

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

**REMOÇÃO DE MICROCISTINAS POR MEIO DE
OXIDAÇÃO QUÍMICA COM HIPOCLORITO DE SÓDIO E
VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECTOR DE
MASSAS**

MARIA MARTINS DO NASCIMENTO

ORIENTADORA: CRISTINA CELIA SILVEIRA BRANDÃO

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

**PUBLICAÇÃO PTARH. DM -136/11
BRASÍLIA/DF, DEZEMBRO/2011**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL

**REMOÇÃO DE MICROCISTINAS POR MEIO DE OXIDAÇÃO
QUÍMICA COM HIPOCLORITO DE SÓDIO E VALIDAÇÃO DO
MÉTODO DE ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM
DETECTOR DE MASSAS**

MARIA MARTINS DO NASCIMENTO

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

APROVADA POR:

**Prof^a. Cristina Celia Silveira Brandão – PhD, (ENC – UnB)
(Orientadora)**

**Prof^a.
(Yovanka Perez Ginoris - DSc, ENC/UnB)**

**Prof^a.
(Inês Sabioni Resck - DSc, IQ/UnB)**

BRASÍLIA/DF, 06 DE DEZEMBRO DE 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

NASCIMENTO, MARIA MARTINS

Remoção de microcistinas por meio de oxidação química com hipoclorito de sódio e validação do método de análise por cromatografia líquida com detector de massas. [Distrito Federal] 2011.

xiv, 112p 210 x 297 mm (ENC/FT/UnB, Mestre, Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, 2011). Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília. Faculdade de Tecnologia.

Departamento de Engenharia Civil e Ambiental.

1. Oxidação

2. Microcistinas

3. Hipoclorito de sódio

4. Espectrometria de massas

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

NASCIMENTO, M. M. (2011). *Remoção de microcistinas por meio de oxidação química com hipoclorito de sódio e validação do método de análise por cromatografia líquida com detector de massas*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 112p.

CESSÃO DE DIREITOS

AUTOR: Maria Martins do Nascimento.

TÍTULO: Remoção de microcistinas por meio de oxidação química com hipoclorito de sódio e validação do método de análise por cromatografia líquida com detector de massas.

GRAU: Mestre

ANO: 2011

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

Maria Martins do Nascimento
mmnascimento@gmail.com

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo incondicional apoio e compreensão, e principalmente por todo amor a mim dedicado.

À Prof^a Cristina Brandão, agradeço a orientação neste estudo, mas principalmente pela paciência, compreensão, pelo conhecimento transferido e por confiar no meu trabalho.

À Professora Maria Hosana Conceição pelo incentivo prestado e por estar disposta a prestar-me esclarecimentos sempre que precisei em questões técnicas relacionadas a este estudo. Agradeço a Professora Inês Sabioni Resck pela atenção dispensada e pelos esclarecimentos relacionados à estrutura química.

À Professora Yovanka Pérez Ginoris pela orientação quanto ao uso do software estatístico utilizado neste trabalho.

Às queridas colegas Glenda, Izabela, Liane e Elvira pelo companheirismo e amizade dispensada ao longo dessa jornada.

À querida amiga e companheira de sala, Nara Juliana, pelos momentos de descontração e por encorajar-me durante todo esse período. Agradeço a Orlandina por toda força e incentivo.

À colega Jaqueline Benassuly pela amizade e pelo auxílio na execução dos ensaios cinéticos, e meu muito obrigado pelo apoio nos momentos difíceis de reflexão e tristeza.

Agradeço à Carol pelos ensinamentos referentes ao teste ELISA e operação do CLAE. Ao Denio, Marcilene, Júnior e Boy pela amizade, carinho, respeito e ajuda incondicional.

À coordenação do programa de pós-graduação em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, a CAPES e ao CNPQ pelo incentivo financeiro.

RESUMO

REMOÇÃO DE MICROCISTINAS POR MEIO DE OXIDAÇÃO QUÍMICA COM HIPOCLORITO DE SÓDIO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

Autor: Maria Martins do Nascimento

Orientador: Cristina Celia Silveira Brandão

Programa de pós-graduação em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos

Brasília, dezembro de 2011.

As florações de cianobactérias provocadas pelo aporte de nutrientes nos corpos de água impactam a qualidade das águas. Esses micro-organismos ao serem lisados liberam toxinas para a água. O tratamento de água convencional - coagulação, floculação, sedimentação e filtração - não é eficiente na remoção dessas cianotoxinas dissolvidas, porém a oxidação no durante a etapa de desinfecção (cloração) pode ser uma alternativa para a remoção desses compostos. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo estudar o processo de oxidação de microcistinas dissolvidas usando o hipoclorito de sódio como oxidante, avaliando a cinética de oxidação, influência da dose e tempo de contato, bem como a caracterização das microcistinas produzidas pela linhagem NPLJ-4 de *Microcystis aeruginosa* e a validação o método para determinação de microcistina-LR por cromatografia líquida com detector de massas (CL-MS/MS). Os resultados obtidos sugerem a presença de seis variantes de microcistinas produzidas pela linhagem NPLJ-4, sendo a mais abundante a [D-Leu] MCYST-LR. O método de determinação da MCYST-LR implementado apresentou, na faixa de 1-50 $\mu\text{g L}^{-1}$, boa linearidade, com coeficiente de ajuste (r) maior que 0,99. A repetitividade do método, obtida mediante a fortificação de amostras com diferentes concentrações de microcistina-LR, apresentou resultados satisfatórios (CV % < 20). Os Limites de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ) foram inferiores a 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MCYST-LR, valor máximo permitido pela legislação brasileira sobre potabilidade da água, indicando a aplicabilidade do método para o controle de água para consumo humano. Nas condições avaliadas, microcistinas semi-purificadas oxidadas com hipoclorito de sódio em valor de pH 6, os resultados mostraram que a oxidação segue uma cinética de *pseudo*-primeira ordem em relação à concentração de microcistinas e a eficiência de remoção foi proporcional ao CT (concentração de cloro vezes tempo de contato). Para concentrações de microcistinas de cerca de 100, 40 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, os produtos CT mínimos necessários para obtenção de concentrações de microcistinas atendendo o padrão de potabilidade foram, respectivamente, 120, 60 e 30 $\text{mg L}^{-1} \text{ min}$.

Palavras chave: Microcistinas, Oxidação, hipoclorito de sódio, espectrometria de massa.

ABSTRACT

MICROCYSTINS REMOVAL THROUGH OXIDATION WITH SODIUM HYPOCHLORITE AND VALIDATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH MASS SPECTROMETRY AS ANALYTICAL METHOD.

Author: Maria Martins do Nascimento

Supervisor: Cristina Celia Silveira Brandão

Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos

Brasília, December 2011.

Blooms of cyanobacteria caused by nutrients loads to water sources impacts water quality. When these microorganisms are lysed they release toxins into the water. The conventional water treatment, based in coagulation, flocculation, sedimentation and filtration, is not effective in removing these dissolved cyanotoxins, but the oxidation during chlorination can be an alternative for the removal of such microcontaminants. Therefore, this work aimed to study the oxidation of microcystins using sodium hypochlorite as oxidant, evaluating the oxidation kinetics, the influence of dose and oxidation time, as well as the characterization of microcystins variants produced by *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4 strain and optimization and validation of the analytical method for determination of MCYST-LR by liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS/MS). The results indicated the presence of six variants of microcystins produced by the *M. aeruginosa* NPLJ-4 strain, with the [D-Leu] MCYST-LR being the most abundant toxin. The LC-MS/MS method for quantification of MCYST-LR showed good linearity in the range of 1 to 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, with fitness coefficient (r) > 0.99. The repeatability, obtained by fortifying blank samples with different concentrations of microcystin-LR, was considered satisfactory ($\text{CV}\% < 20$). The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were lower than 1.0 mg L^{-1} of MCYST-LR, the Brazilian drinking water standard, suggesting the applicability of the method for the drinking water quality control. Under the conditions studied, oxidation of semi-purified microcystins with sodium hypochlorite at pH 6, the results showed that the oxidation followed a *pseudo*-first order kinetics regarding the microcystins concentration and the removal efficiency was related to CT product (concentration of chlorine *times* oxidation time). For concentrations of microcystins of around 100, 40 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, the minimum CT values of 120, 60 e 30 $\text{mg L}^{-1} \text{min}$, respectively, are necessary to guarantee residual concentrations of microcystins bellow de drinking water standard, 1.0 mg L^{-1} .

Keywords: Microcystins, oxidation, sodium hypochlorite, mass spectrometry.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - OBJETIVOS	3
2.1 - OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 - CIANOTOXINAS	4
3.1.1 - Neurotoxinas.....	5
3.1.2 - Hepatotoxinas	7
3.2 - MÉTODOS DE DETECÇÃO DE MICROCISTINAS	9
3.3 - VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	16
3.3.1 - Seletividade ou especificidade.....	16
3.3.2 - Linearidade	17
3.3.3 - Limite de detecção	18
3.3.4 - Limite de quantificação	18
3.3.5 - Recuperação.....	19
3.3.6 - Precisão	19
3.4 - OXIDAÇÃO QUÍMICA APLICADA À REMOÇÃO DE MICROCISTINAS	19
3.4.1 - Produtos da oxidação com cloro.....	30
4 - METODOLOGIA	36
4.1 - ETAPA PRELIMINAR	37
4.1.1 - Cultivo, extração e semipurificação das microcistinas	37
4.1.2 - Produção do hipoclorito de sódio	41
4.2 - ETAPA 1- Validação do método para quantificação de MCYST-LR	42
4.2.1 - Otimização dos parâmetros	43
4.2.2 - Otimização das condições cromatográficas.....	44
4.2.3 - Validação do método para determinação de MCYST-LR	44
4.2.3.1 - Seletividade e especificidade.....	45
4.2.3.2 - Linearidade.....	45
4.2.3.3 - Limite de Detecção (LOD).....	46
4.2.3.4 - Limite de Quantificação (LOQ)	46
4.2.3.5 - Recuperação	47
4.2.3.6 - Precisão	47

4.3 - ETAPA 2 - CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCISTINAS PRODUZIDAS PELA LINHAGEM NPLJ-4.....	48
4.4 - ETAPA 3 - ENSAIOS DE OXIDAÇÃO.....	49
4.4.1 - Ensaio 1	53
4.4.2 - Ensaio 2	54
4.4.3 - Ensaio 3	54
4.4.4 - Ensaio 4	55
4.4.5 - Ensaio 5	55
4.4.6 - Ensaio 6	56
4.4.7 - Estudo da cinética da reação de microcistinas com cloro	56
4.4.7.1 - Ensaio 7.....	56
4.4.7.2 - Ensaio 8.....	57
4.4.7.3 - Ensaio 9.....	57
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1 - ETAPA 1 – MÉTODO DE DETECÇÃO PARA MCYST-LR	58
5.1.1 - Otimização dos parâmetros	58
5.1.2 - Otimização das condições cromatográficas.....	61
5.1.3 - Validação do método de determinação de MCYST-LR	62
5.1.3.1 - Seletividade e especificidade.....	62
5.1.3.2 - Linearidade.....	63
5.1.3.3 - Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	63
5.1.3.4 - Recuperação e precisão.....	65
5.1.4 - Curva de calibração.....	66
5.1.5 - Teste com água de torneira.....	67
5.2 - ETAPA 2 - CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCISTINAS PRODUZIDAS PELA LINHAGEM NPLJ-4 DE <i>MICROCYSTIS AERUGINOSA</i>	68
5.3 - ETAPA 3 – OXIDAÇÃO DE MICROCISTINA COM CLORO.....	80
5.3.1 - Cinética da oxidação de Microcistinas com o cloro	90
6 - CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
APÊNDICES	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1-Estrutura geral das microcistinas (Carmichael 1992, modificado).....	7
Figura 3.2 – Principais componentes de um espectrômetro de massas (Skoog <i>et al.</i> ,2002, modificado).....	12
Figura 3.3 - Esquema do sistema de espectrometria de massas (Martins Júnior <i>et al.</i> , 2006).	13
Figura 3.4 - Ionização <i>eletrospray</i> com analisador de massas quadrupolo (Applied Biosystems, adaptado).....	14
Figura 3.5 - Mecanismo da formação de subproduto dihidroxi-microcistina-LR, modificada a partir deTsuji <i>et al.</i> , 1997.....	33
Figura 3.6 - Decomposição da MCYST- LR via cloração, modificada a partir de Lawton e Robertson, 1999.	34
Figura 4.1 – Cultivo de <i>Microcystis aeruginosa</i>	38
Figura 4.2 - Material lisado dissolvido após processo de filtração em membrana com retenção de 1 µm (a) e 0,45 µm (b).....	39
Figura 4.3 - Manifolde e os cartuchos C ₁₈ utilizados para semipurificação de microcistinas.	40
Figura 4.4 - Fluxograma de extração e semipurificação/concentração de microcistinas....	41
Figura 4.5 –Gerador de cloro.....	42
Figura 4.6 - Fluxograma dos ensaios de oxidação.....	51
Figura 4.7 - Esquema dos controles de dosagens do clor nos ensaios de oxidação.	52
Figura 5.1 - Espectro de massas de MCYST-LR em ionização positiva (A) e negativa (B) no modo scan.	59
Figura 5.2 - Espectro de massa das transições m/z 135 e 103 identificadas no modo MRM para o íon precursor [M + H ⁺] de m/z 995,7.....	61
Figura 5.3 - Cromatograma de análise dos brancos de matrizes, água pura (A) e potável (B) para a fragmentação monitorada, m/z 135.....	62
Figura 5.4 - Cromatogramas de análises de água mili-q (A) e água potável (B) fortificadas com 6,2 µg L ⁻¹ do padrão MCYST-LR	68
Figura 5.5 - Cromatograma no sistema CLAE-DAD referente ao extrato semipurificado da cepa NPLJ-4 (A) e ao padrão MCYST-LR (B).	69
Figura 5.6 - Espectro de massas EM referente ao extrato semipurificado de microcistina. 71	

Figura 5.7 - Espectro de massas EM (A) e EM/EM (B) referente ao pico (2) predominante observado no extrato de microcistinas.	72
Figura 5.8 - Estrutura molecular referente à MCYST-LR, modificada a partir de Merel <i>et al.</i> , 2009.	73
Figura 5.9 - Espectrograma de massas EM (A) e EM/EM (B) referente ao pico (1) observado no extrato de microcistinas.	74
Figura 5.10 - Espectrograma de massas EM (A) e EM/EM (B) referente ao pico (3) observado no extrato de microcistinas.	75
Figura 5.11 - Espectrograma de massas EM do pico 4 (A), EM/EM referente ao constituinte m/z 1051,7 (B) e EM/EM do constituinte m/z 1055,8 (C).	77
Figura 5.12 - Espectrograma de massas EM antes da oxidação (A), EM após 3 horas (B) e EM após 24 horas de tempo de contato (C).	81
Figura 5.13 - Valores médios do cloro residual livre (mg L^{-1}) inicial e nos tempos de contato 15 e 30 min para as concentrações médias de 103,3 (A) e 44 $\mu\text{g L}^{-1}$ (B) de microcistinas.	83
Figura 5.14 - Residuais de microcistinas nos tempos de contato de 15 e 30 minutos para as doses de cloro adicionadas a água de estudo com concentrações iniciais de microcistinas de 103,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (A) e 44,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (B).	84
Figura 5.15 - Residuais de cloro livre (A) e de microcistinas (B) obtidos após aplicação do cloro nos tempos de 15 e 30 minutos.	86
Figura 5.16 – Valores de concentrações iniciais e residuais de microcistinas para as doses de cloro aplicadas nos tempos de contato de 15 e 30 minutos.	87
Figura 5.17 - Oxidação das microcistinas em função do CT (concentração <i>vezes</i> tempo de contato).	89
Figura 5.18 - Cloro combinado formado nos tempos de contato de 15 e 30 minutos no processo de oxidação de 40,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de microcistinas (A) e 21,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (B).	89
Figura 5.19 - Curva de decaimento das microcistinas na concentração média de 42 $\mu\text{g L}^{-1}$ e concentrações médias de cloro de 0,5, 1,5 e 3,0 mg L^{-1}	91
Figura 5.20 - Cinética de <i>pseudo</i> -primeira ordem para a oxidação de microcistinas com cloro.	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - DL ₅₀ de neurotoxinas por injeção intraperitoneal (Carmichael, 1992).	6
Tabela 3.2 - Tipos de microcistinas (Carmichael 1992, modificado).	8
Tabela 3.3 - Fontes de ionização e seus respectivos agentes ionizantes (Skoog <i>et al.</i> , 2002, adaptado).	12
Tabela 3.4 - Processos de oxidação utilizados na remoção de microcistinas.	23
Tabela 3.5 - Resumo de trabalhos científicos relativos à oxidação de microcistinas com hipoclorito de sódio.	29
Tabela 3.6 - Principais subprodutos formados no processo de oxidação pela adição de agentes oxidantes/desinfetantes à água (Lykins, 1994; Paschoalato <i>et al.</i> , 2008).	31
4.1- Etapas experimentais das atividades realizadas.	36
Tabela 5.1- Parâmetros otimizados para operação no modo MRM.	59
Tabela 5.2 - Parâmetros otimizados para as transições monitoradas (m/z 135 e 103) no modo MRM.	60
Tabela 5.3 - Condições dos gradientes de eluição para MCYST-LR.	61
Tabela 5.4 - Resultados dos dados obtidos da equação da reta nos experimentos 1 a 3.	63
Tabela 5.5 - Resultados da relação sinal/ruído (s/r) para MCYST-LR, 0,12 µg L ⁻¹ , em CLAE-EM/EM.	64
Tabela 5.6 - Resultados para os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para MCYST-LR em água.	64
Tabela 5.7 - Recuperação (R%) e repetibilidade (CV%) referentes aos experimentos 1 a 3.	65
Tabela 5.8 - Resumo dos resultados obtidos na validação do método.	66
Tabela 5.9 - Dados obtidos para construção da curva de calibração.	66
Tabela 5.10 - Fragmentos das variantes de microcistinas produzidas pela linhagem de <i>Microcystis aeruginosa</i> - NPLJ-4.	79
Tabela 5.11- Resumo das condições de realização dos ensaios de oxidação das microcistinas com o cloro - etapa 1.	82
Tabela 5.12 - Comparativos dos resultados obtidos nos ensaios de oxidação 4 e 5 com diferentes valores de pH no tempo de contato de 30 minutos.	86
Tabela 5.13 – Resultados dos ensaios de oxidação 5 e 6 com diferentes concentrações de microcistinas e diferentes doses de cloro nos tempos de contato de 15 e 30 minutos e valor de pH 6.	88

Tabela 5.14 - Condições de realização dos ensaios cinéticos utilizadas no estudo da cinética de oxidação das microcistinas.....	90
Tabela 5.15 - Parâmetros obtidos da cinética de microcistinas para as diferentes doses de cloro.....	92

LISTA DE SÍMBOLOS, NOMECLATURAS E ABREVIACÕES

AE	Água de estudo
Adda	Ácido 3 amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenilado-4-dienóico
ADMAdda	Ácido acetil-dimetil 3 amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenilado-4-dienóico
Ala	Alanina
APCI	Ionização química àa pressão atmosfera
Arg	Arginina
COD	Carbono Orgânico Dissolvido
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo
CID	Colisão dissociada induzida
CXP	Potencial de Saída da Célula de Colisão
C ₁₈	Cartucho de octadecil-silano
CE	Energia de Colisão
CT	Concentração versus tempo
Dhb	Dehidrobutirina
DL ₅₀	Dose Letal
DP	Potencial de Orifício
E°	Potencial do eletrodo
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EM	Espectrometria de massas
EC	<i>European Community</i>
EP	Energia Potencial
ESI	Ionização por eletronebulização
FAB	Bombeamento com átomos rápidos
GS1	Gás nebulizante
GS2	Gás secante
Glu	Ácido glutâmico
HTyR	Homotirosina
i.p	Intraperitonal
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LAA	Laboratório de Análise de Água

LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
Leu	Leucina
M	Molar
Mdha	N-metildihidrolamina
MeAsp	Ácido metil aspártico
MGlu	Glutamato de metila
MCYST	Microcistinas
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
m/z	Massa/carga
mm	Milímetro
MS	Ministério da Saúde
MON	Matéria Orgânica Natural
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
ODS	Octacecil-silano
PDA	Foto-diodo array
pH	Potencial Hidrogeniônico
PP1	Proteína fosfatase 1
PP2A	Proteína fosfatase 2
ppb	Partes por bilhão
rpm	Rotação por minuto
SPs	Subprodutos
THMs	Trihalometanos
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
µG	Micrograma
µL	Microlitro

1 - INTRODUÇÃO

A poluição e o aporte de nutrientes em excesso nos corpos d'água, principalmente nitrogênio e fósforo, são as principais causas de eutrofização e das conseqüentes alterações na qualidade da água de mananciais superficiais. A eutrofização se caracteriza pelo crescimento de florações de microalgas e cianobactérias. Essa acelerada reprodução provoca alteração da cor da água e confere odor e sabor desagradáveis ao corpo hídrico. Algumas espécies de cianobactérias produzem toxinas hepatotóxicas, neurotóxicas ou causadoras de irritações na pele, que representam riscos à saúde humana por meio da ingestão oral, consumo do pescado ou pelo contato direto com a água contaminada.

Algumas cianotoxinas possuem ação muito rápida, outras têm sua atuação mais lenta produzindo efeitos crônicos. O tipo mais comum de intoxicação envolvendo cianobactérias é ocasionado por hepatotoxinas, que podem causar morte em um intervalo de poucas horas ou poucos dias.

Um caso de intoxicação por cianotoxinas ocorrido no Brasil com repercussão internacional influenciou significativamente os estudos nesse campo. Em abril de 1996, foi detectada a presença de cianotoxinas no Açude Tabocas, em Caruaru, PE, o qual fornecia água ao reservatório do Instituto de Doenças Renais (IDR) desta cidade. A presença de cianotoxinas foi detectada também em amostras de fígado e sangue de pacientes de hemodiálise, assim como no carvão ativado do filtro utilizado para purificar a água usada pela clínica. Dos 131 pacientes renais crônicos submetidos a sessões de hemodiálise, 52 vieram a óbito até 10 meses após o início dos sintomas (Azevedo *et al.*, 2002).

As espécies já identificadas como produtoras de hepatotoxinas estão incluídas nos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Cylindrospermopsis*, *Planktotrix*, *Oscillatoria*, *Radiocystis*, *Arthrospira*. A espécie *Microcystis aeruginosa* é produtora de microcistinas que são heptapeptídeos cíclicos cuja estrutura geral é D-alanina [D-Ala]-X-[D-MeAsp]-Z-Adda-[D-Glu]-Mdha, onde X e Z são os dois L aminoácidos variáveis. Vários autores têm relatado que a toxicidade das microcistinas é parcialmente devida ao grupamento Adda constituinte dessa molécula.

O tratamento de água convencional baseado nos processos - coagulação, floculação, sedimentação e filtração - elimina parte significativa dos microrganismos presentes na água, incluindo as cianobactérias. Contudo, este tipo de tratamento não tem se mostrado eficiente na remoção das frações dissolvidas das cianotoxinas. Portanto, é necessária a implementação de barreiras mais seguras para remoção desses compostos de forma a reduzir os riscos à saúde. A oxidação química tem se mostrado uma das opções mais promissoras para a remoção de microcistinas dissolvidas.

O cloro é um oxidante forte e, no Brasil, é um dos agentes desinfetantes mais usados nas estações de tratamento de água. A ação tóxica do cloro sobre as células das microalgas e cianobactérias pode produzir efeito indesejável. O cloro na forma de ácido hipocloroso, que é o composto ativo, penetra através da membrana celular, agindo sobre as proteínas ou sobre as enzimas celulares, alterando suas características físico-químicas, impedindo a continuação de suas atividades vitais normais, ao mesmo tempo levando à lise celular e a liberação de toxinas. Por outro lado, vários estudos mostram também a eficiência do cloro na destruição das toxinas dissolvidas, mas ainda há escassez de informação sobre os produtos formados no processo de oxidação, e seus efeitos sobre a saúde.

Face à vasta utilização do cloro como agente desinfetante e seu potencial de oxidação das cianotoxinas, o presente trabalho buscou ampliar o conhecimento sobre a remoção das microcistinas usando como oxidante o hipoclorito de sódio. Para viabilizar o estudo, foi implementada e validada a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE/EM/EM).

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

Estudar o processo de oxidação de microcistinas dissolvidas usando o hipoclorito de sódio como agente oxidante.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

- a) Implementar e validar o método analítico de determinação de MCYST-LR por meio da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção por espectrometria de massas (CLAE/EM/EM).
- b) Caracterizar as microcistinas produzidas pela linhagem NPLJ-4 de *Microcystis aeruginosa*;
- c) Avaliar o efeito da dose de cloro e tempo de contato na remoção de microcistinas, sob determinada condição de pH e temperatura;
- d) Avaliar a cinética da oxidação das microcistinas com cloro.

A hipótese deste trabalho é a possível utilização da etapa de desinfecção com o cloro no processo de tratamento de água para a oxidação de microcistinas dissolvidas na água.

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo refere-se à apresentação dos principais trabalhos científicos referentes às cianobactérias e cianotoxinas que deram subsídio para o desenvolvimento desta dissertação. Inicia-se com as principais características das cianotoxinas, a seguir são apresentadas algumas técnicas analíticas de detecção de cianotoxinas, descreve-se os parâmetros para validação de um método específico. No último tópico, são apresentados alguns resumos de estudos científicos sobre oxidação química das cianotoxinas.

3.1 - CIANOTOXINAS

A poluição de corpos de água superficiais por rejeitos provenientes das atividades humanas resultam em impactos negativos sobre a qualidade da água, tais como: a redução de oxigênio dissolvido, a perda das qualidades cênicas, ou seja, das características estéticas do ambiente e seu potencial para lazer, a morte de peixes e o aumento da incidência de florações de microalgas e cianobactérias (eutrofização artificial). As florações se caracterizam pelo intenso crescimento desses microrganismos na superfície da água, formando uma densa camada de células com vários centímetros de profundidade, com conseqüências relacionadas à saúde pública (Azevedo e Brandão, 2003).

Além da carga de nutrientes, o tempo de detenção da água no corpo hídrico, a estratificação e a temperatura são fatores que influenciam na formação e na intensidade das florações. Entretanto, a capacidade de crescimento nos diferentes meios é uma das características marcantes das cianobactérias e faz com que, em caso de florações, esses organismos predominem sobre as algas.

As cianobactérias, também conhecidas popularmente como cianofíceas ou algas azuis, são microrganismos aeróbios fotoautótrofos. Dessa forma, a fotossíntese é seu principal modo de obtenção de energia para o metabolismo, entretanto, sua organização celular demonstra que esses microrganismos são procariontes e, portanto, muito semelhantes bioquímica e estruturalmente às bactérias.

A principal preocupação com o aumento da ocorrência de florações de cianobactérias em mananciais de abastecimento de água está relacionada com a capacidade de esses microrganismos produzirem e liberarem compostos tóxicos para o meio líquido, compostos esses conhecidos como cianotoxinas. As toxinas são liberadas para a água quando ocorre o rompimento da célula (lise) seja pelo decaimento natural ou pela ação de diferentes agentes químicos (Yoo *et al.*, 1995). Uma vez liberados, esses compostos podem alterar a estrutura de diversas comunidades aquática.

A exposição a essas cianotoxinas pode afetar a saúde humana, tanto pelo contato dérmico, inalação, consumo oral ou intravenoso, como no caso de tratamento de hemodiálise. Entretanto, a principal via de intoxicação pode ser pela ingestão oral da água contaminada com células de cianobactérias e toxinas e pelo consumo de peixes que tenham se alimentado de cianobactérias e acumulado suas toxinas (Magalhães *et al.*, 2001). No caso da ingestão de água, o maior risco está associado ao consumo de água sem o tratamento adequado para remoção das cianobactérias e toxinas.

Registros de ocorrência de pelo menos 32 espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas foram observados por Sant'Anna *et al.* (2008), em diferentes ambientes aquáticos brasileiros. De acordo com esses autores a *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena* são os gêneros com o maior número de espécies potencialmente tóxicas.

São vários os gêneros e espécies de cianobactérias que formam florações e podem liberar diferentes tipos de toxinas. Contudo, as neurotoxinas e as hepatotoxinas são consideradas os principais agentes tóxicos produzidos por essas cianobactérias. Esses grupos apresentam uma estabilidade química e uma degradação microbiológica bastante diferente nos ambientes aquáticos.

3.1.1 - Neurotoxinas

As neurotoxinas produzidas pelas cianobactérias podem interferir no funcionamento do sistema nervoso levando o indivíduo à morte por parada respiratória após poucos minutos de exposição. Os tipos mais conhecidos dessa toxina são: anatoxina-a, anatoxina-a(s), saxitoxinas (Carmichael, 1994).

Anatoxina-a é um alcalóide neurotóxico que age como um potente bloqueador neuromuscular pós-sináptico de receptores nicotínicos e colinérgicos. Os sinais de envenenamento por essa toxina, em animais selvagens e domésticos, incluem: desequilíbrio, fasciculação muscular, respiração ofegante e convulsões. A morte é devida à parada respiratória e ocorre de poucos minutos a poucas horas, dependendo da dosagem ingerida e consumo prévio de alimento (Carmichael, 2001).

Anatoxina-a(s) é um organofosforado natural (N-hidroxiguanidina fosfato de metila) muito tóxica, mas devido a sua instabilidade pode ser inativada a elevadas temperaturas, maiores que 40°C, e sob condições alcalinas. Os sinais de intoxicação observados, em animais, são a intensa salivação, tremores, diarreia entre outros (Carmichael, 2001).

As saxitoxinas são um grupo de alcalóides carbamatos que podem ser não sulfatados (saxitoxinas), com um único grupamento sulfato (G-toxinas) ou com dois grupamentos sulfatos (C-toxinas). O mecanismo de ação dessas neurotoxinas ocorre com inibição da condução nervosa por bloqueamento dos canais de sódio, afetando ou a permeabilidade ao potássio ou a resistência das membranas. Os sinais clínicos de intoxicação humana incluem tontura, adormecimento da boca e das extremidades, fraqueza muscular, náusea, vômito, sede e taquicardia. Os sintomas podem começar cinco minutos após a ingestão, e a morte pode ocorrer entre 2 a 12 horas. Em casos de intoxicação com dose não letal, geralmente os sintomas desaparecem de um a seis dias (Carmichael, 1994).

A toxicidade aguda desses grupos de alcalóides apresenta bastante variação. A DL₅₀ (Dose Letal) ou quantidade de toxinas que ao serem ingeridas provocam a morte de pelos menos 50% da população alvo, por injeção intraperitoneal (i.p.) em camundongos, para neurotoxinas purificadas estão apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - DL₅₀ de neurotoxinas por injeção intraperitoneal (Carmichael, 1992).

Toxinas	DL ₅₀ (i.p) µg Kg ⁻¹ de peso corpóreo
Anatoxina-a	200
Anatoxina-a(s)	20
Saxitoxinas	10

3.1.2 - Hepatotoxinas

Seu nome genérico, hepatotoxinas, deve-se, justamente, ao fato de as células hepáticas (hepatócitos) serem o alvo principal de sua ação tóxica. O tipo mais comum de intoxicação envolvendo cianobactérias é ocasionado por essas toxinas, que apresentam uma ação mais lenta, podendo causar morte em um intervalo de poucas horas a poucos dias. Dentre as espécies identificadas como produtoras de hepatotoxinas estão incluídos os gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Cylindrospermopsis*, *Planktotrix*, *Oscillatoria*, *Radiocystis*, *Arthrospira* (Meriluoto e Codd, 2005).

As hepatotoxinas parecem ser o tipo de cianotoxinas mais amplamente distribuído no meio aquático. Destas, as mais comumente encontradas nas águas superficiais, e mais estudadas, são as microcistinas.

A estrutura geral das microcistinas é [D-Ala]-X-[D-MeAsp]-Z-Adda-[D-Glu]-Mdha, onde X e Z são os dois L aminoácidos variáveis, D-MeAsp é D ácido metilaspártico, D-Glu é o ácido glutâmico e Mdha representa N-metildeidroalanina. O grupamento Adda, ácido 3-amino-9-metóxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienóico, está presente nas microcistinas e também nas nodularinas. Este grupamento tem sido apontado como um dos responsáveis pela atividade biológica dessas hepatotoxinas (Sivonen e Jones, 1999).

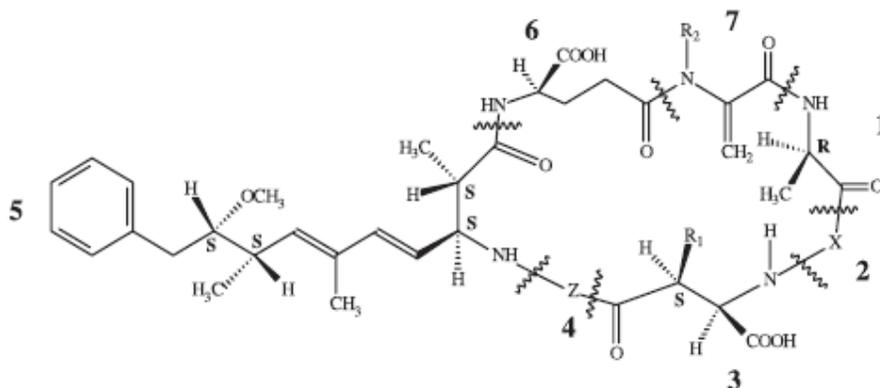


Figura 3.1-Estrutura geral das microcistinas (Carmichael 1992, modificado).

Variações da estrutura molecular podem ocorrer nos sete aminoácidos, sendo mais frequentes as substituições nas posições 2 e 4 (X e Z) e metilações nos aminoácidos 3 e 7 e 3 ou 7 (Carmichael, 1992). A Figura 3.1 ilustra a estrutura geral das microcistinas

(MCYST), enquanto na Tabela 3.2 são apresentadas algumas combinações dos L aminoácidos que definem o análogo da molécula e a nomenclatura desse grupo.

Tabela 3.2 - Tipos de microcistinas (Carmichael 1992, modificado).

