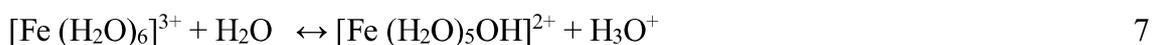
Fonte: BOKARE et al., 2014

A velocidade de degradação também diminui em pH abaixo de 2,5, apesar das espécies de Fe⁺² permanecerem solúveis, pois altas concentrações de H⁺ podem sequestrar radicais hidroxila (Equação 6) (BOKARE et al., 2014).



O íon Fe^{3+} formado na reação (Equação 1) reage com íons OH^- oriundos da redução do peróxido de hidrogênio e da dissociação da água e formam as espécies hidrolisadas de ferro (III), as quais encontram-se em equilíbrio com o precipitado de hidróxido férrico ($\text{Fe}(\text{OH})_3$), realizando a coagulação. A coagulação, nesse caso, só é efetivada devido à geração dos complexos de hidróxido de ferro, como também à formação de oxi-hidróxidos após o ajuste de pH caso seja necessário, formando ou aumentando o tamanho dos flocos e facilitando a precipitação das partículas. Nesse caso, com a utilização de reagente de Fenton, as substâncias orgânicas refratárias são removidas em duas fases, tanto na oxidação como na coagulação.

O processo de coagulação, o qual é fundamentado pela formação de espécies hidrolisadas, conforme as equações de 7 a 11 (WU et al., 2011).



É importante considerar que a substituição do sulfato de alumínio (coagulante mais utilizado nas ETAs do Brasil) pelo sulfato ferroso pode trazer benefícios quando se leva em consideração o residual de alumínio, pois o mesmo pode causar sérios problemas a saúde humana, pela bioacumulação no organismo podendo provocar fraturas por osteoporose, doença de Alzheimer, Parkinson, hiperatividade em crianças e dificuldade de aprendizado. O sulfato ferroso por sua vez além de não estar associado a qualquer problema de saúde em seres humanos tem sido empregado no combate à anemia. Outro ponto positivo é que o sulfato ferroso é um dos sais de ferro mais barato existente no mercado (DE JULIO, 2006).

Além disso, outras vantagens dos processos de oxidação de Fenton, e que os tornaram tão populares, são: (1) os radicais oxidantes são gerados a pressão e temperatura ambiente, dispensando a utilização de instalações de reatores complexos, (2) a simplicidade do processo, bem como a sua flexibilidade permitem fácil implementação como um sistema individual ou híbrido, além de facilitar sua integração com outros

processos já existentes no tratamento de água, como a coagulação, filtração e oxidação biológica. (3) A velocidade elevada com que ocorre a reação entre o ferro e o H_2O_2 provoca a ativação do H_2O_2 e a subsequente geração de $\text{OH}\cdot$, gerando o menor tempo de reação entre todos os POAs (BRITO, 2012).

A maior desvantagem é atribuída à necessidade do pH ácido para que as espécies de ferro se encontrem dissolvidas. No entanto, a presença da matéria orgânica pode ser capaz de auxiliar em sua solubilidade. Complexos orgânicos de Fe^{3+} são estáveis em pH neutro, tornando capaz de ultrapassar a dependência do pH ácido do processo foto-Fenton tradicional. Complexos fotoativos de Fe^{3+} são formados por grupamentos carboxilatos e policarboxilatos, sendo os mais comumente presentes em matéria orgânica dissolvida (SPUHLER et al., 2010).

Os estudos experimentais utilizando o Reagente Fenton, em sua grande maioria, ainda são realizados em escala laboratorial, com alguns poucos trabalhos em escala piloto. FREITAS et al., (2013), (ZONG et al., (2009), BOBER et al., (2008), AL MONAMI et al., (2007), BANDALA et al., (2004), YUAN et al., (2002) e GAJDEK et al., (2001), descrevem a eficiência do processo Fenton na remoção microcistina-LR, obtendo excelentes resultados. A eficiência na degradação/destruição de contaminantes depende de diversos fatores como: parâmetros operacionais, composição química da água (presença de aditivos, sequestrantes), cinética da reação, mecanismos de degradação e geração de radicais livres, principalmente o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$).

No Estado da Paraíba, alguns estudos também foram realizados. BURITI (2012) avaliou em escala de bancada a remoção de microcistina-LR de água destinada ao abastecimento público, utilizando o reagente de Fenton nos processos de floculação, decantação e filtração seguidos de colunas de carvão ativado granular com distintos tempos de contato. Após a coagulação, floculação e sedimentação a concentração de microcistina-LR reduziu de $18,52 \mu\text{g.L}^{-1}$ para $9,59 \mu\text{g.L}^{-1}$, nos tempos de 5, 10 e 15 min, apresentando percentuais de remoção de 30%, 48% e 48%, respectivamente. Após a filtração a concentração de microcistina-LR foi reduzida para um valor médio de $8,07 \mu\text{g.L}^{-1}$ equivalendo a um percentual de remoção de 20%, ficando claro as limitações da filtração em areia na remoção de microcistina-LR. Para tanto, o uso das colunas de CAG para a adsorção da microcistina-LR remanescente no tempo de 2h, foi fundamental a fim de atender ao Valor Máximo Permitido de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ estabelecido pela Portaria 2914/11 do Ministério da Saúde.

