

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA**

GABRIELLE ARAÚJO VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO
ASSIMILÁVEL A PARTIR DA EXPOSIÇÃO DE CÉLULAS DE CIANOBACTÉRIAS
AO PROCESSO UV/H₂O₂**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CURITIBA

2021

GABRIELLE ARAÚJO VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO
ASSIMILÁVEL A PARTIR DA EXPOSIÇÃO DE CÉLULAS DE CIANOBACTÉRIAS
AO PROCESSO UV/H₂O₂**

**Assessment of the potential formation of assimilable organic carbon from the
exposure of cyanobacterial cells to the UV/H₂O₂ process**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Química, do Departamento Acadêmico
de Química e Biologia da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lucila Adriani de Almeida
Coral

CURITIBA

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

GABRIELLE ARAÚJO VASCONCELOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE CARBONO ORGÂNICO
ASSIMILÁVEL A PARTIR DA EXPOSIÇÃO DE CÉLULAS DE CIANOBACTÉRIAS
AO PROCESSO UV/H₂O₂**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Química, do Departamento Acadêmico de Química e Biologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lucila Adriani de Almeida Coral

Data de aprovação: 14/dezembro/2021.

Lucila Adriani de Almeida Coral (Orientadora)
Doutorado em Engenharia Ambiental
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Fatima de Jesus Bassetti
Doutorado em Engenharia Química
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Roberta Carolina Pelissari Rizzo Domingues
Doutorado em Engenharia Química
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**CURITIBA
2021**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha avó Benedita por ser tão compreensiva com a minha ausência mesmo num momento de perda para a conclusão deste trabalho.

Agradeço também ao meu namorado Daniel por sempre estar do meu lado, por me incentivar, por me escutar, por todo o seu suporte. Muito obrigada por tudo.

Gostaria de agradecer a minha professora/orientadora Lucila A. A. Coral principalmente pela infinita paciência comigo, pelas correções, pelos ensinamentos, por disponibilizar seu tempo e por compartilhar seu conhecimento comigo. Com absoluta certeza aprendi muito ao longo desses anos.

Gostaria de agradecer também ao Diogo, estagiário do laboratório, que me auxiliou com a manutenção do material para as minhas análises.

Deixo aqui meu muito obrigado à Servidora Rúbia que ficou responsável pelas análises de COD feitas no LAMAQ (Laboratório Multiusuário de Análises Químicas); obrigada por disponibilizar seu tempo. Também agradeço ao Guilherme Ferreira e Rodrigo Netto da Fundação Oswaldo Cruz que disponibilizaram a citometria de fluxo para as análises de COA, de fundamental importância para minha pesquisa, e pelo aporte financeiro para a realização das análises.

Agradeço a banca avaliadora, Prof^a Dr^a Fatima de Jesus Bassetti e Prof^a Dr^a Roberta Carolina Pelissari Rizzo Domingues, pela avaliação do trabalho e pelas contribuições realizadas.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que passaram ao longo da minha vida acadêmica que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse executado.

RESUMO

As cianobactérias são organismos responsáveis por aumentar a presença de matéria orgânica na água, podendo causar problemas operacionais no sistema de tratamento. Os processos oxidativos avançados são um dos métodos utilizados no intuito de reduzir a carga de matéria orgânica na água, sendo o processo UV/H₂O₂ um dos mais conhecidos. Porém, a utilização do processo oxidativo pode formar o carbono orgânico assimilável (COA) que é um subproduto formado pela mineralização parcial da matéria orgânica. Logo, este trabalho tem como objetivo avaliar inicialmente a formação de COA a partir de uma solução tampão fosfato contaminada com diferentes espécies de cianobactérias e condições de dosagem de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a fim de analisar a contribuição delas na formação do COA. Já que a quantificação do COA depende do crescimento de duas estirpes bacterianas, a *Pseudomonas fluorescens* (P-17) e a *Spirillum sp.* (NOX) e ambas não se desenvolvem na presença do H₂O₂ é importante avaliar primeiramente os agentes inibitórios de H₂O₂. Os testes ocorreram com dois possíveis agentes, o sulfito de sódio na proporção de 3,7 mg L⁻¹ e a catalase bovina na concentração de 0,2 mg L⁻¹. Foram preparados três meios, um contendo o meio de cultura líquido (acetato de sódio), outra contendo a catalase e a última contendo o sulfito de sódio. As estirpes foram inoculadas nesses meios e o crescimento foi avaliado através de citometria de fluxo em laboratório da Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz). Uma vez determinado o agente de paragem deu-se início aos ensaios oxidativos. A solução tampão fosfato era então contaminada primeiramente com a espécie *Microcystis aeruginosa* e depois com a *Raphidiopsis raciborskii*, ambas numa densidade celular de 5x10⁵ cel mL⁻¹. Essa água era encaminhada para o reator oxidativo onde adicionou-se as dosagens de H₂O₂ de 5, 20, 50 e 100 mg L⁻¹. Após, a luz era acionada e a solução permanecia, por um período de 60 minutos, em contato com a luz UV. Durante o processo, alíquotas para COD (carbono orgânico dissolvido) eram retiradas nos tempos de 5, 10, 20 e 60 minutos, filtradas e acidificadas para posterior análise. Já para a quantificação de COA, alíquotas de 50 mL foram retiradas durante o processo e 25 µL de catalase eram adicionados. Depois, as amostras eram filtradas em filtro de seringa e pasteurizadas. As estirpes bacterianas eram então inoculadas e permaneciam em estufa bacteriológica por um período de 96 horas. Após este período, as amostras eram analisadas por meio de citometria de fluxo. Como resultado, pode-se encontrar que o residual de peróxido diminuiu ao longo do tempo e esta queda foi mais acentuada para maiores dosagens H₂O₂. Pode-se observar também que a morfologia celular das cianobactérias contribui para o aumento do COA mas não para o COD e que na presença da catalase as estirpes apresentam um bom crescimento possibilitando a melhor visualização da formação de COA ao longo do processo oxidativo. Conclui-se com este estudo que a morfologia celular é um importante fator na quantificação do COA e que as concentrações de H₂O₂ também influenciam em sua formação.

Palavras-chave: Cianobactérias. Processo Oxidativo Avançado. Carbono Orgânico Assimilável.

ABSTRACT

Cyanobacteria are organisms responsible for increasing the presence of organic matter in water, which can cause operational problems in the treatment system. Advanced oxidative processes are one of the methods used in order to reduce the load of organic matter in water, the UV/H₂O₂ process being one of the best known. However, the use of the oxidative process can form assimilable organic carbon (AOC), which is a by-product formed by the partial mineralization of organic matter. Therefore, this work aims to initially evaluate the formation of AOC from a phosphate buffer solution contaminated with different species of cyanobacteria and conditions of dosage of hydrogen peroxide (H₂O₂) in order to analyze their contribution to the formation of AOC. Since AOC quantification depends on the growth of two bacterial strains, *Pseudomonas fluorescens* (P-17) and *Spirillum* sp. (NOX) and both do not develop in the presence of H₂O₂ it is important to first evaluate the inhibitory agents of H₂O₂. The tests were carried out with two possible agents, sodium sulphite at a proportion of 3.7 mg L⁻¹ and bovine catalase at a concentration of 0.2 mg L⁻¹. Three media were prepared, one containing the liquid culture medium (sodium acetate), another containing catalase and the last containing sodium sulphite. The strains were inoculated in these media and the growth was evaluated using flow cytometry in the Fiocruz laboratory (Fundação Oswaldo Cruz). Once the arresting agent was determined, the oxidative tests were started. The phosphate buffer solution was then contaminated first with the species *Microcystis aeruginosa* and then with *Raphidiopsis raciborskii*, both at a cell density of 5x10⁵ cell mL⁻¹. This water was sent to the oxidative reactor where the dosages of H₂O₂ of 5, 20, 50 and 100 mg L⁻¹ were added. Afterwards, the light was turned on and the solution remained, for a period of 60 minutes, in contact with UV light. During the process, aliquots for DOC (dissolved organic carbon) were removed at times of 5, 10, 20 and 60 minutes, filtered and acidified for further analysis. As for the quantification of AOC, 50 mL aliquots were removed during the process and 25 µL of catalase were added. Afterwards, the samples were filtered through a syringe filter and pasteurized. The bacterial strains were then inoculated and remained in a bacteriological incubator for a period of 96 hours. After this period, the samples were analyzed using flow cytometry. As a result, it can be found that the residual peroxide decreased over time and this drop was more accentuated for higher doses of H₂O₂. It can also be observed that the cellular morphology of cyanobacteria contributes to the increase in AOC but not to DOC and that, in the presence of catalase, the strains show good growth, enabling better visualization of the formation of AOC throughout the oxidative process. It is concluded with this study that cell morphology is an important factor in the quantification of AOC and that the concentrations of H₂O₂ they also influence their formation.

Keywords: Cyanobacteria. Advanced Oxidative Process. Assimilable Organic Carbon.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da célula de cianobactéria	9
Figura 2 - Representação da ocorrência de floração de cianobactérias do gênero <i>Microcystis</i> . (a) Células de cianobactérias; (b) Floração no reservatório de Barra Bonita	11
Figura 3 - Estrutura química das toxinas microcistina-LR (a) e saxitoxina (b).....	12
Figura 4 - Formas de obtenção dos radicais hidroxila a partir do POA	14
Figura 5 - Representação esquemática do funcionamento do citômetro de fluxo com células sanguíneas.....	19
Figura 6 - Fluxograma do procedimento experimental	23
Figura 7 - Regressão Linear para calcular o residual de H ₂ O ₂	27
Figura 8 - Representação do crescimento celular da cepa P-17 na presença de agentes inibidores	32
Figura 9 - Representação do crescimento celular da cepa NOX na presença de agentes inibidores	33
Figura 10 - Comportamento do decaimento de H ₂ O ₂ nos ensaios com células de <i>Microcystis aeruginosa</i>	35
Figura 11 - Comportamento do decaimento de H ₂ O ₂ nos ensaios com células de <i>Raphidiopsis raciborski</i>	35
Figura 12 - Concentração de COD ao longo do processo oxidativo para <i>Microcystis aeruginosa</i> e <i>Raphidiopsis raciborskii</i>	36
Figura 13 - Gráfico de densidade celular após leitura em citometria de fluxo	39
Figura 14 - Concentração de COA para a <i>Microcystis aeruginosa</i>	40
Figura 15 - Concentração de COA para a <i>Raphidiopsis raciborskii</i>	40
Fotografia 1 - Visão da sala de cultivo das cianobactérias.....	20
Fotografia 2 - Reator fotoquímico utilizado nos ensaios oxidativos	22
Fotografia 3 - Fotografia do sistema de refrigeração e caixa de proteção do sistema UV/H ₂ O ₂	22
Fotografia 4 - Imagens das câmaras de contagem de Neubauer (a) e Sedgewick-Rafter (b).....	27
Fotografia 5 - Citômetro de fluxo utilizado no trabalho	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVO	8
2.1	Objetivo geral	8
2.2	Objetivos específicos	8
3	REFERENCIAL TEÓRICO	9
3.1	Cianobactérias	9
3.2	Processos Oxidativos Avançados	14
3.3	Carbono Orgânico Assimilável	17
4	METODOLOGIA	20
4.1	Cultivos de cianobactérias	20
4.2	Água de Estudo	20
4.3	Sistema de Oxidação	21
4.4	Procedimento experimental	23
4.4.1	Determinação do agente de inibição	23
4.4.2	Avaliação da decomposição do H ₂ O ₂ ao longo do processo	24
4.4.3	Avaliação da formação de COD e COA	25
4.4.4	Métodos analíticos.....	26
4.4.4.1	Quantificação de H ₂ O ₂ Residual.....	26
4.4.4.2	Contagem de células.....	27
4.4.4.3	Carbono orgânico dissolvido	28
4.4.4.4	Carbono orgânico assimilável	29
4.4.4.4.1	<i>Preparo do material</i>	29
4.4.4.4.2	<i>Ativação e preparo dos inóculos líquidos das cepas P-17 e NOX</i>	29
4.4.4.4.3	<i>Quantificação do Carbono Orgânico Assimilável</i>	30
5	RESULTADOS	32
5.1	Agente Inibitório	32
5.2	Residual de Peróxido	34
5.3	Carbono Orgânico Dissolvido	36
5.4	Carbono orgânico assimilável	38
6	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

As cianobactérias são microrganismos aeróbios, procariontes e fotossintetizantes que apresentam uma organização celular muito semelhante à das bactérias, mas possuem pigmentos como os das algas (AZEVEDO; VASCONCELOS, 1998). Esses organismos podem colonizar diversos ambientes como solo e rochas, sendo que apresentam um melhor desenvolvimento em ambientes aquáticos, principalmente em rios de água doce com temperatura entre 15 e 30 °C, e pH de neutro a alcalino (ARAUJO, 2009). Quando esses ambientes se encontram ricos em nutrientes ou em processo de eutrofização, pode-se observar o fenômeno chamado de floração, que nada mais é que o crescimento excessivo das cianobactérias (AZEVEDO; BRANDÃO, 2003; MADIGAN, 2016).