Nome da toxina	L-aminoácido (X)	L-aminoácido (Z)
MCYST – LA	Leucina	Alanina
MCYST – LR	Leucina	Arginina
MCYST – RR	Arginina	Arginina
MCYST – YR	Tirosina	Arginina
MCYST – YA	Tirosina	Alanina
MCYST – YM	Tirosina	Metionina
MCYST – AR	Alanina	Arginina
MCYST – FR	Fenilalanina	Arginina
MCYST – WR	Triptofano	Arginina
MCYST – HtyrR	Homo-tirosina	Arginina

Embora em 2009, Sivonen e Jones relatassem que pelo menos 85 análogos das microcistinas eram conhecidos, as mais estudadas são as variantes MCYST-LR e MCYST-LA. A MCYST-LR é a variante mais tóxica entre os análogos de microcistinas, pois apresenta DL₅₀ (i.p.) em animais de laboratório entre 25 a 150 µg kg⁻¹ de peso corpóreo e entre 5.000 e 10.900 µg kg⁻¹ de peso corpóreo por administração oral (Sivonen e Jones, 1999). Devido a essa comprovada toxicidade crônica, a Organização Mundial de Saúde (WHO) limitou o valor máximo de 1,0 µg L⁻¹ de MCYST-LR na água para consumo humano (WHO, 1999). No Brasil, a portaria nº 518/2004, do Ministério da Saúde (MS) (Brasil, 2004) tem como valor máximo permitido para microcistinas em águas destinadas ao consumo humano 1,0 µg L⁻¹, sendo aceitável a concentração máxima de 10 µg L⁻¹ de microcistinas em até três amostras, consecutivas ou não, nas análises de água potável realizadas em um período de doze meses.

Os estudos relativos aos mecanismos de ação das hepatotoxinas peptídicas têm mostrado que várias microcistinas e nodularinas são potentes inibidores de proteínas fosfatases tipo 1 (PP1) e 2A (PP2A) de células eucariontes. Estas toxinas também são reconhecidas como potentes promotores de tumores hepáticos (Yoshizawa *et al.*, 1990). Elas chegam aos hepatócitos por meio de receptores dos ácidos biliares e promovem uma desorganização

dos filamentos intermediários e dos filamentos de actina, que são polímeros protéicos componentes do citoesqueleto (Runnegar e Falconer, 1986).

Essa desorganização leva a uma retração dos hepatócitos, provocando a perda de contato entre eles com as células que formam os capilares sinusoidais. Como consequência, o fígado perde sua arquitetura e desenvolve graves lesões internas. A perda de contato entre as células cria espaços internos que são preenchidos pelo sangue que passa a fluir dos capilares para esses locais (Carmichael, 1994).

Tem sido verificado que, outro alcalóide hepatotóxico, denominado cilindrospermopsina, cujo mecanismo de ação se dá por inibição da síntese protéica, também causa danos severos em células renais, pulmonares e cardíacas dos animais testados. Esse alcalóide é uma toxina de ação lenta, podendo apresentar seu efeito tóxico máximo em um intervalo de poucas horas a poucos dias. Em camundongos, a DL_{50} (i.p.) após 24 horas é de 2 mg Kg^{-1} de peso corpóreo (Harada *et al.*, 1994). Devido a essa elevada toxicidade, a portaria do MS nº 518/2004 recomenda como limite aceitável de concentrações de cilindrospermopsinas de até $15 \mu\text{g L}^{-1}$ na água potável.

3.2 - MÉTODOS DE DETECÇÃO DE MICROCISTINAS

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 e permitir a agilidade na tomada de decisões. Por outro lado, técnicas analíticas altamente sofisticadas podem ser aplicadas para determinar, com precisão, o tipo e quantidade de cianotoxinas. Tanto as técnicas quanto as metodologias podem ser selecionadas dependendo dos equipamentos e do grau de especificidade, assim como, o tipo de informação requerida. Ressalta-se que seletividade e sensibilidade são critérios importantes para a escolha do método analítico a ser empregado.

Para analisar as cianobactérias nas florações, os métodos usados compreendem os bioensaios e/ou ensaios físico-químicos. A presença de microcistinas nos ecossistemas pode

ser detectada mediante essas técnicas (Harada *et al.*, 1999), sendo o bioensaio, ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), e os ensaios físico-químicos, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e espectrometria de massas (EM), as técnicas de detecção e quantificação muito utilizadas para análises dessas cianotoxinas.

Os métodos físico-químicos possuem como desvantagem, em relação aos bioensaios, a necessidade de tratamento prévio das amostras. Permitem, no entanto, a detecção e quantificação de pequenas quantidades de toxinas na amostra. Entretanto o método ELISA tem a vantagem de ser uma técnica que não necessita de tratamento prévio da amostra para ser analisada.

O método ELISA permite fazer uma análise imuno-química da amostra baseado na interação anticorpo-antígeno. Atualmente existem vários tipos de *kits* ELISA, como por exemplo, os qualitativos, nos quais a leitura pode ser feita visualmente, e os quantitativos, que são fornecidos em placas, necessitando de um espectrofotômetro específico para sua determinação. Pode-se citar como principais vantagens do método: a sensibilidade (na ordem de partes por bilhão - ppb), a praticidade, a rapidez e a economia em relação ao custo de implantação no laboratório. No entanto, no teste ELISA, o resultado final não discrimina as variantes de microcistina presentes na amostra; indicando apenas o total de toxina detectado (Yoo *et al.*, 1995). Ainda, pode haver interferências nos resultados, se na composição da amostra existir constituintes de afinidade, ou seja, compostos com semelhanças significativas com as microcistinas. Neste caso, pode apresentar resultado falso-positivo.

Em alguns casos, após a detecção e quantificação das toxinas produzidas por cianobactérias, é necessário proceder à identificação do seu análogo. Para tanto se recorre aos ensaios físico-químicos. Um dos métodos mais utilizados é o CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), um tipo de cromatografia líquida que emprega colunas recheadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel, eluída sob pressão. Essa técnica tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de toxinas em amostras pré-purificadas, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e nível elevado de detectabilidade.

Uma das desvantagens da CLAE é a necessidade do uso de padrões para efeitos comparativos em função do grande número de variantes estruturais das microcistinas. A técnica é dispendiosa, pois além do alto custo do equipamento e dos padrões, são requeridas habilidades e qualificações operacionais para o manuseio do equipamento. Adicionalmente, muitas vezes é necessário realizar a concentração e purificação da amostra previamente às análises, devido à presença de outros compostos que podem interferir na análise dos cromatogramas e influenciar o limite de detecção do equipamento.

Com o avanço da tecnologia, surgiram novas técnicas que permitem o esclarecimento de estruturas desconhecidas, com alta capacidade de seletividade e confiabilidade dos resultados obtidos. A espectrometria de massas (EM) é um exemplo dessa evolução. A espectrometria de massas é uma técnica capaz de identificar, de forma simultânea, os análogos da microcistinas em amostras de água (Kondo *et al.*, 1992). A EM tem ainda a capacidade de fornecer informações sobre a composição elementar de amostras, a estrutura molecular, a composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas, além de ser capaz de alcançar limites de detecção muito baixos.

Para a análise de amostras, em condições ideais de separação, no espectrômetro de massas, foi desenvolvida a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, denominada CLAE/EM. Este acoplamento tornou-se uma técnica analítica robusta, versátil e com boa sensibilidade.

O espectrômetro de massas é um instrumento constituído por três partes: fonte de ionização, analisador de massas e detector de íons com aquisição de dados. A Figura 3.2 apresenta os principais componentes de CLAE/EM.

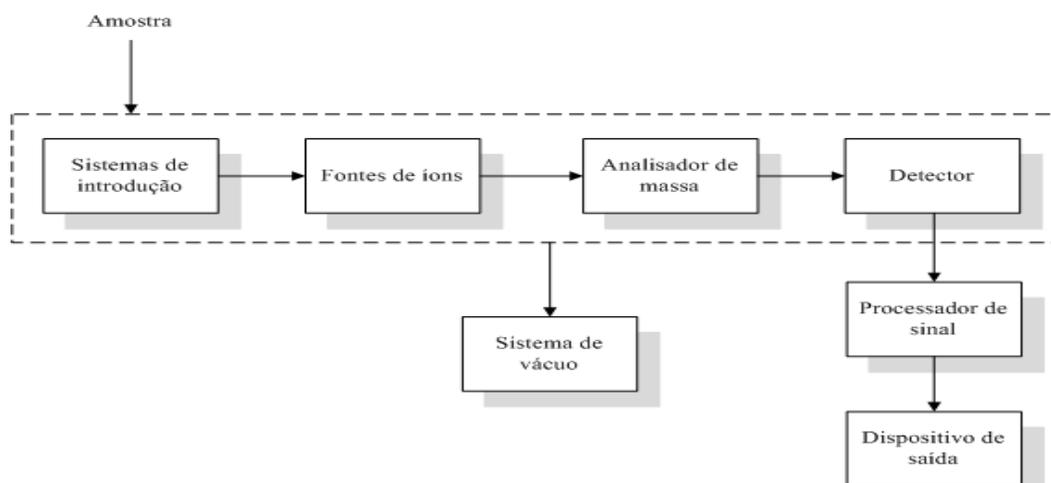


Figura 3.2 – Principais componentes de um espectrômetro de massas (Skoog *et al.*, 2002, modificado).

A transferência de uma amostra da condição ideal, empregada em CLAE, para a condição requerida em EM exigiu o desenvolvimento de interfaces para compatibilizar estas duas técnicas. Para que uma substância possa ser detectada em EM, ela precisa ser ionizada, antes. Este procedimento ocorre por meio de vários métodos de ionização. A Tabela 3.3 apresenta alguns exemplos das fontes de ionização existentes e seus respectivos agentes ionizantes.

Tabela 3.3 - Fontes de ionização e seus respectivos agentes ionizantes (Skoog *et al.*, 2002, adaptado).

Tipo Básico	Fontes de Íons	Agente ionizante
Fase Gasosa	Impacto de elétrons (IE)	Elétrons energéticos
	Ionização química (CI)	Íons gasosos reativos
	Ionização por campo (FI)	Eletrodo com alto potencial
Dessorção	Dessorção por campo (FD)	Eletrodo com alto potencial
	Ionização por eletronebulização (ESI)	Campo elétrico elevado
	Ionização química a pressão atmosférica (APCI)	Íons gasosos reativos
	Dessorção /ionização com laser auxiliada por matriz (MALD)	Feixe de laser
	Dessorção por plasma (DP)	Fragmentos de fissão de ^{252}Cf
	Bombeamento com átomos rápidos (FAB)	Feixe atômico energético

A interface de eletronebulização (ESI, do inglês *electrospray*), na qual um spray é produzido com auxílio de uma corrente elétrica, e a ionização química (APCI- do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), que produz uma espécie química que ioniza a substância em análise são as interfaces que operam à pressão atmosférica. Estas duas formas de ionização são complementares, sendo a *electrospray* a mais usada para moléculas de maior polaridade e massa molecular (Lanças, 2009). A Figura 3.3 apresenta um esquema de um sistema de espectrometria de massas.

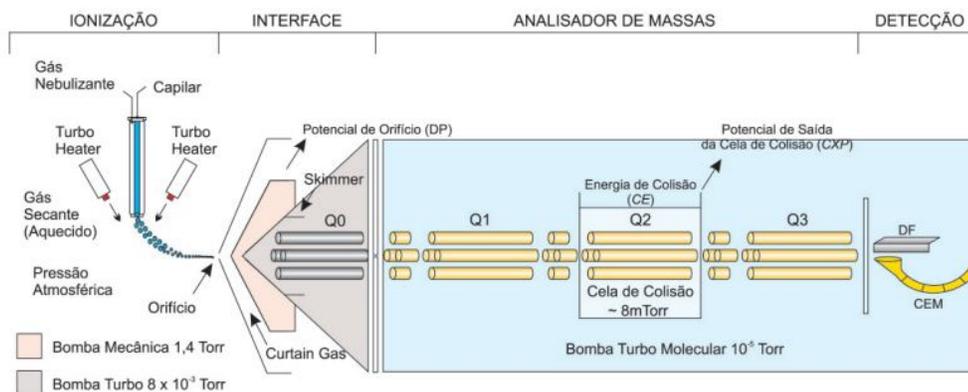


Figura 3.3 - Esquema do sistema de espectrometria de massas (Martins Júnior *et al.*, 2006).

No sistema de ionização por eletronebulização a amostra em solução (usualmente um solvente polar volátil) entra na fonte de íons através de um tubo capilar de aço inoxidável envolvido por um fluxo de nitrogênio (o gás nebulizador). A extremidade do capilar é mantida em um potencial elevado em relação a um eletrodo. Quando a solução deixa o tubo capilar, forma-se um aerossol de gotículas carregadas que são dessolvatadas ao se deslocarem em sentido contrário ao posicionamento de um eletrodo em uma região de pressão atmosférica (Silverstein *et al.*, 2007). Na Figura 3.4 está ilustrada a ionização *electrospray* com analisador de massas quadrupolo.

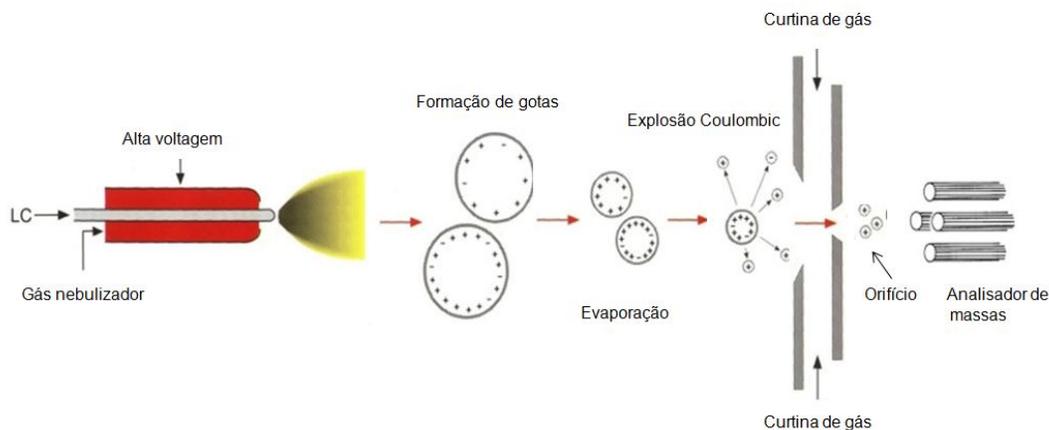


Figura 3.4 - Ionização *eletrospray* com analisador de massas quadrupolo (Applied Biosystems, adaptado).

De acordo com Chiaradia *et al.* (2008) à medida que ocorre a dessolvatação, ou seja, a evaporação do solvente na amostra, o tamanho das gotas é reduzido até o ponto em que a força de repulsão entre as cargas similares fica maior que as forças de coesão da fase líquida (tensão superficial). Nesse momento, ocorre a chamada "explosão coulômbica". Uma série de explosões passa então a ocorrer até que são produzidos íons do analito a partir destas gotas, os quais são transferidos para o interior do espectrômetro de massas.

Os íons positivos produzidos são atraídos por uma fenda do espectrômetro de massa e são separados, no analisador, de acordo com a relação entre a massa da espécie e a sua carga elétrica (m/z , massa/carga). Os íons separados, no analisador, são encaminhados para o detector e em seguida analisados no sistema que produz um espectro de massas (Skoog *et al.*, 2002).

Ainda segundo Skoog *et al.* (2002) para se obter o espectro de um analito, que tem massa molecular nominal "M", o vapor do analito ao ser bombardeado com um feixe de elétrons conduz à perda de um elétron formando o íon molecular M^+ , chamado de íon precursor. Esse íon precursor ao sofrer colisões com um gás inerte é fragmentado formando assim íons de massas menores denominados de íons produtos.

Existem diferentes tipos de analisadores de massas, como por exemplo, o aprisionador de íons (quadrupolo íon trap - tandem), constituído de dois analisadores de massas em sequencia (Q1 e Q3), porquanto recebe a denominação de CLAE/EM/EM. O efluente da

coluna cromatográfica entra no primeiro analisador (Q1), no qual se verifica a presença do íon molecular protonado (M^+), molécula original que perdeu apenas um elétron, característico da substância a ser analisada. O íon selecionado vai para a câmara de reação (Q2) contendo gás nitrogênio onde sofrerá colisão e fragmentação, gerando outros íons. Estes novos íons, denominados íons produto, são analisados no segundo analisador (Q3).

A técnica de CLAE-EM/EM vem se destacando devido à sua alta especificidade analítica quando utilizada em modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês “*Multiple Reaction Monitoring*”), no qual os analisadores de massas Q1 e Q3 selecionam o íon precursor e produto, respectivamente, definindo uma transição de m/z específica. Nesse modo, o segundo quadrupolo (Q2) funciona como uma cela de colisão, onde os íons precursores selecionados, em Q1, de acordo com as razões m/z são fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID), após colisões com um gás inerte, o nitrogênio, sob uma energia específica. Otimizando o detector para tal experimento (MRM), contendo mais de uma transição para o mesmo íon precursor, gera-se um método confirmatório (Martins Júnior *et al.*, 2006).

Dessa forma, é possível confirmar a identidade de um composto presente em uma amostra complexa utilizando a técnica de CLAE/EM/EM. Empregando-se um padrão analítico, obtém-se o espectro do composto, nos dois analisadores, de forma independente, e escolhe-se o íon característico do composto, no primeiro analisador, e um dos íons característicos, no segundo analisador, após a colisão. Uma vez conhecidos esses dois íons, efetua-se a análise com a amostra de interesse, monitorando apenas o íon escolhido para o primeiro analisador, íon-precursor, e o íon escolhido para o segundo analisador, íon produto. Este tipo de monitoramento é, normalmente, referido como uma transição $a \rightarrow b$, onde “a” é a relação massa/carga (m/z) do íon precursor e “b” a relação massa/carga (m/z) do íon produto. Uma vez que apenas um íon é escolhido para ser analisado em cada analisador, todos os demais são ignorados (Lanças, 2009).

Portanto, o emprego da técnica CLAE/EM/EM fornece informações referentes à retenção do composto na coluna, às transições monitoradas e ao sinal proporcional à concentração do analito, que permitem atingir níveis de confiabilidade e sensibilidade, de acordo com os limites recomendados pelos órgãos governamentais.

3.3 - VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

Validação de um método é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos (ABNT, 2005).

A Comunidade Européia desenvolveu, em 2002, um guia de validação (EC/657/2002) do desempenho de métodos analíticos e interpretação de resultados aplicados à identificação e quantificação de resíduos e contaminantes de origem animal (EC, 2002). No Brasil, o INMETRO no documento de caráter orientativo (DOQ-CGCRE-008) ‘Orientação sobre validação de métodos analíticos’ aborda os requisitos aplicáveis à validação de métodos analíticos (INMETRO, 2010). Esses documentos têm sido usados como base para validação de métodos para análises e prevêem que, os parâmetros que devem ser observados no processo de validação de um método analítico sejam:

- Seletividade ou especificidade;
- Linearidade;
- Limite de detecção;
- Limite de quantificação;
- Recuperação;
- Precisão (repetitividade e reprodutibilidade).

3.3.1 - Seletividade ou especificidade

Conforme mostra na literatura, existem instituições que fazem referências somente à especificidade dos métodos. Nesse caso, podem ser citados, Validação de Procedimentos Analíticos (ICH, 1995) e a Comissão de Decisão da Comunidade Européia (EC, 2002). Esses órgãos definem a especificidade como sendo a habilidade de o método distinguir entre o analito a ser medido e outras substâncias presentes na amostra. Entretanto a *International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC* e o INMETRO citam somente a seletividade como sendo a capacidade do método de quantificar o analito na presença de interferentes. Sendo assim, neste trabalho serão utilizados os termos seletividade e especificidade como definido por esses órgãos, uma vez que os mesmos

estão de acordo com o objetivo pretendido de quantificar o analito de interesse na presença de outras substâncias.

Em geral, uma das formas de verificar a seletividade é mediante a observação da presença de picos na região do tempo de retenção do analito de interesse injetando-se um branco, isento do analito de interesse, obtido com a mesma matriz a ser analisada (Lanças, 2009). Esse parâmetro pode ser também comprovado por meio de análise utilizando as técnicas auto-confirmatórias, como por exemplo, a espectrometria de massas.

3.3.2 - Linearidade

Expressa a resposta obtida em função da concentração do analito, a qual deve ser estudada em um determinado intervalo de concentrações do analito. A quantificação requer que se conheça a relação entre a resposta medida e a concentração do analito. 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 tem a forma:

$$y = ax + b \qquad \text{Equação (3.1)}$$

Na 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 próximo da unidade maior a relação, maior a probabilidade de existir uma relação linear definida.

3.3.3 - Limite de detecção

Corresponde à menor quantidade de um analito na amostra que pode ser detectada pelo método. Pode ser determinado como a menor concentração do analito cujo sinal pode ser diferenciado do ruído do sistema. A exigência para distinguir-se ruído de um sinal analítico varia entre laboratórios. Um critério comum é aceitar como limite de detecção (LOD) a concentração do analito que gera sinal três vezes maior do que o ruído do sistema (Lanças, 2009). Outro critério, recomendado pela EC/657/2002 (EC, 2002), é por meio de uma curva analítica. Neste caso, o material branco é fortificado com concentrações 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 LOD, sendo 2,33 o valor-z (teste hipótese utilizado em estatística descritiva) com nível de confiança de 95%.

3.3.4 - Limite de quantificação

O Limite de quantificação (LOQ) pode ser determinado por meio da análise de amostras com concentração do analito conhecida com nível aceitável de exatidão e precisão (ICH, 1995).

Na literatura existem várias formas de determinar o LOQ. De acordo com Lanças (2009), o LOQ pode ser definido em relação ao ruído empregando-se o branco como referência. Valores da ordem de $10s$, em que s é o desvio padrão do sinal gerado como resposta do branco podem ser aceitos.

O LOQ pode ser determinado ainda, segundo EC/657/2002 (EC, 2002), por meio de análise das amostras fortificadas com concentrações conhecidas do analito. Para a obtenção do LOQ plota-se a concentração adicionada contra o sinal obtido. A concentração correspondente ao LOD mais 1,64 vezes o desvio padrão do coeficiente linear da reta é igual ao LOQ, sendo 1,64 é o valor-z (teste hipótese utilizado em estatística descritiva) considerando um nível de confiança de 95%.

3.3.5 - Recuperação

Refere-se à medida da eficiência do processo de isolamento do analito de interesse da matriz em que se encontra presente. O estudo de recuperação consiste na fortificação da matriz, ou seja, na adição de soluções do padrão analítico de interesse com concentrações conhecidas, à matriz isenta do analito (Lanças, 2009).

3.3.6 - Precisão

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

De acordo com Lanças (2009), a precisão 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 ser estimada pelo desvio padrão ou pelo coeficiente de variação.

3.4 - OXIDAÇÃO QUÍMICA APLICADA À REMOÇÃO DE MICROCISTINAS

O processo de oxidação envolve a troca de elétrons entre espécies químicas com mudança do estado de oxidação das espécies envolvidas. Como uma espécie perde elétrons, e é oxidada, e outra ganha elétrons, e é reduzida, o processo é geralmente denominado de oxirredução.

De acordo com Weber Jr. (1972), o objetivo da oxidação no tratamento de água é converter espécies químicas indesejáveis em espécies não prejudiciais, ou seja, no tratamento de água, além da inativação de organismos, os desinfetantes, devido ao elevado poder de oxidação que os mesmos apresentam, também são usados com outros fins, destacando-se:

- Oxidar ferro e manganês;

- Prevenir o crescimento e manutenção da estabilidade biológica nos sistemas de reservação e distribuição de água;
- Remover sabor e odor;
- Melhorar a eficiência de coagulação e filtração;
- Prevenir o crescimento de algas em decantadores e filtros;
- Remover cor;
- Minimizar a formação de subprodutos da desinfecção dependendo do oxidante.

A desinfecção é um processo que usa um agente químico ou não e que tem por objetivo a inativação de microrganismos patogênicos presentes na água. Isto se torna possível por meio de alguns mecanismos tais como, destruição da estrutura celular, interferência no metabolismo com a inativação de enzimas e interferência na biossíntese e no crescimento celular. No caso dos agentes químicos, considera-se que a eficiência da desinfecção resulte da oxidação ou da ruptura da parede celular, com consequente desintegração das células, e difusão do agente para o interior da célula, o qual interfere na sua atividade (Di Bernardo e Dantas, 2005).

O modo de ação dos desinfetantes químicos pode resultar em efeito indesejado quando o agente oxidante é adicionado na água contendo cianobactérias, pois ao terem sua parede celular rompida (lise) esses organismos liberam as toxinas para água. Por outro lado, o poder oxidante dos desinfetantes pode ser benéfico quando as toxinas já se encontram dissolvidas na água. Ou seja, a pré-desinfecção de águas eutrofizadas pode se configurar em um problema, mas no caso da pós-desinfecção (pós-remoção das células nos processos de separação sólido-líquido na estação de tratamento de água), o efeito pode ser benéfico com relação à oxidação da toxina dissolvida.

As tecnologias de tratamento de água convencional baseadas nos processos de coagulação, floculação, sedimentação ou flotação e filtração, têm se mostrado eficientes na remoção de células de cianobactérias, mas são ineficazes para remover as microcistinas extracelulares (Himberg *et al.*, 1989; Chow *et al.*, 1999; Ho *et al* 2006; Ying *et al*, 2008). O processo de oxidação química pode então, complementando esse tratamento, se configurar como a barreira para a redução dos riscos à saúde associados à presença de cianotoxinas na água para consumo humano.

A remoção de microcistinas provenientes das cianobactérias tem sido objeto de estudo de inúmeras pesquisas (Brook *et al.* (2006); Rodriguez *et al.* (2007); Kuroda *et al.* (2007) entre outros), sendo várias as linhas de abordagem do problema. Os agentes oxidantes usados no tratamento de água para remoção dessas microcistinas incluem, dentre outros, cloro e cloraminas, dióxido de cloro, permanganato de potássio, ozônio. Nos últimos anos, o potencial utilização de Processos Oxidativos Avançados (POA) no tratamento de água também têm sido objeto de estudo.

Rodriguez *et al.* (2007) realizaram estudos comparativos em águas contendo 3,6 mg L⁻¹ de carbono orgânico dissolvido (COD) usando os oxidantes ozônio (0,25 mg L⁻¹), cloro, dióxido de cloro e permanganato de potássio (0,75 mg L⁻¹) adicionados à água contendo concentração de 1 mg L⁻¹ de MCYST-LR. Os experimentos foram realizados à temperatura de 20°C e em pH entre 6 e 8. Ao analisarem a oxidação das MCYST-LR, foi verificado que o ozônio é eficiente para remoção dessa cianotoxina. No entanto, o resultado do estudo sugere que o dióxido de cloro não seja um oxidante adequado para a remoção dessa cianotoxina no processo de tratamento de água. O ozônio e permanganato de potássio, de acordo com o estudo, são eficientes na redução MCYST-LR, já o cloro foi eficiente, em pH 8 e temperatura de 20°C, pois promoveu a quase completa remoção de MCYST-LR quando aplicada dose de 3 mg L⁻¹.

As reações dos oxidantes com as cianotoxinas são sempre marcadas pela competição com outros compostos orgânicos presentes na água. Como resultado, a ocorrência de matéria orgânica natural na água a ser tratada é um dos fatores importantes a serem considerados nesse processo. Segundo Laplanche *et al.* (1995), as demandas de ozônio, por exemplo, dependem dos parâmetros de qualidade da água, principalmente da presença de carbono orgânico dissolvido.

Contudo, de acordo com os pesquisadores Brook *et al.* (2006), a matéria orgânica perde significância no processo de oxidação se um residual de ozônio for mantido. Infere-se desse relato que ocorrerá maior demanda do oxidante na degradação das microcistinas, porém a eficiência será alcançada se mantido o residual do agente oxidante na água. Esse fato foi avaliado por Rositano *et al.* (2001), nos ensaios de bancada. Segundo esses autores um residual de 0,2 mg L⁻¹ de ozônio exposto ao tempo de contato de 5 minutos foi

eficiente na oxidação das MCYST-LR e LA. O estudo foi realizado usando uma concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$, para cada toxina dissolvida em água com diferentes características de qualidade da água de estudo (COD e alcalinidade) e valores de pH entre 7,4 e 7,5.

Em estudo realizado por Kuroda *et al.* (2007), foi avaliado o efeito da oxidação em águas contendo as cepas toxigênicas de *Microcystys ssp* e microcistinas, utilizando cloro, dióxido de cloro e permanganato de potássio como oxidantes. Os autores realizaram experimento com densidades de $1,4 \times 10^5$ células de *Microcystys ssp* mL^{-1} e concentração de microcistinas (MCYST) de $132 \mu\text{g L}^{-1}$. Nesse estudo foi observado que utilizando um tempo de contato de 30 minutos e doses de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de cloro, $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de dióxido de cloro e $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ de permanganato de potássio, eficiências de remoção de MCYST de 84, 34 e 13%, respectivamente, foram obtidas. Entretanto, para a mesma concentração de microcistinas (intracelular + extracelular) ao final do tempo de contato de 60 minutos usando doses de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cloro, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de dióxido de cloro e $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de permanganato de potássio, foram alcançadas eficiências de remoção de 97, 46 e 50%, respectivamente. Com este resultado, os autores concluíram que a cloração pode ser uma alternativa viável para a remoção de microcistinas em águas destinadas ao consumo humano.

A baixa eficiência alcançada por Kuroda *et al.* (2007) e Rodriguez *et al.* (2007) em seus experimentos utilizando o oxidante dióxido de cloro corroboram o resultado obtido no estudo realizado por Kull *et al.* (2004). Estes autores já haviam observado que o dióxido de cloro não era um oxidante eficiente para a remoção de microcistinas em águas naturais, pois este oxidante apresenta baixa reatividade com as microcistinas.

Já as cloraminas, muito embora possuam a vantagem de reduzir a formação de subprodutos, são oxidantes muito fracos. Nicholson *et al.* (1994) relataram, em seu estudo, que não foi observado qualquer efeito oxidante para *Microcystis aeruginosa* mesmo usando uma concentração de 20 mg L^{-1} de monoclорamina e o tempo de contato de cinco dias.

Vários oxidantes já foram testados no processo de oxidação de microcistinas. A Tabela 3.4 apresenta um resumo de alguns estudos que avaliaram a oxidação de microcistinas usando

diversos agentes físico-químicos. Contudo, o cloro é um dos agentes químicos oxidantes mais usados no processo de desinfecção nas estações de tratamento de águas no Brasil.

Tabela 3.4 - Processos de oxidação utilizados na remoção de microcistinas.

Processo de oxidação	Tipos de microcistinas	Referência
Ultravioleta (UV)	MCYST-LR e MCYST-RR	Tsuji <i>et al.</i> (1995)
Ozônio, Permanganato de Potássio, Peróxido de Hidrogênio	MCYST-LR	Lawton e Robertson (1999)
Fenton	MCYST-LR	Gajdek <i>et al.</i> (2001)
Ozônio	MCYST-LR e MCYST-LA	Rositano <i>et al.</i> (2001)
Ozônio	MCYST-LR	Höger <i>et al.</i> (2003)
Fenton e Foto-Fenton	MCYST-LR	Bandala <i>et al.</i> (2004)
Radiação ultravioleta e peróxido de Hidrogênio	MCYST-RR	Qiao <i>et al.</i> (2005)
Dióxido de Titânio	MCYST-LR	Yaun <i>et al.</i> (2006)
Irradiação ultrasônica	MCYST-LR	Hudder <i>et al.</i> (2007)
Cloro e Permanganato de Potássio	MCYST-LR e MCYST-RR	Rodriguez <i>et al.</i> (2008)
Ozônio	MCYST-LR e MCYST-RR	Miao e Tao (2008)
Foton-fenton, UVA, UVC, Peróxido de Hidrogênio	MCYST-LR	Freitas, A (2008)
Ozônio, Peróxido de Hidrogênio, fenton	MCYST-LR e MCYST-RR	Momani <i>et al.</i> (2008)
Ferrato (VI) de potássio	MCYST-LR	Luca <i>et al.</i> (2010)

As pesquisas têm demonstrado que o cloro é capaz de produzir efeitos letais a microrganismos. O cloro nas suas formas ativas HOCl e ClO⁻ danifica a parede celular dos microrganismos promovendo a lise da célula. De acordo com a USEPA (1999), a eficiência do cloro, tanto como desinfetante como oxidante, depende de vários fatores, tais como: a temperatura, o pH, as condições de mistura, a turbidez, o tempo de contato, a presença de substâncias interferentes e a concentração do cloro disponível.

A distribuição das espécies entre HOCl e ClO⁻ é determinada pelo pH da água. Em valores de pH mais baixo a espécie dominante é o ácido hipocloroso e, conseqüentemente, maior será a eficiência da oxidação. No entanto, em valores de pH mais elevado, maior será a concentração do íon hipoclorito o que causa uma redução na eficiência. Estudos têm demonstrado que quando a espécie dominante é ClO⁻ se requer maior tempo de contato para alcançar a mesma eficiência no processo de oxidação, devido ao seu menor potencial de oxidação (Nicholson *et al.*, 1994; Acero *et al.*, 2005).

Nicholson *et al.* (1994) avaliaram a eficiência dos oxidantes hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio e cloro aquoso em pH 3, 4, 7, 8, 9 e 10 e concentrações de microcistinas dissolvidas em água destilada entre 130-300 µg L⁻¹. Em valores de pH abaixo de 8, foram observadas remoções de microcistinas acima de 95% quando aplicadas doses de 15 mg L⁻¹ dos três oxidantes (hipoclorito de cálcio, cloro aquoso e hipoclorito de sódio) no tempo de contato de 30 minutos. Os pesquisadores observaram menor degradação das toxinas para valores de pH acima de 8.

Hart *et al.* (1998) realizaram estudos para simular o efeito da cloração no final do tratamento de água na remoção de MCYST-LR. Os autores usaram concentração de 6,9 µg L⁻¹ de MCYST-LR e dose de 1,7 mg L⁻¹ de hipoclorito de sódio. Para o valor de pH igual a 5, a remoção alcançada foi maior que 93% no tempo de contato de 30 minutos. Nessas condições o cloro residual livre foi de 0,7 mg L⁻¹. Em valor de pH 7 e a mesma dosagem de cloro, nenhuma remoção significativa foi alcançada após 30 minutos, verificando-se somente após 22h de tempo de contato uma remoção de microcistina próxima de 90%. Para um valor de pH 9, a redução da concentração de MCYST-LR foi baixa mesmo após 22h de contato. Mais uma vez os resultados demonstraram que a eficiência no processo de oxidação com o composto hipoclorito de sódio é fortemente dependente do pH.