ARAGÃO (2014) aplicou o processo Fenton em escala de bancada com o objetivo de remover microcistina-LR em água de abastecimento. Foi utilizado uma concentração 15 mg.L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $5,50 \text{ mg.L}^{-1}$ de H_2O_2 para valores de pH de oxidação entre 2 e 7 com tempo de oxidação entre 5 e 30 min. A alta velocidade em que ocorre a reação de Fenton, associada ao elevado potencial oxidativo dos radicais hidroxila gerados pela mesma fazem com que uma grande quantidade do contaminante alvo possa ser removido em poucos minutos. Deste modo, os resultados mostraram que a reação de Fenton ocorre com maior eficiência com valores de pH moderadamente ácido. Em pH 6 e 7, houve remoção de até 96,3% de microcistina-LR e em pH entre 2 e 5 houve remoção completa de microcistina-LR em todos os tempos de oxidação.

Testando diferentes faixas de pH (2,0, 4,5, e 7,0) e diferentes concentrações do reagente Fenton (proporção de 1/3 de $(\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2)$), SILVA (2015) avaliou a eficiência do processo convencional, seguido de oxidação com o reagente Fenton na oxidação da microcistina-LR. O reagente Fenton apresentou-se como ótimo oxidante e coagulante tendo em vista a elevada eficiência da oxidação no tratamento de água com elevada concentração inicial de $10,24 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR. A concentração da microcistina-LR remanescente apresentou valores de $0,07 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ nas diferentes faixas de pH e nos tempos de oxidação 5,0; 12,5 e 20 minutos. Além disso, após sedimentação de 15 min, o reagente Fenton possibilitou a remoção significativa de turbidez ($0,07 \text{ uT}$), cor verdadeira ($2,61 \text{ uH}$) e COD ($7,7 \text{ mg. L}^{-1}$).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa e descrição geral

A pesquisa foi desenvolvida em escala de bancada no Laboratório de Química e Saneamento Ambiental (LAQUISA) localizado na Estação Experimental de Tratamento Biológico de Esgotos Sanitários (EXTRABES) pertencente a Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), localizado na cidade de Campina Grande, Paraíba. O desenvolvimento experimental seguiu as seguintes etapas:

1. Cultivo da cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa*;
2. Lise de células de *M. aeruginosa* realizada através do congelamento e descongelamento 3x consecutivas de alíquotas do cultivo para liberar a microcistina-LR;
3. Preparação da água de estudo: água do reservatório de Saulo Maia + extrato semi-purificado de Microcistina-LR obtido pela extração de fase sólida (por cartucho C18);
4. Execução de ensaio de oxidação, coagulação, floculação e sedimentação com Reagente Fenton utilizando diferentes dosagens de Fe^{+2} e H_2O_2 , pH (8,5), tempo de coagulação (10min) e sedimentação (10min), seguido de filtração;
5. Análises dos parâmetros de controle: cor verdadeira, cor aparente, turbidez, microcistina-LR e peróxido residual;
6. Análise dos fragmentos moleculares da MC-LR remanescentes da oxidação.

4.2 Preparação e caracterização da água de Estudo (AE)

A água de estudo foi preparada com 0,5 L de extrato semi-purificado de MC-LR obtido pela extração de fase sólida (cartucho C18) para 1,6 L de água bruta, correspondendo à concentração final aproximada de $4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de MC-LR.

Após a adição da microcistina – LR na água bruta, realizou-se caracterização da água de estudo para os parâmetros de pH, alcalinidade total, dureza total, turbidez, cor aparente, cor verdadeira e microcistina-LR conforme métodos preconizados por APHA (2012), exceto microcistina – LR (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros de caracterização da água de estudo e métodos utilizados.

PARÂMETROS	MÉTODOS APHA, (2012).
pH	Eletrométrico 4500 B
Alcalinidade Total ($\text{mg.L}^{-1}\text{CaCO}_3$)	Titulométrico 2320 B
Dureza Total ($\text{mg.L}^{-1}\text{CaCO}_3$)	Titulométrico 2340 C
Turbidez (uT)	Nefelométrico 2130 B
Cor aparente e verdadeira (uH)	Espectrofotométrico 2120 C
Microcistina – LR ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	CLAE - EM

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

As medições de pH, turbidez, cor aparente, cor verdadeira, foram realizadas com os seguintes equipamentos: pHmetro (Tecnal Tec 3MP), turbidímetro (DLT-WV) e espectrofotômetro (COLEMAN 35-D) respectivamente.

4.3.1 Ensaios de oxidação utilizando reagente Fenton

Os experimentos de oxidação, coagulação, floculação e sedimentação foram realizados em um homogeneizador de soluções modelo (HM01) que simulou as etapas iniciais que fazem parte do ciclo completo de uma Estação de Tratamento de Água (ETA) convencional. O processo de filtração foi realizado por filtros de papel de laboratório de filtração rápida, que reproduziu a retenção de partículas ainda presentes após as etapas anteriores.