O crescimento desordenado desses microrganismos pode provocar alterações organolépticas na água, problemas operacionais nas estações de tratamento e liberação de toxinas prejudiciais à saúde humana provenientes do rompimento da sua membrana celular (AZEVEDO; VASCONCELOS, 1998; AZEVEDO; BRANDÃO, 2003). A remoção das células da água bruta pode ser obtida por meio de processos convencionais de tratamento de água, destacando-se os processos de coagulação, floculação, flotação e filtração, os quais são considerados eficientes na remoção de células intactas de cianobactérias e, portanto, na remoção de compostos intracelulares (TEIXEIRA, 2007). Entretanto, metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de cianobactérias, incluindo cianotoxinas, apresentam baixa massa molar, e não são removidos de maneira eficiente por sistemas convencionais de tratamento quando dissolvidos na água; logo, se faz necessário o uso de métodos complementares de tratamento como, por exemplo, os processos oxidativos avançados (POA) (CENTURIONE; DI BERNARDO, 2003).

Os POAs têm como tendência de converter os contaminantes orgânicos de baixa massa molecular em CO₂, água e íons inorgânicos através de reações de degradação que envolvem espécies oxidantes (TEIXEIRA; JARDIM, 2004). Um dos processos que pode ser utilizado no tratamento de águas é o processo UV/H₂O₂ (TEIXEIRA; JARDIM, 2004). Esse processo pode reduzir a matéria orgânica por mineralização completa dos compostos orgânicos em CO₂, ou por uma degradação parcial que converte compostos orgânicos maiores em menores e mais biodegradáveis (KOOIJ, 1992; TORR; MOHSEN, 2007). Porém, este processo não

reduz com eficácia o carbono orgânico total presente na água, e ainda produz o carbono orgânico assimilável (COA) (DI BERNARDI; DANTAS, 2010).

O COA é capaz de interagir com o cloro na etapa de desinfecção da água e formar os trihalometanos, que são subprodutos da desinfecção (do inglês *disinfection by-products* - DBPs) potencialmente cancerígenos (TORR; MOHSEN, 2007). Além disso, o COA é um importante indicativo de estabilidade biológica da água, uma vez que pode ser assimilado pelos microrganismos presentes na água podendo ocasionar um aumento na população bacteriana, aumentando assim, a incidência de reconstruções de biofilmes que podem se formar no sistema de distribuição de água potável (HAMMES; EGLI, 2005). Por este motivo, é importante avaliar e quantificar a contribuição das cianobactérias para o aumento do COA, principalmente pós processo oxidativo, visto que o processo pode aumentar a concentração desses compostos (BAZRI, 2010).

Considerando o exposto, este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de formação de carbono orgânico assimilável a partir da exposição de células das cianobactérias *Microcystis aeruginosa* e *Raphidiopsis raciborskii* ao processo oxidativo UV/H₂O₂. Considerou-se a avaliação de duas espécies de morfologias diferentes, uma vez que a característica celular é diferente no que tange o conteúdo orgânico disponível.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial de formação de carbono orgânico assimilável a partir da exposição de células de diferentes espécies de cianobactérias ao processo oxidativo UV/H₂O₂.

2.2 Objetivos específicos

São objetivos específicos desse estudo:

- Avaliar o potencial de formação de carbono orgânico assimilável em diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a partir da utilização de uma solução tampão fosfato contaminada com as espécies de cianobactérias.
- Avaliar o crescimento das estirpes *Pseudomonas fluorescens* (P-17) e *Spirillum* (NOX) na presença da catalase e sulfito de sódio como inibidores de H₂O₂.
- Analisar o decaimento do H₂O₂ em diferentes concentrações do oxidante na presença de células de *Microcystis aeruginosa* e *Raphidiopsis raciborskii*.
- Avaliar a formação do carbono orgânico dissolvido ao longo do processo oxidativo na água de estudo na presença das células de cianobactérias.
- Avaliar o potencial de formação de carbono orgânico assimilável ao longo do processo oxidativo na presença das células de cianobactérias.
- Avaliar a influência da morfologia das espécies de cianobactéria na formação do carbono orgânico dissolvido e assimilável.

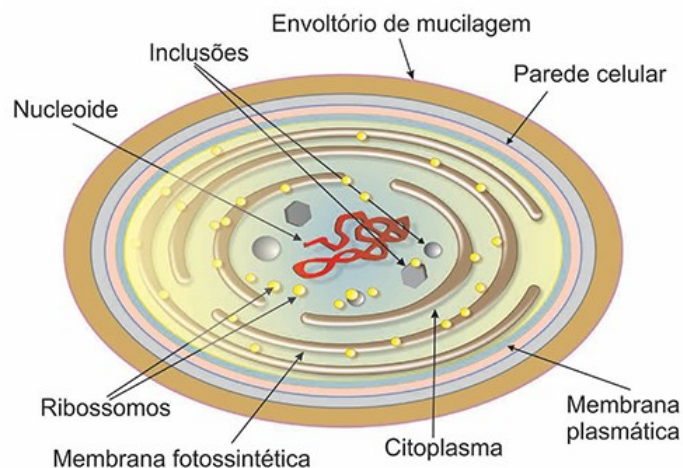
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Cianobactérias

As cianobactérias estão entre os primeiros seres vivos que apareceram na Terra há cerca de 3,5 bilhões de anos. Estes organismos evoluíram a partir de bactérias anoxigênicas passando a produzir oxigênio. O oxigênio gerado era lançado para atmosfera permitindo assim que as formas de vida multicelulares pudessem evoluir tornando-se mais complexas, originando as plantas e os animais como são atualmente conhecidos (MADIGAN, 2016).

As cianobactérias são microrganismos aeróbicos, procariontes e fotossintetizantes podendo ser denominadas por cianofíceas, *mixophyta*, *cyanophyta*, *schizophyta* e algas azuis (DI BERNARDO, 2010). As células apresentam uma parede celular delgada, coberta geralmente por um material mucilaginoso composto por polissacarídeos. No seu interior, o citoplasma é composto por ribossomos, plasmídeos e uma única molécula de DNA. Além disso, existem os tilacóides, estruturas onde se encontram os pigmentos como a clorofila-a, carotenoides e ficobilinas. Suas reservas glicídicas são formadas por grãos citoplasmáticos em forma de glicogênio e podem apresentar uma estrutura vegetativa unicelular, colonial ou filamentosa (FRANCESCHINI, 2009; JUDD, 2009). Na Figura 1 tem-se um esquema representativo da célula da cianobactéria.

Figura 1 - Representação esquemática da célula de cianobactéria



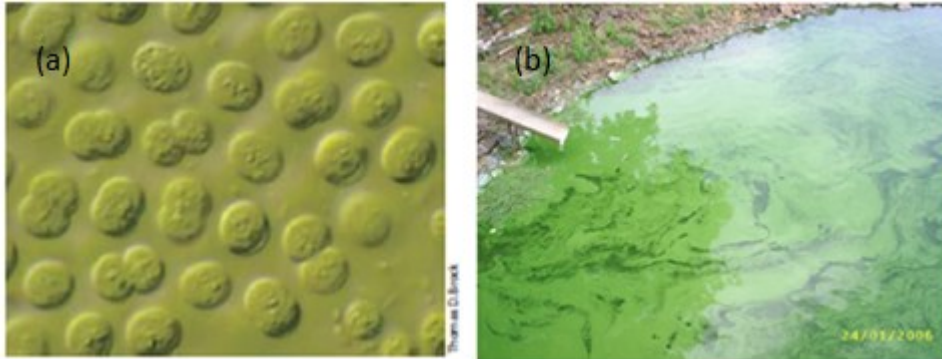
Fonte: Madigan (2016)

As cianobactérias são microrganismos cosmopolitas, pois podem ser encontradas em ambientes extremos como fontes termais, neve, deserto, e ainda na maioria dos ambientes terrestres e aquáticos, principalmente em água doce (CARVALHO, 2013). Algumas espécies de cianobactérias podem ser planctônicas, ou seja, são capazes de flutuar na coluna de água de lagos e oceanos que, quando em grande quantidade, resultam no fenômeno chamado de floração ou *bloom* (MADIGAN, 2016).

Devido às atividades humanas como a utilização de fertilizantes na agricultura, descarga de esgotos domésticos e industriais nos corpos hídricos sem o devido tratamento e a crescente taxa de urbanização, verifica-se um enriquecimento artificial de nutrientes como fósforo e nitrogênio nos ecossistemas aquáticos, fenômeno chamado de eutrofização. O excesso desses nutrientes faz com que ocorra um crescimento desordenado de cianobactérias, tornando o fenômeno de floração mais recorrente (CARVALHO, 2013).

As espécies mais comuns em florações no Brasil foram relatadas nos estudos realizados por Soares *et al.* (2007), que confirmaram um domínio da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* (correntemente utilizada como sinônimo de *Raphidiopsis raciborskii*) nas águas do rio Paraibuna, no sudeste brasileiro. Em outro estudo realizado por Cardoso *et al.* (2017), relatou-se o aparecimento das espécies *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Pseudanabaena limnetica*, *Microcystis sp.*, *Dolichospermum sp.* e *Oscillatoria sp.* em trechos de uma bacia integrante do rio São Francisco na região semiárida no nordeste brasileiro. Na Figura 2a tem-se representada a morfologia da célula de cianobactéria do gênero *Microcystis* e a Figura 2b ilustra a ocorrência de floração do mesmo gênero no reservatório de Barra Bonita, que na ocasião do evento recebia uma carga de efluentes domésticos, industriais e agrícolas e por isso apresenta características de um ambiente eutrófico com frequentes florações registradas (SOTERO-SANTOS, 2006; ARAÚJO, 2009).

Figura 2 - Representação da ocorrência de floração de cianobactérias do gênero *Microcystis*. (a) Células de cianobactérias; (b) Floração no reservatório de Barra Bonita



Fonte: Medigan (2016)

Fonte: Cetesb (2006)

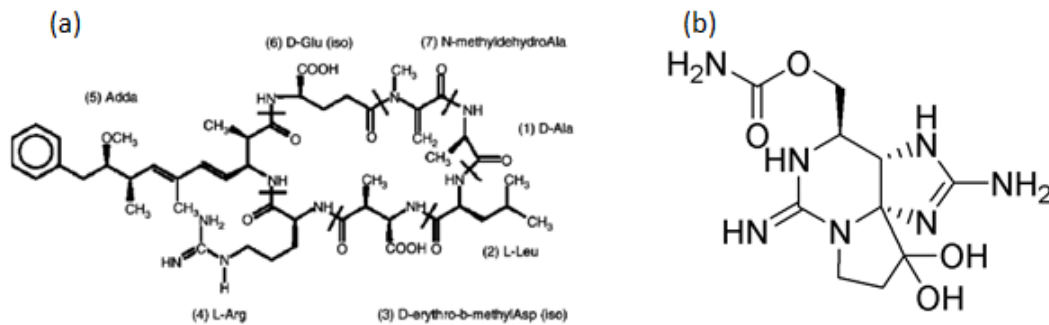
A ocorrência das florações de cianobactérias pode interferir no equilíbrio do ecossistema aquático, uma vez que altera a transparência do meio podendo ocorrer a desoxigenação do corpo hídrico e ainda pode causar problemas nas estações de tratamento, alterando as propriedades organolépticas na água. Além disso, estes microrganismos podem ser um risco à saúde humana, devido à sua capacidade de produzir metabólitos secundários, denominados cianotoxinas (CARVALHO, 2013).

As cianotoxinas podem ser agrupadas em dois grandes grupos, as endotoxinas e as exotoxinas. As endotoxinas são constituintes da parede celular das cianobactérias, sendo armazenadas no seu interior, sendo liberadas para o meio quando da ocorrência de apoptose ou quando o organismo é submetido a algum estresse celular. Já as exotoxinas são proteínas, que são liberadas em baixa concentração para o meio, mas apresenta uma ação tóxica relativamente alta (ALVES, 2005).