Pegorer (2006) *apud* Di Bernardo *et al.* (2007) também estudou a oxidação das microcistinas. Os ensaios foram realizados com concentração inicial de 100 µg L⁻¹ de microcistinas inoculadas em água desionizada à temperatura de 20°C e valor de pH próximo à neutralidade. Os resultados do estudo mostraram uma remoção de 79% após 30 minutos de tempo de contato usando uma dosagem de 1,6 mg L⁻¹ de cloro. Aumentando a dosagem de cloro para 3 mg L⁻¹, decorridos 30 minutos de tempo de contato a remoção atingida foi de 95%. Com a aplicação da dose de 5 mg L⁻¹ de cloro nos 10 primeiros

minutos foi alcançada uma remoção de aproximadamente 94% e ao final dos 30 minutos de contato atingiu 96% de remoção de microcistinas. Sendo assim, foi constatado que a eficiência de remoção aumentou com um incremento da concentração de cloro empregada, porém, na maior parte dos casos, esse aumento não foi diretamente proporcional à dosagem.

Outro estudo referente à oxidação usando cloro como oxidante foi realizado por Lawton e Robertson (1999). Os pesquisadores aplicaram dose de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de cloro, proveniente da solução de hipoclorito de sódio, em água pura inoculada com cerca de 130 a $300 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de MCYST-LR. Os ensios foram realizados em valor de pH 7. Os resultados mostraram, após 30 minutos de tempo de contato, eficiência máxima de remoção de MCYST-LR de 70-80% no processo de oxidação.

A temperatura é outro parâmetro que também exerce influência no processo de oxidação de microcistna. Acero *et al.* (2008) ao avaliarem concentrações de 3 mg L^{-1} de cloro livre e pH 7,3 observaram que o tempo necessário para reduzir a concentração inicial de $5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de MCYST-LR para valor abaixo de $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ diminuiu de 40 para 20 minutos quando a temperatura foi elevada de 10 para 25°C . Entretanto, o aumento da temperatura provocou um decaimento mais rápido na concentração do cloro livre, e consequentemente, a relação CT, (concentração vezes tempo de contato) tornou-se menor. Os resultados demonstraram que a redução da concentração das toxinas MCYST-LR é proporcional a CT do cloro.

As demandas do oxidante, incluindo cloro, variam em função de outros parâmetros de qualidade da água. A matéria orgânica natural (MON) é um exemplo, pois quando presente na água a ser tratada demanda uma maior quantidade do oxidante, aumentando, dessa forma, a relação CT. Assim como a concentração, as características da MON contendo, por exemplo, proporções significativas de moléculas com estruturas aromáticas ativadas, favorecem maior demanda de cloro, uma vez que essas moléculas são mais suscetíveis ao ataque pelo cloro (Reckhow *et al.*, 1990).

Acero *et al.* (2008) avaliaram o efeito da oxidação da MCYST-LR com hipoclorito de sódio, usando dois tipos de águas contendo parâmetros de qualidades diferentes, COD, bicarbonato, amônia e bromo. As condições eram similares para os dois experimentos, sendo as concentrações iniciais de MCYST-LR de $5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, valor de pH 7,3 e o tempo de

contato de 30 minutos. Para reduzir a concentração de MCYST-LR a valores inferior a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ foi necessário uma dose de 3 mg L^{-1} de cloro livre para a água contendo maiores quantidades de matéria orgânica e inorgânica e 2 mg L^{-1} para a amostra com menores quantidades, indicando, dessa forma, a influência dessas substâncias no processo de oxidação das toxinas.

Freitas (2007) realizou estudo, em escala de bancada, de oxidação de microcistina proveniente da lise das células tóxica de *Microcystis aeruginosa* – cepa NPLJ-4 com solução de hipoclorito de sódio. Os ensaios foram realizados usando microcistinas dissolvidas, após filtração em membrana de éster de celulose com retenção de $0,45\mu\text{m}$, sob condições de temperatura entre 22 e 25 °C e valor de pH da água de estudo, antes da adição do cloro, entre 4,8 e 5,1. Ao aplicar a dose de cloro de 11mg L^{-1} na solução de microcistinas diluídas em água desionizada contendo $81 \mu\text{g L}^{-1}$ foi observado remoção de 97 % ao final de 30 minutos de tempo de contato. De acordo com relatos da autora a elevada dose de cloro usada no ensaio realizado com água de estudo contendo material da lise diluído em água deionizada revela a influência, no processo de remoção de microcistinas, desses compostos oriundos da lise das células.

Os tipos de análogos de microcistinas presentes na amostra a ser oxidada também podem influenciar no resultado da oxidação. Com o intuito de avaliar esta influência, Ho *et al.* (2006) avaliaram o comportamento de quatro tipos de análogos de microcistinas purificadas (MCYST-LA, MCYST-LR, MCYST-RR, MCYST-YR) em dois tipos de água tratadas submetidas ao processo de oxidação com o uso de cloro. Em seus estudos usando a mesma concentração, $20 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada toxina, e um valor para CT de 25 mg min L^{-1} , foi obtida uma concentração residual de microcistinas abaixo do limite estabelecido pela Organização Mundial de Saúde. Os autores ainda constataram que a combinação dos fatores pH e estrutura molecular das microcistinas são muito importantes no processo de cloração, sendo que cada variante apresenta reatividade diferente, MCYST-YR>MCYST-RR>MCYST-LR>MCYST-LA, ou seja, a facilidade com que as microcistinas são oxidadas depende dos grupos de aminoácidos presentes na estrutura molecular da toxina.

Ainda segundo Ho e colaboradores (2006), as microcistinas têm diferentes grupos aminos em sua estrutura que podem influenciar na reatividade. Enquanto que os grupos leucina e alanina são considerados relativamente não reativos com o cloro, pois são essencialmente

grupos alquílicos, os grupos arginina e tirosina têm maior reatividade com o cloro. Os autores sugerem que MCYST-YR foi mais suscetível à oxidação pelo cloro porque contém em sua estrutura anéis aromáticos ativados, além do grupo arginina. Por isso, a importância de se conhecer os análogos de microcistinas presentes na água a ser analisada, pois cada análogo pode ser oxidado em graus diferentes, dependendo da estrutura molecular, assim como o valor de pH da água.

A cinética da reação de microcistinas com cloro foi estudada por Acero *et al.* (2005) usando diferentes concentrações de MCYST-LR purificadas diluídas em água Mili-Q e diferentes doses de hipoclorito de sódio. Os estudos foram realizados à temperatura de 20°C e valor de pH 7,2. Nessas condições a oxidação da MCYST-LR pelo o cloro seguiu uma reação cinética de *pseudo*-primeira ordem, pois a constante de velocidade de reação da MCYST-LR aumentou com o aumento da dose de cloro aplicada, ou seja, existe uma proporcionalidade direta entre a taxa da reação de oxidação e a concentração da microcistina.

Com base nesse estudo, mantendo a concentração do cloro em excesso, pode-se considerar que a cinética de oxidação do cloro com as microcistinas pode ser escrita da seguinte forma (Equação 3.2):

$$\frac{d[MCYST]}{dt} = -k[MCYST]^a \cdot [Cl]^b \quad \text{Equação (3.2)}$$

Na qual:

k = constante de velocidade;

[MCYST] = concentração de microcistinas ($\mu\text{g L}^{-1}$);

[Cl] = concentração de cloro (mg L^{-1});

a = ordem da reação para microcistinas;

b = ordem da reação para o cloro;

t = tempo de reação (min).

Se b = 0, considerando a concentração do cloro em constante durante o tempo de reação, a equação 3.2 pode ser escrita como;

$$\frac{d[MCYST]}{dt} = k'[MCYST] \quad \text{Equação (3.3)}$$

Na qual:

k' = constante de velocidade para cinética de *pseudo*-primeira ordem (min^{-1}).

Ying *et al.* (2008) também realizaram estudos cinéticos com microcistinas e dióxido de cloro. A MCYST-RR, concentração inicial de $100 \mu\text{g L}^{-1}$, foi oxidada com diferentes doses de cloro, 8mg L^{-1} , 10mg L^{-1} , 15mg L^{-1} e 20mg L^{-1} , à temperatura de 10°C e pH 6,48. Os resultados indicaram uma cinética de *pseudo*-primeira ordem cujo coeficiente de regressão foi superior a 0,99. Os autores observaram que a constante de taxa de oxidação das microcistinas pelo cloro aumentava com o aumento das doses do cloro aplicadas, mas o tempo de meia vida diminuía, ou seja, a relação CT (concentração *vezes* tempo) era otimizada.

A Tabela 3.5 apresenta um resumo dos trabalhos científicos referentes à aplicação do hipoclorito de sódio no processo de oxidação de microcistinas, assim como as condições de realização desses ensaios e os resultados obtidos. Os resultados apresentados, para o mesmo tempo de contato, mostram que a eficiência da oxidação com o cloro é dependente tanto do pH quanto da matéria orgânica presente na água, pois nota-se que para os estudos realizados com microcistinas não purificadas doses mais elevadas de cloro foram necessárias para alcançar maiores remoções.

Observa-se ainda na Tabela 3.5, nos estudos realizados, que as maiores remoções de microcistinas foram alcançadas quando doses de cloro mais elevadas foram aplicadas ou quando ocorreu maior tempo de contato entre as microcistinas e o cloro.

Tabela 3.5 - Resumo de trabalhos científicos relativos à oxidação de microcistinas com hipoclorito de sódio.

Referência	MCYST	Diluição	Conc. inicial ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Dosagem de cloro (mg L^{-1})	pH	Tempo de contato (min)	Resultado
Nicholson <i>et al.</i> (1994)	Extrato centrifugado	Água destilada	130 - 300	1	< 8	30	40% remoção
				5			80% remoção
Hart <i>et al.</i> (1998)	MCYST-LR dissolvidas	Água após tratamento	6,9	1,7	5	30	93% remoção
					7		Insignificante
Lawton e Robertson (1999)	MCYST-LR purificada	Água pura	130 -300	5	7	30	70-80% remoção
Pegorer (2006) <i>apud</i> Di Bernardo <i>et al.</i> (2007)	Microcistinas	Água desionizada	100	1,6	7	30	79% remoção
				3		30	95% remoção
				5		10	94% remoção
						30	96% remoção
Freitas (2007)	Microcistinas não purificadas	Água desionizada	81	11	4,8-5,1	30	97% remoção
Acero <i>et al.</i> (2008)	MCYST-LR purificada	Água superficial	5	3	7,3	30	Remoção < $1\mu\text{g L}^{-1}$
		Água superficial		2			

3.4.1 - Produtos da oxidação com cloro

Apesar de os desinfetantes reduzirem os riscos da população em contrair doenças por meio da veiculação hídrica, um efeito adverso na desinfecção com agentes químicos está relacionado com a possibilidade de esses desinfetantes levarem à formação de subprodutos.

Os subprodutos são formados quando o oxidante reage com os compostos orgânicos e inorgânicos presentes na água. A efetividade de um processo de oxidação depende não somente da capacidade do oxidante de degradar os micropoluentes nas reais condições operacionais no tratamento de água, mas também em reduzir a toxicidade, ou seja, os produtos da oxidação não devem ser tóxicos.

Lykins (1994) observou que a oxidação realizada com cloro livre, na presença de matéria orgânica natural e brometos, resulta na reação de formação de trihalometanos (THMs) assim como outros subprodutos da desinfecção. Os principais subprodutos que podem ser formados durante o processo de oxidação quando adicionados agentes oxidantes químicos à água estão listados na Tabela 3.6.

Vários oxidantes reagem com a matéria orgânica natural e formam diferentes subprodutos. Enquanto que o cloro, predominantemente, produz compostos orgânicos halogenados, o ozônio produz aldeídos, cetonas e subprodutos inorgânicos. O dióxido de cloro produz clorato e clorito, enquanto que ozônio produz bromato quando usado na presença de bromo. O tipo e as quantidades de subprodutos formados durante o tratamento de água dependem não só do tipo e dosagem do produto usado, mas também da qualidade da água, da seqüência do processo e de fatores ambientais tais como temperatura, pH, tempo de contato e matéria orgânica (USEPA, 1999).

De acordo com Singer (1994), embora os estudos considerem as substâncias húmicas como principais precursoras da formação de subprodutos halogenados, pesquisas realizadas mostraram que as algas/microalgas, de um modo geral, e as cianobactérias e suas toxinas podem contribuir para formação de subprodutos, particularmente trihalometanos e os ácidos haloacéticos.

Tabela 3.6 - Principais subprodutos formados no processo de oxidação pela adição de agentes oxidantes/desinfetantes à água (Lykins, 1994; Paschoalato *et al.*, 2008).

Classe de Subprodutos	Subproduto	Fórmula química
Trihalometanos (THMs)	Clorofórmio	CHCl ₃
	Bromodiclorometano	CHBrCl ₂
	Dibromoclorometano	CHBr ₂ Cl
	Bromofórmio	CHBr ₃
Ácidos Haloacéticos (AHAs)	Ácido monocloroacético	CH ₂ ClCOOH
	Ácido dicloroacético	CHCl ₂ COOH
	Ácido tricloroacético	CCl ₃ COOH
	Ácido monobromoacético	CH ₂ BrCOOH
	Ácido dibromocloroacético	CHBr ₂ COOH
	Ácido tribromoacético	CBr ₃ COOH
	Ácido bromocloroacético	CHBrClCOOH
	Ácido bromodicloroacético	CBrCl ₂ COOH
Haloacetoneitrilas (HANs)	Ácido dibromocloroacético	CBr ₂ ClCOOH
	Dicloroacetoneitrila	CHCl ₂ C=N
	Tricloroacetoneitrila	CCl ₃ C=N
	Dibromoacetoneitrila	CHBr ₂ C=N
	Tribromoacetoneitrila	CBr ₃ C=N
Haloacetoneitrilas (HANs)	Bromocloroacetoneitrila	CHBrClC=N
	Cloreto cianogênico	ClC=N
Haloacetoneitrilas (HANs)	Brometo cianogênico	BrC=N
	Halopicrinas (HPs)	Cloropicrina
Bromopicrina		CBr ₃ NO ₂
Haloacetoneitrilas (HANs)	1,1-Dicloroacetona	CHCl ₂ COCH ₃
	1,1,1-Tricloroacetona	CCl ₃ COCH ₃
Halofenóis (HFs)	2-clorofenol	C ₆ H ₅ ClO
	2,4-diclorofenol	C ₆ H ₄ Cl ₂ O
	2,4,6-triclorofenol	C ₆ H ₃ Cl ₃ O
Haloaldeídos (HADs)	Dicloroacetaldeído	CHCl ₂ CHO
	Tricloroacetaldeído	CCl ₃ CHO

A formação desses subprodutos halogenados decorrente da oxidação de cianobactérias com cloro foi avaliada por Kuroda (2006). Diferentes concentrações de células de *Microcystis* foram submetidas à oxidação com hipoclorito de cálcio a pH 7,1 e à temperatura de 25°C no período de 3 a 7 dias. A primeira água de estudo, contendo $1,4 \times 10^6$ cel mL⁻¹, e a segunda, com $5,5 \times 10^6$ cel mL⁻¹, foram diluídas em água filtrada oriunda da estação de tratamento de água de São Carlos, SP. As doses de cloro aplicadas variaram de 10 mg L⁻¹ a 20 mg L⁻¹ para a primeira água de estudo e de 50 mg L⁻¹ a 75 mg L⁻¹ para a segunda água de estudo. Os resultados obtidos mostraram que a capacidade de formação de trihalometanos para a água de estudo de menor densidade de células foi menor que 1 µg L⁻¹ em 3 dias e de 31 µg L⁻¹ em 7 dias, e para a segunda água de estudo, de maior densidade de células, foi de 129 µg L⁻¹ em 3 dias e de 183 µg L⁻¹ em 7 dias. Esses valores indicam a existência de uma relação forte entre a densidade de *Microcystis* ssp. e a capacidade máxima de formação de THMs.

Em 2003, Senogles-Derham e colaboradores avaliaram a formação de trihalometanos (THMs) e ácidos haloacéticos (AHAs), provenientes da oxidação de microcistinas com cloro. O experimento foi realizado, sob condições de pH 6,0, aplicando a dose de cloro de 0,6 mg L⁻¹ e 60 µg L⁻¹ microcistinas purificadas diluídas em água Mili-Q. Após 90 dias de tempo de contato, não foi observada a presença de ácidos haloacéticos. Entretanto foi detectada uma concentração de 5 µg L⁻¹ de trihalometanos. O resultado do THM obtido, após oxidação da microcistina com o cloro, foi menor que o valor recomendado pela Organização Mundial de Saúde para água potável, que é de 0,1 mg L⁻¹ para trihalometano total (WHO, 2008).

Os produtos provenientes da cloração de águas contendo a variante de microcistinas, MCYST-LR, foram avaliados por Tsuji *et al.* (1997). O dihidroxi-microcistina foi o primeiro subproduto proveniente da cloração de microcistinas purificadas a ser identificado. Os autores avaliaram, em escala de bancada, os efeitos da cloração na decomposição das MCYST-LR e MCYST-RR diluídas em água destilada. O resultado obtido sugere que o subproduto foi formado pela ação do cloro livre nas ligações insaturadas do grupo Adda das microcistinas, como apresentado a Figura 3.5.

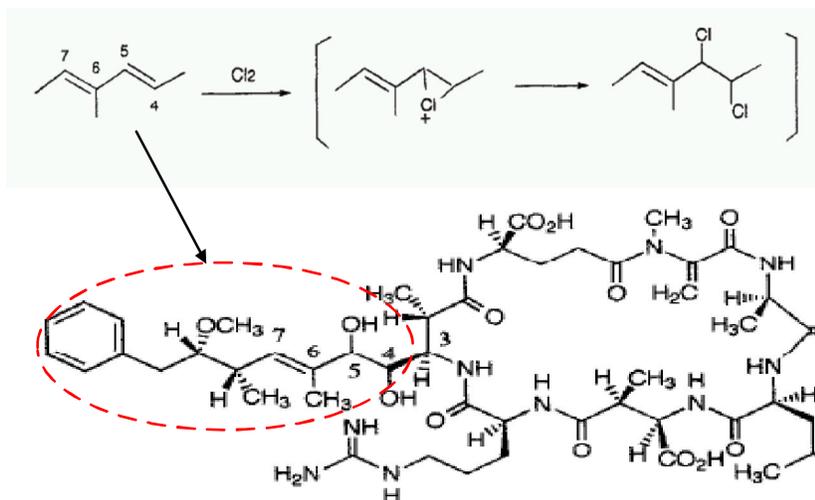


Figura 3.5 - Mecanismo da formação de subproduto dihidroxi-microcistina-LR, modificada a partir de Tsuji *et al.*, 1997.

Ainda segundo Tsuji *et al.* (1997), os produtos da oxidação das microcistinas foram examinados por CLAE após a cloração de 100 µg de MCYST-LR diluída em 10 mL de água destilada usando dosagem de 1,92 mg L⁻¹ de cloro livre proveniente do hipoclorito de sódio. O valor de pH, segundo os autores, era mantido abaixo de 7,2. Ao final de três horas de tempo de contato a MCYST-LR foi degradada e novos picos surgiram, no cromatograma, com o tempo de retenção de 10 minutos, que foram mais sensivelmente detectados a 210 nm do que 238 nm. A reação foi continuada por 24 horas até a completa decomposição das toxinas. Para caracterizar estruturalmente os produtos formados, somente um pico do cromatograma foi isolado e analisado pela técnica espectrometria de massas. Nesta análise os autores identificaram o composto formado, como produto da oxidação da microcistina com o cloro, o dihidroxi-microcistina.

No entanto, Lawton e Robertson, (1999) defendem que, o mecanismo mais plausível é que o cloro dissolveu-se em água formando o ácido hipocloroso e que ao protonar-se, reagiu com as ligações insaturadas da MCYST-LR para então formar cloridrina. O halogênio na cloridrina pode ter reagido com água para formar a dihidroxi-microcistina como demonstrado na Figura 3.6.

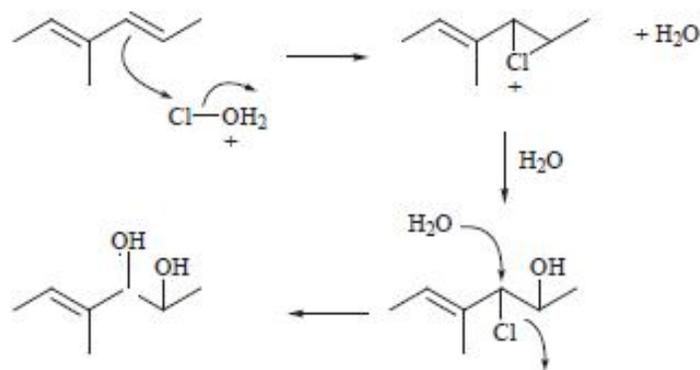


Figura 3.6 - Decomposição da MCYST- LR via cloração, modificada a partir de Lawton e Robertson, 1999.

Em estudos, recentes, em escala de laboratório, utilizando cloro na forma de ácido hipocloroso, Merel *et al.* (2009) identificaram quatro novos subprodutos provenientes da oxidação da MCYST-LR bem como seus isômeros. São eles: monoclora-microcistina, monoclora-dihidroxi-microcistina, dicloro-dihidroxi-microcistina e tricloro-hidroxi-microcistina. Os ensaios foram realizados usando água pura fortificada com 20 mg L⁻¹ de MCYST-LR a 20°C e a pH 7. A dosagem de cloro foi realizada de forma que a fração molar inicial cloro/toxina era equivalente a 20, ou seja, para cada mol de toxina adicionava 20 moles de cloro. Ao final de 60 minutos de tempo de contato mais de 99% das MCYST-LR foram transformadas.

A toxicidade dos produtos da reação da MCYST-LR purificada com o cloro foi investigada por Tsuji *et al.* (1997). Os produtos da oxidação, removido o residual de MCYST-LR, não mostraram, nos bioensaios realizados por injeções intraperitoneais (i.p) em camundogos, hepatotoxicidade para 1mg Kg⁻¹ e 3mg Kg⁻¹.

Nessa mesma linha de pesquisa, Rodriguez *et al.* (2008) avaliaram a toxicidade dos produtos formados na oxidação de MCYST-LR e MCYST-RR purificadas com cloro por meio da análise da proteína fosfatase PP1A. Os experimentos foram conduzidos em água mili-Q, temperatura de 20°C, a pH 7,1 e tempo de contato de 30 minutos. As concentrações iniciais de MCYST-LR e MCYST-RR e cloro foram 244,2 mg L⁻¹, 193,2 mg L⁻¹ e 34,1mg L⁻¹, respectivamente. Não foi observada inibição da proteína fosfatase PP1 nos resultados obtidos da análise realizada por meio de CLAE, dos produtos da oxidação. De acordo com os pesquisadores pode ser concluído que os produtos formados na cloração de MCYST-LR

e MCYST-RR, nessas condições de ensaios, não apresentam toxicidade com referência à inibição da PP1.

Embora Senogles-Derham *et al.* (2003) não tenham observado em seus estudos referentes aos produtos da oxidação do cloro com microcistinas em água pura, aumento da incidência de câncer em camundongo geneticamente predisposto a efeito carcinogênico, estudos epidemiológicos realizados por Tokmak *et al.* (2004) e Gopal *et al.* (2007) têm sugerido que o desenvolvimento de câncer em humanos pode estar potencialmente associado com subprodutos halogenados oriundos do processo de cloração da água.

Com base nas informações levantadas na revisão bibliográfica, foi desenvolvida uma metodologia para validar o método para determinação de MCYST-LR e também a caracterização das microcistinas produzidas pela linhagem NPLJ-4. Foi desenvolvida ainda a metodologia para estudar a oxidação de microcistinas pelo cloro, como uma opção para remoção de microcistinas, ainda que em elevadas concentrações, no processo de tratamento de água, observando as reações cinéticas em diferentes doses de cloro e tempo de contato. A descrição da metodologia utilizada neste trabalho é apresentada a seguir, no item 4.

4 - METODOLOGIA

Neste capítulo é apresentada a metodologia utilizada para o desenvolvimento experimental para a obtenção das microcistinas usadas neste estudo, a caracterização dessas toxinas, o desenvolvimento e validação do método analítico para identificar e quantificar MCYST-LR em água, assim como a realização dos ensaios da oxidação química para a remoção de microcistinas na água.

Este trabalho, de caráter experimental, foi desenvolvido no Laboratório de Análise de Água (LAA) do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da Universidade de Brasília. Para realização deste estudo foi usado hipoclorito de sódio como agente oxidante e água de estudo (AE) contendo microcistinas, em água Mili-Q, produzidas a partir de cultivos *Microcystis aeruginosa* (cepa NPLJ-4). Para o desenvolvimento do método usou-se solução do padrão MCYST-LR.

O trabalho experimental foi dividido em quatro etapas que estão resumidas na Tabela 4.1. Na etapa preliminar, foram realizadas atividades preparatórias para obter as microcistinas e a solução do oxidante, fundamental para o desenvolvimento do trabalho. Na etapa 1 desenvolveu-se o método de determinação de MCYST-LR. Na etapa 2, foi realizada a caracterização das microcistinas produzidas pela linhagem NPLJ-4 e finalmente, na etapa 3, foram efetuados os ensaios de oxidação, assim como a avaliação da cinética de oxidação das microcistinas pelo cloro.

4.1- Etapas experimentais das atividades realizadas.

Etapas	Atividades
Etapa preliminar	Cultivo, Extração e semipurificação das microcistinas e produção da solução do oxidante, hipoclorito de sódio
Etapa 1	Validação do método para identificação e detecção de microcistinas-LR
Etapa 2	Caracterização das microcistinas produzidas pela linhagem NPLJ-4 de <i>Microcystis aeruginosa</i>
Etapa 3	Oxidação – avaliação das faixas de dosagem do oxidante, dos tempos de contato e da cinética de reação de oxidação das microcistinas pelo cloro

O desenvolvimento e validação do método para determinação de MCYST-LR em água foi realizado por meio da técnica de espectrometria de massas sequencial. A caracterização das microcistinas produzidas pela linhagem NPLJ-4 de *Microcystis aeruginosa* foi realizada utilizando as técnicas CLAE-DAD e espectrometria de massas.

4.1 - ETAPA PRELIMINAR

Esta etapa envolveu as atividades do cultivo, extração e semipurificação de cianotoxinas produzidas pela linhagem de *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4 cultivadas para o desenvolvimento do estudo e também, a produção do oxidante, hipoclorito de sódio.

4.1.1 - Cultivo, extração e semipurificação das microcistinas

O cultivo das *Microcystis aeruginosa* foi unialgal, em meio de cultura ASM-1 realizado na sala de cultivo instalada no Laboratório de Análise de Água – LAA. Nessa sala, o ambiente é mantido sob condições assépticas, com temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 1$, intensidade luminosa controlada (cerca de $40 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$) e foto-período de 12 horas (12:12 h). O crescimento e o aspecto das células foram monitorados por meio de observações periódicas, utilizando-se microscópio óptico.

Com a finalidade de aumentar o volume do cultivo, eram realizadas repicagens dos cultivos a cada 15 dias, período necessário para alcançar a fase de crescimento exponencial das células. A proporção utilizada no processo de repicagem era de uma parte do cultivo de célula na fase exponencial para nove partes do meio de cultivo novo. Na Figura 4.1 é apresentado o cultivo de *Microcystis aeruginosa* realizado no Laboratório de Análise de Água – LAA.



Figura 4.1 – Cultivo de *Microcystis aeruginosa*

Para obtenção das toxinas, as células cultivadas de *Microcystis aeruginosa* eram submetidas ao processo de gelo/degelo, com repetições consecutivas, e em seguida submetidas a banho de ultra-som (Nicholson e Burch, 2001). Esse procedimento promove o rompimento da membrana celular (lise) e, conseqüentemente, a liberação de toxina e de outros compostos intracelulares para o meio líquido. Essa suspensão, com o material lisado, foi mantida fora do alcance de luz, sob congelamento a -20°C , até o momento da etapa de semipurificação e concentração.

Os compostos intracelulares provenientes da lise das células das cianobactérias são considerados ricos em proteínas e outros compostos que podem interferir nas análises, e nos processos de oxidação e, portanto, foi necessária a realização de semipurificação do material lisado.

Para os procedimentos de extração, semipurificação e concentração foram consultadas diferentes metodologias (Harada *et al.*, 1988; Meriluoto, 1997; Lawton *et al.*, 1994). Foi adotado, que é o principal método que é preconizado pela *International Organization for Standardization* o método ISO 20179:2005 (ISO, 2005) com modificações no que se refere ao volume da amostra do cultivo lisado e filtrado, pois neste trabalho utilizou-se um cultivo com elevada concentração de biomassa.

Previamente ao processo de semipurificação/concentração, o material lisado era submetido à filtração em membrana de microfibras de vidro com tamanho de poros de retenção de partículas de aproximadamente $1\ \mu\text{m}$, e em seguida em membrana de éster de celulose com

retenção de partículas de 0,45 μm , com o objetivo de remover os fragmentos das células lisadas. Na Figura 4.2 pode-se observar o material filtrado contendo as toxinas dissolvidas e as membranas de 1 μm e 0,45 μm , respectivamente, após terem sido utilizadas no processo de filtração para a obtenção de uma solução contendo o material lisado dissolvido.

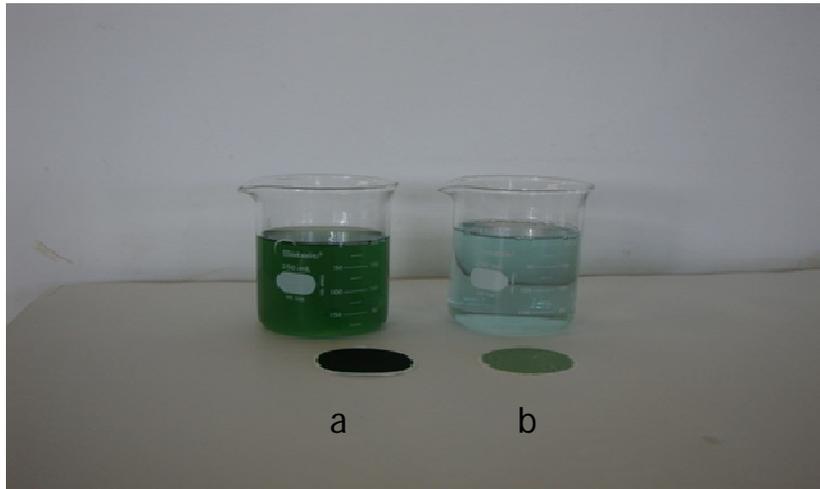


Figura 4.2 - Material lisado dissolvido após processo de filtração em membrana com retenção de 1 μm (a) e 0,45 μm (b).

A semipurificação e concentração de toxinas podem ser realizadas utilizando a extração em fase sólida. A amostra é passada através de um cartucho de extração C_{18} (octadecil-silano-ODS) contendo um material adsorvente que retém as toxinas de interesse. As toxinas adsorvidas são então eluídas do material adsorvente usando solventes, como por exemplo, metanol (Nicholson e Burch, 2001). Posteriormente o volume de amostra eluído pode ser reduzido por meio de evaporação do solvente resultando em um extrato concentrado de toxinas da amostra original.

No presente trabalho a semipurificação/concentração da solução do material lisado obtido, após a filtração, foi realizada utilizando cartucho de extração em fase sólida C_{18} . A Figura 4.3 ilustra o equipamento, manifolde com os cartuchos C_{18} , utilizado no processo de semipurificação de microcistinas.

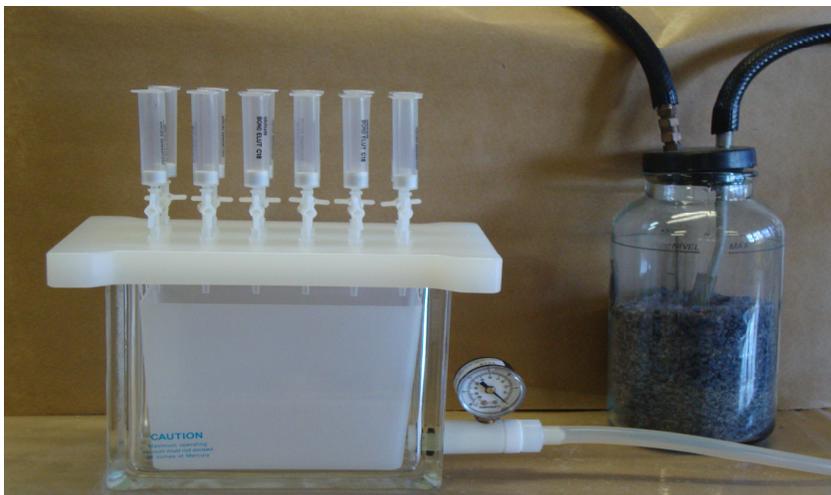


Figura 4.3 - Manifold e os cartuchos C_{18} utilizados para semipurificação de microcistinas.

Basicamente, o procedimento de semipurificação/concentração das microcistinas consistia de fazer fluir através da fase sólida, 50 mL de material lisado e filtrado. Posteriormente, o cartucho foi lavado com 4 mL de solução de metanol 20% (v/v) e para eluir as microcistinas adsorvidas à fase sólida, o cartucho foi alimentado com 2 mL da solução de metanol 90% (v/v) acidificada com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA).

Para o sucesso do processo de adsorção das microcistinas à fase sólida C_{18} dois cuidados eram necessários: a ativação da fase sólida (alimentação com 4 mL de metanol e 4 mL de água desionizada) e a correção do pH da solução de material lisado para valor 7, usando-se ácido trifluoroacético.

O volume de 50 mL do material lisado e filtrado utilizado na metodologia descrita foi definido a partir da realização de testes preliminares com volumes de 25, 50, 75, 100, 150 e 200 mL. Para seleção do volume se considerou o maior volume com maior recuperação das microcistinas. Volumes superiores a 50 mL resultaram em baixa recuperação do material originalmente presente na amostra do material lisado.

A fração eluída, cerca de 2 mL, era então evaporada à temperatura de 40 °C em um rotavapor (Buchi Waterbath B-480) e ressuspensa em 2 mL de água ultra pura (Mili-Q). Essa fração foi mantida à temperatura de -20°C até uso do extrato. O fluxograma geral dos procedimentos de extração, semipurificação e concentração das cianotoxinas está apresentado na Figura 4.4.

