

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**

Lucila Adriani Coral

**AVALIAÇÃO DA PRÉ-OZONIZAÇÃO NO CONTROLE DE
CIANOBACTÉRIAS E DEGRADAÇÃO DE MICROCISTINAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Ambiental, área de concentração Potabilização de Águas.

Orientador: Prof. Flávio Rubens Lapolli, Dr.

Co-orientadora: Prof^a. Fátima de Jesus Bassetti, Dr^a

Co-orientadora no exterior: Prof^a. Michèle Prévost, Dr^a

Florianópolis
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Coral, Lucila Adriani

Avaliação da pré-ozonização no controle de cianobactérias e degradação de microcistinas [tese] / Lucila Adriani Coral ; orientador, Flávio Rubens Lapolli ; co-orientadora, Fatima de Jesus Bassetti. - Florianópolis, SC, 2012. 216 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.

Inclui referências

1. Engenharia Ambiental. 2. Pré-ozonização. 3. Cianobactérias. 4. Cianotoxinas. 5. Subprodutos da desinfecção. I. Lapolli, Flávio Rubens. II. Bassetti, Fatima de Jesus. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.



TERMO DE APROVAÇÃO

“Avaliação da Prê-ozonização no Controle de Cianobactérias e Degradação de Microcistinas”.

Lucila Adriani Coral

A Tese foi julgada e aprovada pela banca examinadora no Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de

DOUTORA EM ENGENHARIA AMBIENTAL

Aprovado por:

Prof. Flávio Rubens Lapolli, Dr.
(Orientador)

Prof. William Gerson Matias, Dr.

Prof. Maria Angeles Lobo Recio, Dr.

Prof. Celia Regina Monte Barardi, Dr.

Prof. Rosângela Bergamasco, Dr.

Prof. Marcio Barreto Rodrigues, Dr.

Prof. Flávio Rubens Lapolli
(Coordenador PPGEA)

FLORIANÓPOLIS, SC – BRASIL
DEZEMBRO/2012.

Às pessoas mais importantes da minha vida: meus
pais Alair e Terezinha, e meu irmão Christian.

AGRADECIMENTOS

O meu eterno agradecimento aos meus pais, Alair e Terezinha e meu irmão Christian por abrirem mão da minha companhia nestes longos anos, por me ampararem nos momentos mais difíceis e por não me deixarem desistir dos meus objetivos. Nenhuma conquista seria possível sem o apoio de vocês.

Ao meu orientador, professor Dr. Flávio Rubens Lapolli, pela orientação profissional e pessoal, pela compreensão e pela confiança em meu trabalho. Serei sempre muito grata por ter me acolhido no LaRA e ter me dado a oportunidade de tanto crescimento.

À minha co-orientadora, professora Dr^a. Fatima de Jesus Bassetti, pela amizade acima de tudo, incentivo e auxílio constante. Obrigada por ter estado todos estes anos ao meu lado.

À professora Dr^a. Michèle Prévost, por me acolher na sua equipe na École Polytechnique de Montréal, pelos grandes ensinamentos e, principalmente, pela motivação em enxergar em pequenos detalhes grandes resultados. Este um ano em sua companhia jamais será esquecido.

Ao professor Dr. Benoit Barbeau pela amizade, ensinamento e paciência para com meu aprendizado.

Ao colega Dr. Arash Zamyadi, por me mostrar que é possível amar a ciência em toda a sua plenitude. E aos meus queridos amigos do CREDEAU, Jacinthe Mailly, Julie Philibert, Mireille Blais, Yves Fontaine, Mélanie Rivard, Marcellin Fotsing, Ladjji Meite, Denis Bouchard e Khadija Aboufadi pelo apoio constante no laboratório e pelos ensinamentos pessoais. Jamais vos esquecerei.

À professora Roselane Laudares Silvia pela atenção incondicional e disposição em esclarecer as muitas dúvidas desse vasto mundo das cianobactérias.

Aos meus companheiros de laboratório e amigos pra toda a vida, Maria Eliza, Jossy, Tiago, Pauline, Marie, Marcelo, Cristiane, Ronaldo, Damaris, Jacqueline, Rafael, Tiago Guedes, Fernanda e Caroline. Com vocês a caminhada foi, sem dúvida, muito mais prazerosa. Meu agradecimento especial à Jossy e Maria Eliza pela ajuda incondicional na finalização da tese e por me fazerem acreditar no meu trabalho.

Aos meus amigos Cláudia, Bruno, Renata, Iracema, Silvia, Cristina, Wanderli, Tiago Victor, Rodrigo, Heloisa, Maria Pilar, Cristiane Leis, Mariele, Maria Elisa, Raquel, Tutti, Dona Eliani, Vitor, Lucas, e muitos outros com quem tenho o prazer de dividir os meus dias e que serão lembrados para sempre.

Aos meus estagiários em algum período deste doutorado, Eduardo, Beatriz e Júlia. Obrigada pelo apoio no laboratório e por também me ensinarem, de alguma forma, como posso ser melhor.

Às minhas amigas de sempre Carla, Vanessa, Paola, Fernanda, Ângela e Anigeli. Obrigada pelo incentivo e pelas palavras de carinho. A distância nos une ainda mais. Um agradecimento especial à minha amiga Vanessa, que me acolheu em Montréal e tornou os meus dias longe de casa muito mais fáceis.

Aos meus amigos Luis, Kamila e Joanna. Obrigada por todos esses anos de convivência, dividindo problemas e alegrias. Sem dúvida, uma amizade eterna.

Agradeço especialmente ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. A todos os professores e funcionários que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação profissional e pelo meu crescimento pessoal. Saberei levar para meus alunos os ensinamentos que gentilmente me foram cedidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para a minha permanência no doutorado nesta instituição de ensino e no Exterior.

Aos membros da banca avaliadora, prof^a. Dr^a. Rosangela Bergamasco, Prof. Dr. Márcio Barreto Rodrigues, Prof. Dr. William Gerson Matias; Prof^a. Dr^a. Maria Angeles Lobo Récio e Prof^a. Dr^a. Célia Regina Monte Barardi pelas contribuições e pela amizade.

Enfim, o meu agradecimento a todos aqueles que de alguma forma estiveram presentes na minha trajetória e, mesmo que não continuem fisicamente parte dela, estarão sempre presentes no coração e na memória.

"A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada."

ALBERT EINSTEIN

Resumo

O aumento na incidência de florações de cianobactérias potencialmente tóxicas em mananciais de abastecimento tem se tornado uma preocupação em nível mundial. A pré-ozonização, embora seja um processo eficiente, tem como problemática a tendência à lise celular com a liberação dos constituintes internos à célula. Entretanto, existem ainda limitadas informações sobre o nível de lise ou mudanças nas propriedades da célula após a ozonização, a liberação e oxidação de toxinas e outros compostos; e a contribuição das cianobactérias na formação de subprodutos da desinfecção. Este estudo investigou o mecanismo de ação do ozônio em células de *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena flos-aquae* cultivadas em laboratório, em termos de viabilidade celular e alterações nas propriedades das células; liberação de compostos intracelulares; estudo cinético de degradação da toxina intracelular; e a potencialidade de formação de subprodutos da desinfecção. Avaliações semelhantes foram realizadas para amostra de água superficial em reservatório de água com floração de diferentes gêneros de cianobactérias. Diferentes doses de ozônio (0,5, 2 e 4 mgO₃·L⁻¹), densidade de células (2,5x10⁵ e 1,5x10⁶ cel·mL⁻¹) e pH (6 e 8) foram utilizados neste estudo. Os resultados obtidos indicaram uma rápida e completa perda de viabilidade celular para ambas as espécies após exposição ao ozônio (valor CT - concentração x tempo) ≤ 0,2 mg·min/L, embora não significativa redução no número de células tenha sido observada. O aumento da concentração de carbono orgânico extracelular foi observado para ambas as espécies, tendo-se obtido maiores concentrações para *A. flos-aquae* e em pH 8. O aumento na formação de trihalometanos (THM) e ácidos haloacéticos (HAA) após a ozonização foi igualmente verificado, principalmente para *A. flos-aquae* em pH 8 (cerca de 174% e 65% para THM e HAA, respectivamente). Como era esperado, as concentrações de THM e HAA formados aumentaram nas análises com água natural. A capacidade de degradação de microcistina intracelular pelo ozônio foi verificada, tendo-se uma degradação mais lenta em pH 8, o que sugere que a microcistina é mais reativa com o ozônio molecular, presente em maior quantidade em pH 6. Embora a pré-ozonização de cianobactérias aumente a probabilidade de formação de subprodutos, a efetividade do oxidante na degradação de toxinas torna esse processo atrativo, considerando-se a ausência de toxinas no final do sistema de tratamento.

Palavras-chave: pré-ozonização, cianobactérias, cianotoxinas, integridade celular, subprodutos da desinfecção.

Abstract

The increased incidence of potentially toxic cyanobacterial blooms in water systems has become a worldwide concern. Pre-ozonation, although being an efficient process, has a problematic tendency to cell lysis with the release of the internal cell constituents. However, there is limited amount of information about the level of lysis or changes in the cell properties after ozonation, release and oxidation of toxins, and the contribution of cyanobacteria to the formation of disinfection by-products (DBPs). This study investigated the mechanism of action of ozone on *M. aeruginosa* and *A. flos-aquae* cells, grown in laboratory, in terms of cell viability and changes in the properties of the cells, release of intracellular compounds; kinetics of intracellular toxin degradation; and the DBPs formation. Similar assays were performed with of surface water sample, with an extent bloom of different cyanobacterial genders. Different doses of ozone ($0.5, 2$ and $4 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$), cell densities ($250,000$ and $1,500,000 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$), and pH (6 and 8) were used in this evaluation. The results indicated a quick and complete loss of viability for both CB species after exposure (CT value - concentration x time) to ozone $\leq 0.2 \text{ mg} \cdot \text{min/L}$, although no significant decrease in total organism number was observed. Increasing the concentration of extracellular dissolved organic carbon (DOC) was observed for both species, with higher concentrations for *A. flos-aquae* at pH 8 . The increase in trihalomethanes (THM) and haloacetic acids (HAA) formation after ozonation was also observed, especially for *A. flos-aquae* at pH 8 (about 174% and 65% for THM and HAA, respectively). As expected, the concentrations of THM and HAA were higher on the analysis of natural water samples. The ability of intracellular microcystin degradation by ozone was observed, with slower degradation at pH 8 , suggesting that microcystin is more reactive with molecular ozone specie, in higher concentration at pH 6 . Although pre-ozonation of cyanobacteria increases the probability of by-product formation, the effectiveness of this oxidant agent in the degradation of toxins turns this process attractive, considering the absence of toxins at the end of the treatment.

Keywords: pre-ozonation, cyanobacteria, cyanotoxins, cellular integrity, disinfection by-products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Representação esquemática da estrutura celular da cianobactéria e componentes encontrados intracelularmente.....	40
Figura 2.2. Filamentos de cianobactéria do gênero <i>Anabaena</i> na presença (N^+) e na ausência (N^-) de nitrogênio combinado. As setas indicam os heterocitos formados na ausência de nitrogênio.	42
Figura 2.3. Representação esquemática do ciclo de vida de uma cianobactéria (representação de espécies da ordem <i>Nostocales</i>).....	43
Figura 2.4. Países onde florações aquáticas de cianobactérias produzindo cianotoxinas foram documentadas.	48
Figura 2.5. Estrutura geral das microcistinas (a) e estrutura da toxina MC-LR (b).	53
Figura 2.6. Representação esquemática da estrutura do fígado normal, e após a ação da microcistina.	54
Figura 2.7. Modelo de reação direta e indireta do ozônio. (S: sequestrador; R: produto da reação; M: micropoluentes)	59
Figura 2.8. Estrutura da toxina MC-LR e sítios de ataque do ozônio. ..	70
Figura 2.9. Caminhos de reação e subprodutos originados da degradação de MC-LR (X = Leu) e MC-RR (X = Arg) por ozônio no lado Adda da molécula de microcistina.....	72
Figura 2.10. Degradação de MC-LR (X = Leu) e MC-RR (X = Arg) pelo ozônio considerando a fração Mdha da molécula de microcistina.	73
Figura 3.1. Local de cultivo das cepas de <i>M. aeruginosa</i> e <i>A. flos-aquae</i> . Em destaque a espécie de cianobactéria contida em cada frasco indicado.	77
Figura 3.2. Mapa da localização da Baía Missisquoi na porção norte do Lago Champlain (a) e fotografia do local (b).....	79
Figura 3.3. Fluxograma representativo dos experimentos de pré-ozonização com cultivo de células de cianobactérias e floração natural.	81
Figura 3.4. Sistema de ozonização com borbulhamento do ozônio produzido em um sistema contendo água ultra-pura sob resfriamento.	82
Figura 3.5. Oxidação do índigo trissulfonato pelo ozônio.	83
Figura 3.6. Reator de vidro utilizado para os ensaios de ozonização. ((a) reator sobre agitador magnético; (b) distribuidor para coleta de amostra).	84

Figura 3.7. Representação esquemática da área representativa para contagem de filamentos de <i>A. flos-aquae</i> em câmara de Sedgewick-Rafter.	87
Figura 3.8. Representação esquemática do princípio de detecção do método de ELISA com anticorpo conjugado HRP (horseradish peroxidase) - avaliação indireta.	89
Figura 3.9. Curva típica representativa de decomposição do ozônio em água.	93
Figura 4.1. Curvas de crescimento de <i>M. aeruginosa</i> e <i>A. flos-aquae</i> em laboratório, considerando densidade óptica, concentração de carbono orgânico dissolvido e total.	100
Figura 4.2. Correlação linear entre COT e DO ₇₃₀ para <i>M. Aeruginosa</i> e <i>A. flos-aquae</i> na fase exponencial de crescimento.	102
Figura 4.3. Concentração de toxina total e extracelular durante o período de crescimento da espécie <i>M. aeruginosa</i>	103
Figura 4.4. Avaliação da viabilidade celular das cianobactérias <i>M. aeruginosa</i> e <i>A. flos-aquae</i> nos tempos inicial e final do período de crescimento.	104
Figura 4.5. Liberação de COD para <i>M. aeruginosa</i> (a) e <i>A. flos-aquae</i> (b) para a densidade de $2,5 \times 10^5$ cel·mL ⁻¹ ; dose de ozônio de 0,5, 2,0 e 4,0 mg·L ⁻¹ e pH de 6 e 8.	106
Figura 4.6. Liberação de COD para <i>M. aeruginosa</i> (a) e <i>A. flos-aquae</i> (b) para a densidade de $1,5 \times 10^6$ cel·mL ⁻¹ ; dose de ozônio de 0,5, 2,0 e 4,0 mg·L ⁻¹ e pH de 6 e 8.	107
Figura 4.7. Liberação normalizada de COD como uma função de CT _{O₃} (a) e CT _{OH} (b).	110
Figura 4.8. Impacto da ozonização sobre a viabilidade celular a partir do método BacLight™. Células de <i>M. aeruginosa</i> (a) antes e (b) após ozonização; células de <i>A. flos-aquae</i> (c) antes e (d) após ozonização (pH 6 com 0,5 mgO ₃ ·L ⁻¹ - 30 s de tempo de contato).	113
Figura 4.9. Alteração na coloração das amostras de suspensão de <i>M. aeruginosa</i> em função da dose de ozônio e do tempo de contato para densidade de $1,5 \times 10^6$ cel·mL ⁻¹ . (a) pH 6 e (b) pH 8.	118
Figura 4.10. Alteração na coloração das amostras de suspensão de <i>A. flos-aquae</i> em função da dose de ozônio e do tempo de contato para densidade de $1,5 \times 10^6$ cel·mL ⁻¹ . (a) pH 6 e (b) pH 8.	119

- Figura 4.11. Impacto da ozonização na integridade celular - avaliação por MEV. Células de *M. aeruginosa* (a) antes e (b) após ozonização pH 6, 0,5 mgO₃·L⁻¹ e 0,5 min; (c) pH 6, 4 mgO₃·L⁻¹ e 10 min; (d) pH 8, 0,5 mgO₃·L⁻¹ e 10 min, (e) pH 8, 4 mgO₃·L⁻¹ e 0,5 min; (f) pH 8, 4 mgO₃·L⁻¹ e 10 min. 121
- Figura 4.12. Impacto da ozonização sobre a integridade celular - avaliação por MEV. Células de *A. flos-aquae* (a) antes e (b) após ozonização (pH 6 com 2 mgO₃·L⁻¹ - 0,5 min de tempo de contato). 122
- Figura 4.13. Curvas de decaimento de ozônio em água ultra-pura na ausência e na presença de células de *M. aeruginosa* (MIC). (a) 2,5x10⁵ cel·mL⁻¹ e pH 6; (b) 2,5x10⁵ cel·mL⁻¹ e pH 8; (c) 1,5x10⁶ cel·mL⁻¹ e pH 6; e (d) 1,5x10⁶ cel·mL⁻¹ e pH 8..... 126
- Figura 4.14. Curvas de decaimento de ozônio em água ultra-pura na ausência de células e na presença de células de *A. flos-aquae* (ANA). (a) 2,5x10⁵ cel·mL⁻¹ e pH 6; (b) 2,5x10⁵ cel·mL⁻¹ e pH 8; (c) 1,5x10⁶ cel·mL⁻¹ e pH 6; e (d) 1,5x10⁶ cel·mL⁻¹ e pH 8. 128
- Figura 4.15. Perfil comparativo do decaimento de ozônio para *M. aeruginosa* (MIC) e *A. flos-aquae* (ANA) em função do pH (2,5x10⁵ cel·mL⁻¹; 4 mgO₃·L⁻¹). (a) pH 6; e (b) pH 8..... 131
- Figura 4.16. Perfil comparativo do decaimento de ozônio e da concentração de COD extracelular para *M. aeruginosa* (a) e *A. flos-aquae* (b) em função do pH (2,5x10⁵ cel·mL⁻¹; 4 mgO₃·L⁻¹). O círculo na figura indica a maior concentração liberada/formada de COD dentre os tempos de exposição avaliados..... 132
- Figura 4.17. Curvas preditivas de decaimento de ozônio para água Milli-Q com ausência e presença de células de *M. aeruginosa*, *A. flos-aquae*, e *M. aeruginosa* + *A. flos-aquae* em pH 6 e 8 (dose de ozônio = 2 mg·L⁻¹; COD = 2 mg·L⁻¹). (MIC: *M. aeruginosa*; ANA: *A. flos-aquae*). 136
- Figura 4.18. Formação de THM e HAA após ozonização de *M. aeruginosa* (a) e *A. flos-aquae* (b) em pH 6 e 8 após 10 min de tempo de contato com 0,5, 2 e 4 mgO₃·L⁻¹ para 2,5x10⁵ cel·mL⁻¹ (condições de cloração: cloro residual de 1,0 ±0,2 mg·L⁻¹ após 24 horas de tempo de contato a 22 °C)..... 141
- Figura 4.19. Perfil de liberação e oxidação de microcistinas. pH: 6 e 8; doses de ozônio: 0,5, 2 e 4 mg·L⁻¹; densidade celular: 2,5x10⁵ cel·mL⁻¹ (a) e 1,5x10⁶ cel·mL⁻¹ (b). 144

Figura 4.20. Perfil da liberação e degradação de microcistina e residual de ozônio em pH 6 (densidade: $1,5 \times 10^6$ cel·mL ⁻¹). (a) 0,5 mgO ₃ ·L ⁻¹ ; (b) 2,0 mgO ₃ ·L ⁻¹ ; (c) 4,0 mgO ₃ ·L ⁻¹	148
Figura 4.21. Perfil da liberação e degradação de microcistina e residual de ozônio em pH 8 (densidade: $1,5 \times 10^6$ cel·mL ⁻¹). (a) 0,5 mgO ₃ ·L ⁻¹ ; (b) 2,0 mgO ₃ ·L ⁻¹ ; (c) 4,0 mgO ₃ ·L ⁻¹	149
Figura 4.22. Perfil da liberação e degradação de microcistina em pH 6 e 8 durante os ensaios de ozonização (densidade: $2,5 \times 10^5$ cel·mL ⁻¹). (a) 0,5 mgO ₃ ·L ⁻¹ ; (b) 2,0 mgO ₃ ·L ⁻¹ ; (c) 4,0 mgO ₃ ·L ⁻¹	152
Figura 4.23. Perfil da liberação e degradação de microcistina em pH 6 e 8 durante os ensaios de ozonização (densidade: $1,5 \times 10^6$ cel·mL ⁻¹). (a) 0,5 mgO ₃ ·L ⁻¹ ; (b) 2,0 mgO ₃ ·L ⁻¹ ; (c) 4,0 mgO ₃ ·L ⁻¹	153
Figura 4.24. Oxidação de pCBA durante o processo de ozonização com células de <i>M. aeruginosa</i> ($2,5 \times 10^5$ cel·mL ⁻¹).....	154
Figura 4.25. Relação entre COD extracelular e toxina (liberação e oxidação) ($1,5 \times 10^6$ cel·mL ⁻¹). (a) 0,5 mgO ₃ ·L ⁻¹ ; (b) 2,0 mgO ₃ ·L ⁻¹ ; e (c) 4,0 mgO ₃ ·L ⁻¹	155
Figura 4.26. Gêneros de cianobactérias encontrados nas amostras de água superficial utilizadas nos ensaios de ozonização. (visualização em microscópio óptico em 400 X).....	159
Figura 4.27. Curvas de decaimento de ozônio em água natural com turbidez de 15 uT (160.694 cel·mL ⁻¹ ; pH 6,05; 2 e 3 mgO ₃ ·L ⁻¹)......	161
Figura 4.28. Curvas de decaimento de ozônio em água natural com turbidez de 25 uT (218.550 cel·mL ⁻¹ ; pH 6,79; 2 e 5 mgO ₃ ·L ⁻¹)......	162
Figura 4.29. Curvas de decaimento de ozônio em água natural com turbidez de 45 uT (855.280 cel·mL ⁻¹ ; pH 6,72; 2 e 4 mgO ₃ ·L ⁻¹)......	162
Figura 4.30. Curvas de decaimento de ozônio em água natural com turbidez de 65 uT (502.840 cel·mL ⁻¹ ; pH 6,80; 3 e 5 mgO ₃ ·L ⁻¹)......	163
Figura 4.31. Curvas de decaimento de ozônio para ensaios com células isoladas de <i>M. aeruginosa</i> e <i>A. flos-aquae</i> , e floração natural (dose: 2 mgO ₃ ·L ⁻¹)......	164
Figura 4.32. Proporção dos quatro gêneros de cianobactérias na amostra (a) antes e (b) após a ozonização (10 min) - 15 uT e 2 mgO ₃ ·L ⁻¹	166
Figura 4.33. Proporção dos quatro gêneros de cianobactérias na amostra (a) antes e (b) após a ozonização (10 min) - 15 uT e 3 mgO ₃ ·L ⁻¹	166
Figura 4.34. Proporção dos quatro gêneros de cianobactérias na amostra (a) antes e (b) após a ozonização (10 min) - 25 uT e 2 mgO ₃ ·L ⁻¹	166

Figura 4.35. Proporção dos quatro gêneros de cianobactérias na amostra (a) antes e (b) após a ozonização (10 min) - 25 uT e 5 mgO ₃ ·L ⁻¹	167
Figura 4.36. Proporção dos quatro gêneros de cianobactérias na amostra (a) antes e (b) após a ozonização (10 min) - 45 uT e 2 mgO ₃ ·L ⁻¹	167
Figura 4.37. Proporção dos quatro gêneros de cianobactérias na amostra (a) antes e (b) após a ozonização (10 min) - 45 uT e 4 mgO ₃ ·L ⁻¹	167
Figura 4.38. Proporção dos quatro gêneros de cianobactérias na amostra (a) antes e (b) após a ozonização (10 min) - 65 uT e 3 mgO ₃ ·L ⁻¹	168
Figura 4.39. Proporção dos quatro gêneros de cianobactérias na amostra (a) antes e (b) após a ozonização (10 min) - 65 uT e 5 mgO ₃ ·L ⁻¹	168
Figura 4.40. Viabilidade celular após ozonização de amostra de água superficial a 25 uT e 2 mgO ₃ ·L ⁻¹	169
Figura 4.41. Viabilidade celular após ozonização de amostra de água superficial a 45 uT e 2 e 4 mgO ₃ ·L ⁻¹	169
Figura 4.42. Concentração de COD antes (tempo 0 min) e após o processo de ozonização para as amostras de água superficial nas diferentes condições avaliadas.	171
Figura 4.43. Perfil de decaimento dos teores de turbidez nas amostras de água superficial nas condições avaliadas.	172
Figura 4.44. Formação de THM e HAA com e sem pré-ozonização para amostra de água superficial em diferentes doses de ozônio e turbidez inicial.	175
Figura 4.45. Perfil de liberação e oxidação de microcistina a partir de amostra de água superficial.	176

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Doses letais e organismos produtores de cianotoxinas.....	51
Tabela 2.2. Valores de referência para as toxinas microcistina, toxinas paralisantes, anatoxina-a e cilindrospermopsina adotados por alguns países.....	51
Tabela 2.3. Potenciais oxidativos de oxidantes utilizados para o tratamento de água.	58
Tabela 4.1. Valores de CT obtidos nos ensaios de decaimento de O ₃ para as espécies <i>M. aeruginosa</i> e <i>A. flos-aquae</i> , considerando densidade de células, pH e dose de ozônio.	115
Tabela 4.2. Valores de demanda imediata de ozônio nas condições avaliadas.....	124
Tabela 4.3. Demanda imediata de O ₃ predita para os diferentes valores de pH avaliados, considerando concentração inicial de COD de 2 mg·L ⁻¹ (R ² : 0,90).....	125
Tabela 4.4. Constantes de velocidade aparente de pseudo-primeira-ordem (<i>k</i>) para decaimento de ozônio.	133
Tabela 4.5. Parâmetros estimados para determinar o comportamento do decaimento de ozônio.....	134
Tabela 4.6. Concentração total de THM (TTHM) e HAA (THAA) antes e após pré-tratamento com ozônio.....	138
Tabela 4.7. Ozônio residual e dados de degradação de microcistina após ozonização das células de <i>M. aeruginosa</i> em densidades de 2,5x10 ⁵ e 1,5x10 ⁶ cel·mL ⁻¹ , pH 6 e 8 e 10 min de tempo de contato (Dosagens: 0,5, 2 e 4 mgO ₃ ·L ⁻¹).	146
Tabela 4.8. Constantes de reação de liberação e oxidação de MC-LR eq. total para densidade de células de 1,5x10 ⁶ cel·mL ⁻¹	151
Tabela 4.9. Constantes de decaimento, tempo de meia vida e demanda imediata de ozônio para as condições avaliadas com amostra natural de floração de cianobactérias.	161
Tabela 4.10. Constantes de decaimento, tempo de meia-vida e demanda imediata de ozônio para ensaios de pré-oxidação com células isoladas de <i>M. aeruginosa</i> e <i>A. flos-aquae</i> e floração natural (dose: 2 mgO ₃ ·L ⁻¹).	164
Tabela 4.11. Porcentagem de redução de turbidez após ozonização... ..	173
Tabela 4.12. Concentração total de THM e HAA antes e após pré-tratamento com ozônio em amostras de água superficial.	174

Tabela 4.13. Constantes de liberação e oxidação de toxina total para amostra de água superficial a 45 uT e dosagens de 2 e 4 mgO₃·L⁻¹.... 177

LISTA DE ABREVIATURAS

Ad: 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6-ácido dienóico

ANA: *Anabaena*

ANTX: Anatoxina

CB: Cianobactéria

COA: Carbono orgânico assimilável

COT: Carbono orgânico total

COD: Carbono orgânico dissolvido

CT: Concentração x tempo de contato

CNRC: Canadian National Research Council

CRSNG: Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada

CREDEAU: Centre de recherche, développement et validation des technologies et procédés de traitement des eaux

CYN: Cilindropermopsina

DCAA: Ácido dicloroacético

dmMC-LR: 3-desmetil microcistina-LR

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPD: Dietil parafenileno diamino

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EPM: École Polytechnique de Montréal

FDA: Diacetato de fluoresceína

HAA: Ácido haloacético

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

LC: Liquid Chromatography

LD: Limite de detecção

LPM: Litros por minuto

Mdha: N-metildehidroalanina

MIC: *Microcystis*

MOA: Matéria orgânica algogênica

MOE: Matéria orgânica extracelular

MOI: Matéria orgânica intracelular

MON: Matéria orgânica natural

MS: Mass Spectrometry

MTBE: Éter metil terc-butílico

MC-LA: Microcistina-LA

MC-LF: Microcistina-LF

MC-LR: Microcistina-LR

MC-LW: Microcistina-LW

MC-LY: Microcistina-LY
MC-RR: Microcistina-RR
MC-YR: Microcistina-YR
pCBA: Ácido para-clorobenzóico
PI: Iodeto de propídio
POA: Processo oxidativo avançado
RNA: Ácido ribonucleico
THM: Trihalometano
TCAA: Ácido tricloroacético
USEPA: United States Environmental Protection Agency
WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	30
1.1 INTRODUÇÃO	30
1.2 OBJETIVOS	33
1.2.1 Objetivo Geral.....	33
1.2.2 Objetivos Específicos.....	34
1.3 HIPÓTESES DA PESQUISA	34
1.3.1 Primeira Hipótese.....	34
1.3.2 Segunda Hipótese.....	35
1.3.3 Terceira Hipótese	35
1.4 JUSTIFICATIVA.....	35
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	38
2.1 CIANOBACTÉRIAS - ESTRUTURA CELULAR E FISIOLOGIA	38
2.2 FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS	44
2.3 CIANOTOXINAS	49
2.3.1 Microcistina	52
2.4 PROCESSOS OXIDATIVOS APLICADOS AO TRATAMENTO DE ÁGUA.....	55
2.4.1 Oxidação Química	55
2.4.2 Mecanismo de ação dos oxidantes químicos na remoção de microrganismos.....	56
2.4.3 Ozonização.....	57
2.4.3.1 Principais fatores que afetam as reações do ozônio.....	62
2.4.3.2 Ozonização aplicada à remoção de cianobactérias e degradação de cianotoxinas	66
2.4.3.2.1 Ação do ozônio na molécula de microcistina	70
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	76
3.1 CULTIVO DE CIANOBACTÉRIAS	76
3.2 MANANCIAL PARA COLETA DE ÁGUA SUPERFICIAL... ..	78
3.3 EXPERIMENTOS DE PRÉ-OZONIZAÇÃO	80
3.4 ANÁLISES	85

3.4.1 Contagem, integridade celular e morfologia.....	85
3.4.2 Quantificação de carbono orgânico dissolvido.....	88
3.4.3 Quantificação de cianotoxinas.....	88
3.4.4 Formação de subprodutos.....	90
3.5 AVALIAÇÕES CINÉTICAS.....	91
3.5.1 Cálculos fator CT: exposição ao ozônio molecular e radicais livres.....	91
3.5.2 Modelagem cinética.....	92
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	98
4.1 CRESCIMENTO E MORFOLOGIA DOS CULTIVOS DE M. aeruginosa E A. flos-aquae.....	98
4.2 ENSAIOS DE OZONIZAÇÃO COM CULTIVOS LABORATORIAIS DE M. aeruginosa E A. flos-aquae.....	105
4.2.1 Efeito da ozonização na liberação de COD das células.....	105
4.2.2 Efeito do ozônio sobre a integridade celular de M. aeruginosa e A. flos-aquae.....	111
4.2.3 Impacto das cianobactérias e COD sobre o decaimento do ozônio.....	122
4.2.3.1 Demanda imediata de ozônio.....	123
4.2.3.2 Modelo cinético de pseudo-primeira ordem.....	125
4.2.3.3 Modelo cinético de ordem n-ésima.....	134
4.2.4 Formação de subprodutos da desinfecção a partir de células de cianobactérias.....	136
4.2.5 Efeito da ozonização na liberação e oxidação de toxina intracelular em células de M. aeruginosa.....	143
4.3 APLICAÇÃO DO OZÔNIO EM FLORAÇÃO NATURAL DE CIANOBACTÉRIAS.....	158
4.3.1 Impactos sobre o decaimento de ozônio.....	160
4.3.2 Efeito da ozonização na quantificação de células de cianobactérias, liberação de COD e turbidez.....	165
4.3.2.1 Avaliação da viabilidade celular após ozonização.....	165
4.3.2.2 Efeito da ozonização na liberação de COD das células e redução da turbidez.....	170
4.3.2.3 Formação de subprodutos da desinfecção nas amostras de água superficial.....	173

4.3.2.4 Efeito da ozonização na liberação e oxidação de toxina....	175
5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	180
5.1 CONCLUSÕES	180
5.2 RECOMENDAÇÕES	182
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	186
7 ANEXOS	207
Anexo A. Reagentes e concentrações utilizadas para a preparação do meio de cultivo ASM-1 (cultivo de <i>M. aeruginosa</i>).....	207
Anexo B. Reagentes e concentrações utilizadas para a preparação do meio de cultivo BG-11 (cultivo de <i>A. flos-aquae</i>)	209
Anexo C. Procedimento analítico para determinação da integridade celular pelo método BacLight™	211
Anexo D. Procedimento analítico para determinação da concentração de cloro residual livre.....	213
Anexo E. Procedimento de extração de compostos de THM e HAA.	215

Capítulo 1

Introdução & Objetivos

*"Nenhuma grande descoberta
jamais foi feita sem uma
suposição arrojada."*

Isaac Newton

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias são um componente significativo do ciclo de nitrogênio marinho e são importantes produtores primários nos oceanos (LI, 2009). Entretanto, a presença destes microrganismos tem sido reportada também em outros *habitats*, como lagos e reservatórios de água, o que causa preocupação tanto pelas alterações nas características físico-químicas e na cadeia trófica do ambiente, quanto pelas alterações operacionais nos sistemas de tratamento de água.

As cianobactérias são consideradas o único grupo capaz de reduzir nitrogênio e carbono em condições aeróbias, e esta característica pode ser o fator responsável pelo sucesso evolutivo e ecológico desses microrganismos (GAULT; MARLER, 2009). Quando as condições ambientais são favoráveis ao crescimento das cianobactérias, uma vantagem competitiva destas sobre outras espécies fitoplanctônicas é iniciada, dando origem ao que se denomina floração ou "bloom". A ocorrência de florações de cianobactérias e microalgas é normalmente associada a ambientes eutrofizados (BARTRAM et al., 1999) e à estabilidade da coluna d'água (BRIAND; JACQUET; BERNARD, 2003). Em águas eutrofizadas com níveis de fósforo total de $0,01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e níveis de amônia ou nitrogênio-nitrato maiores que $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, o crescimento desses microrganismos ocorre rapidamente (RUSIN et al., 2000).

De forma geral, florações de cianobactérias ocorrem com maior frequência no verão, após um longo período de exposição solar e em condições de água calma e aquecida (OLIVER; GANF, 2000). Entretanto, a ocorrência desses eventos tem sido igualmente registrada em períodos de primavera e outono e, em alguns casos, no inverno (BUCKA; WILK-WOŹNIAK, 2005). Eventos de floração em lagos e reservatórios de água são frequentemente relatados na literatura, inclusive no Brasil (COSTA et al., 2006; OBERHOLSTER; BOTHA; CLOETE, 2006; CARVALHO et al., 2008; SÖMEK; USTAOĞLU; M., 2008; MOSCHINI-CARLOS et al., 2009; GRAHAM et al., 2010; SÁ et al., 2010). A espécie *Microcystis aeruginosa* é uma das cianobactérias

formadoras de floração mais comuns em ecossistemas de água doce, sendo largamente distribuída em todos os continentes (STRAUB et al., 2011). No Brasil, as espécies *M. aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*, são normalmente as mais encontradas nos eventos de floração.

Além de resultar em uma série de alterações no corpo d'água, limitando o seu uso recreacional e provocando perturbações em todo o ecossistema aquático, densidades elevadas de células de cianobactérias no manancial resultam em problemas operacionais nos processos de tratamento de água. As variações súbitas de pH na água induzem a menores eficiências nas etapas de coagulação e floculação, e a baixa densidade das células dificulta a sedimentação dos flocos formados, o que resulta em maiores cargas para os filtros, os quais têm a sua carreira de filtração reduzida devido à obstruções tanto na superfície quanto no interior da camada filtrante (BABLON et al., 1991a). Além disso, o aumento nas dosagens de coagulante, maior volume de lodo gerado, sabor e odor na água tratada e a formação de subprodutos da desinfecção, são também considerados como dificuldades operacionais decorrentes da elevada densidade de células de cianobactérias no manancial (DE JULIO et al., 2010).

Além dos problemas operacionais em virtude das células, a produção de toxinas (cianotoxinas) é uma das maiores preocupações associadas à presença de cianobactérias em mananciais de abastecimento de água, uma vez que estas moléculas são altamente solúveis em água e não são passíveis de remoção por processos convencionais de tratamento (BARTRAM et al., 1999). As hepatotoxinas, que compreendem as microcistinas e nodularinas, são as toxinas mais frequentemente encontradas no ambiente e normalmente associadas a eventos de intoxicação (AFSSA; AFSSET, 2006). Dos dois grupos representativos desta toxina, a microcistina é a mais estudada, o que se deve a sua elevada toxicidade e ao maior número de ocorrência de florações de espécies produtoras desta substância, tendo como principais gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nostoc* e *Anabaenopsis*. Estas toxinas são altamente solúveis em água, tendo-se conhecimento da existência de mais de 80 variantes (HUMPAGE, 2008; WESTRICK et

al., 2010), sendo a MC-LR a variante encontrada com maior frequência e em maior concentração em eventos de floração.

Considerando que mais de 95% da toxina é caracterizada como intracelular (NEWCOMBE, 2002), a maior preocupação reside em evitar que as mesmas sejam liberadas para a água, o que pode ocorrer naturalmente, em virtude do estado de senescência dos microrganismos ou artificialmente, através da lise celular, muitas vezes associada à aplicação de algicidas (LAVOIE et al., 2007; WESTRICK et al., 2010). Quando a liberação da toxina é inevitável ou mesmo desejável, torna-se então necessária a adoção de processos capazes de permitir a degradação ou a retenção dessas substâncias.

Recentemente, uma série de estudos na literatura tem avaliado a efetividade dos processos oxidativos, convencionais ou avançados, na degradação de cianotoxinas. Dentre os agentes oxidantes convencionais destacam-se em maior grau o cloro, o ozônio e o permanganato de potássio, sendo o ozônio destacado como o oxidante mais efetivo na degradação de toxinas comparado aos demais: $O_3 > KMnO_4 > Cl_2$ (SHARMA et al., 2012). O ozônio é um agente com elevado poder oxidante e bastante versátil quando de seu uso no tratamento de águas. Dentre suas aplicações podem ser destacadas a remoção de cor, turbidez, compostos que causam sabor e odor na água, carbono orgânico total (COT) e no tratamento de compostos orgânicos sintéticos (CORPORATION, 2010). Como destacado por Miao e Tao (2009), o uso do ozônio no tratamento de água para abastecimento é vantajoso por diferentes razões: (1) é um processo destrutivo com menor formação de subprodutos se comparado ao cloro; (2) apresenta elevada capacidade de oxidação em curtos períodos de tempo; e (3) não resulta em poluição secundária, como observado quando do uso de permanganato de potássio.

Na degradação de cianotoxinas, o ozônio apresenta elevada capacidade de degradação de MC-LR, anatoxina (ANTX) e cilindrospermopsina (CYN) (RODRÍGUEZ et al., 2007b). Em moléculas de microcistina, a reatividade do ozônio com as duplas ligações da metade Adda da molécula e da porção amina no anel (Mdha), resultam na rápida e efetiva eliminação de sua toxicidade. Vários estudos destacam a efetividade do ozônio na degradação de

microcistina dissolvida (SHAWWA; SMITH, 2001; ONSTAD et al., 2007; RODRÍGUEZ et al., 2007b; MIAO; TAO, 2009; AL MOMANI; JARRAH, 2010). Na avaliação da eficiência de degradação, fatores como temperatura, dose de ozônio, pH e concentração de carbono orgânico devem ser considerados, uma vez que irão influenciar na efetividade do oxidante.

Embora avaliações quanto à degradação de toxina intracelular, assim como os efeitos do oxidante na célula da cianobactéria sejam ainda reduzidas, alguns estudos destacam como principal efeito da oxidação a liberação de compostos orgânicos intracelulares, além de toxinas, que tendem a aumentar a formação de subprodutos. Estudos de pré-ozonização de células de cianobactéria indicam alterações na morfologia de células de cianobactéria, com redução no teor de clorofila-a e liberação de compostos intracelulares (HOEGER; DIETRICH; HITZFELD, 2002; HUANG; CHENG; CHENG, 2008; MIAO; TAO, 2009; LI et al., 2011), mas são restritivos quanto a informações sobre o mecanismo de atuação. Estudos mais exploratórios sobre a dinâmica de oxidação de células e liberação e degradação de cianotoxinas são encontrados com relação à pré-cloração (DALY; HO; BROOKES, 2007; ZAMYADI et al., 2010; ZAMYADI et al., 2012).

Embora alguns estudos tenham mostrado que a pré-ozonização é eficaz na redução de células de certas espécies de cianobactéria, limitadas informações são obtidas quanto à cinética de degradação de microcistina intracelular, a demanda de ozônio por células de cianobactérias, perda de viabilidade celular, e contribuição das células de cianobactérias na formação de subprodutos da desinfecção. Assim, a avaliação destes aspectos pelo presente estudo é considerada relevante do ponto de vista da viabilidade de aplicação do ozônio como uma etapa de pré-tratamento para águas procedentes de ambientes eutrofizados.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo geral avaliar a cinética de ação do ozônio na estrutura celular de cianobactérias e a degradação de

cianotoxinas por este oxidante, e avaliar a contribuição da matéria orgânica das células na formação de subprodutos da desinfecção em diferentes condições operacionais de pré-ozonização.

1.2.2 Objetivos Específicos

Mais especificamente, este estudo teve como objetivos:

- Avaliar o impacto da ozonização na característica celular (morfologia e integridade celular) das cianobactérias *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena flos-aquae*.
- Estudar o comportamento de liberação de compostos intracelulares, em termos de carbono orgânico dissolvido e toxinas, frente a crescentes exposições ao ozônio (CT - concentração do oxidante x tempo).
- Desenvolver um modelo cinético para descrever a reatividade das cianobactérias estudadas com o ozônio (O₃).
- Estimar a formação de trihalometanos (THM) e ácidos haloacéticos (HAA) a partir da pré-ozonização das células de cianobactérias como cultivos isolados.
- Determinar quantitativamente a eficiência da pré-ozonização na degradação de microcistina intracelular e a sua cinética de decomposição.
- Comparar os efeitos da pré-ozonização em amostras de floração natural de cianobactérias com aqueles observados no estudo com cepas de cianobactérias cultivadas em laboratório.

1.3 HIPÓTESES DA PESQUISA

1.3.1 Primeira Hipótese

Considerando estudos de pré-cloração de células de cianobactérias, a perda da viabilidade celular só é alcançada quando elevadas doses de ozônio são aplicadas e em longos tempos de contato (elevado valor CT), sendo a viabilidade comparável com a redução no número de células.

Ainda, a perda da viabilidade depende da densidade de células e da espécie de cianobactéria.

1.3.2 Segunda Hipótese

A oxidação com ozônio, como um estágio de pré-tratamento, compromete a permeabilidade celular das cianobactérias, promove a liberação da toxina intracelular, e a oxidação da toxina na mesma velocidade; a qualidade da água altera a cinética de liberação e oxidação da toxina intracelular.

1.3.3 Terceira Hipótese

A pré-ozonização de cianobactérias intactas resulta na formação de subprodutos da cloração, ex. trihalometanos (THM) e ácidos haloacéticos (HAA), devido à liberação de materiais orgânicos intracelulares; as características da cianobactéria, conteúdo orgânico e pH influenciam na formação desses subprodutos.

1.4 JUSTIFICATIVA

Eventos de floração de cianobactérias têm sido frequentemente registrados tanto em regiões de clima temperado como tropical, com alterações expressivas na qualidade da água de mananciais de abastecimento e possível comprometimento da qualidade da água após o tratamento. Embora os processos convencionais de tratamento de água permitam a remoção de cianobactérias, na sua maioria como células intactas, é preciso considerar dois aspectos quando a presença de espécies tóxicas de cianobactérias é detectada: (1) embora grande parte da toxina produzida pela cianobactéria permaneça intracelular, a fração dissolvida não é retida pelo sistema e atinge a água tratada; e (2) a acumulação de cianobactérias nos sistemas de sedimentação e filtração tem como risco associado a liberação da toxina intracelular, as quais não serão retidas nos processos de tratamento subsequentes.

A aplicação de algicidas visando o controle do crescimento de cianobactérias em corpos d'água é uma prática antiga, ainda utilizada, mas evitada pelos danos inerentes de sua aplicação quanto à liberação de

toxinas e compostos causadores de sabor e odor na água. Por outro lado, a adoção de processos oxidativos tendo como agentes oxidantes o cloro e seus derivados e o ozônio como um estágio de pré-tratamento, tem sido avaliada tendo em vista a elevada eficiência destes agentes na degradação de diferentes toxinas. No entanto, ainda poucos estudos relacionam a ação desses agentes na estrutura celular de algas e cianobactérias, sobretudo em relação ao ozônio, de forma a compreender os mecanismos que governam as alterações estruturais da célula e a capacidade de degradação das toxinas intracelulares. O entendimento das variáveis que governam o pré-tratamento com oxidantes químicos aplicados às florações de cianobactérias, assim como a avaliação dos efeitos benéficos, como a degradação de toxinas, ou deletérios, como a contribuição na formação de subprodutos tóxicos, pode contribuir para a decisão de adotar ou não este processo quando eventos de floração de cianobactérias vêm a comprometer o uso do corpo d'água como manancial de abastecimento de água potável.

O Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), tem investido, por meio de diferentes laboratórios de pesquisa, na avaliação de processos de tratamento que permitam a remoção de cianobactérias e cianotoxinas. O Laboratório de Reuso de Águas (LaRA), além de processos de remoção com membranas, tem avaliado a aplicação de processos oxidativos avançados, em particular o processo UV/H₂O₂ no tratamento de águas visando a remoção de cianobactérias e degradação de toxinas. Neste sentido, a parceria com a École Polytechnique de Montréal, Canadá, no Departamento de Engenharia Civil, de Geologia e de Minas, coordenado pela professora Michèle Prévost, teve como intuito, complementar o conhecimento já existente, trazendo, de certa forma, um interesse maior sobre a especificidade do processo oxidativo aplicado ao controle de cianobactérias e a degradação de toxinas, visando a sua aplicabilidade aos nossos mananciais.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original."

Albert Einstein

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CIANOBACTÉRIAS - ESTRUTURA CELULAR E FISIOLOGIA

Cianobactérias, também conhecidas como algas azuis, representam, como regra, uma espécie cosmopolita (BUCKA; WILK-WOŹNIAK, 2005), podendo, portanto, ser encontradas nos mais diversos *habitats*. São microrganismos procariontes e, portanto, bioquimicamente e estruturalmente semelhantes às bactérias; entretanto, são semelhantes às algas em função do tamanho e pela presença de pigmentos em sua estrutura, o que lhes permite a realização de fotossíntese (WHO, 1998b). Além da clorofila-a, a presença de pigmentos azuis (ficobilinas) e vermelhos (ficocianinas e ficoeritrinas) torna as cianobactérias capazes de colorir a água em tons de verde-oliva a violeta, vermelho ou marrom, dependendo da proporção dos pigmentos assimilativos (BUCKA; WILK-WOŹNIAK, 2005).

Assim como outros microrganismos aquáticos, as cianobactérias apresentam uma atuação indispensável para a manutenção dos ecossistemas, sendo consideradas como os mais antigos organismos produtores de oxigênio, cujos fósseis remontam aproximadamente 3,5 bilhões de anos (SCHOPF, 2000; HUDNELL, 2008). Embora sejam capazes de colonizar os mais diversos habitats e se adaptar a diferentes condições ambientais, as cianobactérias são mais comumente encontradas no plâncton de ambientes marinhos e de água doce (MOLICA; AZEVEDO, 2009).