Antes de executar os ensaios, definiu o volume de hidróxido de sódio (NaOH) para elevar o pH para 8,5. De acordo com a Equação da reação Fenton, verifica-se que 1 mol de Fe^{+2} reage com 1 mol de H_2O_2 . Sabe-se que 1 mol de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ possui massa de 278,02 g, correspondendo a uma massa de Fe^{+2} de 55,85 g. Uma dosagem de 15 mg.L^{-1} de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ corresponde a $3,01 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Fe}^{+2}$ ($15 \times 55,85/278,02$), cuja estequiometria estabelece uma dosagem de $1,83 \text{ mg.L}^{-1}$ de H_2O_2 ($3,01 \times 34,01/55,85$). Para uma dosagem de 3E, tem-se $5,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de H_2O_2 ($3 \times 1,83$).

Para os testes de oxidação, coagulação/floculação e sedimentação as dosagens de peróxido de hidrogênio foram três vezes o requerido na estequiometria (3E) da reação Fenton sendo esta relação usada para todas as dosagens do sulfato ferroso (Tabela 3). A solução de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ foi preparada com concentração de 5% e a de H_2O_2 com concentração de 2000 mg.L^{-1} .

A água de estudo foi adicionada em tubos Falcon de 15mL com o reagente Fenton 1:3 (sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2)) e em seguida foi ajustado o pH para 8,5. Para ajustar o pH de coagulação foi utilizada uma solução de Cloreto de Sódio (NaCl) 0,1 N.

A Tabela 3 apresenta os diferentes valores de Fe^{2+} e H_2O_2 que foram testados, resultando em 14 tratamentos.

Tabela 3: Dosagens de Fe²⁺ e H₂O₂ para cada tratamento testado.

Tratamento	Dosagem de Fe²⁺ (mM)	Dosagem de H₂O₂ (mM)	Proporção (Fe²⁺ : H₂O₂)
T1	1	3	1:3
T2	1,25	3,75	1:3
T3	1,5	4,5	1:3
T4	2	6	1:3
T5	2,5	7,5	1:3
T6	3	9	1:3
T7	3,5	10,5	1:3
T8	4	12	1:3
T9	4,5	13,5	1:3
T10	5	15	1:3
T11	5,5	16,5	1:3
T12	10	30	1:3
T13	15	45	1:3
T14	20	60	1:3

4.4 Parâmetros de controle

Os parâmetros de turbidez, cor verdadeira, carbono orgânico total e microcistina-LR foram quantificados conforme métodos preconizados pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012), exceto microcistina – LR, conforme mostrados na Tabela 2. A análise de peróxido residual seguiu o método de RAMOS, et al., 2016.

Os subprodutos formados no sistema Fenton após ação sobre a microcistina - LR foram identificados e quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da água de estudo

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

Tabela 4: Caracterização da água de estudo.

Parâmetros	Médias
pH	7,6
Alcalinidade (mg. L ⁻¹ CaCO ₃)	53
Dureza (mg. L ⁻¹ CaCO ₃)	40
Cor Aparente (uH)	105
Cor Verdadeira (uH)	25
Turbidez (uT)	23
MC-LR (µg.L ⁻¹)	4

A água de estudo apresentou pH levemente alcalino. A turbidez correspondeu a um valor de 23 uT, o que representa aproximadamente 5x mais do valor exigido para água potável (Portaria 2914/2011 – MS). A cor aparente apresentou valor 7x maior (105 uH) em relação ao Valor Máximo Permitido pela portaria citada. Com a adição do extrato semipurificado de MC-LR, a água de estudo obteve concentração de MC-LR elevada de 4 µg.L⁻¹.

5.2 Ensaios de oxidação seguidos de coagulação, floculação, sedimentação e filtração

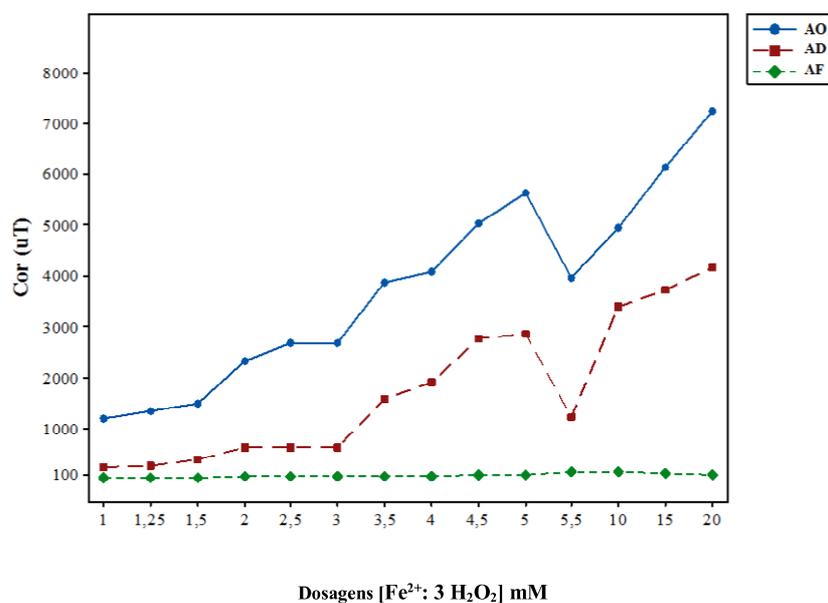
Durante os ensaios de oxidação seguidos de coagulação, floculação, sedimentação e filtração foram avaliados os parâmetros físico-químicos e biológico da água em estudo, que serão descritos a seguir.