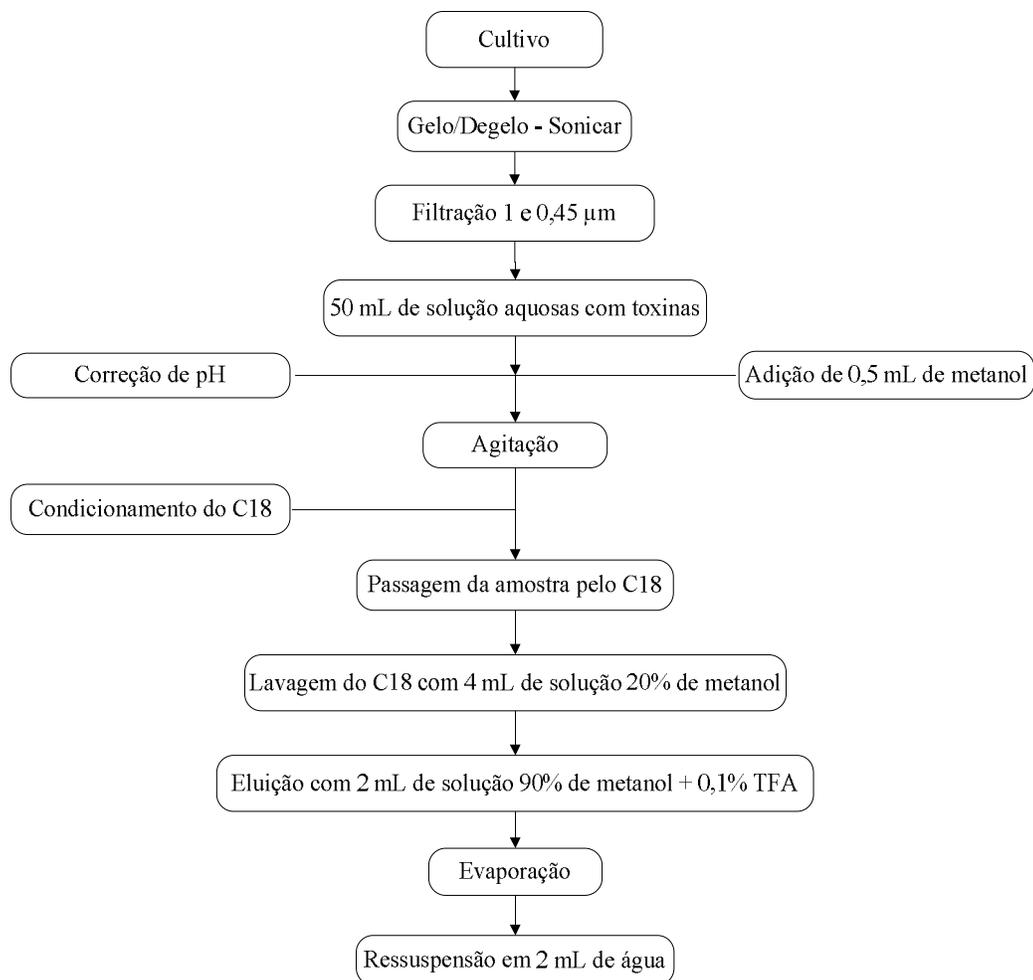


Figura 4.4 - Fluxograma de extração e semipurificação/concentração de microcistinas.

Após os procedimentos de semipurificação/concentração o volume do extrato concentrado de toxinas obtido foi homogeneizado. Foi retirada uma alíquota do extrato e realizada a análise, por meio do teste ELISA, para verificação da concentração das toxinas presentes.

4.1.2 - Produção do hipoclorito de sódio

A solução oxidante, hipoclorito de sódio, utilizada nos ensaios de oxidação das microcistinas foi produzida em um gerador de solução oxidante, que forneceu uma solução de hipoclorito de sódio, em uma concentração cerca de 1.250 mg L^{-1} de cloro, a partir da eletrólise do cloreto de sódio. Para a produção desta solução utilizou-se cloreto de sódio grau analítico e água destilada. A. Na Figura 4.5 é mostrado o gerador utilizado na produção do cloro usado nos ensaios.



Figura 4.5 –Gerador de cloro

4.2 - ETAPA 1- Validação do método para quantificação de MCYST-LR

Nesta etapa apresenta-se a metodologia adotada para implementação do método de detecção e quantificação de MCYST-LR utilizando a espectrometria de massas sequencial, iniciando pela otimização dos parâmetros e das condições cromatográficas para validação do método. Apresenta-se ainda a metodologia de análise que permite a identificação das variantes de microcistinas oriundas da linhagem NPLJ-4 de *Microcystis aeruginosa*.

O desenvolvimento do método para análises de MCYST-LR foi realizado utilizando a CLAE-EM/EM. Esse sistema é composto de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), Agilent 1200 (Agilent Technologies, CA), equipado com bomba quaternária e degaseificador, acoplado a espectrômetro de massas triplo quadrupolar API 3200, Applied Biosystems/MDS Sciex (Sciex, Toronto, CA). A fonte de ionização Turbo VTM foi operada no modo de ionização eletronebulização (do inglês, “*electrospray*” - ESI), e utilizando para tratamento de dados o Software *Analyst* versão 1.4.2 (Applied Biosystems, CA).

Para desenvolvimento do método utilizou-se uma solução padrão de MCYST-LR adquirida da Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH – CA com concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e pureza declarada superior a 95%. Utilizou-se também coluna cromatográfica C_{18} , em fase reversa, Zorbax Eclipse XDB- C_{18} com dimensões de 4,6 x 150 mm, 5 μm .

Nesse sistema, os compostos, após serem separados na coluna cromatográfica, eram expostos ao processo de eletronebulização que se decompõem formando íons menores que, detectados, geram o espectro de massas. Os fragmentos gerados podem ser íons, radicais ou moléculas neutras. Os diferentes íons gerados na câmara de ionização são separados de acordo com sua razão massa/carga (m/z), sendo detectados apenas os fragmentos catiônicos, ou seja, íons positivos, chamados íons moleculares, de carga unitária. Estes íons possuem alta energia e são capazes de romper ligações covalentes, fragmentando-se em pedaços menores.

Inicialmente, tanto os parâmetros cromatográficos quanto os parâmetros do espectrômetro de massas foram otimizados com base nos estudos desenvolvidos por Dahlmann *et al.* (2003) e Machado (2008). Para definição do método de análise da MCYST-LR as condições analíticas foram realizadas conforme metodologia descrita a seguir.

4.2.1 - 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.

Inicialmente, preparou-se uma solução de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ do padrão de MCYST-LR em metanol: água (1:1). Usou-se essa solução para realizar a infusão no espectrômetro de massas, a um fluxo de $10 \mu\text{L min}^{-1}$, com o objetivo de obter os parâmetros ótimos da fonte de ionização. Essa infusão da solução, no espectrômetro de massas, permitiu a caracterização nos modos de varredura (“Q1 MS Scan”) e a fragmentação da molécula (Q2) no espectrômetro de massas.

Para se obter o espectro do analito, a MCYST-LR, que tem massa molecular nominal de 994,7 o vapor dessa toxina foi bombardeado com um feixe de elétrons, o que conduziu à perda de um elétron formando o íon molecular M^+ .

Para avaliar o modo de ionização de maior sensibilidade, se positivo ou negativo, foi realizada uma análise no modo Q1 MS Scan que permitiu definir essa polaridade. Em seguida realizou-se análise no modo “Q1 Multiplo Ion” sendo possível verificar a

estabilidade e a intensidade do sinal do composto. Nesta análise avaliou-se a necessidade de concentrar ou diluir a amostra para que fosse possível a detecção do analito. Logo após, foi realizada a análise no modo EM/EM no qual foram geradas fragmentações da molécula MCYST-LR e as duas transições que foram monitoradas. Os parâmetros foram otimizados para essas transições, gerando assim um Método de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) para quantificar e confirmar a toxina MCYST-LR.

4.2.2 - Otimização das condições cromatográficas

O estudo cromatográfico foi realizado utilizando soluções padrão de MCYST-LR na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em solução de metanol e água desionizada (1:1) e eluídas em coluna cromatográfica C_{18} utilizando gradiente de eluição sob fluxo de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. O volume de injeção foi de $100 \mu\text{L}$.

A avaliação da fase móvel foi realizada sob duas combinações diferentes de componentes orgânicos com o intuito de avaliar a melhor sensibilidade na detecção de MCYST-LR. A primeira tentativa foi realizada usando o metanol e a segunda usando acetonitrilo. Nos dois ensaios foram adicionados 0,1% de ácido fórmico e 2 mM de acetato de amônio.

De acordo com Cong *et al.*, 2006 a adição do ácido fórmico, na fase móvel, torna melhor a ionização da MCYST-LR, aumentando, dessa forma, a sensibilidade quando a aquisição é feita no modo positivo.

Machado (2008) ao realizar a otimização do método de determinação de MCYST-LR por CLAE/EM/EM também obteve uma melhor ionização quando usou o componente de fase móvel acetonitrilo e água combinado com os aditivos ácido fórmico 0,1% e acetato de amônio 2 mM.

4.2.3 - Validação do método para determinação de MCYST-LR

A validação do método para determinação de MCYST-LR em água foi realizada incluindo os parâmetros mencionados no item 3.3. O processo incluiu a etapa de preparação da amostra e a análise por CL/EM/EM.

Foram escolhidas quatro concentrações para validação: $1 \mu\text{g L}^{-1}$, $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$, $25 \mu\text{g L}^{-1}$ e $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Após definir as concentrações, procedeu-se a preparação das soluções adicionando a substância de referência, MCYST-LR, em água ultrapura (Mili-Q), nas diferentes concentrações, que foram divididos em três experimentos.

Cada experimento consistiu de 28 soluções do padrão de referência que foram preparadas e analisadas, sendo 24 amostras das soluções de MCYST-LR, 4 alíquotas de água Mili-Q usadas como branco (matriz). No primeiro experimento foram realizadas as análises das concentrações, $1 \mu\text{g L}^{-1}$, $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$, $25 \mu\text{g L}^{-1}$ e $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Em cada experimento a análise de cada concentração foi realizada em replicatas de 6. Os outros dois experimentos foram realizados utilizando o mesmo procedimento, porém, em dias diferentes.

Cada amostra, de 100 ml, fortificada com MCYST-LR, foi homogeneizada e submetida ao procedimento de recuperação, que consistiu em fazer fluir a amostra através do cartucho C_{18} , e posteriormente o material eluído foi evaporado e ressuspenso em 2 ml de solução de metanol e água (1:1).

Os parâmetros incluídos no procedimento de validação do método foram selecionados com base na literatura analisada e principalmente nos documentos dos órgãos INMETRO, DOQ-CGCRE-008 – (Fev 2010) e oficial *Journal of the European Communities - Commission Decision 657/EC (2002)* e estão descritos a seguir:

4.2.3.1 - Seletividade e especificidade

A seletividade foi avaliada por meio da análise de brancos da matriz (matriz isenta do analito). Amostras de água Mili-Q (brancos dos experimentos 1 a 3) e potável (torneira) foram preparadas e analisadas para verificação da existência de picos interferentes nos mesmos tempos de retenção da MCYST-LR.

4.2.3.2 - Linearidade

Para verificação da linearidade foram preparadas soluções com diferentes concentrações com a substância de referência, MCYST-LR (SIGMA-ALDRICH), descrita no item 4.4.2, experimentos de 1 a 3. Os resultados produzidos a partir das concentrações de $1 \mu\text{g L}^{-1}$,

12,5 µg L⁻¹, 25 µg L⁻¹ e 50 µg L⁻¹ foram utilizados para construir os gráficos analíticos, plotando a resposta obtida no detector, no caso a área, contra a concentração adicionada do analito.

4.2.3.3 - Limite de Detecção (LOD)

Inicialmente, foi determinado o limite de detecção do equipamento para o método em estudo. A determinação do limite baseou-se no estudo de Machado, (2008) no qual soluções do padrão MCYST-LR foram injetadas com intuito de obter uma relação sinal/ruído (s/r) de 3 a 5. Observando-se a relação desejada, sete replicatas de injeções cromatográficas foram realizadas e a relação s/r foi determinado para cada injeção.

Para determinação do Limite de detecção do método (LOD) foram utilizados os resultados das análises de amostras fortificadas em diferentes níveis (experimento 1 a 3) item 4.2.3. Ao plotar o sinal obtido das amostras fortificadas *versus* a concentração do analito adicionada obteve-se o valor do LOD por meio da equação 4.1 (EC, 2002).

$$\text{LOD} = b + 2,33*s \quad \text{Equação (4.1)}$$

Na qual:

b = Coeficiente linear das curvas de fortificações (experimento 1 a 3);

s = desvio padrão dos coeficientes lineares obtidos nos experimento 1 a 3;

“2,33” = valor crítico de t de *Student* para um intervalo de confiança de 99%.

4.2.3.4 - Limite de Quantificação (LOQ)

A obtenção do limite de quantificação foi possível por meio das análises das amostras fortificadas em diferentes concentrações, descritos no item 4.2.3, ao plotar o sinal obtido das amostras fortificadas contra a concentração do analito adicionado. O valor do LOQ foi obtido por meio da equação 4.2:

$$\text{LOQ} = b + 2,33*s + 1,64*s \quad \text{Equação (4.2)}$$

Na qual:

b = Coeficiente linear das curvas de fortificação obtidas nos experimentos 1 a 3;

s = desvio padrão dos coeficientes lineares obtidas nos experimentos 1 a 3;

“2,33 e 1,64” = valores críticos de t de *Student* para intervalos de confiança de 99 e 95%, respectivamente.

4.2.3.5 - Recuperação

A recuperação percentual (R%) do analito foi realizada pelas análises das amostras fortificadas (experimentos 1 a 3, item 4.2.3) com quantidades conhecidas do padrão. De acordo com o INMETRO as amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações: baixa, média e alta, da faixa de uso do método. Para este experimento utilizou-se quatro diferentes concentrações $1 \mu\text{g L}^{-1}$, $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$, $25 \mu\text{g L}^{-1}$ e $50 \mu\text{g L}^{-1}$.

A recuperação percentual foi obtida para cada amostra fortificada através da equação 4.3. O valor obtido, empregado a fórmula, corresponde à média das recuperações obtidas em diferentes concentrações.

$$R\% = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100 \quad \text{Equação (4.3)}$$

Na qual:

C_1 = concentração do analito obtida na amostra fortificada do experimento 1 a 3;

C_2 = concentração do analito na amostra não fortificada de cada experimento (água);

C_3 = concentração do analito adicionado à amostra fortificada, padrão MCVYST-LR.

4.2.3.6 - Precisão

Neste trabalho não foi possível realizar análise interlaboratorial, portanto a precisão foi avaliada por meio do parâmetro de repetitividade usando o coeficiente de variância percentual (CV%) obtido a partir dos resultados dos ensaios de recuperação descrito no item 4.2.3.5. O coeficiente de variação foi obtido por meio da equação 4.4:

$$CV = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação (4.4)}$$

Na qual:

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada.

Após determinar as condições cromatográficas ideais, construiu-se uma curva padrão analítica para determinar a concentração do analito de interesse. A curva foi preparada a partir do padrão de MCYST-LR (SIGMA-ALDRICH).

A curva foi construída com cinco níveis, relacionando a resposta do equipamento com as concentrações de MCYST-LR de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, 12,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, ou seja, cada concentração do padrão, MCYST-LR, há um sinal analítico correspondente. Cada ponto da curva foi injetado em triplicata sob o fluxo de 700 $\mu\text{L min}^{-1}$ e volume de injeção de 100 μL .

4.3 - ETAPA 2 - CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCISTINAS PRODUZIDAS PELA LINHAGEM NPLJ-4

A técnica de cromatografia de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e a cromatografia líquida com detector de massas (CL-EM/EM) foram utilizadas para caracterização do extrato semipurificado produzido a partir da lise de células da linhagem NPLJ-4 de *Microcystis aeruginosa* cultivadas no LAA, com o intuito de verificar as variantes de microcistinas predominantes produzidas por esta linhagem.

A técnica CLAE-DAD foi utilizada para a separação das frações de microcistinas presentes no extrato. Para tal, antes de ser injetada a amostra do extrato de microcistinas semipurificadas foi filtrada em filtro de polietileno GV Millex com tamanho de poros de 0,22 μm e diâmetro de 3 mm (Millipore). Nesta análise, utilizou-se a coluna C_{18} , em fase reversa, Zorbax Eclipse XDB- C_{18} com dimensões de 4,6 X 150 mm e diâmetro das partículas da fase reversa de 5 μm .

Esta análise cromatográfica foi realizada usando as soluções de acetonitrilo e água a um fluxo de 0,7 mL min^{-1} e injeção de 100 μL . Baseado nos estudos realizados pelos

pesquisadores Tsuji *et al.* (1997) a detecção foi realizada a 210 e 238 nm e o espectro de absorção de cada pico foi analisado entre 200-300 nm.

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

Dando sequência à avaliação preliminar, as frações cromatográficas referentes às potenciais variantes de microcistinas, predominantes no extrato, observadas nos espectrogramas por CLAE-DAD foram coletadas, separadamente em vial de 5 mL.

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

4.4 - ETAPA 3 - ENSAIOS DE OXIDAÇÃO

A água de estudo (AE) usada foi preparada a partir da diluição do extrato produzido na etapa de semipurificação/concentração das microcistinas (Etapa preliminar) em água ultrapura (Mili-Q) com o objetivo de obter as concentrações iniciais aproximadas de toxinas ($100, 40$ e $20 \mu\text{g L}^{-1}$) adotadas nos ensaios de oxidação.

Para realizar os ensaios de oxidação foram utilizados os dispositivos de mistura do equipamento de testes de jarros. Foram utilizados os recipientes de vidro (béqueres) com capacidade para 500 e 1000 mL. Foi utilizada uma agitação de 100 rpm apenas no primeiro minuto do ensaio com a finalidade de homogeneizar a solução oxidante adicionada à água de estudo. Nesses ensaios foram avaliadas a influência do tempo de contato e a dose de cloro no processo de oxidação das microcistinas.

Os ensaios foram realizados em sala climatizada, na qual as temperaturas do ar ambiente e da água foram monitoradas e mantidas sob controle ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$), minimizando assim, possíveis interferências dessa variável nos resultados da oxidação.

Com base na literatura analisada, foi adotado o pH 6 para a execução dos ensaios de oxidação, pois nesse pH a espécie predominante é o ácido hipocloroso, oxidante mais forte, que promove maiores eficiências na remoção de microcistinas (Hart *et al.*, 1998). O ajuste do pH, quando necessário, era realizado usando soluções de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio 1M.

Além disso, foram realizados ensaios preparatórios para avaliar a concentração de tiosulfato de sódio necessária para a descloração da amostra para análise posterior das toxinas. Este procedimento é importante para assegurar o fim da reação do cloro nos tempos de contato determinados.

Como mostrado no fluxograma da Figura 4.6, foram retiradas as amostras para análises de toxinas e cloro nos tempos de contato de 15 e 30 minutos. A Portaria MS nº 518 recomenda um tempo de contato mínimo de 30 minutos, para garantir uma desinfecção efetiva, assim sendo, é importante avaliar o processo de oxidação nesse tempo de contato. O tempo de 15 minutos foi utilizado com para verificar a concentração necessária do oxidante para remoção de toxinas na relação CT com o intuito de otimizar o processo de oxidação.

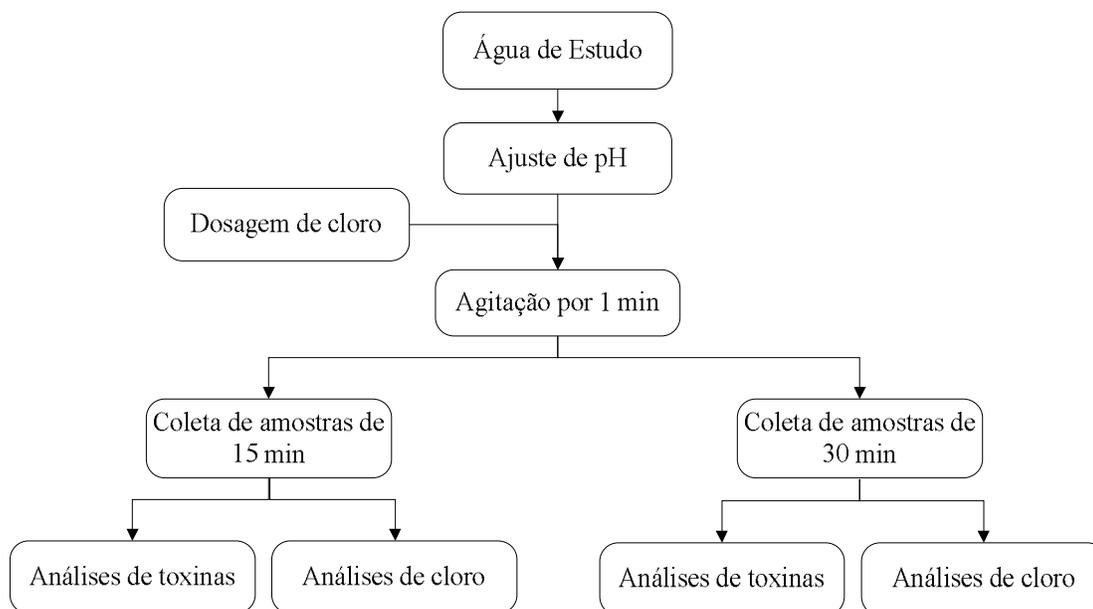


Figura 4.6 - Fluxograma dos ensaios de oxidação.

Cada amostra retirada, nos tempos de contato determinados, era dividida em duas alíquotas. Na primeira alíquota, de 10 mL, foram adicionados 0,2 mL de tiosulfato de sódio na concentração de 1M para posterior análise do residual de microcistinas. Na segunda alíquota, de 60 mL, foram realizadas, de imediato, as determinações de cloro residual livre e cloro total.

Durante os ensaios, a dose de cloro adicionada para promover a oxidação, foi monitorada. O monitoramento, denominado de controle, consistia na realização de dosagens da solução de hipoclorito de sódio adicionada à água desionizada em volume igual à adicionada a amostra (água de estudo-AE). O valor da concentração de cloro medido imediatamente após a homogeneização do controle foi considerado a dosagem adicionada no ensaio de oxidação. A Figura 4.7 apresenta o esquema dos ensaios realizados no processo de oxidação no qual pode ser observado que para cada dose aplicada à água de estudo, dose igual era adicionada ao mesmo volume de água pura.

Para avaliar uma possível perda ou degradação natural das toxinas foram realizadas análises no ensaio em branco, ou seja, sem a presença do oxidante (Figura 4.7). Os ensaios foram realizados nas mesmas condições dos ensaios de oxidação.

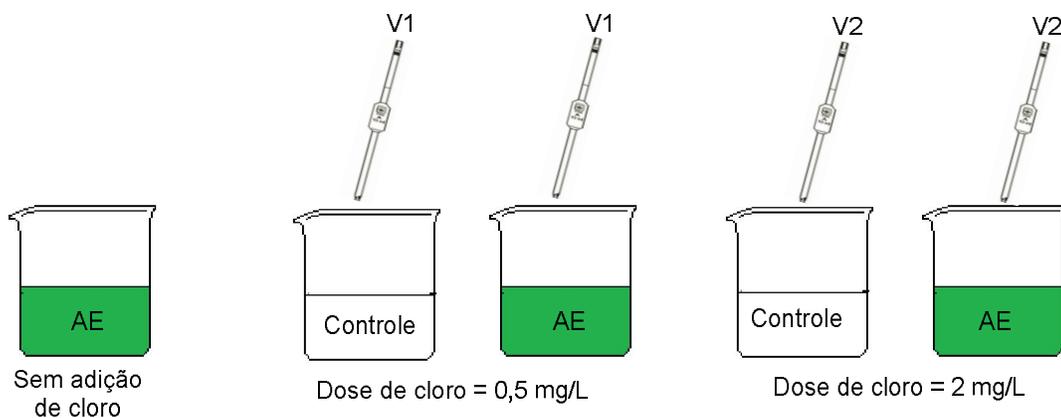


Figura 4.7 - Esquema dos controles de dosagens do cloro nos ensaios de oxidação.

Como já mencionado, nos ensaios de oxidação os parâmetros pH e temperatura foram monitorados e o cloro livre e cloro total medidos nos tempos de contato determinados, assim como a concentração de microcistinas.

As análises para determinação dos parâmetros cloro livre, cloro total, pH e temperatura foram realizadas empregando-se os métodos recomendados pelo *Standard Methods* (APHA, 2005).

As medições do cloro total e cloro livre foram realizadas pelo método DPD (dietil-p-fenil-diamina) utilizando reagentes HACH. Houve a necessidade de fazer diluições de parte das amostras para que fosse possível alcançar os limites de detecção do método. O limite superior do método utilizado na análise de cloro era de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$.

Para quantificação das microcistinas foi utilizado o método ELISA, por meio de *kits* quantitativos (Abraxis). O método ELISA consiste na identificação de um antígeno por meio de anticorpos específicos fixos no fundo de uma placa de 96 poços com capacidade para $200 \mu\text{L}$ cada. Cada poço é incubado com uma amostra contendo o antígeno e com um conjugado composto de antígeno ligado a enzima. O antígeno ligado a enzima e o não ligado (amostra) competem pela ligação com os anticorpos. Após a reação, a placa é lavada e somente os antígenos com ou sem enzima que se ligam aos anticorpos permanecem aderidos à placa. O substrato da enzima é adicionado aos poços e ocorre uma reação colorimétrica com a enzima, ou seja, quanto maior a intensidade de cor, menor a concentração de toxina presente na amostra.

A medida de intensidade da cor foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm. A partir dos valores de intensidade de cores lidas e usando uma curva de calibração construída a partir dos padrões de microcistinas, são obtidas as concentrações das amostras submetidas à análise.

Este método tem a vantagem de ser muito sensível o que possibilita a detecção de baixas concentrações de toxinas sem a necessidade de concentração da amostra para análise. O seu limite de detecção é de 0,15 a 5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Além disso, este teste responde a uma variedade de microcistinas, porém tem a desvantagem de não fazer a distinção entre as variantes.

As análises qualitativas das microcistinas oriundas do extrato semipurificado da linhagem NPLJ-4 de *Microcistis aeruginosa* foram realizadas por meio da técnica de espectrometria de massas.

Nessa etapa foram realizados, 9 ensaios com água de estudo na presença de cloro, cujas doses de cloro variaram de 0,5 mg L^{-1} a 66,5 mg L^{-1} e empregando concentrações de microcistinas de 21 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 2.230 $\mu\text{g L}^{-1}$. Nesses ensaios foram avaliadas as doses de cloro necessárias para oxidar microcistinas nas diferentes concentrações e nos tempos de contato adotados (15 min, 30 min, 180 min e 1440 min).

4.4.1 - Ensaio 1

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

4.4.2 - Ensaio 2

No ensaio 2, realizado após análise dos dados obtidos no ensaio 1 usando AE com mesma concentração de microcistinas semipurificadas (cerca de $2,2 \text{ mg L}^{-1}$) optou-se por aumentar a dose de cloro, de 60 mg L^{-1} para $66,5 \text{ mg L}^{-1}$, e o volume, de 15 mL para 40 mL, a ser coletado após os tempos de contato avaliados. Dessa forma, duas alíquotas eram retiradas, sendo a primeira, para análise de cloro, com o mesmo volume de 60 mL e a segunda alíquota, para o estudo do comportamento da oxidação das microcistinas, com o volume de 40 mL, no qual eram adicionados 4 mg de ácido ascórbico. Esta segunda amostra foi submetida ao processo de secagem por meio de rotoevaporação e ressuspensa em 2 mL de solução metanol/água (1:1). O mesmo procedimento foi realizado para as alíquotas retiradas no tempo de contato de 24 horas.

O valor de pH adotados nos ensaios 1 e 2 foi de $7,0 \pm 0,2$. As amostras obtidas, após o processo de oxidação, foram submetidas à análise por meio da técnica de espectrometria de massas.

Os dados obtidos na análise das amostras do extrato de microcistinas semipurificadas oxidadas, ensaios 1 e 2, foram comparados entre os espectros obtidos das amostras oxidadas e os espectros da amostra antes da oxidação, com o intuito de observar o comportamento das microcistinas no processo de oxidação com o cloro nos tempos de contatos adotados.

4.4.3 - Ensaio 3

Inicialmente foram realizados ensaios preparatórios com o objetivo de obter as doses do oxidante a serem aplicadas no processo de oxidação, assim como as concentrações de microcistinas e permitir possíveis ajustes de pH ou modificações nas concentrações do oxidante e das microcistinas.

O ensaio consistiu na oxidação de 200 mL da água de estudo contendo aproximadamente de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de microcistinas, com as diferentes doses de cloro propostas, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ e 8 mg L^{-1} . O valor do pH da água de estudo foi ajustado para 6,0 antes

da aplicação das doses de cloro. Esse ensaio foi realizado em três repetições e as análises em triplicatas.

A adoção das doses de cloro e concentrações de microcistinas foi baseada na literatura científica analisada (Tabela 3.5). Há evidências na literatura científica da ocorrência de florações de cianobactérias em águas naturais em concentrações bem elevadas. Park *et al.* (1998) analisaram amostras de água naturais, na Korea, no período de 1992 a 1995. Ao analisarem as águas do lago Mulkum, os autores observaram a presença de elevadas concentrações de microcistinas, entre 0,6 e 171 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo 89 e 82 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MCYST-RR e MCYST-LR, respectivamente.

O valor de 0,5 mg L^{-1} de cloro foi adotado por ser o residual de cloro livre necessário para garantir a completa manutenção da completa desinfecção, após 30 minutos de tempo de contato, no processo de oxidação (Nicholson *et al.*, 1994; Hart *et al.*, 1998) e porque a Portaria MS nº 518/2004 recomenda que no processo de tratamento de água para consumo humano, logo após a desinfecção, a água tratada deve conter um teor mínimo 0,5 mg L^{-1} de cloro residual livre.

4.4.4 - Ensaio 4

Com o intuito de avaliar o comportamento das toxinas optou-se por realizar esse ensaio usando a mesma dose de cloro proposta no ensaio 3, porém usando concentrações menores de microcistinas na AE da ordem de 44 $\mu\text{g L}^{-1}$. As análises de cloro residual livre, cloro total e microcistinas foram realizadas nas mesmas condições do ensaio 3.

4.4.5 - Ensaio 5

No ensaio 5, em função dos resultados obtidos nos ensaios 3 e 4, estreitou-se a faixa de dosagens de cloro para que fosse possível identificar a melhor dose para alcançar a maior eficiência na remoção das cianotoxinas. As doses de cloro propostas foram 1 mg L^{-1} , 1,5 mg L^{-1} , 2,0 mg L^{-1} e 2,5 mg L^{-1} . Esse ensaio foi realizado usando AE com a mesma concentração de microcistinas adotada no ensaio 4. Contudo, o pH da água de estudo foi ajustado para cada dosagem de forma que, ao aplicar as doses de cloro o valor medido, imediatamente após a adição de cloro apresentava valor de pH aproximadamente 6.

4.4.6 - Ensaio 6

Este ensaio foi realizado com o objetivo de comparar os resultados obtidos no ensaio 5. Neste ensaio buscou-se reduzir pela metade a concentração de microcistinas na AE em relação ao ensaio 5. As doses de cloro adotadas foram $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ nos tempos de contato de 15 e 30 minutos. Esse ensaio foi realizado em duas repetições e as análises do cloro e microcistina em triplicatas.

4.4.7 - Estudo da cinética da reação de microcistinas com cloro

Para avaliar se a degradação das microcistinas com cloro segue uma cinética de *pseudo*-primeira ordem como descrita por Acero *et al.* (2005) e Ying *et al.* (2008) realizou-se o estudo cinético da oxidação das microcistinas provenientes da cepa NPLJ-4 com o oxidante hipoclorito de sódio. Foram realizados ensaios com diferentes doses de cloro ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$, $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ e $3,0 \text{ mg L}^{-1}$) e semelhantes concentrações de microcistinas nos diferentes tempos de contato.

Cada ensaio foi realizado em duas repetições, sendo a análise do residual de microcistinas realizada em duplicata e a de cloro residual livre e total em triplicata. Os ensaios foram realizados em sala climatizada cuja temperatura do ar ambiente variou de 23 a 25 °C e da amostra de 24 a 25 °C. A faixa de pH foi de $6 \pm 0,2$ e a agitação, de 100 rpm, foi mantida apenas no primeiro minuto. Nos tempos de contatos estabelecidos eram retiradas duas alíquotas da amostra. Na primeira alíquota, foi realizada, de imediato, a determinação de cloro residual livre e total. Na segunda alíquota, foi adicionada solução de tiosulfato de sódio 1N e, em seguida, foi congelada para posterior análise de microcistinas pelo método ELISA. As características de cada ensaio realizado são descritas a seguir.

4.4.7.1 - Ensaio 7

No ensaio 7 foi aplicada uma dose correspondente a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de cloro, em 750 mL da água de estudo contendo cerca de $42 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de microcistinas. As análises de cloro residual livre, cloro total e residual de microcistinas foram realizadas nos tempos de 0 min, 3 min, 8 min, 15 min e 30 min.

4.4.7.2 - Ensaio 8

No ensaio 8 foi aplicada uma dose de cloro correspondente à concentração de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ em 750 mL da água de estudo contendo a mesma concentração de microcistinas do ensaio 7. As análises de cloro residual livre, cloro total e residual de microcistinas foram realizadas nos tempos de contato de 0 min, 1 min, 2 min, 4 min, 6 min 8 min e 15 min.

4.4.7.3 - Ensaio 9

No ensaio 9 foi aplicada em 100 mL da água de estudo (AE) contendo a mesma concentração de microcistinas, uma dose de cloro correspondente à concentração de $3,0 \text{ mg L}^{-1}$. Como foi observado nos ensaios 7 e 8 que o residual do cloro combinado formado não era significativo, neste ensaio, analisou-se somente o cloro residual livre e residual de microcistinas, sendo as alíquotas retiradas nos tempos de contato de 0 min, 1 min, 2 min, 4 min, 6 min, 8 min e 15 min.