As espécies de cianobactérias podem ser diferenciadas em função de suas características morfológicas, estruturais e funcionais (células vegetativas, heterocitos e acinetos), forma, dimensões e hábitos de sobrevivência (hábitos coloniais ou solitários). De acordo com Paerl (1998), as cianobactérias fitoplancônicas podem ser segregadas de acordo com suas características de tamanho, forma estrutural e forma de agregação. A partir destes critérios, quatro grupos morfológicos podem ser caracterizados: picoplâncton unicelular (0,2 – 3 μm de diâmetro); nanoplâncton e micropoplâncton cocóides coloniais (2 – 10 μm de diâmetro); micropoplâncton filamentosos solitários; e micropoplâncton

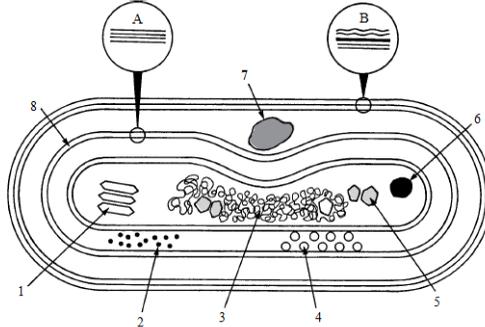
filamentoso colonial. A maioria das formas filamentosas e todas as formas coloniais produzem vesículas de gás, o que lhes confere fluutuabilidade na coluna d'água (VISSER et al., 2005).

Em termos estruturais, a célula de cianobactéria é, em média, maior do que a célula dos demais procariontes, podendo atingir dimensões elevadas, como a espécie *Oscillatoria princeps*, com até 60 µm de diâmetro (MAUSETH, 1998). Espécies filamentosas podem apresentar tricomas de diferentes comprimentos, com uma proporção de até duas ordens de magnitude em relação à largura do tricoma, que pode variar de 1 µm a mais de 50 µm (STAL, 2007). Estruturalmente, as cianobactérias são caracterizadas como células gram-negativas, diferenciando-se de bactérias gram-negativas em virtude de apresentarem uma camada de peptidoglicano consideravelmente mais espessa, como as bactérias gram-positivas (FIORE; TREVORS, 1994; MAUSETH, 1998; HOICZYK; HANSEL, 2000; LIBERTON; PAKRASI, 2008). A camada de peptidoglicano é a estrutura responsável por conferir rigidez à parede celular e proteção da célula contra a lise osmótica. Camadas superficiais ou "S-layers", formadas por proteínas e glicoproteínas, são também encontradas como parte da estrutura externa da célula (ŠMARDA et al., 2002; LIBERTON; PAKRASI, 2008), e observadas entre a membrana externa e uma camada de mucilagem (bainha de mucilagem) (LIBERTON; PAKRASI, 2008) suficientemente forte para manter agregados cianobactérias unicelulares e filamentosas (MAUSETH, 1998).

O aparato fotossintético (complexo PS I e PS II) encontra-se localizados sobre e dentro de tilacóides livremente dispostos no citoplasma e próximos à periferia da célula (MUR; SKULBERG; UTKILEN, 1999). Em muitas cianobactérias, os tilacóides são dispostos em fileiras (3 a 6) paralelas umas às outras e em relação a parede celular (ADAMS; DUGGAN, 1999). A ficobilina é o pigmento acessório em cianobactérias, sendo dividida em duas classes: a ficocianina, que absorve em aproximadamente 630 nm (coloração azul) e a ficoeritrina, com absorção a 570 nm (coloração vermelha) (FUJITA et al., 1994; MAUSETH, 1998). Esses pigmentos ocorrem ligados às proteínas, formando as ficobiliproteínas, que quando agregadas, formam os ficobilissomos (PB) (MAUSETH, 1998), os quais permanecem ligados

à superfície dos tilacóides (ADAMS; DUGGAN, 1999). Além dos PB, moléculas de clorofila-a associadas a cada fotossistema (PS I e PS II) atuam como pigmentos na captação da luz para cada reação fotoquímica (FUJITA et al., 1994). Na Figura 2.1, tem-se uma representação esquemática de uma célula de cianobactéria.

Figura 2.1. Representação esquemática da estrutura celular da cianobactéria e componentes encontrados intracelularmente.



(1) vesículas de gás; (2) grânulos de glicogênio; (3) região nucleoplasmática; (4) ficobilissomos; (5) carboxissomo; (6) grânulo de polifosfato; (7) granulo de cianoficina; (8) tilacóide; (A) visão ampliada do tilacóide; (B) visão ampliada do envelope celular, mostrando a membrana externa, a camada de peptidoglicano e a membrana citoplasmática.

Fonte: (ADAMS; DUGGAN, 1999).

O sucesso competitivo das cianobactérias em relação a outras espécies é baseado em estratégias fisiológicas e adaptativas (SANT'ANNA et al., 2008). As propriedades fisiológicas variam de espécie para espécie, o que significa que as diferentes espécies também apresentam estratégias adaptativas distintas. Dentre essas estratégias, são consideradas a capacidade de ajuste da flutuabilidade na coluna d'água (vesículas de gás), a formação de escumas, a capacidade de armazenamento de fósforo e fixação de nitrogênio atmosférico, capacidade de dormência e baixo índice de predação.

Muitas espécies tóxicas de cianobactérias apresentam vesículas de gás ou aerótopos que lhes permitem regular sua flutuabilidade na coluna d'água, de forma a encontrar o melhor ambiente para seu

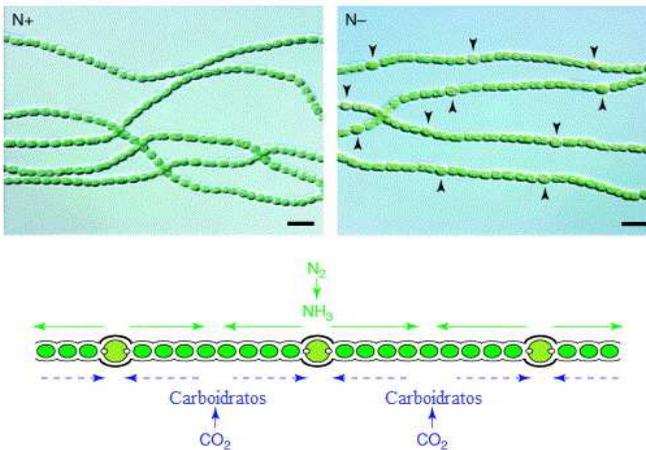
desenvolvimento. Os aerótopos se tornam mais abundantes quando a luz é reduzida e o crescimento do organismo é mais lento. Do contrário, quando a luminosidade é muito elevada, o acúmulo de fotoassimilados (produtos da fotossíntese) torna as células túrgidas e provoca o colapso de uma porção das vesículas, com perda da flutuabilidade (VISSER et al., 2005; TEIXEIRA, 2009). Da mesma forma, quanto maior a disponibilidade de nutrientes, maior a flutuabilidade das células (VISSER et al., 2005).

Devido a esta capacidade de flutuação na coluna d'água, alguns gêneros de cianobactérias (ex. *Microcystis*, *Anabaena* e *Aphanizomenon*) formam grandes colônias que se acumulam na superfície da água. A proximidade com a superfície da água traz como benefício maior incidência de irradiação e, dessa forma, maior taxa de fotossíntese (VISSER et al., 2005) e estoque de maiores quantidades de carboidratos (MUR; SKULBERG; UTKILEN, 1999). Além disso, a grande extensão das colônias reduz a disponibilidade de nutrientes para outros microrganismos competidores, reduzindo seu crescimento; e oferece proteção contra a predação e maior capacidade de flutuação na coluna d'água (VISSER et al., 2005). A formação de escumas é favorecida quando a temperatura da água é mais elevada e a agitação da massa líquida é reduzida (PAERL; HUISMAN, 2009).

Células diferenciadas, encontradas em cianobactérias filamentosas (microrganismos compostos por múltiplas células), podem favorecer a manutenção de uma determinada espécie no ambiente quando as condições deste não são consideradas ideais para o crescimento. Essas espécies desenvolveram vários tipos de células especializadas, como os heterocitos (célula fixadora de nitrogênio), acinetos (células de resistência) e hormogonias (células em filamentos móveis) (KUMAR; MELLA-HERRERA; GOLDEN, 2010). Na ausência de fontes de nitrogênio, a espécie filamentosa forma os heterocitos em intervalos semirregulares (entre 10 e 20 células) ao longo do filamento, com as demais células permanecendo como vegetativas e responsáveis pela fotossíntese oxigênica e pela fixação do carbono (MULLINEAUX et al., 2008; KUMAR; MELLA-HERRERA; GOLDEN, 2010). Os heterocitos perdem a capacidade de realizar a fotossíntese oxigênica e a fixação de CO₂, embora mantenham o fotossistema I. Dessa forma, uma relação

mutualística é estabelecida entre os heterocitos, que fornecem o nitrogênio fixado como glutamina e outros aminoácidos para as células vegetativas que, por sua vez, fornecem aos heterocitos o carbono fixado produzido pela fotossíntese (GOLDEN; YOON, 2003) (Figura 2.2). Apesar desta relação mutualística, heterocitos e células vegetativas estabelecem uma espécie de "separação espacial" para evitar que a nitrogenase seja inativada pelo oxigênio, o que é possível em virtude dos heterocitos possuírem um envelope celular de glicolipídeos que atua como uma barreira de gás, promovendo um ambiente anaeróbico (STAL, 2007; KUMAR; MELLA-HERRERA; GOLDEN, 2010). Essa separação entre as células é o que possibilita que o organismo possa realizar fotossíntese ao mesmo tempo em que fixa o nitrogênio. Heterocitos não crescem ou se dividem como as demais células vegetativas, cuja divisão ocorre por fissão binária (STAL, 2007). Espécies dos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Nodularia* e *Nostoc* são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico.

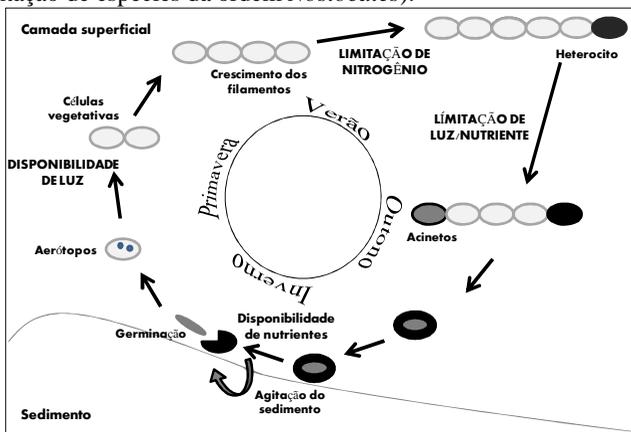
Figura 2.2. Filamentos de cianobactéria do gênero *Anabaena* na presença (N^+) e na ausência (N^-) de nitrogênio combinado. As setas indicam os heterocitos formados na ausência de nitrogênio.



Fonte: adaptado de (GOLDEN; YOON, 2003).

Em condições ambientais que estimulam a dormência, algumas cianobactérias formam uma parede celular mais espessa e tornam-se acinetos, considerados esporos de resistência (MAUSETH, 1998). Por serem células de maior tamanho e espessura, essas tendem a descer na coluna d'água (HENSE; BECKMANN, 2006), podendo sobreviver no sedimento durante o período de inverno e mesmo durante muitos anos, enquanto consomem suas reservas de carboidratos para respiração ou fermentação (LAVOIE et al., 2007). A presença de acinetos no filamento é normalmente associada a existência de heterocitos, embora, em algumas ocasiões, seja possível o desenvolvimento de acinetos mesmo quando o desenvolvimento de heterocitos é reprimido pela presença de nitrogênio (ADAMS; DUGGAN, 1999). Quando as condições ambientais tornam-se novamente favoráveis, as células retornam à atividade e, uma vez que tenham recolonizado a superfície da água (dentro de poucos dias ou semanas), a fase de crescimento das cianobactérias é reiniciada (HENSE; BECKMANN, 2006). Na Figura 2.3 tem-se representado esquematicamente o ciclo de vida de cianobactérias produtoras de heterocitos e acinetos.

Figura 2.3. Representação esquemática do ciclo de vida de uma cianobactéria (representação de espécies da ordem *Nostocales*).



Fonte: adaptado de (HENSE; BECKMANN, 2006)

Além da produção de cianotoxinas, as cianobactérias podem secretar substâncias alelopáticas, expelidas diretamente sobre o predador, de forma a repelir o ataque, podendo causar atordoamento, alterações fisiológicas no organismo e mesmo a morte do predador (SMAYDA, 1997).

2.2 FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS

O termo floração ou “bloom” é associado ao crescimento massivo de cianobactérias em um curto período de tempo (alguns dias) e por uma forte diminuição na diversidade específica na comunidade fitoplanctônica local (AFSSA; AFSSET, 2006). Em condições ambientais adequadas, que envolvem a disponibilidade de nutrientes (N e P), temperatura e luminosidade, as cianobactérias podem formar extensas florações, com milhões de colônias e, por essa razão, esses eventos são associados à existência de escumas na superfície da água. Algumas espécies, como a *Planktothrix agardhii*, no entanto, não formam escumas, embora apresentem elevada densidade de células (WHO, 2003).

A ocorrência de florações de cianobactérias é diretamente relacionada às condições de eutrofização em um sistema aquático. Dentro do aumento da biomassa fitoplanctônica durante a eutrofização, mais notadamente se faz o desenvolvimento de cianobactérias, o que tem sido documentado em ecossistemas boreais, temperados, subtropicais e tropicais (HAVENS, 2008). O aumento na concentração de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo, é normalmente apontado como a principal causa da eutrofização. Embora o aporte de nutrientes possa ser realizado por fontes naturais, são as fontes antropogênicas as principais responsáveis pelo progressivo aumento das concentrações destes nutrientes nos corpos d'água. Efluentes domésticos e industriais, efluentes de atividades agrícolas contendo pesticidas e fertilizantes, o manejo inadequado de bacias hidrográficas e mesmo a construção de barragens em rios são apontados por Vasconcelos (2006) como as maiores causas da eutrofização e, portanto, das florações de cianobactérias quando estes microrganismos estão presentes.

Além do aporte de nutrientes, condições favoráveis de pH (6 e 9), temperatura (25 a 30 °C) e elevada luminosidade, favorecem o crescimento desordenado das cianobactérias (SANT'ANNA et al., 2008). Paerl e Huisman (2008) destacam que o aquecimento global tende a intensificar a formação de florações devido ao aumento da temperatura média da água, o que favorece a estratificação térmica de lagos por períodos mais longos, reduzindo a mistura vertical. Essas condições favoreceriam a formação de vesículas de gás por algumas espécies de cianobactérias, de forma que estas possam permanecer na superfície da água. De acordo com Katircioğlu, Akin e Atici (2004) e Msagati, Siame e Shushu (2006), a produção de toxinas é diretamente relacionada à intensidade de luz e a temperatura do corpo d'água. Quando a intensidade luminosa é elevada, a absorção de ferro pelas cianobactérias é maior, portanto tem-se um maior crescimento dos microrganismos e a produção de toxinas é favorecida. Mudanças na temperatura da água podem alterar a estrutura química da toxina, tendo-se assim maior produção de uma variante sobre outra. Katircioğlu, Akin e Atici (2004) destacam que em temperaturas abaixo de 25 °C, *Anabaena spp.* produz microcistina-LR (MC-LR), enquanto a microcistina-RR (MC-RR) é preferencialmente sintetizada em temperaturas mais elevadas. A identificação de maiores concentrações de toxina na água em temperaturas mais elevadas sugere que as cianobactérias são mais tóxicas durante períodos mais quentes e em regiões onde o clima é naturalmente mais quente (WHO, 1998a).

De forma geral, florações de cianobactérias ocorrem com maior frequência no verão, após um longo período de exposição solar e em condições de água calma e aquecida (OLIVER; GANF, 2000). Entretanto, a ocorrência desses eventos tem sido igualmente registrada em períodos de primavera e outono e, em alguns casos, no inverno (BUCKA; WILK-WOŹNIAK, 2005). Havens (2008) destaca que as florações de cianobactérias apresentam uma ampla dinâmica temporal, com alguns lagos, rios e estuários tendo florações sazonais que começam no verão e terminam no outono, outros que apresentam florações persistentes, que englobam todas as estações do ano, e ainda outros que ocorrem em picos extremos mas se desfazem em poucos dias ou semanas.

Vasconcelos (2006) relaciona os principais efeitos da formação de floração de cianobactérias em corpos d'água, destacando o decréscimo na transparência da água, flutuações nos níveis de oxigênio na água, flutuações no pH e a liberação de toxinas por espécies tóxicas de cianobactérias. A menor transparência da água impede que a luz atinja profundidades maiores, prejudicando espécies que não são capazes de migrar na coluna d'água e pequenos animais que necessitam da visão para sua sobrevivência. Florações de elevada biomassa tendem a produzir grandes quantidades de oxigênio durante o dia, podendo causar a supersaturação da água. O consumo do oxigênio durante a noite pela respiração de todos os organismos aquáticos, por sua vez, resulta na queda da concentração de oxigênio a níveis que podem causar a morte de espécies sensíveis a baixas concentrações de oxigênio, como os peixes. Variações no pH, elevados durante o dia e mais baixos a noite, também acabam por causar efeitos negativos no ecossistema. A produção de toxinas por algumas espécies é outro aspecto preocupante quando da presença de florações de cianobactérias tóxicas. Além de causar a morte de organismos aquáticos, o contato com a água pode levar à morte de animais de pequeno e mesmo grande porte, principalmente através da ingestão da água. Ainda maior atenção deve ser dada quando o corpo d'água contaminado é utilizado como manancial de abastecimento de água potável, em que a não remoção das toxinas pode expor a população aos efeitos deletérios das toxinas no organismo, podendo levar a morte do indivíduo quando a exposição se dá em doses muito elevadas.

A presença de cianobactérias tóxicas em mananciais de abastecimento de água tem sido destacada como um perigo em potencial para a qualidade da água destinada ao abastecimento humano. Lagos e barragens apresentam tempos de retenção de água normalmente mais longos se comparado aos rios, o que favorece o acúmulo de sedimentos e nutrientes como o fósforo, que após certo período de armazenamento pode ser liberado para a água e, combinado às condições ideais de crescimento, favorecer um rápido aumento no crescimento de algas e cianobactérias (DAVIS; SHAW, 2006). Eventos de floração em lagos e reservatórios de água são frequentemente relatados na literatura, inclusive no Brasil (COSTA et al., 2006; OBERHOLSTER; BOTHA;

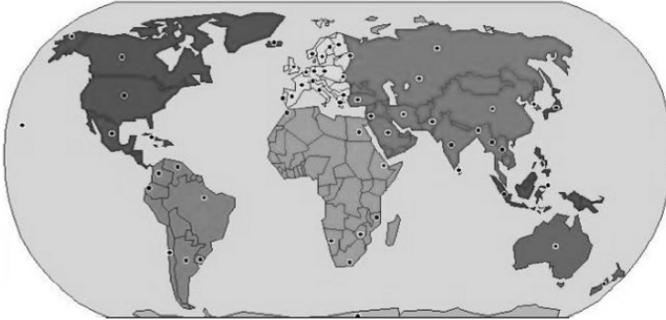
CLOETE, 2006; CARVALHO et al., 2008; SÖMEK; USTAOĞLU; M., 2008; MOSCHINI-CARLOS et al., 2009; GRAHAM et al., 2010; SÁ et al., 2010). As cianobactérias tóxicas mais comumente encontradas em florações de água doce são *Microcystis* spp., *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Planktothrix rubescens*, *Synechococcus* spp., *Planktothrix agardhii*, *Gloeotrichia* spp., *Anabaena* spp., *Lyngbya* spp., *Aphanizomenon* spp., *Nostoc* spp., *Oscillatoria* spp., *Schizothrix* spp. e *Synechocystis* spp (WHO, 2003). A espécie *Microcystis aeruginosa* é uma das cianobactérias formadoras de floração mais comuns em ecossistemas de água doce, sendo largamente distribuída em todos os continentes e com maior frequência de toxicidade (STRAUB et al., 2011). No Brasil, as espécies *M. aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii* são normalmente as mais observadas nos eventos de floração (SANT'ANNA et al., 2008).

Vários reservatórios urbanos utilizados para o abastecimento de água no Brasil têm sido sujeitos a eutrofização e frequentes florações de cianobactérias, o que é relacionado às alterações na qualidade da água, principalmente em decorrência do despejo de efluentes domésticos e industriais, como é o caso dos reservatórios Billings e Guarapiranga, em São Paulo. Alguns estudos nesses reservatórios indicam a presença de diferentes espécies de cianobactérias, com predominância de espécies do gênero *Microcystis* e da espécie *C. raciborskii* (CARVALHO et al., 2007; MOSCHINI-CARLOS et al., 2009; PICCIN-SANTOS; BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2012). A detecção de variantes de microcistina foi sempre observada nestes estudos. Florações de cianobactérias em reservatórios de outras regiões do país, como Pernambuco (DANTAS; MOURA; BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2011; BITTENCOURT-OLIVEIRA et al., 2012; PICCIN-SANTOS; BITTENCOURT-OLIVEIRA, 2012), Pará (VIEIRA et al., 2005; SÁ et al., 2010), Rio Grande do Norte (CHELLAPPA; COSTA, 2003) e Rio Grande do Sul (MATTHIENSEN; YUNES; CODD, 1999; CARVALHO et al., 2008), entre outros Estados, também são relatadas.

Lavoie et al. (2007) consideram que a presença de cianotoxinas tenha sido reportada em praticamente todas as regiões onde florações de cianobactérias foram estudadas, o que torna a intoxicação por cianotoxinas um problema de ordem mundial. A Figura 2.4 apresenta a

distribuição de proliferações de cianobactérias associadas com produção de cianotoxinas em diferentes continentes.

Figura 2.4. Países onde florações aquáticas de cianobactérias produzindo cianotoxinas foram documentadas.



Fonte: (CARMICHAEL, 2008).

Além das alterações da qualidade da água e das perturbações na biodiversidade do ecossistema aquático, como mencionado anteriormente, a presença de cianobactérias em lagos e reservatórios de água traz uma série de problemas para o uso antrópico deste ambiente. A presença de florações de cianobactérias tende a desencorajar o uso dos corpos d'água para atividades recreativas em função da coloração, odor e textura da água. Além disso, pode-se relacionar a possibilidade de afecções cutâneas ou de mucosas após o banho em ambientes contaminados. Outros aspectos que podem ser relacionados são: produção de sabor desagradável na água; e indução a riscos sanitários por ingestão, inalação ou exposição por diálise, em casos onde as cianobactérias e toxinas não são completamente eliminadas (AFSSA; AFSSET, 2006).

No que concerne ao tratamento de águas para abastecimento, a presença de cianobactérias em quantidades relativamente elevadas, tende a promover uma série de problemas operacionais. As variações súbitas de pH na água devido ao consumo e produção de CO₂ pelas cianobactérias induz a uma menor eficiência dos processos de coagulação e floculação, influenciando, conseqüentemente, na

sedimentabilidade dos flocos. A baixa densidade das células é outro fator que dificulta a etapa de sedimentação e, por conseguinte, atribui maiores cargas para os filtros, cujas carreiras de filtração tendem a ser reduzidas devido à obstrução dos mesmos pelas cianobactérias, tanto na superfície quanto no interior da camada filtrante (BABLON et al., 1991a). O aumento nas dosagens de coagulantes, maior volume de lodo, sabor e odor na água tratada e a formação de subprodutos da desinfecção são também considerados como dificuldades operacionais decorrentes de elevadas concentrações de células de cianobactérias no corpo d'água (DE JULIO et al., 2010). Apesar de todas as implicações operacionais atribuídas a presença das cianobactérias, a maior preocupação reside na adoção de processos de tratamento que resultem na remoção de cianotoxinas, metabólitos produzidos por algumas espécies de cianobactéria, visto que processos convencionais de tratamento são caracterizados como ineficientes para esta finalidade .

2.3 CIANOTOXINAS

Cianotoxinas são definidas como metabólitos secundários sintetizados por algumas espécies de cianobactérias de pelo menos quatro das cinco ordens existentes (FALCONER, 2005). Cerca de 40 espécies de cianobactérias são caracterizadas como produtoras de cianotoxinas (JAYATISSA et al., 2006; WESTRICK et al., 2010). Considerando que a maior parte das toxinas é intracelular, aproximadamente 95% (CHORUS; BARTRAM, 1999), tem-se como preocupação evitar que as mesmas sejam liberadas para a água. A liberação destas substâncias pode ocorrer naturalmente, em virtude do estado de senescência das células ou através da lise celular, o que muitas vezes é associada à aplicação de algicidas (LAVOIE et al., 2007; WESTRICK et al., 2010).

A função exata das toxinas ainda não é totalmente definida. Lavoie et al. (2007) destacam considerações de diferentes autores quanto a função destas substâncias. Alguns autores sugerem a produção das cianotoxinas como forma de proteção contra a predação pelo zooplâncton e para a eliminação de organismos competidores pelo

mesmo recurso, de forma que as cianobactérias mantenham-se dominantes sobre outros microrganismos fitoplanctônicos. Outros autores consideram que as toxinas exerceriam funções regulatórias no metabolismo celular e seriam importantes para o crescimento da célula.

As toxinas produzidas por cianobactérias podem ser categorizadas de acordo com suas propriedades toxicológicas ou por sua estrutura química. A partir das propriedades toxicológicas, esses compostos são classificados como neurotoxinas (anatoxina-a, anatoxina-a(s) e saxitoxina e congêneres), promotores de tumor (microcistinas e lipopolissacarídeos), dermatotoxinas ou toxinas irritantes ao contato (lingbiatoxina A, aplisiatoxinas e lipopolissacarídeos) e hepatotoxinas (microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsina). Baseado na sua estrutura química, as cianotoxinas são classificadas em três grupos principais: peptídeos cíclicos (microcistinas e nodularinas); alcalóides (neurotoxinas e cilindrospermopsina); e lipopolissacarídeos (MSAGATI; SIAME; SHUSHU, 2006). Falconer (2005) destaca que a permanência das toxinas na célula é variável em função do tipo de toxina. Neste sentido, alcalóides seriam mais propensos a permanecerem dissolvidos na água do que peptídeos, os quais são liberados da célula somente quando da ocorrência de danos ou morte celular.

Das toxinas solúveis em água, cilindrospermopsina e microcistinas são consideradas as de maior importância quando se trata da segurança do fornecimento de água potável (FALCONER, 2005). Ambas as toxinas tem o fígado como órgão alvo e apresentam propriedades carcinogênicas e promotoras de tumor. Na Tabela 2.1 são indicadas as principais toxinas associadas a eventos de floração com a ocorrência de intoxicação, a dose letal (DL_{50}) para cada grupo de toxina por administração intraperitoneal para ratos, e os organismos produtores.

Como destacado por Hoeger et al. (2005), alguns países, normalmente com históricos de contaminação com cianobactérias em reservatórios de água, estabelecem em sua legislação, valores de referência (máximo valor permitido) para algumas cianotoxinas. Os limites máximos de concentração adotados para diferentes toxinas em diferentes países são indicados na Tabela 2.2. Valores de referência para muitas das toxinas existentes não são adotados pela falta de dados de toxicidade animal.

Tabela 2.1. Doses letais e organismos produtores de cianotoxinas.

Toxina	DL ₅₀ (µg/kg de peso corporal)	Organismos produtores*
Anatoxina-a	250	<i>Ana, Osc, Aph, Cylmun, Plank Osci,</i>
Homoanatoxina-a	250	<i>Plank</i>
Anatoxina-a(s)	40	<i>Ana</i>
Saxitoxinas	10 a 30	<i>Aph, Plankx, Ana, Cylsis, Lyng</i>
Microcistinas	25 a ~1.000	<i>Mic, Ana, Nos, Plank, Anasis, Hapalo</i>
Nodularinas	30 a 50	<i>Nod</i>
Cilindrospermopsina	200 a 2.100	<i>Cylsis, Apha, Raph, Umez</i>

**Ana, Anabaena; Osc, Oscillatoria; Aph, Aphanizomenon; Cylmun, Cyldrospermum; Plank, Planktothrix; Lyng, Lyngbya; Cylsis, Cyldrospermopsis; Mic, Microcystis; Nos, Nostoc; Anasis, Anabaenopsis; Hapalo, Hapalosiphon; Nod, Nodularia; Raph, Raphidiopsis; Umez, Umezakia.*
Fonte: (CODD; MORRISON; METCALF, 2005).

Tabela 2.2. Valores de referência para as toxinas microcistina, toxinas paralisantes, anatoxina-a e cilindrospermopsina adotados por alguns países.

	MC*	TPs	ANTX-a	CYN
Austrália	1,3 µg·L ⁻¹	3,0 µg·L ⁻¹ (1)	- (2)	- (2)
Brasil	1,0 µg·L ⁻¹	3,0 µg·L ⁻¹ (3)	-	-
Canadá	1,5 µg·L ⁻¹	-	-	-
França	1,0 µg·L ⁻¹	-	-	-
Europa	0,1 µg·L ⁻¹	0,1 µg·L ⁻¹	0,1 µg·L ⁻¹	0,1 µg·L ⁻¹
Nova Zelândia	1,0 µg·L ⁻¹	1,0 µg·L ⁻¹	6,0 µg·L ⁻¹ (4)	3,0 µg·L ⁻¹
Oregon (USA)	1,0 µg·g ⁻¹ (5)	-	-	-
WHO	1,0 µg·g ⁻¹ (6)	-	-	-

* MC (microcistina); TPs (toxinas paralisantes); ANTX-a (anatoxina-a), CYN (cilindrospermopsina).

Fonte: Valores retirados de (AUSTRALIA, 2004), (BRASIL, 2011), (HOEGER; HITZFELD; DIETRICH, 2005) e (NEW-ZEALAND, 2005).

-
- (1) Valor de alerta calculado para exposição aguda quando da ocorrência de florações intermitentes (AUSTRALIA, 2004).
- (2) Somente mencionado na legislação – falta de dados de toxicidade (AUSTRALIA, 2004).
- (3) Valores recomendados (BRASIL, 2011).
- (4) Valores máximos também determinados para os análogos anatoxina-a(s) e homoanatoxina: $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.
- (5) Saúde alimentar.
- (6) Valor provisório.

2.3.1 Microcistina

A microcistina é a toxina mais frequentemente encontrada em florações de água doce e a mais estudada devido a sua elevada toxicidade. São microrganismos produtores destas toxinas cianobactérias dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Nostoc* e *Anabaenopsis*.

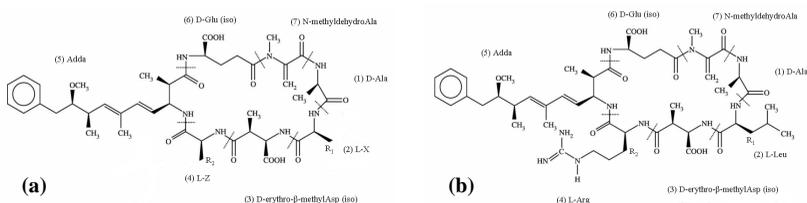
As microcistinas são altamente solúveis em água sendo conhecidas mais de 80 variantes (HUMPAGE, 2005; WESTRICK et al., 2010). De acordo com van Apeldoorn et al. (2007), as microcistinas são estáveis no reservatório de água por menos de uma semana, mas mostram-se estáveis por longos períodos de tempo em água filtrada ou deionizada. Esses compostos se apresentam relativamente polares, devido principalmente à presença de ácidos carboxílicos livres na estrutura (MSAGATI; SIAME; SHUSHU, 2006), e seu peso molecular varia de 800 a 1.100 Da (SIVONEN; JONES, 1999).

Estruturalmente, as microcistinas são classificadas como hepatopeptídeos cíclicos, contendo cinco aminoácidos fixos, sendo D-alanina (posição 1), ácido D-metilaspartico (posição 3), Adda (3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6-ácido dienóico) (posição 5), Ácido D-glutâmico (posição 6) e N-metildehidroalanina (Mdha) (posição 7), e dois aminoácidos variáveis nas posições 2 (X) e 4 (Y), normalmente L-aminoácidos (MSAGATI; SIAME; SHUSHU, 2006). Falconer (2005) destaca que a maioria das variantes de L-aminoácidos apresenta aminoácidos hidrofóbicos na posição X e hidrofílicos na posição Y. As principais diferenças estruturais entre as variantes de microcistina, tais como MC-LR, MC-LA, MC-RR e MC-YR, devem-se à substituição de

aminoácidos simples (WESTRICK et al., 2010). As variantes mais tóxicas de microcistina são aquelas com L-aminoácidos mais hidrofóbicos, como por exemplo, MC-LA, -LR, -YR e -YM, e as menos tóxicas aquelas com aminoácidos mais hidrofílicos, como por exemplo a MC-RR. A diferença de toxicidade entre uma variante e outra pode ser de 6 a 10 vezes (FALCONER, 2005).

Na Figura 2.5, tem-se representada a estrutura geral da toxina microcistina (Figura 2.5a) e a estrutura da MC-LR (Figura 2.5b), em que nas posições X e Y tem-se a presença dos aminoácidos leucina (L) e arginina (R), respectivamente. Em outras variantes de microcistina, como por exemplo, MC-RR e MC-YA, as posições X e Y são substituídas por arginina-arginina e tirosina-alanina, respectivamente (MOLICA; AZEVEDO, 2009). Outros aminoácidos que podem substituir essas posições são indicados por van Apeldoorn et al. (2007). A MC-LR é considerada a variante mais tóxica e mais frequentemente encontrada em fontes de água (ANTONIOU; CRUZ; DIONYSIOU, 2005). Um valor máximo permitido de $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ expresso em termos de equivalente de microcistina é preconizado pela legislação brasileira (Tabela 2.2) (BRASIL, 2011).

Figura 2.5. Estrutura geral das microcistinas (a) e estrutura da toxina MC-LR (b).

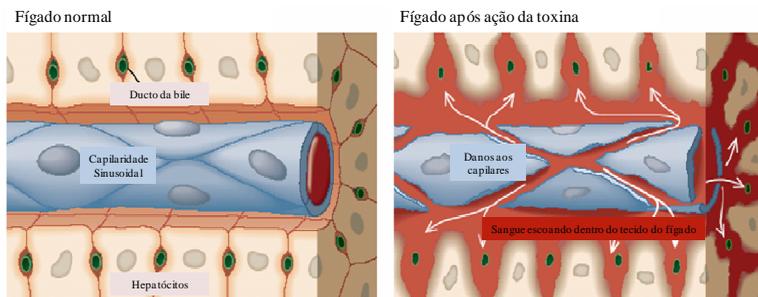


As microcistinas são consideradas extremamente estáveis e resistentes a hidrólise e oxidação química em pH próximo a neutralidade (SIVONEN; JONES, 1999). Em temperaturas elevadas (40 °C) e alto ou baixo valor de pH, são reportadas hidrólises lentas, e períodos de aproximadamente 10 semanas a pH 1 e mais de 12 semanas a pH 9 para

que uma degradação superior a 90% seja alcançada (TEIXEIRA, 2009). Westrick et al. (2010) destacam que as microcistinas possuem três áreas na molécula sujeitas a oxidação: a dupla ligação conjugada na metade Adda; a única dupla ligação na metade Mdha; e a cadeia lateral dos aminoácidos das variantes. Considerando as variantes MC-LR, MC-LA, MC-RR e MC-YR, os autores indicam que somente os aminoácidos arginina e tirosina são potencialmente vulneráveis a oxidação.

A toxicidade das microcistinas é atribuída à presença do aminoácido Adda na estrutura, o qual atua a partir da inibição da proteína fosfatase 1 e 2A (PP1 e PP2A). Essas proteínas são essenciais para os processos regulatórios da célula, tais como crescimento, síntese de proteínas, metabolismo de glicogênio e contração muscular. As hepatotoxinas têm como órgão alvo o fígado, causando a destruição da estrutura interna do órgão, e podendo levar a hemorragia intra-hepática, choque hipovolêmico e morte (BRIAND; JACQUET; BERNARD, 2003; ANTONIOU; CRUZ; DIONYSIOU, 2005; MSAGATI; SIAME; SHUSHU, 2006). A Figura 2.6 esquematiza a ação da microcistina no fígado.

Figura 2.6. Representação esquemática da estrutura do fígado normal, e após a ação da microcistina.



Fonte: adaptado de Hudnell, K. (2005) (http://www.swrcb.ca.gov/water_issues/programs/bluegreen_algae/docs/workgroup110805/hudnell_cyano.pdf)

Alguns estudos sugerem que a microcistina pode atuar como uma substância promotora de tumor (apesar de não causar câncer diretamente, estimula a proliferação de células cancerosas). De acordo

com Svirčev et al. (2010), além de promotora de tumor, a MC-LR pode atuar como iniciadora de tumor, o que é baseado no fato de que esta substância pode induzir a danos no DNA, seja por interação direta com o DNA ou por mecanismos indiretos através da formação de espécies oxigênicas reativas. Comparada a nodularina, outra toxina hepatotóxica, a microcistina mostra-se levemente menos potente como promotora de tumor (BRIAND; JACQUET; BERNARD, 2003).

2.4 PROCESSOS OXIDATIVOS APLICADOS AO TRATAMENTO DE ÁGUA

2.4.1 Oxidação Química

Por definição, a oxidação é um processo químico caracterizado pela perda de elétrons por uma molécula, átomo ou íon. Este processo envolve reações de quebra de ligações químicas e a remoção de elétrons, os quais são transferidos do contaminante para o agente oxidante. Dessa forma, o contaminante é oxidado e o oxidante (aceptor de elétrons) reduzido (REGENESIS, 2007). De acordo com Parson e Willians (2004), a oxidação pode ser gerada a partir de compostos inorgânicos, em que se tem a remoção de elétrons para produzir um maior estado de oxidação; ou de compostos orgânicos, em que a combinação do material carbonáceo com o oxigênio produz um composto mais oxigenado.

No tratamento de água e águas residuárias, o principal objetivo da oxidação química é a mineralização, a qual é definida como a conversão de um poluente orgânico em dióxido de carbono (CO_2), água e moléculas inorgânicas simples ou, ao menos, em produtos menos agressivos (ANDREOZZI et al., 1999; PARSONS; WILLIANS, 2004). Os oxidantes mais comumente empregados no tratamento de água são: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ozônio (O_3), cloro (Cl_2) e permanganato de potássio (KMnO_4). Ozônio e peróxido de hidrogênio, em particular, mostram-se eficientes quanto à remoção de matéria orgânica e minimização na formação de trihalometanos (THMs), o que os tornam oxidantes potenciais em substituição ao cloro. Com a aplicação do ozônio, alguns funcionais na MON podem ser oxidados, assim como o oxidante pode transformar a MON de um caráter hidrofóbico para um

caráter hidrofílico, reduzindo a formação de trihalometanos (ŚWIETLIK et al., 2004). O H_2O_2 é normalmente empregado em conjunto à radiação ultravioleta (UV) (oxidação fotoquímica), uma vez que o principal mecanismo de degradação se deve aos radicais hidroxila ($\cdot OH$), gerados a partir de sua decomposição fotoquímica. A aplicação conjunta do processo UV/ H_2O_2 e O_3 é igualmente possível, podendo-se obter uma maior eficiência de degradação.

2.4.2 Mecanismo de ação dos oxidantes químicos na remoção de microrganismos

Quando um oxidante é usado como biocida, diferentes mecanismos de ação podem ser considerados (MAILLARD, 2002; MORATÓ et al., 2003; ASANO et al., 2007). De acordo com Maillard (2002), três níveis de interação podem ser descritos: (1) interação com os componentes da parede externa da célula; (2) interação com a membrana citoplasmática; e (3) interação com os constituintes citoplasmáticos. Essas interações podem ocorrer em um ou em todos os níveis. Quando agentes oxidantes não-específicos são usados (ex. diferentes formas de cloro) a estrutura mais externa da célula (parede celular e membrana citoplasmática) são as primeiras a ser atacadas (MORATÓ et al., 2003). Embora a viabilidade celular possa não ser afetada, a mudança na hidrofobicidade é visível (MAILLARD, 2002).

Com o rompimento da parede celular, a membrana citoplasmática e os constituintes internos da célula são atacados. O rompimento da membrana citoplasmática, mesmo que a parede celular não seja rompida, induz a liberação dos componentes intracelulares, devido a mudanças na permeabilidade, de forma que o oxidante possa atacá-los interna ou externamente à célula (MAILLARD, 2002; MORATÓ et al., 2003). Alguns estudos indicam que biocidas hidrofílicos com baixo peso molecular (< 600 Da) podem passar através dos poros de células gram-negativas, enquanto outras moléculas de maior peso molecular ou lipofílicas/hidrofílicas são impedidos, difundindo-se através da bicamada da membrana externa (DENYER; STEWART, 1998; MCDONNELL; RUSSELL, 1999). Dessa forma, apesar da liberação

dos constituintes intracelulares, danos na parede celular do microrganismo não seriam verificados.

2.4.3 Ozonização

A ozonização no tratamento de águas começou a ser utilizada na Europa durante o final dos anos de 1880, sendo o ozônio empregado como um agente antibactericida, rapidamente reconhecido por sua eficiência (BROOKE, 2009). Entretanto, de acordo com o referido autor, o principal objetivo da ozonização não era apenas a desinfecção, mas também a redução do sabor e odor em águas de abastecimento.

Na maioria das plantas de tratamento, o ozônio é utilizado em múltiplas aplicações. Quando o objetivo é a oxidação de ferro (Fe) e manganês (Mn) livres ou se considera a melhoria no processo de coagulação, o ozônio é usualmente instalado no início da planta de tratamento (pré-ozonização). A aplicação do ozônio após a etapa de sedimentação ou antes da etapa de filtração, denominada ozonização intermediária, tem como princípio melhorar a eficiência da adsorção (CAG – carvão ativado granular) ou filtração e para o controle de sabor e odor (BABLON et al., 1991a; RAKNESS, 2005). O uso do ozônio em ambas as posições também pode ser considerado. Em plantas de tratamento que não possuem sistema de filtração, o ozônio é utilizado primariamente para a desinfecção de microrganismos, tendo a oxidação como um benefício secundário (RAKNESS, 2005).

A forte natureza eletrofílica do ozônio lhe confere habilidade de reagir com uma ampla variedade de grupos funcionais orgânicos, incluindo duplas e triplas ligações carbono-carbono alifáticas e aromáticas, grupos funcionais organometálicos, e ainda com algumas ligações carbono-cloro (NOYES, 1991). Compostos alifáticos insaturados reagem mais rapidamente com o ozônio se comparado a hidrocarbonetos saturados, assim como compostos aromáticos com grupos doadores de elétrons (OH e NH₂) tem reação mais rápida do que químicos aromáticos com grupos receptores de elétrons (NO₂ e Cl₂) (BABLON et al., 1991b; MASTEN; DAVIES, 1994). De forma geral, os aldeídos reagem mais rapidamente do que os alcoóis e os ácidos carboxílicos mostram-se essencialmente não reativos com o ozônio.

Hoigné e Bader (1983 apud MASTEN; DAVIES, 1994a)¹ consideram que quanto mais clorado um composto, menos facilmente ele é oxidado. Noyes (1991) destaca que devido à natureza não seletiva das reações de ozonização, deve-se considerar que os níveis de concentração de contaminantes não perigosos, mas oxidáveis, na corrente de alimentação seja reduzida tanto quanto possível no tratamento prévio.

O ozônio é caracterizado como um oxidante forte e um poderoso desinfetante. Assim como outros oxidantes empregados para o tratamento de água, o ozônio é instável em água e sofre reações com alguns componentes da matriz (VON GUNTEN, 2003). Os potenciais de oxidação dos oxidantes e desinfetantes mais comuns associados ao tratamento de água são listados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Potenciais oxidativos de oxidantes utilizados para o tratamento de água.

Espécies		Potencial de oxidação (V)
Radical hidroxila	$\cdot\text{OH}$	2,80
Ozônio	O_3	2,07
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	1,76
Íon permanganato	MnO_4^-	1,68
Ácido hipocloroso	HOCl	1,49
Cloro	Cl_2	1,36
Ácido hipobromoso	HOBr	1,33
Bromo	Br_2	1,07
Ácido hipoyodoso	HOI	0,99
Dióxido de cloro	ClO_2 (aq)	0,95
Iodo	I_2	0,54
Oxigênio	O_2	0,40

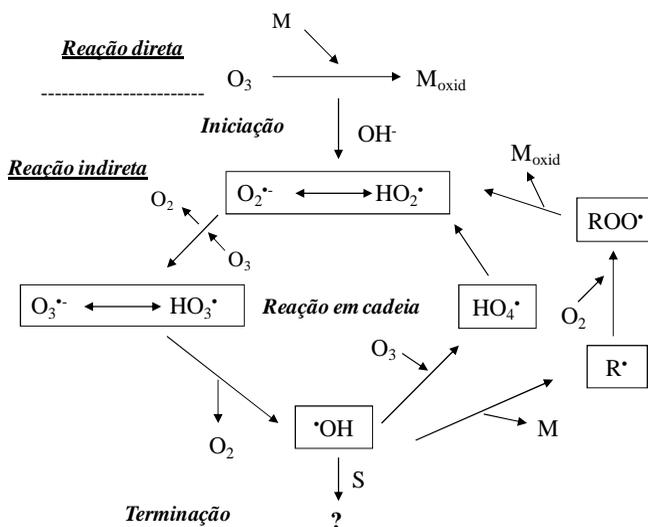
Fonte: (SHAMMAS; WANG, 2005)

Em uma solução aquosa, o ozônio pode reagir com diferentes compostos a partir de dois mecanismos de reação distintos: reação direta, em que o O_3 molecular reage diretamente com o composto; e reação indireta, em que os radicais $\cdot\text{OH}$ formados a partir da

¹ Hoigné, J. The chemistry of ozone in water. In: S. Stucki (ed.). Process Technologies for water treatment. New York: Plenum, 1988. p. 121-143.

decomposição do ozônio são responsáveis pela reação com os compostos orgânicos (BABLON et al., 1991b; GOTTSCHALK; LIBRA; SAUPE, 2010). Vários segundos após a introdução do ozônio na água, parte deste reage imediatamente com os constituintes dissolvidos na água, e outra parte se decompõe para formar os radicais (TAKIĆ et al., 2004). Na Figura 2.7 tem-se representado os dois mecanismos possíveis de oxidação com o uso do ozônio.

Figura 2.7. Modelo de reação direta e indireta do ozônio. (S: sequestrador; R: produto da reação; M: micropoluento)



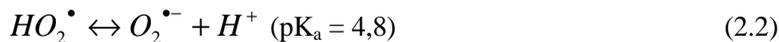
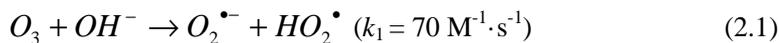
Fonte: Adaptado de (GOTTSCHALK; LIBRA; SAUPE, 2000).

As reações indiretas são consideradas mais rápidas e menos seletivas que as reações diretas, podendo reagir de forma mais fácil e rápida com os diversos constituintes orgânicos presentes na água. Von Gunten (2003) destaca que para diferentes aplicações, as duas espécies de ozônio (O_3 molecular e radicais $^{\cdot}OH$) possuem importâncias diferentes. Enquanto a desinfecção ocorre a partir da reação com o ozônio molecular, o processo de oxidação pode ocorrer por meio de ambas as espécies oxidantes. Segundo o referido autor, a desinfecção e a oxidação

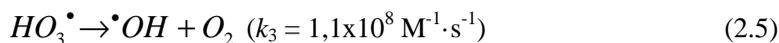
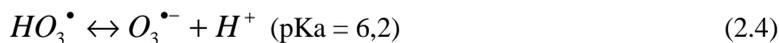
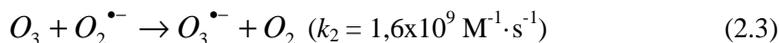
podem ocorrer simultaneamente se a reação direta com o ozônio é responsável pela oxidação. Caso contrário, se os compostos mostram-se resistentes a oxidação direta, o ozônio é transformado em radicais $\cdot\text{OH}$, o que resulta em uma menor eficiência do processo em relação à desinfecção.

Bablon et al. (1991b) destacam que em reações diretas, o ozônio pode atuar como um agente 1,3-dipolo, um agente eletrofílico ou como um agente nucleofílico. Esses três tipos de reação irão ocorrer em soluções que contenham poluentes orgânicos. Devido a sua estrutura dipolar, a molécula de ozônio reage com compostos insaturados (duplas ou triplas ligações) tendo-se a formação de uma estrutura cíclica chamada de ozonido (mecanismo de Criegee). Quando em solução protônica, esse ozonido primário gerado se decompõe em compostos carbonílicos (aldeídos e cetonas) e íons híbridos (compostos químicos eletricamente neutros, mas com cargas opostas em diferentes átomos) que podem se converter em compostos carbonílicos e peróxido de hidrogênio. As reações eletrofílicas são restritas a sítios moleculares que apresentem elevada densidade eletrônica e principalmente em soluções cuja presença de determinados compostos aromáticos seja verificada. Compostos aromáticos que são substituídos por grupos doadores de elétrons (OH, NH_2 e compostos similares), apresentam uma elevada densidade eletrônica nos carbonos localizados nas posições *orto* e *para* e, portanto, são mais reativos com o ozônio nestas posições. Compostos aromáticos substituídos por grupos receptores de elétrons ($-\text{COOH}$ e $-\text{NO}_2$), por sua vez, apresentam baixa densidade eletrônica, reagindo fracamente com o ozônio. Para estes compostos, são caracterizadas as reações nucleofílicas.