5.2.1 Cor Aparente e Verdadeira

A Figura 1 apresenta os resultados de cor aparente remanescente após os processos de oxidação Fenton, decantação e filtração.

O valor médio inicial da cor aparente na água de estudo foi de 105 uH, contudo, com a adição do coagulante este valor alcançou 7250 uH (Figura 1) quando utilizou a dosagem de 20 mM de (FeSO₄.7H₂O) e 60mM de (H₂O₂) no T14. Isto se deve ao fato de que a reação de Fenton acontece de forma mais eficiente em valores de pH moderadamente ácido, fazendo com que uma maior parte do ferro se encontre na forma complexada, caso contrário contribui para a elevação da cor aparente.

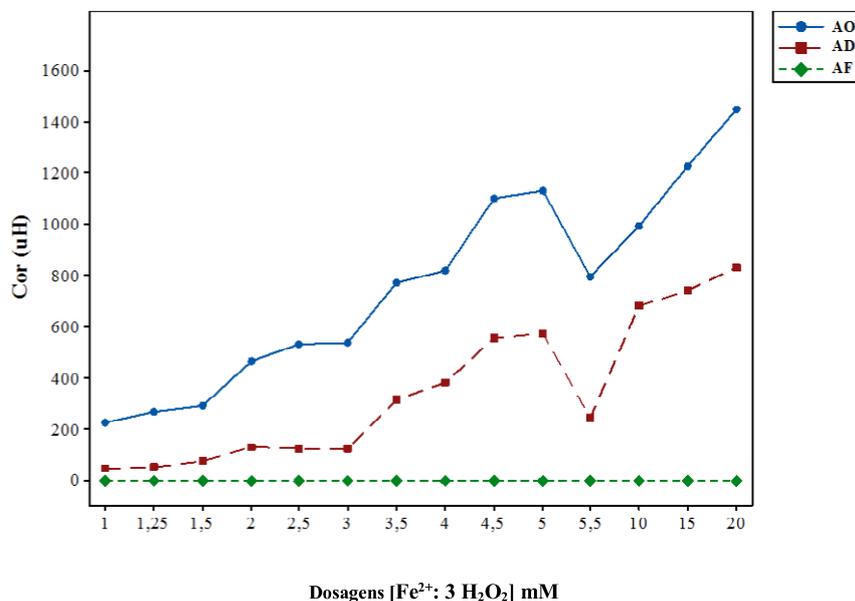
Figura 1. Cor aparente remanescente após oxidação Fenton, decantação e filtração.



É importante considerar que mesmo após o processo de filtração em todos os tratamentos avaliados a cor aparente não atendeu o valor ao VMP pela Portaria 2914/2011, apresentando médias de 100 uH.

A Figura 2 apresenta os resultados de cor verdadeira remanescente após a oxidação Fenton, decantação e filtração. O valor médio da cor verdadeira na água de estudo foi de 25 uH.

Figura 2. Cor verdadeira remanescente após oxidação Fenton, decantação e filtração.



A cor verdadeira está relacionada à presença na água de substâncias dissolvidas ou coloidais na água, particularmente substâncias húmicas, que não são passíveis de separação, através de processos unicamente físicos. Uma remoção eficaz dessas substâncias depende da coagulação química e da filtração (DI BERNADO, 2003).

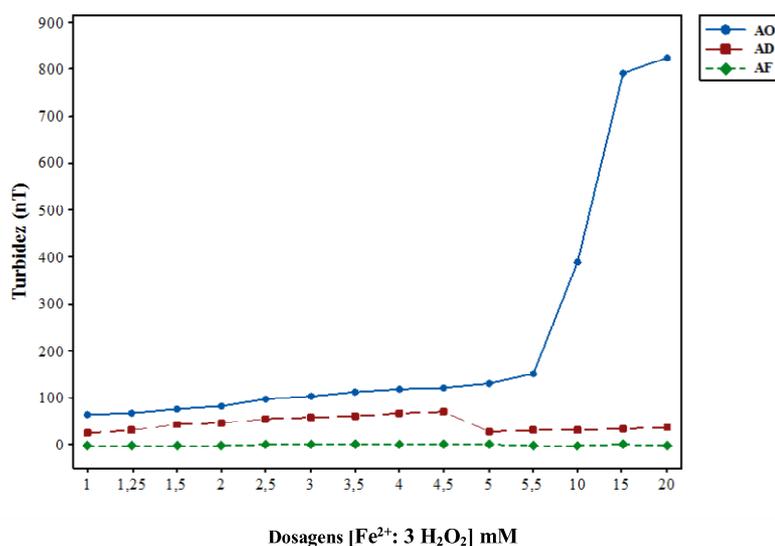
Observou-se que o reagente Fenton foi eficiente na remoção da cor verdadeira. Os valores obtidos após a filtração para os 14 tratamentos estudados corresponderam a um valor menor (aproximadamente 0,5 uT) (Figura 2) ao valor exigido pela Portaria 2914/11 do Ministério da Saúde, que estabelece padrão organoléptico de potabilidade o VMP de 15 uH (BRASIL, 2011).

5.2.2 Turbidez

As impurezas presentes na água, em função de sua natureza e dimensões, podem se apresentar na forma coloidal, dissolvida ou suspensa, conferindo turbidez às águas naturais. A predominância de uma ou outra característica pode influenciar significativamente na coagulação, quer na dosagem de coagulante, quer no pH de coagulação (SANTOS, et al., 2007).