Os dados obtidos a partir dos ensaios 8 e 9 permitiram avaliar se as reações de oxidação de microcistinas pelo cloro seguem uma cinética de *pseudo*-primeira ordem, conforme preconizado por Acero *et al.* (2005) e Ying *et al.* (2008). Plotando-se em um gráfico valores do logaritmo natural da concentração de microcistinas, $\ln(C_0/C)$, *versus* o tempo, onde C_0 é a concentração inicial e C é a concentração final, obtém-se uma reta. Se a reação for de *pseudo*-primeira ordem em relação ao cloro, obtém-se uma reta de coeficiente angular k' de forma que, ao aumentar a dose de cloro aplicada, a constante de velocidade (k') aumenta proporcionalmente.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados referentes à validação do método desenvolvido para análise de Microcistina-LR pela técnica CL/EM/EM. Da mesma forma, são apresentados e discutidos os resultados relativos à caracterização das microcistinas produzidas pela linhagem NPLJ-4, assim como os resultados dos ensaios obtidos na oxidação das microcistinas com cloro.

5.1 - ETAPA 1 – MÉTODO DE DETECÇÃO PARA MCYST-LR

Nesta etapa são apresentados os resultados referente à validação do método para a detecção e quantificação de microcistina-LR, que compreende a otimização dos parâmetros do detector de massas e das condições cromatográficas, assim como a validação dos parâmetros do método analítico.

5.1.1 - Otimização dos parâmetros

A otimização visou o ajuste dos parâmetros relativos à fonte de ionização do detector para maximização da resposta do instrumento. Para tal, uma solução de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ do padrão MCYST-LR, preparada em metanol e água (1:1) e acidificada com 0,1 % de ácido fórmico, foi injetada no espectrômetro de massas. A Figura 5.1 apresenta os espectros de massas da MCYST-LR obtido no modo de varredura (“Q1 MS Scan”) com ionização positiva e negativa.

Analisando a Figura 5.1 fica claro que a melhor ionização ocorre na polaridade positiva, pois se verificou maior sensibilidade com a protonação da molécula de MCYST-LR $[M + H]^+ = 995,7$, com valor próximo a 8×10^6 cps, enquanto que na polaridade negativa o valor foi de cerca de $1,2 \times 10^6$ cps.

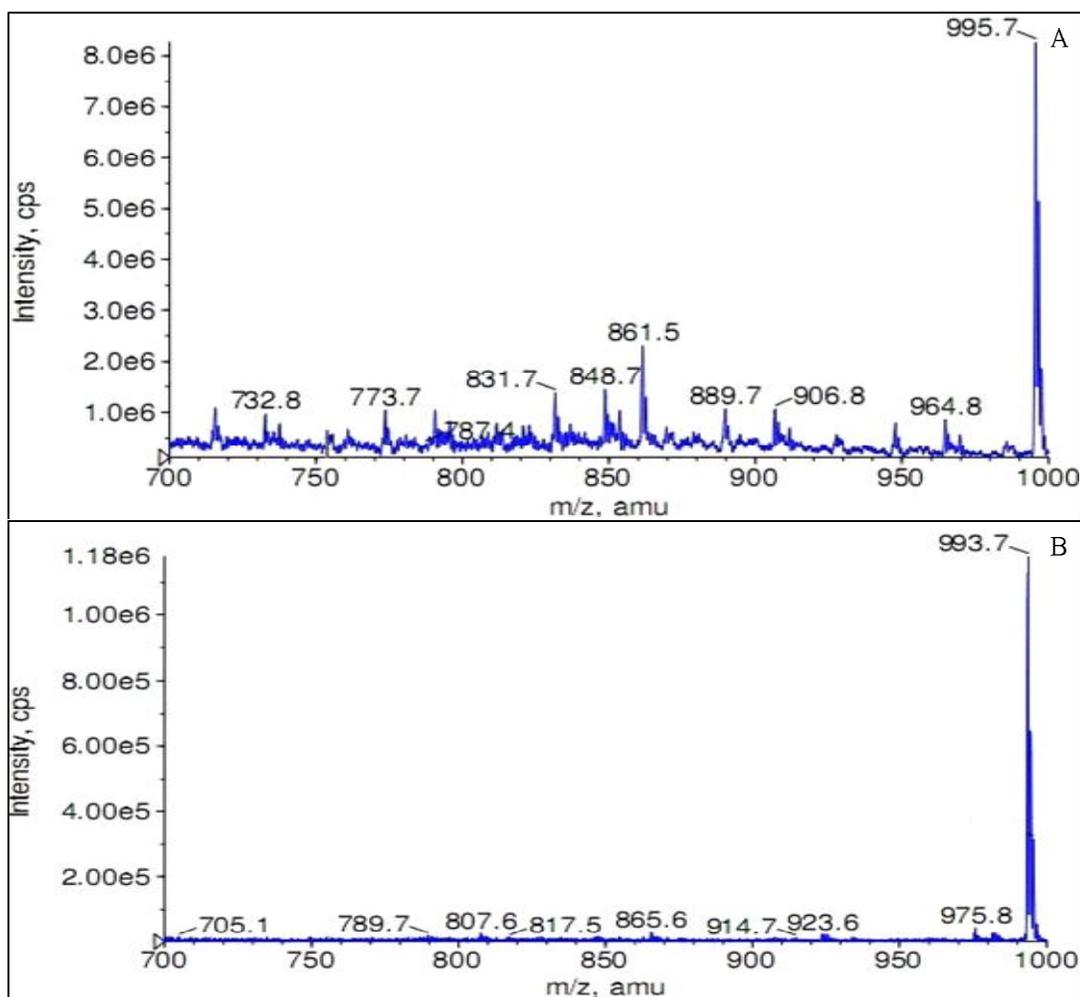


Figura 5.1 - Espectro de massas de MCYST-LR em ionização positiva (A) e negativa (B) no modo scan.

Identificada a melhor polaridade, o espectrômetro foi operado no modo MRM - Monitoramento de Reações Múltiplas - com ionização por eletronebulização, no modo de ionização positiva para otimização dos parâmetros da fonte de ionização. A Tabela 5.1 apresenta os valores otimizados dos parâmetros da fonte.

Tabela 5.1- Parâmetros otimizados para operação no modo MRM.

Parâmetro	Valor
Cortina de gás (Curtains Gás-CUR)	10 psi
Gás nebulizante (GS1)	60 psi
Gás secante (GS2)	45psi
Voltagem capilar	4500V
Temperatura	550 °C

Adotando-se as condições descritas na Tabela 5.1 procedeu-se a otimização dos parâmetros para fragmentação da molécula de MCYST-LR, os quais estão apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Parâmetros otimizados para as transições monitoradas (m/z 135 e 103) no modo MRM.

Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Potencial de Orifício (DP) V	Energia de Colisão (CE) eV	Potencial de Saída da Célula de Colisão (CXP) V
995,7	135	110	89	4
995,7	103	110	129	4

A Figura 5.2 apresenta a fragmentação estrutural da molécula de microcistina-LR (MCYST-LR) nas condições otimizadas. Observa-se que o íon precursor $[M + H^+]$ de m/z 995,7 produziu duas fragmentações mais abundantes, m/z 135 e m/z 103. Esses dois fragmentos foram selecionados para a implementação do método quantitativo, sendo a transição mais sensível, de m/z 995,7 para m/z 135, utilizada para quantificar a MCYST-LR e a transição m/z 995,7 para m/z 103 para confirmar o analito. O fragmento m/z 135 é característico das microcistinas e corresponde a fragmento do grupamento Adda da molécula (Kondo *et al.*, 1992). O composto m/z 102 corresponde ao fragmento do Adda, que perdeu o MeOH de m/z 32.

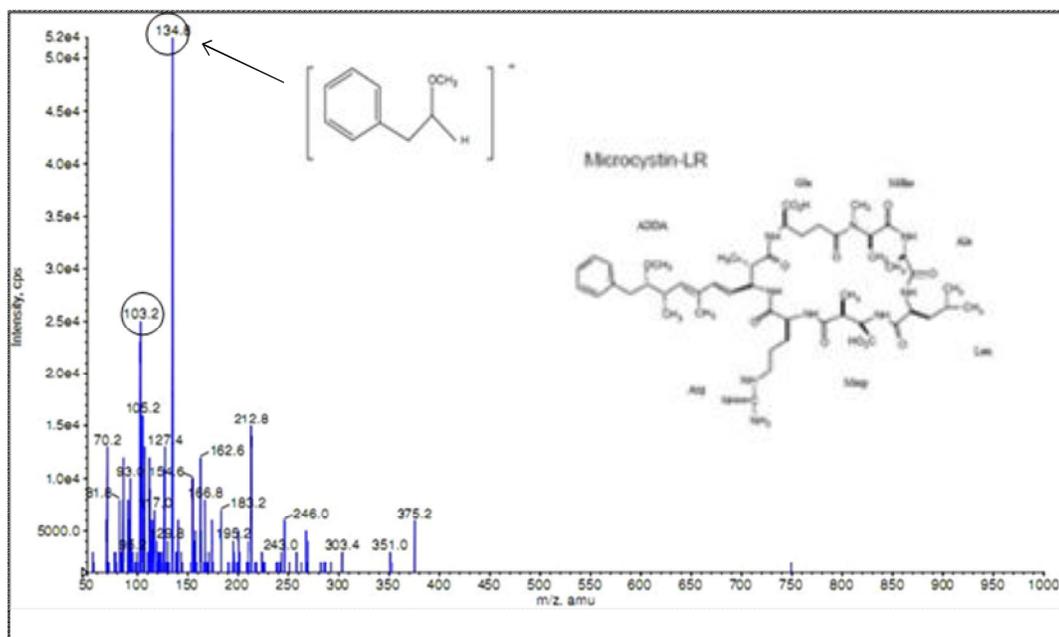


Figura 5.2 - Espectro de massa das transições m/z 135 e 103 identificadas no modo MRM para o íon precursor $[M + H]^+$ de m/z 995,7.

5.1.2 - Otimização das condições cromatográficas

Para definir as condições cromatográficas, duas composições da fase móvel foram testadas: água e metanol, e, água e acetonitrilo. Na Tabela 5.3 são apresentados os gradientes de eluição testados na otimização. Os resultados obtidos eram avaliados verificando o aumento do sinal resposta do padrão de MCYST-LR analisado. As análises foram realizadas com fluxo de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ da fase móvel e volume da solução do padrão injetada de $100 \mu\text{L}$. Nos dois ensaios, adicionou-se 0,1% de ácido fórmico e 2 mM de formiato de amônio.

Tabela 5.3 - Condições dos gradientes de eluição para MCYST-LR.

Tempo (min)	Eluente A	Eluente B
	Água (%)	Metanol ou Acetonitrilo (%)
0	70	30
3	15	85
4	10	90
5	70	30
7	70	30

Comparados os resultados das análises usando o metanol e acetonitrilo foi possível verificar que a condição que mostrou melhor resolução cromatográfica, com menor retenção na coluna cromatográfica, assim como maior resposta, intensidade do sinal, foi obtida para o componente orgânico acetonitrilo.

5.1.3 - Validação do método de determinação de MCYST-LR

5.1.3.1 - Seletividade e especificidade

A partir da comparação dos resultados dos cromatogramas gerados com os brancos das matrizes, água pura e água potável (isentas do analito), Figura 5.3, foi possível verificar que não há presença de interferentes no tempo de retenção da MCYST-LR para as transições monitoradas (m/z 135 e 103). Sendo assim, o método pode ser considerado seletivo e específico para análise de MCYST-LR em água nas fragmentações monitoradas por CLAE-EM/EM.

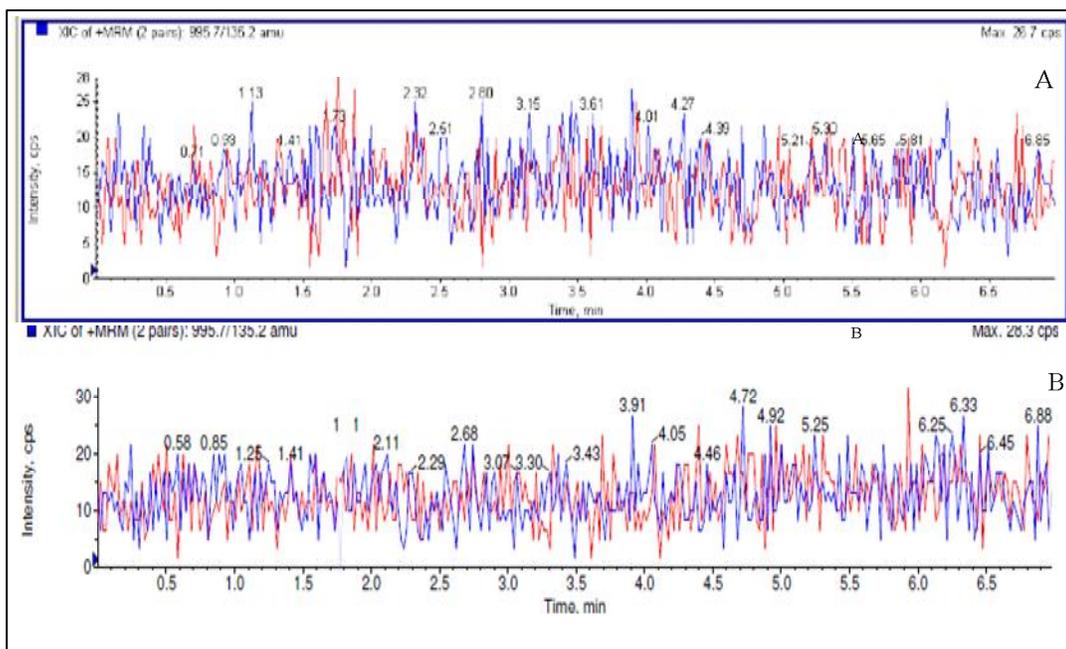


Figura 5.3 - Cromatograma de análise dos brancos de matrizes, água pura (A) e potável (B) para a fragmentação monitorada, m/z 135.

5.1.3.2 - Linearidade

A linearidade foi determinada por meio da construção de gráficos de correlação entre a concentração de MCYST-LR (1 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) e a resposta do detector (área do pico) gerados a partir das recuperações de soluções padrão da toxina (experimentos 1 a 3). A Tabela 5.4 apresenta os coeficientes de correlação (r), angulares (a) e lineares (b) obtidos por meio da regressão linear dos dados experimentais (Apêndice A, item A.1).

Tabela 5.4 - Resultados dos dados obtidos da equação da reta nos experimentos 1 a 3.

	a	b	r
Experimento 1	573,28	- 82,94	0,9987
Experimento 2	557,91	- 101,25	0,9958
Experimento 3	563,91	- 76,12	0,9983

As curvas analíticas obtidas foram consideradas lineares, pois os coeficientes de correlação (r) foram superiores a 0,99 indicando que as respostas do detector, nos intervalos analisados, foram proporcionais às concentrações de MCYST-LR. De acordo com Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil, 2003) um coeficiente de correlação igual ou superior a 0,99 é aceitável.

5.1.3.3 - Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).

De acordo com INMETRO (Brasil, 2010), 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. A Tabela 5.5 apresenta a relação sinal/ruído (s/r) para sete injeções de uma solução de 0,12 $\mu\text{g L}^{-1}$ de MCYST-LR. O valor médio da relação sinal/ruído resultou em $3,8 \pm 0,47$.

Tabela 5.5 - Resultados da relação sinal/ruído (s/r) para MCYST-LR, 0,12 $\mu\text{g L}^{-1}$, em CLAE-EM/EM.

Réplicas	s/r
1	4,5
2	4,1
3	3,7
4	3,0
5	4,2
6	3,7
7	3,8
Média	3,8 \pm 0,5

Ribani *et al.* (2004) relata em seus estudos que apesar da relação sinal/ruído ser o método mais utilizado para técnicas analíticas em geral, para 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 LOD e LOQ mais baixos, pois a determinação é feita somente pela intensidade do sinal do detector e não pela área, afetando dessa forma tanto o LOD quanto LOQ.

Portanto para determinar o limite de detecção e o limite de quantificação utilizou-se o método baseado nos parâmetros do gráfico de correlação obtidos a partir dos experimentos 1 a 3 (Apêndice A, item A.2 e A.3), que é estatisticamente mais confiável. Como pode ser observado na Tabela 5.6 o método apresentou limite de detecção de 0,21 $\mu\text{g L}^{-1}$ e limite de quantificação de 0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Esses valores podem ser considerados satisfatórios, pois são inferiores a 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, valor máximo permitido (VMP) para a concentração de microcistinas em água para consumo humano, de acordo com a portaria/518 do Ministério da Saúde (Brasil, 2004).

Tabela 5.6 - Resultados para os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para MCYST-LR em água.

	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Média
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,20	0,24	0,19	0,21
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,24	0,28	0,23	0,25

5.1.3.4 - Recuperação e precisão

Os ensaios de recuperação (experimento de 1 a 3) usando soluções padrão de MCYST - LR, foram realizados em quatro concentrações; $1 \mu\text{g L}^{-1}$, $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$, $25 \mu\text{g L}^{-1}$ e $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Nesses ensaios, foram obtidos valores de recuperação entre 74 a 98% (Tabela 5.7 e Apêndice A, Tabela A1). De acordo com os critérios estabelecidos pela Comunidade Européia (EC, 2002) para análise de compostos, são aceitos valores de recuperação entre 70-120%. Portanto, os resultados de recuperação obtidos foram considerados satisfatórios para MCYST-LR.

Tabela 5.7 - Recuperação (R%) e repetibilidade (CV%) referentes aos experimentos 1 a 3.

Concentração de MCYST-LR ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Experimento 1 (n=6)	Experimento 2 (n=6)	Experimento 3 (n=6)
1	R (%)	77,6	74,7	75,0
	DP	0,15	0,15	0,13
	CV (%)	19,8	19,5	17,6
12,5	R (%)	95,3	90,5	94,4
	DP	0,03	0,1	0,04
	CV (%)	2,7	9,9	3,8
25	R (%)	89,9	89,0	88,3
	DP	0,02	0,1	0,04
	CV (%)	2,4	8,7	5,0
50	R (%)	97,5	94,6	96,0
	DP	0,01	0,05	0,01
	CV (%)	1,5	5,0	1,6

R = Recuperação; CV = Coeficiente de Variação; DP = Desvio Padrão; n= n° de repetições.

Para o estudo da precisão utilizou-se o parâmetro repetibilidade representado pelos coeficientes de variação (CV). A Comunidade Européia (EC, 2002) recomenda valores de CV iguais ou inferiores a 20%. Como todos os valores para CV obtidos (Tabela 5.8) foram menores que 20%, o método proposto pode ser considerado preciso.

A Tabela 5.8 apresenta um resumo dos parâmetros avaliados e os resultados obtidos na validação do método para determinação de MCYST-LR em água.

Tabela 5.8 - Resumo dos resultados obtidos na validação do método.

Parâmetro	Resultado	Referências
Seletividade e especificidade	O método foi considerado seletivo e específico para análises de MCYST-LR em água	-
Linearidade	$r = 0,9958$ a $0,9987$	Acima de 0,99 ANVISA - RE nº 899
Faixa linear de trabalho	$1,0 - 50 \mu\text{g L}^{-1}$	-
LOD	$0,21 \mu\text{g L}^{-1}$	-
LOQ	$0,25 \mu\text{g L}^{-1}$	-
Recuperação	$R(\%) = 74$ a 98%	70 -120% - EC/657/2002
Repetibilidade	$CV(\%) = 1,5$ a $19,8 \%$	Até 20 % - EC/657/2002

5.1.4 - Curva de calibração

Para quantificação da MCYST-LR a partir do método proposto, foi construída uma curva de calibração com cinco soluções preparadas com concentrações diferentes $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$, $25 \mu\text{g L}^{-1}$, $50 \mu\text{g L}^{-1}$ e $100 \mu\text{g L}^{-1}$ do padrão de MCYST-LR. Os parâmetros, desvio padrão (DP), exatidão e o coeficiente de variação (CV, %) atribuídos às injeções do padrão MCYST-LR são apresentados na Tabela 5.9. A curva de calibração é ilustrada no Apêndice A, item A.4.

Tabela 5.9 - Dados obtidos para construção da curva de calibração.

Concentração do padrão ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentração média ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Exatidão	DP	CV (%)
1,0	1,05	105,91	0,13	12,63
12,5	12,63	101,10	1,17	9,28
25	22,84	91,39	0,67	2,96
50	49,62	99,25	1,26	2,55
100	102,32	102,32	2,22	2,17

A curva analítica obtida foi considerada linear, pois o coeficiente de correlação (r) foi 0,9988 indicando que as respostas do detector foram proporcionais às concentrações analisadas nos determinados intervalos. De acordo com Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução - RE nº 899 (Brasil, 2003), um coeficiente de correlação igual ou superior a 0,99 é aceitável.

5.1.5 - Teste com água de torneira

Com o intuito de testar o método, uma amostra de água potável (torneira) foi coletada e adicionado ácido ascórbico para desclorar, e em seguida fortificada com $6,2 \mu\text{g L}^{-1}$ do padrão MCYST-LR. Essa solução foi injetada, em triplicatas, obtendo-se concentração média e desvio padrão de $6,1 \mu\text{g L}^{-1}$ e 0,08, respectivamente.

De acordo com os critérios e requisitos estabelecidos pela Comunidade Européia (EC, 2002) para métodos confirmatórios em espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida o tempo de retenção relativo, aceitável, para o analito deve ser equivalente ao tempo de retenção do padrão, sendo tolerável uma variação de $\pm 2,5 \%$. A Figura 5.4 apresenta os cromatogramas referentes às análises de água mili-q (A) e água potável (B) fortificadas com $6,2 \mu\text{g L}^{-1}$ do padrão de MCYST-LR.

Como pode ser observado na Figura 5.4 o tempo de retenção do analito foi compatível com o tempo do padrão de MCYST-LR demonstrando que o método atende ao requisito proposto.

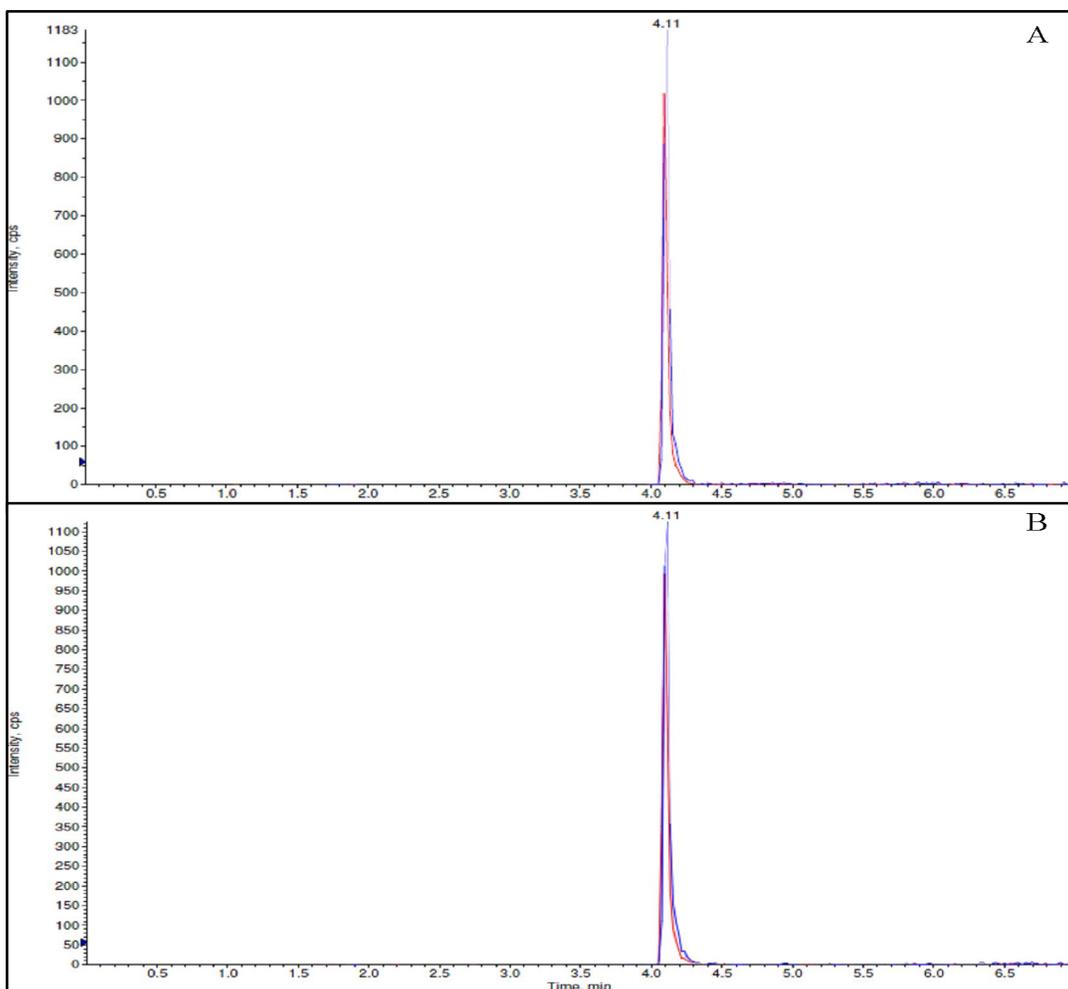


Figura 5.4 - Cromatogramas de análises de água mili-q (A) e água potável (B) fortificadas com $6,2 \mu\text{g L}^{-1}$ do padrão MCYST-LR

5.2 - ETAPA 2 - CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCISTINAS PRODUZIDAS PELA LINHAGEM NPLJ-4 DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

Segundo Soares *et al.* (2004), a linhagem NPLJ-4 referente à *Microcystis aeruginosa* isolada na Lagoa de Jacarepaguá, Rio de Janeiro, apresenta 4 variantes de microcistinas, sendo a MCYST-LR a mais abundante, representando cerca de 80% do total das microcistinas produzidas. Para verificar se o extrato semipurificado proveniente do cultivo da linhagem NPLJ-4 produzido no LAA apresentava essa mesma característica foram realizadas análises do extrato, utilizando as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD) e, posteriormente, a técnica de cromatografia líquida com detector de massas (CL-EM/EM). A Figura 5.5 apresenta os

cromatogramas referentes ao extrato das toxinas semipurificadas proveniente da linhagem NPLJ-4 (A) e ao padrão MCYST-LR (B).

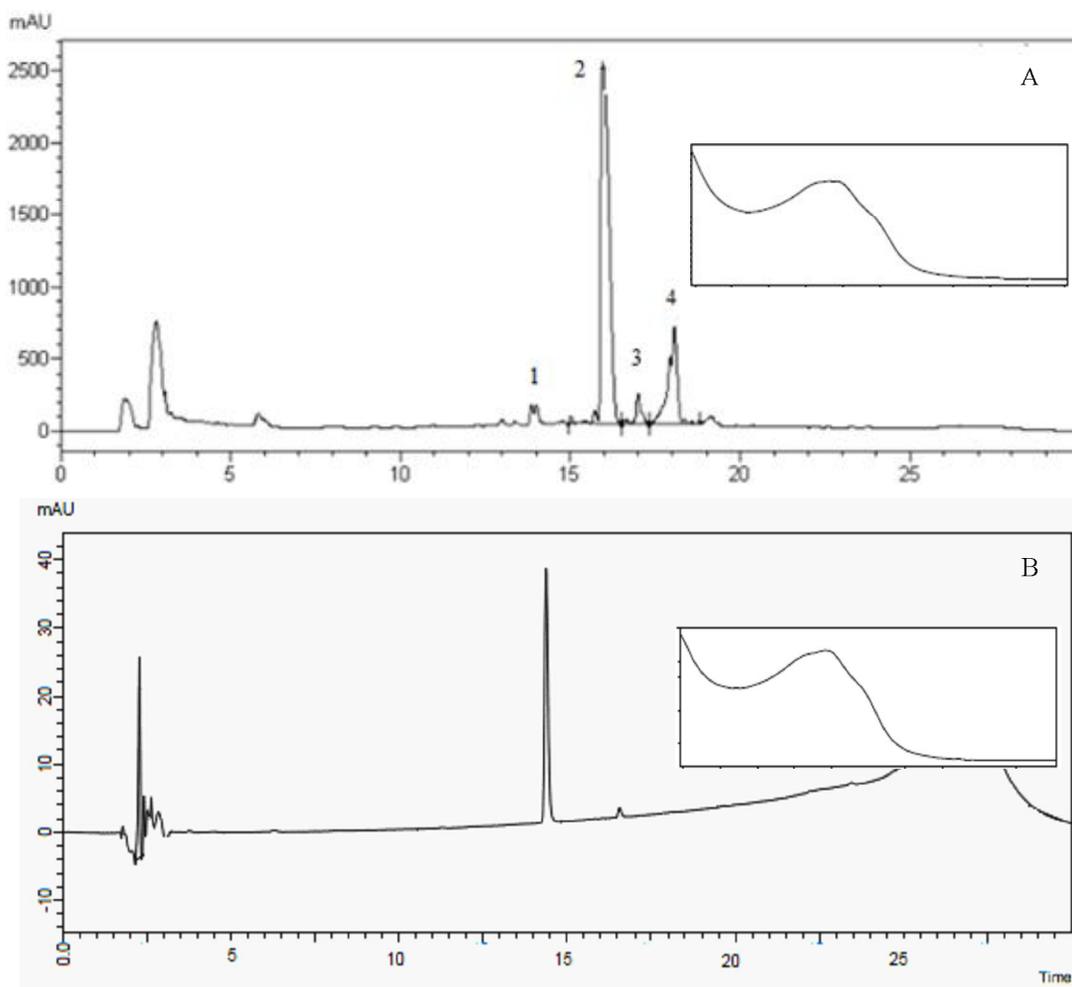


Figura 5.5 - Cromatograma no sistema CLAE-DAD referente ao extrato semipurificado da cepa NPLJ-4 (A) e ao padrão MCYST-LR (B).

Embora o índice de similaridade, de 0,994, obtido entre o padrão MCYST-LR e a fração cromatográfica apresentada do pico 2 (Figura 5.5A) indique que se trata da mesma molécula, quando são comparados os tempos de retenção das frações cromatográficas com o padrão MCYST-LR, observa-se que a fração mais abundante presente no cromatograma, Figura 5.5(A), apresenta um tempo de retenção de 16 min, enquanto que o cromatograma referente ao padrão MCYST-LR, Figura 5.5(B), revela que o tempo de retenção dessa variante é de 14,4 min. Essa diferença nos tempos de retenção sugere que essa fração cromatográfica (pico 2) não corresponde à MCYST-LR.

Como não se dispunha de outros padrões de microcistinas para realização de uma comparação direta, optou-se por investigar as variantes correspondentes aos picos formados por meio de espectrometria de massas. Para tal as frações correspondentes a cada pico foram isoladas por meio do sistema CLAE-DAD.

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

Posteriormente, para verificar a ocorrência da microcistina-LR no extrato foi realizada uma varredura por meio da técnica de espectrometria de massas. A Figura 5.6 apresenta o espectrograma da análise da varredura referente ao extrato semipurificado de microcistinas realizada na faixa de 700 a 1100 unidades de massa atômica (a.m.u). Observa-se que a toxina mais abundante apresenta massa molecular m/z 1037,7 ($M+H^+$) divergindo dos estudos realizados, em 2004, por Soares e colaboradores com a mesma linhagem NPLJ-4, cujos relatos apresentam a MCYST-LR, m/z 995,5 ($M+H^+$), como a variante mais abundante.

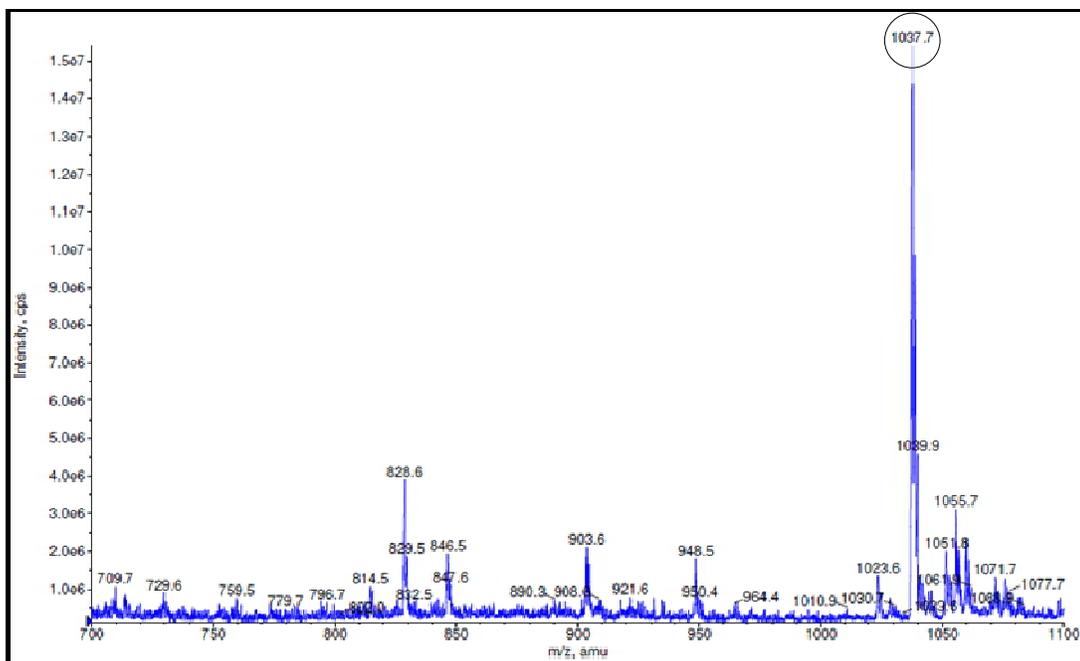


Figura 5.6 - Espectro de massas EM referente ao extrato semipurificado de microcistina.

A Figura 5.7 apresenta a varredura referente à fração cromatográfica correspondente ao pico 2, onde se verifica, mais uma vez a predominância do composto m/z 1037,8. A fragmentação dessa molécula, apresentada na Figura 5.7(B), revela a presença do fragmento Adda, m/z 135, característico de uma microcistina (Kondo *et al.*, 1992). As fragmentações de outras espécies químicas, observadas no espectro, foram realizadas, contudo não se observou a presença de fragmentos característicos de microcistinas.