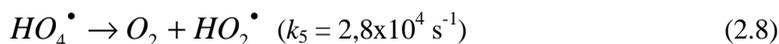
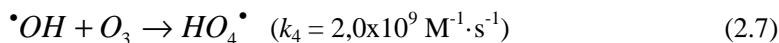
A reação indireta no processo de oxidação com ozônio é considerada mais complexa se comparada à reação direta. Três diferentes etapas são consideradas na reação: iniciação, propagação em cadeia e terminação (Figura 2.7). Gottschalk, Libra e Saupe (2000) descrevem a sequência das etapas no processo. A iniciação corresponde ao decaimento do ozônio, acelerado por iniciadores, como por exemplo, íons hidróxido (OH^-), tendo-se a formação de um ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e um radical hidroperóxil (HO_2^{\cdot}) (Eq. 2.1). Acima do equilíbrio ácido-base, o radical HO_2^{\cdot} forma um ânion $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Eq. 2.2).



Na segunda etapa (reação em cadeia), o ânion $O_2^{\bullet-}$ reage com o ozônio para formar um ânion ozonido ($O_3^{\bullet-}$), o qual se decompõe imediatamente via trióxido de hidrogênio (HO_3^{\bullet}) para um radical $\bullet OH$ (Eq. 2.3 a 2.5). Na reação global, três moléculas de O_3 produzem dois radicais $\bullet OH$ (Eq. 2.6).

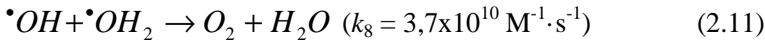
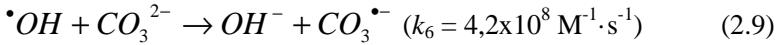


Os radicais $\bullet OH$ formados reagem com o ozônio conforme as equações 2.7 e 2.8. Os radicais HO_2^{\bullet} formados podem iniciar novamente a cadeia de reações (Eq. 2.2). Ainda outros mecanismos de reação podem ser obtidos nesta etapa.



Na etapa de terminação, algumas substâncias orgânicas e inorgânicas reagem com o radical $\bullet OH$ para formar radicais secundários que não produzem radicais superóxidos ($HO_2^{\bullet}/O_2^{\bullet-}$) (Eq. 2.9 e 2.10). Essas

substâncias (“sequestradores”) tendem a encerrar a cadeia de reações e inibir o decaimento do ozônio. Reações entre dois radicais também podem encerrar a cadeia de reações (Eq. 2.11).



No tratamento de água, a aplicação do ozônio pode ser realizada para diversos propósitos: desinfecção e controle de algas; oxidação de poluentes inorgânicos (ferro e manganês); oxidação de micropoluentes orgânicos (compostos que geram sabor e odor, poluentes fenólicos e pesticidas); oxidação de macropoluentes; e melhoria da coagulação (BABLON et al., 1991).

2.4.3.1 Principais fatores que afetam as reações do ozônio

O nível de decomposição do ozônio depende de alguns fatores, como temperatura, pH, concentração de ozônio, e a concentração de promotores (OH) e inibidores na água (COD e alcalinidade) (TAKIĆ et al., 2004). A eficiência do ozônio na degradação do contaminante alvo será determinada em função das condições de decomposição do oxidante. Dependendo da qualidade e da quantidade de compostos oxidáveis e também de fatores como temperatura, pH e concentração de "sequestradores" o tempo de reação pode mudar de poucos segundos para alguns minutos (CSÉFALVAY; NÖTHER; MIZSEY, 2007).

Efeito da Temperatura

A temperatura tem efeito direto sobre a solubilidade do ozônio. Temperaturas elevadas tendem a reduzir a solubilidade do oxidante na água. Por outro lado, a decomposição do ozônio torna-se mais rápida em

temperaturas mais elevadas (CSÉFALVAY; NÖTHE; MIZSEY, 2007; ERSHOV; MOROZOV, 2009) e a taxa de reação do ozônio com o substrato também tende a aumentar (BABLON et al., 1991), uma vez que sua habilidade de oxidação aumenta. Gottschalk, Libra e Saupe (2000) consideram que um aumento da temperatura em 10 °C tende a dobrar a taxa de reação do ozônio. Bablon et al. (1991) destacam que um aumento na taxa de destruição de microrganismos é geralmente associado ao aumento de temperatura da água, seguindo a teoria de Hoff-Arrhenius. Nesta teoria, considera-se que a temperatura determina a taxa pela qual o desinfetante difunde através da superfície do organismo e a sua taxa de reação com o substrato. Temperaturas muito elevadas, no entanto, tendem a reduzir a eficiência global do processo de oxidação, em virtude da redução da quantidade de ozônio disponível para a ocorrência da reação (YASAR et al., 2007). Yasar et al. (2007) observaram redução na eficiência de remoção de DQO (demanda química de oxigênio) quando a temperatura aumentou de 30 para 60 °C. Cséfalvay, Nöthe e Mizsey (2007) avaliaram a influência da temperatura na decomposição do ozônio e observaram redução no tempo de decomposição com o aumento da temperatura. Em temperatura de 8 °C o ozônio desapareceu completamente após 600 s, enquanto a 27 °C o desaparecimento do ozônio ocorreu em cerca de 200 s. Dessa forma, quantitativamente, o ozônio torna-se menos disponível para oxidação em temperaturas muito elevadas.

Efeito do pH

Como destaca Von Gunten (2003), o pH da água é considerado um fator importante devido a presença dos íons hidróxido, os quais são responsáveis pela etapa de iniciação na decomposição do ozônio (Eq. 2.1). O aumento na concentração de íons OH⁻ em virtude do maior pH na água, tende a acelerar a fase de iniciação de decomposição do ozônio. Considerando que os radicais [•]OH apresentam potencial oxidativo mais elevado e são menos seletivos em comparação ao ozônio molecular, a taxa de reação com os constituintes tende a ser aumentada. Ershov e Morozov (2008) observaram um aumento substancial na taxa de decomposição do ozônio quando o pH aumentou de 4 para 8, sendo o

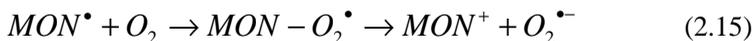
valor de pH na solução restabelecido após a completa decomposição do ozônio. Em estudo posterior, Ershov e Morozov (2009) observaram que a concentração de ozônio em solução ($0,8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) diminuiu cerca de 90% em aproximadamente 100 horas em pH 1,7. Com o aumento do pH para 7,9, a decomposição completa ocorreu em apenas 30 min. Os autores indicaram a seguinte relação entre a taxa constante e o pH: $0,023 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ em pH 1,0; $0,038 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ em pH 3,0; $0,57 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ em pH 4,7; $2,64 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ em pH 6,0 e $12,93 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ em pH 7,9. Normalmente, sob condições de baixo pH (inferior a 4) a reação direta é predominante, enquanto em pH alcalino, acima de 10, a reação indireta é dominante. Ambas as reações podem ser encontradas quando o pH é próximo a neutralidade (GOTTSCHALK; LIBRA; SAUPE, 2000).

Compostos sequestradores de radicais $\cdot\text{OH}$ (“Scavengers”)

Como mencionado anteriormente, “sequestradores” são substâncias que competem com outras substâncias pela reação com os radicais $\cdot\text{OH}$, limitando, dessa forma, a ação do oxidante. Dentre essas substâncias, a matéria orgânica natural (MON) e espécies carbonatadas (CO_3^{2-} e HCO_3^-) são destacadas.

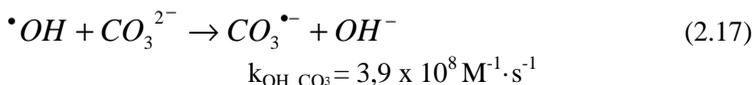
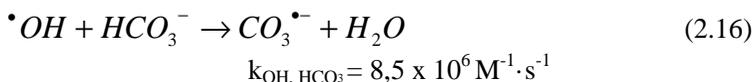
A MON pode afetar a estabilidade do ozônio diretamente, a partir de sua reação direta com a molécula de O_3 (Eq. 2.12 e 2.13) ou indiretamente, através do sequestro dos radicais $\cdot\text{OH}$ (Eq. 2.14 e 2.15) (VON GUNTEN, 2003). Como destacado por Cséfalvay, Nöthe e Mizsey (2007), os radicais $\cdot\text{OH}$ apresentam taxa de reação constante mais elevada com os “sequestradores” do que com o ozônio. Se o “sequestrador” presente reage com os radicais $\cdot\text{OH}$, o consumo de ozônio pode ser determinado pela concentração dos componentes oxidáveis e a taxa de reação do ozônio pode ser calculada a partir da dependência do tempo pela concentração de ozônio.





Em relação às reações do radical $\bullet OH$ com a MON, Von Gunten (2003) destaca a origem de dois efeitos na estabilidade do ozônio. Após a reação, a fração de MON leva a formação de radicais centralizados (Eq. 2.14) que, ao reagirem com o oxigênio resulta na formação de radicais superóxidos (Eq. 2.15), os quais reagem rapidamente com o ozônio para formar radicais $\bullet OH$ novamente.

A presença de carbono inorgânico na forma de carbonatos e bicarbonatos tende a reduzir a eficiência da ozonização. As reações de inibição das reações indiretas com os carbonatos e bicarbonatos são indicados nas equações 2.16 e 2.17. Gottschalk, Libra e Saupe (2000) destacam que, embora as taxas de reação sejam relativamente baixas em comparação às taxas de reação de compostos orgânicos com o radical $\bullet OH$, a reação do carbono inorgânico com o radical $\bullet OH$ não deve ser negligenciada, uma vez que esses compostos estão presentes na água em concentrações relativamente elevadas. Ainda de acordo com os autores, o aumento na concentração de carbono inorgânico tende a reduzir a taxa de reação com compostos orgânicos, mas, por outro lado, reduz igualmente o decaimento do ozônio, de forma que a oxidação direta do substrato orgânico torna-se mais importante.



2.4.3.2 Ozonização aplicada à remoção de cianobactérias e degradação de cianotoxinas

A eficiência do ozônio como um oxidante capaz de promover a degradação de cianotoxinas dissolvidas tem sido relatada em alguns estudos na literatura. Elevadas remoções são observadas para microcistina (ROSITANO; NICHOLSON; PIERONNE, 1998; ROSITANO et al., 2001; SHAWWA; SMITH, 2001; BROOKE et al., 2006; ONSTAD et al., 2007; MIAO; TAO, 2009; AL MOMANI; JARRAH, 2010), anatoxina-a (ROSITANO et al., 2001; AL MOMANI, 2007; ONSTAD et al., 2007), e cilindrospermopsina (ONSTAD et al., 2007). Para saxitoxina e seus análogos, a eficiência da ozonização é reduzida ou mesmo nula (ROSITANO et al., 2001; ORR; JONES; HAMILTON, 2004; BROOKE, 2009).

Como observado, a microcistina é a cianotoxina mais estudada quando se avalia a eficiência de degradação de cianotoxinas por diferentes oxidantes, tendo-se observado em todos os estudos, elevadas remoções deste contaminante. Brooke et al. (2006) observaram decréscimo da concentração de MC-LA e MC-LR para água de dois mananciais distintos com o aumento da dose de ozônio, tendo-se completa remoção da toxina com dosagem de ozônio de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a partir de uma concentração inicial de toxina de aproximadamente $40 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de MC-LR eq. Miao e Tao (2009) obtiveram remoções superiores a 89,3% e 95,7% para MC-RR e MC-LR, respectivamente, a partir de uma concentração inicial para cada variante da toxina igual a $15 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e para uma dosagem de $5 \text{ mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$.

Devido ao seu elevado potencial oxidativo, seja como ozônio molecular (2,07 V) ou como radicais $\cdot\text{OH}$ (2,80 V), o ozônio apresenta uma taxa de degradação de toxinas muitas vezes superior a de outros oxidantes, como o cloro. Em um estudo de degradação de MC-LR, ANTX-a e CYN com ozônio, cloro, dióxido de cloro e permanganato de potássio em água natural e pH 8, realizado por Rodriguez et al. (2007b), diferenças significativas entre as taxas de degradação foram observadas. Valores de $4,1 \times 10^5$, 357, 33,0 e $1,0 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ foram encontrados para MC-LR, para ozônio, permanganato de potássio, cloro e dióxido de cloro, respectivamente. Para as demais toxinas (ANTX-a e CYN), a mesma tendência foi mantida. Al Momani e Jarrah (2010) avaliaram de forma

mais ampla o efeito da temperatura e do pH na taxa de degradação de MC-LR e MC-RR. Esses parâmetros são importantes, visto que, assim como a presença de outros constituintes, podem alterar a taxa de decomposição do ozônio e a eficiência de degradação da toxina. Como observado pelos autores, menores eficiências de remoção para ambas as toxinas foram obtidas em pH alcalino, sendo a taxa de degradação conseqüentemente menor com o aumento do pH. Para MC-LR, por exemplo, uma taxa constante (k) de degradação de $6,79 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ foi obtida a pH 2, superior a taxa encontrada em pH 11, igual a $3,49 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a 20°C . Um decréscimo ainda maior foi observado para MC-RR, cuja taxa de degradação reduziu de $2,45 \times 10^5$ para $4,96 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. O comportamento descrito sugere que a toxina tende a reagir mais fortemente com o ozônio molecular do que com os radicais $\cdot\text{OH}$. Em relação à temperatura, os autores observaram um aumento na degradação das toxinas quando a temperatura aumentou de 20 para 35°C .

Considerando que o ozônio, de forma geral, é um agente oxidante não seletivo, qualquer constituinte orgânico presente no meio poderá ser atacado, o que implica em uma competição entre a toxina a ser degradada e os demais compostos orgânicos (FALCONER, 2005). Por esta razão, a dosagem de ozônio aplicada deve ser suficientemente elevada a ponto de satisfazer a demanda em ozônio para a oxidação do material orgânico na água e resultar em uma remoção confiável de toxinas. A menor eficiência de degradação de microcistina na presença de COD foi avaliada por Brooke et al. (2006) e Miao e Tao (2009). Utilizando duas fontes naturais de água (concentração de COD de $5,3$ e $19,9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), Brooke et al. (2006) observaram ser necessária uma dosagem de ozônio quatro vezes maior para a água com concentração de COD mais elevado para que a remoção completa das toxinas ($40 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de MC-LR eq.) fosse obtida. Miao e Tao (2009), em avaliação com água ultra-pura com diferentes concentrações de COD (1 a $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e dosagem de ozônio de $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, também observaram uma maior concentração residual de MC-RR após 10 min de tempo de contato e residuais de ozônio menores quanto maior a concentração de COD no meio. Como destacado por Brooke et al. (2006), a qualidade da água

não se torna limitante na degradação de toxinas quando a concentração de ozônio residual disponível é adequada.

Estudos de degradação de toxina intracelular e, conseqüentemente, dos efeitos do oxidante na estrutura celular de cianobactérias, principalmente para o ozônio, são ainda bastante restritos. Para este tipo de avaliação, considera-se a pré-oxidação como processo utilizado. Estudos com a aplicação do ozônio para esta finalidade destacam a redução nos valores de clorofila-a e a destruição das células quando da aplicação de determinadas doses de ozônio, como observados nos estudos realizados por Miao e Tao (2009) e Li et al. (2011). Miao e Tao obtiveram máxima redução na concentração de clorofila-a (91%) para *M. aeruginosa* com a aplicação de $5 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ (concentração inicial de clorofila-a não informada pelo autor). Em adição, os autores indicaram que a interação entre o ozônio e as células de cianobactérias resultou em uma visível destruição da parede celular das cianobactérias para dose mais elevada ($5 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$). Li et al. (2011) procuraram avaliar o efeito do pH na redução de clorofila-a também para *M. aeruginosa*, e observaram um aumento na eficiência de remoção de 68,4 para 86,7% quando o pH foi aumentado de 3 para 9, considerando uma concentração inicial de clorofila-a de $1600 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ e dosagem de ozônio de $0,752 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ em fluxo contínuo. O aumento na remoção de clorofila-a com o aumento do pH deve-se ao fato da manutenção constante de um residual de ozônio, devido ao fluxo contínuo de O_3 , mesmo na presença de "sequestradores" dos radicais $\cdot\text{OH}$. O número de células remanescentes não foi indicado em ambos os estudos.

A maior preocupação quando se avalia o emprego da pré-oxidação no tratamento de água com a presença de algas e cianobactérias, é a inerente capacidade de lise celular do oxidante. Como destacado no item 2.4.2, o oxidante tende a atacar a parede celular do organismo e, mesmo que não haja o rompimento da estrutura externa, alterações na permeabilidade da célula e o rompimento da membrana plasmática resultam na liberação de compostos intracelulares. Como outros oxidantes, o ozônio irá atacar primeiramente a parede celular e a membrana plasmática através da oxidação de glicoproteínas e glicolipídios ou de certos aminoácidos como o triptofano e a rápida morte celular após a ozonização pode ser atribuída primeiramente a

mudanças na permeabilidade celular e, em seguida, pela lise da célula (GREENE; FEW; SERAFINI, 1993; MORATÓ et al., 2003).

A liberação de compostos intracelulares (matéria orgânica intracelular - MOI), além de toxinas, a partir da oxidação das células, tende a aumentar a concentração de carbono orgânico dissolvido (COD) na água e, dessa forma, contribuir para a formação de subprodutos da desinfecção, quando da aplicação de cloro ao final do processo, destacando-se a formação de trihalometanos (THM) e ácidos haloacéticos (HAA) (PLUMMER; EDZWALD, 2001; HONG et al., 2008; FANG et al., 2010b). Miao e Tao (2009) observaram um aumento na concentração de COD da suspensão algal de $0,34 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (sem ozonização) para $1,03 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $1,98 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $2,56 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ quando dosagens de O_3 iguais a 1, 3 e $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, foram aplicadas. O mesmo comportamento foi observado por Huang, Cheng e Cheng (2008) para as espécies *Oscillatoria tenuis* e *M. aeruginosa*. Além disso, um consumo de ozônio significativamente maior é observado quando se compara a oxidação de células e toxinas separadamente, como observado por Hoeger, Dietrich e Hitzfeld (2002).

A capacidade de degradação da toxina intracelular após a oxidação da célula deve ser igualmente considerada na avaliação da pré-ozonização de cianobactérias. Dos estudos avaliados, somente Hoeger, Dietrich e Hitzfeld (2002) fazem uma referência quanto à degradação de toxinas, verificando que para maiores densidades de células, maiores doses de ozônio eram requeridas. Uma avaliação mais aprofundada para a pré-ozonização, como observado nos estudos de Daly et al. (2007) e Zamyadi et al. (2010) com a pré-cloração de células de cianobactérias, considerando a liberação e oxidação de toxinas e a viabilidade celular dos organismos, não foi encontrada.

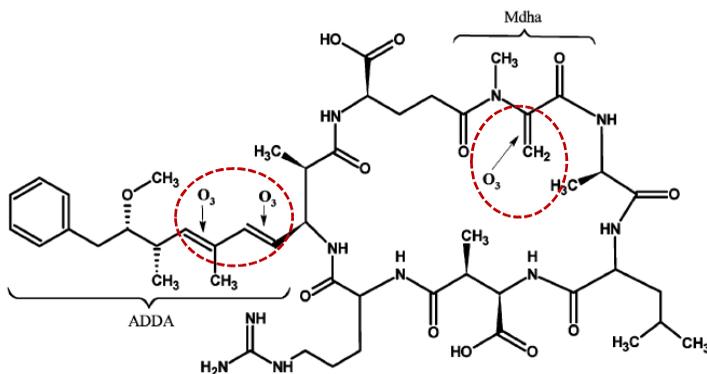
Embora seja consistente a observação de que a pré-ozonização de águas com cianobactérias venha a resultar em prejuízos na qualidade da água, se considerado o aumento da concentração de substâncias orgânicas e, conseqüentemente, a contribuição para a formação de subprodutos da desinfecção ao final do tratamento, também deve-se levar em consideração que este processo tende a evitar que toxinas possam vir a estar presentes na água tratada. Esta consideração é relevante quando se verifica que os processos convencionais de

tratamento, na sua concepção não se mostram eficientes na remoção destes compostos. Além disso, deve-se ponderar que a pré-ozonização é um processo que necessita de processos subsequentes de tratamento, de forma que os produtos orgânicos formados a partir da oxidação sejam removidos nas etapas posteriores e, uma vez que a degradação de toxinas foi obtida no início do sistema, outros processos de tratamento avançados tornam-se desnecessários.

2.4.3.2.1 Ação do ozônio na molécula de microcistina

A toxicidade da microcistina é associada às duplas ligações presentes na fração Adda (3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6-ácido dienóico) da molécula e, portanto, a quebra destas ligações resulta na eliminação de sua toxicidade (LAWTON; ROBERTSON, 1999; ONSTAD et al., 2007). O ozônio reage com as duplas ligações conjugadas presentes na metade Adda e com a dupla ligação no grupo Mdha (ONSTAD et al., 2007; WESTRICK et al., 2010), como indicado na Figura 2.8. Pequenas diferenças nas taxas de degradação entre as diferentes variantes de microcistina podem ser atribuídas aos grupos radicais da molécula.

Figura 2.8. Estrutura da toxina MC-LR e sítios de ataque do ozônio.



Fonte: adaptado de (ONSTAD et al., 2007).

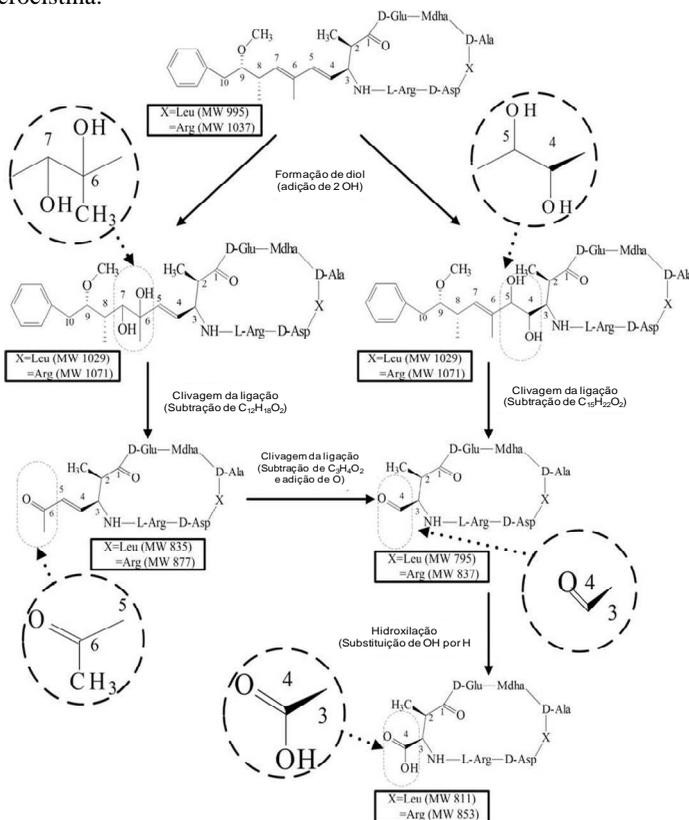
Em termos oxidativos, o radical $\cdot\text{OH}$ apresenta um potencial (2,08 V) superior ao O_3 molecular (2,07 V). No entanto, a menor seletividade e estabilidade dos radicais $\cdot\text{OH}$ acabam por reduzir a sua eficiência de degradação. Tendo-se em consideração a oxidação de microcistinas, Onstad et al. (2007) observaram constantes de velocidade 5 vezes maiores nas reações de degradação de MC-LR com radicais $\cdot\text{OH}$, se comparada às reações da toxina com o ozônio molecular. No entanto, a estabilidade do radical $\cdot\text{OH}$ é desfavorecida em meios com a presença de compostos orgânicos devido à afinidade destes com os radicais $\cdot\text{OH}$. Os autores destacam que a reatividade seletiva do ozônio molecular favorece a sua ação na degradação da microcistina em comparação aos radicais $\cdot\text{OH}$. Uma vez que a presença de radicais $\cdot\text{OH}$ é favorecida em pH alcalino, a degradação do composto alvo pode ser reduzida em água cuja concentração de compostos orgânicos é elevada.

Poucos estudos na literatura têm avaliado a ação do ozônio na degradação de microcistina, assim como outras toxinas, quanto aos aspectos de sua reatividade com a estrutura da molécula e a formação de produtos intermediários. Al Momani e Jarrah (2010) e Miao et al. (2010) propõem mecanismos de oxidação de MC-LR e MC-RR com o ozônio e indicam os intermediários formados a partir das reações de oxidação. De acordo com os autores, dois caminhos são considerados: o ataque eletrofílico às duplas ligações na parte Adda, com uma inicial hidroxilação da molécula (adição de dois OH na posição C4-C5 ou C6-C7) e posterior clivagem da ligação e subtração do fragmento Adda; e a clivagem do anel com a quebra da ligação insaturada do aminoácido Adda e a subtração do fragmento C_3O . Como indicado por Masten e Davies (1994a), a reação do ozônio com os alcenos resulta na formação de aldeídos, ácidos carboxílicos, cetonas e/ou dióxido de carbono. Já o ataque eletrofílico do ozônio molecular tende a ocorrer em átomos que carregam carga negativa, como N, P, O ou carbono nucleofílico. O ataque indireto pelo radical $\cdot\text{OH}$ geralmente ocorre por três caminhos: abstração de hidrogênio, transferência eletrônica ou adição de radical, com a hidroxilação do anel aromático, como foi observado por Miao et al. (2010) como diferencial na degradação de MC-RR.

Miao et al. (2010) e Al Momani e Jarrah (2010) destacam diferenças entre os tipos de subprodutos formados e seus tamanhos, o que foi

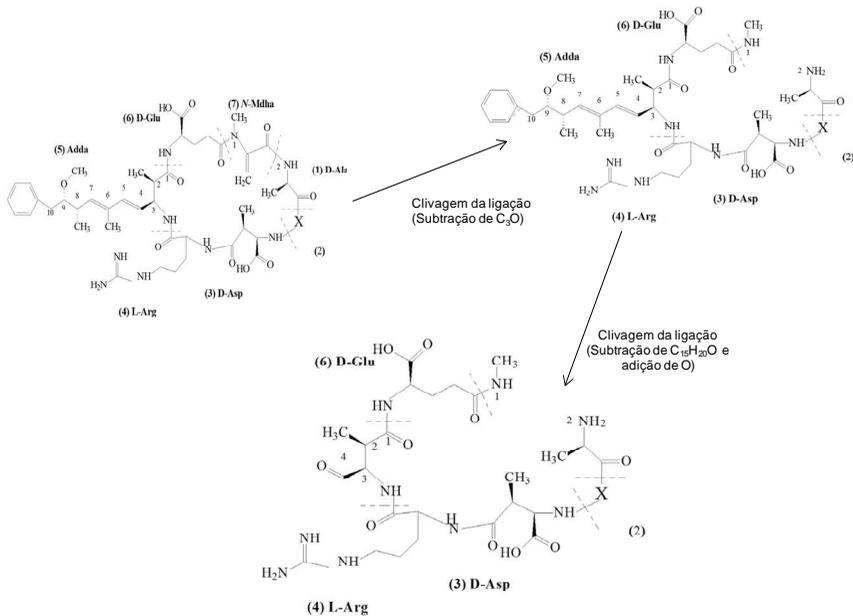
relacionado com a concentração de toxinas e a dose de ozônio empregada nos ensaios. Doses mais elevadas podem favorecer um ataque mais agressivo à estrutura da toxina e resultar na formação de fragmentos de menor tamanho. Os caminhos de reação (Adda ou Mda) e os subprodutos formados a partir da degradação de MC-LR e MC-RR são apresentados na Figura 2.9 e na Figura 2.10, respectivamente, conforme exposto por Miao et al. (2010) em seus estudos.

Figura 2.9. Caminhos de reação e subprodutos originados da degradação de MC-LR (X = Leu) e MC-RR (X = Arg) por ozônio no lado Adda da molécula de microcistina.



Fonte: adaptado de (MIAO et al., 2010).

Figura 2.10. Degradação de MC-LR (X = Leu) e MC-RR (X = Arg) pelo ozônio considerando a fração Mdha da molécula de microcistina.



Fonte: adaptado de (MIAO et al., 2010).

Capítulo 3

Materiais e Métodos

"A curiosidade é mais importante do que o conhecimento."

Albert Einstein

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental deste estudo foi desenvolvida no Departamento de Engenharia Civil, de Geologia e de Minas, da École Polytechnique de Montréal (EPM), Canadá. As atividades laboratoriais foram realizadas nas dependências do Centro de Pesquisa, Desenvolvimento e Validação para Tecnologias e Processos de Tratamento de Água (CREDEAU - Centre de Recherche, développement et validation des technologies et procédés de traitement des eaux) no quadro de atividades do Conselho de Pesquisa em Ciências Naturais e em Engenharia do Canadá em Água Potável (“la Chaire CRSNG - Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canadá, en Eau Potable”), sob a orientação da professora Dr^a. Michèle Prévost.

A avaliação do ozônio como processo oxidativo favorável à remoção de cianobactérias e degradação de cianotoxinas foi considerada relevante em virtude das anuais ocorrências de florações de cianobactérias em alguns mananciais utilizados para o abastecimento de água da região de Québec, Canadá. A Baía Missisquoi, uma grande excursão de água do Lago Champlain e que apresenta anualmente elevadas florações de cianobactérias, foi utilizada como fonte de estudo na aplicação da ozonização em amostras reais.

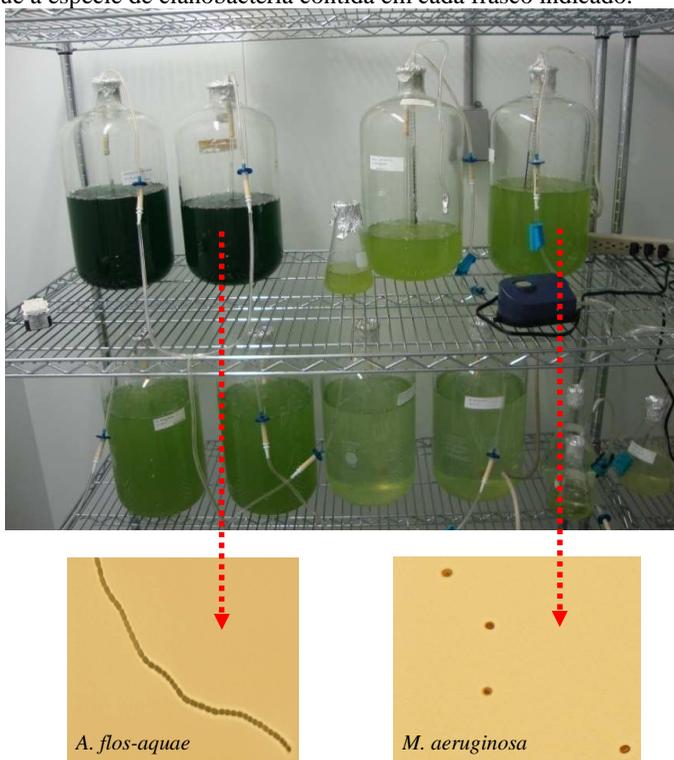
Florações de cianobactérias também são frequentes no Brasil, inclusive na Ilha de Santa Catarina, onde a presença permanente da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* na Lagoa do Peri, manancial destinado ao abastecimento de água da Costa Leste-Sul da ilha, tem incentivado o estudo de diferentes processos de tratamento visando à remoção das células e degradação de suas toxinas, dentre eles, os processos oxidativos.

3.1 CULTIVO DE CIANOBACTÉRIAS

Uma cepa tóxica de *Microcystis aeruginosa* (CPCC 299) e uma cepa não tóxica de *Anabaena flos-aquae* (CPCC 64), obtidas do Centro Canadense de Cultivo Ficológico (Canadian Phycological Culture Centre) foram cultivadas em laboratório. Ambas as cepas foram cultivadas em meios inorgânicos de crescimento, sendo a cepa de *M.*

aeruginosa cultivada em meio ASM-1 (GORHAM et al., 1964) (Anexo A) e a cepa de *A. flos-aquae* em meio de cultivo BG-11 (RIPPKA et al., 1979) (Anexo B). Para o meio BG-11, uma alíquota de 1 mL de solução de vitaminas foi adicionada para favorecer o crescimento da espécie (GUILLARD; RYTHER, 1962). O cultivo foi incubado em câmara com temperatura controlada em 26 ± 1 °C, aeração constante e sob regime de foto-período (12h luz/12h escuro) com uma intensidade luminosa de $70 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ (Figura 3.1). Para evitar contaminações, todo o material utilizado, assim como os meios de cultivo, foi esterilizado por autoclavagem e as operações realizadas em condições de assepsia.

Figura 3.1. Local de cultivo das cepas de *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae*. Em destaque a espécie de cianobactéria contida em cada frasco indicado.



Visando monitorar o crescimento das espécies de cianobactérias cultivadas, amostras dos cultivos foram recolhidas em intervalos de 3 a 4 dias para caracterização. A avaliação foi iniciada considerando uma proporção de inóculo de 10% em relação ao volume total de meio de cultivo. Foram considerados os seguintes parâmetros nesta avaliação: densidade óptica a 730 nm (OD_{730}) (HUANG et al., 2009), pH, número de células, viabilidade celular (BacLight™), carbono orgânico dissolvido (COD) (extracelular e total) e carbono orgânico total (COT), além da concentração de toxinas, avaliada somente para a espécie *M. aeruginosa*, uma vez que a espécie *A. flos-aquae* se mostrou não produtora de toxinas. Os cultivos para esta avaliação foram mantidos nas mesmas condições experimentais descritas anteriormente.

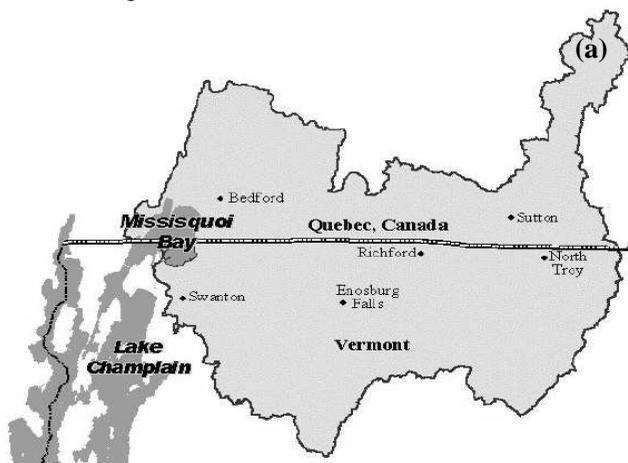
Para os ensaios de ozonização, os microrganismos em fase exponencial ou estacionária (aproximadamente 20 dias de crescimento) foram separados por filtração em membrana de nitrocelulose com porosidade de 1,2 μm (*M. aeruginosa*) e 10 μm (*A. flos-aquae*). Em seguida, as células foram ressuspensas em tampão borato a pH 7 e quantificadas por microscopia óptica, utilizando uma câmara de contagem Sedgewick-Rafter. A partir desta contagem, volume equivalente ao número de células desejado era adicionado à água de estudo.

3.2 MANANCIAL PARA COLETA DE ÁGUA SUPERFICIAL

Visando avaliar a aplicação do ozônio na remoção de cianobactérias e degradação de cianotoxinas em ambiente natural, foram realizadas coletas de água da Baía Missisquoi entre os meses de julho e setembro de 2011, período em que foi observada a ocorrência de elevada floração de cianobactérias neste manancial.

A Baía Missisquoi é caracterizada como uma lagoa rasa (em média 2,3 metros de profundidade e 77,5 km^2 de extensão superficial) localizada no extremo norte do Lago Champlain, e dividida por uma fronteira internacional que separa o Estado de Vermont (Estados Unidos) e a Província do Quebec (Canadá) (BECK et al., 2012) (Figura 3.2).

Figura 3.2. Mapa da localização da Baía Missisquoi na porção norte do Lago Champlain (a) e fotografia do local (b).



Fonte: imagem da internet (<http://www.google.com.br/imgres>) e arquivo pessoal.

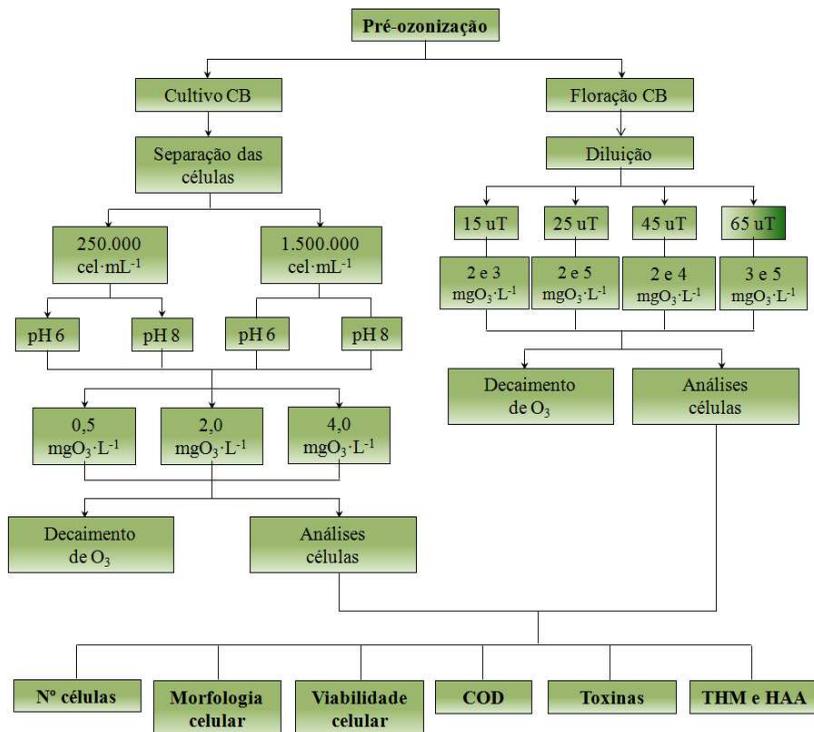
A presença de cianobactérias neste ambiente é anualmente verificada nos meses de verão, com um aumento expressivo na densidade destes

organismos com o decorrer dos anos. Beck et al. (2012) relacionam o visível aumento na eutrofização da Baía Missisquoi desde 1980 a um aumento proporcional da concentração de fósforo total neste ambiente, tendo-se observado um incremento de aproximadamente 79% no teor de fósforo entre os anos de 1979 e 2009 (concentração média de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), com origem principal a partir de fontes não pontuais ligadas a atividades agrícolas. Desde o ano de 2001, a ocorrência das florações de cianobactérias na Baía Missisquoi tem comprometido o uso da água para abastecimento e recreação, devido à presença de toxinas dissolvidas, resultando em um elevado impacto na economia da região. Caracterizações realizadas por Fortin et al. (2010) entre 2008 e 2011, indicam a dominância de espécies produtoras de microcistina sobre a comunidade fitoplanctônica do corpo d'água tanto nos meses de verão quanto de outono, tendo-se identificado a predominância de espécies dos gêneros *Microcystis* e *Anabaena*. Por esta razão, adotou-se o cultivo laboratorial de espécies destes gêneros para o desenvolvimento do estudo.

3.3 EXPERIMENTOS DE PRÉ-OZONIZAÇÃO

O desempenho do ozônio foi avaliado para ambas as cianobactérias, *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae*, considerando-se estudos cinéticos de consumo de ozônio e avaliação do efeito do oxidante sobre as células. Nesta avaliação, foram consideradas três diferentes doses do oxidante, (0,5, 2,0 e 4,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), duas densidades de células, $2,5 \times 10^5$ e $1,5 \times 10^6$ $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$, e valores de pH inicial de 6 e 8. Os valores de pH indicados foram escolhidos em virtude de serem valores normalmente encontrados em mananciais e lagos utilizados como fonte de abastecimento na região de Montréal e da cidade de Québec. Este planejamento experimental resultou em um total de 24 ensaios de ozonização, além de 6 outros ensaios nas mesmas condições de pH e doses de O_3 na ausência de células, utilizados como controle. Ensaios similares foram realizados para avaliação da pré-ozonização com a água natural (Baía Missisquoi). As condições operacionais avaliadas são sintetizadas na Figura 3.3.

Figura 3.3. Fluxograma representativo dos experimentos de pré-ozonização com cultivo de células de cianobactérias e floração natural.

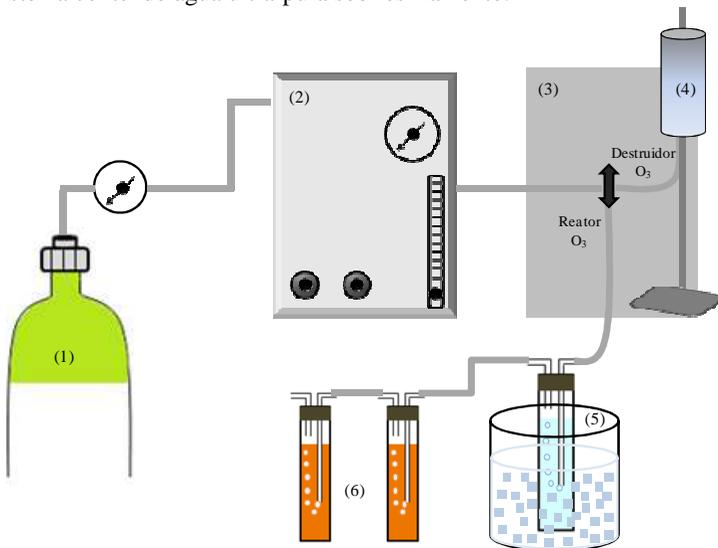


Nos experimentos para determinação do decaimento do ozônio e seu impacto na viabilidade celular, soluções estoque de O₃ (60 - 70 mg·L⁻¹) foram preparadas a partir da difusão de ozônio gasoso em água ultra-pura. O ozônio foi produzido através de um gerador de bancada (TG-10, Ozone Solutions, Inc.) com capacidade de produção de 10 g de O₃ por hora a 2 LPM (litros por minuto) utilizando oxigênio puro a uma pressão de 0 a 100 psi. O frasco contendo água ultra-pura foi mantido sob resfriamento constante à 4 °C, de forma a maximizar a dissolução do gás na água. O sistema de produção de ozônio é representado na

Figura 3.4. De forma a evitar que o excesso de ozônio produzido no sistema fosse liberado para a atmosfera, promoveu-se a quebra das moléculas de O_3 através de sua passagem por uma solução de iodeto de potássio (KI) a 2%, com a formação de uma molécula de O_2 (Eq. 3.1). No momento do uso da solução estoque de ozônio, o gás produzido pelo gerador era direcionado para um sistema de destruição.



Figura 3.4. Sistema de ozonização com borbulhamento do ozônio produzido em um sistema contendo água ultra-pura sob resfriamento.

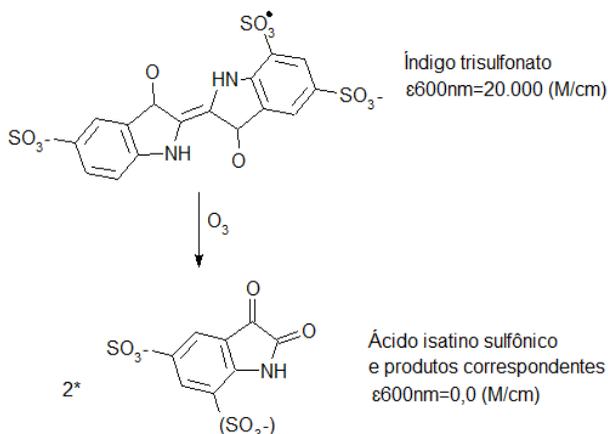


- (1) Cilindro de O_2 (3) Painel de controle (5) Saturação de água com O_3
 (2) Ozonizador (4) Destruidor de O_3 (6) Armadilhas com solução de KI

A concentração da solução estoque de ozônio, assim como a concentração de ozônio residual nas amostras foram determinadas de acordo com o método colorimétrico 4500- O_3 (APHA, 2005) utilizando o reagente índigo trissulfonato ($\epsilon_{600nm}=20.000 M^{-1}\cdot cm^{-1}$). A molécula de índigo contém apenas uma dupla ligação $C=C$, o que possibilita uma

reação direta com o ozônio em elevada taxa de reação (Figura 3.5) (GOTTSCHALK; LIBRA; SAUPE, 2000). As amostras foram analisadas a 600 nm em espectrofotômetro (Cary 100, Varian) em uma célula de quartzo de 1 cm (para quantificação de ozônio na solução estoque) ou 2 cm (para determinação do residual de ozônio nas amostras). A concentração de ozônio medida é diretamente proporcional a coloração azul da solução de índigo.

Figura 3.5. Oxidação do índigo trissulfonato pelo ozônio.



Fonte: (GOTTSCHALK; LIBRA; SAUPE, 2000).

Os valores de pH inicial foram ajustados utilizando-se tampão borato (força iônica: 0,05 M), produzido a partir de uma solução de ácido bórico $31 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (H_3BO_3) e hidróxido de sódio $16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (NaOH). As curvas de decaimento de ozônio foram monitoradas em um reator de bancada, em regime de batelada para cada uma das condições mencionadas anteriormente (dose de oxidante, densidade celular e pH). As doses de ozônio aplicadas foram administradas pela injeção de uma alíquota da solução estoque de ozônio, via seringa, diretamente na amostra, mantida sob agitação constante. Um bécker de vidro com capacidade de 2 L foi utilizado como reator nos ensaios, tendo-se

acoplado uma tampa em Teflon para evitar a desgaseificação do ozônio da amostra (Figura 3.6).

Figura 3.6. Reator de vidro utilizado para os ensaios de ozonização. ((a) reator sobre agitador magnético; (b) distribuidor para coleta de amostra).

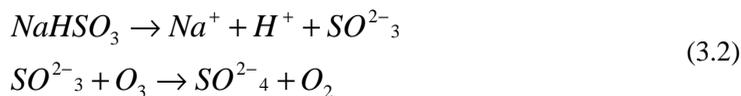


Fonte: adaptado de arquivo pessoal

Os valores residuais de ozônio foram medidos ao longo de um período de 10 min de reação a partir da adição de 5 mL da amostra (dispenser) a 20 mL de solução índigo trissulfonato em diferentes concentrações (0,02, 1 ou 3%). O uso da solução de índigo nas diferentes concentrações era condicionado ao residual de ozônio na amostra. Quanto maior a concentração de ozônio, maior a descoloração da solução de índigo. Assim, a concentração de índigo era reduzida com o decorrer do tempo de reação, em função do menor residual de ozônio. Para quantificar a formação de radicais $\cdot\text{OH}$, um reator paralelo foi

enriquecido com uma solução de ácido para-clorobenzóico (pCBA) a $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($1,28 \mu\text{M}$). Uma sub-amostra de 1,5 mL, retirada do mesmo frasco para determinação do residual de ozônio, foi filtrada em filtro $0,45 \mu\text{m}$ (Millex-HV), sendo os primeiros 0,5 mL descartados e o volume remanescente analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (características da coluna: Nucleosil 100-5, RP-C18, 150 mm de comprimento, $4,6 \mu\text{m}$, Macherey-Nagel). A fase móvel consistiu em 60% água (acidificada a pH 2 com H_2SO_4) e 40% metanol (grau HPLC). A detecção do pCBA, com limite de detecção (LD) igual a $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, foi realizada utilizando um detector de arranjo de diodos a 236 nm (Elite LaChrom, Hitachi). As condições cromatográficas foram estabelecidas a partir de estudo realizado por Vincent, Kotbi e Barbeau (2010).

O efeito do oxidante sobre as células de cianobactérias foi determinado a partir de medidas de COD extracelular, viabilidade celular, contagem de células e concentração de toxinas (*M. aeruginosa*) em tempos de contato pré-determinados de 0,5, 1,5, 3,0, 5,0 e 10,0 min. A reação do ozônio com a amostra foi imediatamente interrompida nos tempos de contato indicados com a adição de uma solução de bissulfito de sódio $1.000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (NaHSO_3 - $2,2 \text{ mg}/\text{mgO}_3$) (Eq. 3.2). Os procedimentos experimentais para a determinação dos parâmetros analíticos indicados são descritos nas seções a seguir.