Na Figura 3 estão apresentados os resultados de turbidez remanescente do tratamento após oxidação Fenton, decantação e filtração.

Figura 3. Turbidez remanescente após oxidação Fenton, decantação e filtração.

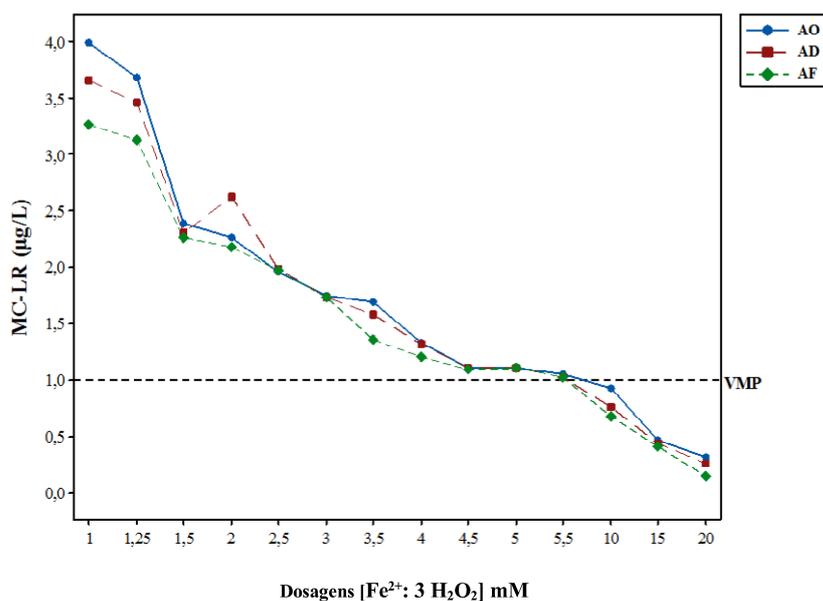


A eficiência da etapa da filtração é avaliada pela redução da turvação da água. Convém que a turvação na saída dos filtros esteja entre 0,06 – 0,10 uT. Se o resultado for superior a 0,10 uT, normalmente deve-se à não eficácia das etapas anteriores, nomeadamente a coagulação, floculação e flotação (CASTRO, 2015). Os valores de turbidez após o processo de filtração em todas as dosagens estudadas, foram menores que o valor exigido pela Portaria 2914/11 do Ministério da Saúde que estabelece valor de turbidez $\leq 0,5$ uT. O tratamento T14 com dosagem de 20 mM de $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ e 60mM de (H_2O_2) promoveu uma remoção de 99%, apresentando turbidez final de 0,09 uT.

5.2.3 Microcistina – LR

Utilizando o pH 8,5 de coagulação para todos os tratamentos, foi verificado que houve eficiência de remoção de microcistina-LR para as dosagens mais altas de $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$: 3 de (H_2O_2) , conforme mostrado na Figura 4.

Figura 4. Microcistina - LR remanescente após oxidação Fenton, decantação e filtração.



A alta velocidade em que ocorre a reação de Fenton, associada ao elevado potencial oxidativo dos radicais hidroxila gerados pela mesma, fazem com que uma grande quantidade do contaminante alvo possa ser removido em poucos minutos. No estudo, a MC-LR remanescente após 10 min de oxidação, decantação e filtração, as concentrações detectadas nos tratamentos (T12, T13 e T14) foram inferiores a $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ tornando a água dentro dos padrões de qualidade estabelecido pela legislação atual.

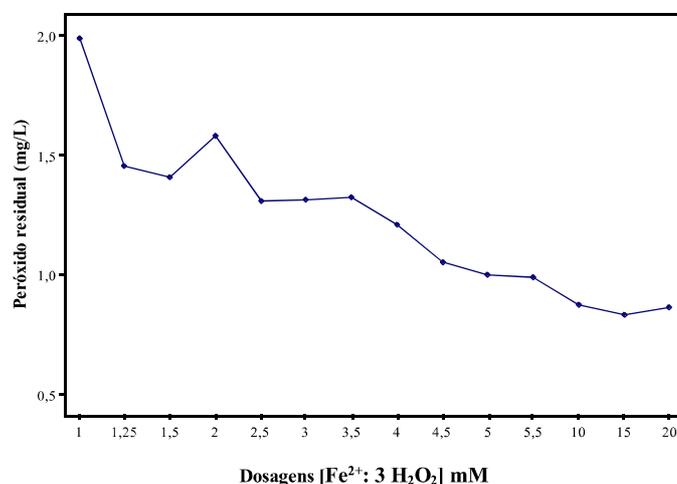
O T14 promoveu remoção de 96% de microcistina – LR atingindo concentração de $0,15 \mu\text{g.L}^{-1}$. Estes resultados evidenciam o potencial de oxidação apresentado pelo processo de Fenton e também pelo fato do H_2O_2 também atuar como um agente oxidante, porém, com um potencial oxidativo menor que o do radical hidroxila livre, o que faz com que em condições ideais para a realização da reação, ocorra uma elevada remoção do contaminante.