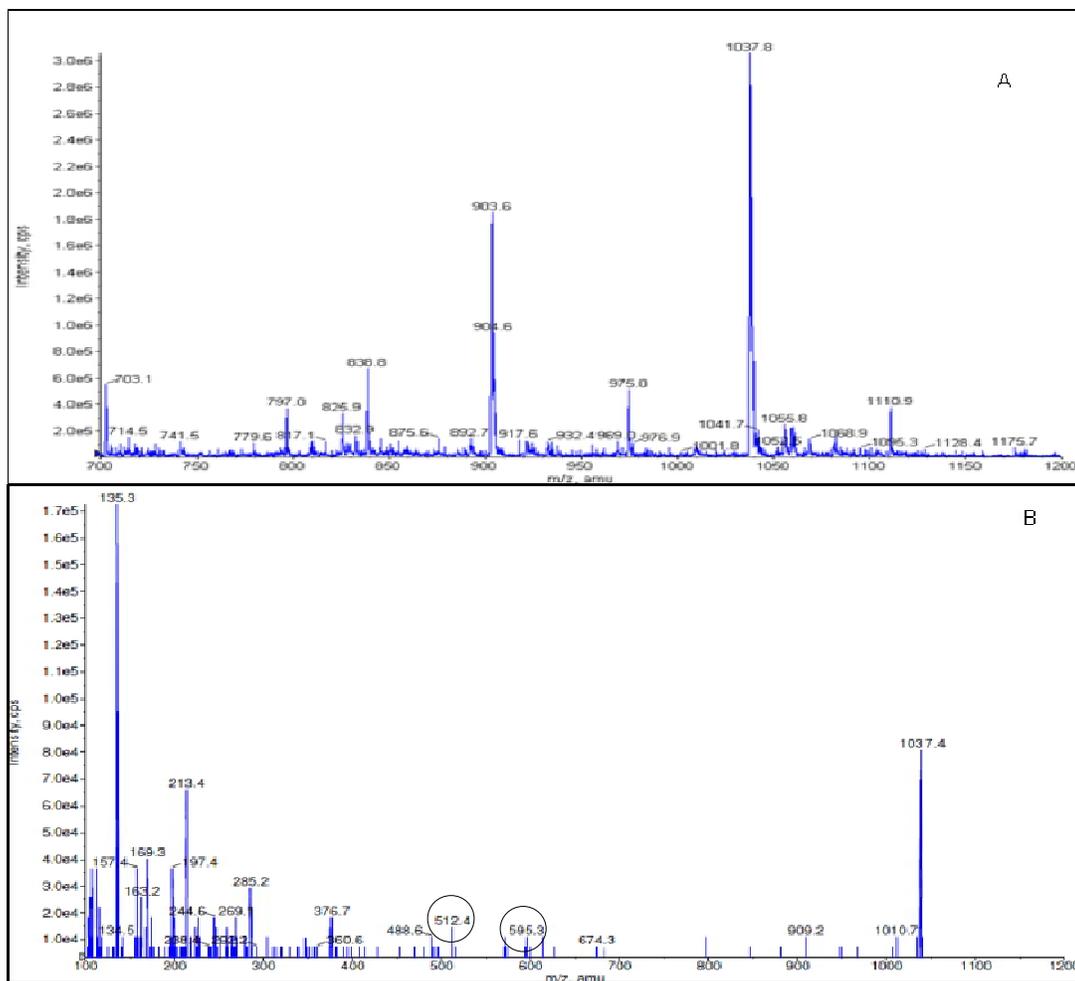


Figura 5.7 - Espectro de massas EM (A) e EM/EM (B) referente ao pico (2) predominante observado no extrato de microcistinas.

Com base nos estudos realizados pelos pesquisadores Matthiensen *et al.* (2000), Park *et al.* (2001) e Silva (2006) sugere-se que o componente de massas 1037,7 ($M+H^+$) corresponde à variante [D-Leu] MCYST-LR, pois a presença dos fragmentos m/z 213, 375 e 286 (Figura 5.7 B) mostra que não ocorreram desmetilações nos grupos Mdha e MeAsp e os fragmentos m/z 595 e 512 confirmam a estrutura $Mdha^7-Leu^1-Leu^2-MeAsp^3-Arg^4$ e $Leu^1-Leu^2-MeAsp^3-Arg^4$, respectivamente.

Em estudos realizados no Brasil, Matthiensen e colaboradores detectaram a presença predominante da [D-Leu] MCYST-LR em florações ocorridas em dezembro de 1996 no estuário da Lagoa de Patos. As análises cromatográficas, espectrométricas de massas e de ressonância magnética nuclear permitiram a elucidação da sua estrutura molecular. Os dados obtidos definiram este composto como tendo um componente de massas 1037,6

(M+H⁺) apresentando a fórmula molecular C₅₂H₈₀O₁₂N₁₀ correspondente a um peptídeo cíclico -Leu¹- Leu²-Masp³-Arg⁴-Adda⁵-Glu⁶-Mdha⁷.

Ainda segundo Matthiensen *et al.* (2000), Park *et al.* (2001) e Silva (2006), a única diferença estrutural entre a variante [D-Leu] MCYST-LR e a MCYST-LR é a substituição de alanina (Ala) por uma Leucina (Leu) na posição 1 da molécula (Figura 5.8). Essa substituição resulta em diferença de 42 unidades de massa molecular entre a MCYST-LR, de m/z equivalente a 995,7 (M+H⁺), e a [D-Leu] MCYST-LR, de m/z equivalente a 1037,6 (M+H⁺).

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

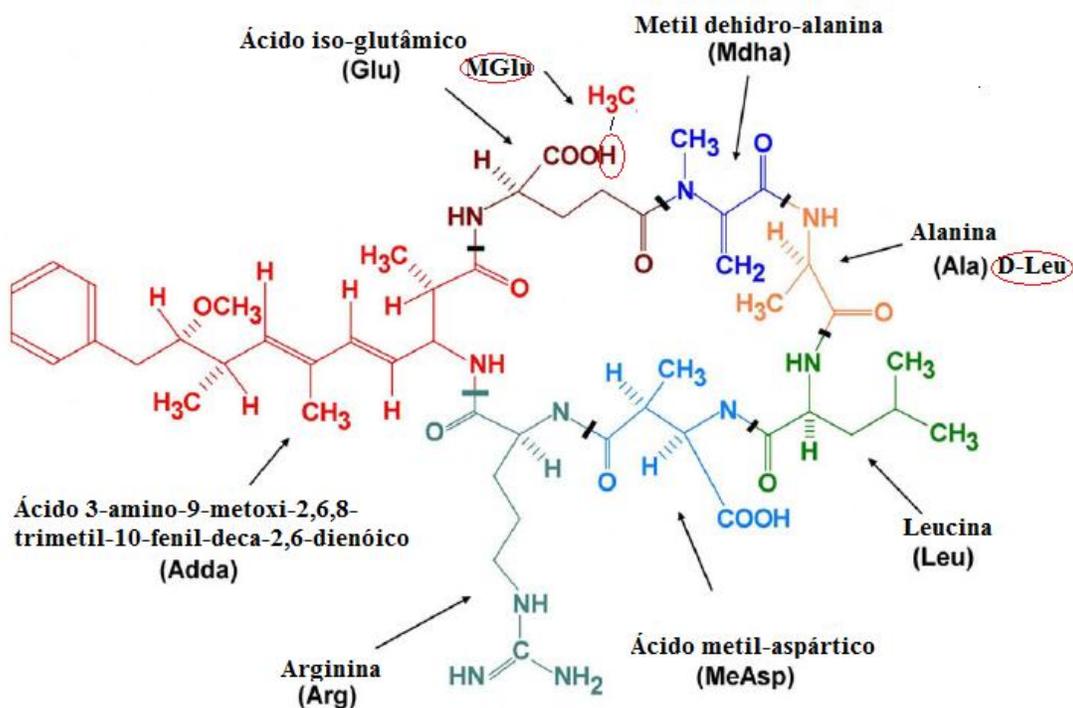


Figura 5.8 - Estrutura molecular referente à MCYST-LR, modificada a partir de Merel *et al.*, 2009.

A toxicidade da toxina [D-Leu] MCYST-LR foi avaliada por meio de bioensaios realizados com injeções intraperitoniais em camundongos (Matthiensen *et al.*, 2000). Os

estudos comprovaram que essa variante confere toxicidade semelhante à apresentada pela MCYST-LR. De acordo com os autores a dose letal mínima determinada pelo bioensaio em camundongos foi de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$, para as duas toxinas.

A Figura 5.9(A) apresenta o espectrograma de massas EM e a Figura 5.9(B) o espectrograma dos fragmentos EM/EM referente à fração cromatográfica do pico 1 da Figura 5.5(A). Observa-se na Figura 5.9(A) que o componente mais abundante apresenta massas 1071,7 ($M+H^+$).

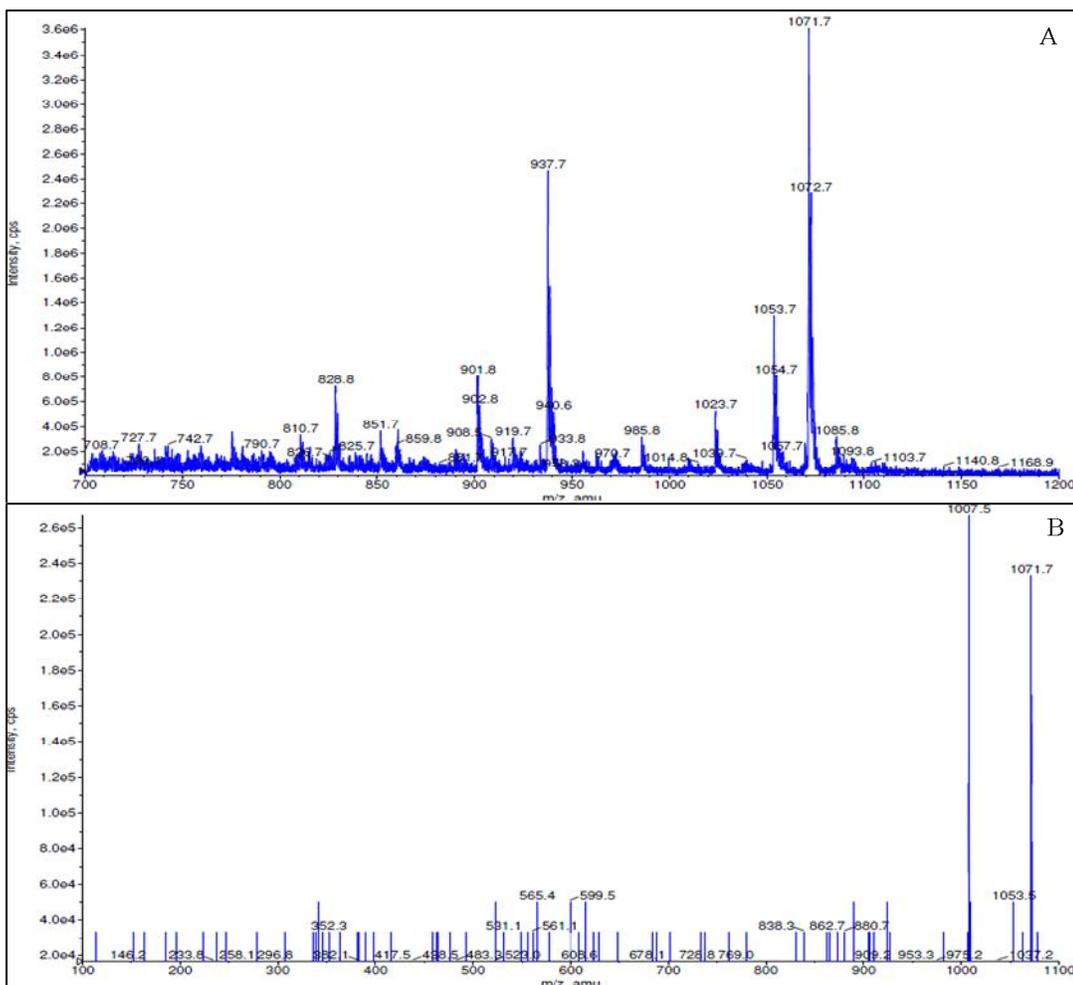


Figura 5.9 - Espectrograma de massas EM (A) e EM/EM (B) referente ao pico (1) observado no extrato de microcistinas.

Neste estudo não foi possível a elucidação estrutural da molécula m/z 1071,7, devido à baixa resolução do espectro de fragmentação obtido. Contudo, Albuquerque-Junior *et al.* (2006) realizaram estudos com toxinas oriunda da linhagem, NPLJ-4, de *Microcystis*

aeruginosa, e observaram a presença de um composto de m/z 1071,65 ($M+H^+$). Ao analisarem os dados obtidos por meio da técnica de espectrometria de massas, os autores identificaram essa toxina como sendo a variante [D-Asp³, ADMAdda⁵, Dhb⁷] MCYST-HtyrR. Os autores não apresentaram a sequência dos fragmentos característicos da estrutura molecular.

A Figura 5.10(A) apresenta o espectrograma de massas (EM) referente à fração cromatográfica do pico 3 da Figura 5.5(A). Observa-se nessa Figura que o componente mais abundante apresenta massas m/z 1023,7 ($M+H^+$). Foi realizado a fragmentação dessa molécula cujos espectrograma dos fragmentos EM/EM estão apresentados na Figura 5.10 (B).

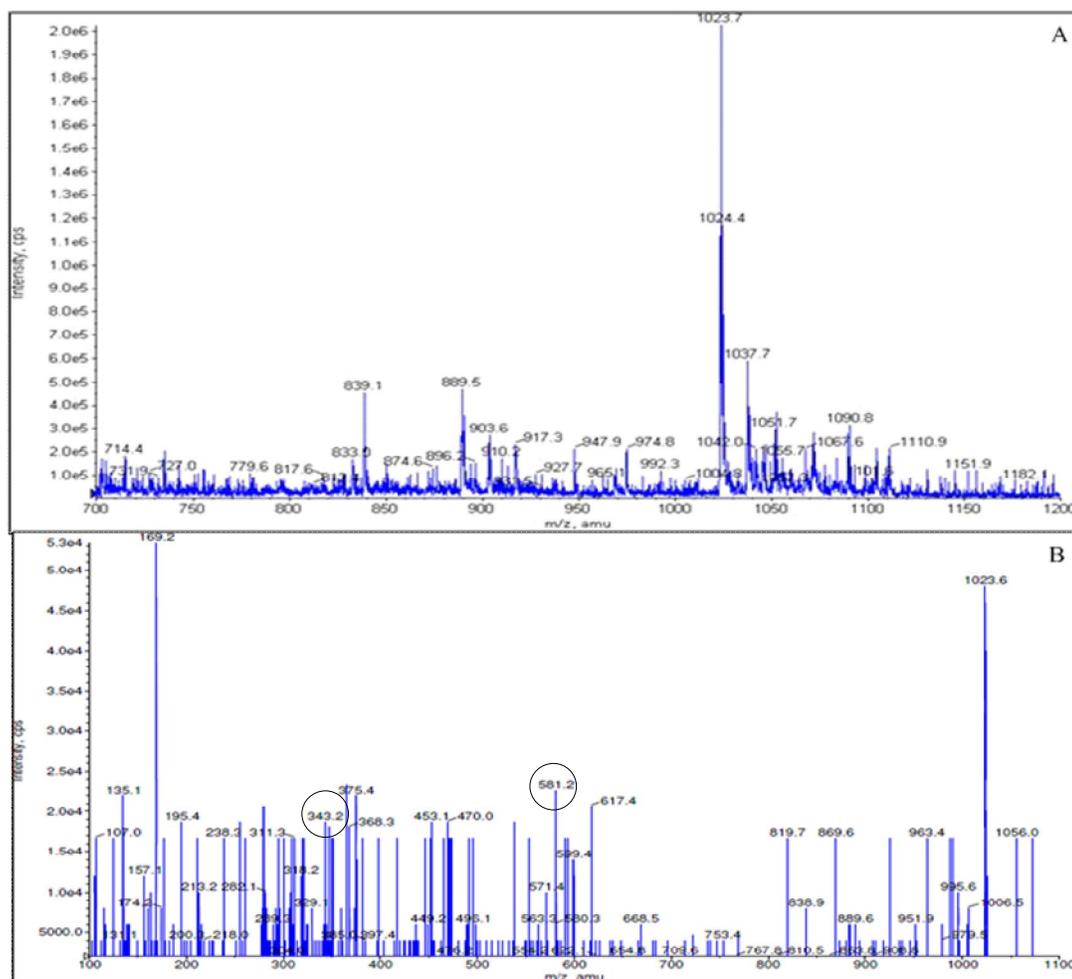


Figura 5.10 - Espectrograma de massas EM (A) e EM/EM (B) referente ao pico (3) observado no extrato de microcistinas.

Com base na literatura analisada (Carmichael, 1992; Stenico *et al.*, 2009; Sangolkar *et al.*, 2009) sugere-se que esse componente de massa 1023,7 ($M+H^+$), seja característico da variante [D-Asp³] MCYST-RR. A presença dos fragmentos m/z 213 e 375 no espectrograma de massas (Figura 5.10B) indica que não ocorreram desmetilações no grupo Mdha ou Glu. Contudo, não foi observado a presença do fragmento m/z 286, característico do fragmento MeAsp, sugerindo, dessa forma, a ocorrência de desmetilação nesse grupamento da molécula e portanto sendo modificado para D-Asp. Sendo assim, a sequência dos fragmentos m/z 581 e 343 indicam a estrutura Mdha⁷-Ala¹-Arg²-[D-Asp]³-Arg⁴ e Ala¹-Arg²-[D-Asp]³+H, respectivamente.

A Figura 5.11(A) apresenta o espectrograma de massas EM referente à fração cromatográfica do pico 4 da Figura 5.5(A). Essa fração cromatográfica apresentou quatro constituintes mais significativos correspondentes às massas 921,6, 917,7, 1051,8 e 1055,8 ($M+H^+$). Esses constituintes foram fragmentados, sendo que os compostos m/z 921,6 e 917,7 não apresentaram padrão de fragmentação característico de microcistinas. As Figuras 5.11(B) e 5.11(C) correspondem à fragmentação em EM/EM para as massas 1051,8 e 1055,8, respectivamente.

No espectro relativo a m/z 1051,8, Figura 5.11(B), não foi observada a presença dos fragmentos m/z 213 e 375 correspondentes as sequências Glu⁶-Mdha⁷ + H e C₁₁H₁₄O-Glu⁶-Mdha⁷ + H (Bateman *et al.*, 1995), respectivamente, sugerindo dessa forma a ocorrência de modificação nesta sequência de fragmentos. Contudo, observa-se a presença, abundante, do fragmento m/z 227 que pode corresponder ao fragmento metilado do ácido glutâmico (MGlu) cuja sequência é MGlu⁶-Mdha⁷ + H.

Bateman *et al.* (1995) em suas análises, por meio de técnica de espectrometria de massas, com microcistinas provenientes da espécie *Microcystis aeruginosa* relataram em seus estudos a presença da MCYST-LR metilada no ácido glutâmico (Glu). A ocorrência de metilações neste grupo foi evidenciada também por Oksanen *et al.* (2004) quando analisaram a espécie *Nostoc sp.*, linhagem IO-102-I, que verificaram, em seus estudos, a presença de metilações no ácido glutâmico constituinte da variante MCYST-LR.

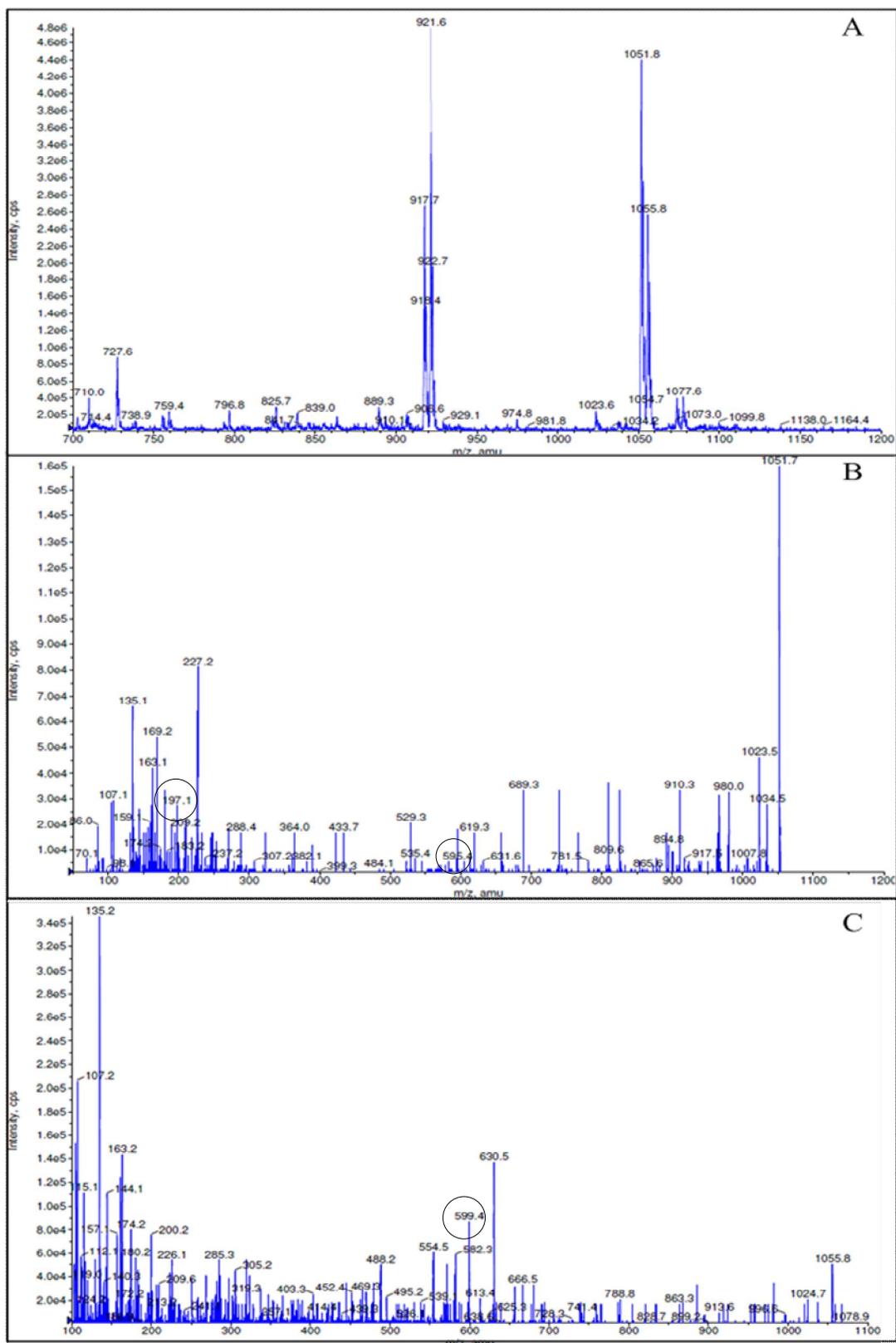


Figura 5.11 - Espectrograma de massas EM do pico 4 (A), EM/EM referente ao constituinte m/z 1051,7 (B) e EM/EM do constituinte m/z 1055,8 (C).

Com base nessas informações sugere-se que o composto de massas 1051,8, citado anteriormente, corresponde ao isômero metilado [MGlu, D-Leu]-MCYST-LR. A presença do fragmento m/z 174 indica a presença de arginina na molécula (Batemen *et al.*, 1995) e os fragmentos m/z 595 e 197 confirmam as estruturas $\text{Mdha}^7+\text{Leu}^1-\text{Leu}^2-\text{MeAsp}^3-\text{Arg}^4 + \text{H}$ (Park *et al.*, 2001) e $\text{Mdha}^7-\text{Leu}^1+\text{H}$ (Silva, 2006), respectivamente. O fragmento m/z 227 pode corresponder à estrutura $\text{MGlu}-\text{Mdha} + \text{H}$ (Tabela 5.10). A substituição do H pelo grupo CH_3 no grupamento Glu (Figura 5.8) resulta na diferença de 14 unidades de massas atômica entre a [D-Leu] MCYST-LR, de m/z equivalente a 1037,7 ($\text{M}+\text{H}^+$), e a [MGlu, D-Leu]-MCYST-LR, de m/z equivalente a 1051,7 ($\text{M}+\text{H}^+$).

O composto de massa 1055,8 (Figura 5.11C) foi parcialmente identificado. A presença dos fragmentos 599 pode corresponder à estrutura $\text{Arg}^4-\text{Adda}^5-\text{Glu}^6 + \text{H}$ (Lombardo *et al.*, 2006). Observa-se também, no espectro da Figura 5.11C, a presença do fragmento m/z 174 característico de resíduo de arginina. Sendo assim, as evidências apontam para um isômero de massa de uma variante MCYST-XR.

Em função dos dados obtidos a partir das varreduras das frações cromatográficas relativas aos picos 1 a 4 da Figura 5.5(A), e das fragmentações das massas mais abundantes em cada espectro dos picos correspondentes (Tabela 5.10), e considerando os relatos da literatura científica, sugere-se que o extrato semipurificado de microcistinas obtido a partir da linhagem NPLJ-4 cultivada no LAA contém, predominantemente, a variante [D-Leu]MCYST-LR (pico 2). As demais variantes podem ser [D-Asp]MCYST-RR, MGlu [D-Leu] MCYST-LR e a variante identificada parcialmente MCYST-XR, mas é necessário um estudo mais aprofundado.

Como a variante mais abundante no extrato semipurificado proveniente da linhagem NPLJ-4 de *Microcystis aeruginosa* não corresponde a microcistina-LR e como não há padrão da variante [D-Leu] MCYST-LR o método quantitativo desenvolvido não pôde ser utilizado para a análise de microcistinas nos ensaios de oxidação com hipoclorito de sódio objeto do item 5.3.

Tabela 5.10 - Fragmentos das variantes de microcistinas produzidas pela linhagem de *Microcystis aeruginosa* - NPLJ-4.

Fragmento	m/z			
	Pico 1	Pico 2	Pico 4	Pico 4
[M+H]	1023	1037	1051	1055
[M+H] -OH	1006		1034	
[M+H] -NH ₃			1034	
[M+H] -CO	995	1010	1023	
[M+H] -COOH	979		1007	
[M+H] -Ala	952			
[M+H] -Arg	869		895	895
[M+H] -frag Adda 135 +H	889		917	
[M+H] -[D-Asp]	908			
[M+H] -[M-Glu] +2H			910	
MeAsp-Arg-Adda-Glu + H				728
MeAsp-Arg-Adda + H/ Arg-Adda-Glu +H	599			599
Mdha-Ala-Arg-[D-Asp]-Arg	581			582
Mdha-Leu-Leu-MeAsp-Arg		595	595	
Arg-Adda-CO + H	571			
Arg-MeAsp-Leu-Ala-Mdha + 2H				554
Arg-Adda + H	470			469
163- Glu-Mdha+Leu		488		
Leu-Leu-MeAsp-Arg		512		
Arg-MeAsp-Leu + H			399	
Frag. Adda (163)-Glu-Mdha+H	375	376		
Ala-Arg-[D-Asp] + H	343			
Frag. Adda (163)-MGlu + H			307	
Arg-MeAsp + H		286		285
Leu-Leu + H/ MGlu-Mdha + H			227	226
Mdha-Leu + H		197	197	
Arg+NH ₂ + 2H	174		174	174
Glu-Mdha + H	213	213		213
CH(CH ₃)-CH=C(CH ₃)- CH=CH-CH ₂ -CH(CH ₃)-CO		163	163	163
Mdha-Leu - CO+ H		169	169	
Frag. Adda	135	135	135	135
Variante sugerida	[D-Asp] MCYST- RR	[D-Leu] MCYST- LR	[MGlu, D-Leu] MCYST- LR	MCYST- XR

5.3 - ETAPA 3 – OXIDAÇÃO DE MICROCISTINA COM CLORO

Para avaliar preliminarmente o comportamento das variantes identificadas no extrato semipurificado de microcistinas, foram realizados dois ensaios de oxidação (1 e 2) que foram avaliados usando a espectro de massas EM da varredura das amostras oxidadas obtido nos ensaios realizados.

Para permitir essa avaliação, optou-se por trabalhar com amostras com concentrações de microcistinas elevadas. Assim os ensaios 1 e 2 foram realizados com concentração inicial de microcistinas de cerca de $2,2 \text{ mg L}^{-1}$, dose de cloro de 60 e $66,5 \text{ mg L}^{-1}$, e tempos de contato de 3 e 24 horas. A temperatura e o valor de pH foram, respectivamente, 24°C e $7,4 \pm 0,1$. A Figura 5.12 ilustra os espectros de massas (varredura em EM) referentes às amostras antes e após a oxidação nos dois tempos de contato.

As quatro variantes foram analisadas considerando as massas mais abundantes observadas nos espectros de massa dos picos 1 a 4 (Figura 5.7A, Figura 5.9A, Figura 5.10A e Figura 5.11A). Ao comparar o espectrograma da Figura 5.12(A) com o espectrograma da Figura 5.12(B) observa-se que as variantes m/z 1023,7 1037,7 e 1055,8 desapareceram após horas de tempo de contato, enquanto que a variante m/z 1051 ainda é observada após esse tempo de contato. Essa variante, m/z 1051, parece ser a mais difícil de ser oxidada, pois no espectrograma da análise da amostra oxidada no tempo de contato de 24 horas ainda é observada a presença dessa toxina, Figura 5.12(C).

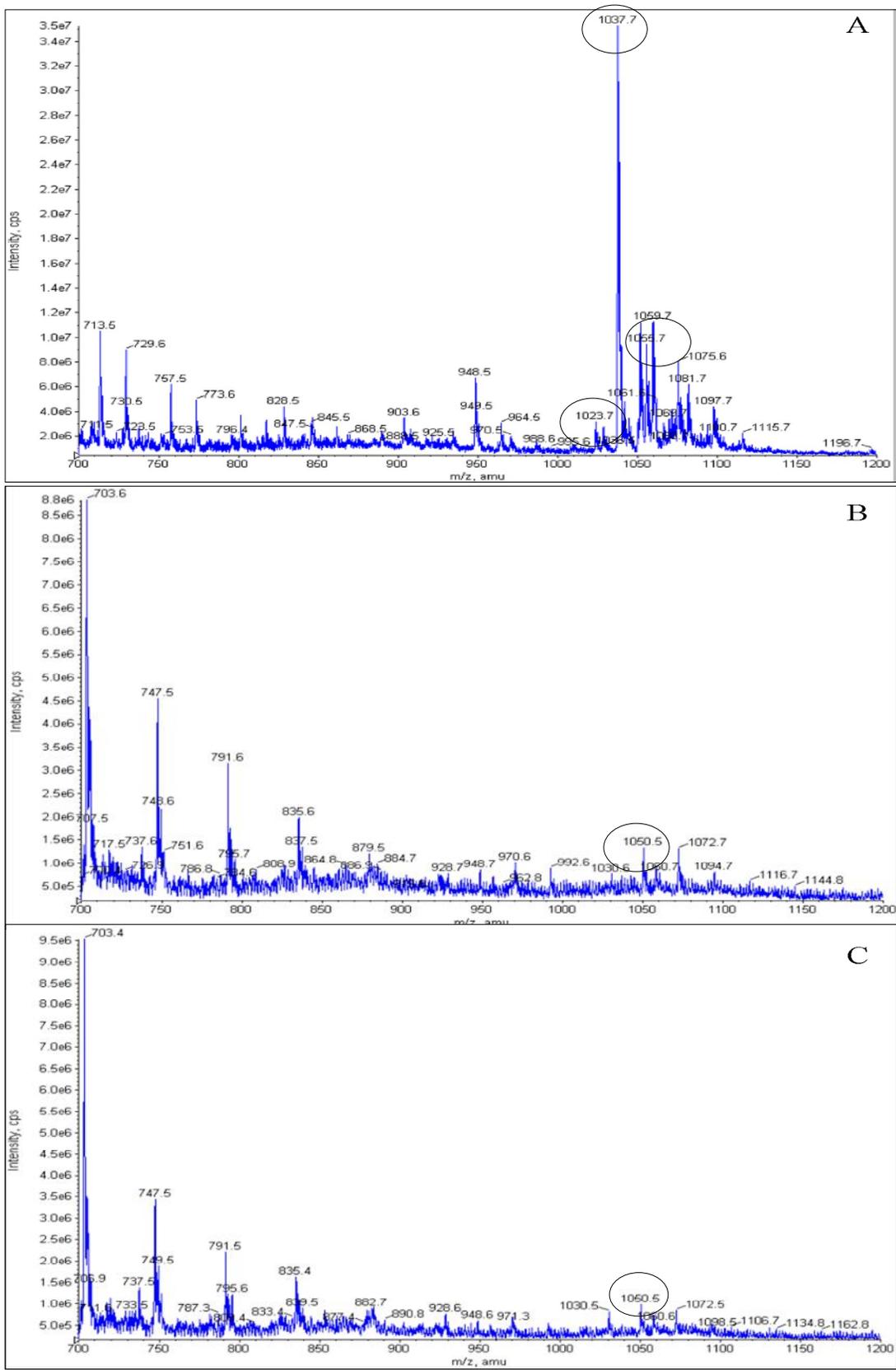


Figura 5.12 - Espectrograma de massas EM antes da oxidação (A), EM após 3 horas (B) e EM após 24 horas de tempo de contato (C).

A avaliação da eficiência de remoção das microcistinas, por meio da oxidação com cloro, nos tempos de contatos de 15 e 30 minutos foi estudada, também nessa etapa, por meio dos ensaios 3, 4, 5, e 6. A Tabela 5.11 apresenta o resumo das condições dos ensaios realizados, sendo que os dados obtidos nos ensaios estão apresentados no Apêndice B, item B.1. As temperaturas do ar ambiente e das amostras foram monitoradas durante os ensaios sendo observadas variações de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Tabela 5.11- Resumo das condições de realização dos ensaios de oxidação das microcistinas com o cloro - etapa 1.

Ensaio	Conc. MCVYST ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Dose de cloro (mg L^{-1})	Varição do pH da oxidação	Nº de repetições
3	103,3	0,5 - 2 - 4 - 7,9	5,8 - 7,8	3
4	44,1	0,5 - 2 - 4 - 7,9	5,8 - 7,8	3
5	40,1	1,0 - 1,5 - 2,1 - 2,5	5,8 - 6,2	2
6	21,4	1,1 - 1,6 - 2,0	5,8 - 6,2	2

Como pode ser observado na Tabela 5.11 tanto as concentrações iniciais de microcistinas na água de estudo como as doses de cloro adicionadas variaram nos quatro ensaios realizados. As doses de cloro $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, 2 mg L^{-1} , 4 mg L^{-1} e $7,9 \text{ mg L}^{-1}$ foram valores inicialmente previstos, contudo, não foram, necessariamente, as doses de cloro aplicadas para todos os ensaios, pois foi observada no decorrer da realização dos ensaios a necessidade de estreitar a faixa das doses a serem avaliadas (Tabela 5.11). A maior eficiência na remoção de microcistinas e o teor de cloro residual de cloro livre foram os critérios estabelecidos para decidir a dosagem mínima e a máxima de cloro para os ensaios seguintes (ensaios 4, 5 e 6), ou seja, a dosagem que fornecesse maior remoção de toxinas com o residual de cloro livre mínimo, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, recomendado pela Portaria do MS nº518/2004 para águas destinadas ao consumo humano.