3.4 ANÁLISES

3.4.1 Contagem, integridade celular e morfologia

A determinação do número de células de cianobactérias foi conduzida a partir de contagem em microscópio óptico em câmara de contagem de Sedgewick-Rafter após a preservação da amostra com lugol (APHA, 2005). A contagem de células foi realizada previamente

aos ensaios de ozonização, visando determinar o volume necessário da suspensão de células (obtida a partir de filtração da cultura em fase estacionária) a ser adicionado à água para atender a densidade celular desejada, e para determinar o número de células remanescentes após o processo oxidativo. O número de células por mL de amostra é expresso a partir da Equação 3.3, considerando-se o fator de diluição agregado. Para a espécie filamentososa *A. flos-aquae*, adotou-se inicialmente a determinação do número médio de células por filamento (mínimo de 30 filamentos). Devido ao longo comprimento da cianobactéria filamentososa, procedeu-se a contagem das mesmas por unidade de área na câmara de contagem ($100 \mu\text{m}^2$) (Figura 3.7). O número total de cel/mL é estimado a partir do número de filamentos contados na área considerada e multiplicado pelo número médio de células por filamento (Eq. 3.4). Todas as amostras foram preservadas em lugol após a coleta. Quando dos ensaios com água natural, a identificação e quantificação das espécies de cianobactérias presentes nas amostras foram realizadas em laboratório do Ministério do Meio Ambiente de Quebec.

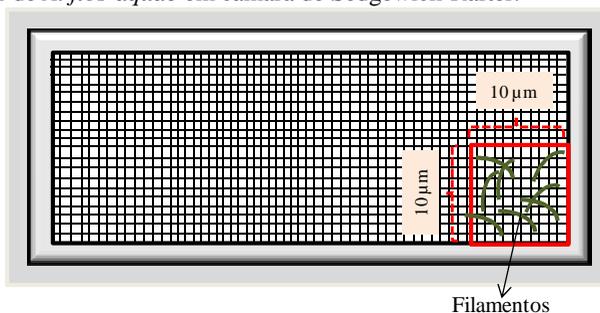
$$N = \frac{N_0 \cdot 1000}{C} \quad (3.3)$$

onde N é o número de células por mL; N_0 é o número de células contado; e C é o número de campos contados.

$$N = \frac{N_0 \cdot 1000 \text{mm}^3}{A \cdot D \cdot C} x F \quad (3.4)$$

onde N é o número de células por mL; N_0 é o número de filamentos contado; A é a área de cada campo (mm^2); D é a profundidade de cada campo (mm); C é o número de campos contados; e F é o número médio de células por filamento.

Figura 3.7. Representação esquemática da área representativa para contagem de filamentos de *A. flos-aquae* em câmara de Sedgewick-Rafter.



A avaliação da integridade celular antes e após a exposição das cianobactérias ao processo oxidativo foi realizada empregando-se o kit colorimétrico BacLight™ (Molecular Probes, Inc.) (BOULOS et al., 1999; STOCKS, 2004; BERNEY et al., 2007). O teste BacLight™ consiste em dois corantes, o corante verde fluorescente SYTO® 9 e o corante vermelho fluorescente iodeto de propídio (PI), que têm como princípio integrar-se a dupla fita de DNA da cianobactéria. A diferença entre os dois corantes é a habilidade de penetração de cada um na célula. Enquanto o SYTO® 9, quando utilizado isoladamente, integra-se ao genoma de células viáveis e inviáveis, o PI penetra somente em células cuja membrana se encontre danificada, o que é atribuído ao maior peso molecular deste corante. Devido à maior afinidade do PI aos ácidos nucleicos, quando ambos os corantes estão presentes dentro da célula, o SYTO® 9 é substituído pelo PI, tendo-se assim, a predominância da coloração vermelha na célula (STOCKS, 2004). Dessa forma, células vivas, com a membrana intacta irão apresentar fluorescência verde, enquanto células com a membrana danificada irão apresentar fluorescência vermelha. A visualização das células foi realizada em microscópio de fluorescência Olympus BX51, com lâmpada de halogênio e filtro FITC/Texas Red (U-N51006), com detecção dos corantes entre 450 e 490 nm. O procedimento experimental utilizado para a determinação da viabilidade celular das cianobactérias é descrito no Anexo C.

A estrutura morfológica das cianobactérias antes e após a exposição ao oxidante foi observada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). As observações foram realizadas com o auxílio de um microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (FEG-SEM. Jeol JSM-7600TFE).

3.4.2 Quantificação de carbono orgânico dissolvido

As amostras para determinação quantitativa de carbono orgânico dissolvido (COD) procedente das células foram filtradas em membrana hidrofílica de polietersulfona com tamanho médio de poro de $0,45\mu\text{m}$ (Supor[®] - 450, PALL, USA), previamente lavada com um litro de água ultra-pura para remoção de impurezas. A quantificação do COD foi conduzida com o auxílio do analisador de carbono orgânico total de laboratório Sievers 5310C.

Frações intra e extracelular de COD foram consideradas. As amostras de COD extracelular foram obtidas por filtração imediatamente após a exposição das células ao ozônio. Para as medidas de COD intracelular, a amostra foi submetida a três ciclos de gelo/degelo para alcançar o completo rompimento das células e a liberação das substâncias intracelulares, e então filtradas, tendo-se, dessa forma, os valores em termos de COD total (frações intra e extracelular). Todas as amostras para análise de COD foram coletadas em vidraria livre de carbono, obtido após a permanência das mesmas em forno mufla a $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 horas. As análises foram realizadas imediatamente após a filtração ou preservadas sob refrigeração por no máximo uma semana antes da análise.

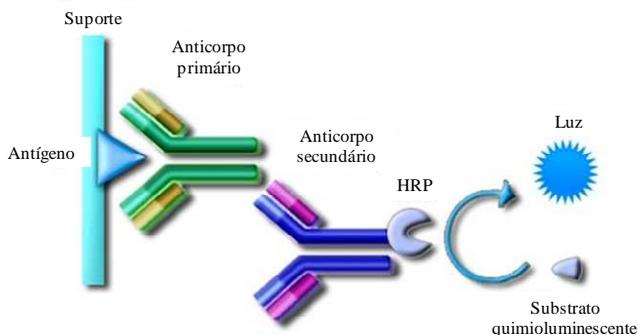
3.4.3 Quantificação de cianotoxinas

A quantificação de microcistina antes e após a oxidação de *M. aeruginosa* por ozonização foi realizada em termos de concentração dissolvida (extracelular) e total (extracelular e intracelular). O procedimento foi o mesmo adotado para a quantificação de COD.

As análises quantitativas foram realizadas utilizando-se kit ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (ABRAXIS 520011) para totas

as condições avaliadas. Devido ao baixo requerimento de equipamentos e rápida e efetiva detecção de microcistinas em amostras de água, o kit ELISA é normalmente empregado em análises quantitativas, embora forneça apenas valores em termos de toxina total (μg de MC-LR eq.), não diferenciando entre as variantes de microcistina presentes na amostra. Como descrito pelo fabricante, o teste se baseia em uma competição indireta em que a microcistina presente na amostra compete pelos sítios de ligação dos anticorpos anti-Microcistina. Com a lavagem da placa, um segundo anticorpo marcador (anticorpo-HRP) é adicionado e a introdução de uma solução de substrato após uma segunda lavagem resulta na formação da coloração azul, cuja intensidade é inversamente proporcional à concentração de microcistina na amostra. A determinação quantitativa é obtida após leitura da placa em fluorímetro a 450 nm. A Figura 3.8 representa esquematicamente o princípio de detecção em que o método é baseado. As análises quantitativas com kit ELISA foram realizadas com a inserção direta da amostra nas placas, em duplicata, sem a filtração da amostra quando da quantificação de toxina total.

Figura 3.8. Representação esquemática do princípio de detecção do método de ELISA com anticorpo conjugado HRP (horseradish peroxidase) - avaliação indireta.



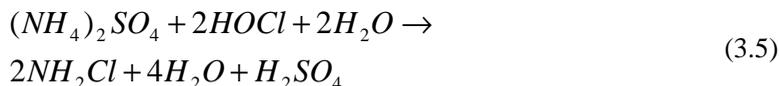
Fonte: imagens da internet (http://www.cyanagen.it/index.php?option=com_content&view=article&id=2&Itemid=144 - adaptado)

De forma a identificar as variantes de microcistina produzidas pela cepa de *M. aeruginosa* cultivada em laboratório e possíveis variantes encontradas na água natural eutrofizada, foram realizadas análises por cromatografia líquida seguida de espectrometria de massas a partir de extração em fase sólida em modo on-line (on-line SPE e LC MS/MS). O método utilizado permite a determinação de concentrações de toxina em $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ em amostras de 1 mL sem pré-concentração. O tempo de corrida foi de 6,8 min/amostra. Colunas LC Hypersil Gold C18 (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) foram empregadas na extração on-line (12 μm , 20 x 2,1 mm) e análises de separação (1,9 μm , 50 x 2,1 mm). Foram utilizadas como fase móvel água com 0,1% de ácido fórmico (Fase A), e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (Fase B) com gradiente escalonado. As seguintes variantes de microcistina foram consideradas passíveis de identificação: MC-LR (LD 1,0 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$), MC-YR (LD 17,0 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$), MC-LY (LD 1,0 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$), MC-LF (LD 1,0 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$), MC-RR (LD 0,01 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$), MC-LW (LD 9,0 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$) e dmMC-LR (3-desmetil MC-LR) (LD 3,0 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$). Anteriormente a inserção no aparelho, as amostras foram preparadas adicionando-se 125 μL de metanol 100% e 25 μL de padrão interno (nodularina) a 5 mL de amostra, sendo a mesma fracionada em três vials para análises em replicata.

3.4.4 Formação de subprodutos

O potencial de formação de subprodutos da desinfecção a partir das cianobactérias, considerando-se o efeito da pré-ozonização no aumento da formação destes compostos, foi avaliada neste estudo. Foram consideradas as três doses de ozônio determinadas inicialmente, ambos os valores de pH e densidade de células igual a $2,5 \times 10^5 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ para cada espécie separadamente. Às amostras bruta e ozonizadas (após 10 min de tempo de contato) foi adicionado cloro livre suficiente para alcançar uma concentração de cloro residual de $1 \pm 0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ após 24 horas de tempo de contato a 22 °C. Ao final da incubação, amostras para análises de trihalometanos (THM) e ácidos haloacéticos (HAA) foram recolhidas em frascos contendo sulfato de amônio, de forma a interromper a ação do cloro com os constituintes da amostra, tendo-se a

formação de cloreto de cloraminas (Eq. 3.5). O cloro livre residual foi determinado através do método colorimétrico DPD (dietil parafenileno diamino) 4500C1-G (APHA, 2005). O procedimento para determinação da concentração de cloro residual livre é descrito no Anexo D.



Para os compostos de THM procedeu-se a extração líquido/líquido com hexano, como descrito no Standard Methods 6232B (APHA, 1998). Os compostos de HAA, por sua vez, foram obtidos através de extração líquido/líquido com éter metil terc-butílico (MTBE) seguido por derivatização com metanol ácido, de acordo com o Método USEPA 552.2 (USEPA, 1995). Os procedimentos de extração de THM e HAA são descritos no Anexo E. Todos os subprodutos foram analisados por cromatografia gasosa (CP-3800, Varian) com detecção por captura de elétrons (GC/ECD). Utilizou-se uma coluna capilar empacotada RTX-5MS, com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura de filme.

3.5 AVALIAÇÕES CINÉTICAS

3.5.1 Cálculos fator CT: exposição ao ozônio molecular e radicais livres

Para cada tempo de contato específico, a exposição ao ozônio molecular (valor de CT, concentração do oxidante x tempo de contato, expresso como mg.min/L) foi calculada como a área sob a curva de decaimento através de integração numérica usando o método trapezoidal. Para validar os valores de CT numérico estimados esses foram comparados a valores de CT modelado, obtidos assumindo-se uma cinética de decaimento de pseudo-primeira ordem (k') (Eq. 3.6).

$$CT_{O_3} = \frac{C_0}{k'} [1 - \exp(-k' \cdot t)] \quad (3.6)$$

onde C_0 = ozônio residual inicial ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) determinado a partir do ajuste exponencial da relação entre o ozônio residual e o tempo (min); e k' = constante de decaimento de pseudo-primeira ordem (min^{-1}).

A exposição aos radicais $\cdot\text{OH}$ ($CT_{\cdot\text{OH}}$) foi determinada utilizando a taxa de reação constante para o radical $\cdot\text{OH}$ ($k_{\text{OH},\text{pCBA}} = 5,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e cinética de segunda ordem, tal como expresso na Equação 3.7.

$$\frac{d(\text{pCBA})}{dt} = -k_{\text{OH},\text{pCBA}} \cdot [\text{pCBA}] \cdot [\cdot\text{OH}] \quad (3.7)$$

onde $k_{\text{OH},\text{pCBA}}$ é a taxa constante para o pCBA (min^{-1}); $[\text{pCBA}]$ é a concentração de pCBA ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$); e $[\cdot\text{OH}]$ é a concentração de radicais livres.

A partir desta consideração, a exposição ao $\cdot\text{OH}$ é definida como expresso na Equação 3.8:

$$CT_{\text{OH}} = \int \cdot\text{OH} \times dt = \frac{\text{Ln} \left(\frac{[\text{pCBA}]_o}{[\text{pCBA}]} \right)}{k_{\text{pCBA}}} \quad (3.8)$$

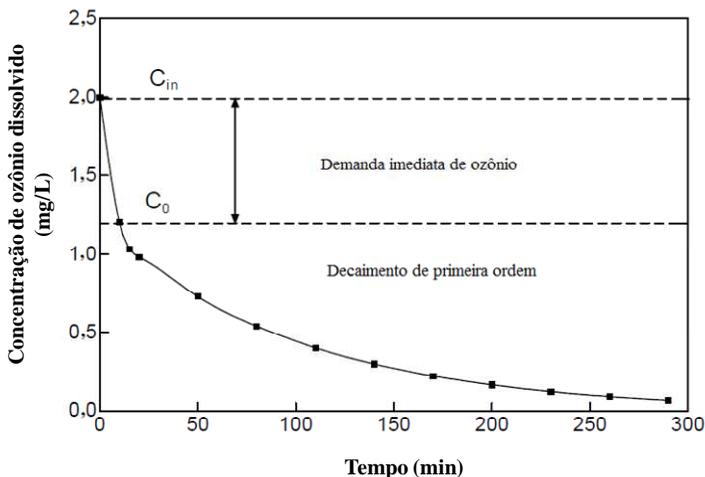
3.5.2 Modelagem cinética

O decaimento do ozônio foi modelado como um processo em duas etapas: uma demanda imediata e uma cinética de ordem *n-ésima*.

A demanda imediata de ozônio é caracterizada como a quantidade de ozônio consumida rapidamente, no primeiro estágio do processo de oxidação (medida após poucos segundos) (PARK et al., 2001). Como exposto por Zhang (2006) a partir de estudos prévios na literatura, quando o ozônio é aplicado em águas contendo matéria orgânica, um

consumo inicial rápido é verificado, seguido por um período mais lento de decaimento, o qual é caracterizado como um modelo cinético de pseudo-primeira ordem (Eq. 3.10) (BABLON et al., 1991b). O conhecimento da demanda imediata do oxidante contribui para estabelecer uma concentração residual de ozônio adequada no sistema ao final do tratamento. Na Figura 3.9 tem-se representada uma curva típica de decomposição do ozônio.

Figura 3.9. Curva típica representativa de decomposição do ozônio em água.



Fonte: adaptado de (ZHANG, 2006).

Numericamente, a demanda imediata de ozônio é descrita como a diferença entre a dose de oxidante aplicada e a concentração inicial obtida a partir de regressão linear ou a primeira concentração residual medida. A relação é expressa por:

$$D_{\text{imediata}} = C_{\text{in}} - C_0 \quad (3.9)$$

onde, C_{in} é a dose de ozônio aplicada ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e C_0 é a concentração residual inicial medida (tempo 17 s) ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (ZHANG, 2006).

Uma etapa além do modelo geral de regressão foi desenvolvida para prever a demanda de ozônio como uma função da dose de oxidante, do pH, do tipo de organismo e da concentração de COD. O decaimento de ozônio após a demanda imediata foi modelado considerando-se duas estratégias alternativas. Inicialmente, cinéticas de pseudo-primeira ordem foram ajustadas sucessivamente para cada curva de decaimento, considerando-se como valor de C_0 a concentração observada após a demanda imediata obtida por regressão linear (Eq. 3.10).

$$\frac{C}{C_0} = \exp(-k \times t) \quad (3.10)$$

onde C e C_0 são as concentrações final e inicial do composto alvo ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); k é a taxa constante de reação de pseudo-primeira ordem (min^{-1}); e t é o tempo (min).

Como uma abordagem alternativa, uma lei de taxa cinética empírica (Eq. 3.12) foi desenvolvida a partir da cinética de decaimento do ozônio em água ultra-pura (Eq. 3.11) considerando a presença do COD.

$$\frac{dO_3}{dt} = k \times (O_3)^2 \times (OH^-)^m \quad (3.11)$$

$$\frac{dO_3}{dt} = -k \times (O_3)^n \times (OH^-)^m \times (COD_T)^p \quad (3.12)$$

onde O_3 é o ozônio residual; t é o tempo; OH^- é a concentração de hidróxidos; COD_T é a concentração de carbono orgânico total medida após ozonização das células de cianobactérias; e n , m , p e k são parâmetros de ajuste obtidos por regressão não-linear.

Assumindo que o pH e o COD_T são constantes durante a ozonização, a Equação 3.12 pode ser integrada sob o formato da Equação 3.13. Assumir que o COD_T é constante foi uma simplificação adotada, uma vez que não foi possível a obtenção de dados suficientes para representar a reatividade do COD de acordo com o tempo de exposição. Além disso, considera-se que o COD representa uma série de compostos orgânicos, ao invés de um único soluto.

$$O_3 = \left[\frac{1}{(O_3)_0^{n-1}} + k \times t \times (OH^-)^m \times (COD_T)^p \right]^{1-n} \quad (3.13)$$

A Equação 3.11 foi ajustada separadamente para os ensaios de ozonização conduzidos para cada um dos organismos, assim como para o conjunto de dados obtidos (combinando dados para ambos os organismos).

Capítulo 4

Resultados e Discussão

"Ninguém é tão sábio que nada tenha para aprender, nem tão tolo que nada tenha pra ensinar."

Blaise Pascal

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A apresentação dos resultados obtidos será realizada em três blocos distintos: avaliação das características dos cultivos laboratoriais de *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae* (Seção 4.1); ensaios de ozonização com cultivos de *Microcystis aeruginosa* e *Anabaena flos-aquae* (Seção 4.2); e ensaios de ozonização com floração natural de cianobactérias (Seção 4.3).

4.1 CRESCIMENTO E MORFOLOGIA DOS CULTIVOS DE *M. aeruginosa* E *A. flos-aquae*

O crescimento das espécies *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae* foi determinado basicamente pelo monitoramento da densidade óptica do cultivo (DO_{730}), sendo a taxa específica de crescimento definida como um aumento da DO_{730} durante o tempo de crescimento avaliado. Considerando a proporção de inóculo empregada no início do cultivo (10%), um valor de DO_{730} inicial de $0,006 \text{ cm}^{-1}$ ($61.808 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$) para *M. aeruginosa* e $0,014 \text{ cm}^{-1}$ ($238.600 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$) para *A. flos-aquae* foi verificado.

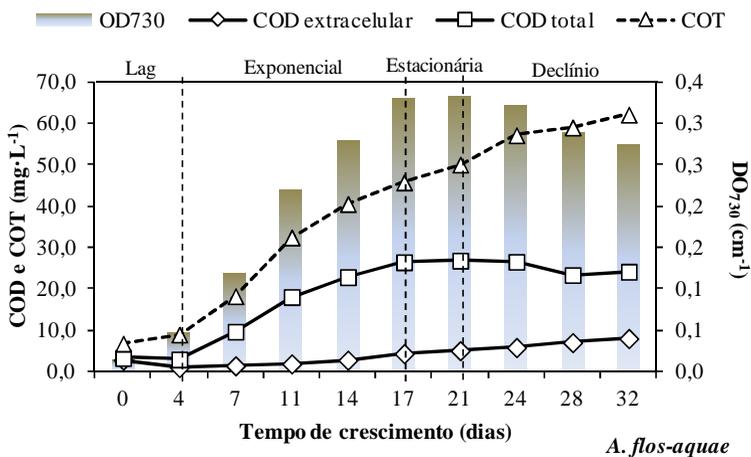
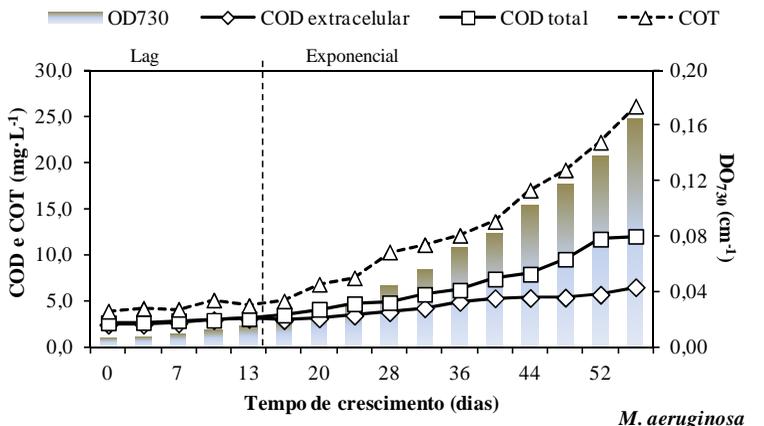
Ao contrário do observado por Huang et al. (2009) em estudos com as mesmas espécies de cianobactérias (tempo de cultivo entre 38 e 45 dias), para o cultivo de *M. aeruginosa*, neste estudo, não foi possível estabelecer uma distinção entre as quatro fases de crescimento (lag, exponencial, estacionária e de declínio) no período de avaliação (56 dias). Para *A. flos-aquae*, as distintas fases de crescimento foram identificadas no período de avaliação (32 dias) (Figura 4.1). Para *M. aeruginosa*, considerou-se um tempo de latência (fase lag) de aproximadamente 16 dias enquanto para *A. flos-aquae*, um período mais curto, de 4 dias, foi observado. Para *A. flos-aquae*, a fase exponencial durou aproximadamente 13 dias e uma rápida fase estacionária com declínio da densidade foi observada. Em termos de DO_{730} , valores próximos foram observados por Huang et al. (2009), embora períodos mais longos para todas as fases de crescimento desta espécie tenham sido relatados. Baseando-se na medida de DO_{730} , a taxa de crescimento

específico na fase exponencial foi em média $0,06 \text{ d}^{-1}$ ($0,035$ a $0,088 \text{ d}^{-1}$) e $0,15 \text{ d}^{-1}$ ($0,06$ a $0,30 \text{ d}^{-1}$) para *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae*, respectivamente, valores estes obtidos a partir da Equação 4.1 (SANGOLKAR et al., 2009). Os resultados indicam que a cepa de *Microcystis* apresentou um crescimento mais lento se comparado a cepa de *Anabaena*, nas condições de cultivo utilizadas. Taxas de crescimento específico de $0,02$ a $0,34 \text{ d}^{-1}$, $0,05$ a $1,11 \text{ d}^{-1}$ e $0,1$ a $1,8 \text{ d}^{-1}$ são reportados em estudos avaliando o crescimento de diferentes cepas de *Microcystis* (LONG; JONES; ORR, 2001; WILSON; WILSON; HAY, 2006; SANGOLKAR et al., 2009).

Além da densidade celular inicial, a expressiva diferença entre as taxas de crescimento para as duas espécies estudadas pode ser relacionada à concentração de nutrientes (nitrogênio e fósforo) no meio de cultivo. Em sua composição, o meio de cultivo BG-11 (*A. flos-aquae*) apresenta concentração igual a $1.500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de nitrogênio (em termos de NaNO_3) e $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de fósforo (em termos de K_2HPO_4), o que é aproximadamente 8,5 e 2,3 vezes maior que a concentração encontrada no meio de cultivo ASM-1 (*M. aeruginosa*), respectivamente. A maior concentração destes nutrientes teria favorecido o rápido crescimento exponencial de *A. flos-aquae* e com isso, o declínio também rápido dos nutrientes disponíveis. Para *M. aeruginosa*, a menor densidade inicial de células pode ter favorecido a estabilidade da relação A/M (alimento/microrganismo) por um período mais longo, refletindo em um crescimento constante. Em termos de tempo de duplicação, calculado como $\ln(2)/\mu$ (WILSON; WILSON; HAY, 2006), valores iguais a $11,5 \text{ d}^{-1}$ e $4,6 \text{ d}^{-1}$ foram obtidos na fase exponencial de crescimento para *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae*, respectivamente. A partir destes resultados, pode-se sugerir que ambientes que apresentem concentrações de nitrogênio e fósforo semelhantes ao meio ASM-1 favoreceriam a permanência de florações de *M. aeruginosa* por um período maior de tempo se comparado a *A. flos-aquae*.

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad (4.1)$$

Figura 4.1. Curvas de crescimento de *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae* em laboratório, considerando densidade óptica, concentração de carbono orgânico dissolvido e total.



A relação entre DO₇₃₀ e a quantificação do carbono orgânico presente no meio em termos de carbono orgânico dissolvido e total

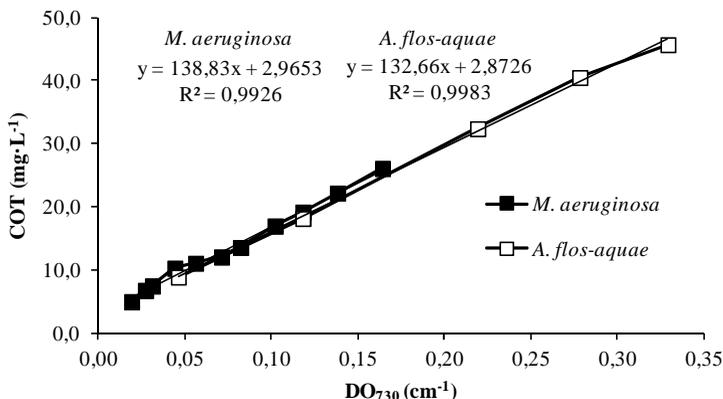
durante o crescimento de *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae* é também representada na Figura 4.1. Como observado, a concentração de COD liberado por ambas as cianobactérias aumentou progressivamente com a idade do cultivo. Valores máximos de COD extracelular de 6,49 e 7,94 mg·L⁻¹ foram obtidos para *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae*, respectivamente, ao final do período de crescimento avaliado, com produções proporcionais de conteúdo de COD por célula semelhantes para as duas espécies.

Em média, aproximadamente 77% do carbono dissolvido produzido pelas células de *M. aeruginosa* foi liberado para o meio, sendo essa porcentagem reduzida com o tempo de crescimento. Para *A. flos-aquae*, apenas 21% do COD produzido pelas células foi contabilizado como COD extracelular, indicando que a maior parte do carbono produzido é mantida na célula até a sua lise. Do conteúdo de carbono orgânico total, o COD produzido pelas células de *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae* correspondeu a 57% e 48%, respectivamente, sendo possível considerar o conteúdo de carbono excedente como aquele presente na estrutura celular da cianobactéria. Uma correlação linear positiva entre as frações de carbono medidas e a densidade óptica foi observada para *M. aeruginosa*, mas não para *A. flos-aquae* para o período completo de cultivo avaliado. Considerando-se somente a fase exponencial de crescimento, uma correlação linear de 0,99 foi obtida para ambas as espécies (Figura 4.2). A mesma correlação (entre DO₇₃₀ e COT) não foi observada por Huang et al. (2009), tendo os autores verificado, no entanto, uma correlação linear positiva entre DO₇₃₀ e clorofila-a (0,97 para *Anabaena* e 0,98 para *Microcystis*), sugerindo que a densidade óptica a 730 nm pode ser utilizada como um parâmetro para indicar o crescimento celular das espécies de cianobactérias avaliadas.

Na avaliação do pH dos cultivos, para ambas as espécies foi verificado um aumento constante nos valores de pH do meio com o decorrer do período de crescimento, com um maior aumento de pH no cultivo de *A. flos-aquae*. Um acréscimo do pH de 7,31 para 7,70 e de 7,28 para 8,51 foi contabilizado para *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae*, respectivamente. A excessiva fotossíntese é considerada um dos fatores responsáveis pelo aumento no pH do meio, sendo valores entre 6 e 9 considerados ótimos para o desenvolvimento destes organismos em

corpos d'água (SANT'ANNA et al., 2008). Esse aumento de pH é considerado um dos problemas associados a florações de cianobactérias em mananciais de abastecimento de água, uma vez que tendem a interferir nas etapas de coagulação e floculação e, conseqüentemente, na eficiência do processo de tratamento.

Figura 4.2. Correlação linear entre COT e DO_{730} para *M. Aeruginosa* e *A. flos-aquae* na fase exponencial de crescimento.

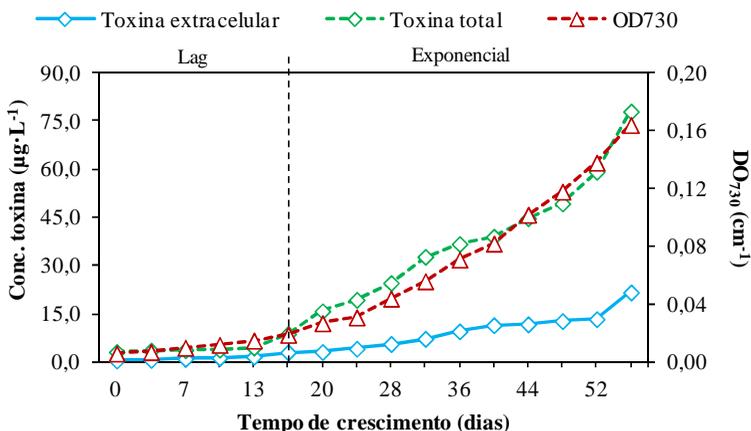


O perfil de produção de microcistina pela cianobactéria *M. aeruginosa* é representado na Figura 4.3. Apenas duas variantes de microcistina foram produzidas pela cepa CPCC 299, a MC-LR (microcistina-LR) e a dmMC-LR (3-desmetil microcistina-LR). Proporcionalmente, a toxina MC-LR foi a variante dominante (60 a 80%) no total de toxinas produzidas. Na quantificação de toxina dissolvida, no entanto, a proporção de dmMC-LR foi ligeiramente superior àquela observada para MC-LR, o que pode ser relacionado ao seu menor peso molecular (980 Da) comparado à MC-LR (994 Da).

A Figura 4.3 representa o comportamento das frações dissolvida (toxina liberada pela célula no meio) e total (toxina extra e intracelular). Uma correlação linear positiva ($R^2 = 0,98$) foi observada entre a densidade óptica e a concentração de toxina total produzida pelas células. Em média, 26% da toxina produzida pela célula foi

caracterizada como toxina dissolvida. Por não ter sido possível a identificação das etapas estacionária e de declínio no período de cultivo, o aumento natural da concentração de toxinas dissolvida em relação à toxina intracelular não pode ser observada como esperado quando do período de morte celular. A produção média de microcistina, definida como equivalente de MC-LR (MC-LR eq.) por célula foi determinada como $4,6 \times 10^{-5} \mu\text{g}\cdot\text{cel}^{-1}$ nas condições avaliadas para a cepa de *M. aeruginosa* CPCC 299.

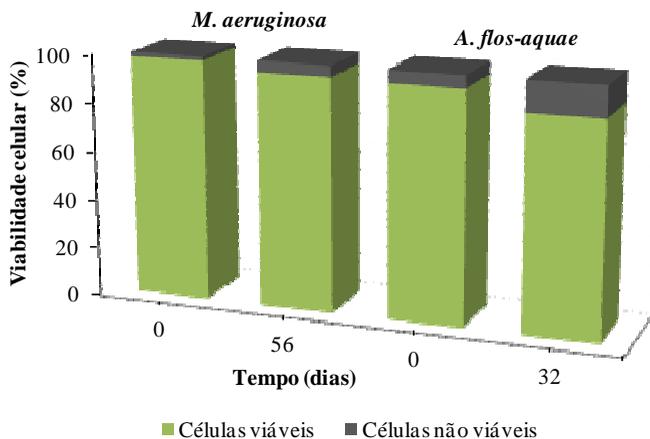
Figura 4.3. Concentração de toxina total e extracelular durante o período de crescimento da espécie *M. aeruginosa*.



A perda de viabilidade das células com o tempo de cultivo foi avaliada a partir do método BacLight™. Na Figura 4.4 tem-se representada a viabilidade inicial e final dos cultivos de *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae*. Em termos percentuais, a cianobactéria *A. flos-aquae* apresentou uma maior redução da viabilidade celular (12,7%) ao final do período de cultivo (32 dias) se comparado a *M. aeruginosa* (4,68%) para um total de 56 dias de cultivo. Para *A. flos-aquae*, a perda de viabilidade passou a ser mais expressiva no início da fase estacionária, corroborando com o decaimento nas medidas de densidade óptica. Um

tempo maior de cultivo para ambas as espécies permitiria uma melhor avaliação tanto da viabilidade celular (até reduzidos índices de células viáveis) como dos demais parâmetros destacados. A quantificação dos valores residuais de nutrientes (N e P) poderia igualmente complementar esta avaliação, visto que a concentração destes elementos é determinante no desenvolvimento dos microrganismos em questão.

Figura 4.4. Avaliação da viabilidade celular das cianobactérias *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae* nos tempos inicial e final do período de crescimento.



Morfologicamente, o cultivo de *M. aeruginosa* foi caracterizado como um cultivo de células isoladas, com diâmetro médio de 3 μ m. A formação de colônias não foi verificada em nenhum estágio do crescimento celular. Este comportamento pode ser associado à movimentação constante do meio de cultivo devido à aeração. Sangolkar et al. (2009), em avaliação de cultivo isolado de *M. aeruginosa*, por sua vez, identificaram distintas morfologias durante o período de crescimento, com a presença de células isoladas na fase inicial e posterior formação de colônias compactas. O uso de aeração artificial no referido estudo não foi mencionado. O cultivo de *A. flos-aquae* apresentou filamentos de tamanhos variados, o que dificultou a

determinação de um número médio constante de células por filamento. Valores de 3,5 μm e 2 μm foram determinados para comprimento e largura das células, respectivamente.

4.2 ENSAIOS DE OZONIZAÇÃO COM CULTIVOS LABORATORIAIS DE *M. aeruginosa* E *A. flos-aquae*

4.2.1 Efeito da ozonização na liberação de COD das células

A ozonização das suspensões de células de cianobactérias resultou em um aumento substancial na concentração de COD no meio. Na Figura 4.5 e Figura 4.6 tem-se representado o aumento do COD para *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae* após ozonização em doses de 0,5, 2,0 e 4,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ozônio para as densidades de célula de $2,5\times 10^5 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 4.5) e $1,5\times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 4.6). Como observado, proporcionalmente, a maior quantificação de COD extracelular foi observada já no primeiro tempo de contato avaliado (0,5 min). Este comportamento pode ser atribuído a duas condições distintas: uma rápida reação entre o ozônio e a biomassa celular, com a formação direta de COD; ou uma reação indireta a partir da lise celular das cianobactérias, levando à liberação dos compostos intracelulares (MÜLLER et al., 2003; HAMMES et al., 2007; RAMSEIER et al., 2011).

Figura 4.5. Liberação de COD para *M. aeruginosa* (a) e *A. flos-aquae* (b) para a densidade de $2,5 \times 10^5$ cel·mL⁻¹; dose de ozônio de 0,5, 2,0 e 4,0 mg·L⁻¹ e pH de 6 e 8.

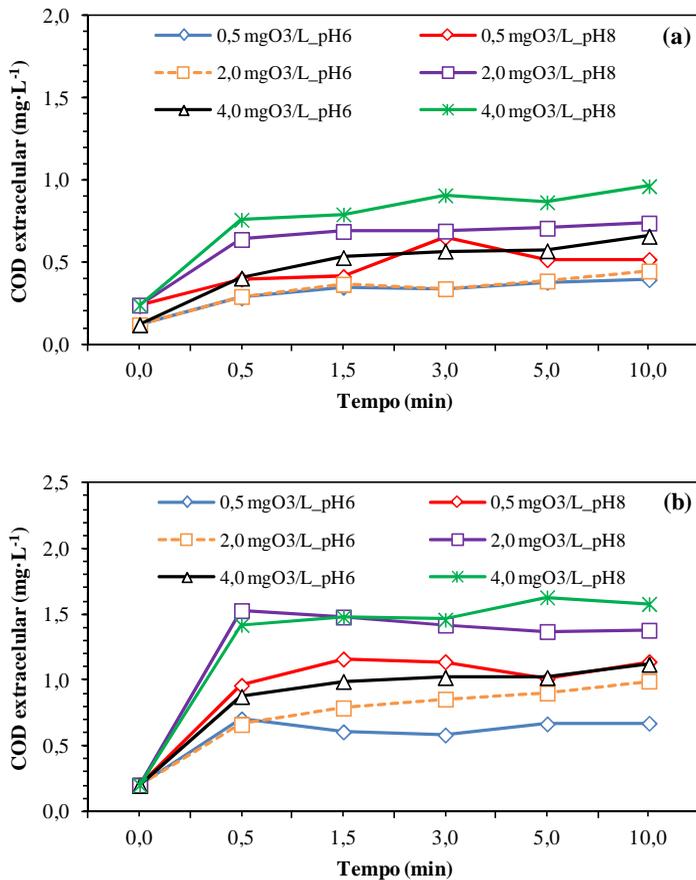
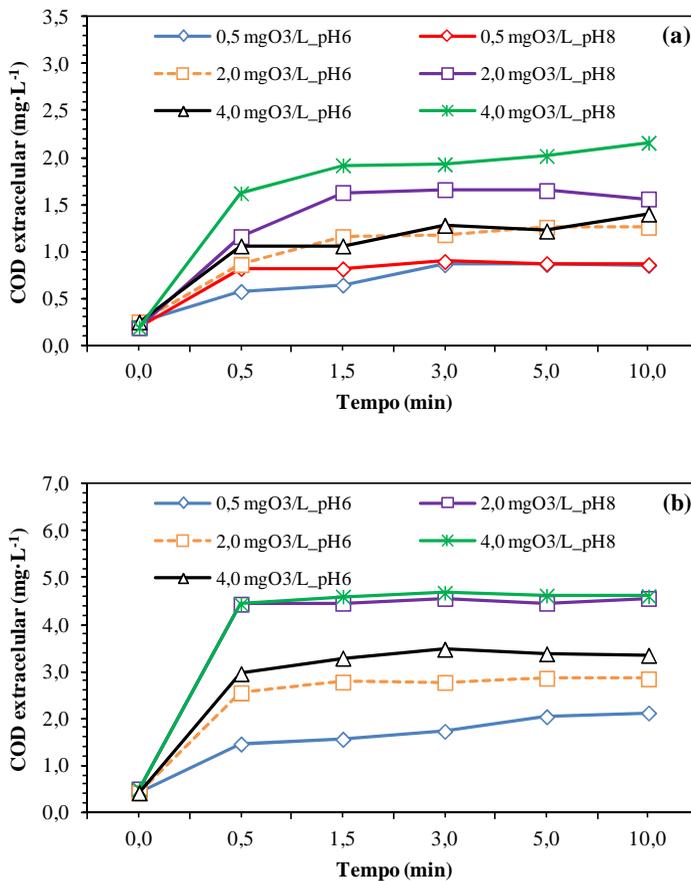


Figura 4.6. Liberação de COD para *M. aeruginosa* (a) e *A. flos-aquae* (b) para a densidade de $1,5 \times 10^6$ cel·mL⁻¹; dose de ozônio de 0,5, 2,0 e 4,0 mg·L⁻¹ e pH de 6 e 8.



Como mostrado nas Figuras citadas acima, doses mais elevadas de ozônio tenderam a resultar em uma maior concentração de COD extracelular. Para $2,5 \times 10^5$ cel·mL⁻¹ (Figura 4.5), por exemplo, um aumento de $0,52$ mg·L⁻¹ de COD com a aplicação de $0,5$ mgO₃·L⁻¹ para $0,96$ mg·L⁻¹ após 4 mgO₃·L⁻¹, e de $1,14$ mg·L⁻¹ de COD com

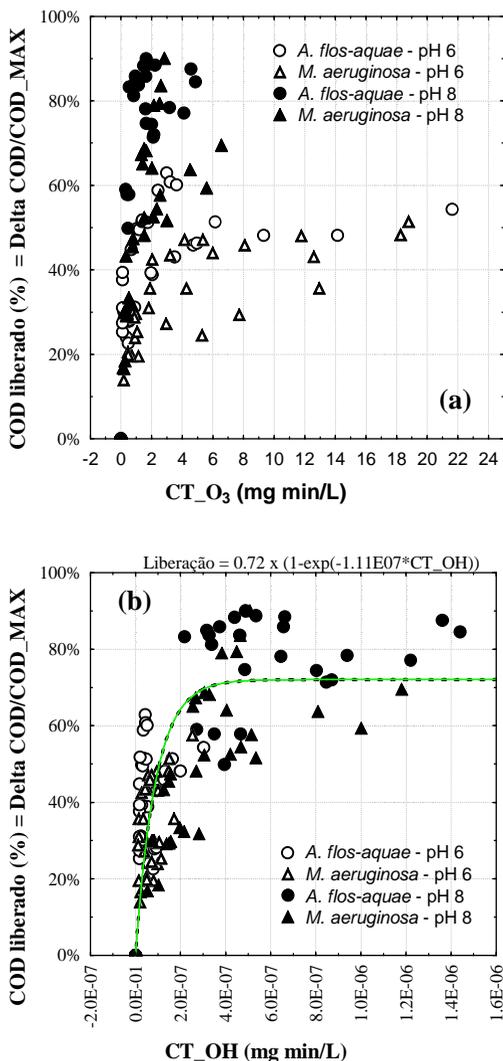
0,5 mgO₃·L⁻¹ para 1,58 mg·L⁻¹ após 4 mgO₃·L⁻¹ foi observado para *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae*, respectivamente, após um tempo de contato de 10 min e a pH 8. Para *A. flos-aquae*, no entanto, a pH 8, o aumento de 2 para 4 mgO₃·L⁻¹, para ambas as densidades, não promoveu um aumento na concentração de COD extracelular, o que sugere que a 2 mgO₃·L⁻¹, todo o material orgânico teria sido devidamente liberado ou oxidado. Tendo-se em consideração as duas vias possíveis para explicar o aumento na concentração de COD após a ozonização, doses mais elevadas de ozônio poderiam ter causado maiores danos à célula e permitido a liberação de maiores frações de COD intracelular. Por outro lado, as maiores frações de COD quantificadas podem ser referentes à formação deste por reações diretas entre o ozônio e os compostos orgânicos não-assimiláveis presentes na estrutura celular, uma vez que o ozônio apresenta uma reatividade mais elevada com compostos orgânicos se comparado a outros oxidantes (RAMSEIER et al., 2011). A maior concentração de COD extracelular quando da ozonização de *A. flos-aquae* em comparação à *M. aeruginosa*, em média 90% superior, pode ser relacionada ao tamanho da célula da cianobactéria, resultando, conseqüentemente, em uma maior quantidade de substâncias intracelulares a ser liberada, ou em maior biomassa celular disponível para oxidação.

O aumento na concentração de COD disponível no meio após ozonização de células de *M. aeruginosa* foi também observada por Miao e Tao (2009). Os autores reportam que o aumento da dose de ozônio de 1 para 5 mg·L⁻¹ elevou a concentração de COD de 1,03 para 2,56 mg·L⁻¹. O mesmo comportamento foi observado por Huang, Cheng e Cheng (2008), que atribuíram o aumento na concentração de COD à reação do ozônio com os polissacarídeos da parede celular da cianobactéria. O aumento na proporção de COD extracelular após ozonização foi também observado para algumas espécies de algas, como *Cyclotella sp.* (PLUMMER; EDZWALD, 2001) e *Scenedesmus quadricauda* e *Scenedesmus vacuolatus* (PLUMMER; EDZWALD, 2001; HAMMES et al., 2007). Hammes et al. (2007) observaram uma relação próxima entre a concentração de carbono orgânico assimilável (COA) e COD, principalmente em tempos mais baixos de exposição (1 - 2 mg·min/L), em que 90% do COD foi caracterizado como COA.

O carbono orgânico assimilável compreende a fração do COD que pode ser facilmente assimilada pelas bactérias e convertido em biomassa celular (LIU et al., 2002), sendo produzida a partir da oxidação da matéria orgânica dissolvida. Devido ao baixo peso molecular, estes compostos favorecem a atividade microbiana, sendo considerado um controlador do crescimento biológico em sistemas de distribuição (PÁDUA; FERREIRA, 2006). O ozônio, particularmente, é caracterizado por produzir elevadas concentrações de COA e de forma imediata, devido a sua elevada reatividade em água (HAMMES et al., 2006). Uma correlação entre ambas, biomassa de cianobactéria (*Planktothrix rubescens*) e pigmentos em águas superficiais, e a formação de COA após pré-ozonização foi observada por Müller et al. (2003). Em estudo de ozonização de células de *Aphanizomenon gracile*, Ramseier et al. (2011) observaram um aumento imediato na concentração de COA, mesmo em baixas doses de ozônio, como observado para o conteúdo de COD neste estudo. A fração de carbono assimilável não foi determinada na presente pesquisa.

A influência do pH na reatividade do ozônio em termos de COD extracelular também foi observada. Uma maior quantidade de COD foi liberada em pH 8 se comparado a pH 6. Um aumento na concentração de COD em maiores valores de pH (5,5 a 9,0) foi também observado por Huang, Cheng e Cheng (2008). Em pH alcalino, a maior concentração de íons hidróxido (OH⁻) promove a decomposição do ozônio e a formação de radicais hidroxila ([•]OH) (WIDRIG; GRAY; MCAULIFFE, 1996; VON GUNTEN, 2003). De acordo com Widrig, Gray e Mcauliffe (1996), o mecanismo de reação do radical [•]OH é mais propenso a degradar moléculas alifáticas saturadas, as quais estão largamente presentes em substâncias orgânicas derivadas de algas. Dessa forma, uma maior concentração de radicais [•]OH, devido ao pH alcalino ou a aplicação de doses mais elevadas de O₃, podem aumentar o dano celular e a formação de COD.

Na Figura 4.7 tem-se representada uma avaliação normalizada da liberação de COD (expresso em termos de % do máximo de COD liberado) para ambos os organismos como uma função da exposição ao ozônio molecular (CT_{O₃}) ou a exposição aos radicais hidroxila (CT_{OH}).

Figura 4.7. Liberação normalizada de COD como uma função de CT_{O_3} (a) e CT_{OH} (b).

Como observado na Figura 4.7a, não é óbvia a diferença da liberação de COD entre as espécies *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae*. A maior concentração de COD extracelular (Figuras 4.5 e 4.6) foi essencialmente causada pela maior carga de biomassa das células de *A. flos-aquae*. Entretanto, para ambos os organismos, existe uma importante diferença causada pelo valor de pH. A liberação de COD a pH 6 estabilizou em 30 a 50% da concentração final de COD observada a pH 8. A plotagem do CT de liberação com respeito ao CT_{OH} (Figura 4.7b) forneceu uma melhor descrição do conjunto de dados. Pode-se inferir que os radicais livres desempenham um papel importante na oxidação das células algais. CT_{OH} pode ser correlacionado com CT_{O_3} , assim como um maior CT_{O_3} também levaria a um maior CT_{OH} . Esse comportamento é também considerado para o efeito do pH, o que explica a superioridade do CT_{OH} sobre CT_{O_3} em predições de liberação de COD das células.