5.2.4 Peróxido Residual

O uso do peróxido de hidrogênio como oxidante possui inúmeras vantagens sobre outros tratamentos químicos como aqueles que utilizam cloro e ozônio: é comercialmente disponível, possui estabilidade térmica, pode ser estocado on-site, apresenta solubilidade infinita em água e não gera subprodutos em processos de desinfecção, como organoclorados (PEIXOTO, 2013). O monitoramento dos níveis deste composto é indispensável, uma vez que, a presença de peróxido residual pode causar sérios danos ao meio ambiente, no caso de águas residuais tratadas, ou sérios danos à saúde da população, no caso de água destinada ao abastecimento público.

Após o processo de filtração foi avaliada a concentração de peróxido residual para todas as dosagens estudadas. Conforme Figura 5, os tratamentos realizados obtiveram concentrações de peróxido residual de acordo com o esperado uma vez que, as maiores dosagens utilizadas no T12, T13 e T14 apresentaram menores concentrações desse oxidante.

Figura 5. Concentração de Peróxido Residual após o processo de filtração



5.3 Subprodutos formados nos processos da oxidação da microcistina-LR

Os fragmentos de degradação da molécula de microcistina- LR foram identificados através de varredura no modo “FULL MS2” utilizando o espectrômetro de massas, e apresentaram massa/carga (m/z) de 69; 87; 135, 159; 213; 286; 374; 445; 553; 558; 682; 778; 866; 967 e 995 que se mostraram presentes com pequenas variações de intensidade relativa nos 14 tratamentos realizados.

A identificação de alguns fragmentos foi realizada com base na literatura pesquisada conforme mostra a Tabela 5.

Tabela 5: Principais fragmentos identificados com sua respectiva m/z.

Subprodutos identificados	Fragmento sugerido	Referência
728	MeAsp – Arg – Adda – Glu	MAYUMI et al., 2006
682	Arg – Adda – Glu – Mdha	MAYUMI et al., 2006
599	Arg – Adda – Glu	MAYUMI et al., 2006
135	Adda	ANTONIOU et al., 2008
213	Glu – Mdha	DAHLMANN et al., 2010
375	C ₁₁ H ₁₄ O – Glu – Mdha	FASTNER et al., 2011
286	MeAsp – Arg	FASTNER et al., 2011
866	Arg – Adda – Glu – Mdha – Ala – Leu	ZONG et al., 2013
553	Mdha – Ala – Leu – MeAsp – Arg	BENKE et al., 2015

Fonte: Autor, 2017

Por ser uma molécula relativamente grande e apresentar vários grupos funcionais em diversas posições, em cada grupo apresenta suscetibilidade para rompimento das ligações gerando os subprodutos da degradação (SILVA, 2015).

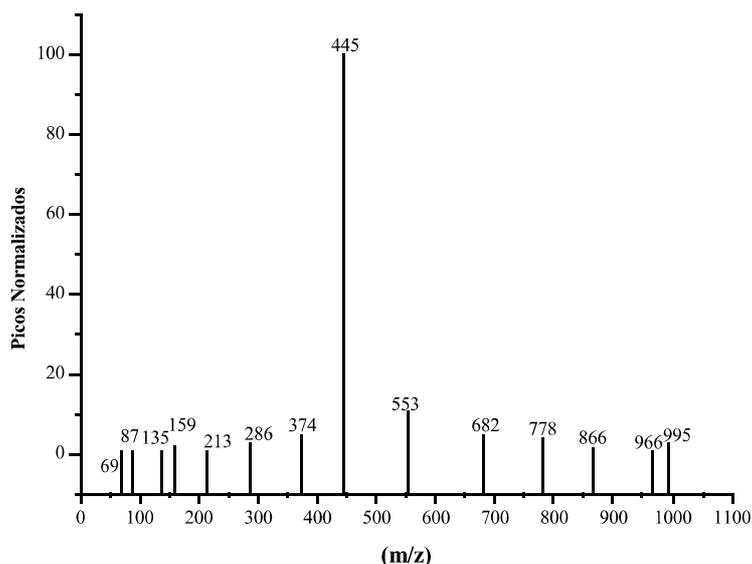
Sabe-se que o processo de degradação mediado por radical hidroxila se inicia com a incorporação de radicais hidroxila, usualmente 2, 3 ou 4, no grupamento Adda. Posteriormente, rearranjos permitem a eliminação de grupos mais lábeis (por exemplo, Adda, leucina), assim como reações de ciclização intramolecular, que levam à formação de ciclos de menor massa molar.

A maior parte dos intermediários identificados no estudo, tinha a estrutura cíclica intacta e ao decorrer da degradação os intermediários foram sendo linearizados, os peptídeos com massa molar mais baixos podem ser identificados pela clivagem da porção MeAsp e L-Arg. Segundo SONG, et al., 2009, esses fragmentos podem ter sido gerados pela clivagem de ligações peptídicas, uma vez que os números de massa/carga

correspondem à diferença entre a molécula precursora (MC-LR m/z 995) e as porções dos peptídeos libertados.

Os intermediários formados durante o ataque da hidroxila através da reação Fenton sobre a MC-LR apresentou melhor eficiência de degradação no T14. O espectro da fragmentação da MC-LR obtido no tratamento T14 se apresenta na Figura 6.

Figura 6. Espectro da fragmentação da MC-LR obtido no Tratamento T14.