As toxinas podem ainda ser classificadas quanto à sua estrutura química e sua ação farmacológica podendo ser divididas em: neurotoxinas, hepatotoxinas e dermatotoxinas (ALVES, 2005). As neurotoxinas atuam especificamente no sistema nervoso, sendo produzidas principalmente pelos gêneros *Anabaena sp.*, *Aphanizomenon sp.*, *Oscillatoria sp.*, *Trichodesmium sp.* e *Cylindrospermopsis sp.*, sendo os três tipos de toxinas produzidas a partir dessas espécies a anatoxina-a, saxitoxinas e homoanatoxina (ALVES, 2005; AZEVEDO, 1998). Já as hepatotoxinas são toxinas que atuam no fígado e a intoxicação apresenta uma ação mais lenta, podendo levar à morte em horas ou dias (FERNANDES, 2005). São produtoras dessa classe de toxina espécies dos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc* e *Cylindrospermopsis*, sendo a toxina produzida denominada de microcistina

(ALVES, 2005; CARMICHAEL, 1994; FERNANDES, 2005). As dermatotoxinas causam irritações na pele e apresentam um menor dano se comparado às toxinas anteriormente citadas (ALVES, 2005). Na Figura 3 encontram-se representadas as estruturas químicas gerais das saxitoxinas e das microcistinas.

Figura 3 - Estrutura química das toxinas microcistina-LR (a) e saxitoxina (b)



Fonte: Alves (2005)

A ocorrência de intoxicação em humanos e animais causada pela liberação de cianotoxinas na água é cada vez mais frequente e já foi observada em diversos países como Austrália, Inglaterra, China e África do Sul (CARVALHO, 2013). Os primeiros relatos datam de 1989, em que, em uma cidade rural da Austrália, a água de abastecimento foi tratada com um algicida, sulfato de cobre, ocasionando a lise celular da espécie *Microcystis aeruginosa*, liberando hepatotoxinas e causando danos hepáticos na população (AZEVEDO, 2003). Já no Brasil, no ano de 1996, aproximadamente 60 pacientes de uma clínica de hemodiálise, localizada na cidade de Caruaru-PE, morreram de hepatite tóxica devido à intoxicação por microcistinas, detectada através de exame de sangue. Investigações mostraram que ocorreram problemas no tratamento da água, resultando na contaminação dos filtros da clínica (ARAUJO, 2009; SÁ, 2010).

A legislação em vigor relativa ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e o seu padrão de potabilidade é a Portaria GM/MS nº 888 de 04 de maio de 2021, que altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017 (BRASIL, 2021). A Portaria dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. De acordo com a legislação, o monitoramento deve ocorrer mensalmente no ponto de captação quando o número de células de cianobactérias

não exceder 10.000 células mL⁻¹. Quando a densidade celular for superior a 20.000 células mL⁻¹ no ponto de captação, análises semanais da concentração de microcistinas, saxitoxinas e cilindrospermopsina devem ser realizadas. Os valores máximos permitidos (VMP) de cianotoxinas estão indicados na Tabela 1, conforme Portaria GM/MS nº 888 (BRASIL, 2021). As mesmas concentrações são consideradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (OMS, 1995).

Tabela 1 - Valores máximos permitidos para cianotoxinas na água para consumo humano conforme Portaria GM/MS nº 888

Parâmetro	Condição	VMP*
Microcistina	Análise obrigatória para consumo humano	1,0 µg L ⁻¹ (equivalente de MCYST-LR)
Saxitoxina	Análise obrigatória para consumo humano	1,0
Cilindrospermopsina	Análise obrigatória para consumo humano	1,0 µg L ⁻¹ (equivalente STX)

* VMP = Valor Máximo Permitido.

Fonte: Brasil (2021)

Além da preocupação com a presença das cianotoxinas, a matéria orgânica proveniente das células de cianobactérias (intra ou extracelular) pode ainda interagir com o cloro na etapa de cloração nas estações de tratamento, resultando na geração de importantes precursores de subprodutos de desinfecção (DBP) como os trihalometanos (THM), que apresentam um elevado potencial carcinogênico (CUI *et al.*, 2002; FANG, 2010). Essa observação foi feita inicialmente por Morris e Baum¹ em 1978¹, que demonstraram que a cloração da matéria orgânica proveniente da massa algal pode produzir clorofórmio (AZEVEDO, 2003).

Em outra pesquisa realizada em 1998 por Graham *et al.* foi estimado que em uma floração de cianobactérias da espécie *Anabaena flos-aquae*, a cloração contribuiu com a produção de cerca de 1,1 mg L⁻¹ de THM total a partir de células viáveis e 0,2 mg L⁻¹ de THM total a partir das substâncias extracelulares, valores consideravelmente acima do valor recomendado pela OMS para água potável que é de 100 µg L⁻¹ (AZEVEDO, 2003; OMS, 1995).

¹MORRIS, J. C.; BAUM, B. Precursors and mechanisms of haloform formation in the chlorination of water supplies. **Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects**, v. 2, 1978.

3.2 Processos Oxidativos Avançados

Os Processos Oxidativos Avançados (POA) vêm ganhando cada vez mais relevância na pesquisa e desenvolvimento de tecnologia de tratamento de águas e efluentes, por se tratar de um método que apresenta estabilidade química devido a formação das espécies oxidantes e que reduz os impactos ambientais, comparados a outros métodos (MARCELINO, 2013; ARAÚJO, 2016). Esses processos caracterizam-se por converter contaminantes orgânicos a substâncias mais degradáveis como o dióxido de carbono (CO_2), água e ânions inorgânicos, através de reações de degradação que utilizam espécies altamente oxidantes, principalmente os radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) (MARCELINO *et al.*, 2013; TEIXEIRA; JARDIM, 2004). Esses radicais podem ser gerados a partir de diversas formas como apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Formas de obtenção dos radicais hidroxila a partir do POA



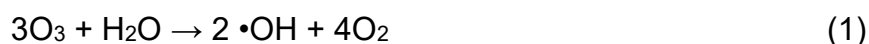
Fonte: adaptado de Marcelino *et al.* (2003)

Os POAs podem ser divididos em dois grandes sistemas: o sistema heterogêneo e o sistema homogêneo. O sistema heterogêneo representa as reações que ocorrem com a presença de catalisadores sólidos como, por exemplo, $\text{TiO}_2/\text{O}_2/\text{UV}$. Já o homogêneo ocorre na ausência de catalisadores sólidos. Ambos os sistemas

podem ainda ser associados ou não à radiação ultravioleta (UV) (TEIXEIRA; JARDIM, 2004).

Os POAs ainda podem ser classificados em processos químicos, fotoquímicos, sonoquímicos e eletroquímicos. Dentre os POAs, os processos fotoquímicos são os que apresentam uma tecnologia mais simples e mais eficiente (ARAÚJO, 2016). Geralmente neste processo, um agente oxidante forte como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ozônio (O_3) é associado à radiação UV degradando os poluentes através da formação de radicais $\bullet OH$ por oxidação direta ou fotodecomposição (ARAÚJO, 2016). Dentre os sistemas fotoquímicos pode-se destacar o sistema UV/ O_3 e UV/ H_2O_2 .

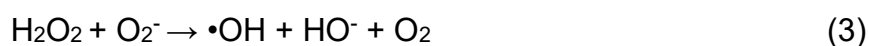
A elevada natureza eletrofílica do ozônio faz com que ele possa reagir com diversos grupos funcionais orgânicos, incluindo duplas e triplas ligações carbono-carbono de estrutura aberta e alguns aromáticos, grupos funcionais organometálicos e ainda com algumas ligações carbono-cloro (NOYES, 1991). Em soluções aquosas, o O_3 pode reagir de duas maneiras: por reação direta, em que o O_3 molecular reage diretamente com o composto, ou de maneira indireta, através da formação dos radicais $\bullet OH$ (GOTTSCHALK; LIBRA; SAUPE 2009). As reações indiretas são consideradas mais rápidas e menos seletivas que as reações diretas, podendo, desse modo, reagir de maneira mais fácil e rápida com diversos compostos orgânicos presentes na água (VON GUNTEN, 2003). Porém pelo ozônio atacar mais especificamente centros nucleofílicos ela é mais seletiva em comparação a outros métodos e também apresenta um elevado custo de implantação. (TEIXEIRA; JARDIM, 2004) Uma forma simplificada de apresentar a reação que envolve esse tipo de sistema é indicada na Equação 1.



O processo que combina o H_2O_2 com a radiação UV é muito mais eficiente do que o uso de cada um individualmente. Isso acontece

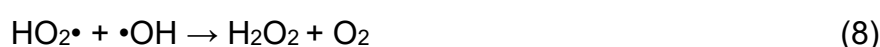
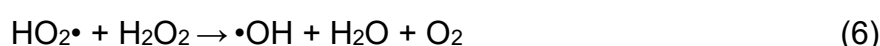
devido a uma reação indireta que ocorre e que é muito eficiente pelo fato de o potencial de oxidação do radical hidroxila ($E^\circ = +2,80 V$) ser muito mais elevado que o potencial de oxidação do H_2O_2 molecular ($E^\circ = +1,77V$), sendo assim capaz de promover uma oxidação mais energética. A formação desses radicais envolve a quebra homolítica da molécula de peróxido de hidrogênio com a cisão de uma ligação

sigma de elevada energia (FIOREZE, 2014). A formação dos radicais e do produto da oxidação está representada nas Equações 2, 3 e 4.



O processo UV/H₂O₂ é um processo vantajoso por ser comercialmente mais acessível, pelo oxidante poder ser armazenado, pela elevada solubilidade do H₂O₂ em água, por gerar dois radicais $\cdot\text{OH}$ por molécula de H₂O₂ fotolisada, e por apresentar uma alta estabilidade térmica (FIOREZE, 2014; MOMENTI, 2006). Porém, a taxa de oxidação química é limitada pela taxa de formação dos radicais hidroxila, e o H₂O₂ pode funcionar como um capturador de radicais (FIOREZE, 2014; MOMENTI, 2006).

O excesso de H₂O₂ pode originar reações competitivas com os radicais $\cdot\text{OH}$, o que gera um efeito inibitório na degradação das moléculas. O excesso de H₂O₂ acaba capturando os radicais presentes no meio, podendo recombinar-se, gerando outros radicais com menor poder oxidativo como o radical hidroperóxil (HO₂ \cdot). Nas Equações 5 a 9 têm-se representadas as possibilidades de recombinação dos radicais (HUANG; SHU, 1995).



Outra limitação do processo UV/H₂O₂ para o tratamento de efluentes seria a baixa velocidade de degradação diante de substâncias complexas como, por exemplo, os ácidos húmicos. Essas substâncias são fortes absorvedores da radiação incidente; conseqüentemente, maiores dosagens de H₂O₂ são necessárias para acontecer o efeito sinérgico necessário entre os oxidantes (MOMENTI, 2006).

O processo UV/H₂O₂ pode ser utilizado também para o tratamento de água e tem como principal vantagem a não formação de subprodutos de desinfecção, tais como halogenados e íons brometo (IKEHATA; EL-DIN 2006). Porém, quando existe a

presença da matéria orgânica natural (MON), incluindo células de cianobactérias, a remoção de micropoluentes utilizando o sistema UV/H₂O₂ nas condições comerciais (2000 mJ cm⁻² e [H₂O₂] até 20 mg L⁻¹) não são suficientes para eliminar/mineralizar a MON (SARATHY; MOHSENI, 2010). A MON pode sofrer ainda uma alteração estrutural ou uma transformação capaz de afetar a qualidade da água. Na literatura, o impacto que o sistema UV/H₂O₂ pode provocar é avaliada através da medição do carbono orgânico assimilável (COA) (BAZRI; BARBEAU; MOHSENI, 2012).

3.3 Carbono Orgânico Assimilável

A matéria orgânica para a água de consumo pode vir através da matéria orgânica natural, por atividade humana ou produtos gerados pelas reações químicas decorrente ao tratamento da água e sua distribuição (WESTPHALEN, 2016). O parâmetro que avalia a concentração da matéria orgânica é chamado de carbono orgânico total (COT) que pode ser fracionado em COD e particulado. A parte referente ao COD que mede a quantidade que pode ser degradado pelo metabolismo microbiano é chamado de carbono dissolvido biodegradável (CODB) e o COA mede essa fração que pode ser rapidamente assimilada pelos microrganismos. O que torna o COA um importante parâmetro para avaliar a estabilidade biológica já que o COA pode servir de doador de elétrons para reação de oxidação e redução de microrganismo importantes para o crescimento celular o que favorece o crescimento de microrganismos em estações de tratamento (Westphalen, 2016).