4.2.2 Efeito do ozônio sobre a integridade celular de *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae*

O impacto da ozonização sobre a morfologia e a integridade celular foi verificado por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e pelo método BacLight™, respectivamente. Não foi verificada perda de integridade celular devido à adição direta das células na água tamponada. Entretanto, como mostrado nas Figura 4.8b e Figura 4.8d, uma perda imediata da integridade celular após a exposição ao ozônio para ambas as espécies de cianobactérias foi observada: todas as células apresentaram uma coloração vermelho/alaranjado mesmo para o menor tempo de contato (30 ± 5 s) e dose de ozônio de $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Esses resultados indicam danos imediatos à membrana celular em valores de $CT \leq 0,2 \text{ mg} \cdot \text{min} / \text{L}$ para todos os experimentos de ozonização, para ambas as espécies de cianobactéria, os valores de pH e as densidades de célula adotados. Com o aumento da dose de ozônio e do tempo de contato, as células se tornaram mais opacas, indicando que as ligações do PI (iodeto de propídio) com os sítios de ataque foram progressivamente reduzidas, com a provável oxidação destes sítios ativos pelo ozônio. Para a dose mais elevada de $4 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, já nos primeiros 30 s de tempo de contato, a opacidade das células foi observada, concluindo-se, portanto, que a oxidação dos sítios de ataque

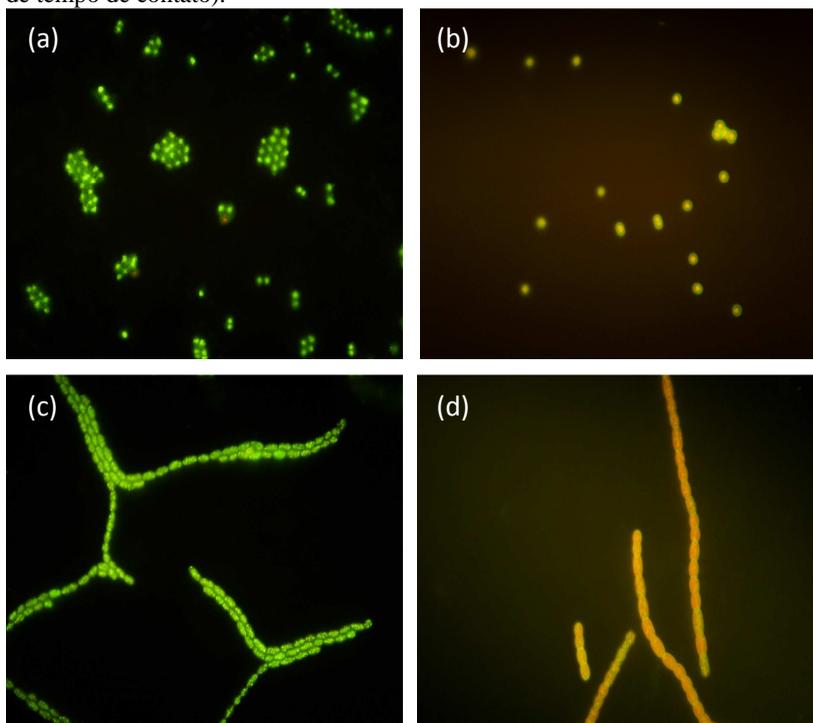
do corante PI foram imediatamente oxidados. Enquanto carboidratos e ácidos graxos reagem levemente com o ozônio, aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos reagem muito rapidamente com este oxidante (BABLON et al., 1991b). Ambos DNA e RNA podem ser degradados pelo ataque do ozônio (ozônio molecular ou radicais $\cdot\text{OH}$) mesmo com a célula permanecendo intacta (THERUVATHU et al., 2001; CATALDO, 2005), o que explicaria a manutenção da estrutura da célula, mas na degradação do genoma da célula.

Assim como outros oxidantes, o ozônio ataca primeiramente a parede celular e as glicoproteínas, glicolípídeos ou certos aminoácidos da membrana plasmática. A rápida morte da célula após a ozonização pode ser atribuída às mudanças na permeabilidade celular do microrganismo seguida pela lise da célula (GREENE; FEW; SERAFINI, 1993; MORATÓ et al., 2003). Devido ao elevado potencial de oxidação do ozônio, a lise celular não é descrita como o mecanismo primário de inativação, mas uma consequência da elevada concentração do oxidante aplicado, uma vez que o ozônio tende a reagir mais fortemente com o material nuclear (GREENE; FEW; SERAFINI, 1993). Devido à completa perda de viabilidade das células de ambas as cianobactérias após 30 s de tempo de contato, não foi possível determinar a cinética de dano celular, como indicado por Daly, Ho e Brookes (2007) e Zamyadi et al. (2010).

Na avaliação do número remanescente de células durante os ensaios de ozonização, diferentes valores de redução foram observados em função da dose, do pH e da espécie de cianobactéria. Para *M. aeruginosa*, em densidade igual a $2,5 \times 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$, o total da contagem de células realizadas entre 0 e 10 min de tempo de ozonização indicou uma lise limitada (< 2%) para a menor dose de ozônio ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) a pH 6. Para as dosagens mais elevadas, de 2 e $4 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, um total de 32 e 41% de perdas em termos de número de células foi verificado. Em pH 8, entretanto, nenhuma redução significativa do número de células foi verificada. O maior residual de ozônio em pH 6 pode ter favorecido a oxidação das células, com consequente lise, em tempos maiores de exposição. Embora os radicais $\cdot\text{OH}$ possam ser mais agressivos às células (dados apresentados na sequência), a sua menor estabilidade,

reduzida em altas concentrações de COD, reduziriam seus efeitos ao ponto de culminar na lise celular dos organismos.

Figura 4.8. Impacto da ozonização sobre a viabilidade celular a partir do método BacLight™. Células de *M. aeruginosa* (a) antes e (b) após ozonização; células de *A. flos-aquae* (c) antes e (d) após ozonização (pH 6 com $0,5 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ - 30 s de tempo de contato).



Para *A. flos-aquae*, nenhuma redução de célula significativa ($> 2\%$) foi verificada para ambos os valores de pH e dose de ozônio, o que pode igualmente ser relacionado como uma função dos baixos valores de ozônio residual quando da ozonização desta espécie de cianobactéria. Considerando os resultados em termos de viabilidade e número de células, pode-se ponderar que a aplicação de baixas doses de ozônio em

reduzido tempo de contato, seria suficiente para causar a inativação do microrganismo, mas não a sua lise.

Embora um mesmo valor reduzido de CT tenha sido suficiente para as duas espécies apresentarem-se como células não viáveis, uma considerável diferença nos valores de CT para ambas as cianobactérias foi verificada. Os valores de CT para *M. aeruginosa* foram sempre superiores ou semelhantes ($\text{pH } 8$ e $0,5 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$) àqueles determinados para *A. flos-aquae* (Tabela 4.1), o que sugere que *M. aeruginosa* seria aparentemente mais resistente ao oxidante se comparado a *A. flos-aquae*. Deve-se considerar, no entanto, que a presença de uma maior concentração de COD quando dos ensaios com *A. flos-aquae* teria favorecido o consumo de O_3 , resultando em menores valores de CT e, portanto, sugerindo que esta espécie seria menos reativa ao oxidante. Esta relação será melhor discutida quando da avaliação cinética do processo (seção 4.2.3.3). Zamyadi et al. (2012) também observaram a necessidade de um maior valor de CT para a remoção de *M. aeruginosa* se comparado à outras espécies de cianobactérias avaliadas pelos autores. Os valores de CT foram também influenciados pelos valores de pH (menores em pH 8), pela dose de ozônio (quanto maior a dose de ozônio maiores os valores de CT) e pela densidade de células, tendo-se frequentemente menores valores de CT para a densidade mais elevada.

Visando validar os valores reais de CT obtidos, estes foram comparados a valores de CT modelados, obtidos com os valores de decaimento de ozônio e tempo igual a 10 min, a partir da Equação 4.2. Para ambas as espécies de cianobactérias verificou-se que o CT modelado poderia subestimar os valores de CT real (Eq. 4.3 e 4.4). Dessa forma, considerou-se que a remoção de células pode ser controlada a partir de um CT real.

$$CT_{\text{modelado}} = \frac{C_0}{k'} [1 - \exp(-k' \cdot t)] \quad (4.2)$$

onde C_0 é a concentração residual inicial de ozônio ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) determinada a partir do ajuste exponencial da relação entre ozônio residual e tempo (min); e k' é a constante de decaimento de primeira ordem (min^{-1}).

$$CT_{\text{mod elado}} = 1,01CT_{\text{real}} - 0,39 \quad (R^2: 1,0) \quad M. \text{ aeruginosa} \quad (4.3)$$

$$CT_{\text{mod elado}} = 1,02CT_{\text{real}} - 0,55 \quad (R^2: 1,0) \quad A. \text{ flos-aquae} \quad (4.4)$$

Tabela 4.1. Valores de CT obtidos nos ensaios de decaimento de O₃ para as espécies *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae*, considerando densidade de células, pH e dose de ozônio.

Tempo (min)	<i>M. aeruginosa</i> - pH 6 (250.000 cel·mL ⁻¹)			<i>M. aeruginosa</i> - pH 8 (250.000 cel·mL ⁻¹)		
	0,5 mgO ₃ ·L ⁻¹	2 mgO ₃ ·L ⁻¹	4 mgO ₃ ·L ⁻¹	0,5 mgO ₃ ·L ⁻¹	2 mgO ₃ ·L ⁻¹	4 mgO ₃ ·L ⁻¹
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	0,18	1,13	1,80	0,13	0,77	1,50
1,5	0,45	2,95	6,01	0,26	1,52	2,99
3,0	0,73	5,29	11,77	0,32	2,10	4,52
5,0	0,90	7,73	18,26	0,35	2,33	5,60
10,0	1,05	12,95	31,60	0,38	2,56	6,57
Tempo (min)	<i>A. flos-aquae</i> - pH 6 (250.000 cel·mL ⁻¹)			<i>A. flos-aquae</i> - pH 8 (250.000 cel·mL ⁻¹)		
	0,5 mgO ₃ ·L ⁻¹	2 mgO ₃ ·L ⁻¹	4 mgO ₃ ·L ⁻¹	0,5 mgO ₃ ·L ⁻¹	2 mgO ₃ ·L ⁻¹	4 mgO ₃ ·L ⁻¹
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	0,18	0,89	1,96	0,16	0,83	1,63
1,5	0,35	2,03	4,96	0,30	1,59	3,16
3,0	0,47	3,50	9,31	0,39	1,98	4,11
5,0	0,50	4,70	14,14	0,44	2,09	4,56
10,0	0,56	6,13	21,63	0,52	2,15	4,85
Tempo (min)	<i>M. aeruginosa</i> - pH 6 (1.500.000 cel·mL ⁻¹)			<i>M. aeruginosa</i> - pH 8 (1.500.000 cel·mL ⁻¹)		
	0,5 mgO ₃ ·L ⁻¹	2 mgO ₃ ·L ⁻¹	4 mgO ₃ ·L ⁻¹	0,5 mgO ₃ ·L ⁻¹	2 mgO ₃ ·L ⁻¹	4 mgO ₃ ·L ⁻¹
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	0,21	0,86	1,88	0,19	0,74	1,42
1,5	0,46	2,03	4,26	0,40	1,32	2,14
3,0	0,65	3,21	8,09	0,50	1,52	2,51
5,0	0,76	4,14	12,60	0,55	1,63	2,60
10,0	0,96	5,35	18,79	0,72	2,01	2,83
Tempo (min)	<i>A. flos-aquae</i> - pH 6 (1.500.000 cel·mL ⁻¹)			<i>A. flos-aquae</i> - pH 8 (1.500.000 cel·mL ⁻¹)		
	0,5 mgO ₃ ·L ⁻¹	2 mgO ₃ ·L ⁻¹	4 mgO ₃ ·L ⁻¹	0,5 mgO ₃ ·L ⁻¹	2 mgO ₃ ·L ⁻¹	4 mgO ₃ ·L ⁻¹
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	0,15	0,66	1,39	0,11	0,54	1,06
1,5	0,24	1,01	2,40	0,18	0,80	1,48
3,0	0,36	1,18	2,98	0,27	0,92	1,64
5,0	0,48	1,37	3,19	0,44	1,14	1,80
10,0	0,71	1,74	3,62	1,03	1,62	2,23

Comparativamente a estudos utilizando cloro como oxidante, os resultados aqui obtidos indicam que o ozônio tende a ser mais efetivo na

perda de viabilidade celular em um tempo de contato inferior. Por exemplo, Zamyadi et al. (2012a) verificaram diferenças na perda da integridade celular para distintas espécies de cianobactérias após experimentos de cloração (2 e 5 mg Cl₂·L⁻¹). Um valor de CT superior a 31 mg·min/L foi necessário para perturbar a integridade (medida a partir do método FDA - diacetato de fluoresceína) de mais de 99% das células de *M. aeruginosa*, enquanto um valor de CT de aproximadamente 8 mg·min/L teve um impacto equivalente em células de *A. circinalis*, *C. raciborskii* e *A. issatschenkai*. Para todas as espécies, os autores verificaram uma redução de 60 a 80% no número de células, considerando-se dessa forma a sua lise completa após o período de cloração (60 min) e para ambas as doses, ao contrário do que foi observado no presente estudo com ozônio. Em outro estudo, Zamyadi et al. (2010) obtiveram uma redução de 9 e 15% de *A. circinalis* após exposição a doses de cloro de 2 e 3 mg·L⁻¹, respectivamente, e um valor de CT < 7 mg·min/L foi requerido para reduzir a viabilidade celular dos organismos em valores inferiores a 2%. Para uma densidade de aproximadamente 330.000 cel·mL⁻¹, Daly, Ho e Brookes (2007) verificaram que doses de cloro ≥ 12 mg·L⁻¹ resultaram em lise em mais de 98% das células de *M. aeruginosa* já no primeiro minuto de tempo de contato. Considerando que um CT ≤ 0,2 mg·min/L foi suficiente para tornar inviáveis 100% das células de ambas as espécies avaliadas como não viáveis, a aplicação do ozônio em comparação ao cloro seria mais favorável, tanto pelo menor tempo de exposição como pela menor dose de oxidante requerida.

No mesmo estudo mencionado anteriormente, Daly, Ho e Brookes (2007) observaram ainda uma redução na fluorescência da clorofila com a adição do cloro, o que foi atribuído à oxidação dos pigmentos fotossintéticos. A ação do ozônio observada neste estudo também promoveu uma redução na intensidade da coloração das amostras (Figuras 4.9 e 4.10), podendo-se interpretar esta ocorrência também como uma oxidação dos pigmentos fotossintéticos, embora não tenham sido realizadas análises quantitativas de clorofila-a. Quanto maior a dose de ozônio aplicada, menor a intensidade da cor observada nas amostras, principalmente para *M. aeruginosa*. O menor conteúdo de clorofila-a em *M. aeruginosa* em comparação a *A. flos-aquae*, como observado por

Huang et al. (2009), teria favorecido a ação mais efetiva do ozônio na oxidação dos pigmentos para *M. aeruginosa* em uma mesma condição experimental.

O efeito do pH na oxidação dos pigmentos também deve ser considerado, principalmente para *A. flos-aquae* (Figura 4.10). Em condições alcalinas, o ozônio tende a reagir com os íons OH^- para a formação de radicais $\cdot\text{OH}$, cujo potencial oxidativo é reconhecidamente superior (2,85 V) ao do ozônio molecular (2,07 V). Esta consideração foi utilizada por Li et al. (2011) para explicar a maior redução na concentração de clorofila-a em ensaios de ozonização com células de *M. aeruginosa* em valores de pH de 3, 7, 9 e 11. A presença de uma maior concentração de radicais $\cdot\text{OH}$ (obtido pela contínua inserção de ozônio no meio) teria favorecido a oxidação dos pigmentos com a redução do teor de clorofila-a com o decorrer do tempo de contato avaliado (90 min) nos pHs 9 e 11. Portanto, devido a menor oxidabilidade do ozônio molecular, este teria atuado mais fracamente na oxidação dos pigmentos em pHs mais baixos. Embora a formação de radicais $\cdot\text{OH}$ em pH mais elevado também tenha sido contabilizada neste estudo, a mesma consideração não pode ser estabelecida nas condições experimentais aqui avaliadas, uma vez que os ensaios foram realizados em batelada e sem a introdução contínua de ozônio, como observado no estudo de Li et al. (2011) e, portanto, sem a produção contínua de radicais $\cdot\text{OH}$. Embora não seja possível estimar numericamente, a ação do ozônio molecular pareceu ser similar à dos radicais $\cdot\text{OH}$ em termos de redução de cor, para uma mesma dose de ozônio em ambos os valores de pH, considerando-se os ensaios com *M. aeruginosa* (Figura 4.9). Para *A. flos-aquae*, pode-se sugerir que a ação do O_3 em pH 6 foi mais efetiva, visto a obtenção de uma redução de cor da amostra (Figura 4.10a) ($4 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$). Em pH 8, a baixa concentração de ozônio residual ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ em 1,5 min) teria desfavorecido a ação do mesmo na oxidação dos pigmentos.

Figura 4.9. Alteração na coloração das amostras de suspensão de *M. aeruginosa* em função da dose de ozônio e do tempo de contato para densidade de $1,5 \times 10^6 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$. (a) pH 6 e (b) pH 8.

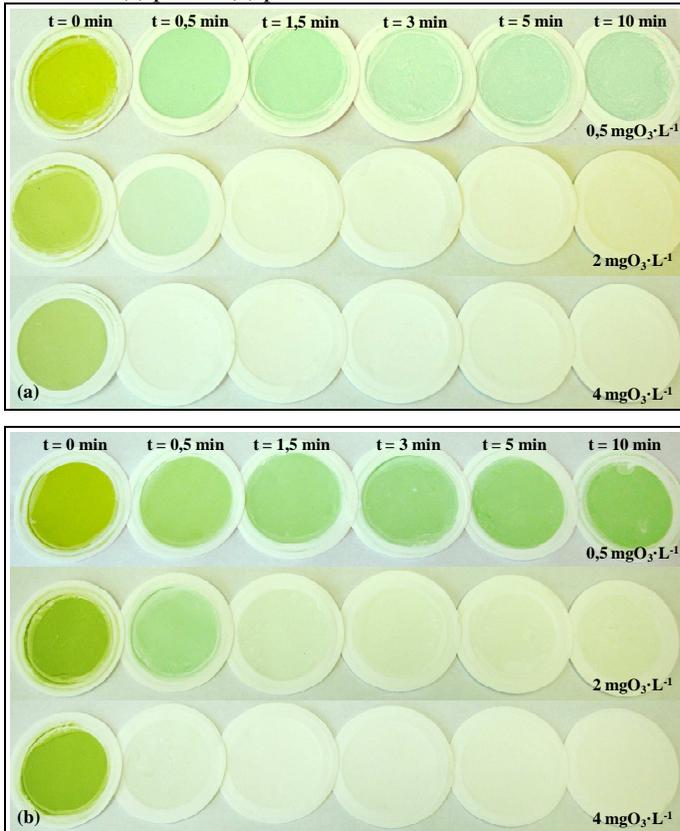
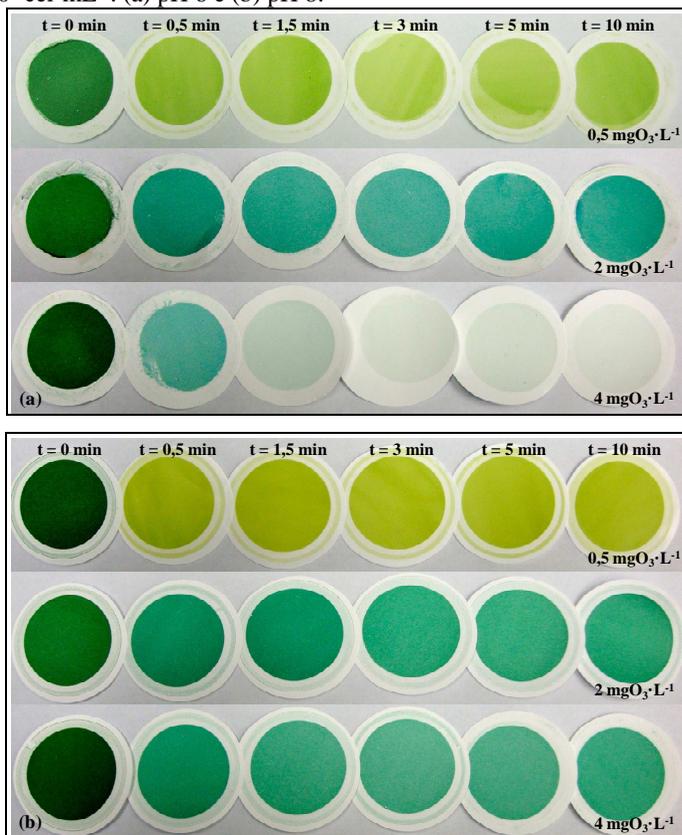


Figura 4.10. Alteração na coloração das amostras de suspensão de *A. flos-aquae* em função da dose de ozônio e do tempo de contato para densidade de $1,5 \times 10^6$ cel·mL⁻¹. (a) pH 6 e (b) pH 8.



Miao e Tao (2009) também avaliaram os efeitos do ozônio na remoção de células de *M. aeruginosa*. Doses de ozônio de 1, 3 e 5 mg·L⁻¹ foram aplicadas em uma suspensão de células e a remoção foi observada em termos de clorofila-a. Remoções de até 91,2% de clorofila-a foram obtidas para dose de ozônio de 5 mg·L⁻¹ após 60 min de tempo de contato (concentração inicial de clorofila-a não informada). Os valores de CT requeridos não foram calculados. Ainda, os autores

relatam alterações na estrutura celular de *M. aeruginosa* em diferentes proporções em função da dose de ozônio aplicada. Nas doses acima de $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ozônio, lise completa do microrganismo foi observada. A extensão dos danos às células em termos numéricos ($\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$) não foi indicada pelos autores. Experimentos desenvolvidos por Hoeger, Dietrich e Hitzfeld (2002) com a pré-ozonização de *Microcystis*, resultou em lise da maioria das células após a aplicação de ozônio em $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, diferentemente do reportado por Miao e Tao (2009) e Plummer e Edzwald (1998), que reportam maior lise celular em doses superiores a $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Danos às células de *M. aeruginosa* após ozonização, também são relatados por Li et al. (LI et al., 2011) a pH 9 e concentração de ozônio de $0,752 \text{ mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ e fluxo de $8 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, tendo-se observado destruição parcial das células após 10 min de tempo de contato, com perda da maior parte da parede celular após 90 min de tratamento.

Se comparado aos estudos de Li et al. (2011), a ação do ozônio nas células de *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae* no presente estudo pareceu ser menos destrutiva (Figura 4.11 e Figura 4.12). Para *M. aeruginosa*, com a dosagem de ozônio mais baixa ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e pH 6, alterações morfológicas na estrutura externa da célula foram observadas já nos primeiros 30 s de tempo de contato (Figura 4.11b), não ocorrendo alterações expressivas dessa condição para o tempo total de ozonização (10 min). Mesmo para a maior dosagem, $4 \text{ mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$, apenas alterações na morfologia da parede celular foram observadas (Figura 4.11c). Células completamente destruídas, que justifiquem a redução do número de células indicado anteriormente, não foram encontradas nesta avaliação microscópica. Quando avaliado o efeito do ozônio em pH 8, verificou-se que em dosagem mais baixa, não houve alterações na morfologia externa da célula (Figura 4.11d) como observado a pH 6. Com o aumento da dosagem para $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, no entanto, uma alteração mais visível na estrutura da parede celular foi observada já em 30 s de tempo de contato (Figura 4.11e), sendo esta mais evidente após 10 min de tempo de contato (Figura 4.11f). Para *A. flos-aquae*, com a aplicação de $2 \text{ mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, observaram-se alterações visíveis na morfologia da parede celular após 30 s de tempo de contato a pH 6, aparentando uma redução no volume celular (Figura 4.12).

Figura 4.11. Impacto da ozonização na integridade celular - avaliação por MEV. Células de *M. aeruginosa* (a) antes e (b) após ozonização pH 6, $0,5 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ e 0,5 min; (c) pH 6, $4 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ e 10 min; (d) pH 8, $0,5 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ e 10 min, (e) pH 8, $4 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ e 0,5 min; (f) pH 8, $4 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ e 10 min.

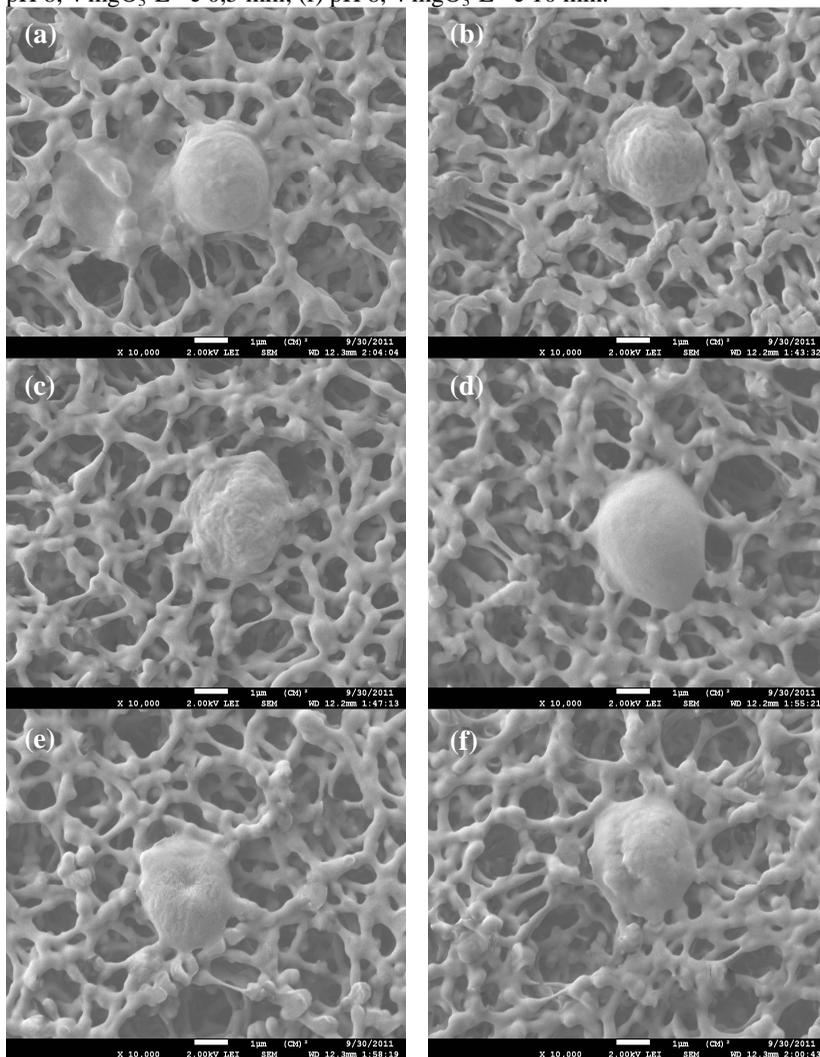
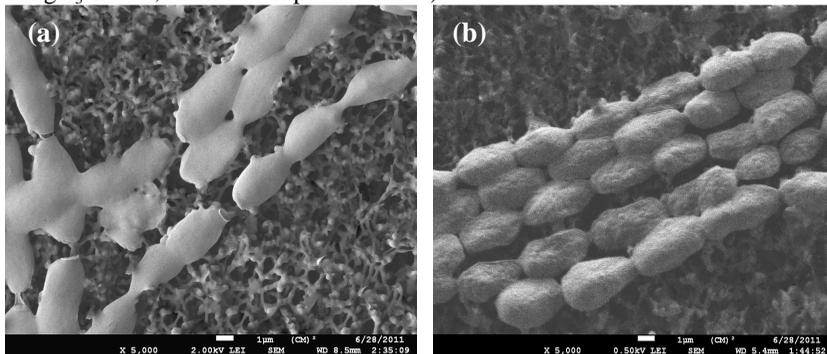


Figura 4.12. Impacto da ozonização sobre a integridade celular - avaliação por MEV. Células de *A. flos-aquae* (a) antes e (b) após ozonização (pH 6 com $2 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ - 0,5 min de tempo de contato).



Lin et al. (2009) observaram diferenças significativas entre a oxidação de *M. aeruginosa* e *A. circinalis*, indicando que a espécie filamentosa seria menos resistente à oxidação com cloro, o que pode ser também sugerido para o ozônio na presente avaliação. Neste mesmo estudo, os autores verificaram que o cloro atuou de maneira mais agressiva na célula de *M. aeruginosa* comparativamente ao observado com ozônio no presente estudo.

Nas condições avaliadas, os resultados obtidos são consistentes com a literatura: a liberação de COD e metabólitos internos precede a lise celular. Consequentemente, reduzidos tempos de contato podem ser suficientes para induzir danos às células e perda da integridade, mas com pequena ou nenhuma interferência no número de células.

4.2.3 Impacto das cianobactérias e COD sobre o decaimento do ozônio

Na sequência serão apresentados resultados referentes à demanda imediata de ozônio e à cinética de decaimento do ozônio que foi caracterizada a partir de um modelo clássico de pseudo-primeira ordem. Como última análise, será apresentada a generalização dos dados

cinéticos dos ensaios com ozônio, obtida através do desenvolvimento de um modelo de ordem *n-ésima*.

4.2.3.1 Demanda imediata de ozônio

Os valores de demanda imediata de ozônio (D_{imediata}) a partir dos dados reais, considerando-se a primeira medida de ozônio residual realizada entre 15 e 17 s, são indicados na Tabela 4.2. Como observado, maiores valores de demanda inicial foram obtidos com o aumento da dose de oxidante, do pH da amostra e da densidade de células de cianobactérias.

Considerando-se a análise estatística dos dados encontrados, a maior demanda imediata de ozônio pode ser diretamente relacionada à maior dosagem de ozônio, pH e concentração de COD. Estatisticamente, considerando todas as variáveis iguais, a demanda imediata de ozônio não foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) para *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae*. Conseqüentemente, foi possível prever a demanda imediata de ozônio para ambos os organismos com uma elevada correlação ($R^2 = 0,90$) a partir da Eq. 4.5.

$$D_0 = a + b \times \text{DoseO}_3 + c \times \text{pH} + d \times \text{COD} \times \text{DoseO}_3 \quad (4.5)$$

onde D_0 é a demanda imediata de ozônio; e a (-0,93), b (0,10), c (0,14) e d (0,03) são coeficientes de regressão.

A análise dos dados estatísticos revelou que a interação entre COD e dose de ozônio foi o preditor mais importante da equação. Esta interação reflete o fato de que um aumento na dose de ozônio produz uma elevada demanda imediata em águas ricas em COD. Da mesma forma para o pH, o seu aumento levou a maiores demandas imediatas de ozônio, o que é uma consequência direta da maior atividade dos radicais livres em pH mais elevado. A partir da Eq. 4.5 e considerando-se uma concentração inicial de COD de $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ em função do pH, a demanda inicial tenderia a variar entre 0,00 (pH 6 e $0,5 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$) e $0,82 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 8 e $4 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$), como indicado na Tabela 4.3.

Tabela 4.2. Valores de demanda imediata de ozônio nas condições avaliadas.

CB*	Dens. (cel·mL ⁻¹)	pH	COD ^(a) (mg·L ⁻¹)	Dose ^(b) (mgO ₃ ·L ⁻¹)	C ₀ ^(c)	D _{imediate} (mg·L ⁻¹)
<i>M. aeruginosa</i>	2,5x10 ⁵	6	0,28	0,51	0,38	0,13
			0,29	2,03	1,96	0,07
			0,40	4,05	3,98	0,07
		8	0,40	0,50	0,23	0,27
			0,64	2,00	1,37	0,63
			0,76	4,01	2,75	1,26
	1,5x10 ⁶	6	0,57	0,50	0,38	0,12
			0,86	2,02	1,80	0,22
			1,06	4,02	3,57	0,45
		8	0,82	0,51	0,35	0,16
			1,16	2,00	1,41	0,59
			1,62	4,02	2,47	1,55
<i>A. flos-aquae</i>	2,5x10 ⁵	6	0,70	0,53	0,30	0,23
			0,66	2,02	1,77	0,25
			0,88	4,00	3,62	0,38
		8	0,96	0,50	0,27	0,23
			1,53	2,04	1,51	0,53
			1,42	4,05	2,79	1,26
	1,5x10 ⁶	6	1,46	0,51	0,32	0,19
			2,55	2,03	1,20	0,83
			2,96	4,02	2,52	1,50
		8	-	0,53	0,14	0,39
			4,44	2,03	0,82	1,21
			4,44	4,05	1,73	2,32
Água Milli-Q	-	6	-	0,49	0,48	0,01
			-	2,00	1,91	0,09
			-	4,03	4,00	0,00
		8	-	0,50	0,44	0,04
			-	2,02	1,87	0,15
			-	4,03	3,66	0,37

^(a) Concentração de COD extracelular a 0,5 min; ^(b) Dose real aplicada; ^(c) concentração residual na primeira medida realizada.

* CB = cianobactérias

Tabela 4.3. Demanda imediata de O₃ predita para os diferentes valores de pH avaliados, considerando concentração inicial de COD de 2 mg·L⁻¹ (R²: 0,90).

pH 6		pH 8	
Dose de O ₃ (mg·L ⁻¹)	D _{imediate} (mg·L ⁻¹)	Dose de O ₃ (mg·L ⁻¹)	D _{imediate} (mg·L ⁻¹)
0,5	0,00	0,5	0,26
2,0	0,22	2,0	0,50
4,0	0,50	4,0	0,82

Como destacado por Höger (2003), o não monitoramento da presença de cianobactérias em um manancial pode afetar a eficiência do processo de tratamento, uma vez que o sistema pode não estar preparado para um aumento na demanda inicial de ozônio. Assim, mesmo que a demanda seja satisfeita, o residual de ozônio, se presente, pode não ser suficiente para permitir a degradação das toxinas dissolvidas. Portanto, o monitoramento da presença e quantificação de células no manancial deve ser considerado um procedimento constante.

4.2.3.2 Modelo cinético de pseudo-primeira ordem

O perfil de decomposição do ozônio nas diferentes condições experimentais avaliadas é apresentado na Figura 4.13 (*M. aruginosa*) e Figura 4.14 (*A. flos-aquae*). Para cada curva de decaimento, avaliada de forma individual, um modelo de pseudo-primeira ordem foi ajustado por regressão não-linear. Como observado nas figuras, o perfil de decaimento do ozônio na ausência de células foi mais lento se comparado ao perfil de decaimento quando as células estavam presentes. Em pH 6 a taxa de decaimento mostrou-se mais estável, para as três doses aplicadas, do que em pH 8, mesmo na ausência de cianobactérias. A maior quantidade de íons OH⁻, em decorrência do pH mais elevado, teria acelerado a reação de iniciação de decomposição do ozônio molecular, com a geração dos radicais [•]OH, os quais são menos estáveis em água (VON GUNTEN, 2003; ERSHOV; MOROZOV, 2008). Também, Ershov e Morozov (2008) consideram não negligenciável a reação tanto do O₃ molecular como dos radicais [•]OH com os constituintes da solução tampão (ex. fosfato e ácido bórico). Dessa

forma, possíveis reações entre O_3 molecular e/ou radicais $\cdot OH$ e estes constituintes podem ter também contribuído para aumentar a velocidade de decomposição do ozônio em pH 8.

Figura 4.13. Curvas de decaimento de ozônio em água ultra-pura na ausência e na presença de células de *M. aeruginosa* (MIC). (a) $2,5 \times 10^5$ cel·mL⁻¹ e pH 6; (b) $2,5 \times 10^5$ cel·mL⁻¹ e pH 8; (c) $1,5 \times 10^6$ cel·mL⁻¹ e pH 6; e (d) $1,5 \times 10^6$ cel·mL⁻¹ e pH 8.

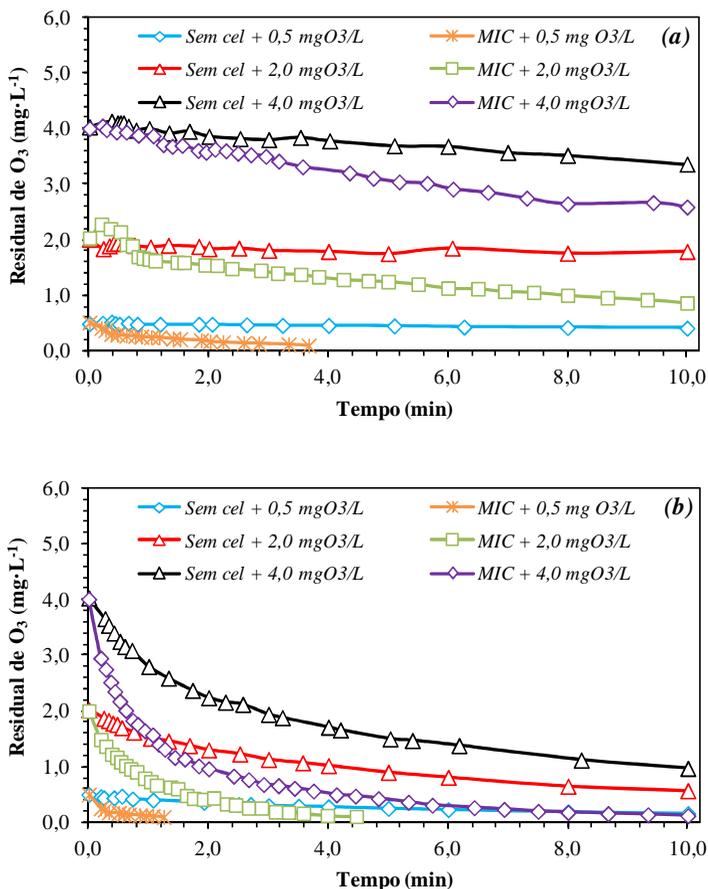


Figura 4.13. Cont...

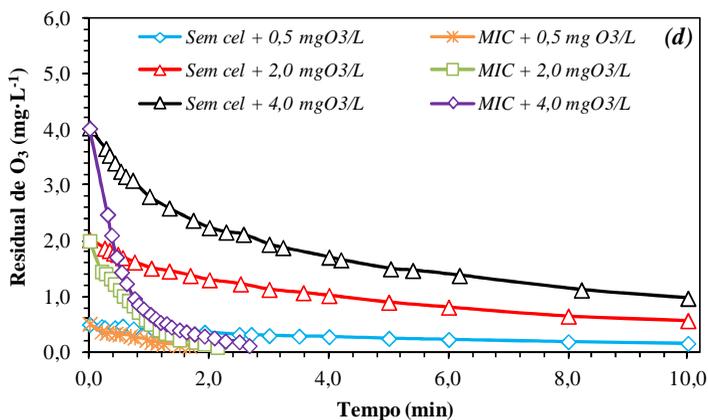
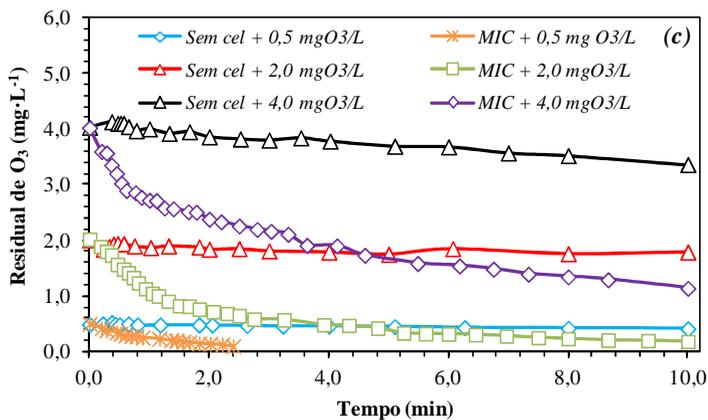


Figura 4.14. Curvas de decaimento de ozônio em água ultra-pura na ausência de células e na presença de células de *A. flos-aquae* (ANA). (a) $2,5 \times 10^5$ cel·mL⁻¹ e pH 6; (b) $2,5 \times 10^5$ cel·mL⁻¹ e pH 8; (c) $1,5 \times 10^6$ cel·mL⁻¹ e pH 6; e (d) $1,5 \times 10^6$ cel·mL⁻¹ e pH 8.

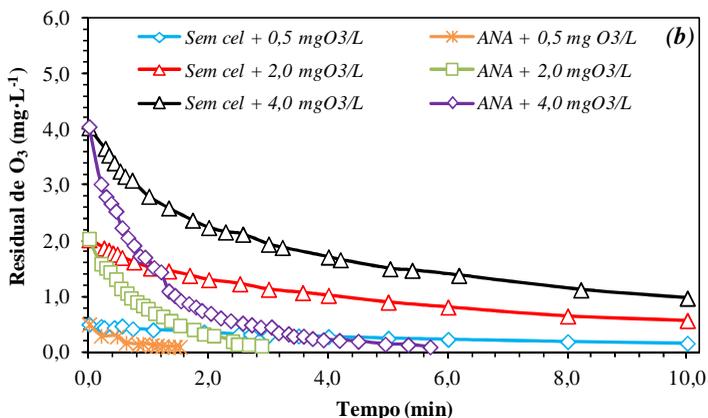
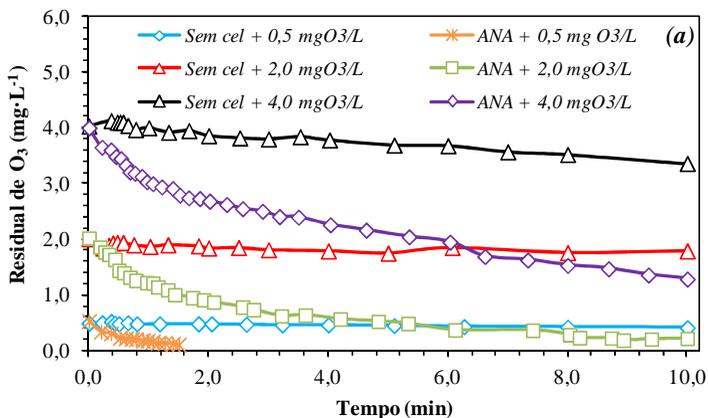
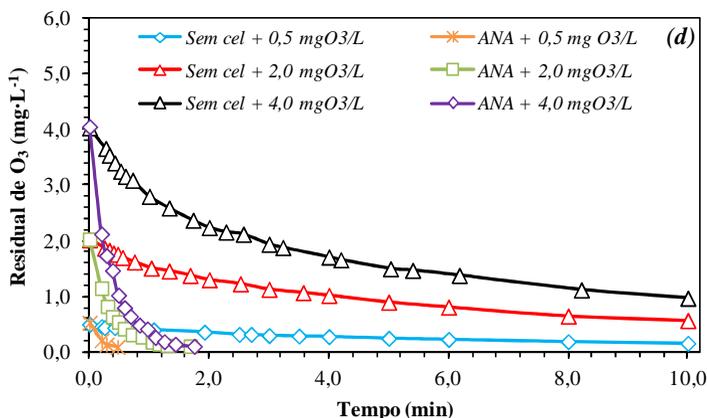
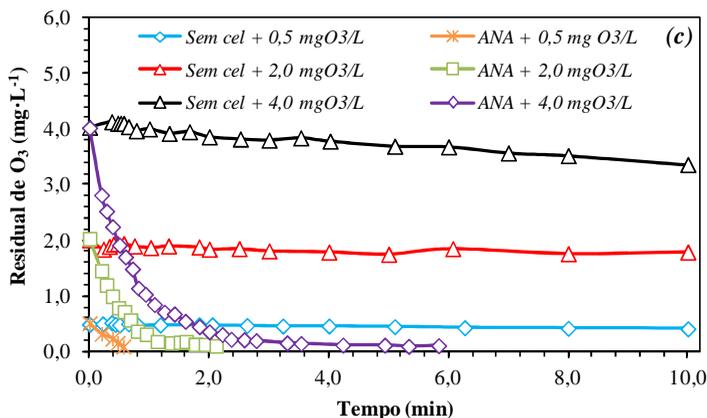


Figura 4.14. Cont...



Em condições idênticas de ozonização, os maiores decaimentos foram sempre observados para *A. flos-aquae* se comparado a *M. aeruginosa*. Este efeito pode ter sido causado pelo fato das células de *Anabaena* serem maiores (3,5 μm de comprimento x 2 μm de largura) que as de *Microcystis* (3 μm de diâmetro). Uma vez que a densidade de

células inicial foi equivalente para ambos os microrganismos, *A. flos-aquae* apresentaria uma maior carga orgânica a ser oxidada, tanto em termos de COD, quando os valores obtidos para *Anabaena* foram em média 90% maiores (Seção 4.2.1), como em relação aos constituintes orgânicos da parede celular. O aumento na dose de ozônio resultou em uma menor velocidade de decaimento, assim como maiores valores de ozônio residual. Como destacado por Park et al. (2001), a menor velocidade constante de decaimento para uma maior dose de ozônio pode ser relacionada ao consumo de uma maior quantidade de constituintes orgânicos por reação direta já na fase de demanda inicial de ozônio, uma vez que este está disponível em maior quantidade. Com o aumento da densidade de cianobactérias de $2,5 \times 10^5$ para $1,5 \times 10^6$ cel·mL⁻¹, completa decomposição do ozônio foi observada em menos de 3 min de tempo de contato considerando a maior dose de ozônio aplicada (4 mg·L⁻¹). Assim como para a água ultra-pura isenta de células, o pH alcalino favoreceu o maior decaimento do ozônio.

Na Figura 4.15 tem-se representado o efeito do pH no perfil de decaimento de ozônio comparativamente para as duas espécies de cianobactérias para uma mesma densidade celular ($2,5 \times 10^5$ cel·mL) e dose de ozônio (4 mg·L⁻¹). Para pH 6 em presença de *M. aeruginosa*, o residual de ozônio tende a ser superior para um tempo completo de exposição se comparado a água com *A. flos-aquae*. Em pH 8, ao contrário, o perfil de decaimento de ozônio é semelhante para ambas as espécies, embora a concentração residual de ozônio seja ligeiramente inferior para *A. flos-aquae*. A semelhança no perfil de decaimento para as duas espécies em pH 8, sugere uma rápida conversão do O₃ molecular em radicais [•]OH neste pH, com um ataque mais agressivo dos mesmos às células, o que é refletido na maior concentração de COD extracelular quantificada (Figura 4.16). A 0,5 min de tempo de contato, em que se observou proporcionalmente a maior concentração de COD liberado/formado das células (indicado pelo círculo na Figura 4.16), um valor inferior de residual de O₃ em pH 8 resultou em uma concentração de COD extracelular mais elevada, indicando que a atuação dos radicais [•]OH na liberação/formação de COD foi mais efetiva.

Figura 4.15. Perfil comparativo do decaimento de ozônio para *M. aeruginosa* (MIC) e *A. flos-aquae* (ANA) em função do pH ($2,5 \times 10^5$ cel·mL⁻¹; 4 mgO₃·L⁻¹). (a) pH 6; e (b) pH 8.

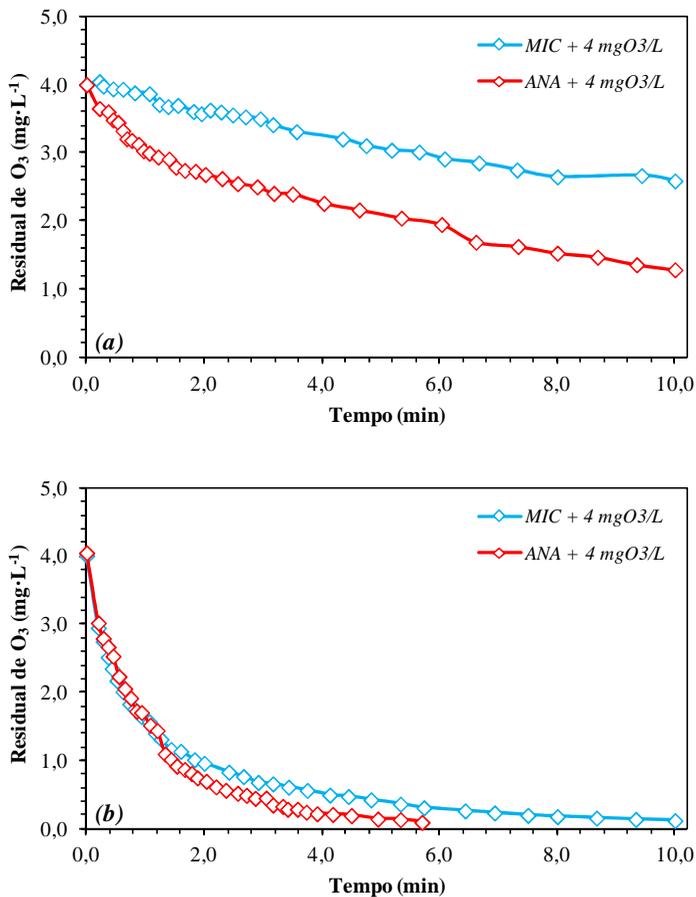
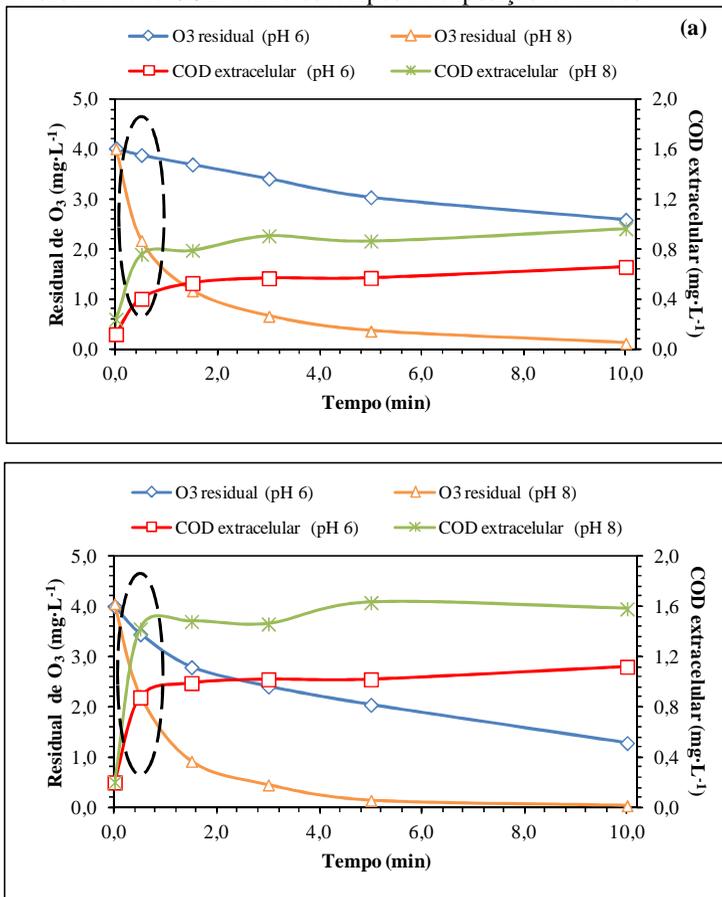


Figura 4.16. Perfil comparativo do decaimento de ozônio e da concentração de COD extracelular para *M. aeruginosa* (a) e *A. flos-aquae* (b) em função do pH ($2,5 \times 10^5$ cel·mL⁻¹; 4 mgO₃·L⁻¹). O círculo na figura indica a maior concentração liberada/formada de COD dentre os tempos de exposição avaliados.