Os valores das doses de cloro adicionado às amostras mostrados nas Tabelas e Figuras deste capítulo representam a média dos valores de cloro medido nos frascos de controles de dosagens nas repetições dos ensaios realizados.

A Figura 5.13 apresenta os resultados de cloro residual livre medido nas amostras de acordo com as doses de cloro aplicadas, após os tempos de contato de 15 minutos e 30 minutos. Na Figura 5.14, são apresentadas as concentrações de microcistinas iniciais e

residuais obtidas para essas condições. Os valores estão expressos por meio das médias aritméticas das concentrações de toxinas observadas nas três repetições, de cada ensaio, assim como os seus respectivos desvios padrões.

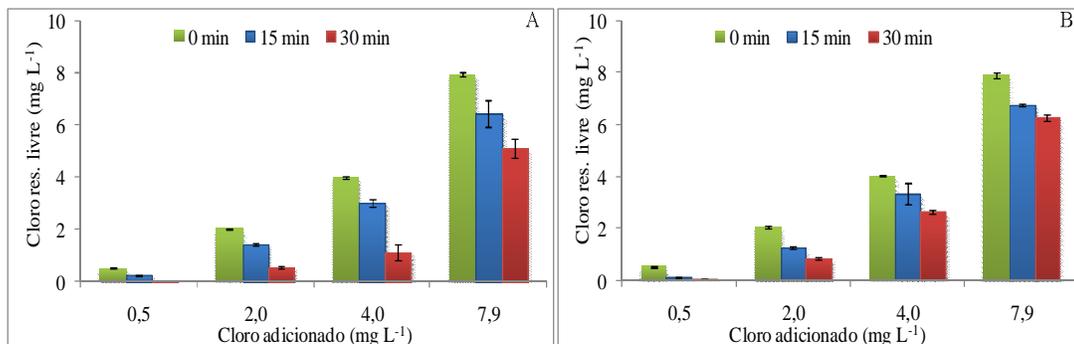


Figura 5.13 - Valores médios do cloro residual livre (mg L⁻¹) inicial e nos tempos de contato 15 e 30 min para as concentrações médias de 103,3 (A) e 44 µg L⁻¹ (B) de microcistinas.

A Figura 5.13 mostra que ao aplicar a dose de 0,5 mg L⁻¹ de cloro nos ensaios 3 e 4 ocorreu consumo total do cloro. Contudo, com a aplicação de doses de cloro a partir de 2 mg L⁻¹ foram observados residuais de cloro livre acima de 0,5 mg L⁻¹ alcançando valores de até 6,3 mg L⁻¹ ao final de 30 minutos de tempo de contato.

As concentrações de cloro, nos frascos de controle, referentes às doses de cloro aplicadas nos tempos de contato de 15 e 30 minutos foram próximos em todos os ensaios, indicando que não ocorria perda de cloro significativa durante os ensaios, de modo que o consumo de cloro observado pode ser atribuído às reações de oxidação das microcistinas presentes na água de estudo.

Os dados de microcistinas referentes ao ensaio 3, Figura 5.14, apresentaram maior dispersão do que no ensaio 4, pois nesta fase inicial os procedimentos metodológicos do processo de oxidação estavam sendo ajustados. Como a concentração do extrato semipurificado de microcistinas era elevada foi necessário realizar diluições. Sendo assim, os desvios das concentrações de microcistinas observados nesse ensaio podem ser atribuídos às diluições sucessivas das alíquotas.

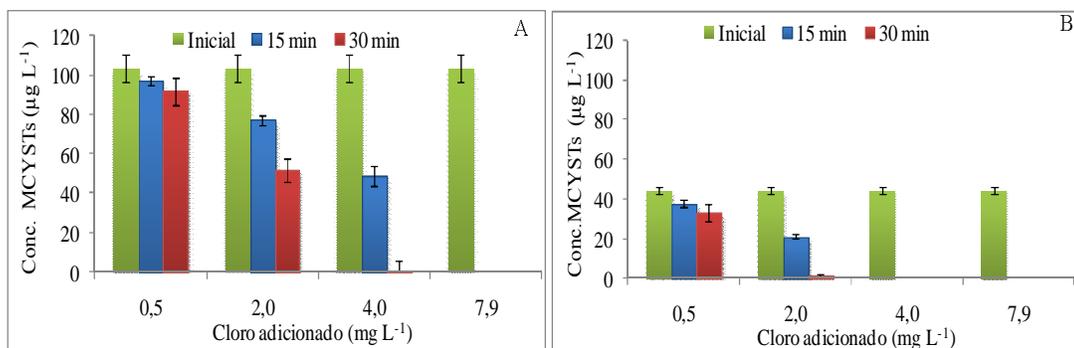


Figura 5.14 - Residuais de microcistinas nos tempos de contato de 15 e 30 minutos para as doses de cloro adicionadas à água de estudo com concentrações iniciais de microcistinas de 103,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (A) e 44,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (B).

Ainda com relação à realização dos ensaios 3 e 4 destaca-se a dificuldade em manter o valor de pH próximo de 6 durante o processo de oxidação. O valor do pH da água de estudo era mantido próximo a 6, contudo, ao realizar medições logo após a adição do cloro à água de estudo, observava-se que os valores de pH variavam de 5,8 a 7,8. As maiores variações ocorriam quando doses mais elevadas do cloro eram aplicadas, ou seja, a partir de 2 mg L^{-1} .

Os dados obtidos relativos à concentração de microcistinas na água de estudo, sem adição de cloro (branco), nos tempos de contato de 0, 15 e 30 minutos não apresentaram variações apreciáveis, indicando que não ocorreu degradação das microcistinas durante o tempo de realização de cada ensaio (Apêndice B, item B.1, Tabela B5).

Para a concentração média inicial de microcistinas de 103,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ observa-se na Figura 5.14(A) que foi necessária a dosagem de cerca de 4 mg L^{-1} de cloro para promover a quase total remoção das microcistinas após o tempo de contato de 30 minutos. Nesta dosagem o cloro residual livre após 30 minutos era de 1,1 mg L^{-1} .

Di Bernardo *et al.* (2007) relatam resultados obtidos com a aplicação de dose de 5,0 mg L^{-1} de cloro, nos quais foi verificada a remoção de 96% de microcistinas, após 30 minutos, para uma concentração inicial de cerca de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os ensaios de oxidação foram realizados sob condições de pH próximas à neutralidade e microcistinas sem processo de purificação diluídas em água deionizada. No presente estudo, no ensaio 3, cuja concentração média inicial de microcistinas era 103,3 $\mu\text{g L}^{-1}$, a aplicação de dose de 4 mg L^{-1} promoveu quase total remoção de microcistinas, cerca de aproximadamente 99%, ao

final de 30 minutos, sendo observado um residual de cloro livre de $1,1 \text{ mg L}^{-1}$. Como este estudo foi realizado com microcistinas semipurificadas, menor dose de cloro foi necessária na oxidação das microcistinas. A diferença entre o trabalho relatado e o presente trabalho pode ser explicada por uma demanda de cloro associada à matéria orgânica extracelular proveniente das microcistinas na água de estudo usada no primeiro trabalho.

O estudo de Merel *et al.* (2009) indica que um mol de MCYST-LR tem uma demanda de cloro de 12,6 mol em 30 minutos. Essa demanda está associada a sua estrutura, pois a ação do cloro ocorre nos grupos aminos, além do Adda, grupo comum às microcistinas. Quanto mais grupos aminos estiverem presentes em uma molécula de microcistina, maior será a demanda de cloro requerida na oxidação. Portanto, o tipo de microcistina presente na amostra é muito importante no processo de oxidação.

Com relação ao ensaio 4, concentração inicial de microcistinas de $44,1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, Figura 5.14 (B), a dose de 2 mg L^{-1} foi suficiente para a remoção de 97 % das toxinas quando expostas ao tempo de contato de 30 minutos. O valor de pH medido logo após a adição do cloro, para essa dose, era de $7,0 \pm 0,2$.

Como foi observado maiores variações do pH quando doses de cloro mais elevadas eram aplicadas, o ajuste de pH para os ensaios 5 e 6 foram realizados usando um procedimento diferente daquele usado para os ensaios 3 e 4. Este procedimento consistiu do ajuste do pH da água de estudo antes da adição da solução oxidante, de forma que, ao aplicar a dosagem do cloro, os valores de pH medidos, imediatamente após a aplicação, apresentavam variações de $6 \pm 0,2$.

O hipoclorito de sódio quando usado em doses mais elevada tende a elevar o valor de pH da solução devido à alcalinidade desse composto (Nicholson *et al.*, 1994). Isto foi observado também nos estudos de Acero *et al.* (2005) durante ensaios de oxidação de microcistinas, usando o hipoclorito de sódio, e valores de pH entre 4 e 9. Os autores observaram que para as dosagens de cloro mais elevadas era necessário o ajuste do pH para valores abaixo de 8 a fim de garantir a eficiência do processo de oxidação.

Conforme mostrado na Tabela 5.11 e Figura 5.15, no ensaio 5 foram aplicadas as doses intermediárias de cloro de 1 mg L^{-1} , $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, $2,1 \text{ mg L}^{-1}$ e $2,5 \text{ mg L}^{-1}$, para uma

concentração inicial de microcistinas de $40,1 \mu\text{g L}^{-1}$. A dose de cloro de $2,1 \text{ mg L}^{-1}$ promoveu 99% de remoção de microcistinas, sendo observado residual de cloro livre de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ao final de 30 minutos.

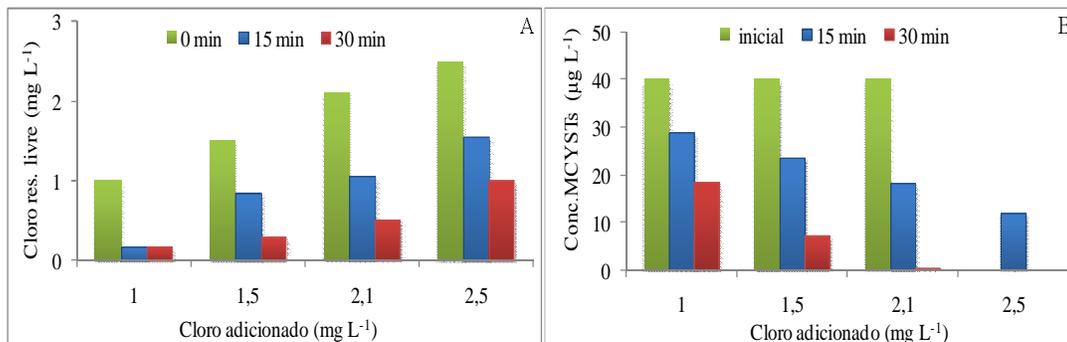


Figura 5.15 - Residuais de cloro livre (A) e de microcistinas (B) obtidos após aplicação do cloro nos tempos de 15 e 30 minutos.

A Tabela 5.12 mostra a influência do valor do pH de oxidação ao comparar os resultados obtidos nos ensaios 4 e 5, cujas concentrações iniciais de microcistinas eram próximas. Foi observado que a demanda de cloro livre no ensaio 5 foi de $1,2 \text{ mg L}^{-1}$, para a dose aplicada de $2,1 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto que no ensaio 4, foi de $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ para aproximadamente a mesma dose de cloro. A maior remoção observada para o ensaio 5 (99%) em relação ao ensaio 4 (97%) pode ser explicada pelo aumento da relação HOCl/OCl⁻ no valor de pH mais baixo já que o ácido hipocloroso apresenta potencial de oxidação maior quando comparado com o íon hipoclorito.

Tabela 5.12 - Comparativos dos resultados obtidos nos ensaios de oxidação 4 e 5 com diferentes valores de pH no tempo de contato de 30 minutos.

Ensaio	Conc. inicial de MCYST ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Conc. final de MCYST ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Dose de cloro (mg L^{-1})	Demanda de cloro (mg L^{-1})	Valor de pH	Remoção (%)
4	44,1	1,3	2,0	0,8	7	97
5	40,1	0,3	2,1	1,2	6	99

Hart *et al.* (1998) realizaram estudos para simular o efeito da cloração no final do tratamento de água na remoção de MCYST-LR. Os autores usaram concentração de $6,9 \mu\text{g L}^{-1}$ de MCYST-LR e dose de $1,7 \text{ mg L}^{-1}$ de hipoclorito de sódio. Para o valor de pH igual a 5, a remoção alcançada foi maior que 93% no tempo de contato de 30 minutos. O cloro residual livre foi de $0,7 \text{ mg L}^{-1}$. Com o valor de pH 7 e a mesma dosagem de cloro,

nenhuma remoção significativa foi alcançada após 30 minutos e somente após 22h de tempo de contato a remoção foi próxima de 90%. Para um valor de pH 9, a redução de MCYST-LR foi baixa mesmo após 22h de contato. Os resultados demonstraram que a eficiência no processo de oxidação com o composto hipoclorito de sódio é fortemente dependente do pH.

O ensaio 6 foi realizado com uma concentração inicial de microcistinas de $21,4 \mu\text{g L}^{-1}$, cerca de metade da concentração dos ensaios 4 e 5. A Figura 5.16 apresenta os resultados obtidos referentes aos residuais de microcistinas para os tempos de contato de 15 e 30 minutos.

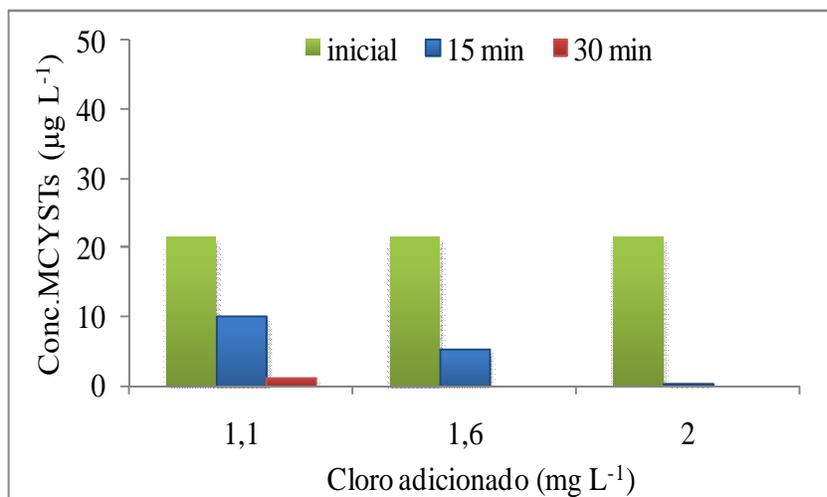


Figura 5.16 – Valores de concentrações iniciais e residuais de microcistinas para as doses de cloro aplicadas nos tempos de contato de 15 e 30 minutos.

Referente às remoções obtidas, se os resultados do ensaio 5 forem comparados com os resultados obtidos no ensaio 6, verifica-se que para as duas concentrações iniciais de microcistinas ($40,1$ e $21,4 \mu\text{g L}^{-1}$), quando aplicada a mesma dosagem de cloro, a concentração de microcistinas removidas é próxima, e pode ser considerada semelhante frente aos erros experimentais (Tabela 5.13). Ao aplicar diferentes doses de cloro para uma mesma concentração inicial de toxinas observa-se um aumento praticamente proporcional na eficiência de remoção. Este resultado converge com o relato de Acero *et al.* (2005) que ao analisarem a oxidação de MCYST-LR com cloro verificaram que a taxa de degradação aumentava com o aumento da dose de cloro e não dependia da concentração inicial de toxinas.

Tabela 5.13 – Resultados dos ensaios de oxidação 5 e 6 com diferentes concentrações de microcistinas e diferentes doses de cloro nos tempos de contato de 15 e 30 minutos e valor de pH 6.

Ensaio	Dose de cloro (mg L ⁻¹)	Conc. inicial de MCYST (µg L ⁻¹)	Tempo (min)	Conc. final de MCYST (µg L ⁻¹)	Concentração removida (µg L ⁻¹)
5	1,0	40,1	30	18,5	21,6
	2,1	40,1	30	0,3	39,8
6	1,1	21,4	30	1,1	20,3
	2,0	21,4	15	0,2	21,2

Ainda referente ao ensaio 6, Tabela 5.13, observou-se que para o tempo de contato de 15 minutos foram necessários 2,0 mg L⁻¹ de cloro, para alcançar remoções de microcistinas acima de 99%. Já para a dose aplicada de 1,1 mg L⁻¹ de cloro obteve-se uma remoção de 95% ao final de 30 minutos. Observa-se, portanto que, é possível se obter elevadas remoções de microcistinas com menores tempos de contato se utilizadas maiores doses de cloro, ou seja, quanto menor o tempo de contato maior será a dose de cloro necessária para a oxidação. Em outras palavras, a eficiência de remoção de microcistinas depende do produto CT (concentração *vezes* tempo), como sugere a Figura 5.17.

A Figura 5.17 mostra a influência do CT na oxidação, pois ao usar o mesmo valor de CT para as mesmas concentrações iniciais de microcistinas semelhante percentual de remoção de microcistina é obtido. Contudo, ao aumentar o valor de CT a remoção de microcistinas aumenta quase que proporcionalmente (Figura 5.17 B e C).

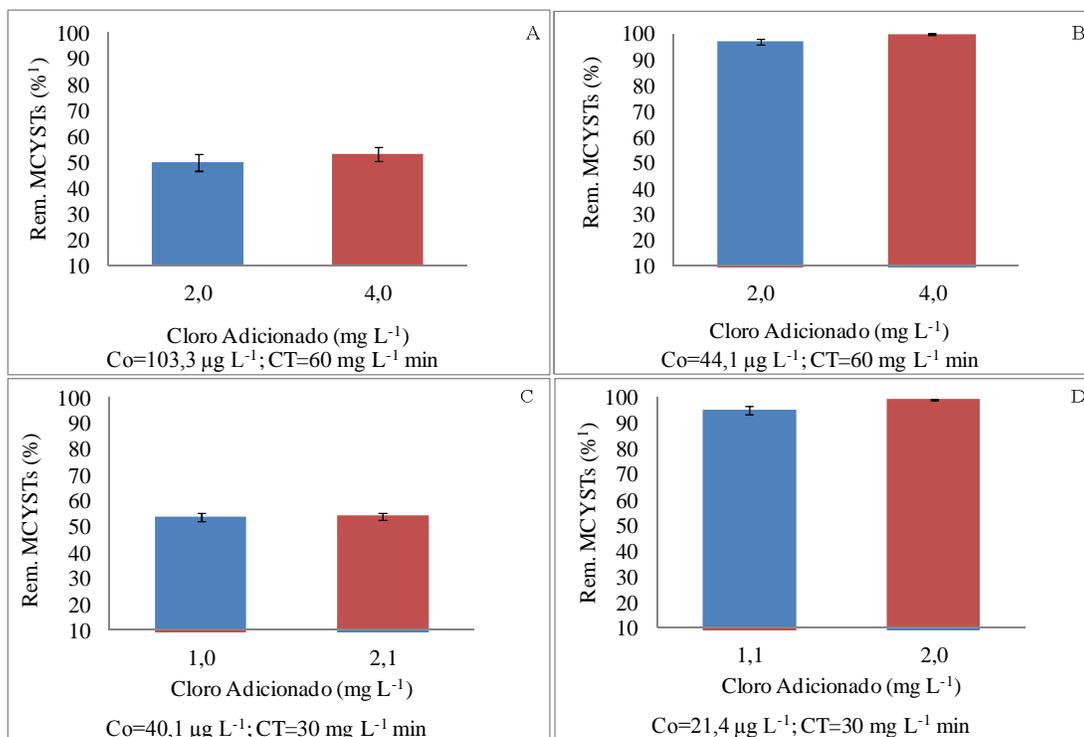


Figura 5.17 - Oxidação das microcistinas em função do CT (concentração vezes tempo de contato).

Segundo Merel *et al.* (2009), a cloração de microcistina-LR induz formação de cloro combinado que pode ser estimado como a diferença entre as medições de cloro total e cloro livre. A presença de cloro combinado, espécies de cloraminas, proveniente da reação do cloro com os grupos aminos, constituintes das moléculas de microcistinas, foi evidenciada neste estudo ao longo dos 30 minutos de contato, conforme mostrado na Figura 5.18.

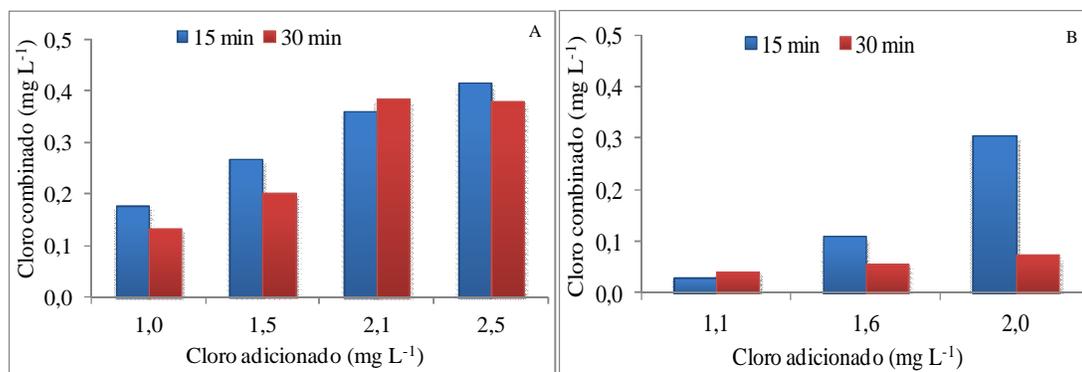


Figura 5.18 - Cloro combinado formado nos tempos de contato de 15 e 30 minutos no processo de oxidação de 40,1 µg L⁻¹ de microcistinas (A) e 21,4 µg L⁻¹ (B).

As reações de formação de cloraminas são governadas pelo pH da água e pela relação cloro/amônia ($\text{Cl}_2/\text{NH}_3\text{-N}$). Em geral, com a diminuição do valor de pH e o aumento da relação $\text{Cl}_2/\text{NH}_3\text{-N}$ a molécula de amônia torna-se mais clorada (Di Bernardo e Dantas, 2005). Observa-se na Figura 5.18 que ocorre aumento do cloro combinado quando doses mais elevadas de cloro são aplicadas para a mesma concentração inicial de toxinas.

5.3.1 - Cinética da oxidação de Microcistinas com o cloro

Para estudar a reação das microcistinas semipurificadas proveniente da cepa NPLJ-4 com o cloro, foram realizados ensaios com concentração média inicial de microcistinas de $42 \mu\text{g L}^{-1}$ e diferentes doses de cloro. A Tabela 5.14 apresenta as condições de realização dos ensaios e os tempos de contato adotados nesta etapa do trabalho.

Tabela 5.14 - Condições de realização dos ensaios cinéticos utilizadas no estudo da cinética de oxidação das microcistinas.

Ensaio	$[\text{Cloro}]_0$ (mg L^{-1})	$[\text{MCYST}]_0$ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Tempo de contato (min)
7	0,5	41,3	0, 3, 8, 15 e 30
8	1,5	43,3	0, 1, 2, 4, 6, 8, e 15
9	3,0	42,0	

$[\text{Cloro}]_0$ = conc. inicial de cloro; $[\text{MCYST}]_0$ = conc. inicial de microcistinas.

Os ensaios foram realizados em sala climatizada, cuja variação de temperatura do ar ambiente era de 23 ± 2 e de 24 a 25°C para as amostras. O valor de pH de oxidação nos diferentes ensaios foi de $6,0 \pm 0,2$. Ressalta-se que o controle de temperatura e pH é importante para minimizar os efeitos desse parâmetro nas reações de oxidação.

A Figura 5.19 mostra os dados obtidos nos ensaios 7, 8 e 9. Os residuais de microcistinas para as doses de cloro aplicadas nos tempos de contato adotados estão apresentados no Apêndice B, item B.2.

Observa-se na Figura 5.19, como esperado, que o decaimento da concentração de microcistinas é mais rápido com a aplicação de maiores doses de cloro. No tempo de 15 minutos, para as doses aplicadas de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ e $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ de cloro, os

residuais de microcistinas foram respectivamente $29,0 \mu\text{g L}^{-1}$, $18,7 \mu\text{g L}^{-1}$ e $2,9 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto os residuais de cloro livre foram de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, $1,1 \text{ mg L}^{-1}$ e 2 mg L^{-1} .

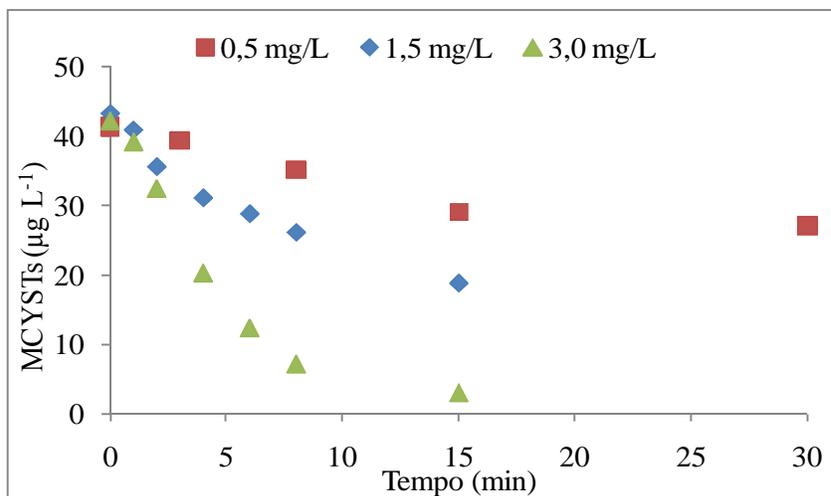


Figura 5.19 - Curva de decaimento das microcistinas na concentração média de $42 \mu\text{g L}^{-1}$ e concentrações médias de cloro de $0,5$, $1,5$ e $3,0 \text{ mg L}^{-1}$.

A Figura 5.20, apresenta o ajuste dos dados obtidos das análises dos ensaios 8 e 9, doses de cloro aplicadas de $1,5$ e $3,0$, a uma cinética de *pseudo*-primeira ordem com relação às microcistinas.

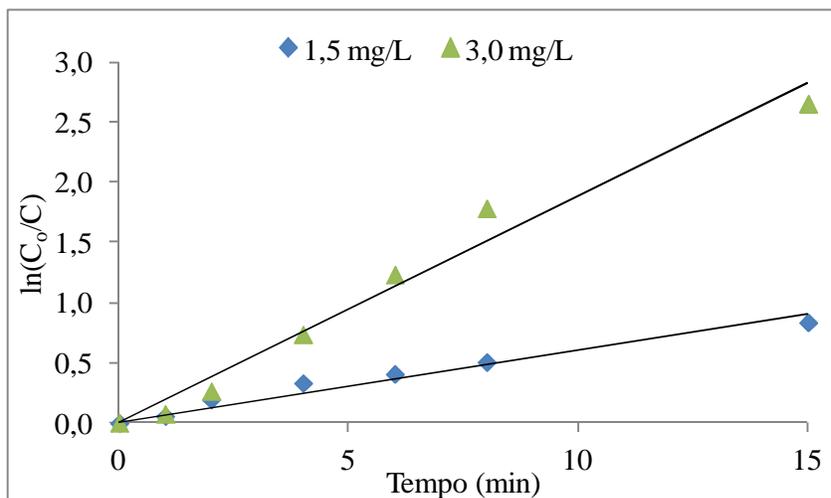


Figura 5.20 - Cinética de *pseudo*-primeira ordem para a oxidação de microcistinas com cloro.

Como pode ser observado na Tabela 5.15, os coeficientes de ajuste (R^2) aos dados experimentais apresentam valores acima de $0,9$. De acordo com Maroco (2003) valores de $R^2 > 0,9$ são geralmente aceitos. A oxidação das microcistinas pelo cloro parece seguir

uma cinética de *pseudo*-primeira ordem em relação às microcistinas. Já em relação ao cloro, a cinética de *pseudo*-primeira ordem não foi confirmada, pois não foi observada uma proporcionalidade entre a concentração de cloro aplicada e a constante de velocidade da reação (k').

Tabela 5.15 - Parâmetros obtidos da cinética de microcistinas para as diferentes doses de cloro.

[MCYST] ₀ (µg L ⁻¹)	[Cloro] ₀ (mg L ⁻¹)	k' (min ⁻¹)	R ²
42,6	1,5	0,0602	0,9576
42,0	3,0	0,1879	0,9757

Considerando as condições experimentais avaliadas pode-se dizer que os resultados obtidos apresentam ajuste satisfatório, contudo os resultados obtidos divergem parcialmente dos resultados observados na literatura científica (Acero *et al.*, 2005 e Ying *et al.*, 2008). Ao analisarem a cinética das microcistinas purificadas MCYST-LR (Acero *et al.*, 2005) e MCYST-RR (Ying *et al.*, 2008) com o cloro verificaram que a oxidação dessas cianotoxinas seguiam uma cinética de *pseudo*-primeira ordem tanto em relação ao cloro quanto em relação às microcistinas. No presente trabalho a cinética de *pseudo*-primeira ordem em relação ao cloro não foi confirmada. É possível que a presença de resíduos de outros compostos intracelulares provenientes da cepa NPLJ-4 semipurificada tenha influenciado na reação com o cloro, assim como a estrutura química dos outros análogos de microcistinas constituintes da cepa usada no estudo.

6 - CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Com relação à validação do método para determinação de MCYST-LR, Os parâmetros avaliados foram considerados satisfatórios, pois estão dentro dos valores sugeridos na literatura. Obteve-se linearidade para microcistina-LR na faixa de 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 70 e 120%. O método também apresentou repetibilidade aceitável, com coeficiente de variação inferior a 20%.

Não foi observado efeito das matrizes, água pura e água potável, na análise de microcistina-LR usando CL-EM/EM, mostrando que essa técnica é específica e seletiva para análise em água. A técnica de CL-EM/EM também se mostrou bastante sensível para detecção e quantificação de microcistina-LR, obtendo-se valores de LOD e LOQ muito abaixo do valor máximo permitido na água de consumo humano ($<1 \mu\text{g L}^{-1}$) segundo prescrito pela legislação brasileira.

Com referência a caracterização da linhagem NPLJ-4, foi observada a presença de 06 (seis) variantes de microcistinas, sendo a [D-Leu] MCYST-LR a variante predominante.

Para a detecção das variantes das microcistinas, em água, é sugerida a utilização simultânea de técnicas como CLAE-DAD e espectrometria de massas.

Os resultados obtidos neste trabalho, considerando as condições experimentais avaliadas, permitiram concluir que a cloração foi efetiva para a remoção de microcistinas mesmo em níveis mais elevados do que os comumente encontrados em águas de abastecimento público.

Em água de estudo com concentração inicial de microcistinas de aproximadamente 40,1 $\mu\text{g L}^{-1}$, após a adição de 2,1 mg L^{-1} de cloro, a concentração de microcistinas foi reduzida para valores de 0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ em 30 minutos, sendo observado um residual de cloro livre de 0,5 mg L^{-1} . Para a concentração inicial de microcistinas de 21,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ foi observada a remoção de 95% de toxinas após 30 minutos de tempo de contato, ao aplicar cloro em dose de 1,1 mg L^{-1} .

Para uma determinada concentração de microcistinas dissolvidas, a eficiência de remoção dessas toxinas foi proporcional ao CT (concentração de cloro *vezes* tempo de contato). Nas condições estudadas, para concentrações de microcistinas de cerca de 100, 40 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, os produtos CT mínimos necessários para obtenção de concentrações de microcistinas atendendo o padrão de potabilidade foram, respectivamente, 120, 60 e 30 $\text{mg L}^{-1} \text{ min}$.

A reação de oxidação das microcistinas semipurificadas provenientes da cepa NPLJ-4 pelo cloro segue uma cinética de *pseudo*-primeira ordem em relação à concentração de microcistina, mas não em relação a dose de cloro.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, recomenda-se para estudos futuros referentes à oxidação de microcistinas:

- A realização de estudos cinéticos detalhados sobre a oxidação das microcistinas proveniente da cepa NPLJ-4 usando concentrações em excesso do reagente cloro.
- Considerando a diversidade dos produtos formados no processo de oxidação, recomenda-se a oxidação isolada de cada variante de interesse de microcistinas para que seja possível a realização de estudos detalhados, por meio da técnica de espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear, dos compostos formados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acero, J. L., Rodriguez, E., Meriluoto, J. (2005). "Kinetics of reactions between chlorine and the cyanobacterial toxins microcystins." *Water Research*, **39**(8), 1628-1638.
- Acero, J. L., Rodriguez, E., Majado, M. E., Sordo, A., Meriluoto, J. (2008). "Oxidation of microcystin-LR chlorine and permanganate drinking water treatment." *Journal of Water Supply: Research and Technology*, **57**(6), 371-380.
- Albuquerque Junior, E.C., Melo, L. F. C., Franco, T. T. (2006). "Use of solid-phase extraction, high performance liquid chromatography, and MALDI-TOF identification for [D-Leu¹]-MCYST-LR analysis in treated water: Validation of the analytical methodology." *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy*, **52**(1).
- An, J. Carmichael, W.W., (1994). "Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for study of microcystins and nodularin." *Toxicon*, **32**(12), 1495-1507.
- APHA- American Public Health Association. (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21st edition, edited by Andrey D. Eaton, Lenore S. Clesceri, Eugene W. Rice, Arnold E. Greenberg, Washington, E.U.A.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT, NBR ISO/IEC 17025 (2005). *Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração*. Rio de Janeiro, RJ.
- Azevedo, S. M. F. O., Carmichael, W.W., Jochimsen, E.M., Rinehart, K.L., Sharon L., Shaw, G. L., Eaglesham, G. K. (2002). "Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil." *Toxicology*, **181-182**, 441-446.
- Azevedo, S. M. F. O. e Brandão, C. C. S. B. (2003). "Cianobactérias Tóxicas na Água para Consumo Humano na Saúde Pública e Processos de Remoção em Água para Consumo Humano." *FUNASA*.
- Bandala, E. R., Martinez, D., Martinez, E., Dionysou, D. D. (2004). "Degradation of microcystin-LR toxin by fenton and photon-fenton process." *Toxicon*, **43**, 829-832p.
- Bateman, K. P., Thibault, P., Douglas, D. J., White, R. L. (1995). "Mass spectral analyses of microcystins from toxic cyanobacteria using on-line chromatographic and electrophoretic separations." *Canada. Journal of Chromatography*, **712**, 253-268.