O carbono orgânico assimilável (COA) corresponde a uma fração do carbono orgânico total (COT), cerca de 0,1-9%, presente na água, sendo a fração mais facilmente biodegradável por possuir uma massa molar relativamente baixa (KOOIJ, 1992). Vários estudos ligam o COA diretamente à reconstrução e formação de biofilme no sistema de distribuição de água potável (HAMMES; EGLI, 2005). Para uma água biologicamente estável, os valores de COA devem estar entre 10 e 50 µg de COA L⁻¹, segundo Kaplan *et al.* (1993).

A quantificação do COA pode ser realizada através do crescimento microbiano de duas estirpes bacterianas, a *Pseudomonas fluorescens* P-17 e *Spirillum sp.* NOX. A espécie P-17 utiliza uma ampla variedade de compostos como aminoácidos e carboidratos e não metaboliza ácidos carboxílicos e ácidos oxálicos,

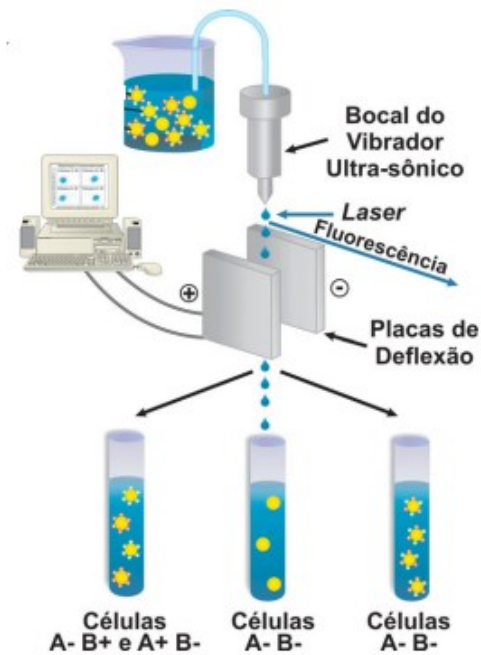
um dos compostos habitualmente produzidos durante o processo oxidativo. Por isso, a estirpe NOX é utilizada, pois ela é capaz de crescer em meios contendo ácidos carboxílicos e é capaz de utilizar também o oxalato. Além disso, a NOX não é capaz de assimilar carboidratos, álcoois, aminoácidos ou ácidos aromáticos (ROCHA, 2007; ESCOBAR; RANDALL; TAYLOR, 2010). Esse crescimento pode ser monitorado nas amostras de água por contagem de colônias, que posteriormente é convertido em unidades de COA como μg acetato-C/L. Os ensaios convencionais envolvendo COA foram inicialmente desenvolvidos por van der Kooji 1992.

Nos ensaios convencionais desenvolvidos por van der Kooij (1992), as amostras eram armazenadas em frascos tratados com tiosulfato de sódio que funciona como um inibidor de crescimento microbiano e um inativador do cloro residual que possa estar presente. Após, as amostras são pasteurizadas para inativar qualquer microrganismo existente, e então as estirpes bacterianas são inoculadas normalmente numa concentração de 500 UFC mL⁻¹. As amostras são então incubadas por um período de 9 dias e o crescimento microbiano é quantificado por plaqueamento em Agar nutritivo (BAZRI, 2010; ROCHA, 2007).

Outro método que surgiu como principal ferramenta para a quantificação e análise celular é a citometria de fluxo associada à coloração fluorescente. A principal vantagem que esta técnica apresenta é a enumeração precisa de todas as células, incluindo aquelas que são incultúvel ou inativa (HAMMES; EGLI, 2005).

No sistema, as partículas e células individuais são suspensas em um fluido e passam por um afinamento até que o fluido de revestimento faça com que cada célula passe individualmente por um feixe que contém uma luz de excitação, geralmente um laser. Este processo também é conhecido como focagem hidrodinâmica. Quando o feixe de luz atinge a célula, a luz se espalha para frente e para os lados. Esse espalhamento da luz é coletado via detectores e transformada em sinais que serão transmitidos para o computador. Os sinais coletados *Forward Scatter* (FS) e *Side Scatter* (SS) fornecem informações sobre o tamanho e granularidade da célula, respectivamente (BAZRI, 2010). Na Figura 5 tem-se representado de maneira esquematizada o funcionamento de um citômetro de fluxo.

Figura 5 - Representação esquemática do funcionamento do citômetro de fluxo com células sanguíneas



Fonte: Bender (2008)

Ainda, a técnica permite diferenciar várias células utilizando agentes fluorados especiais. O raio laser emitido da fonte excita o corante adicionado à célula para um nível de energia mais alto. A vida útil neste estágio é extremamente curta e o fluoróforo emite luz num comprimento de onda maior ao retornar ao seu nível de energia fundamental. A luz emitida pela célula excitada é então detectada com coletores especiais que produzem sinais que são posteriormente traduzidos num software de computador (BAZRI, 2010).

4 METODOLOGIA

4.1 Cultivos de cianobactérias

Neste trabalho, foram utilizadas duas cepas potencialmente tóxicas de cianobactérias. A cepa tóxica da espécie *Microcystis aeruginosa* (BCCUSP) foi cedida pelo Departamento de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo (USP) e a espécie *Raphidiopsis raciborskii* (T3) foi cedida pelo Laboratório de Toxicologia Ambiental da Universidade Federal do Paraná, tendo a cepa sido obtida previamente do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias, da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As cepas foram cultivadas em laboratório em meio inorgânico de crescimento ASM-1. Os cultivos permanecem em uma sala onde são mantidos sob aeração constante, temperatura de 25 ± 1 °C e regime de fotoperíodo de 16/8 (16 horas com luz e 8 horas de escuro) (Fotografia 1). Para os ensaios, foi utilizado tempo de cultivo de aproximadamente 30 a 40 dias.

Fotografia 1 - Visão da sala de cultivo das cianobactérias



Fonte: Autoria própria (2021)

4.2 Água de Estudo

Para a realização dos ensaios utilizou-se uma solução tampão fosfato contaminada com as espécies de cianobactérias. A solução tampão fosfato foi preparada num balão volumétrico a partir da diluição de 250 mL de fosfato de potássio

monobásico com 195,5 mL de hidróxido de sódio de concentração igual 0,2 M, com ajuste do pH para 7,4 a partir de soluções de H₃PO₄ ou NaOH 0,2 molar.

Após o preparo, à solução tampão era adicionado um volume correspondente a densidade celular da espécie de cianobactéria de interesse, tendo-se realizado os ensaios separadamente para cada uma das espécies.

A obtenção das células foi feita a partir de centrifugação do cultivo a 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o material concentrado foi ressuspenso na solução tampão fosfato. A densidade celular foi determinada através de contagem em microscópio óptico com o auxílio de câmara de Neubauer para a *M. aeruginosa* e com a câmara de Sedgewick-Rafter para *R. raciborskii*. Após as contagens, calculou-se o volume de cada cultivo, o qual foi então adicionado à solução tampão para atingir a densidade celular desejada (5×10^5 cel mL⁻¹).

4.3 Sistema de Oxidação

Para a oxidação da água de estudo foi utilizado um reator de vidro com capacidade total de 1,1 litros, sendo o volume útil de 0,8 litros (Fotografia 2), conectado a um sistema de refrigeração e pontos de entrada e saída de amostra. Para a fonte de radiação UV foi utilizada uma lâmpada de mercúrio de alta pressão (125 W) inserida em um bulbo de quartzo, o qual permanece mergulhado no líquido amostral, permitindo a irradiação no interior do sistema de maneira uniforme.

Fotografia 2 - Reator fotoquímico utilizado nos ensaios oxidativos

Fonte: Siquerolo (2017)

Como medida de proteção para o usuário em relação à radiação ultravioleta, o sistema permanece dentro de uma caixa de proteção construída em madeira. A refrigeração do sistema foi realizada por meio de um banho termostaticado que contém uma bomba de recirculação, o que permite manter a temperatura no interior do reator a 20 ± 1 °C (Fotografia 3).

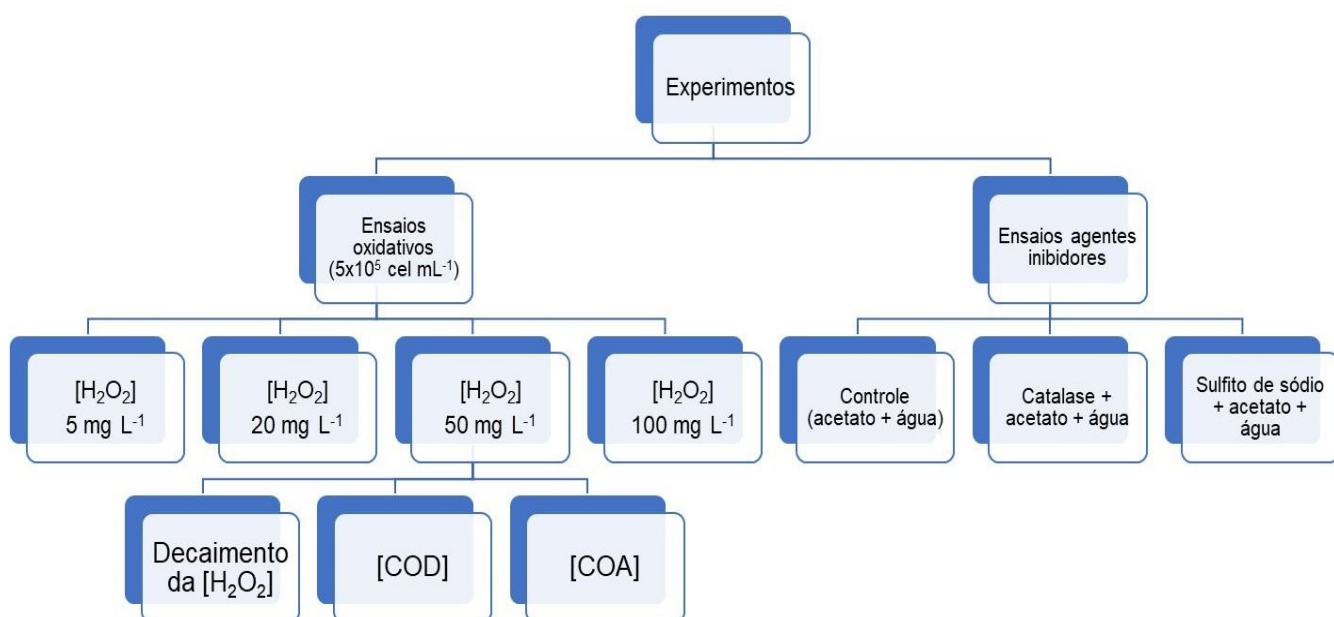
Fotografia 3 - Fotografia do sistema de refrigeração e caixa de proteção do sistema UV/H₂O₂

Fonte: Siquerolo (2017)

4.4 Procedimento experimental

O presente estudo foi dividido em ensaios oxidativos e ensaios de agentes inibitórios. Para os ensaios oxidativos foram realizados experimentos com diferentes concentrações de H_2O_2 . Para cada concentração escolhida foram realizadas análises de decaimento de H_2O_2 , carbono orgânico dissolvido (COD) e carbono orgânico assimilável (COA). Já nos ensaios dos agentes inibitórios dedicou a avaliar o crescimento das cepas *Pseudomonas fluorescens* (P-17) e *Spirillum* (NOX), necessárias para a quantificação do COA, em meio inorgânico e orgânico. Na Figura 6 têm-se um fluxograma representativo das etapas previstas no procedimento experimental.

Figura 6 - Fluxograma do procedimento experimental



Fonte: autoria própria (2021)

4.4.1 Determinação do agente de inibição

Na presença do H_2O_2 as cepas bacterianas P-17 e NOX não se desenvolvem, logo não se torna possível avaliar o crescimento dessas estirpes ao longo do processo oxidativo. Como consequência, a análise de COA ao longo do processo oxidativo não poderia ser realizada. A fim de tornar o estudo possível se fez necessária a avaliação

de algum agente que inibisse o efeito do H_2O_2 e não comprometesse o crescimento celular dos microrganismos. Para isso, dois agentes foram testados, sendo o primeiro um agente inorgânico, neste caso o sulfito de sódio (Na_2SO_3) marca Neon, e outro orgânico, a catalase de fígado de boi em pó (Sigma-Aldrich) com concentração equivalente a 2000-5000 unidades/mg de proteína.