A Tabela 4.4 sumariza os parâmetros de regressão derivados das análises de decaimento. Embora o modelo de pseudo-primeira ordem geralmente forneça um bom ajuste para dados experimentais

(R^2 normalmente $> 0,95$), algumas condições claramente exibiram dois regimes cinéticos. Os tempos de meia-vida variaram desde valores baixos como 0,21 min até 64 min, sendo estes valores mais acentuadamente elevados em pH 6 quanto maior a dose de ozônio aplicada. Em pH 8, esse comportamento em relação à meia-vida não foi observado. Em pH e densidade de células mais elevado, menores tempos de meia-vida foram observados.

Tabela 4.4. Constantes de velocidade aparente de pseudo-primeira-ordem (k) para decaimento de ozônio.

CB ⁽¹⁾	pH	Dose O ₃ (mg·L ⁻¹)	2,5x10 ⁵ cel·mL ⁻¹		1,5x10 ⁶ cel·mL ⁻¹	
			k (s ⁻¹)	T _{1/2} (min)	k (s ⁻¹)	T _{1/2} (min)
Água Milli-Q	6	0,5	3,52 x 10 ⁻⁴ (0,95) ⁽²⁾	32,85	3,52 x 10 ⁻⁴ (0,95)	32,85
		2,0	1,82 x 10 ⁻⁴ (0,78)	63,59	1,82 x 10 ⁻⁴ (0,78)	63,59
		4,0	3,17 x 10 ⁻⁴ (0,98)	36,48	3,17 x 10 ⁻⁴ (0,98)	36,48
Água Milli-Q	8	0,5	2,02 x 10 ⁻³ (0,99)	5,72	2,02 x 10 ⁻³ (0,99)	5,72
		2,0	2,38 x 10 ⁻³ (0,99)	4,86	2,38 x 10 ⁻³ (0,99)	4,86
		4,0	2,87 x 10 ⁻³ (0,97)	4,03	2,87 x 10 ⁻³ (0,97)	4,03
<i>M.</i> <i>aeruginosa</i>	6	0,5	6,57 x 10 ⁻³ (0,97)	1,76	9,85 x 10 ⁻³ (0,96)	1,17
		2,0	1,53 x 10 ⁻³ (0,94)	7,53	6,30 x 10 ⁻³ (0,97)	1,83
		4,0	8,17 x 10 ⁻⁴ (0,99)	14,15	2,10 x 10 ⁻³ (0,97)	5,50
	8	0,5	1,57 x 10 ⁻² (0,96)	0,73	1,36 x 10 ⁻² (0,98)	0,85
		2,0	1,18 x 10 ⁻² (0,99)	0,98	2,18 x 10 ⁻² (0,99)	0,53
		4,0	8,65 x 10 ⁻³ (0,98)	1,34	2,74 x 10 ⁻² (0,99)	0,42
<i>A.</i> <i>flos-aquae</i>	6	0,5	1,48 x 10 ⁻² (0,99)	0,78	4,56 x 10 ⁻² (0,96)	0,25
		2,0	4,68 x 10 ⁻³ (0,98)	2,49	3,19 x 10 ⁻² (0,99)	0,36
		4,0	1,75 x 10 ⁻³ (0,99)	6,60	2,04 x 10 ⁻² (0,99)	0,57
	8	0,5	1,71 x 10 ⁻² (0,95)	0,68	5,52 x 10 ⁻² (0,96)	0,21
		2,0	1,56 x 10 ⁻² (0,99)	0,74	3,81 x 10 ⁻² (0,99)	0,30
		4,0	1,30 x 10 ⁻² (0,99)	0,89	3,91 x 10 ⁻² (0,99)	0,30

⁽¹⁾ CB: cianobactérias; ⁽²⁾ Coeficientes de correlação (R^2) apresentados entre parênteses.

4.2.3.3 Modelo cinético de ordem n -ésima

Visando estabelecer uma melhor observação sobre o impacto do pH, do carbono orgânico e do ozônio residual sobre a cinética de decaimento do ozônio, uma lei de velocidade empírica generalizada foi construída para o conjunto de dados inteiros.

A Equação 3.11 (seção 3.9) foi ajustada por regressão não-linear para os quatro grupamentos de dados descritos na Tabela 4.5: conjunto de dados para água ultra-pura tamponada; conjunto de dados para *M. aeruginosa*; conjunto de dados para *A. flos-aquae*; e, finalmente, a combinação dos dados de *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae* em um único conjunto de dados. Os modelos forneceram um bom ajuste de dados ($R^2 = 0,87 - 0,92$). A decomposição do ozônio em água ultra-pura provou ser de segunda ordem com respeito ao ozônio dissolvido, enquanto a ordem de reação com relação à concentração de íons hidróxido foi igual a 0,53. Mizuno, Tsuno e Yamada (2007) desenvolveram um modelo cinético similar para descrever o decaimento do ozônio em água ultra-pura, tendo os autores também obtido uma cinética de segunda ordem com respeito ao ozônio dissolvido. A ordem de reação para os íons hidróxido (0,73) foi, no entanto, levemente maior ao obtido neste estudo. Este comportamento deve-se provavelmente ao fato de que o modelo de Mizuno, Tsuno e Yamada (2007) foi desenvolvido para uma faixa mais ampla de pH (4,0 a 7,8).

Tabela 4.5. Parâmetros estimados para determinar o comportamento do decaimento de ozônio.

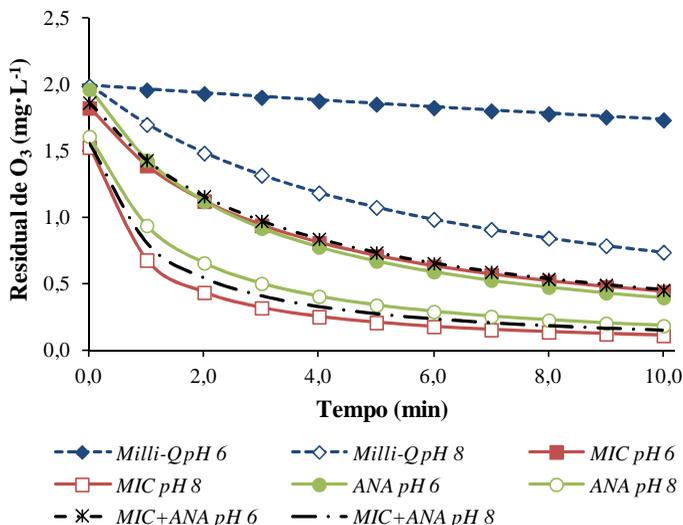
	Parâmetros estimados	Milli-Q $R^2 = 0,92$	MIC* $R^2 = 0,90$	ANA* $R^2 = 0,87$	MIC+ANA $R^2 = 0,88$
O ₃	n	2,00	2,02	2,08	2,04
k	k	131,50	37,60	2,46	13,85
Efeito do pH	m	0,53	0,34	0,18	0,28
Efeito COD_T	p	-	1,19	1,03	1,03

*MIC: *M. aeruginosa*; ANA: *A. flos-aquae*

Na presença de matéria orgânica algal (MOA), o modelo cinético indica que o decaimento do ozônio é sempre de segunda ordem para O_3 e de primeira ordem com relação ao COD. Em relação ao pH, as ordens de reação (0,18 - 0,34) foram menores do que as obtidas em água ultra-pura, o que indica que o impacto do pH sobre o decaimento do ozônio foi reduzido na presença de MOA. A reatividade de *M. aeruginosa* ($k = 37,6 \text{ s}^{-1}$) foi também superior àquela observada para *A. flos-aquae* ($k = 2,46 \text{ s}^{-1}$). Tais resultados indicam que os menores tempos de meia-vida observados quando da oxidação de *A. flos-aquae* foram causados pelo aumento da reatividade da MOA ao invés do aumento de COD promovido pelo maior tamanho das células de *A. flos-aquae* comparado a *M. aeruginosa*.

De forma a permitir uma comparação direta da reatividade do ozônio com as células de cianobactérias, os modelos preditivos de demanda imediata de ozônio e de decaimento foram utilizados para prever o perfil de decaimento de ozônio utilizando uma condição comum de ozonização ($\text{COD}_{\text{Total}} = 2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e dose de ozônio = $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) mantendo variáveis o pH e a espécie de cianobactéria. A Figura 4.17 indica que, para as mesmas condições (pH, dose aplicada e COD_T) o decaimento do ozônio seria semelhante para todos os conjuntos de dados a pH 6 e levemente superior para *M. aeruginosa* a pH 8, em decorrência de sua maior reatividade.

Figura 4.17. Curvas preditivas de decaimento de ozônio para água Milli-Q com ausência e presença de células de *M. aeruginosa*, *A. flos-aquae*, e *M. aeruginosa* + *A. flos-aquae* em pH 6 e 8 (dose de ozônio = $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; COD = $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). (MIC: *M. aeruginosa*; ANA: *A. flos-aquae*).



4.2.4 Formação de subprodutos da desinfecção a partir de células de cianobactérias

Diversos estudos têm avaliado quantitativamente a reatividade de algas e células de cianobactérias e seus metabólitos como precursores de subprodutos da desinfecção (PLUMMER; EDZWALD, 2001; HONG et al., 2008; EL-ATY et al., 2009; HUANG et al., 2009; ZAMYADI et al., 2012). A pré-ozonização de células de cianobactérias induz a liberação de compostos intracelulares que podem contribuir no conjunto de precursores dos subprodutos da desinfecção (assumindo que a pós-cloração é utilizada ao fim do tratamento). Para avaliar o potencial de formação de subprodutos a partir das células de *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae*, submetidas ou não a diferentes doses de ozônio, amostras

contendo densidade de células de $2,5 \times 10^5$ cel·mL⁻¹, em ambos os valores de pH (6 e 8), foram cloradas e submetidas à análises de THM e HAA.

Os resultados obtidos indicaram a formação predominante de clorofórmio (CHCl₃) e ácido dicloroacético (DCAA) nos ensaios com *M. aeruginosa* e de CHCl₃, DCAA e ácido tricloroacético (TCAA) para *A. flos-aquae* (Tabela 4.6). A legislação brasileira (Portaria 2.914) (BRASIL, 2011) preconiza um valor total de 100 µg·L⁻¹ para THM e 80 µg·L⁻¹ como valor máximo permitido como padrão de potabilidade. Os mesmos valores são adotados pela legislação canadense (CANADA, 2006; 2008). Os valores obtidos para a densidade de células estudada (250.00 cel·mL⁻¹) de até 38,4 e 62,7 µg·L⁻¹ de THM e 13,5 e 23,9 µg·L⁻¹ de HAA para *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae*, respectivamente, indicam que a presença das cianobactérias estudadas em águas superficiais poderiam, principalmente para o THM, aumentar a concentração final de subprodutos formados, dependendo da qualidade da água.

Um estudo realizado por Hong et al. (2008) indicou que a formação de THM e HAA a partir de cianobactérias é diretamente relacionada à composição bioquímica da célula. A formação de THM tende a ser maior que de HAA quando a proporção de lipídios na composição da célula é maior. A formação de HAA, por sua vez, é dependente da quantidade de proteínas. De acordo com os autores, a quantidade de proteínas é proporcionalmente maior em células de *M. aeruginosa* do que em células de *Anabaena sp.*, entretanto, as células de *Anabaena sp.* apresentam uma maior proporção de lipídios (HONG et al., 2008). Esta consideração poderia explicar a razão da maior formação de THM a partir das células de *A. flos-aquae* observada neste estudo. Em termos de formação de HAA, embora uma maior concentração deste subproduto tenha sido esperada para *M. aeruginosa* (maior conteúdo de proteína), concentrações mais elevadas de HAA foram obtidas para *A. flos-aquae*. Considerando-se a maior proporção de COD extracelular para *A. flos-aquae*, a maior concentração de material proteináceo disponível teria favorecido a formação de HAA. El-Aty et al. (2009) e Hong et al. (2008) destacam que a formação de subprodutos pode também ser relacionada ao conteúdo de clorofila-a da célula. Considerando que a concentração de clorofila-a é maior em células de *A. flos-aquae* do que

em células de *M. aeruginosa* (HUANG et al., 2009), a concentração total de THM após cloração para *A. flos-aquae* também poderia ser atribuída a este fator.

Tabela 4.6. Concentração total de THM (TTHM) e HAA (THAA) antes e após pré-tratamento com ozônio.

CB*	pH	Dose de O ₃ (mg·L ⁻¹)	T _{THM} (μg·L ⁻¹)	T _{HAA} (μg·L ⁻¹)
<i>M. aeruginosa</i>	6	-	0,0	0,0
		0,5	0,0	0,0
		2,0	0,0	3,4
		4,0	0,0	5,4
		-	6,3	2,9
	8	0,5	15,5	6,0
		2,0	25,5	11,4
		4,0	38,4	13,5
		-	-	-
CB	pH	Dose de O ₃ (mg·L ⁻¹)	T _{THM} (μg·L ⁻¹)	T _{HAA} (μg·L ⁻¹)
<i>A. flos-aquae</i>	6	-	0,0	0,0
		0,5	0,0	0,0
		2,0	1,6	3,3
		4,0	1,9	9,3
		-	22,8	14,4
	8	0,5	35,3	19,8
		2,0	41,6	21,9
		4,0	62,7	23,9
		-	-	-

* CB = cianobactérias

As doses de ozônio mais elevadas resultaram em maior formação de subprodutos, exceto para *Microcystis* a pH 6, em que nenhuma formação de THM pode ser detectada mesmo após a aplicação de ozônio a 4 mg·L⁻¹. Para *Anabaena*, somente nas dosagens de 2 e 4 mg·L⁻¹ foi possível verificar a formação de THM. Maior formação de THM e HAA foi observada para *Anabaena*, uma conclusão coerente se correlacionada à maior concentração de carbono orgânico extracelular quantificado após a ozonização para esta espécie. Embora maiores concentrações de COD tenderam a resultar em mais elevada formação

de subprodutos, pode-se considerar também que a reatividade destes foi tanto pH como organismo-dependente. Máximos rendimentos de $11 \mu\text{g}\cdot\text{mgC}^{-1}$ (TTHM = $38 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e $4 \mu\text{g}\cdot\text{mgC}^{-1}$ (THAA = $14 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) foram obtidos para *M. aeruginosa* em pH 8 e após dosagem de ozônio de $4 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Para *A. flos-aquae*, nas mesmas condições, foram obtidos rendimentos máximos de $16 \mu\text{g}\cdot\text{mgC}^{-1}$ (TTHM = $63 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e $6 \mu\text{g}\cdot\text{mgC}^{-1}$ (THAA = $24 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Huang et al. (2009) obtiveram um rendimento levemente inferior para células de *A. flos-aquae* comparado a *M. aeruginosa*, ao contrário do observado neste estudo, sugerindo que esta ocorrência estaria relacionada às características de menor hidrofobicidade e menor conteúdo de precursores de HAA (proteínas). Da mesma forma, a formação de TCAA para *M. aeruginosa*, não observada neste estudo, foi verificada por Huang et al. (2009) e atribuída a maior hidrofobicidade da MOA para esta espécie.

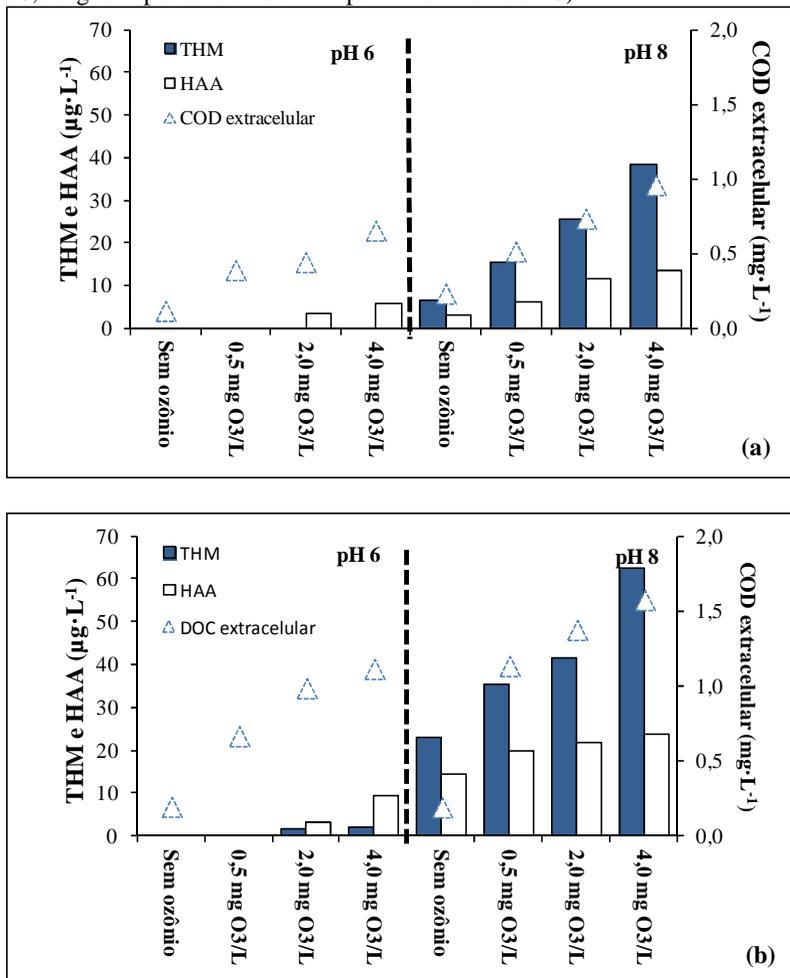
A razão TCAA/DCAA para *A. flos-aquae* variou de 0,14 a 0,21 em pH 6 e de 0,30 a 0,48 em pH 8, tendo-se observado menores razões entre esses compostos com o aumento da dose de ozônio. Esses resultados indicam que o COD produzido pelas células de *A. flos-aquae* foi mais propenso à formação de DCAA do que de TCAA (NGUYEN et al., 2005; EL-ATY et al., 2009). Este comportamento sugere menores níveis de carbono aromático em comparação aos níveis de aminoácidos no conteúdo total de MOE para esta espécie (HONG et al., 2008; HONG; WONG; LIANG, 2009). Conforme destacado por Huang et al. (2009), a maior proporção de material proteináceo na MOE intensifica a dominância de DCAA, podendo-se relacionar este comportamento a fração de nitrogênio presente na estrutura das proteínas. A Figura 4.18 apresenta o total de THM e HAA medido nas diferentes condições de dosagens de ozônio e pH. Uma relação com a concentração de COD extracelular foi também considerada.

A influência do pH na formação de THM pode ser associada a dois mecanismos. Por um lado, a ozonização em pH mais elevado resultou em uma maior concentração de COD extracelular (como mostrado nas Figuras 4.5 e 4.6), aumentando a disponibilidade de MOE. Por outro lado, é conhecido que em pH básico a reatividade do cloro livre com a matéria orgânica tende a aumentar, enquanto em pH ácido a reatividade

do cloro é reduzida. Portanto, o pH mais elevado aliado a concentração de COD pode resultar em maiores concentrações finais de subprodutos. Alguns estudos indicam que o aumento do pH favorece a formação de trihalometanos (IRIARTE et al., 2003; LIANG; SINGER, 2003; NAVALON; ALVARO; GARCIA, 2008; FANG et al., 2010a), mas pode desfavorecer a formação de TCAA (LIANG; SINGER, 2003), enquanto a formação de DCAA mostra-se independente do pH.

A partir de um mecanismo proposto por Reckhow e Singer, em 1985, Liang e Singer (2003) sugerem que THMs e TCAA possuem uma estrutura comum de precursor ($R-CO-CX_3$), sendo a formação da espécie do subproduto dependente da natureza do grupamento funcional R e do pH do meio. Em pH alcalino, a maior formação de THM e HAA é atribuída à hidrólise alcalina, a qual é aumentada com o aumento da concentração de OH^- (IRIARTE et al., 2003; LIANG; SINGER, 2003). Em pH ácido, para que TCAA seja formado, é necessário que R seja um grupamento funcional facilmente oxidável, caso contrário, a hidrólise deverá prevalecer, produzindo trihalometanos. Quando o grupo funcional é um grupo metil (ex. $CH_3-CO-CX_3$ - 1,1,1-trihaloacetona), compostos de THM e DCAA são formados, mas não TCAA (LIANG; SINGER, 2003). Como observado na Figura 4.18, em pH 6, a formação de clorofórmio não foi observada (*M. aeruginosa*) ou foi formado em pequenas concentrações (*A. flos-aquae*), obedecendo o mecanismo descrito. Considerando a formação de DCAA e $CHCl_3$, em média, a formação de DCAA correspondeu a 29% do total de subprodutos formados para *M. aeruginosa* e 27% para *A. flos-aquae* em pH 8. Ao contrário do considerado na literatura consultada, a concentração de TCAA (*A. flos-aquae*) aumentou com o aumento do pH de 6 para 8, assim como as concentrações de DCAA. O mesmo comportamento foi observado por Fang et al. (2010a) em estudos com *M. aeruginosa*.

Figura 4.18. Formação de THM e HAA após ozonização de *M. aeruginosa* (a) e *A. flos-aquae* (b) em pH 6 e 8 após 10 min de tempo de contato com 0,5, 2 e 4 mgO₃·L⁻¹ para 2,5x10⁵ cel·mL⁻¹ (condições de cloração: cloro residual de 1,0 ±0,2 mg·L⁻¹ após 24 horas de tempo de contato a 22 °C).



Uma avaliação comparativa do potencial de formação de subprodutos a partir de MOE e células de cianobactérias não foi considerada neste estudo. Entretanto, algumas observações sobre a MOE foram feitas em relação a subprodutos acumulados durante um longo período de tempo de cultivo de células, o que aumenta a representatividade destas descobertas em uma floração real (ZAMYADI et al., 2012). Outros resultados obtidos por Liu et al. (2011) em estudos de cloração com *M. aeruginosa* indicam que somente 22% do total de THM formado foi derivado da MOE em uma mistura incluindo células e MOE. Em estudos também com células de *M. aeruginosa*, Fang et al. (2010b) avaliaram a contribuição de MOE, MOI e células na formação de subprodutos. Os autores observaram que a MOE formou menores concentrações de clorofórmio e DCAA se comparado à MOI e células de cianobactérias, os quais apresentaram uma contribuição similar na concentração total de subprodutos formados. Outros estudos também demonstram que a formação de subprodutos a partir das células é maior que aquela obtida a partir da fração extracelular (HUANG; CHENG; CHENG, 2008; HUANG et al., 2009; YANG; GUO; SHEN, 2011).

Todos esses resultados confirmam que a pré-oxidação de células de cianobactéria pode impactar significativamente na formação de subprodutos da cloração em certas condições, especialmente quando a concentração de células é elevada. Entretanto, em muitos casos, o conhecimento do nível de precursores tem sido mostrado como o principal fator que afeta a formação total de subprodutos em águas naturais e o fator mais importante que limita o uso da pré-cloração (ZAMYADI et al., 2012). No caso da ozonização, as condições de tratamento podem melhorar a reatividade e o rendimento dos subprodutos a partir das células e do material extracelular. Quando considerada a pré-ozonização, a contribuição de células de cianobactérias no montante de precursores de THM e HAA deve ser cuidadosamente ponderada, especialmente se nenhum tratamento adicional é considerado após a pré-ozonização, ou se o tratamento empregado não é capaz de remover os precursores liberados pelas células.

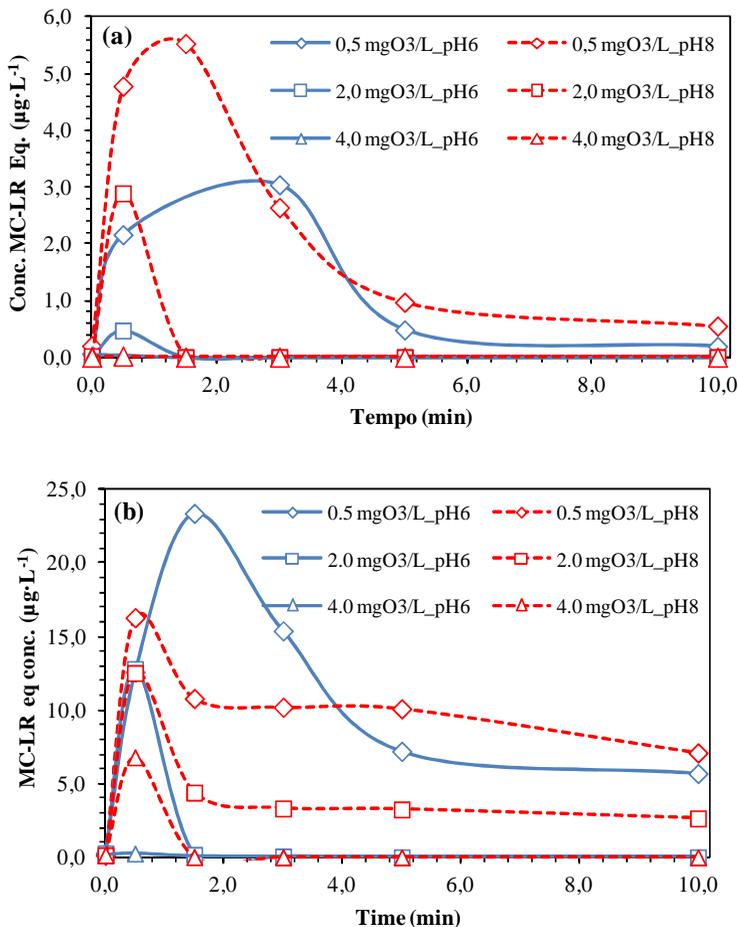
4.2.5 Efeito da ozonização na liberação e oxidação de toxina intracelular em células de *M. aeruginosa*

Os níveis de toxina total e extracelular obtidos após a exposição de células de *M. aeruginosa* ao ozônio, nas três diferentes doses descritas ao longo deste estudo, foram medidos de forma a avaliar o efeito do oxidante na liberação da toxina da célula em comparação com a degradação global de toxinas pelo ozônio.

A imediata alteração na estrutura celular de *M. aeruginosa* foi novamente verificada com o aumento da concentração de toxina extracelular após 30 s de tempo de contato em praticamente todas as condições. Este mesmo comportamento foi observado quando da avaliação da concentração de COD após exposição das células ao oxidante. O perfil de liberação e oxidação de MC-LR eq. durante o período de exposição das células ao processo de ozonização nas diferentes doses de ozônio, pH e densidade celular é apresentado na Figura 4.19. Para ambas as densidades, observa-se um aumento visível na quantidade de toxina extracelular após o início do tratamento. Nas condições avaliadas (exceto para $0,5 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ a $1,5 \times 10^6 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$), verificou-se que em pH 8 a concentração de toxina extracelular foi superior àquela observada para pH 6 para um mesmo tempo de contato (entre 0,5 e 1,5 min). Entretanto, considerando-se o perfil de oxidação em pH 6, um decaimento mais rápido na concentração remanescente de toxina extracelular foi observado para todas as condições avaliadas. A partir da dosagem de $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ em pH 6, completa remoção de toxina extracelular foi observada a partir de 1,5 min de tempo de contato, ou seja, logo após o pico de concentração de toxina liberada pela célula.

Em estudos visando a degradação de MC-LR dissolvida por ozonização, o mesmo comportamento de degradação de toxina em valores de pH mais baixos foi observado (ROSITANO; NICHOLSON; PIERONNE, 1998; SHAWWA; SMITH, 2001; AL MOMANI; SMITH; EL-DIN, 2008; AL MOMANI; JARRAH, 2010). Conforme destacado por Al Momani e Jarrah (2010), a degradação mais lenta a pH alcalino sugere que a microcistina apresenta uma maior afinidade com o ozônio molecular do que com os radicais hidroxila.

Figura 4.19. Perfil de liberação e oxidação de microcistinas. pH: 6 e 8; doses de ozônio: 0,5, 2 e 4 mg·L⁻¹; densidade celular: 2,5x10⁵ cel·mL⁻¹ (a) e 1,5x10⁶ cel·mL⁻¹ (b).



A menor eficiência de degradação de toxina em pH alcalino pode ser considerada sob dois aspectos: um menor potencial de oxidação do

ozônio molecular em pH alcalino (1,24 V) se comparado a pH ácido (2,70 V); e ao aumento na conversão do ozônio molecular em radicais hidroxila em meio alcalino (ROSITANO; NICHOLSON; PIERONNE, 1998). Al Monani e Jarrah (2010) indicam uma redução significativa na constante de velocidade de degradação de MC-LR e MC-RR quando do aumento de pH de 2 para 11. De pH 7 para pH 9 (valores mais próximos aos utilizados no presente estudo) a constante de velocidade (k) reduziu de $9,90 \text{ s}^{-1}$ para $1,58 \text{ s}^{-1}$ para MC-LR, e de $20,0 \text{ s}^{-1}$ para $5,58 \text{ s}^{-1}$ para MC-RR, considerando-se uma temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Maiores valores de k a pH mais baixos indicam a melhor reatividade do O_3 molecular na degradação das microcistinas, de acordo com os autores. Onstad et al. (2007) destacam que a menor oxidação de toxinas pelos radicais $\cdot\text{OH}$ pode ser associada à presença de matéria orgânica, neste caso o COD, que atuaria como sequestrador dos radicais hidroxila e reduziria o seu potencial oxidativo.

As concentrações remanescentes de toxina, total e extracelular, após 10 min de exposição ao ozônio nas condições avaliadas são apresentadas na Tabela 4.7. Para a densidade de $2,5 \times 10^5 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$, anteriormente a ozonização, a concentração de toxina extracelular foi considerada ausente com concentrações de toxina total médias de $8,1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 6) e $7,4 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 8). Com a exposição das células à dosagem de $0,5 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, uma concentração de ozônio residual $\leq 0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ passou a ser detectada a partir de 1,5 min de exposição, com o aumento imediato da concentração de toxina extracelular, como indicado na Figura 4.19. Após 10 min de exposição nesta dosagem, 96% da toxina total foi degradada a pH 6 e 92% a pH 8. A concentração semelhante de toxina total e extracelular indica que grande parte da toxina foi liberada e degradada, como observado por Daly, Ho e Brookes (2007) em experimentos com cloração. A partir da dose de $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, a completa degradação de microcistinas (total e extracelular) foi alcançada (Tabela 4.7) com maior efetividade quando em pH 6 (Figura 4.19).

Tabela 4.7. Ozônio residual e dados de degradação de microcistina após ozonização das células de *M. aeruginosa* em densidades de $2,5 \times 10^5$ e $1,5 \times 10^6$ cel·mL⁻¹, pH 6 e 8 e 10 min de tempo de contato (Dosagens: 0,5, 2 e 4 mgO₃·L⁻¹).

Tempo (min)	Residual de ozônio (mg·L ⁻¹) - pH 6							
	250.000 cel·mL ⁻¹				1.500.000 cel·mL ⁻¹			
0,0	0,0	0,5	2,0	4,0	0,0	0,5	2,0	4,0
0,5	0,0	0,3	2,1	3,9	0,0	0,3	1,6	3,0
1,5	0,0	0,2	1,6	3,7	0,0	0,2	0,8	2,6
3,0	0,0	0,1	1,4	3,4	0,0	0,1	0,6	2,2
5,0	0,0	0,1	1,3	3,0	0,0	0,0	0,3	1,6
10,0	0,0	0,0	0,9	2,6	0,0	0,0	0,2	1,1
Concentração de toxina (µg·L ⁻¹)								
Total	8,1	0,3 (96%)*	0 (100%)	0 (100%)	27,1	7,4 (73%)	0 (100%)	0 (100%)
Extracelular	0,0	0,2	0,0	0,0	0,2	5,7	0,0	0,0

Tempo (min)	Residual de ozônio (mg·L ⁻¹) - pH 8							
	250.000 cel·mL ⁻¹				1.500.000 cel·mL ⁻¹			
0,0	0,0	0,5	2,0	4,0	0,0	0,5	2,0	4,0
0,5	0,0	0,2	1,1	2,2	0,0	0,3	1,1	1,4
1,5	0,0	0,1	0,6	1,2	0,0	0,1	0,2	0,4
3,0	0,0	0,0	0,2	0,7	0,0	0,0	0,1	0,1
5,0	0,0	0,0	0,1	0,4	0,0	0,0	0,1	0,0
10,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Concentração de toxina (µg·L ⁻¹)								
Total	7,4	0,6 (92%)*	0 (100%)	0 (100%)	30,1	16,9 (44%)	3,7 (88%)	0 (100%)
Extracelular	0,0	0,6	0,0	0,0	0,2	7,1	2,6	0,0

* Porcentagem de degradação.

Os valores destacados em negrito referem-se as dosagens de ozônio (mg·L⁻¹).

Para a maior densidade de células, a exposição à dosagem de ozônio de 0,5 mg·L⁻¹ resultou em uma degradação de 73% e 44% de toxina total em pH 6 e 8, respectivamente, a partir da concentração inicial. Para esta mesma dosagem, verifica-se que, do montante total remanescente de toxinas em pH 6 (7,4 µg·L⁻¹) apenas 5,7 µg·L⁻¹ é extracelular, indicando que após a oxidação com dosagem de 0,5 mgO₃·L⁻¹ cerca de 1,7 µg·L⁻¹ permanece ainda como toxina intracelular. O mesmo foi observado em pH 8, em uma maior proporção, com cerca de 9,8 µg·L⁻¹ sendo quantificada como toxina intracelular. Com a dosagem de 2 mgO₃·L⁻¹ em pH 6, completa degradação de toxinas foi observada, ainda com um residual de ozônio de 0,2 mg·L⁻¹ após 10 min de tempo

de contato. Para pH 8, nesta mesma dosagem, ainda um residual de toxina total de $3,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($1,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ como toxina intracelular) foi determinado, tendo-se obtido uma remoção total, a partir da concentração inicial, de 88%. Um residual de ozônio $\leq 0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ foi detectado a partir de 3 min de tempo de contato. Com a dosagem de $4 \text{ mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, toda a toxina inicialmente quantificada foi degradada também a pH 8, com a decomposição completa do ozônio a 5 min de exposição. A baixa ou ausente detecção de toxinas em doses mais elevadas de ozônio sugere que a toxina foi degradada ao mesmo tempo em que foi liberada pela célula. Uma avaliação similar realizada por Daly, Ho e Brookes (2007) com a cloração de células de *M. aeruginosa*, demonstrou a necessidade de maiores dosagens de cloro para uma redução efetiva na concentração de microcistina total, semelhantes as avaliadas neste estudo, além de um também maior tempo de contato. Comparativamente ao cloro, o ozônio mostra-se, portanto, mais efetivo na degradação de microcistinas em um curto tempo de exposição e em menores dosagens, o que favorece o seu uso em relação ao cloro.

O perfil de decaimento do ozônio e de liberação e degradação de toxinas em ambos os valores de pH (6 e 8), são correlacionados nas Figuras 4.20 e 4.21, respectivamente, para a densidade de $1,5 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$. Como pode ser observado, um maior residual de ozônio é sempre observado em pH 6. Para a dose de ozônio mais elevada, no ponto em que se verificou a degradação total das toxinas, residuais de ozônio de 2,6 e $0,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ foram quantificadas para pH 6 e pH 8, respectivamente.

Figura 4.20. Perfil da liberação e degradação de microcistina e residual de ozônio em pH 6 (densidade: $1,5 \times 10^6$ cel·mL⁻¹). (a) 0,5 mgO₃·L⁻¹; (b) 2,0 mgO₃·L⁻¹; (c) 4,0 mgO₃·L⁻¹.

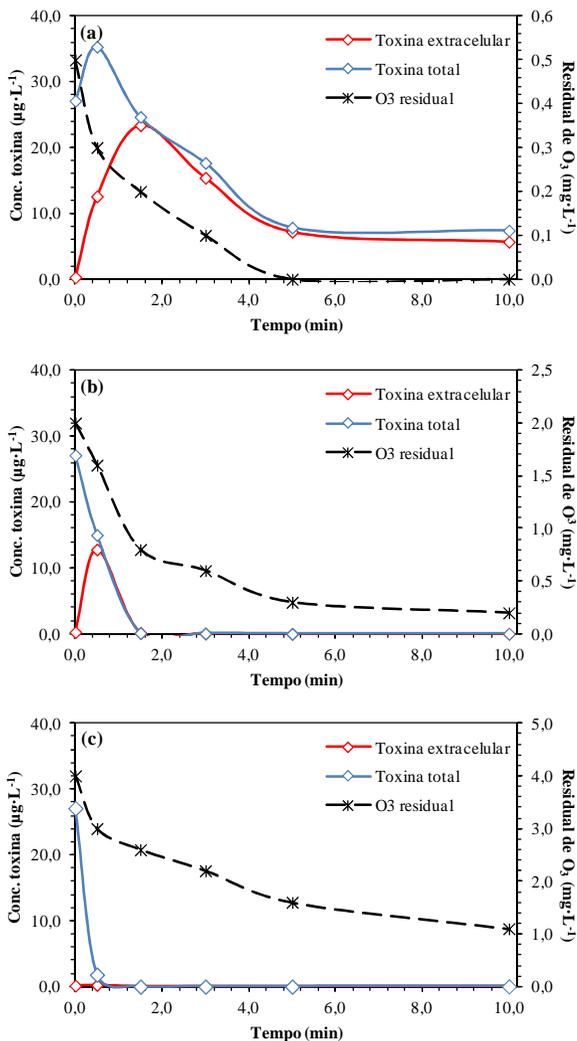
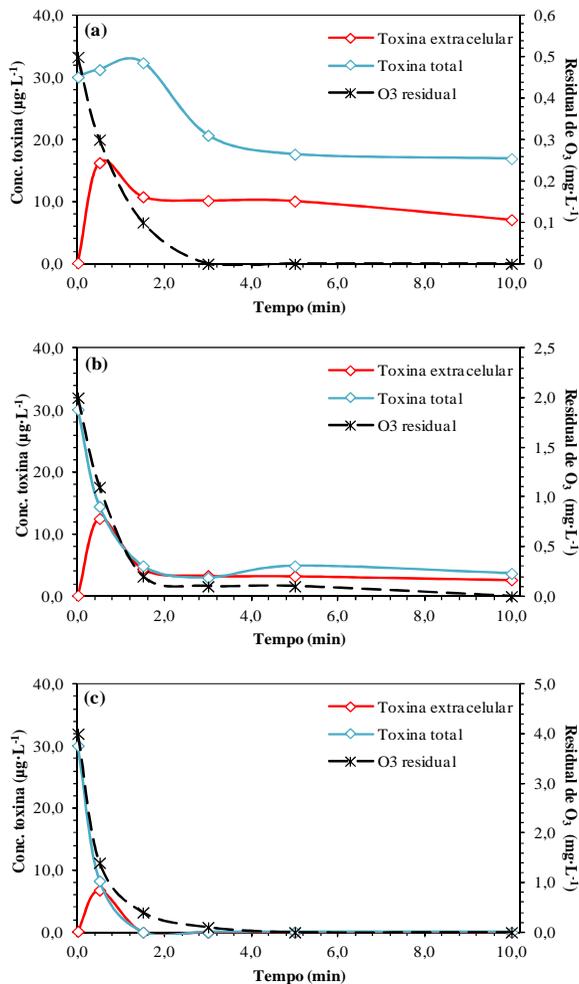


Figura 4.21. Perfil da liberação e degradação de microcistina e residual de ozônio em pH 8 (densidade: $1,5 \times 10^6$ cel·mL⁻¹). (a) 0,5 mgO₃·L⁻¹; (b) 2,0 mgO₃·L⁻¹; (c) 4,0 mgO₃·L⁻¹.



A reação de oxidação de microcistina com o ozônio é descrita como uma reação de segunda ordem, sendo de primeira ordem para cada um dos reagentes. Como indicado por Al Momani e Jarrah (2010), uma cinética de pseudo-primeira ordem pode ser considerada em relação à degradação da toxina, o que é justificado pelos curtos intervalos de tempo utilizados nos dados cinéticos e ao excesso de ozônio na solução (no mínimo 15 vezes a concentração de MC-LR eq.). Cinéticas de pseudo-primeira ordem foram também consideradas por Rodriguez et al. (2007) e Daly, Ho e Brookes (2007) em experimento com pré-cloração. Dessa forma, a taxa de reação pode ser descrita como:

$$\frac{-d[Tox]}{dt} = k_{ap} \times [Toxina]$$

onde, k_{ap} é a constante cinética de pseudo-primeira ordem para a degradação da toxina.

Em ensaios com cloração de células de cianobactérias, Daly, Ho e Brookes (2007) e Zamyadi et al. (2010) destacam que o aumento na concentração de toxina extracelular, logo após a exposição das células ao oxidante, sugere que a toxina intracelular é liberada da célula danificada em uma velocidade maior do que é degradada. Considerando essa premissa, procurou-se comparar a constante de liberação e de oxidação de toxina (total), plotando-se $\ln([\text{MC-LR eq.}]_{CT}/[\text{MC-LR eq.}]_0)$ versus CT. Os valores obtidos são indicados na Tabela 4.8 para a densidade de células de $1,5 \times 10^6 \text{ cel} \cdot \text{mL}^{-1}$, a qual permitiu uma melhor avaliação das constantes em virtude de possibilitar a quantificação de residuais de toxina por um período mais longo de tempo de contato. Como pode ser observado, exceto para a dosagem de $4 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ a pH 6, a constante de velocidade de liberação é maior do que a constante de velocidade de degradação da toxina. Esta relação corrobora com os autores citados, a respeito da velocidade de liberação e degradação da toxina intracelular. Em dosagem de $4 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ a pH 6, o maior valor da constante da oxidação em relação a constante de liberação de toxina sugere que esta é imediatamente oxidada após o contato das células com o ozônio, ainda dentro da célula.

Tabela 4.8. Constantes de reação de liberação e oxidação de MC-LR eq. total para densidade de células de $1,5 \times 10^6$ cel·mL⁻¹.

pH	O ₃ (mg·L ⁻¹)	k liberação de toxina		k oxidação (tox _T)			
		k (s ⁻¹)	k' (M ⁻¹ ·s ⁻¹)	k (s ⁻¹)	k' (M ⁻¹ ·s ⁻¹)		
6	0,5	1,54E-01	7,37E+03	(0,81)*	2,97E-02	1,42E+03	(0,84)
	2,0	7,60E-02	3,65E+03	(1,00)	2,65E-02	1,26E+03	(0,90)
	4,0	4,53E-03	2,17E+02	(1,00)	1,63E-02	7,84E+02	(0,85)
8	0,5	4,15E-01	1,99E+04	(1,00)	2,47E-02	9,60E+02	(0,82)
	2,0	1,03E-01	4,96E+03	(1,00)	1,50E-02	7,36E+02	(0,93)
	4,0	4,49E-02	2,15E+03	(1,00)	1,60E-02	7,68E+02	(0,99)

* Coeficientes de correção (R²)

Em relação ao pH, valores maiores de k são observados em pH 8 em termos de liberação de toxina da célula, o que indica uma ação mais agressiva do ozônio/radicais $\cdot\text{OH}$ na célula. O mesmo comportamento é observado quando avaliado em termos de COD extracelular (Seção 4.2.1). Em termos de oxidação, os valores de k , ao contrário, são maiores em pH 6, indicando uma maior eficiência de degradação das toxinas neste pH, em virtude da maior concentração de O₃ molecular. A relação entre a liberação e a oxidação das toxinas após exposição ao ozônio em todas as condições avaliadas é apresentada na Figura 4.22 e na Figura 4.23.

A presença de compostos orgânicos no meio é considerada um fator limitante no processo de ozonização devido a sua reação direta com o ozônio molecular ou indireta, através do sequestro dos radicais $\cdot\text{OH}$ formados. Globalmente, a taxa constante de reação dos radicais $\cdot\text{OH}$ com os compostos orgânicos, ou sequestradores, é maior do que a taxa constante de reação do O₃ molecular (CSÉFALVAY; NÖTHE; MIZSEY, 2007), uma vez que são moléculas com potencial oxidativo mais elevado e são menos seletivas. Por essa razão, o consumo de radicais $\cdot\text{OH}$ pelos sequestradores (ex. COD) tende a reduzir a eficiência de degradação do composto alvo pelos radicais hidroxila.

Figura 4.22. Perfil da liberação e degradação de microcistina em pH 6 e 8 durante os ensaios de ozonização (densidade: $2,5 \times 10^5$ cel·mL⁻¹). (a) $0,5$ mgO₃·L⁻¹; (b) $2,0$ mgO₃·L⁻¹; (c) $4,0$ mgO₃·L⁻¹.