No estudo, as vias degradadas foram o anel aromático, o grupo metoxi do aminoácido ADDA e ligação dupla do aminoácido MDHA. O ataque de radicais hidroxila no grupamento Adda permite a eliminação de grupos químicos pouco estáveis, assim como reações de ciclização intramolecular formando ciclos de massa molar menor. Os locais mais propensos ao ataque da HO[•] são nas ligações duplas conjugadas devido à sua posição na molécula (ANTONIOU, 2008).

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

6. CONCLUSÃO

- Os valores de turbidez após o processo de filtração em todas as dosagens estudadas, foram menores que o valor exigido pela Portaria 2914/11 do Ministério da Saúde que estabelece valor de turbidez $\leq 0,5$ uT. O tratamento T14 com dosagem de 20 mM de $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ e 60mM de (H_2O_2) promoveu uma remoção de 99%, apresentando turbidez final de 0,09 uT.
- O Reagente Fenton apresentou-se como ótimo oxidante e coagulante tendo em vista a eficiência da oxidação da microcistina-LR. A concentração da microcistina-LR remanescente apresentou valores inferiores a $1,0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ em dosagens (10, 15 e 20 mM Fe^{2+} : 3 H_2O_2) e tempo de oxidação de 10 min, garantindo um efluente com concentração inferior ao valor máximo permitido exigido pela Portaria 2914/11 do Ministério da Saúde.
- A melhor dosagem do reagente Fenton para a água em estudo foi de 20 mM de $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ e 60mM de (H_2O_2) que contribuiu para redução em 96 % de microcistina-LR. Este resultado evidencia o potencial de oxidação apresentado pelo processo de Fenton e também pelo fato do H_2O_2 também atuar como um agente oxidante, porém, com um potencial oxidativo menor que o do radical hidroxila livre.
- O método empregado para análise da oxidação da microcistina-LR utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a *Espectrometria de Massas* mostrou-se uma técnica altamente sensível, rápida e sofisticada na detecção de 14 fragmentos resultantes da oxidação através do reagente Fenton comprovando a eficácia do tratamento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL MOMANI, F. Degradation of cyanobacteria anatoxin-a by advanced oxidation processes. **Separation and Purification Technology**, v.57, p.85-93, 2007.

ANTONIOU, M.G.; SHOEMAKER, J.A.; CRUZ, A.A.; DIONYSIOU, D.D. LC/MS/MS structure elucidation of reaction intermediates formed during the TiO₂ photocatalysis of microcystin-LR. **Toxicon**, v.51, p.1103-1118, 2008.

ASGHAR, A.; RAMAN, A.A.A.; DAUD, W.M.A.W. Advanced oxidation processes for in-situ production of hydrogen peroxide/hydroxyl radical for textile wastewater treatment: a review. **Journal of Cleaner Production**. v.87, p.826-838, 2015.

BANDALA, E.R.; MARTÍNEZ, D.; MARTÍNEZ, E.; DIONYSIOU, D.D. Degradation of microcystin-LR toxin by Fenton and Photo-Fenton processes. **Toxicon**, v.43, p.829-832, 2004.

BOBER, B.; PUDAS, K.; LECHOWSKI, Z.; BIALCZYK, J. Degradation of microcystin-LR by ozone in the presence of Fenton reagent. **Journal of Environmental Science and Health**, v.43, p.186-190, 2008.

BOKARE, A.D.; CHOI, W. Review Of iron-free Fenton-like Systems for activating H₂O₂ in Advanced oxidation processes. **Journal of Hazardous Materials**, v.275, p.121-135, 2014.

BRITO, N.N.; SILVA, V.B.M. Processo oxidativo avançado e sua aplicação ambiental. **Revista Eletrônica de Engenharia Civil**, v.3, p.36-47, 2012.

BURITI, J.S. Remoção de Microcistina-LR de água utilizando coagulação com Reagente de Fenton, floculação, decantação e filtração seguido de carvão ativado granular. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande/PB, p.97. 2012.

CASTRO, I.L.R. Elaboração de Ferramentas para Avaliar a Eficiência de Tratamento de uma ETA – ETA de S. Jorge. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia do Meio Ambiente. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Portugal – PO, p.196, 2015.

CHIRON, S. et al. Pesticide chemical oxidation: State-of-the-art, **Water Reserch**. 34(2), 366-377, 2000.

CHOI, A. D. B. W. Review of Iron-Free Fenton-Like Systems for Activating H₂O₂ in Advanced Oxidation Processes. **Journal of Hazardous Materials**. p. 1-64, 2014.

DE JULIO, M.; NEVES, E.F.A.; TROFINO, J.C.; DI BERNARDO, L. Emprego do reagente de fenton como agente coagulante na remoção de substâncias húmicas de água por meio da flotação por ar dissolvido e filtração. **Engenharia sanitaria ambiental**. v.11, n.3, p.260-268, 2006.

FREITAS, A.M.; SIRTORI, C.; LENZ, C.A.; ZAMORA, P.G.P. Microcystin-LR degradation by solar photo-Fenton, UV-A/photo-Fenton and UV-C/H₂O₂: a comparative study. **Photochem Photobiol Sci**, p.696-702, 2013.

GAJDEK, P.; LECHOWSKI, Z.; BOCHNIA, T.; KEÏPCZYNÂSKI, M. Decomposition of microcystin-LR by Fenton oxidation. **Toxicon**, v.39, p.1575-1578, 2001.