O sulfito de sódio foi preparado a partir de uma solução mãe de concentração igual a 1000 mg L^{-1} . A partir da solução mãe pipetou-se uma alíquota de $19\ \mu\text{L}$ e avolumou-se em um balão de 50 mL a fim de obter uma concentração final de $3,7\text{ mg L}^{-1}$. Já para preparar a solução da catalase, $0,02\text{ g}$ do reagente foram dissolvidos em 50 mL de solução tampão fosfato obtendo-se uma concentração final de $0,4\text{ mg mL}^{-1}$. A partir dessa solução, para obter a concentração de $2 \times 10^{-4}\text{ mg mL}^{-1}$, uma alíquota de $25\ \mu\text{L}$ foi retirada e avolumada com solução tampão fosfato em balão de 50 mL. As concentrações foram escolhidas de acordo com Liu (2003).

Para o experimento, preparou-se uma solução como controle que era composta somente de água e acetato de sódio na concentração de 400 mg L^{-1} e outras duas, uma contendo o sulfito de sódio e a outra a solução de catalase. Previamente, realizou-se a quantificação do número de organismos nos cultivos das cepas P-17 e NOX por meio de citometria de fluxo, de forma a conhecer a densidade celular inicial nas amostras após a inoculação. A cada uma das soluções, foi acrescentado volume igual a 1 mL do cultivo da P-17 e 450 μL do cultivo da NOX. As soluções foram inoculadas em estufa bacteriológica por 4 (quatro) dias, retirando-se a cada 24 h alíquotas de 630 μL , as quais eram acondicionadas em frascos *ependorf* de 1 mL e preservadas em paraformaldeído 1,5%. As amostras das soluções testes foram então analisadas por citometria de fluxo e avaliou-se o crescimento das cepas. Todos os testes foram realizados em triplicata e as inoculações foram feitas para cada espécie de forma separada.

4.4.2 Avaliação da decomposição do H_2O_2 ao longo do processo

Para as análises da decomposição do peróxido, uma alíquota de 2000 mL da água de estudo foi contaminada primeiramente com $500.000\text{ cel mL}^{-1}$ da espécie *Microcystis aeruginosa* e depois com a espécie *Raphidiopsis raciborski*. A densidade de $5 \times 10^5\text{ cel mL}^{-1}$ foi escolhida por estar acima do limite máximo permitido pela

legislação atual (Portaria GM/MS nº 888) (BRASIL, 2021), a fim de caracterizar uma floração de cianobactérias. Após a contaminação da água, uma alíquota de 800 mL era encaminhada para o reator oxidativo, adicionando-se as seguintes dosagens de peróxido de hidrogênio: 5 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹. Em seguida, a luz UV era acionada, e alíquotas de 4 mL eram retiradas diretamente para os tubos de ensaio que continham água nos tempos 2,5, 5, 10, 20, 30, 45 e 60 minutos. Após o metavanadato era adicionado e a leitura feita pelo espectrofotômetro.

4.4.3 Avaliação da formação de COD e COA

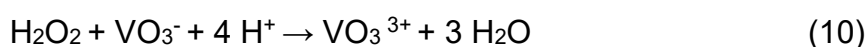
Para as análises de COD uma alíquota da água de estudo foi recolhida antes da adição do H₂O₂, de forma a avaliar o possível aumento da concentração de COD após a oxidação da amostra contendo as células de cianobactérias. Após, adicionou-se o H₂O₂ e a água de estudo foi encaminhada para o reator oxidativo onde permaneceu por um período de 60 minutos em contato com a luz UV. Durante o processo oxidativo, foram coletadas alíquotas de 30 mL nos tempos 5, 10, 20 e 60 minutos e inseridos em frascos livres de carbono contendo solução de sulfito de sódio, cujo volume adicionado corresponde a relação: [3,7 mg L⁻¹]/g de H₂O₂. As amostras coletadas foram filtradas em membrana de acetato de celulose com 0,45 µm de porosidade e acidificadas para posterior quantificação de COD, o qual foi determinado seguindo o método de combustão a 680 °C e detecção de CO₂ (APHA, 2005).

O COA foi analisado da mesma forma que para COD, em que uma alíquota de 50 mL foi retirada da água de estudo sem a presença do H₂O₂ para determinar a concentração inicial de COA. Nos mesmos tempos de oxidação indicados para o COD, alíquotas de 50 mL eram retiradas do reator e adicionava-se 25 µL de catalase bovina já que o sulfito de sódio interfere na quantificação de COA. Depois as amostras eram filtradas em filtro de seringa de PVDF com 0,22 µm de porosidade e pasteurizadas a 70 °C por um período de 30 minutos. (HAMMES; EGLI, 2005). Em seguida, para cada amostra, em frascos separados, era inoculado uma densidade celular correspondente a 1 x 10⁴ cel mL⁻¹ dos cultivos das espécies P-17 e NOX, e estas permaneceram em estufa bacteriológica a 25 °C por um período de 4 (quatro) dias para posterior análise por citometria de fluxo.

4.4.4 Métodos analíticos

4.4.4.1 Quantificação de H₂O₂ Residual

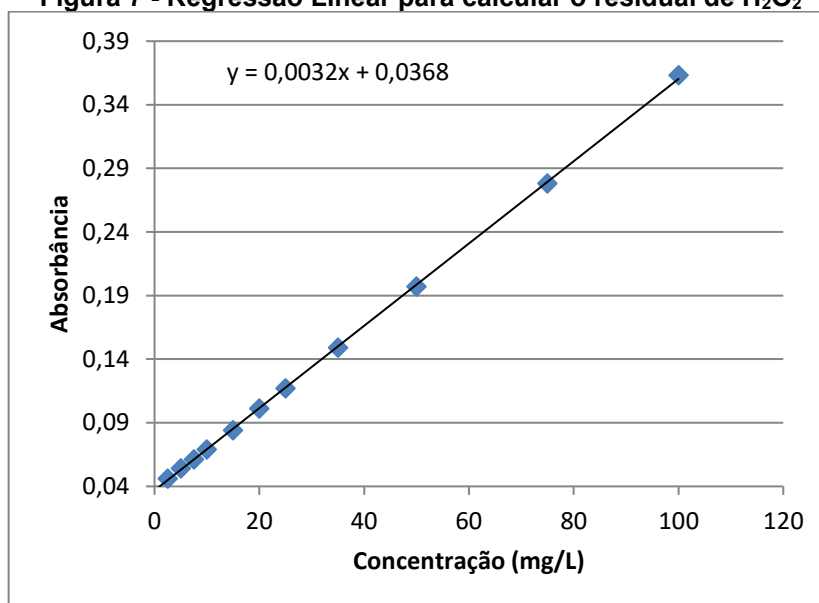
Para as análises de residual de H₂O₂ foi utilizada a metodologia proposta por Nogueira (2005), que utiliza uma solução de metavanadato de amônio (NH₄VO₃) como indicador da presença de H₂O₂ devido à formação do cátion peroxovanádio de cor vermelho-laranja como descrito na Equação 10.



A solução de NH₄VO₃ foi preparada em uma concentração de 0,06 mol L⁻¹ pesando-se o NH₄VO₃ e dissolvendo-o inicialmente em 80 mL de água destilada. Após, foi adicionado 5,56 mL de uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) em concentração de 9 mol L⁻¹.

Para a quantificação do residual de H₂O₂, foi preparada uma solução estoque em concentração de 100 mg L⁻¹ de H₂O₂ e a partir dela foram feitas diluições para preparar a curva de calibração. Para as leituras dos pontos da curva e das amostras foram preparados tubos de ensaio que continham 4,4 mL de água destilada. Depois adicionava-se uma alíquota de 4 mL da amostra e 1,6 mL da solução de NH₄VO₃. Após os tubos eram fechados e homogeneizados e a absorbância das amostras e dos pontos da curva eram lidas em espectrofotômetro UV-Vis (Global Trade Technology) num comprimento de onda de 450 nm. Após as leituras, os dados foram colocados numa planilha do Excel e uma regressão linear foi feita e a equação expressa a partir do gráfico foi utilizada para calcular os valores residuais (Figura 7). O valor do R² foi igual a 0,9998.

Figura 7 - Regressão Linear para calcular o residual de H₂O₂

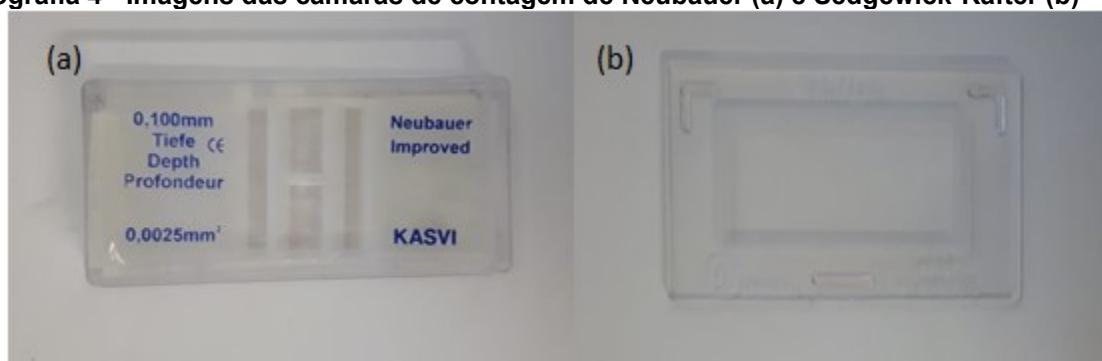


Fonte: Autoria própria (2021)

4.4.4.2 Contagem de células

Para determinar a densidade celular das espécies *Microcystis aeruginosa* e *Raphidiopsis raciborskii* foi utilizado um dos métodos mais comuns que corresponde à contagem microscópica (MADIGAN, 2016). Duas câmaras foram utilizadas para auxiliar na contagem, a câmara de Neubauer para as células de *Microcystis aeruginosa* e a Sedgewick-Rafter para a *Raphidiopsis raciborskii* como apresentado na Fotografia 4.

Fotografia 4 - Imagens das câmaras de contagem de Neubauer (a) e Sedgewick-Rafter (b)



Fonte: Autoria própria (2021)

A contagem foi feita quando os cultivos de *Microcystis aeruginosa* e *Raphidiopsis raciborskii* atingiam o estado exponencial na curva de crescimento, que para estas espécies é cerca de 20 dias. Neste ponto, uma alíquota de 45 mL do cultivo

celular era centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos. O precipitado formado foi então ressuspenso com uma solução tampão fosfato e em seguida 1 (um) mL foi recolhida e diluída em 10 mL de água destilada para posterior leituras nas respectivas câmaras.

Para calcular a densidade celular da *Microcystis aeruginosa* foi utilizando a câmara de Neubauer, foi utilizada a Equação 11, em que C é a concentração celular que é dada através do número de células contadas dividido pelo número de quadrantes presente na câmara, D é a diluição e 10^4 é o fator de correção da câmara.

$$N^{\circ} \text{ de células } mL^{-1} = C \times D \times 10^4 \quad (11)$$

Já o cálculo para a densidade celular da *Raphidiopsis raciborskii* foi utilizado a câmara de Sedgewick-Rafter e o cálculo para obtenção do número de células foi realizado a partir da Equação 12, em que A representa a área de cada campo em mm^2 , D é a profundidade de cada campo (mm), C é o número de campos contados, N_0 é o número de filamentos contados, e F é o número médio de células por filamento o qual neste trabalho o valor adotado foi de 31 células por filamento.

$$N^{\circ} \text{ de células } mL^{-1} = \frac{N_0 \times 1000 \text{ mm}^3}{A \times D \times C} \times F \quad (12)$$

4.4.4.3 Carbono orgânico dissolvido

Para a quantificação de COD, as amostras foram coletadas antes, durante e ao final de cada ensaio UV/H₂O₂. Para as amostras em que foram adicionadas as células de cianobactérias, foi realizada a filtração das mesmas em membrana de acetato de celulose de 0,45 μm de porosidade. As amostras foram preservadas com uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 3 M e mantidas em frascos de vidro previamente tratados por aquecimento em forno mufla a 550 °C por 4 (quatro) horas para eliminação de carbono, e sob refrigeração até a quantificação. As leituras foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Análises Químicas - LAMAQ (UTFPR, Sede Ecoville) no analisador Thermo HiperTOC seguindo o método de combustão a 680 °C e detecção de CO₂ (APHA, 2005).