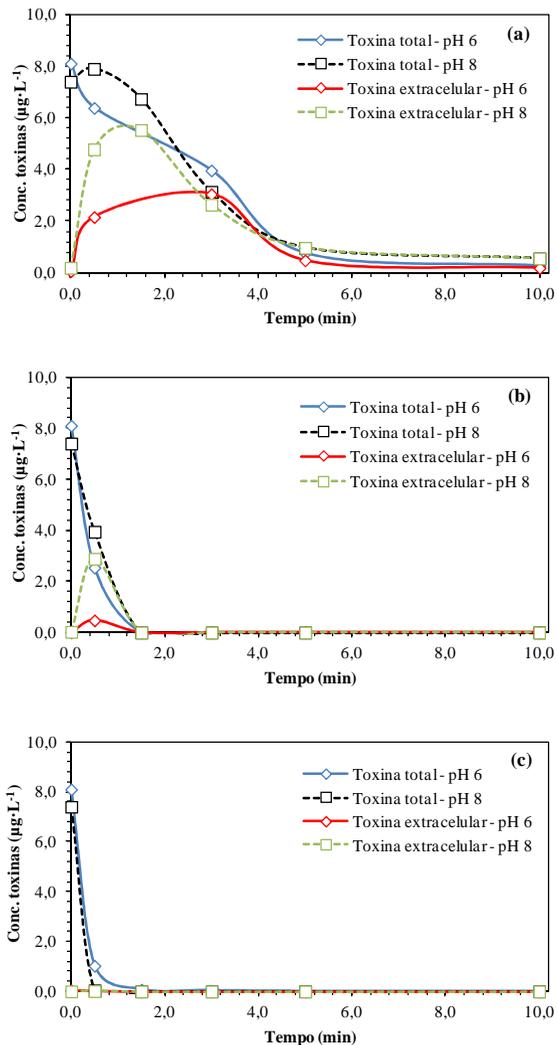
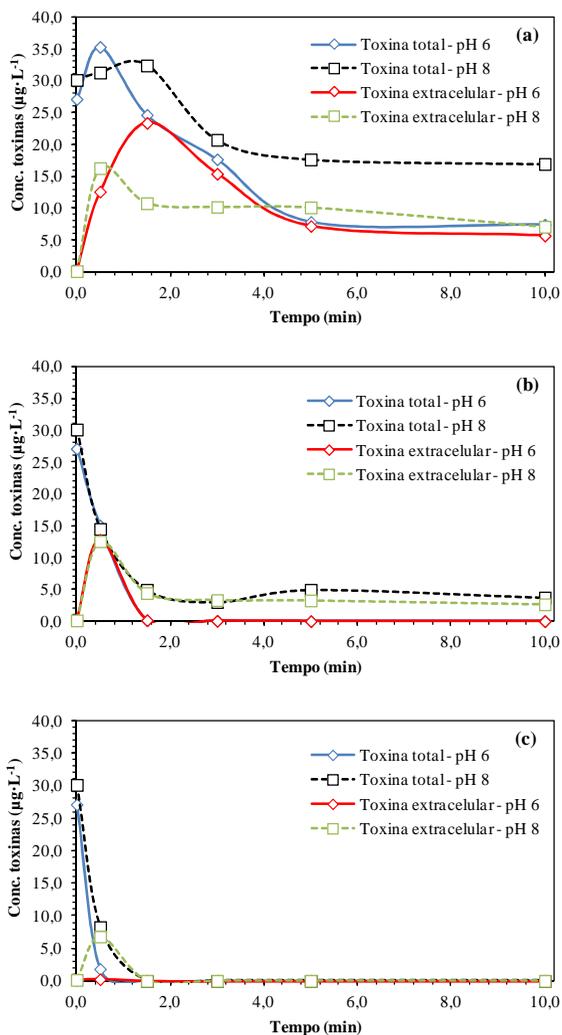
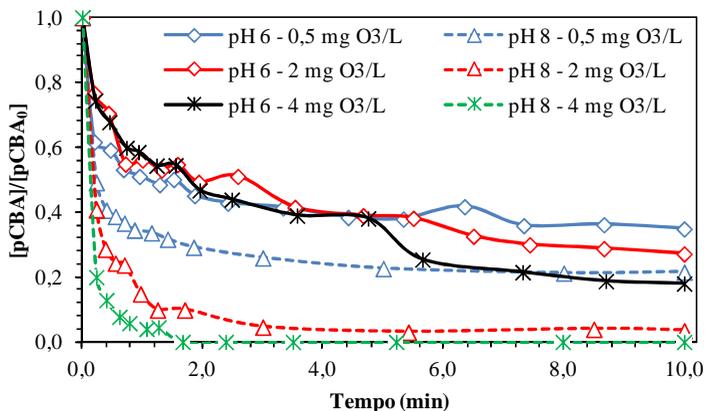


Figura 4.23. Perfil da liberação e degradação de microcistina em pH 6 e 8 durante os ensaios de ozonização (densidade: $1,5 \times 10^6$ cel·mL⁻¹). (a) 0,5 mgO₃·L⁻¹; (b) 2,0 mgO₃·L⁻¹; (c) 4,0 mgO₃·L⁻¹.



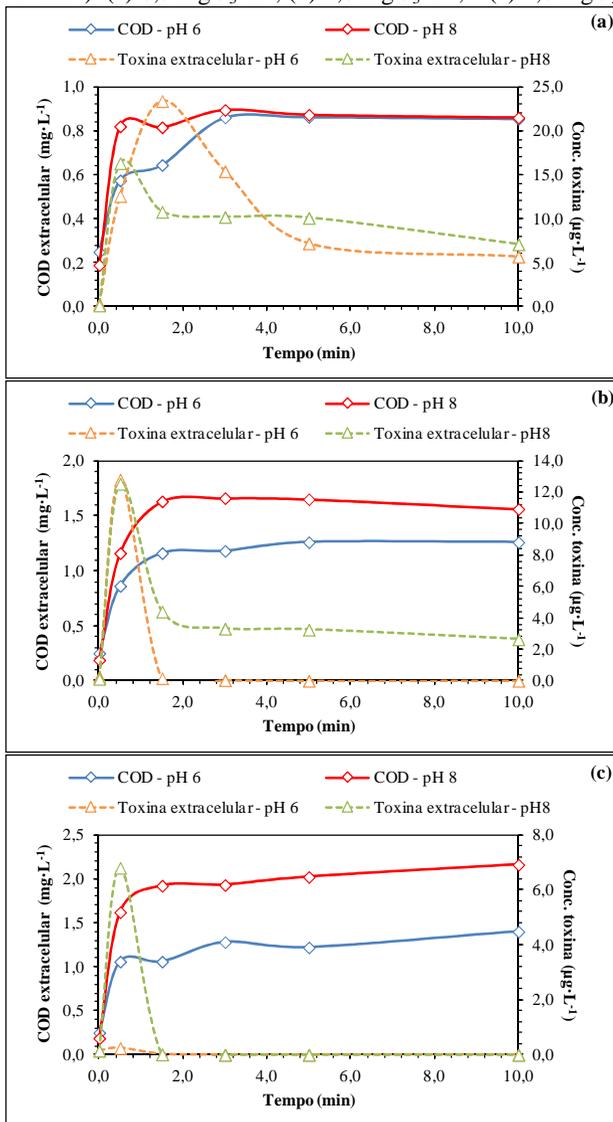
A formação de radicais $\cdot\text{OH}$ em função do pH e da dose de ozônio na presença de células de *M. aeruginosa* ($2,5 \times 10^5 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$) é observada a partir do decaimento da concentração de pCBA em relação ao tempo de exposição (Figura 4.24). Em pH 6 o decaimento da concentração de pCBA é menos expressivo, mesmo em doses mais elevadas. A pH 8, o aumento na dose de ozônio resulta em um decaimento mais intenso na concentração de pCBA, o que sugere a elevada formação de radicais.

Figura 4.24. Oxidação de pCBA durante o processo de ozonização com células de *M. aeruginosa* ($2,5 \times 10^5 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$).



Um exemplo do perfil de oxidação de microcistina em função do conteúdo de COD extracelular é apresentado na Figura 4.25 em relação à densidade de células de $1,5 \times 10^6 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Figura 4.25. Relação entre COD extracelular e toxina (liberação e oxidação) ($1,5 \times 10^6$ cel. \cdot mL $^{-1}$). (a) $0,5$ mgO $_3$ \cdot L $^{-1}$; (b) $2,0$ mgO $_3$ \cdot L $^{-1}$; e (c) $4,0$ mgO $_3$ \cdot L $^{-1}$.



De forma geral, o pico de concentração de toxina liberada pela célula ocorre no mesmo ponto em que se verifica a maior liberação/formação de COD, com a posterior redução da concentração de toxinas. Em relação ao COD extracelular, como comentado em seção anterior, este tende a aumentar com o aumento da dosagem, sendo este comportamento mais expressivo em pH 8. Em pH 6, para as dosagens mais elevadas, a concentração de COD foi similar (aproximadamente $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Em pH 8, ao contrário, um aumento constante de COD extracelular é observado quanto maior a dose de ozônio empregada. Este comportamento sugere que todo o COD intracelular liberado pela célula seja obtido pela ação do ozônio molecular em conjunto com radicais hidroxila, e que um aumento nesta concentração pode ser associado à reação direta dos radicais hidroxila (pH 8) com os constituintes da célula. Do mesmo modo, a maior concentração de COD liberado/formado atuaria como sequestrador dos radicais hidroxila, reduzindo a sua concentração no meio, com menor atuação na degradação da toxina, como é claramente observado na Figura 4.25 para as dosagens de 0,5 e 2 $\text{mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$. Para dosagens mais elevadas, mesmo tendo-se maior concentração de COD, portanto, maior consumo de radicais, o excesso de radicais $\cdot\text{OH}$ é capaz de promover a degradação da toxina. A pH 6, a reação direta do ozônio com o carbono ou a sua decomposição natural não influenciou na degradação da toxina, tendo-se verificado sempre um residual de ozônio ao final do período de oxidação para as dosagens mais elevadas (Figura 4.20). A formação mais elevada de radicais $\cdot\text{OH}$ (Figura 4.24) e a ausência de residual mesmo em dosagem de 4 $\text{mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 4.21) confirmaria a contínua reação entre os radicais $\cdot\text{OH}$ e o COD extracelular ou com o próprio ozônio molecular.

Miao e Tao (2009) avaliaram diferentes concentrações de COD (0 a 4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e observaram uma redução significativa na degradação de MC-RR, sendo esta redução maior quanto maior a concentração de COD. Menores valores de residual de ozônio foram observados quanto maior a concentração de COD. O mesmo comportamento foi observado por Shawwa e Smith (2001) que destacam a competição entre a matéria orgânica e a MC-LR pela reação com o ozônio, visto a necessidade de uma maior dosagem de ozônio para a oxidação da toxina em níveis

inferiores ao limite de detecção quando do aumento da concentração de COD.

Os resultados obtidos com a pré-ozonização dos cultivos laboratoriais indicam que o ozônio, mesmo em reduzidas dosagens, apresenta uma elevada capacidade de danos às cianobactérias estudadas. A liberação de compostos intracelulares no início do tratamento sugere reações imediatas entre as células e as moléculas de ozônio, com a perda imediata de viabilidade, mas com a manutenção, na maioria das condições avaliadas, da estrutura celular, indicando que uma dose inicial de ozônio de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ seria suficiente para induzir a inativação das células. Em termos de concentração de COD, essa dose inicial baixa garantiria que o COD extracelular quantificado seria oriundo exclusivamente dos constituintes orgânicos intracelulares liberados da célula e não da formação de COD pelas reações ozônio/célula. Em termos de liberação e oxidação de toxinas, todas as variáveis, dose, pH e densidade de células influenciaram no potencial oxidativo do ozônio, sendo o pH considerado a variável mais importante, devido a obtenção de uma maior eficiência de degradação desses metabólitos a pH 6, o que indica uma maior afinidade da microcistina com o ozônio molecular. A maior propensão de formação de subprodutos da desinfecção após a reação do ozônio com as células indica ser importante considerar barreiras para a remoção dos precursores formados e que o pH é uma variável importante no processo, visto que em pH alcalino a formação de THM e HAA foi muitas vezes superior a formação destes mesmos compostos a pH 6. Considerando todas as variáveis empregadas, pode-se indicar que as melhores condições operacionais foram obtidas a pH 6 e dose de ozônio intermediária, de $2 \text{ mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$, visto que a degradação da toxina nestas condições foi completa mesmo para a maior densidade de células e que a formação de subprodutos da cloração foi reduzida.

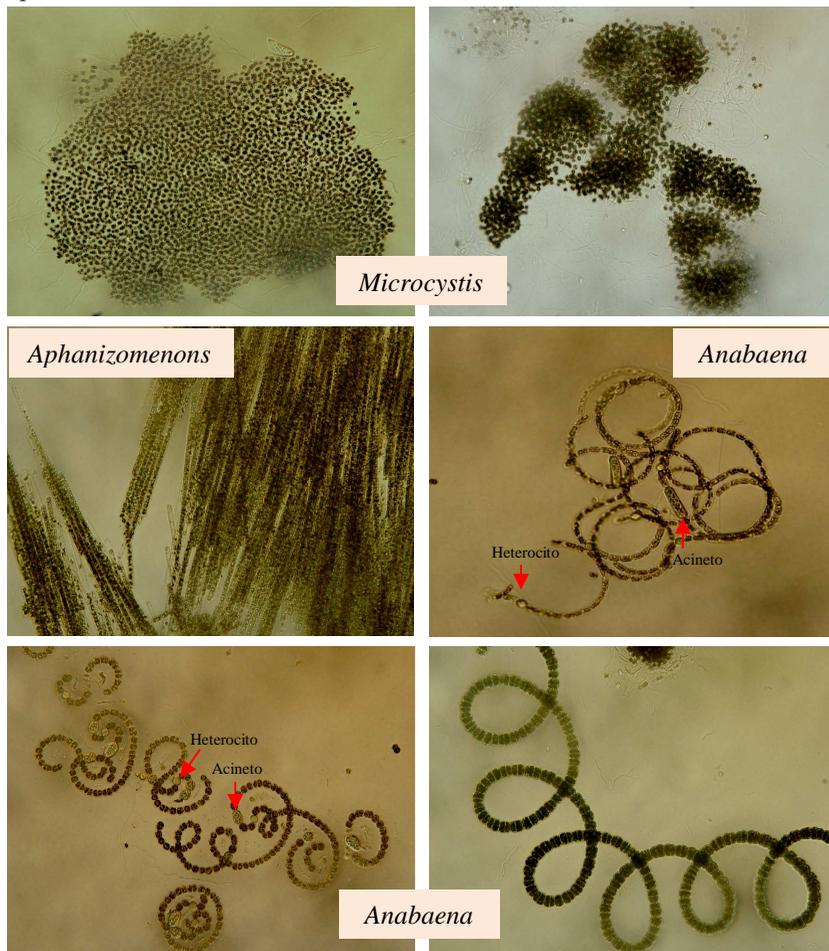
4.3 APLICAÇÃO DO OZÔNIO EM FLORAÇÃO NATURAL DE CIANOBACTÉRIAS

A ação do ozônio nas células de cianobactérias e sua eficiência na degradação de toxinas foram igualmente avaliadas para uma água natural com floração de cianobactérias. As amostras foram coletadas na Baía Missisquoi entre os meses de junho e setembro de 2011. Durante este período de floração, em que os ensaios foram realizados, foi identificada a presença dos gêneros de cianobactérias *Microcystis*, *Anabaena*, *Pseudanabaena* e *Aphanizomenon* (Figura 4.26). Durante o período de floração no manancial, observou-se a dominância alternada dos gêneros *Microcystis* e *Anabaena* sobre os demais gêneros. Como encontrada normalmente em ambientes naturais, a cianobactéria *Microcystis* apresentou-se na sua grande maioria como colônias de células, em diferentes formatos, com poucas células isoladas sendo observadas.

Nas seções a seguir serão apresentados os resultados obtidos em relação ao perfil de decaimento do ozônio, ao efeito do oxidante na liberação de compostos intracelulares (COD), aos efeitos sobre a turbidez, integridade celular, formação de subprodutos da desinfecção e degradação de toxinas. Procurar-se-á relacionar os dados obtidos nesta etapa com aqueles verificados nos ensaios com cultivo laboratorial de *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae*.

Devido à impossibilidade de determinação quantitativa e qualitativa das amostras em termos de gênero e número de cianobactérias, de forma a determinar um valor inicial de células como nos ensaios precedentes, optou-se por realizar as avaliações em termos de turbidez. A seguir, serão apresentados os resultados obtidos para valores iniciais de turbidez de 15, 25, 45 e 65 uT e dosagens de ozônio de 2, 3, 4 e 5 mgO₃·L⁻¹.

Figura 4.26. Gêneros de cianobactérias encontrados nas amostras de água superficial utilizadas nos ensaios de ozonização. (visualização em microscópio óptico em 400 X).



4.3.1 Impactos sobre o decaimento de ozônio

Um total de oito condições (turbidez x dose de O_3) foram avaliadas para as amostras de água superficial. Devido à oscilação natural na variedade e quantidade de organismos durante o período de floração da Baía Missisquoi, a quantificação de microrganismos, tanto em termos de número de células quanto de gênero, não foram proporcionais com o aumento da turbidez, visto que as coletas foram realizadas em dias distintos. Apesar de a maior turbidez avaliada ter sido de 65 uT, o número de células para esta condição ($502.840 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi inferior àquela verificada para a turbidez de 45 uT ($855.280 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$). Ensaio prévios com amostra bruta coletada do manancial foram realizados. No entanto, devido a elevada turbidez da água in natura (acima de 1.000 uT), a avaliação do processo oxidativo foi afetado e, por esta razão, optou-se por diluir a amostra bruta em água ultra-pura, até que fosse atingida a turbidez inicial desejada (entre 15 e 65 uT). Em termos de pH, após a diluição as amostras apresentaram valores entre 6,05 (15 uT) e 6,80 (65 uT), não tendo sido realizada qualquer correção deste valor.

As constantes de pseudo-primeira ordem para as condições avaliadas quanto ao decaimento do ozônio são indicadas na Tabela 4.9, assim como a dose imediata e tempo de meia-vida. Como observado nos ensaios com células isoladas, a velocidade de decaimento é sempre maior para menores doses de ozônio, assim como os tempos de meia-vida. O perfil gráfico do decaimento de ozônio nas condições avaliadas é indicado na Figura 4.27 (15 uT), Figura 4.28 (25 uT), Figura 4.29 (45 uT) e Figura 4.30 (65 uT).

Tabela 4.9. Constantes de decaimento, tempo de meia vida e demanda imediata de ozônio para as condições avaliadas com amostra natural de floração de cianobactérias.

Turbidez (uT)	Dose O ₃ (mg·L ⁻¹)	<i>k</i> (s ⁻¹)	T _{1/2} (min)	D _{imediate} (mg·L ⁻¹)
15	2	3,40E-03 (0,98)*	3,40	0,62
	3	2,07E-03 (0,99)	5,59	0,82
25	2	9,33E-03 (0,99)	1,24	0,88
	5	3,89E-03 (0,99)	2,97	1,06
45	2	9,13E-03 (0,99)	1,27	0,18
	4	3,10E-03 (0,98)	3,72	0,47
65	3	1,11E-02 (0,99)	1,04	0,82
	5	4,56E-03 (0,98)	2,54	0,81

* Coeficientes de correlação (R²)

Figura 4.27. Curvas de decaimento de ozônio em água natural com turbidez de 15 uT (160.694 cel·mL⁻¹; pH 6,05; 2 e 3 mgO₃·L⁻¹).

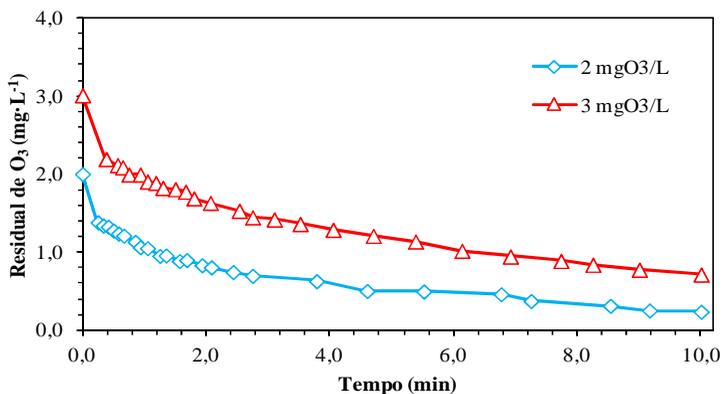


Figura 4.28. Curvas de decaimento de ozônio em água natural com turbidez de 25 uT ($218.550 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$; pH 6,79; 2 e 5 $\text{mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$).

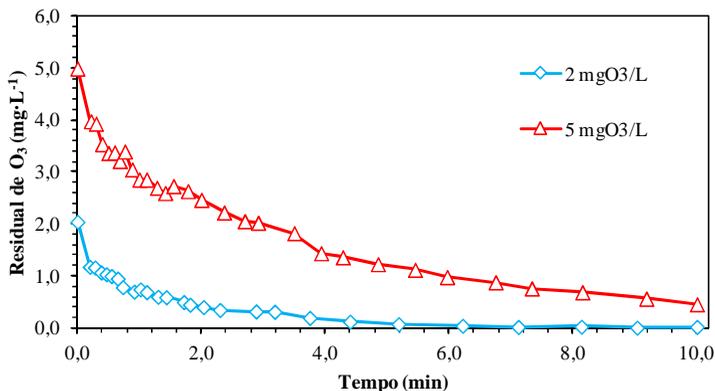


Figura 4.29. Curvas de decaimento de ozônio em água natural com turbidez de 45 uT ($855.280 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$; pH 6,72; 2 e 4 $\text{mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$).

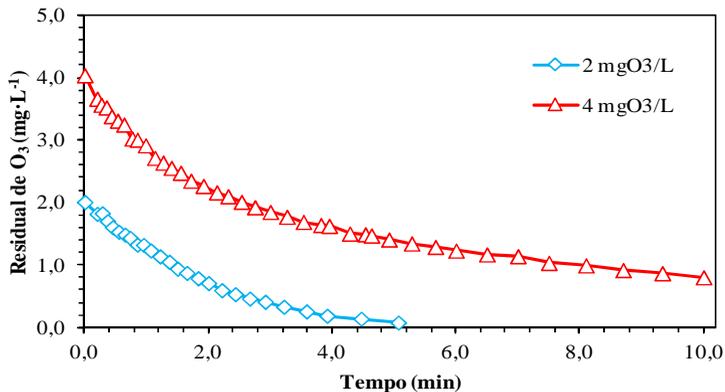
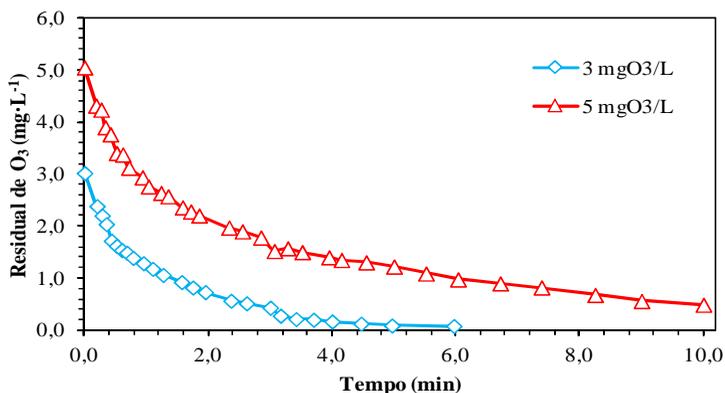


Figura 4.30. Curvas de decaimento de ozônio em água natural com turbidez de 65 uT ($502.840 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$; pH 6,80; 3 e $5 \text{ mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$).



Com o objetivo de fazer uma comparação entre os ensaios com células isoladas e amostra natural, são indicados na Tabela 4.10 valores referentes à constante de decaimento, demanda inicial de ozônio e tempo de meia-vida para a dosagem de $2 \text{ mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ e densidade de células de *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae* de $2,5 \times 10^5 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ (pH 6) e turbidez para água superficial de 25 uT (número de células mais próximo aos ensaios com células isoladas). Uma maior velocidade de decaimento foi observada quando da avaliação da amostra natural, assim como um maior valor de demanda imediata, a qual pode ser associado à presença de outros constituintes orgânicos presentes na água, mesmo após a diluição em água ultra-pura. Do montante de células quantificadas na amostra natural, nesta condição de turbidez, as maiores proporções foram observadas para os gêneros *Microcystis* (37,6%) e *Anabaena* (31,4%). A presença de outras cianobactérias filamentosas (*Aphanizomenon* e *Pseudanabaena*) teria também contribuído para um decaimento mais rápido de ozônio na amostra natural. O perfil de decaimento do ozônio nas condições mencionadas é indicado na Figura 4.31, tendo-se um residual de ozônio inferior a $0,1 \text{ mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ para a amostra natural já a 5,6 min de exposição. Em termos de CT, menores

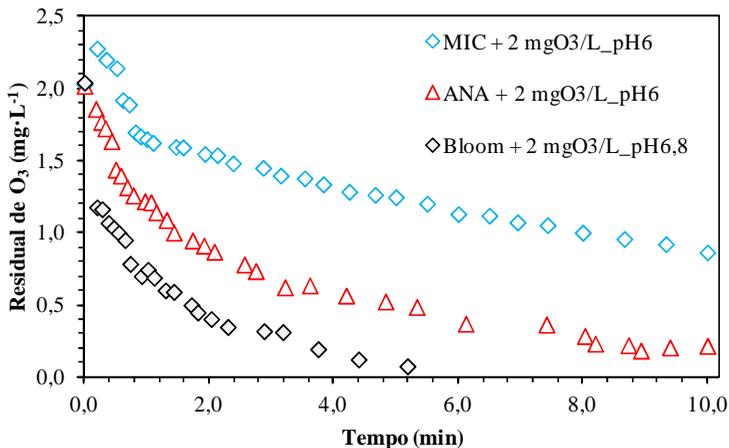
valores foram observados para a água natural, podendo-se estabelecer a seguinte relação: $CT_{\text{Bloom}} < CT_{\text{ANA}} < CT_{\text{MIC}}$.

Tabela 4.10. Constantes de decaimento, tempo de meia-vida e demanda imediata de ozônio para ensaios de pré-oxidação com células isoladas de *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae* e floração natural (dose: $2 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$).

Amostra	$k \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$T_{1/2} \text{ (min)}$	$D_{\text{imediata}} \text{ (mg} \cdot \text{L}^{-1}\text{)}$
<i>M. aeruginosa</i>	1,53E-03	7,53	0,07
<i>A. flos-aquae</i>	4,68E-03	2,47	0,25
Bloom*	9,33E-03	1,24	0,88

*Floração de cianobactérias

Figura 4.31. Curvas de decaimento de ozônio para ensaios com células isoladas de *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae*, e floração natural (dose: $2 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$).



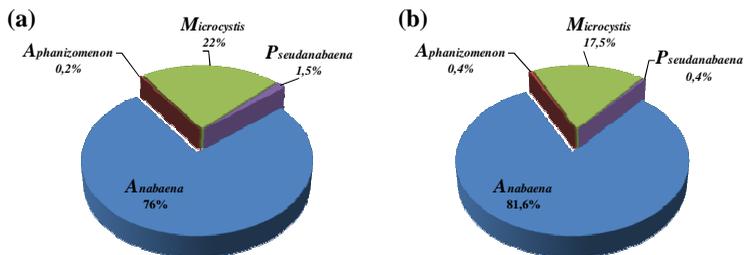
4.3.2 Efeito da ozonização na quantificação de células de cianobactérias, liberação de COD e turbidez

4.3.2.1 Avaliação da viabilidade celular após ozonização

Nos ensaios de ozonização com as amostras de água natural, a remoção de células se comportou de forma aleatória e diferentemente daquela observada quando dos ensaios com células isoladas em cultivo laboratorial. Nas Figuras 4.32 a 4.39 têm-se representado graficamente a proporção de células de cada gênero para cada uma das condições avaliadas antes e após a ozonização. Os valores de remoção indicados nas figuras foram calculados em função do número absoluto e não das proporções representadas nos gráficos. A susceptibilidade de cada gênero às diferentes dosagens e valores de turbidez pode ser relacionada à proporção deste na amostra. De forma geral, os gêneros *Aphanizomenon* e *Pseudanabaena* foram mais susceptíveis ao ozônio, com maiores remoções em relação ao número inicial de células. A maior ou menor vulnerabilidade do gênero ao ozônio pode ser relacionada à fase de crescimento das cianobactérias encontradas nos diferentes dias de amostragem. Comportamento semelhante em relação à elevada proporção de células após oxidação foi observado por Zamyadi et al. (2012b) em estudo de pré-cloração de células provenientes da Baía Missisquoi.

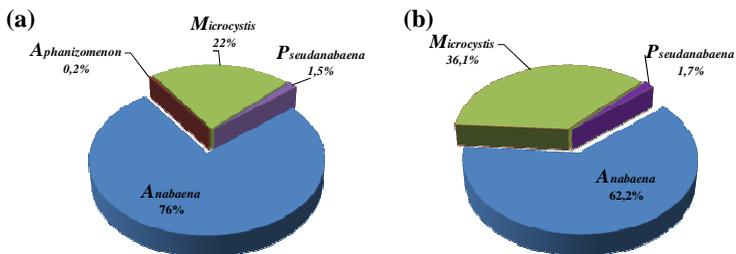
Em algumas ocasiões, principalmente para *Microcystis* e *Anabaena*, verificou-se o aumento no número de células após a ozonização, o que pode ser atribuído ao fato do ozônio ter promovido o desmembramento das colônias em células isoladas para a *Microcystis* e a quebra do tricoma na junção das células vegetativas adjacentes para *Anabaena*. A contagem de células agregadas em colônia pode subestimar a quantificação real do número de células. Para gêneros filamentosos, como a *Anabaena*, a separação das células do tricoma pode induzir, ao contrário, a uma superestimação do número de células, caso a contagem seja realizada por número médio de células por tricoma.

Figura 4.32. Proporção dos quatro gêneros de cianobactérias na amostra (a) antes e (b) após a ozonização (10 min) - 15 uT e 2 mgO₃·L⁻¹.



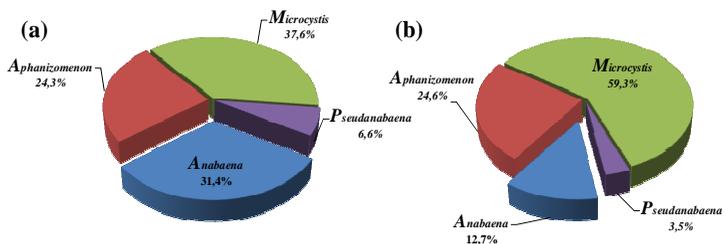
Remoção: 25% *Microcystis*; 73% *Pseudanabaena*

Figura 4.33. Proporção dos quatro gêneros de cianobactérias na amostra (a) antes e (b) após a ozonização (10 min) - 15 uT e 3 mgO₃·L⁻¹.



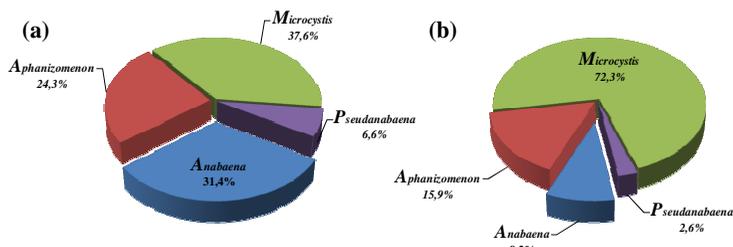
Remoção: 100% *Aphanizomenon*

Figura 4.34. Proporção dos quatro gêneros de cianobactérias na amostra (a) antes e (b) após a ozonização (10 min) - 25 uT e 2 mgO₃·L⁻¹.



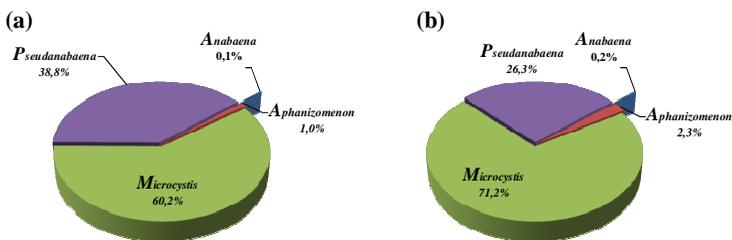
Remoção: 60,9% *Anabaena*; 1,7% *Aphanizomenon*; 49% *Pseudanabaena*

Figura 4.35. Proporção dos quatro gêneros de cianobactérias na amostra (a) antes e (b) após a ozonização (10 min) - 25 uT e 5 mgO₃·L⁻¹.



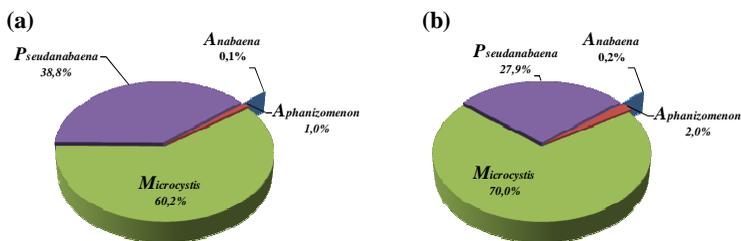
Remoção: 25,4% *Anabaena*; 43,4% *Aphanizomenon*; 65,7% *Pseudanabaena*

Figura 4.36. Proporção dos quatro gêneros de cianobactérias na amostra (a) antes e (b) após a ozonização (10 min) - 45 uT e 2 mgO₃·L⁻¹.



Remoção: 23,4% *Microcystis*; 56,1% *Pseudanabaena*

Figura 4.37. Proporção dos quatro gêneros de cianobactérias na amostra (a) antes e (b) após a ozonização (10 min) - 45 uT e 4 mgO₃·L⁻¹.



Remoção: 27,9% *Microcystis*; 65,4% *Pseudanabaena*

Figura 4.38. Proporção dos quatro gêneros de cianobactérias na amostra (a) antes e (b) após a ozonização (10 min) - 65 uT e 3 mgO₃·L⁻¹.

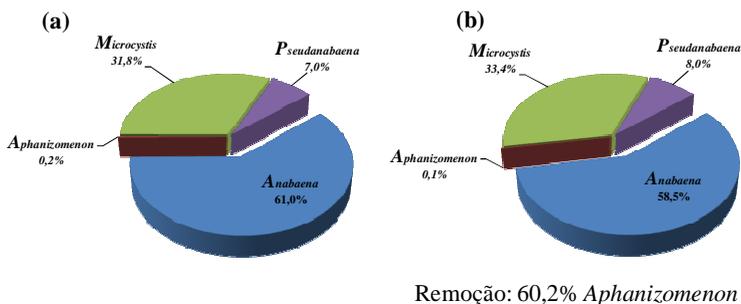
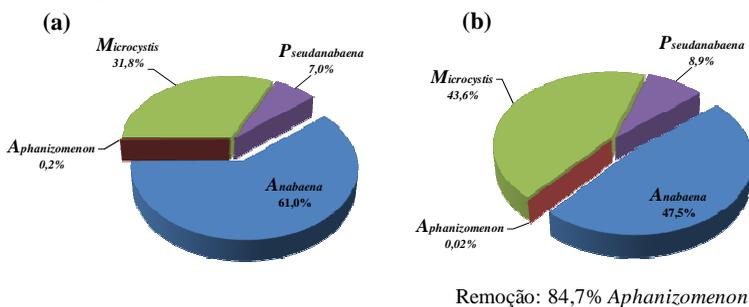


Figura 4.39. Proporção dos quatro gêneros de cianobactérias na amostra (a) antes e (b) após a ozonização (10 min) - 65 uT e 5 mgO₃·L⁻¹.



Análises de integridade celular pelo método BacLightTM foram também realizadas em algumas amostras (25 uT e 45 uT), representadas nas Figuras 4.40 e 4.41. Para a amostra a 25 uT, a dose de ozônio de 2 mg·L⁻¹ (CT de 1,08 mg·min/L - 1 min de tempo de contato) foi suficiente para tornar todas as células de cianobactérias presentes como células não viáveis. Para a amostra de 45 uT, um valor de CT de 1,69 mg·min/L (1 min de tempo de contato) resultou na redução da viabilidade celular a 37% com dose de ozônio de 2 mgO₃·L⁻¹, com completa perda de viabilidade celular a partir de 3 min de tempo de contato (CT de 3,07 mg·min/L). Para a dose de 4 mgO₃·L⁻¹, a 1 minuto

de tempo de contato, 93% das células foram consideradas não viáveis (CT de 3,32 mg·min/L).

Figura 4.40. Viabilidade celular após ozonização de amostra de água superficial a 25 uT e 2 mgO₃·L⁻¹.

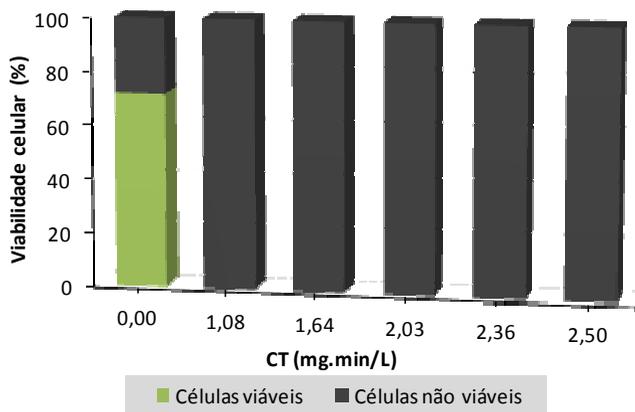
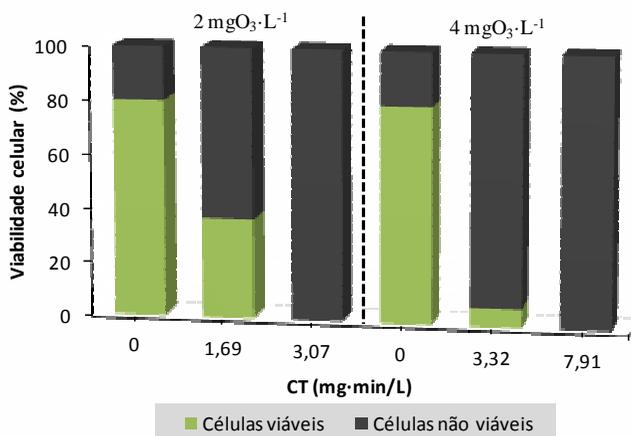


Figura 4.41. Viabilidade celular após ozonização de amostra de água superficial a 45 uT e 2 e 4 mgO₃·L⁻¹.



Comparando aos ensaios com células isoladas (*M. aeruginosa* e *A. flos-aquae*) e a amostra natural com turbidez igual a 45 uT para a mesma dosagem de $2 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$, um maior valor de CT foi requerido para a amostra natural ($3,07 \text{ mg} \cdot \text{min/L}$) se comparado às amostras isoladas ($0,18 \text{ mg} \cdot \text{min/L}$), o que pode ser associado ao consumo do ozônio pelos demais constituintes da amostra antes das células serem devidamente atacadas.

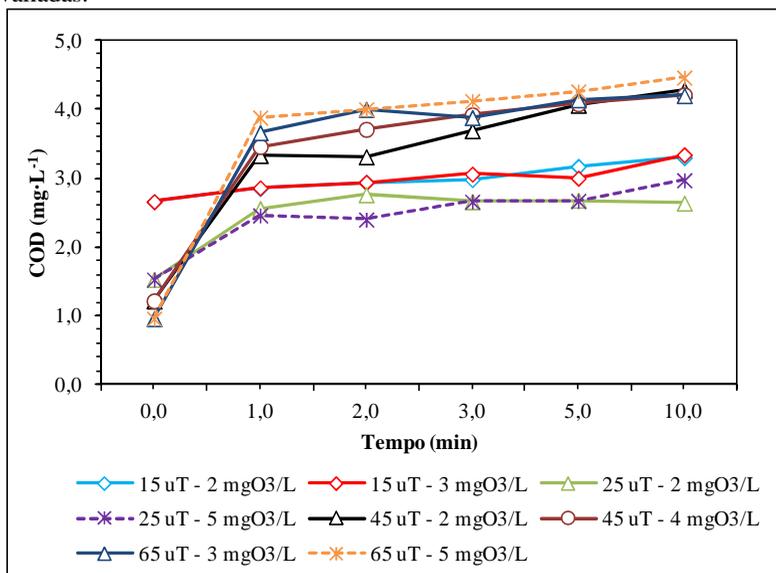
4.3.2.2 Efeito da ozonização na liberação de COD das células e redução da turbidez

Como observado nos ensaios com cultivo unicelular, a ozonização promoveu o aumento na concentração de COD nas amostras. De forma menos expressiva para a amostra com turbidez de 15 uT, um aumento na concentração de COD no primeiro minuto de tempo de contato foi observado. Esse comportamento, assim como os ensaios prévios, sugere que o impacto do ozônio nas células de cianobactérias resultaria em um aumento imediato da concentração de COD em função da liberação de compostos intracelulares. Independente da turbidez avaliada, o aumento na dosagem de ozônio não resultou em maiores concentrações de COD. Na Figura 4.42 tem-se a representação gráfica do aumento de COD após a ozonização para todas as condições avaliadas. Exceto para 15 uT, a concentração inicial de COD foi semelhante para as demais condições. Entre os valores de turbidez de 25 e 45 uT, cerca de $0,80 \text{ mg}$ a mais de COD foi obtido para 45 uT para uma mesma dosagem de $2 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ para o primeiro tempo de contato. Comparando os valores iniciais de turbidez de 45 e 65 uT, pequena diferença de concentração de COD foi observada, mesmo tendo-se uma dosagem mais elevada para esta última condição, o que pode ser associado a presença de um maior número de células a 45 uT do que a 65 uT.

Nos ensaios com células isoladas, um aumento máximo de $0,5 \text{ mgCOD} \cdot \text{L}^{-1}$ ($2,16 \times 10^{-6} \text{ mg COD} \cdot \text{cel}^{-1}$) para *M. aeruginosa* e $0,9 \text{ mg COD} \cdot \text{L}^{-1}$ ($3,60 \times 10^{-6} \text{ mg COD} \cdot \text{cel}^{-1}$) para *A. flos-aquae* foram obtidos para a maior dosagem de ozônio ($4 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$) a pH 6. Valores entre $2,93 \times 10^{-6}$ (15 uT) e $6,96 \times 10^{-6} \text{ mgCOD} \cdot \text{cel}$ (65 uT) foram obtidos nas amostras de água superficial com as maiores dosagens de O_3

utilizadas. Além do COD obtido a partir das células de cianobactérias, os valores superiores deste nas amostras naturais podem ser também relacionados à formação de COD, com uma possível elevada parcela de COA, a partir da ozonização da matéria orgânica dissolvida presente nas amostras (HAMMES et al., 2006).

Figura 4.42. Concentração de COD antes (tempo 0 min) e após o processo de ozonização para as amostras de água superficial nas diferentes condições avaliadas.



Alguns estudos na literatura demonstram que a pré-ozonização pode melhorar o desempenho das etapas de coagulação/floculação e filtração, com reduções expressivas nos teores de cor e turbidez finais, mesmo em águas superficiais com presença de algas (LEE et al., 2005; ZHANG et al., 2011). A pré-ozonização tem como princípio tornar os compostos orgânicos, aderidos no interior das partículas coloidais, mais polares de forma a dessolvê-los das partículas e torná-los mais solúveis. Dessa forma, a partícula (inicialmente carregada negativamente) torna-se

desestabilizada e mais favorável à agregação quando da adição de coagulantes químicos (CORPORATION, 2010).

A pré-ozonização das amostras de água superficial resultou em elevada redução nos teores de turbidez em todas as condições avaliadas (entre 71 e 85%). O perfil de redução de turbidez com o tempo de ozonização é compilado para todas as condições na Figura 4.43. Exceto para a turbidez inicial de 15 uT, nas demais condições, o aumento da dosagem resultou igualmente em uma maior remoção de turbidez. As porcentagens de remoção após o período completo de exposição (10 min) são indicadas na Tabela 4.11.

Figura 4.43. Perfil de decaimento dos teores de turbidez nas amostras de água superficial nas condições avaliadas.

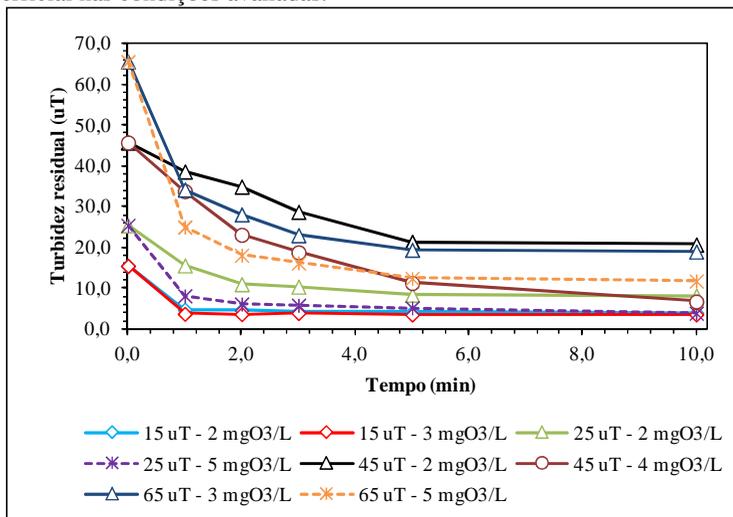


Tabela 4.11. Porcentagem de redução de turbidez após ozonização.

Turbidez (uT)	Dose O ₃ (mg·L ⁻¹)	Redução (%)
15,0	2,0	74,1
	3,0	76,9
25,0	2,0	67,7
	5,0	84,7
45,0	2,0	54,7
	4,0	85,2
65,0	3,0	71,0
	5,0	82,0

4.3.2.3 Formação de subprodutos da desinfecção nas amostras de água superficial

A formação de trihalometanos e ácidos haloacéticos também foi avaliada para a água superficial. As análises foram realizadas para os valores de turbidez de 25 uT (2 e 3 mgO₃·L⁻¹), 45 uT (2 e 4 mgO₃·L⁻¹) e 65 uT (3 e 5 mgO₃·L⁻¹), nas mesmas condições analíticas consideradas para as análises com cultivo unicelular.

Os resultados obtidos indicaram a formação predominante de clorofórmio (CHCl₃), ácido dicloroacético (DCAA) e ácido tricloroacético (TCAA). Ao contrário do observado nos ensaios com cultivo laboratorial, maior conteúdo de TCAA foi quantificado em comparação a DCAA, cuja razão (TCAA/DCAA) foi sempre superior a 1,0, o que indica a presença de um maior nível de carbono aromático.

Os valores obtidos em termos de total de THM e HAA são indicados na Tabela 4.12 e na Figura 4.44. Como esperado, quanto maior o valor de turbidez mais elevada à concentração de THM e HAA, sendo em algumas vezes esses valores superiores aos valores máximos permitidos preconizados pela legislação brasileira e canadense (CANADA, 2006; 2008; BRASIL, 2011).

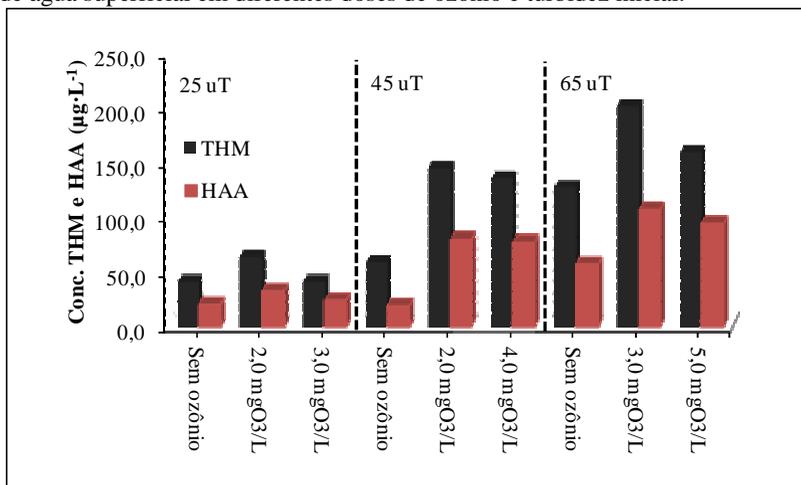
Para todas as condições de turbidez inicial, nas menores dosagens empregadas obteve-se um aumento expressivo na concentração de subprodutos, com uma conseqüente redução destes valores a partir das doses mais elevadas. A redução na formação de subprodutos a partir da pré-ozonização é considerada em alguns estudos na literatura (KO; ABBT-BRAUN; FRIMMEL, 2000; CHANG; MA; ZING, 2002; RODRÍGUEZ; MARCOS; NÚÑEZ, 2012). O ozônio pode formar (aumento da concentração de compostos COA) ou destruir os precursores de subprodutos, o que irá depender da dosagem de ozônio, da natureza da matéria orgânica e dos processos subsequentes de tratamento (CORPORATION, 2010). De forma geral, elevadas razões O_3/COT tendem a resultar em uma menor concentração de precursores de subprodutos. Estudos destacados por Chang, Ma e Zing (2002), consideram que a redução dos subprodutos está relacionada ao fato do ozônio promover a decomposição dos grupos funcionais ativos presentes nos compostos orgânicos. Da mesma forma, a aplicação do ozônio pode resultar em uma maior hidrofobicidade da MON, o que reduz a produção de subprodutos, principalmente em termos de THM (LIANG; SINGER, 2003), como observado na Tabela 4.12. A mineralização de COD à CO_2 também pode ser obtida com adequadas doses de ozônio, tendo-se a formação simultânea de radicais hidroxila (CORPORATION, 2010).

Tabela 4.12. Concentração total de THM e HAA antes e após pré-tratamento com ozônio em amostras de água superficial.

Turbidez (uT)	Dose O_3 ($mg \cdot L^{-1}$)	TTHM ($\mu g \cdot L^{-1}$)	THAA ($\mu g \cdot L^{-1}$)
25	-	41,0	19,4
	2	63,8	32,4
	3	41,0	23,6
45	-	58,8	18,3
	2	145,7	79,9
	4	135,6	77,2
65	-	127,4	56,7
	3	201,6	107,5
	5	159,3	94,2

A reação do ozônio, em maiores dosagens, com os constituintes orgânicos da água pode ter favorecido a redução na concentração final de THM e HAA, sendo esta redução mais expressiva para THM. Essa redução não foi observada quando dos ensaios com cultivo de células, o que pode ser atribuído à presença única de compostos orgânicos intracelulares das cianobactérias e a possível menor reatividade do ozônio na decomposição destes constituintes.