- Brasil (2004). Ministério da Saúde. “Portaria nº 518: Procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.” *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF.
- Brasil (2003). Ministério da Saúde. “Resolução-RE, nº899 (ANVISA): Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.” *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF.
- INMETRO (2010). Instituto Nacional de Metrologia. “DOQ-CGCRE-008, Orientação sobre validação de métodos analíticos”. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil* Brasília, DF.
- Brook, S., Newcombe, G., Nicholson, B., Klass, G. (2006). “Decrease in toxicity of microcystis LA and LR in drinking water by ozonation.” *Toxicon*, **48**(8), 1054-1059.
- Carmichael, W. W. (1992). “Cyanobacteria secondary metabolites – the cyanotoxins”. *Journal of Applied Bacteriology*, **72**, 445-459.
- Carmichael, W. W. (1994). “The toxins of cyanobacteria.” *Scientific American*, **270**(1), 64-72.
- Carmichael, W. W. (2001). “Health effects of Toxin-producing Cyanobacteria: “The CyanoHABs” ”. *Human and Ecological Risk Assessment*, **7**(5), 1393-1407.
- Chiaradia, M.C., Collins, C. H., Jardim I C. S. F. (2008). “O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos”. *Química Nova*, **31**(3), São Paulo.
- Chow, C. W. K., Drikas, M., House, J., Burch, M. D. E, Velzeboer, R. M. A. (1999). “The impact of conventional water treatment processes on cells of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*.” *Water Research*, **33**(15), 3253-3262.
- Cong, L., Huang, B., Qi Chen, Baiyi Lu, Jing Zhang, Yiping Ren (2006). “ Determination of trace amount of microcystins in water samples using liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry”. *Analytica Chimica Acta*, **596** 157-168.
- Dawson, R. (1998). “The toxicology of microcystins”. *Toxicon*, **36** (7), 953-962.
- Dahlmann, J., Budakowski, W.R., Luckas, B. (2003). “ Liquid chromatography-eletrospray ionization spectrometry based method for the simultaneous determination of algal and cyanobacterial toxins in phytoplankton from marine waters and lakes followed

- by tentative structural elucidation of microcystins.” *Journal of chromatography A*, **994**, 45-57.
- Di Bernardo, L. e Dantas A. Di Bernardo. (2005). *Métodos e Técnicas de Tratamento de Água*. São Paulo. v.2, 1565p.
- Di Bernardo, L., de Luca, S. J., Kuroda, E. K. (2007). *Contribuição ao Estudo da Remoção de Cianobactérias e Microcontaminantes Orgânicos por Meio de Técnicas de Tratamento de Água para Consumo Humano*. PROSAB, Belo Horizonte, Minas Gerais, 504p.
- European Communities - Commission Decision 2002/657/EC (2002). *Official Journal of the European Communities*.
- Freitas, M. S. (2007). *Remoção de Microcistinas e Saxitoxinas por Meio de Oxidação com Hipoclorito de Sódio: Avaliação em Escala de Bancada*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Brasília, DF.
- Freitas, A. (2008). *Utilização de Processos Oxidativos Avançados para Remediação de águas Contaminadas por Toxinas Produzidas por Cianobactérias*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, 93p.
- Gajdek, P. Lechowski, Z., Bochnia, T., Kełpczynski, M. (2001). “Decomposition of microcystin-LR by Fenton oxidation.” *Toxicon*, **39**, 1575-1578.
- Gopal, K. Tripathy, S. S., Bersillon, J. L., Dubey, S.P. (2007). “Chlorination byproducts, their toxicodynamics and removal from drinking water.” *Journal of Hazardous Materials*, **140**, 1–6p.
- Harada, K., Suzuki, M., Dahlem, A.M., Beasley, V.R., Carmichael, W.W., Rinehart Jr, K.L. ((1988). “Improved Method for purification of toxic peptides produced by cyanobacteria.” *Toxicon*, **26**(5), 433-439.
- Harada, K., Ohtani, I., Iwamoto, K., Suzuki, M., Watanabe, M. F., Terao, K. (1994). “Isolation of cylindrospermopsin from cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method”. *Toxicon*, 32:73.
- Harada, K., Kondo, F., Lawton, L. (1999). “Laboratory analysis of cyanotoxins.” In: Chorus, I. e Bartram, J. (eds.) *Toxic Cyanobacteria in Water*. A guide to their public health consequences, monitoring and management. E&FN Spon, Londres, 348-367.
- Harada, K., Imanishi, S., Kato, H., Mizuno, M., Ito, E., Tsuji, K. (2004). “Isolation of Adda from microcystin-LR by microbial degradation.” *Toxicon* **44**, 107–109.

- Hart, J., Fawell, J. K., Marsalek, B., Croll, B., Dolejs, P., Sládecková, A., Bruchet, A., Bernazeau, F., Pieronne, I., Baudin, P. (1998). "Algal toxins in surface waters: origins and removal during drinking water treatment processes." *Water Supply*, **16**(½), 611-623.
- Himberg, K., Keijola, A. M., Hiisvirta, L. (1989). "The effect of water treatment process on the removal of hepatotoxins from microcystis and oscillatoria cyanobacteria: a laboratory study." *Water Research*. **23**(2), 979-984.
- Ho, L., Onstad, G., Von Gunten U., Rinck-Pfeiffer, S., Craig, K., Newcombe, G. (2006). "Differences in the chlorine reactivity of four microcystin analogues." *Water Research*, **40**, 1200-1209.
- Höger, J. S. (2006). "*Problems during drinking water treatment of cyanobacterial-loaded surface waters: Consequences for human health*". Dissertation an der Universität Konstanz Gefördert durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU).
- Hudder, A., Song, W., O'Shea, Q. E., Walsh, P. J. (2007). "Toxicogenomic evaluation of microcystin-LR treated with ultrasonic irradiation." *Toxicology and Applied Pharmacology*." **220**, 357-364.
- ICH - International Conference on Harmonization (1995). "Q2A Validation of analytical Procedures."
- International Organization for Standardization - ISO 20179 (2005). "Water quality - Determination of *microcystis*- Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (CLAE) with ultraviolet (UV) detection." First edition.
- International Union of Pure and Applied chemistry (IUPAC) (1991). Analytical Chemistry division. Commission on Chromatography and other Analytical Separations. *Appl. Chem*, **65**, 819.
- Kull, T.P.J., Backlund, P.H., Karlsson, K.M., Meliluoto, J.A.O. (2004). "Oxidation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by chlorine dioxide: Reaction kinetics, characterization and toxicity of reaction products." *Environmental Science & Technology*, **38**(22), 6025-6031.
- Kondo, F., Ikai, Y., Oka, H., Ishikawa, N., Watanabe, M. F., Watanabe, M., Harada, K., Suzuki, M. (1992). "Separation and identification of microcystin in cyanobacteria by frit-fast atom bombardment liquid chromatography/mass spectrometry". *Toxicon*, **30**(3), 227-237.

- Kuroda, E. K. (2006). *Remoção de células e subprodutos de Microcystis spp. Por dupla filtração, oxidação e adsorção*. Tese de Doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos, SP. 233p.
- Kuroda, E. K., Trofino, J. C., Di Bernardo, L. (2007). “Efeito da oxidação de águas contendo *Microcystis spp.* e microcistinas com cloro, dióxido de cloro e permanganato de potássio por meio de ensaios de bancada”. *Anais do 24º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*. Belo Horizonte, Brasil.
- Laças, F. M. (2009). *Cromatografia Líquida Moderna: CLAE/CLAE*. Editora Átomo, Campinas, SP, 382p.
- Lawton, L. A., Robertson, K.J. (1999). “Physico-chemical treatment methods for the removal of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) from potable waters.” *Chemical Society Reviews*, **28**, 217-224.
- Lawton, L. A., Edwards, C., Codd, G.A. (1994). “Extraction and high-performance liquid chromatographic method for determination in raw and treated waters.” *Analyst*, **119**.
- Laplanche A., Orta de Velasquez M., Boisdon V., Martin N. and Martin G. (1995). “Modelisation of micropollutant removal in drinking water treatment by ozonation or advanced oxidation processes.” *Ozone: science & engineering*, **17**(1), 97-117.
- Leite, F. (2008). *Validação em Análises Químicas*. 5ª edição-Editora Átomo, Campinas, SP, 357p.
- Lenzi, E., Favero, L. O. B., Ludhese, E. B. (2009). *Intrudução à química da água: ciência, vida e sobrevivência*. LTC, Rio de Janeiro, RJ, 604p.
- Lykins, Jr. B.W., Koffskey, W.E & Patterson, K. S. (1994). “Alternative disinfectants for drinking water.” *USA Journal Environmental Engineering*, **120**(4), 745-758.
- Luca, S.J., Pegorer, M.G., Luca, M. A. (2010). “Oxidação de microcistinas-LR em águas pelo íon ferrato(VI) -Aqueous oxidation of microcystin-LR by ferrate(VI).” *Engenharia Sanitária e Ambiental*, **15**(1), 5-10p.
- Machado, A. F. (2008). “*Ozonização no tratamento da água para remoção de microcistina-LR e validação do método de análise por LC-MS/MS*.” Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, Porto Alegre, RS, 97p.
- Magalhães, V. F., Soares, R. M., Azevedo, S. M. F.O. (2001) “Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk” *Toxicon*, **39**, 1077-1085.

- Martins Junior, H. A. M., Bustillos, O. V., Pires, M. A. F. (2006). “Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em “tandem” (CLAE-EM/EM).” *Quim. Nova*, **29**(3), 586-592.
- Maroco, J., (2003). *Análise Estatística com utilização do SPSS*. Edições Silabo, Lda. Lisboa, 508p.
- Matthiensen, A.; Beattie, K. A.; Yunes, J. S.; Kaya, K.; Codd, G. A. (2000). “[d-Leu1] Microcystin-LR, from the cyanobacterium *Microcystis* RST 9501 and from a *Microcystis* bloom in the Patos Lagoon estuary, Brazil” *Phytochemistry* **55**, 383-387
- Meriluoto, J. (1997). “Chromatography of microcystins.” *Analytica Chimica Acta*, **352**, 277-298.
- Meriluoto, J. e Codd, G. A. (2005). *Toxic Cyanobacterial monitoring and cyanotoxin analysis*. Abo Akademi University, 149p.
- Merel, S., Lebot, B., Clément, M., Seux, R., Thomas, O., (2009). “Ms Identification of microcystin-LR chlorination by-products”. *Chemosphere*, **74**(6), 832-839p.
- Miao, H., Tao, W (2008). “The mechanisms of ozonation on cyanobacteria and its toxins removal”. *Separation and Purification Technology*. 9396, 7p.
- Momani, F., Smith, D.W., El-Din, M.G. (2008). “Degradation of cyanobacteria toxin by advanced oxidation processes”. *Journal of Hazardous Materials*, **150**, 238–249p.
- Nicholson, B.C, Rositano, J., Burch, M.D. (1994). “Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine.” *Water Research*, **28**(6), 1297-1303.
- Nicholson, B.C., Burch, M. D. (2001). “Evolution of Analytical Methods for Detection and Quantification of Cyanotoxins in Relation to Australian Drinking Water Guidelines.” *Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment*.
- Oksanen, I., Jokela, J., Fewer, D. P., Wahlsten, M., Rikkinen, J., Sivonen, K. (2004). “Discovery of Rare and Highly Toxic Microcystins from Lichen-Associated Cyanobacterium *Nostoc* sp. Strain IO-102-I.” *Applied and Environmental Microbiology*, **70** (10), 5756–5763.
- Park, H., Kim, B., Kim, E., Okino, T. (1998). “Hepatotoxic Microcystins and Neurotoxic Anatoxin-a in Cyanobacterial Blooms from Korean Lakes.” *Environmental Toxicology Water Quality*, **13**, 225-234.

- Park, H., Namikoshi, M., Brittain, S. M., Carmichael, W.W., Murphy, T. (2001). “[d-Leu1] microcystin-LR, a new microcystin isolated from waterbloom in a Canadian prairie lake.” *Toxicon*, **39**, 855-862.
- Paschoalato, C. F. P. R., Trimailovas, M. R., Di Bernardo, L. (2008). “Formação de subprodutos orgânicos halogenados nas operações de pré-oxidação com cloro, ozônio e peroxônio e pós-cloração em água contendo substância húmica.” *Revista Engenharia e sanitaria Ambiental*, **13(3)**, 313-322p.
- Qiao, R., Qi, X., Wang, Q., Zhuang, Y.Y. (2005). “Degradation of microcystin-RR by UV radiation in the presence of hydrogen peroxide.” *Toxicon*, **45(6)**, 745-752p.
- Reckhow, D. A., Singer, P. C., Malcolm, R. L. (1990). “Chlorination of humic materials: byproduct formation and chemical interpretations.” *Environment Science & Technology*, **24(11)**, 1655-1664.
- Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., Jardim, I. C. C. S., Melo, L. F. C. (2004). “Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.” *Química Nova*, **27(5)**, SP.
- Rodriguez, E., Onstad, G. D., Kull, T. P. J., Metcalf, J. S., Acero, J. L., von Gunten, U. (2007). “Oxidation eliminations of cyanotoxins: Comparison of ozone, chlorine, chlorine dioxide and permanganate.” *Water Research*, **41(15)**, 3381-3393.
- Rodriguez, E., Acero, J. L., Spool, L., Meriluoto, J. (2008). “Oxidation of MC-LR and -RR with chlorine and potassium permanganate: Toxicity of the reaction products.” *Water Research*, **42**, 1744-1752.
- Rositano, J., Newcombe, G., Nicholson, B., Szatajnok, P. (2001). “Ozonization of NOM and algal toxins in four treated Waters.” *Water Research*, **35(1)**, 23-32.
- Runnegar, C. T. M. Falconer, R. I. (1986). “Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes.” *Toxicon*, **24(2)**, 109-115.
- Sangolkar, L. N., Maske, S. S., Muthal, P. L., Kashyap, S. M., Chakrabarti, T. (2009). “Isolation and characterization of microcystin producing *Microcystis* from a Central Indian water Bloom.” *Harmful Algae*, **8**, 674-684p.
- Sant'Anna, C. L., Azevedo, M. T. P. Werner, V. R., Camila. (2008). “Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil.” *Algological Studies*, **126**, 251-265p.
- Senogles-Derham, P., Seawright, Shaw, G., Wickramasingh, W., Shahin, M.(2003). “Toxicological aspects of treatment to remove cyanobacterial toxins from drinking

- water determined using the heterozygous P53 transgenic mouse model.” *Toxicol*, **41**, 979-988p.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A. (2002). *Princípios de análises instrumental*. Bookman, Porto Alegre, RS, 936p.
- Singer, P.C. 1994). “Control of disinfection by-products in drinking water.” *Journal of Environmental Engineering*, **120**(4), 727-744.
- Sivonen, K. e Jones, G. (1999). “Cyanobacterial toxins.” In: Chorus, I. e Bartram, J. (eds.) *Toxic Cyanobacteria in Water*. E&FN Spon, Londres, 41-111.
- Sivonen, K. e Jones, G., (2009). “Cyanobacterial toxins.” In: Schaechter, M. Encyclopedia of microbiology (Third Edition), Finland, 290-307.
- Silverstein, R.M., Webster, F.X., KiemLe, D.J. (2007). *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. LTC, Rio de Janeiro, 490p.
- Silva, V. M. A. (2006). “Bioacumulação de Microcistina Originária de *Microcystis aeruginosa* em Girinos de *Rana catesbeiana*.” Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Departamento de Ciências Fisiológicas – CFS, Brasília, DF, 131p.
- Soares, M. R., Magalhães, F. V., Azevedo, S. M. F. O. (2004). “Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions.” *Aquatic Toxicology*, **70**, 1-10.
- Stenico, M. E. S., Neto, R. C., Alves, I. R., Moraes, L. A. B., Shishido, T. K., Fiore, M. F (2009). “Hepatotoxin microcystin-LR extraction optimization.” *J. Braz. Chem. Soc.*, **20** (3), 535-542.
- Teixeira, M. G. L. C., Costa, M. C. N., Carvalho, V. L. P., Pereira, M. S., Hage, E. (1993). “Gastroenteritis epidemic in the area of the Itaparica, Bahia, Brazil.” *Bulletin of Pan Am Health Organ*, **27**(3), 244-253p.
- Tokmak, B., Capar, G., Dilek, F. B., Yetis, U. (2004). “Trihalomethanes and associated potential cancer risks in the water supplyin Ankara, Turkey.” *Environmental Research*, **96**, 345–352p.
- Tsuji, k., Watanuki, T., Kondo, F., Watanabe, M., Nakazawa, S. (1995). “Stability of microcystins from cyanobacteria – II effect of UV light on decomposition and isomerization.” *Toxicol*, **33**(12), 1619-1631p.
- Tsuji, k., Watanuki, T., Kondo, F., Watanabe, M., Nakazawa, S. (1997). “Stability of microcystins from cyanobacteria – IV effect chlorination on decomposition.” *Toxicol*, **35**(7), 1033-1041p.

- United States Environmental Protection Agency – USEPA (1999). *Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual*.
- Yoshizawa, S., Matsusrima, R., Watanabe, F. M., Harada, K., Ichirara, A., Carmichael, W.W., Fujiki, H., (1990). “Inhibition of protein phosphatases by microcystis and nodularin associate with hepatotoxicity.” *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. **116**(6), 609-614.
- Yoo, R.S., Carmichael, W. W., Hoehn, R. C., Hrudey, S. E. (1995). “Cyanobacterial (Blue-Green Algal) Toxins: A Resource Guide.” *American Water Works Association Research Foundation and American Water Works Association*. EUA, 229 p.
- Ying, J., Jun-li, H., Jiao, F., Ming-song, W., Chong-wei. C. (2008). “Degradation of microcystin-RR in water by chlorine dioxide”. *Journal of China University of Mining & Tecnology*, **18**, 623-628.
- Yaun, B., Li, Y., Huang, X, Liu, H., Qu, J. (2006). “ Fe (VI) – assisted photocatalytic degradating of microcystin-LR using Titanium dioxide.” *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **178**, 106-111p.
- Weber Jr, W. J. (1972). *Physicochemical Processes for Water Quality Control*. Wiley-interscience, New York, 640p.
- World Health Organization – WHO (2008). *Guidelines for drinking-water quality*, 3rd ed, Geneve.

APÊNDICES

APÊNDICE A – RESULTADOS OBTIDOS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE MCRYST-LR – ETAPA 1

A.1 – GRÁFICOS DE CORRELAÇÃO OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS 1 A 3

Gráfico analítico obtido a partir dos dados do experimento 1.

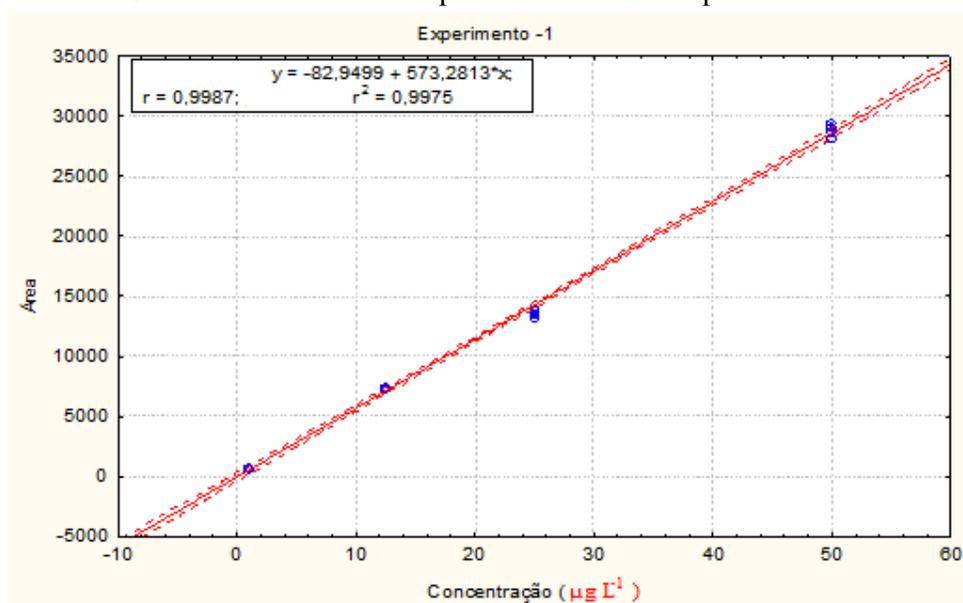


Gráfico analítico obtido a partir dos dados do experimento 2.

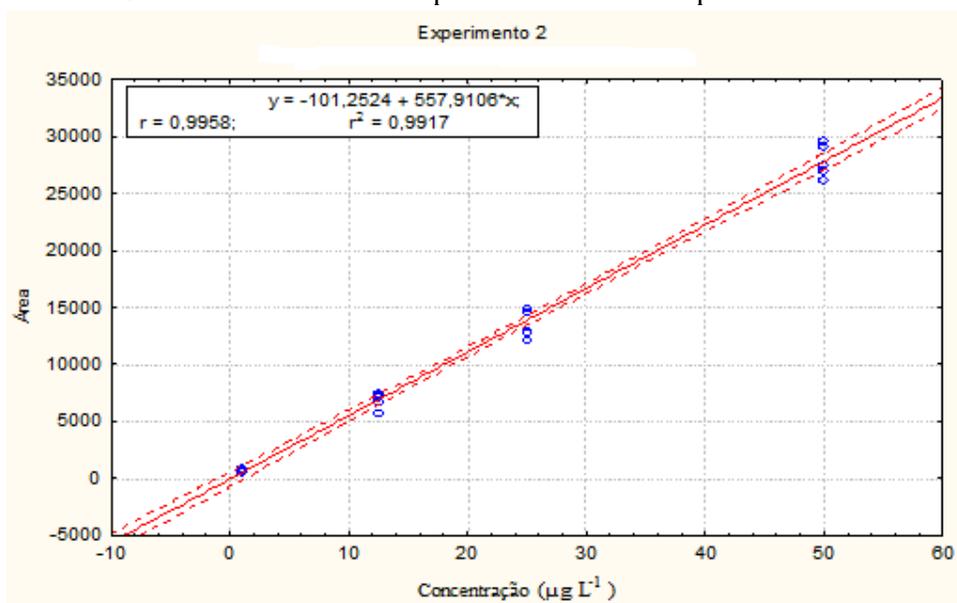
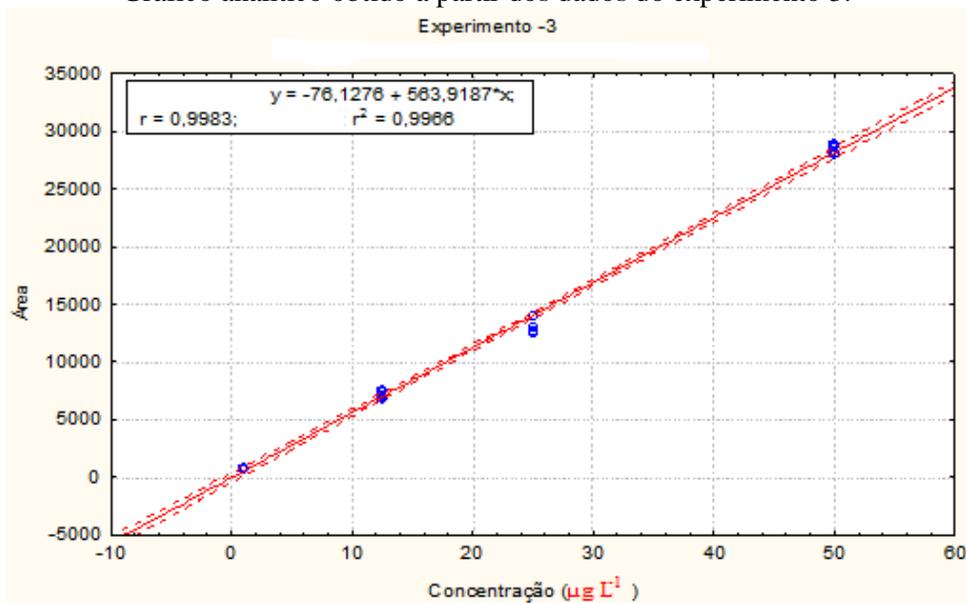


Gráfico analítico obtido a partir dos dados do experimento 3.



A.2 - CÁLCULO PARA OBTER O LIMITE DE DETECÇÃO (LOD)

A concentração correspondente ao coeficiente linear da reta obtida nos experimentos 1 a 3 mais 2,33 vezes o desvio padrão é igual ao LOD.

Então o $\text{LOD} = b + 2,33s$

Sendo: b = Coeficiente linear das curvas de fortificações obtidas nos Experimentos 1 a 3;

s = desvio padrão

Equação do gráfico analítico obtida para experimento 1:

$$y = -82,949 + 573,281x$$

O valor de b que corresponde ao valor em que o y será interceptado ($y = 0$) $x = 0,144$ ou seja $b = 0,144 \mu\text{g L}^{-1}$.

O cálculo para obter os valores de b , nos experimento 2 e 3, segue o mesmo procedimento acima.

Equação do gráfico analítico obtida para experimento 2:

$$y = -101,252 + 557,910x$$

$$b = 0,181 \mu\text{g L}^{-1}$$

Equação do gráfico analítico obtida para experimento 3:

$$y = - 76,127 + 563,918x$$

$$b = 0,134 \mu\text{g L}^{-1}$$

O desvio padrão obtido nos experimentos = 0,025

Então o LOD = $b + 2,33s$

$$\text{Experimento 1 } \text{LOD} = 0,144 + 2,33 * 0,025 \rightarrow \text{LOD} = 0,202 \mu\text{g L}^{-1}$$

$$\text{Experimento 2 } \text{LOD} = 0,181 + 2,33 * 0,025 \rightarrow \text{LOD} = 0,239 \mu\text{g L}^{-1}$$

$$\text{Experimento 3 } \text{LOD} = 0,134 + 2,33 * 0,025 \rightarrow \text{LOD} = 0,192 \mu\text{g L}^{-1}$$

$$\text{Média do LOD} = 0,21 \mu\text{g L}^{-1}$$

A.3- CÁLCULO PARA OBTER O LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)

$\text{LOQ} = b + 2,33s + 1,64s$ sendo; $b = x$ e $s =$ desvio padrão

$$\text{Experimento 1: } \text{LOQ} = 0,144 + 2,33 * 0,025 + 1,64 * 0,025 \rightarrow \text{LOQ} = 0,243 \mu\text{g L}^{-1}$$

$$\text{Experimento 2 } \text{LOQ} = 0,181 + 2,33 * 0,025 + 1,64 * 0,025 \rightarrow \text{LOQ} = 0,280 \mu\text{g L}^{-1}$$

$$\text{Experimento 3 } \text{LOQ} = 0,134 + 2,33 * 0,025 + 1,64 * 0,025 \rightarrow \text{LOQ} = 0,233 \mu\text{g L}^{-1}$$

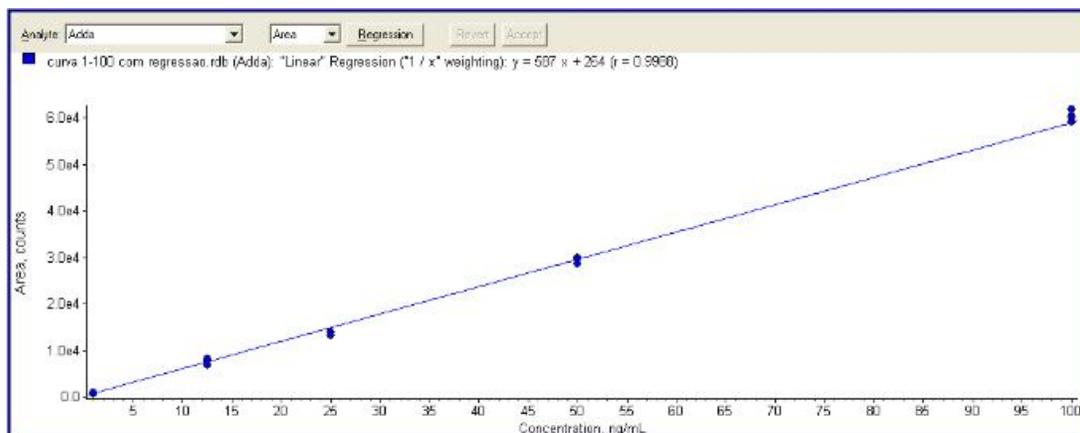
$$\text{Média do LOQ} = 0,25 \mu\text{g L}^{-1}$$

Tabela A1-Dados obtidos na recuperação.

Nível de validação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação		
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
0,00			
1	0,94	0,84	0,91
1	0,84	0,90	0,75
1	0,78	0,82	0,80
1	0,49	0,49	0,53
1	0,85	0,72	0,83
1	0,75	0,72	0,70
	Média	0,78	0,75
	DP	0,15	0,13
	C.V.(%)	19,76	17,58
12,5	0,97	0,93	0,90
12,5	0,95	0,74	0,98
12,5	0,97	0,98	0,96
12,5	0,98	0,96	0,98
12,5	0,95	0,95	0,94
12,5	0,90	0,88	0,91
	Média	0,95	0,91
	DP	0,03	0,04
	C.V.(%)	2,73	3,75
25	0,92	0,97	0,94
25	0,90	0,85	0,84
25	0,87	0,86	0,88
25	0,90	0,85	0,83
25	0,93	1,00	0,94
25	0,88	0,80	0,88
	Média	0,90	0,89
	DP	0,02	0,04
	C.V.(%)	2,43	5,02
50	0,97	0,98	0,98
50	0,98	0,98	0,95
50	0,95	0,88	0,94
50	0,98	0,91	0,94
50	0,99	1,00	0,98
50	0,99	0,93	0,97
	Média	0,98	0,96
	DP	0,01	0,01
	C.V.(%)	1,51	1,56

A.4- CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE MCYST-LR

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



APÊNDICE B – RESULTADOS OBTIDOS NOS ENSAIOS DE OXIDAÇÃO – ETAPA 3

B.1 – RESULTADOS DOS ENSAIOS DE OXIDAÇÃO

Tabela B1- Dados da oxidação obtidos no ensaio 3.

Dose de cloro (mg L^{-1})	Cloro res. livre (mg L^{-1})		MCYST ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	15 min	30 min	15 min	30 min
0				103,3
0,5	0,1	0,0	97,0	91,7
2,0	1,0	0,5	77,0	51,7
4,0	2,2	1,1	48,7	0,3
7,9	6,4	5,1	0,6	ND

ND = Não Detectado

Tabela B2- Dados da oxidação obtidos no ensaio 4.

Dose de cloro (mg L ⁻¹)	Cloro res. livre (mg L ⁻¹)		Cloro total (mg L ⁻¹)		Demanda (mg L ⁻¹)	MCYST (µg L ⁻¹)	
	15 min	30 min	15 min	30 min	30 min	15 min	30 min
0							44,1
0,5	0,1	0,0	0,3	0,2	0,3	37,7	33,1
2,0	1,3	0,9	1,6	1,2	0,8	21,0	1,3
4,0	3,3	2,6	3,7	3,2	0,8	0,1	ND
7,9	6,8	6,3	6,9	7,1	0,8	ND	ND

ND = Não Detectado

Tabela B3- Dados da oxidação obtidos no ensaio 5.

Dose de cloro (mg L ⁻¹)	Cloro res. livre (mg L ⁻¹)		Cloro total (mg L ⁻¹)		Cloro combinado (mg L ⁻¹)		Demanda (mg L ⁻¹)	MCYST (µg L ⁻¹)	
	15 min	30 min	15 min	30 min	15 min	30 min	30 min	15 min	30 min
0,0									40,1
1,0	0,2	0,1	0,4	0,3	0,2	0,1	0,7	28,9	18,5
1,5	0,9	0,3	1,1	0,5	0,3	0,2	1,0	23,5	7,4
2,1	1,1	0,5	1,4	0,9	0,4	0,4	1,2	18,3	0,3
2,5	1,6	1,0	2,0	1,4	0,4	0,4	1,2	12,1	ND

ND = Não Detectado

Tabela B4- Dados da oxidação obtidos no ensaio 6.

Dose de cloro (mg L ⁻¹)	Cloro res. livre (mg L ⁻¹)		Cloro total (mg L ⁻¹)		Cloro combinado (mg L ⁻¹)		MCYST (µg L ⁻¹)	
	15 min	30 min	15 min	30 min	15 min	30 min	15 min	30 min
0								21,4
1,1	0,6	0,4	0,6	0,4	0,0	0,0	10,2	1,1
1,6	1,0	0,5	1,1	0,6	0,1	0,1	5,4	ND
2	1,4	1,0	1,7	1,1	0,3	0,1	0,1	ND

ND = Não Detectado

Tabela B5 - Concentrações de microcistinas (branco) nos tempos 0, 15 e 30 minutos.

Ensaio	MCYST ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
	0 min	15 min	30min
3	103,3	101,7	101,6
4	44,1	42,0	43,0
5	40,1	38,7	40,1
6	21,4	20,4	19,2

Tabela B6- Influência do CT na oxidação de microcistinas.

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

CT= concentração x tempo de contato; DP-Desvio Padrão.

B.2 – RESULTADOS DOS ENSAIOS DA CINÉTICA DAS MICROCISTINAS COM O CLORO

Tabela B7- dados obtidos no ensaio cinético 7.

Tempo (min)	Cloro res. livre (mg L ⁻¹)	Cloro res. total (mg L ⁻¹)	MCYST (µg L ⁻¹)
0	0,50	0,55	41,29
3	0,35	0,49	39,36
8	0,24	0,39	35,15
15	0,14	0,28	29,00
30	0,00	0,25	27,00

Tabela B8- Dados obtidos no ensaio cinético 8.

Tempo (min)	Cloro res. livre (mg L ⁻¹)	MCYST (µ gL ⁻¹)
0	1,52	43,23
1	1,35	40,85
2	1,34	35,56
4	1,29	31,05
6	1,27	28,75
8	1,26	26,05
15	1,10	18,72

Tabela B9- Dados obtidos no ensaio cinético 9.

Tempo (min)	Cloro res. livre (mg L ⁻¹)	MCYST (µ gL ⁻¹)
0	3,01	42,03
1	2,93	38,99
2	2,82	32,26
4	2,77	20,15
6	2,70	12,26
8	2,51	7,06
15	2,02	2,96