4.4.4.4 Carbono orgânico assimilável

4.4.4.4.1 *Preparo do material*

Uma vez que todo o material utilizado para as análises quantitativas de COA devem estar livres de carbono, toda a vidraria foi inicialmente lavada com detergente neutro e enxaguada com água destilada, sendo mantida posteriormente em banho de HCl 0,1 N por 24 h. Após este período, o material foi enxaguado três vezes com água ultrapura. Em seguida, o material já seco permaneceu por 4 (quatro) horas a 550 °C em forno mufla para a eliminação de residuais de carbono.

Os materiais que não podem ser aquecidos, foram imersos em uma solução de persulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 10% a 60 °C por 60 minutos e depois de resfriado foram enxaguados três vezes com água ultrapura e secos a temperatura ambiente.

4.4.4.4.2 *Ativação e preparo dos inóculos líquidos das cepas P-17 e NOX*

Para quantificar o COA, foram utilizadas duas cepas bacterianas, a *Pseudomonas fluorescens* (P-17) e a *Spirillum sp.* (NOX). Os microrganismos foram adquiridos pelo Laboratório de Tratamento e Potabilização de Água através da ATCC (American Type Culture Collection) e foram ativadas no Laboratório de Microbiologia da UTFPR Campus Curitiba, Sede Ecoville. A ativação foi realizada através de inoculação em placas primárias em meio ágar nutriente e incubação em estufa bacteriológica a 25 °C. Os tempos de crescimento desses organismos no meio de cultivo são de aproximadamente 48 h para a P-17 e de 6 (seis) dias para a NOX. Após esse período, as cepas foram repicadas em tubos de ensaios inclinados contendo ágar R2 como meio de cultura e novamente foram incubadas a 25 °C. Os cultivos dos microrganismos foram armazenados sob refrigeração para posterior uso.

Já a preparação dos inóculos líquidos foi baseada na metodologia descrita no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (9217-B): *Pseudomonas fluorescens Strain P-17, Spirillum Strain NOX Method* (9217 A) (APHA, 2005).

Para a inoculação da P-17 e da NOX em meio líquido, seguiu-se o procedimento realizado por Siquerolo (2017), em que se adicionava cerca de 2-3 mL

de água ultrapura aos tubos de cultura pura previamente preparada como descrito nessa mesma seção. A água ultrapura utilizada foi previamente filtrada em filtro de seringa com membrana PES (poliestersulfona) com 0,22 μm de porosidade e autoclavada. Após a adição da água, o tubo foi agitado para que ocorresse o desprendimento das colônias de P-17 e NOX do ágar para a água, formando uma suspensão. Com isso, foi recolhida uma alíquota de 100 μL de cada cultura e transferido para frascos individuais livres de carbono contendo 50 mL de água ultrapura filtrada. Como fonte de crescimento para o crescimento dos microrganismos foi adicionado 125 μL de acetato de sódio (400 mg acetato- C L^{-1}) aos frascos contendo 50 mL de água. Em seguida, as amostras foram incubadas em estufa bacteriológica a 25 °C por 96 h. Depois deste período, os inóculos líquidos foram armazenados em geladeira por um período de até 6 (seis) meses.

4.4.4.4.3 Quantificação do Carbono Orgânico Assimilável

A quantificação de COA se baseia na medição do crescimento das estirpes bacterianas P-17 e NOX, até a saturação de um nutriente que seja essencial para o desenvolvimento desses microrganismos. Quando a saturação ocorre, é possível quantificar a concentração de carbono do meio através da determinação da densidade celular.

Para determinar a concentração COA nas amostras, foram coletadas alíquotas da água de estudo antes, durante e ao final do processo oxidativo. As amostras foram coletadas em frascos livres de carbono e o líquido foi filtrado em filtro de seringa com membrana PVDF com porosidade de 0,22 μm . As amostras foram pasteurizadas a 70 °C por 60 minutos para inativar qualquer outro microrganismo que pudesse estar presente na amostra, de acordo com a metodologia proposta por Hammes e Egli (2005).

Depois da pasteurização, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente para posterior inoculação das estirpes P-17 e NOX. Uma contagem celular dos inóculos líquidos foi realizada anteriormente à inoculação das estirpes a fim de que as amostras iniciais apresentassem densidade celular igual a 1×10^4 cel mL^{-1} . Após a inoculação, as amostras foram incubadas em estufa bacteriológica por 96 h a uma temperatura de 25 °C. Após o período de incubação, de cada amostra era

coletado volume igual a 630 μL e transferido para um tubo *ependorf* de 2 mL contendo 370 μL de paraformaldeído 1,5% para preservação. As amostras permaneceram sob refrigeração até a data da realização da análise, não ultrapassando um prazo de 5 (cinco) dias.

A quantificação de COA foi obtida a partir dos dados de contagem de células de ambas as cepas bacterianas por meio de citometria de fluxo. As análises foram realizadas nas dependências do Instituto Carlos Chagas (Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ) em Curitiba. A concentração de COA nas amostras foi obtida a partir da Equação 13. De acordo com Hammes e Egli (2006), pode-se relacionar a concentração de COA ao número de células, em que 1 μg de COA equivaleria a 1×10^7 células. Na Fotografia 5 tem-se a fotografia do equipamento (citômetro de fluxo) utilizado para as análises.

Fotografia 5 - Citômetro de fluxo utilizado no trabalho



Fonte: Fiocruz – Paraná (2021)

$$COA (\mu\text{gCL}^{-1}) = \frac{(\text{Crescimento celular})L^{-1}}{1 \times 10^7 (\text{células}.\mu\text{gC}^{-1})} \quad (13)$$

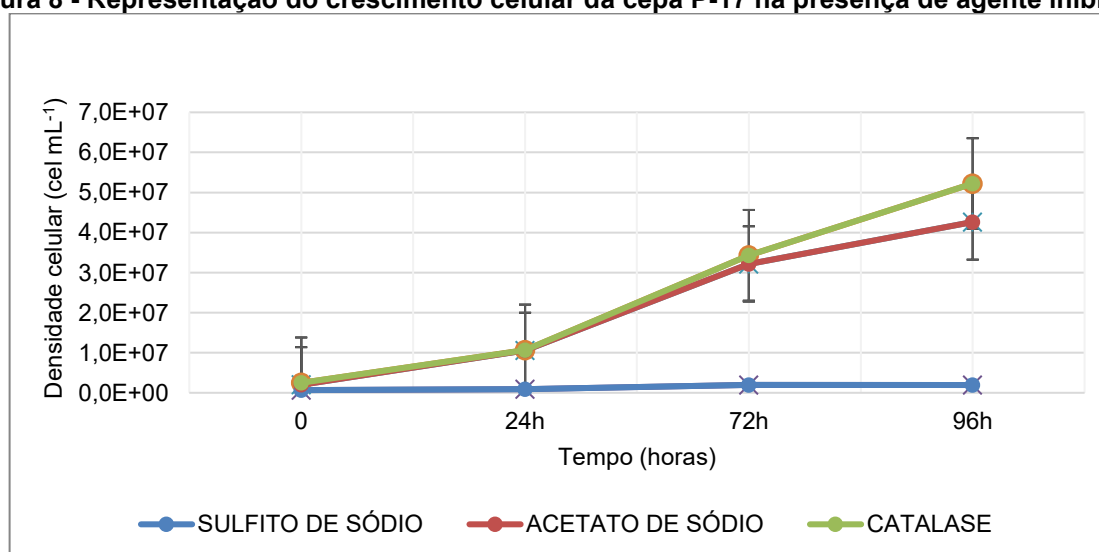
5 RESULTADOS

Os resultados obtidos com este estudo serão divididos em duas etapas. A primeira parte contempla as análises dos agentes inibitórios e residual de peróxido. E uma segunda parte que apresenta as análises do carbono orgânico dissolvido e do carbono orgânico assimilável.

5.1 Agente Inibitório

Como o método de quantificação do COA baseia-se no crescimento celular de duas estirpes bacterianas e sabendo que o H_2O_2 inibe o crescimento das estirpes, é importante avaliar o potencial de crescimento celular em diferentes meios. Na Figura 8 tem-se representado o crescimento celular para a cepa P-17 em acetato de sódio (meio de cultura líquida), em catalase e em sulfito de sódio. Pode-se observar que para o sulfito de sódio (curva azul) a densidade celular permaneceu praticamente inalterada durante todo tempo de estudo. Enquanto em seu meio de cultura e na presença de catalase (curvas vermelho e verde, respectivamente), a P-17 se desenvolveu de maneira semelhante, ou seja, com o passar do tempo em ambas as amostras pode-se notar a tendência de aumento. Logo, pode-se concluir que a catalase não interfere no crescimento da espécie.

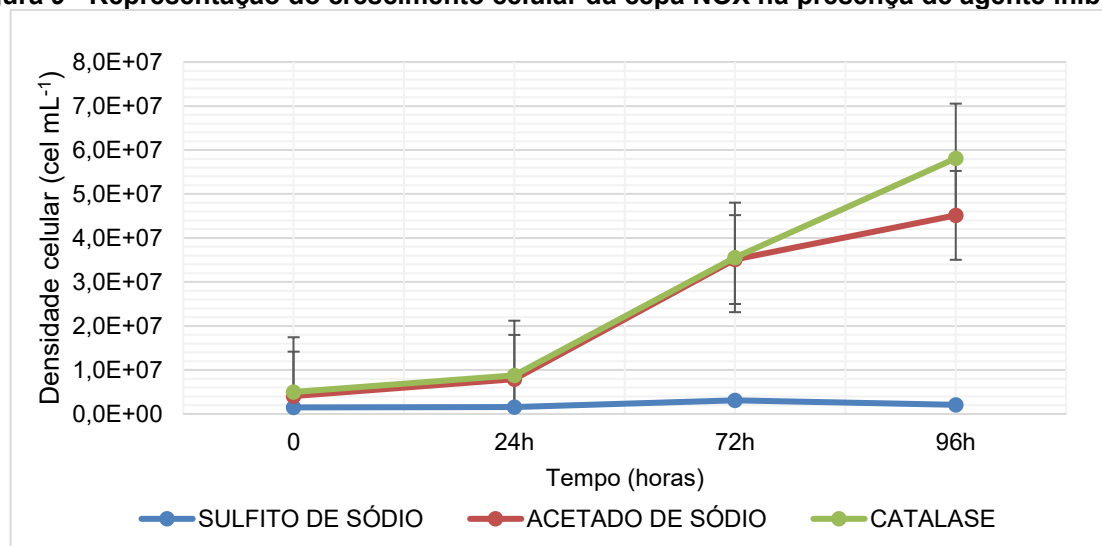
Figura 8 - Representação do crescimento celular da cepa P-17 na presença de agente inibitório



Fonte: Autoria própria (2021)

O mesmo comportamento pode ser observado para a espécie NOX como representado na Figura 9.

Figura 9 - Representação do crescimento celular da cepa NOX na presença de agente inibitório



Fonte: Autoria própria (2021)

Segundo Liu et al. (2003), este comportamento é esperado visto que em seus ensaios testou-se a catalase e diversos agentes inorgânicos, entre eles o sulfito de sódio. Em seu artigo levaram em consideração pequenas e elevadas concentrações de H_2O_2 (10 e 100 mg L⁻¹). Foi observado que na concentração igual a 0,2 mg L⁻¹ para catalase, foi uma proporção suficiente para que ocorresse a paragem da reação com o H_2O_2 em ambas as concentrações analisadas. Também observaram que o tempo de reação foi relativamente baixo, haja vista que em um período inferior a 10 minutos não havia mais H_2O_2 residual na solução. Enquanto isso, ao utilizar o sulfito de sódio, observou-se que ainda havia H_2O_2 residual para altas e baixas concentrações, mesmo ao deixar a solução em maiores tempos de reação, o que demonstra uma desvantagem para o seu uso.

Em outro estudo realizado por Barzi e Mohsen (2013), avaliou-se o crescimento das estirpes para a quantificação do COA. Ao utilizar-se a catalase e outros agentes inorgânicos para os bioensaios, obtiveram resultados nos quais a catalase interferiu nas análises superestimando a concentração de COA, enquanto a utilização de agentes inorgânicos interferiu de maneira negativa nas análises. Como por exemplo o PbO_2 e Ag que inibiram o crescimento das estirpes.