Figura 4.44. Formação de THM e HAA com e sem pré-ozonização para amostra de água superficial em diferentes doses de ozônio e turbidez inicial.

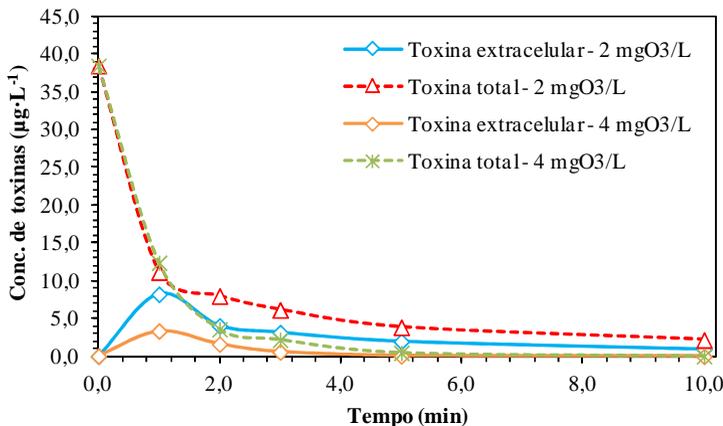


4.3.2.4 Efeito da ozonização na liberação e oxidação de toxina

A avaliação da oxidação de toxinas pelo ozônio para água proveniente de floração natural foi avaliada no valor inicial de turbidez de 45 uT. Qualitativamente, quatro variantes de microcistina foram identificadas em concentração inicial aproximada de 39 µg·L⁻¹ de MC-LR eq.: MC-LR, MC-RR, MC-YR e dmMC-LR. Como observado nos ensaios com células isoladas, um aumento na concentração de toxina extracelular foi observada com a aplicação de ozônio, sendo levemente superior para a dosagem de 2 mgO₃·L⁻¹. O perfil de liberação e

degradação de toxinas (extracelular e total) é demonstrado na Figura 4.45. Após 10 min de tempo de contato, 94,3% e 99,8% da toxina havia sido degradada para as dosagens de 2 e 4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, tendo-se ainda um residual de ozônio de 0,81 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para a dosagem mais elevada.

Figura 4.45. Perfil de liberação e oxidação de microcistina a partir de amostra de água superficial.



Como observado nos ensaios prévios, a velocidade de liberação de toxinas pelas células foi superior à velocidade de degradação, como indicado na Tabela 4.13. Comparativamente aos ensaios com células de *M. aeruginosa*, menores valores de constante de velocidade de degradação foram obtidos para a água superficial, o que é constatado pela permanência de residual de toxina por um maior período de exposição ao ozônio. Enquanto nos ensaios com células isoladas com dose de ozônio de 4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, remoção completa de MC-LR eq. foi obtida em 1,5 min de tempo de contato para ambos os valores de pH avaliados (6 e 8), na amostra de água superficial remoção próxima a 99% foi obtida somente após 5 min de tempo de contato para a mesma dosagem. Esse comportamento pode ser atribuído à presença de uma série de

compostos orgânicos presentes no meio, e que tendem a competir com a toxina pelo ozônio, principalmente pelos radicais $\cdot\text{OH}$.

Tabela 4.13. Constantes de liberação e oxidação de toxina total para amostra de água superficial a 45 uT e dosagens de 2 e 4 $\text{mgO}_3\cdot\text{L}^{-1}$.

O_3 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	k liberação de toxina			k oxidação (tox_T)		
	k (s^{-1})	k' ($\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	(1,00)*	k (s^{-1})	k' ($\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	(1,00)
2	4,56E-02	2,19E+03	(1,00)*	1,15E-02	5,52E+02	(1,00)
4	1,88E-02	9,03E+02	(0,94)	6,47E-03	3,11E+02	(0,99)

*Coeficientes de correlação (R^2)

Os resultados obtidos indicam que, apesar da existência de outros constituintes orgânicos na água superficial, o ozônio, quando aplicado em dose suficiente, permite a degradação de toxinas intra e extracelular, impedindo que a mesma venha a ser detectada ao final do processo de tratamento.

Comparativamente aos ensaios com cultivos laboratoriais de cianobactéria, os resultados indicam que a ação do ozônio nas amostras naturais foi igualmente efetiva quanto a inativação dos organismos, sendo necessário somente maiores tempos de contato. As alterações na permeabilidade celular das cianobactérias foram igualmente verificadas, uma vez que a liberação de compostos intracelulares (COD e toxinas) foi observado, mesmo com a presença de outros constituintes orgânicos presentes na água de estudo atuando como competidores pelo oxidante. A degradação de toxinas, assim como para o cultivo laboratorial foi observada, sendo apenas necessários maiores tempos de contato para uma mesma eficiência de degradação. Com relação à formação de subprodutos, o comportamento de redução de constituintes formados com o aumento da dose de ozônio para um mesmo valor de turbidez indica a existência de diferenças entre os constituintes orgânicos da água natural e os constituintes intracelulares das cianobactérias, os quais apresentariam uma menor reatividade com o ozônio ao ponto de serem degradados e reduzir o potencial de formação de subprodutos.

Capítulo 5

Conclusões e Recomendações

"A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma."

John Rukin

5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

5.1 CONCLUSÕES

Este estudo teve como principal objetivo avaliar o impacto da pré-ozonização em cianobactérias, considerando sua efetividade quanto a degradação de toxina intracelular e a contribuição na formação de subprodutos da desinfecção. Tais informações contribuem para avaliar se a pré-ozonização é uma opção viável ao controle de florações de cianobactérias. Diante dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

Em amostras de cultivos laboratoriais:

- Uma reduzida dose de ozônio ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) foi suficiente para causar uma completa perda de integridade de *M. aeruginosa* e *A. flos-aquae*, para ambas as densidades de célula e valores de pH avaliados.
- Embora não se tenha observado uma significativa perda de células por lise para ambas as espécies avaliadas, os danos na estrutura celular após a ozonização resultaram no aumento da concentração de COD extracelular, o que indica que mesmo em dose de ozônio reduzida, a pré-ozonização destas culturas pode culminar em um aumento na concentração de precursores de subprodutos.
- Embora as espécies avaliadas apresentem morfologia distinta, não foi observada diferença significativa em termos de liberação de COD, apesar de apresentarem biovolumes distintos.
- A liberação de COD foi influenciada pelo aumento da dose de ozônio e do pH da amostra. As maiores concentrações de COD liberadas em pH mais alcalino sugerem que o ataque de radicais $\cdot\text{OH}$ às células contribui mais expressivamente no processo, seja pela ação mais agressiva na estrutura da célula, seja pela reação com compostos orgânicos não assimiláveis presentes na parede celular.
- Análises cinéticas indicaram que a presença de células de cianobactérias em água pode resultar em considerável aumento na

demanda imediata de ozônio. Este comportamento foi dependente da dose de ozônio, da concentração de COD e do pH, mas foi independente da espécie de cianobactéria avaliada.

- O decaimento do ozônio foi influenciado pela espécie de cianobactéria e pelo valor de pH, com mais rápido decaimento observado para células de *A. flos-aquae* em pH 8. Apesar disso, a maior reatividade ao ozônio foi atribuída às células de *M. aeruginosa*.
- As substâncias intracelulares, determinadas como COD, contribuem na formação de subprodutos, sendo a dose de ozônio, o pH e a espécie de cianobactéria importantes parâmetros a serem considerados quanto a formação de subprodutos.
- Maiores concentrações de THM e HAA foram detectadas para *A. flos-aquae* em pH 8, o que pode ser relacionado a maior quantidade de COD liberado, assim como pela composição estrutural da célula. Quanto maior a dose de ozônio aplicada, maior foi a concentração de THM e HAA quantificada.
- Juntamente com o COD, a pré-ozonização promoveu a liberação de toxina intracelular imediatamente após o contato do ozônio com as células de *M. aeruginosa*, mesmo para a menor dose de ozônio ($5 \text{ mgO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$).
- A degradação de microcistina intracelular foi dependente da dose de ozônio e do pH. Maiores valores de k de oxidação foram obtidos a pH 6, o que indica uma maior eficiência de degradação da toxina neste pH, devido a maior afinidade da microcistina ao ozônio molecular do que com os radicais $\cdot\text{OH}$.
- A menor oxidação da microcistina em pH alcalino pode ser também associada a presença de maiores níveis de COD, o qual atuaria como sequestrador dos radicais $\cdot\text{OH}$, reduzindo, desta forma, a sua eficiência de degradação.

Em amostras de floração natural:

- Em termos de redução da integridade celular, um maior CT foi necessário para tornar todas as células quantificadas como não

viáveis, o que se deve a competição das células com outros constituintes orgânicos pelo ozônio.

- Um aumento imediato de COD foi observado com a aplicação de ozônio e reduções de até 85% de turbidez foram alcançadas.
- Maiores concentrações de THM e HAA foram verificadas, tendendo-se, no entanto, uma redução destes valores quando doses de ozônio mais elevadas foram aplicadas. Este comportamento pode ser relacionado à presença de maior concentração de carbono orgânico aromático na água natural em comparação aos cultivos laboratoriais, indicado pela maior razão TCAA/DCAA, o qual reage mais ativamente com o ozônio.
- Na condição de turbidez avaliada para a degradação de toxina intracelular, para uma concentração inicial de toxina total semelhante à obtida em cultivo laboratorial, um maior tempo de contato foi necessário para atingir remoções acima de 90%, o que indica a necessidade de doses e tempos mais elevados para que a demanda de ozônio seja atendida e o residual de ozônio seja suficiente para promover a remoção da toxina.

De forma geral, a pré-ozonização é uma solução atrativa em águas impactadas com florações de cianobactérias. A aplicação do oxidante pode prevenir que a acumulação de células dentro do sistema de tratamento (clarificadores e filtros) resulte em risco de liberação de toxinas, uma vez que as mesmas foram previamente degradadas, além de facilitar a disposição do lodo. Entretanto, é importante levar em consideração o efeito da pré-ozonização na concentração de COD e na formação de subprodutos da desinfecção, os quais podem ser significativos sobre certas condições de ozonização (elevado pH e elevada concentração de células). Dessa forma, um balanço entre os benefícios do controle de células e degradação de toxinas a partir da pré-ozonização e a formação de subprodutos deve ser considerado.

5.2 RECOMENDAÇÕES

Algumas recomendações para futuras pesquisas podem ser sugeridas:

-
- Avaliar outros fatores que possam afetar as reações do ozônio para a mesma finalidade, como agitação e exposição a luz.
 - Avaliar a efetividade da ozonização para outras espécies de cianobactérias e grupos de cianotoxinas.
 - Considerando a elevada eficiência do ozônio na degradação de microcistinas e outras toxinas relatadas na literatura, acredita-se ser interessante avaliar a adoção de processos que permitam a remoção dos precursores de THM e HAA, como filtros biológicos, e processos que permitam a sua remoção quando formados, como sistemas de filtração em membranas.
 - Avaliar a ação de outros processos oxidativos, como o processo UV/H₂O₂ em condições semelhantes e para diferentes espécies de cianobactérias e toxinas.

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

"Os caminhos que conduzem o homem ao saber são tão maravilhosos quanto o próprio saber."

Johannes Kepler

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. G.; DUGGAN, P. S. Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria - Tansley review n. 107. **New Phytol**, v. 144, p. 3-33, 1999.

AFSSA; AFSSET. **Évaluation des risques liés à la présence de cyanobactéries et de leurs toxines dans les eaux destinées à l'alimentation, à la baignade et autres activités récréatives**: 232 p. 2006.

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

AL MOMANI, F. A.; JARRAH, N. Treatment and kinetic study of cyanobacterial toxin by ozone. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, v. 45, p. 719-731, 2010.

AL MOMANI, F. A.; SMITH, D. W.; EL-DIN, M. G. Degradation of cyanobacteria toxin by advanced oxidation processes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 150, p. 238-249, 2008.

ANDREOZZI, R. et al. Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. **Catalysis Today**, v. 53, p. 51-59, 1999.

ANTONIOU, M. G.; CRUZ, A. A.; DIONYSIOU, D. D. Cyanotoxins: new generation of water contaminants. **Journal of Environmental Engineering**, p. 1239-1243, 2005.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. APHA, A., WEF. Washington, D. C.: American Public Health Association 1998.

_____. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. APHA, A., WEF Washington, D. C.: American Public Health Association 2005.

ASANO, T. et al. **Water reuse: issues, technologies, and applications**. 1. United States of America: Metcalf & Eddy, Inc - The McGraw-Hill Companies, 2007.

AUSTRALIA. **Australian Drinking Water Guidelines 6**: National Health and Medical Research Council. Natural Resource Management Ministerial Council.: 615p p. 2004.

BABLON, G. et al. Practical application of ozone: principles and case studies. In: LANGLAIS, B., et al (Ed.). **Ozone in water treatment: application and engineering**. USA: Lewis Publishers, 1991a. p.133-316.

_____. Fundamental Aspects. In: LANGLAIS, B., et al (Ed.). **Ozone in Water Treatment: Application and Engineering**. Chelsea, Michigan: Lewis Publishers, Inc., 1991b. p.11-132.

BARTRAM, J. et al. Introduction. In: CHORUS, I. e BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon, 1999. p.1-14.

BECK, E. et al. **International Missisquoi Bay study board**. International Joint Commission Canada and United States. 2012

BERNEY, M. et al. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight kit in combination with flow cytometry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 10, p. 3283-3290, 2007.

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. et al. Seasonal dynamics of cyanobacteria in a eutrophic reservoir (Arcoverde) in a semi-arid region of Brazil. **Braz. J. Biol.**, v. 72, n. 3, p. 533-544, 2012.

BOULOS, L. et al. LIVE/DEAD[®] BacLight[™]: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. **Journal of Microbiological Methods**, v. 37, p. 77-86, 1999.

BRASIL. **Portaria N 2914**. Brasília: Ministry of Health 2011.

BRIAND, J.-F.; JACQUET, S.; BERNARD, C. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. **Vet. Res.**, v. 34, p. 361-377, 2003.

BROOKE, S. **The destruction of cyanobacterial toxins with oxidants used in drinking water treatment**. 2009. 172 p. (Doctor in Philosophy in Applied Science). University of Australia, Australia.

BROOKE, S. et al. Decrease in toxicity of microcystins LA and LR in drinking water by ozonation. **Toxicon**, v. 48, p. 1054-1059, 2006.

BUCKA, H.; WILK-WOŹNIAK, E. A contribution to the knowledge of some potentially toxic cyanobacteria species forming blooms in water bodies - chosen examples. **Oceanological and Hydrobiological Studies**, v. 34, n. 3, p. 43-53, 2005.

CANADA. **Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: Guideline Technical Document - Trihalomethanes**. Ottawa: Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water of the Federal-Provincial-Territorial Committee on Health and the Environment. 2006.

_____. **Guidelines for Canadian Drinking Water Quality: guideline technical document - Haloacetic acids**. Ottawa: Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking water of the Federal-Provincial-Territorial Committee on Health and the Environment 2008.

CARMICHAEL, W. A world overview - one-hundred-twenty-seven years of research on toxic cyanobacteria - Where do we go from here? In: HUDNELL, H. K. (Ed.). **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research needs**. New York: Springer Science, 2008. p.105-126.

CARVALHO, L. R. et al. A toxic cyanobacterial bloom in an urban coastal lake, Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 761-769, 2008.

_____. Cyanobacterial occurrence and detection of microcystin by planar chromatography in surface water of Billings and Guarapiranga Reservoirs, SP, Brazil. **Revista Brasil. Bot.**, v. 30, n. 1, p. 141-148, 2007.

CATALDO, F. Ozone degradation of ribonucleic acid (RNA). **Polymer Degradation and Stability**, v. 89, p. 275-281, 2005.

CHANG, C.-N.; MA, Y.-S.; ZING, F.-F. Reducing the formation of disinfection by-products by pre-ozonation. **Chemosphere**, v. 46, n. 1, p. 21-30, 2002.

CHELLAPPA, N. T.; COSTA, M. A. M. Dominant and co-existing species of cyanobacteria from a eutrophicated reservoir of Rio Grande do Norte State, Brazil. **Acta Oecologica - International Journal of Ecology**, v. 24, p. S3-S10, 2003.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences monitoring and management**. London: E & FN Spon, 1999.

CODD, G. A.; MORRISON, L. F.; METCALF, J. S. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, p. 264-272, 2005.

CORPORATION, B. V. **White's handbook of chlorination and alternative disinfectants**. 5th ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. , 2010. 1105

COSTA, I. A. S. et al. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a brazilian semiarid reservoir. **Braz. J. Biol.**, v. 66, n. 1B, p. 211-219, 2006.

CSÉFALVAY, E.; NÖTHE, T.; MIZSEY, P. Modelling of wastewater ozonation determination of reaction kinetic constants and effect of temperature. **Chemical Engineering**, v. 51, n. 2, p. 13-17, 2007.

DALY, R. I.; HO, L.; BROOKES, J. D. Effect of chlorination on *Microcystis aeruginosa* cell integrity and subsequent microcystin release and degradation **Environ. Sci. Technol.**, v. 41, p. 4447-4453, 2007.

DANTAS, E. W.; MOURA, A. N.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Cyanobacterial blooms in stratified and destratified eutrophic reservoirs in semi-arid region of Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 4, p. 1327-1338, 2011.

DAVIS, J. L.; SHAW, G. Impacts of eutrophication on the safety of drinking and recreational water. In: GRABOW, W. O. K. (Ed.). **Water**

and Health: Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), v.2, 2006. p.538.

DE JULIO, M. et al. A methodology for optimising the removal of cyanobacteria cells from a brazilian eutrophic water. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 113-126, 2010.

DENYER, S. P.; STEWART, G. S. A. B. Mechanisms of action of disinfectants. **International Biodeterioration & biodegradation**, v. 41, p. 261-268, 1998.

EL-ATY, A. M. A. et al. Influence of chlorine on algae as precursors for trihalomethane and haloacetic acid production. **World Applied Sciences Journal**, v. 6, n. 9, p. 1215-1220, 2009.

ERSHOV, B. G.; MOROZOV, P. A. Decomposition of ozone in water at pH 4-8. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 81, n. 11, p. 1895-1898, 2008.

_____. The kinetics of ozone decomposition in water, the influence of pH and temperature. **Russian Journal of Physical Chemistry A**, v. 83, n. 8, p. 1295-1299, 2009.

FALCONER, I. R. **Cyanobacterial toxins of drinking water supplies: *Cylindrospermopsis* and *Microcystis***. Boca Raton London New York Washington, D.C.: CRC Press, 2005.

FANG, J. et al. Formation of carbonaceous and nitrogenous disinfection by-products from the chlorination of *Microcystis aeruginosa*. **Water Research**, v. 2010, p. 1934-1940, 2010a.

_____. Characterization of algal organic matter and formation of DBPs chlor(am)ination. **Water Research**, v. 44, p. 5897-5906, 2010b.

FIORE, M. F.; TREVORS, J. T. Cell composition and metal tolerance in cyanobacteria. **BioMetals** v. 7, p. 83-103, 1994.

FORTIN, N. et al. Detection of microcystin-producing cyanobacteria in Missisquoi Bay, Quebec, Canada, using quantitative PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 15, p. 5105-5112, 2010.

FUJITA, Y. et al. Short-term and long-term adaptation of the photosynthetic apparatus: homeostatic properties of thylakoids. In: BRYANT, D. A. (Ed.). **The molecular biology of cyanobacteria**. New York: Kluwer Academic Publishers, v.1, 1994. p.677-692.

GAULT, P. M.; MARLER, H. J. **Handbook on cyanobacteria: biochemistry, biotechnology and applications**. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2009. 556

GOLDEN, J. W.; YOON, H.-S. Heterocyst development in *Anabaena*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 557-563, 2003.

GORHAM, P. R. et al. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena Flos-aquae* (Lyngb.) deBréd. **Internation Association of Theoretical and Applied Limnology**, v. 15, p. 796-804, 1964.

GOTTSCHALK, C.; LIBRA, J. A.; SAUPE, A. **Ozonation of Water and Waste Water - A practical guide to understanding ozone and its application**. Weinheim - Federal Republic of Germany: WILEY-VCH, 2000.

_____. **Ozonation of Water and Waste Water - A practical guide to understanding ozone and its application**. Weinheim - Federal Republic of Germany: WILEY-VCH, 2010.

GRAHAM, J. L. et al. Cyanotoxin Mixtures and Taste-and-Odor Compounds in Cyanobacterial Blooms from the Midwestern United States. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 19, p. 7361-7368, 2010. ISSN 0013-936X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/es1008938> >.

GREENE, A. K.; FEW, B. K.; SERAFINI, J. C. A comparison of ozonation and chlorination for the disinfection of stainless steel surfaces. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 3617-3620, 1993.

GUILLARD, R. R. L.; RYTHER, J. H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula convervacea* (Cleve) gran. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 8, p. 229-239, 1962.

HAMMES, F. et al. Formation of assimilable organic carbon (AOC) and specific natural organic matter (NOM) fraction during ozonation of phytoplankton. **Water Research**, v. 41, p. 1447-1454, 2007.

_____. Mechanistic and kinetic evaluation of organic disinfection by-product and assimilable organic carbon (AOC) formation during ozonation of drinking water. **Water Research**, v. 40, p. 2275-2286, 2006.

HAVENS, K. E. Cyanobacteria blooms: effects on aquatic ecosystems. In: HUDNELL, H. K. (Ed.). **Cyanobacterial harmful algal blooms: State of the science and research needs**. New York: Springer, v.619: Advances in experimental medicine and biology, 2008. p.733-748.

HENSE, I.; BECKMANN, A. Towards a model of cyanobacteria life cycle - effects of growing and resting stages on bloom formation of N₂-fixing species. **Ecological Modelling** v. 195, p. 205-218, 2006.

HOEGER, S. J.; DIETRICH, D. R.; HITZFELD, B. C. Effect of ozonation on the removal of cyanobacterial toxins during drinking water treatment. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 11, p. 1127-1132, 2002.

HOEGER, S. J.; HITZFELD, B. C.; DIETRICH, D. R. Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, p. 231-242, 2005.

HOICZYK, E.; HANSEL, A. Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 5, p. 1191-1199, 2000.

HONG, H. C. et al. Yield of trihalomethanes and haloacetic acids upon chlorinating algal cells, and its prediction via algal cellular. **Water Research**, v. 42, p. 4941-4948, 2008.

HONG, H. C.; WONG, M. H.; LIANG, Y. Amino acids as precursors of trihalomethane and haloacetic acid formation during chlorination. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 56, p. 638-645, 2009.

HUANG, J. et al. A comparison of the role of two blue-green algae in THM and HAA formation. **Water Research**, v. 43, p. 3009-3018, 2009.

HUANG, W.-J.; CHENG, Y.-L.; CHENG, B.-L. Ozonation byproducts and determination of extracellular release in freshwater algae and cyanobacteria. **Environmental Engineering Science**, v. 25, n. 2, p. 139-151, 2008.

HUDNELL, H. K. **Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs**. New York: Springer Science, 2008.

HUMPAGE, A. Toxin types, toxicokinetics and toxicodynamics. In: HUDNELL, H. K. (Ed.). **Cyanobacterial harmful algal blooms: state of the science and research needs**. New York: Springer Science, 2008. p.383-416.

HÖGER, S. J. **Problems during drinking water treatment of cyanobacterial-loaded surface waters: consequences for human health**. 2003. 208 p., Universität Konstanz Gefördert, Germany.

IRIARTE, U. et al. Trihalomethane formation in ozonated and chlorinated surface water. **Environ Chem Lett**, v. 1, p. 57-61, 2003.

JAYATISSA, L. P. et al. Occurrence of toxigenic cyanobacterial blooms in freshwaters of Sri Lanka. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 156-164, 2006.

KATIRCIOĞLU, H.; AKIN, B. S.; ATICI, T. Microalgal toxin (s): characteristics and importance. *African Journal of Biotechnology*, v. 3, n. 12, p. 667-674, 2004.

KO, Y.-W.; ABBT-BRAUN, G.; FRIMMEL, F. H. Effect of preozonation on the formation of chlorinated disinfection by-products for river Ruhr. **Acta Hydrochim. Hydrobiol.**, v. 28, n. 5, p. 256-261, 2000.

KUMAR, K.; MELLA-HERRERA, R. A.; GOLDEN, J. W. **Cyanobacterial heterocysts**: Cold Spring Harb Perspect: 1-19 p. 2010.

-
- LAVOIE, I. et al. **Les fleurs d'eau de cyanobactéries - revue de littérature**. INRS rapport n 916, XIII, p.124. 2007
- LAWTON, L. A.; ROBERTSON, P. K. J. Physico-chemical treatment methods for the removal of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) from potable waters. **Chem. Soc. Rev.**, v. 28, p. 217-224, 1999.
- LEE, J. D. et al. Removal of freshwater diatoms (*Synedra acus* and *Stephanodiscus sp.*) by preozonation and addition of polyamine coagulant-aid. **Korean J. Chem. Eng.**, v. 22, n. 5, p. 682-686, 2005.
- LI, H. et al. Effect of pH on inactivation of *Microcystis aeruginosa* by ozonation air in sequencing batch reactor. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 86, p. 468-471, 2011.
- LI, Z. Advances in marine simbiotic cyanobacteria. In: GAULT, P. M. e MARLER, H. J. (Ed.). **Handbook on Cyanobacteria: Biochemistry, Biotechnology and Applications**. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2009. p.463-472.
- LIANG, L.; SINGER, P. C. Factors influencing the formation and relative distribution of haloacetic acids and trihalomethanes in drinking water. **Environ. Sci. Technol.**, v. 37, p. 2920-2928, 2003.
- LIBERTON, M.; PAKRASI, H. B. Membrane systems in cyanobacteria. In: HERRERO, A. e FLORES, E. (Ed.). **The cyanobacteria - molecular biology, genetics and evolution**. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2008.
- LIN, T.-F. et al. Effect of chlorination on the cell integrity of two noxious cyanobacteria and their releases of odorants. **Journal of Water Supply: Research and Technology - AQUA**, v. 58, n. 8, p. 539-551, 2009.
- LIU, W. et al. Investigation of assimilable organic carbon (AOC) and bacterial regrowth in drinking water distribution system. **Water Research**, v. 36, p. 891-898, 2002.
- LIU, Z. et al. The role of nitrobenzene on the yield of trihalomethane formation potential in aqueous solutions with *Microcystis aeruginosa*. **Water Research**, v. 45, p. 6489-6495, 2011.

LONG, B. M.; JONES, G. J.; ORR, P. T. Cellular microcystin content in N-limited *Microcystis aeruginosa* can be predicted from growth rate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 278-283, 2001.

MAILLARD, J.-Y. Bacterial target sites for biocide action. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n. (suppl.), p. 16S-27S, 2002.

MASTEN, S. J.; DAVIES, S. H. R. Use of ozone and other strong oxidants for hazardous waste management. In: NRIAGU, J. O. e SIMMONS, M. S. (Ed.). **Environmental Oxidants**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1994. p.517-548.

_____. Use of ozone and other strong oxidants for hazardous waste management. In: NRIAGU, J. O. e SIMMONS, M. S. (Ed.). **Environmental Oxidants**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1994b. p. 517-548.

MATTHIENSEN, A.; YUNES, J. S.; CODD, G. A. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 59, n. 3, p. 361-376, 1999.

MAUSETH, J. D. **Botany: an introduction to plant biology**. 2. United States: Jones and Bartlett Publishers, Inc., 1998. 794

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

MIAO, H.-F. et al. Detoxification and degradation of microcystin-LR and -RR by ozonation. **Chemosphere**, v. 79, p. 355-361, 2010.

MIAO, H.; TAO, W. The mechanisms of ozonation on cyanobacteria and its toxins removal. **Separation and Purifications Technology**, v. 66, p. 187-193, 2009.

MIZUNO, T.; TSUNO, H.; YAMADA, H. Development of ozone self-decomposition model for engineering design. **Ozone: Science & Engineering**, v. 29, p. 55-63, 2007.

MOLICA, R.; AZEVEDO, S. M. F. O. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. **Oecol. Bras.**, v. 13, n. 2, p. 229-246, 2009.

MORATÓ, J. et al. Microbial response to disinfectants. In: MARA, D. e HORAN, N. (Ed.). **Water and wastewater microbiology**. Great Britain: Elsevier, 2003. p.657-693.

MOSCHINI-CARLOS, V. et al. Cyanobacteria and cyanotoxin in the Billings reservoir (São Paulo, SP, Brazil). **Limnetica**, v. 28, n. 2, p. 273-282, 2009.

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

MÜLLER, K. C. et al. Influence of ozonated cyanobacteria on bacterial growth in rapid sand filters. **Journal of Water Supply: Research and Technology - AQUA**, v. 52, n. 5, p. 333-340, 2003.

MULLINEAUX, C. W. et al. Mechanism of intercellular molecular exchange in heterocyst-forming cyanobacteria. **The EMBO Journal**, v. 27, p. 1299-1308, 2008.

MUR, L. R.; SKULBERG, O. M.; UTKILEN, H. Cyanobacteria in the environment. In: CHORUS, I. e BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences monitoring and management**. London: E & FN Spon, 1999.

NAVALON, S.; ALVARO, M.; GARCIA, H. Carbohydrates as trihalomethanes precursors. Influence of pH and the presence of Cl⁻ and Br⁻ on trihalomethane formation potential. **Water Research**, v. 42, p. 3990-4000, 2008.

NEW-ZEALAND. **Drinking-water standards for New Zealand 2005**. Wellington: Ministry of Health: 181p p. 2005.

NEWCOMBE, G. **Removal of algal toxins from drinking water using ozone and GAC**. Denver, Colorado: American Water Works Research Foundation, 2002.

NGUYEN, M.-L. et al. Characteristics and reactivity of algae-produced dissolved organic carbon-Asce. **Journal of Environmental Engineering**, v. 131, p. 1574-1582, 2005.

NOYES, R. **Handbook of pollution control processes**. USA: Noyes Publication 1991.

OBERHOLSTER, P. J.; BOTHA, A.-M.; CLOETE, T. E. Toxic cyanobacterial blooms in a shallow, artificially mixed urban lake in Colorado, USA. **Lakes & Reservoirs and Management**, v. 11, p. 111-123, 2006.

OLIVER, R. L.; GANF, G. G. Freshwater blooms. In: WHITTON, B. A. e POTTS, M. (Ed.). **The ecology of cyanobacteria - their diversity in time and space**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. p.140-197.

ONSTAD, G. D. et al. Selective oxidation of key functional groups in cyanotoxins during drinking water ozonation. **Environmental Science & Technology**, v. 41, p. 4397-4404, 2007.

ORR, P. T.; JONES, G. J.; HAMILTON, G. R. Removal of saxitoxins from drinking water by granular activated carbon, ozone and hydrogen peroxide - implications for compliance with the Australian drinking water guidelines. **Water Research**, v. 38, p. 4455-4461, 2004.

PÁDUA, V. L.; FERREIRA, A. C. S. Qualidade da água para consumo humano. In: HELLER, L. e PÁDUA, V. L. (Ed.). **Abastecimento de água para consumo humano**. Belo Horizonte-MG: Editora UFMG, 2006. p.153-221.

PAERL, H. W. Growth and reproductive strategies of freshwater blue-green algae (cyanobacteria). In: SANDGREN, C. D. (Ed.). **Growth and reproductive of freshwater phytoplankton**. USA: Cambridge University Press, 1988. p. 261-315

PAERL, H. W.; HUISMAN, J. Blooms like it hot. *Science*, v. 320, p. 57-58, 2008.

_____. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, n. 1, p. 27-37, 2009.

PARK, H.-S. et al. Characterization of raw water for the ozone application measuring ozone consumption rate. **Water Research**, v. 35, n. 11, p. 2607-2614, 2001.

PARSONS, S. A.; WILLIAMS, M. Introduction In: PARSONS, S. A. (Ed.). **Advanced oxidation processes for water and wastewater treatment**. London: IWA, 2004. p.1-6.

PICCIN-SANTOS, V.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C. Toxic cyanobacteria in four Brazilian water supply reservoirs. **Journal of Environmental Protection** v. 3, p. 68-73, 2012.

PLUMMER, J. D.; EDZWALD, J. K. Effect of ozone on algae as precursors for trihalomethane and haloacetic acid production. **Environ. Sci. Technol.**, v. 35, p. 3661-3668, 2001.

_____. Effect of ozone on algae as precursors for trihalomethane and haloacetic acid production. **Environ. Sci. Technol.**, v. 35, p. 3661-3668, 2001.

RAKNESS, K. L. **Ozone in drinking water treatment: process design, operation and optimization**. USA: American Water Works Association, 2005.

RAMSEIER, M. K. et al. Formation of assimilable organic carbon during oxidation of natural waters with ozone, chlorine dioxide, chlorine, permanganate, and ferrate. **Water Research**, v. 45, n. 5, p. 2002-2010, 2011.

REGENESIS. **Principles of chemical oxidation technology for the remediation of groundwater and soil**. RegenOx™ design and application manual - Version 2.0, 2007.

RIPPKA, R. et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

RODRIGUEZ, E. et al. Kinetics of the oxidation of cylindrospermopsin and anatoxin-a with chlorine, monochloramine and permanganate. **Water Research**, v. 41, n. 9, p. 2048-2056, 2007.

_____. Oxidative elimination of cyanotoxins: Comparison of ozone, chlorine, chlorine dioxide and permanganate. **Water Research**, v. 41, n. 15, p. 3381-3393, 2007b.

RODRÍGUEZ, F. J.; MARCOS, L. A.; NÚÑEZ, L. A. Disinfection by-products - A case study: The Úzquiza reservoir water. **Ozone: Science & Engineering**, v. 34, p. 213-224, 2012.

ROSITANO, J.; NICHOLSON, B. C.; PIERONNE, P. Destruction of cyanobacterial toxins by ozone. **Ozone Science & Engineering**, v. 20, p. 223-238, 1998.

ROSITANO, J. et al. Ozonation of nom and algal toxins in four treated waters. **Water Research**, v. 35, n. 1, p. 23-32, 2001.

RUSIN, P. et al. Environmentally transmitted pathogens. In: MAIER, R. M., et al (Ed.). **Environmental microbiology**. San Diego: Academic Press, 2000.

SÁ, L. L. C. et al. Ocorrência de uma floração de cianobactérias tóxicas na margem direita do rio Tapajós, no Município e Santarém (Pará, Brasil). **Rev. Pan-Amaz. Saude**, v. 1, n. 1, p. 159-166, 2010.

SANGOLKAR, L. N. et al. Isolation and characterization of microcystin producing *Microcystis* from a Central Indian water bloom. **Harmful Algae**, v. 8, p. 674-684, 2009.

SANT'ANNA, C. L. et al. Review of toxic species of cyanobacteria in Brazil. **Algological Studies**, v. 126, p. 251-265, 2008.

SCHOPF, J. W. The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage. In: WHITTON, B. A. e POTTS, M. (Ed.). **The ecology of cyanobacteria**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000.

SHAMMAS, N. K.; WANG, L. K. Ozonation. In: WANG, L. K., et al (Ed.). **Physicochemical Treatment Processes**. New Jersey: Humana Press, v.3, 2005. p.315-357.

SHARMA, V. K. et al. Destruction of microcystins by conventional and advanced oxidation processes: a review. **Separation and Purification Technology**, v. 91, p. 3-17, 2012.

SHAWWA, A. R.; SMITH, D. W. Kinetics of Microcystin-LR oxidation by ozone. **Ozone Science & Engineering**, v. 23, p. 161-170, 2001.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: CHORUS, I. e BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon, 1999. p.55-124.

ŠMARDA, J. et al. S-layers on cell walls of cyanobacteria. **Micron**, v. 33, p. 257-277, 2002.

SMAYDA, T. J. What is a bloom? a commentary. **Limnol. Oceanogr.**, v. 42, n. 5, p. 1132-1136, 1997.

SÖMEK, H.; USTAOĞLU, M. R.; M., Y. A case report: algal bloom of *Microcystis aeruginosa* in a drinking-water body, Egirdir lake, Turkey. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 8, p. 177-179, 2008.

STAL, L. J. Cyanobacteria: Diversity and versatility, clues to life in extreme environments. In: SECKBACH, J. (Ed.). **Algae and cyanobacteria in extreme environments**. The Netherlands: Springer, 2007. p.661-680.

STOCKS, S. M. Mechanism and use of the commercially available viability stain, Bac Light. **Cytometry Part A**, v. 61, p. 189-195, 2004.

STRAUB, C. et al. A Day in the Life of *Microcystis aeruginosa* Strain PCC 7806 as Revealed by a Transcriptomic Analysis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. 11, 2011.

ŚWIETLIK, J. et al. Reactivity of natural organic matter fractions with chlorine dioxide and ozone. **Water Research**, v. 38, p. 547-558, 2004.

SVIRČEV, Z. et al. Molecular aspects of microcystin-induced hepatotoxicity and hepatocarcinogenesis. **Journal of Environmental Science and Health Part C**, v. 28, p. 39-59, 2010.

TAKIĆ, L. et al. A study on the kinetics of ozone decomposition in waters of different quality. **Chem. Ind.**, v. 58, n. 3, p. 118-122, 2004.

TEIXEIRA, M. R. Assessing the health risk of flotation-nanofiltration sequence for cyanobacteria and cyanotoxin removal in drinking water. In: GAULT, P. M. e MARLER, H. J. (Ed.). **Handbook on cyanobacteria: Biochemistry, biotechnology and applications**. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2009. p.349-398.

THERUVATHU, J. A. et al. Rate constants of ozone reactions with DNA, its constituents and related compounds. **J. Chem. Soc., Perkin Trans.**, v. 2, p. 269-274, 2001.

USEPA. **Method 552.2 - Determination of haloacetic acids and dalapon in drinking water by liquid-liquid extraction, derivatization and gas chromatography with electron capture detection**. Cincinnati, Ohio: U. S. Environmental Protection Agency: 1-32 p. 1995.

VAN APELDOORN, M. E. et al. Toxins of cyanobacteria. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 51, p. 7-60, 2007.

VASCONCELOS, V. Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: when ecosystems cry for help. **Limnetica**, v. 25, n. 1-2, p. 425-432, 2006.

VIEIRA, J. M. S. et al. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. **Toxicon**, v. 45, p. 901-909, 2005.

VINCENT, S.; KOTBI, A.; BARBEAU, B. Predicting hydroxyl radical activity and trace contaminants removal in ozonated water. **Ozone: Science & Engineering**, v. 32, p. 244-251, 2010.

VISSER, P. M. et al. The ecophysiology of the harmful cyanobacterium *Microcystis*: features explaining its success and measures for its control.

. In: HUISMAN, J., et al (Ed.). **Harmful Cyanobacteria**. The Netherlands: Springer, 2005. p.109-142.

VON GUNTEN, U. Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. **Water Research**, v. 37, p. 1443-1467, 2003.

WESTRICK, J. et al. A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 5, p. 1705-1714, 2010.

WHO. **Guidelines for drinking-water quality: Health criteria and other supporting information. Vol. 2**. Geneva: World Health Organization 1998a.

_____. **Guidelines for safe recreational-water environments: coastal and fresh-waters**. Geneva: World Health Organization: 209 p. 1998b.

_____. **Guidelines for safe recreational water environments. Volume 1: Coastal and fresh waters**. Geneva: World Health Organization: 253 p. 2003.

WIDRIG, D. L.; GRAY, K. A.; MCAULIFFE, K. S. Removal of algal-derived organic material by preozonation and coagulation: Monitoring changes in organic quality by pyrolysis-GC-MS. **Water Research**, v. 30, n. 11, p. 2621-2632, 1996.

WILSON, A. E.; WILSON, W. A.; HAY, M. E. Intraspecific variation in growth and morphology of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7386-7389, 2006.

YANG, X.; GUO, W.; SHEN, Q. Formation of disinfection byproducts from chlor(am)ination of algal organic matter. **Journal of Hazardous Materials**, v. 197, p. 378-388, 2011.

YASAR, A. et al. Ozone for color and COD removal of raw and anaerobically biotreated combined industrial wastewater. **Polish J. of Environ. Stud.**, v. 16, n. 2, p. 289-294, 2007.

ZAMYADI, A. et al. Release and oxidation of cell-bound saxitoxins during chlorination of *Anabaena circinalis* cells. **Environ. Sci. Technol.**, v. 44, p. 9055-9061, 2010

_____. Fate of toxic cyanobacterial cells and disinfection by-products formation after chlorination. **Water Research**, v. 46, p. 1524-1535, 2012a.

_____. Toxic cyanobacterial breakthrough and accumulation in a drinking water plant: a monitoring and treatment challenge. **Water Research**, v. 46, p. 1511-1523, 2012b.

ZHANG, J. **An integrated design approach for improving drinking water ozone disinfection treatment based on computational fluid dynamics**. 2006. 275 p. (Doctor of Philosophy in Civil Engineering). University of Waterloo, Waterloo, Ontario, Canada.

ZHANG, J. et al. Effects and mechanism of pre-ozonation on sand filtration performance. **Ozone: Science & Engineering**, v. 33, p. 66-73, 2011.

Capítulo 7

Anexos

7 ANEXOS

*Anexo A. Reagentes e concentrações utilizadas para a preparação do meio de cultivo ASM-1 (cultivo de *M. aeruginosa*)*

Solução estoque	Reagente	Concentração final (mg·L ⁻¹)
1	NaNO ₃	170
2	K ₂ HPO ₄	17,4
3	Na ₂ HPO ₄	14,2
4	MgCl ₂ ·6H ₂ O	40,62
5	MgSO ₄ ·7H ₂ O	49,33
6	CaCl ₂ ·2H ₂ O	29,4
7	FeCl ₃ ·6H ₂ O	1,0835
8	H ₃ BO ₃	2,47
9	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,3683
10	ZnCl ₂	0,44
11	Na ₂ EDTA	6,64
12	CoSO ₄ ·7H ₂ O	0,0216
13	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,00013

Correção do pH para 7,60 - 7,65 com hidróxido de sódio (NaOH) 1 M.

Anexo B. Reagentes e concentrações utilizadas para a preparação do meio de cultivo BG-11 (cultivo de *A. flos-aquae*)

Solução estoque	Reagente	Concentração final (mg·L ⁻¹)
1	NaNO ₃	1.500
2	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	40
3	MgSO ₄ ·7H ₂ O	75
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	6
5	Ácido cítrico + citrato férrico	6
6	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	1
7	Na ₂ CO ₃	20
8	Solução de metais-traço*	-
9	Solução de vitaminas F/2**	-

* Solução de metais-traço (adição de 1 mL·L⁻¹):

Reagentes	Concentrações finais (mg·L ⁻¹)
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,222
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,390
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,079
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,0494

** Solução de vitaminas F/2

Para cada litro de meio, 1 mL da solução de vitaminas foi adicionado. Solução estoque (100 mL):

- 0,1 mL de vitamina B12 (1 mg·mL⁻¹ de água)
- 1 mL de biotina (0,1 mg·mL⁻¹ de água)
- 20 mg de tiamina HCl.

Correção do pH para 7,5 com ácido clorídrico (HCl) 1 N.

Anexo C. Procedimento analítico para determinação da integridade celular pelo método BacLight™

Reagente BacLight™: misturar os reativos A e B (1:1) e congelar a mistura, assim como os demais componentes do kit a -20°C.

Solução salina estéril: solução salina de NaCl 0,085% estéril. Imediatamente antes de seu uso, filtrar em filtro Millex-GS 0,22 µm.

Protocolo:

- 1) Lavar o funil com álcool etílico por 3 vezes e água ultra-pura outras 3 vezes.
- 2) Colocar um subfiltro branco (25 mm de diâmetro e 0,8 µm de porosidade) e lavar com água ultra-pura.
- 3) Colocar um filtro preto (25 mm de diâmetro e 0,2 µm de porosidade) sobre o subfiltro branco.
- 4) Diluir a amostra com solução salina quando o número de indivíduos for muito elevado.
- 5) Pegar uma alíquota de 1 mL da amostra e colocar em um tubo estéril.
- 6) Adicionar 3 µL da solução BacLight™ preparada inicialmente (colocar diretamente dentro do líquido).
- 7) Misturar a amostra e incubar o tubo por 15 min no escuro a temperatura ambiente.
- 8) Após o período de incubação, transferir a amostra para o funil e filtrar a vácuo lentamente.
- 9) Enxaguar as paredes do filtro com 5 mL de solução salina estéril.
- 10) Colocar o filtro preto sobre uma lâmina de vidro preparada previamente com uma gota de óleo de imersão (kit BacLight™). Em seguida, acrescentar uma gota de óleo de imersão (kit BacLight™) sobre o filtro preto, colocar a lamínula e em seguida mais 1 gota de óleo de imersão (kit BacLight™) sobre a lamínula.
- 11) Ler imediatamente após a preparação em microscópio à epifluorescência com filtro GFP em aumento de 1000 vezes.

- 12) Contar as células verdes (viáveis) e vermelhas (não viáveis) na maior área possível.

Anexo D. Procedimento analítico para determinação da concentração de cloro residual livre.

Reagentes: Solução tampão fosfato pH 6,5
Solução DPD

Quando da adição da solução padrão de cloro na concentração desejada, procedeu-se, após 5 min de incubação, à determinação do residual de cloro presente na amostra, de forma a predizer a necessidade de maiores volumes de cloro para que a obtenção de um residual de $1 \pm 0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ após 24 horas de incubação fosse atendida. O mesmo procedimento descrito a seguir, foi realizado após o período completo de incubação.

Em uma cubeta de quartzo de 2 cm, adicionou-se 250 μL de solução tampão fosfato a pH 6,5 e 250 μL da solução DPD. Em seguida, foram adicionados, 5 mL da amostra. A presença de uma coloração rosa deverá ser observada. Quanto mais intensa a coloração, maior o residual de cloro. As amostras foram lidas em espectrofotômetro UV/VIS a 515 nm e em triplicata. O mesmo procedimento foi realizado com água ultra-pura para zerar o aparelho. Os valores de residual de cloro em $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ são determinados a partir das Eq. 7.1, quando a absorbância foi maior que 410, e 7.2, quando a absorbância foi menor que 410. Quando concentrações de cloro residual superiores ao determinado inicialmente foram obtidas, procedeu-se a diluição da amostra.

$$Y = 3,3209x - 0,287 \quad (7.1)$$

$$Y = 2,6427x - 0,005 \quad (7.2)$$

Estando os valores de residual de cloro compreendido entre $1 \pm 0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, cada amostra foi então coletada em frasco âmbar de 40 mL contendo uma pequena quantidade de sulfato de amônia, de forma a

interromper a reação do cloro com o material presente no meio. Os frascos foram preenchidos em sua totalidade, evitando a presença de oxigênio. As amostras foram preservadas em geladeira até a realização dos procedimentos de extração para THM e HAA.

Anexo E. Procedimento de extração de compostos de THM e HAA.

A amostra recolhida ao final da determinação da concentração de cloro residual (40 mL) foi submetida a procedimentos de extração distintos para determinação de THM e HAA, tendo sido as mesmas realizadas em duplicada.

Extração de compostos de THM:

Para a extração de THM, a 20 mL de amostra adicionou-se 4 mL de hexano (contendo $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de 1,2-dibromopropano como padrão interno) e 5 g de sulfato de sódio (Na_2SO_4), previamente seco em forno mufla a 450°C por 4 horas. A mistura foi homogeneizada em vortex por 30 s e alíquotas de 1 mL foram transferidas para vials e encaminhadas para quantificação por cromatografia gasosa.

Extração de compostos de HAA:

Na extração dos compostos de HAA, a 30 mL de amostra foram adicionados $80 \mu\text{L}$ de ácido 2,3-dicloropropiônico, 1,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, 2 g de cobre II ($\text{Cu}^{2+}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 12 g de Na_2SO_4 (previamente seco a 450°C por 4 horas em forno de mufla) e 4 mL de MTBE (contendo aproximadamente $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de 1,2-dibromopropano como padrão interno). A mistura foi homogeneizada em vortex por 1 minuto. Após a homogeneização, 1 mL da fase orgânica formada foi recolhida em um segundo vial, adicionando-se 2 mL de metanol e $100 \mu\text{L}$ de H_2SO_4 concentrado. A mistura foi incubada a 50°C durante 45 min. Após arrefecimento, foram adicionados 5 mL de uma solução Na_2SO_4 a 20% (p/v) e 1 mL de MTBE contendo padrão interno. Esta mistura foi então homogeneizada em vortex durante 30 s e alíquotas de 1 mL foram transferidas para vials e encaminhadas para quantificação por cromatografia gasosa.

O mesmo procedimento foi realizado para os padrões de HAA (EPA 552 - mix de ácidos haloacéticos).