GULKAYA, I.; SURUCU, G.A.; DILEK, F.B. Importance of H₂O₂/Fe²⁺ ratio in Fenton's treatment of a carpet dyeing wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v.36, p.763-769, 2006.

KANG, S.F. Pre-oxidation and coagulation of textile wastewater by the Fenton process. **Chemosphere**, v.46, p.923-928, 2002.

NOGUEIRA, R.F.P. Fundamentos e aplicações ambientais dos processos fenton e foto-fenton. **Química Nova**, v.30, n.2, p.400-408, 2007.

PANTELIĆ, D. et al. Cyanotoxins: Characteristics, Production and Degradation Routes in Drinking Water Treatment with Reference to the Situation in Serbia, **Chemosphere**, 1, 421-441, 2013.

PEIXOTO, A. L. C., Degradação do herbicida amicarbazona por fotólise direta e h₂O₂ em reator fotoquímico anular coaxial. **Tese de Doutorado**. Escola politécnica, USP, 2013.

SANTOS, P.C.C.S; TEIXEIRA, A.R; ALMEIDA, C.P; LIBÂNIO, M. PÁDUA, V.L. Estudo de coagulação aplicada a filtração direta descendente. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. V.12, N 4. P 361-370. 2007.

SILVA, A. G. Avaliação do pH de oxidação do processo fenton na remoção de microcistina-LR de água de abastecimento. **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Campina Grande. 2015.105p.

SONG, W.; XU, T.; COOPER, W.J.; DIONYSIOU, D.D.; DE LA CRUZ, A.A.; O'SHEA, K.E. Radiolysis Studies on the Destruction of Microcystin-LR in Aqueous Solution by Hydroxyl Radicals. **Environ Sci Technol**. v.43, p.1487-1492,2009.

SPUHLER, D.; RENGIFO-HERRERA, J. A.; PULGARIN, C. The effect of Fe²⁺, Fe³⁺, H₂O₂ and the photo-Fenton reagent at near neutral pH on the solar disinfection (SODIS) at low temperatures of water containing Escherichia coli K12. **Applied Catalysis B: Environmental**. V. 96, p. 126–141, 2010.

TEIXEIRA, C. P. A. B; JARDIM, W. F. Processos Oxidativos Avançados: conceitos teóricos. **Caderno temático**, v. 3. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Química - IQ, Laboratório de Química Ambiental - LQA. Campinas, 2004.

WU, Y.; ZHOU, S.; YE, X.; ZHAO, R.; CHEN, D. Oxidation and coagulation removal of humic acid using Fenton process. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 379, p. 151-156, 2011.

YUAN, B.L.; QU, J.H.; FU, M.L. Removal of cyanobacterial microcystin-LR by ferrate oxidation-coagulation. **Toxicon**, v.40, p.1129-1134, 2002.

CONCLUSÃO GERAL

Para determinação de microcistinas em CLAE, o processamento prévio da amostra é essencial para a produção de cromatogramas confiáveis. A extração em fase sólida em cartuchos C18, é amplamente utilizada para a concentração de amostras de água e para eliminar contaminantes da matriz. No entanto, é comum que uma parte substancial do analito permaneça na matriz após a extração, de modo que uma subsequente medição forneça um valor inferior à verdadeira concentração da substância. Assim, toda amostra que recebe tratamento de análise (extração, concentração, etc) deve ter calculado experimentalmente o erro ou perda do analito.

As propostas da integração entre os Processos Convencionais associados aos Processos Oxidativos Avançados (POAs), foram baseadas na possibilidade da eliminação ou transformação de produtos resistentes à biodegradação em produtos com maior potencial de biodegradabilidade. Quando o POA foi empregado como etapa inicial ou final de um conjunto de um sistema de tratamento, seja ele em escala piloto ou em escala de bancada, proporcionaram alterações nos parâmetros físicos-químicos e biológicos, tornando a qualidade de água tratada compatível com os limites estabelecidos pela Portaria 2914/2011-MS.

A utilização de um reator fotocatalítico pode ser uma alternativa viável para o tratamento de águas contaminadas com microcistinas, por apresentar vantagens em relação a seu custo de construção e por ser de fácil operacionalidade, podendo ser instalado em comunidades rurais, nas quais não há disponibilidade de água potável para consumo humano de boa qualidade. O uso do Reagente Fenton como agente oxidante, em pouco tempo de contato tornou o processo de degradação muito mais eficiente, efetuando uma maior degradação (96%) de microcistina – LR. A velocidade elevada com que ocorre a reação entre o ferro e o H_2O_2 provoca a ativação do H_2O_2 e a subsequente geração de $OH\cdot$, gerando o menor tempo de reação entre todos os POAs.

É importante ressaltar que ambos os processos utilizados podem ser empregados em Estações de Tratamento de Água na potabilização de água com concentrações elevadas de compostos orgânicos, uma vez que, foi observado redução significativa da cor aparente, cor verdadeira, turbidez e microcistina-LR. Assim constituem práticas alternativas sustentáveis e seguras para o tratamento de água contaminadas com compostos tóxicos, entre eles a microcistina-LR, que por não ser completamente

eliminada no tratamento convencional, podem permanecer na água distribuída e causar inconvenientes de ordem de saúde pública à população.