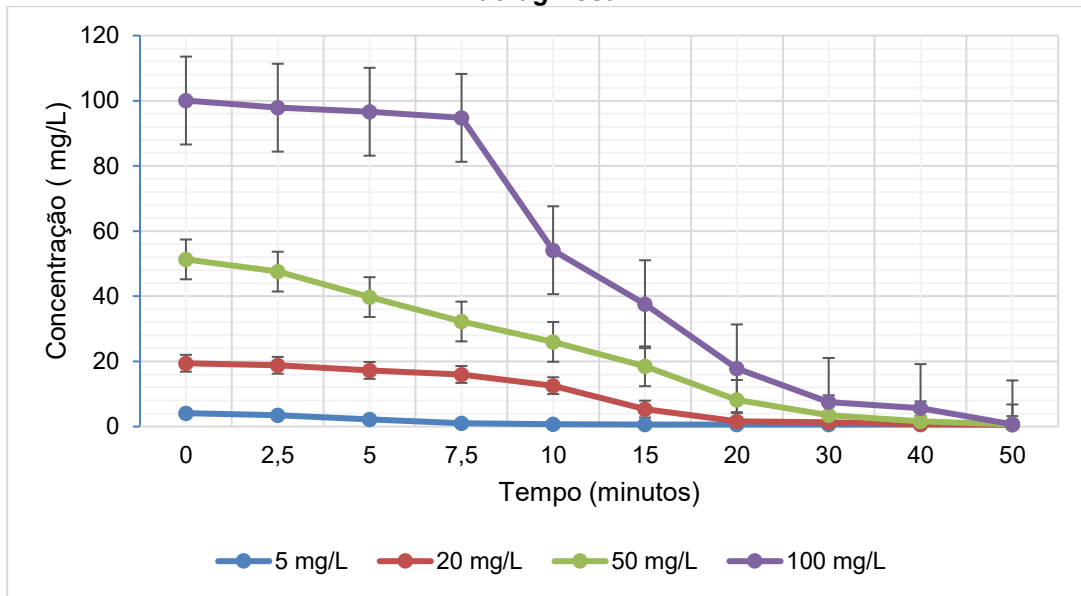
Devido a isto, a partir da avaliação desses artigos e os resultados obtidos no presente estudo, optou-se por utilizar a catalase bovina como agente de paragem a fim de garantir o crescimento das estirpes e assegurar a quantificação do COA durante os ensaios oxidativos.

5.2 Residual de Peróxido

A partir da Figura 10 pode-se observar que em 60 minutos, para todas as dosagens de H_2O_2 , o residual encontrou-se abaixo de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. Pode-se notar também que para concentrações muito altas, como 50 mg L^{-1} e 100 mg L^{-1} , o decaimento ocorre de maneira mais rápida do que para concentrações mais baixas (5 mg L^{-1} e 20 mg L^{-1}), o que pode estar relacionado à formação de subprodutos da quebra hemolítica do H_2O_2 pela luz. Um estudo feito por Barbosa (2018) mostra o potencial redox da sua água de estudo, que era uma água coletada de um reservatório na Paraíba contaminada com $5 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$ de *Microcystis aeruginosa*. A água passava por duas filtrações biológicas e por fim foi tratada com $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$. Analisando os resultados pode-se observar que o valor máximo da geração de radicais $\bullet\text{OH}$ ocorreu no tempo de 60 minutos para dosagens mais altas, no caso 1000 mM de H_2O_2 . Porém ocorreu uma diminuição desse potencial no período de 15-30 minutos, fato este que deve estar associado ao consumo dos radicais na própria reação de oxidação.

Quanto mais radical no meio reacional maior a chance desses radicais reagirem entre si e com o próprio H_2O_2 podendo formar um radical de menor poder oxidativo como o radical peridroxil (FIOREZE, 2014).

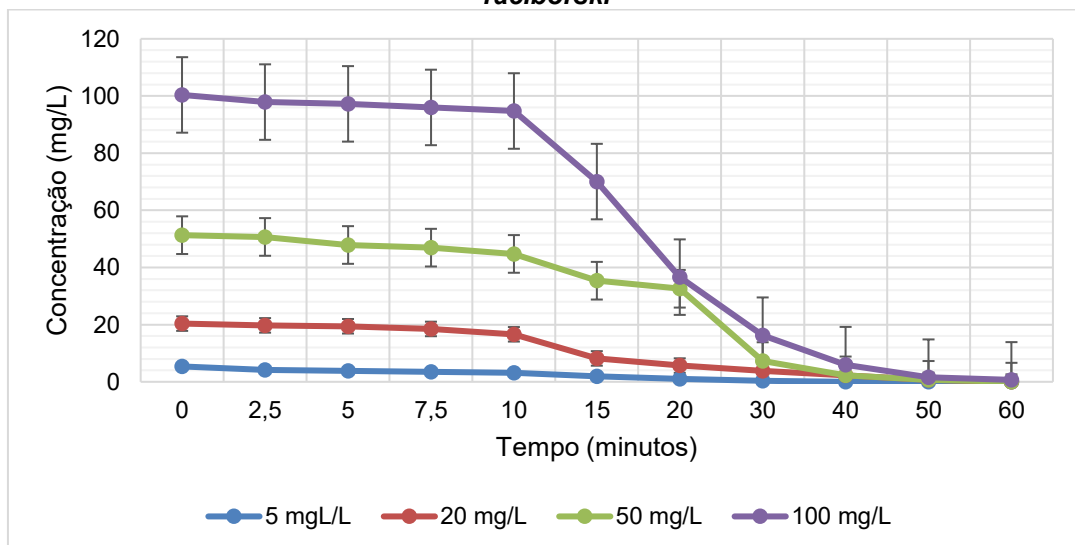
Figura 10 - Comportamento do decaimento de H_2O_2 nos ensaios com células de *Microcystis aeruginosa*



Fonte: Autoria própria (2021)

Comparando o residual de peróxido na água contendo a *Microcystis aeruginosa* com a *Raphidiopsis raciborski* não foi observada nenhuma diferença de comportamento quanto ao decaimento do H_2O_2 . Em ambas as espécies, o decaimento ocorreu de maneira semelhante. Na Figura 11 tem-se o decaimento para a *Raphidiopsis raciborski*.

Figura 11 - Comportamento do decaimento de H_2O_2 nos ensaios com células de *Raphidiopsis raciborski*



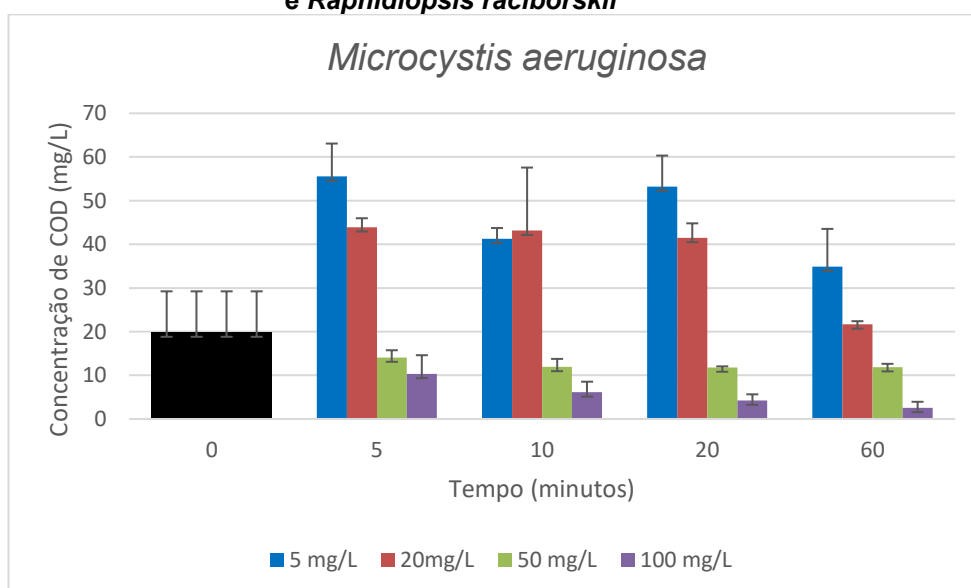
Fonte: Autoria própria (2021)

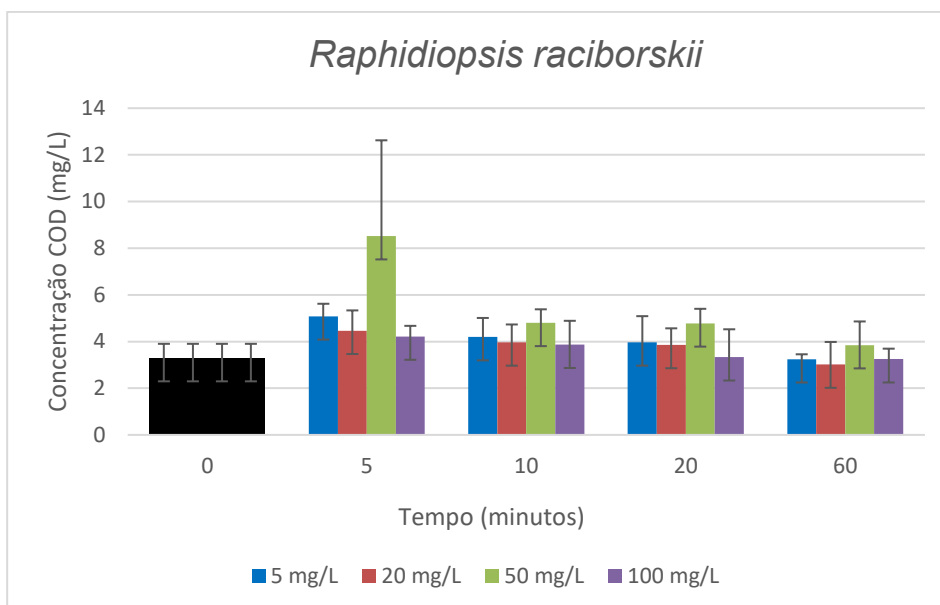
5.3 Carbono Orgânico Dissolvido

O COD é definido como sendo toda a fração do carbono orgânico menor que $0,2 \mu\text{m}$ sendo uma mistura heterogênea de pequenas moléculas orgânicas como açúcares, aminoácidos, proteínas, até estruturas mais complexas como o ácido húmico (SUHETT, 2006). Em ambientes aquáticos, a principal fonte de obtenção desse carbono é através da flora aquática como as macrófitas aquáticas e o fitoplâncton. No caso da água de estudo, a única fonte de obtenção do COD seria através das células das espécies analisadas. Na Figura 12 pode-se verificar o comportamento da concentração de COD para a *Microcystis aeruginosa* e para *Raphidiopsis raciborskii* ao longo do processo oxidativo.

Em um primeiro momento pode-se notar um aumento de COD nos primeiros 5 minutos de reação para *Microcystis aeruginosa* principalmente nas concentrações mais baixas de H_2O_2 avaliadas (5 mg L^{-1} e 20 mg L^{-1}). Este comportamento provavelmente se dá pela liberação dos compostos intracelulares presentes nas células, como já observado por Siquerolo (2017). Para a *Microcystis aeruginosa* esse aumento chegou a $55,55 \text{ mg L}^{-1}$ para a concentração de 5 mg L^{-1} de H_2O_2 , para uma densidade celular de $5 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$.

Figura 12 - Concentração de COD ao longo do processo oxidativo para *Microcystis aeruginosa* e *Raphidiopsis raciborskii*





Fonte: Autoria própria (2021)

Pode-se sugerir ainda que, para a *Microcystis aeruginosa*, ocorre a degradação da molécula de COD pela ação do H_2O_2 que por um período relativamente longo pode levar a mineralização da molécula por completo ou em frações menores. Essa observação também foi feita por Siquerolo (2017). O estudo sugeriu que a gradual redução da concentração de COD ocorre quanto maior for a concentração do oxidante; logo, maior será a taxa de produção dos radicais $\bullet OH$, então maior será a capacidade de mineralização dos compostos gerados pelo processo oxidativo.

Outro ponto que se pode notar, principalmente com relação ao COD gerado pela *Microcystis aeruginosa*, é que quanto maior a concentração de H_2O_2 menor é a produção de COD tanto nos primeiros minutos quanto no final do tempo de oxidação. Esse comportamento também foi observado por Siquerolo (2017).

O comportamento para a espécie *Raphidiopsis raciborskii* foi diferente se comparado aos valores obtidos para a *Microcystis aeruginosa*. Pode-se observar que durante o processo oxidativo as concentrações de COD mantiveram-se muito semelhantes umas as outras. Também pode-se notar que a concentração final de COD é menor se comparado ao da *Microcystis aeruginosa*.

Por diferença de morfologia a *Raphidiopsis raciborskii* deveria apresentar uma concentração de COD maior que a da *Microcystis aeruginosa* já que a *Raphidiopsis raciborski* é mais complexa que a *Microcystis aeruginosa* (MELCHER, 2007).

Em estudo realizado a partir do cultivo das espécies de cianobactérias *M. aeruginosa* e *Anabaena flos-aquae* por Coral (2012), pode-se observar que no meio com mais nitrogênio e fósforo, ASM-1, favorecia a permanência da espécie *M. aeruginosa* por maior tempo se comparada com a *A. flos-aque*. Em termos de COD liberado no meio de cultivo pode-se notar que nos primeiros dias de cultivo a *A. flos-aque* apresentou uma maior concentração, porém esse valor diminui com o passar do tempo. Logo, em períodos longos de cultivo, superiores a 32 dias, desfavorecem o estudo da *A. flos-aque* pois aumentava o número de células não viáveis. Um paralelo pode ser feito com a *R. raciborskii* já que apresenta uma morfologia semelhante a *A. flos-aque*.

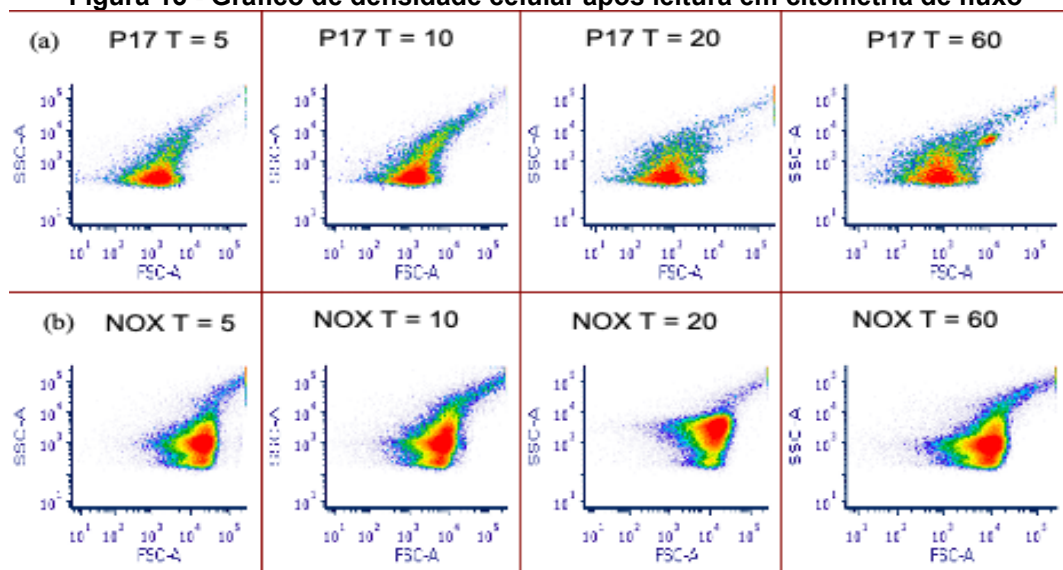
Como tempo de cultivo utilizado para a *R. raciborskii* foi entre 30 e 40 dias, o número de células não viáveis pode ter aumentado prejudicando a quantificação do COD, justificando a tendência de menor produção de COD se comparado com a *M. aeruginosa*.

5.4 Carbono orgânico assimilável

Na Figura 13 tem-se a representação da densidade celular para as cepas P-17 (a) e NOX (b) após leitura por citometria de fluxo nos tempos 5, 10, 20 e 60 min. Os filtros utilizados que representam o eixo “x” e “y” no gráfico são respectivamente o FSC-A e o SSC-A que juntos representam a morfologia celular (SIQUEROLO, 2017). Nos gráficos, as cores quentes representam uma maior densidade e as frias uma menor densidade celular (SIQUEROLO, 2017).

O que se pode notar a partir da figura acima é que ocorreu um aumento com o passar do tempo das regiões de cores quentes para ambas as espécies. O que demonstra que o agente inibidor escolhido, no caso a catalase, inibiu o efeito do H_2O_2 ao longo do processo possibilitando assim a quantificação do COA ao longo do processo oxidativo.

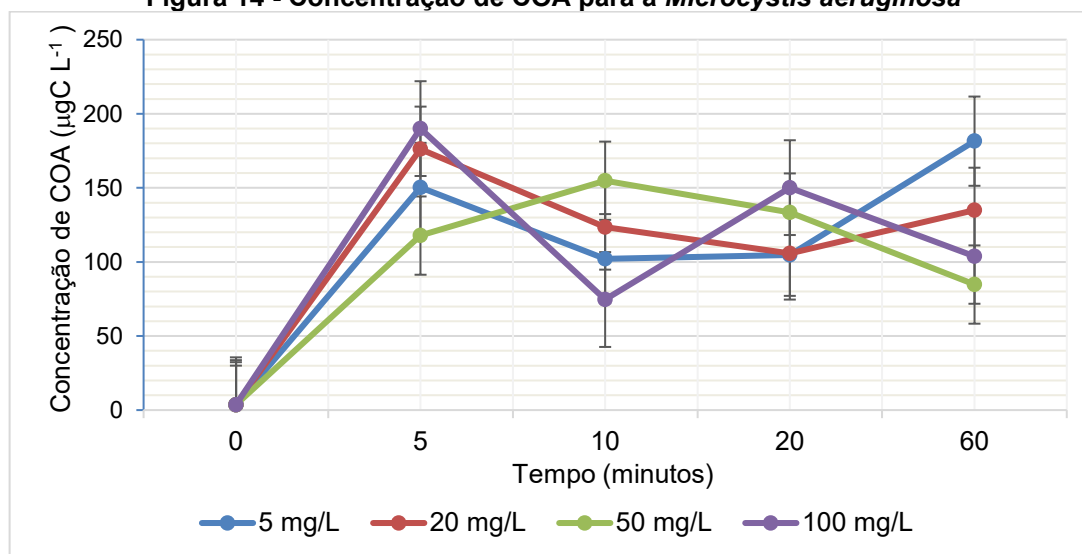
Figura 13 - Gráfico de densidade celular após leitura em citometria de fluxo



Fonte: Autoria própria (2021)

Na Figura 14 tem-se representado o comportamento do COA ao longo do processo oxidativo para a *Microcystis aeruginosa* para as concentrações de 5, 20, 50 e 100 mg L⁻¹ de H₂O₂. Pode-se observar que da mesma forma que para o COD, o COA aumenta significativamente nos primeiros 5 minutos de reação para todas as concentrações analisadas. Durante o processo, esses valores caem um pouco e voltam a aumentar ao final para as concentrações menores (5 e 20 mg L⁻¹) e diminuído para concentrações maiores (50 e 100 mg L⁻¹). Bahzi e Mohseni (2015) e Siquerolo (2017), também observaram essa tendência de diminuição para concentrações maiores de COA e atribuíram esse fato ao aumento da oxidação parcial e da quebra das moléculas maiores em menores devido a ação das hidroxilas formadas durante o processo.

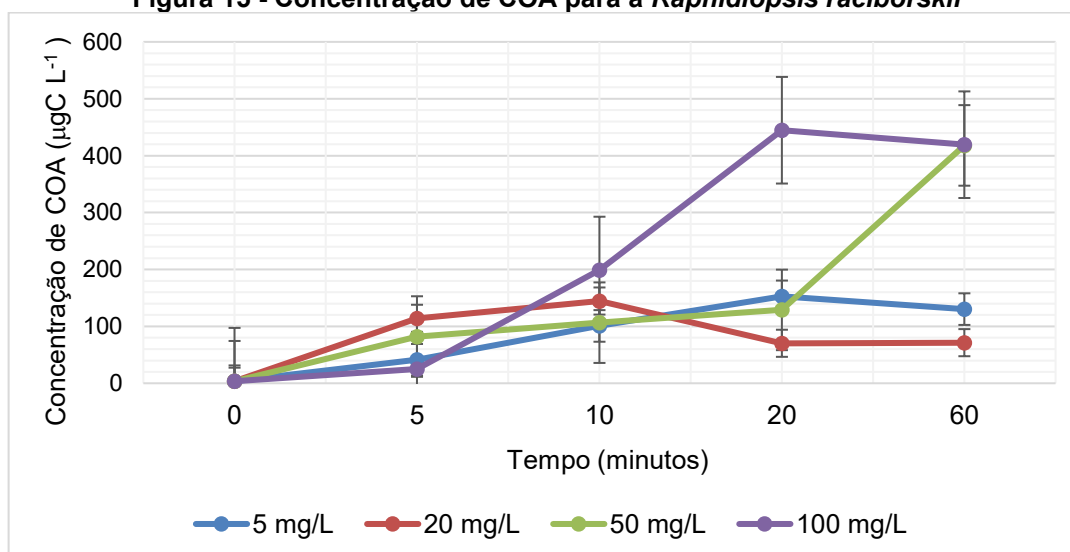
Figura 14 - Concentração de COA para a *Microcystis aeruginosa*



Fonte: Autoria própria (2021)

Na Figura 15 é representado o comportamento do COA para a espécie *Raphidiopsis raciborskii*. O que se pode notar é que assim como para *Microcystis aeruginosa*, nos primeiros 5 minutos, observou-se um aumento para todas as concentrações que foi aumentando gradativamente para as concentrações maiores (50 e 100 mg L⁻¹). As menores (5 e 20 mg L⁻¹) também aumentaram, mas de maneira menos acentuada apresentando uma leve queda ao final do processo. E aqui observa-se o comportamento inverso para o final do processo se comparada com a *Microcystis aeruginosa* em que as maiores concentrações de COA ao final do processo foram as de maior concentração de H₂O₂.

Figura 15 - Concentração de COA para a *Raphidiopsis raciborskii*



Fonte: Autoria própria (2021)

Essa diferença de comportamento se deve a diferença da morfologia entre as células estudadas. Como a célula da *Raphidiopsis raciborskii* é mais complexa que a da *Microcystis aeruginosa*, a liberação do COA pode ocorrer de forma mais tardia apresentando um valor maior se comparado com a da *Microcystis aeruginosa*. (MELCHER, 2007).

6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir com este trabalho que ao utilizar o sulfito de sódio e a catalase para possibilitar a quantificação do COA, a catalase se mostrou um melhor inibidor que o sulfito de sódio pois não interferiu no crescimento das estirpes, viabilizando o estudo do COA ao longo do processo oxidativo.

Quanto ao residual de peróxido, pode-se notar que a concentração de H_2O_2 diminuiu ao longo do tempo de reação sendo que em 60 minutos já não foi mais identificada a presença de residual para todas as dosagens estudadas, e que o mesmo comportamento da curva foi semelhante para ambas as espécies analisadas.

No que se refere ao COD a tendência que se pode notar para a *Microcystis aeruginosa* é que ocorre um aumento inicial, mas que vai diminuindo gradualmente até o final do tempo estudado para a maioria das concentrações H_2O_2 . Porém, essa tendência não é observada para a *Raphidiopsis raciborskii*. O que pode ter ocorrido é que o tempo de cultivo mais longo (30-40 dias) pode ter prejudicado as análises pelo número de células não viáveis que o cultivo pode ter.

Por fim, para as análises de COA pode-se notar um aumento evidente para os primeiros 5 minutos de reação. Porém, ao final do processo as espécies apresentaram um comportamento inverso nas maiores concentrações do COA final. Para concentração de 100 mg L^{-1} de H_2O_2 o valor chegou a ser de $419 \text{ } \mu\text{gC L}^{-1}$ para a *Raphidiopsis raciborskii* enquanto para a *Microcystis aeruginosa* esse valor chegou em $103 \text{ } \mu\text{gC L}^{-1}$. Essa diferença se deve a morfologia celular pois a *Raphidiopsis raciborskii* apresenta uma morfologia mais complexa e por isso a diferença nos valores apresentados no COA.

A partir dos resultados obtidos nesse estudo, pode-se considerar que, nas condições estudadas, o tratamento com UV/ H_2O_2 se mostrou uma boa alternativa para o tratamento da matéria orgânica natural da água. Porém, como foi possível observar ao longo desse estudo, o subproduto formado, no caso o COA, torna a técnica um pouco menos atrativa já que a formação deste subproduto traz alguns malefícios como já discutidos anteriormente. Uma alternativa interessante para associar ao processo oxidativo UV/ H_2O_2 é a filtração biológica, já que o biofilme formado consome o COA, além de ser uma técnica de baixo custo e de fácil manuseio.

REFERÊNCIAS

- AL MOMANI, F.; SMITH, D. W.; EL-DIN, M. G. Degradation of cyanobacteria toxin by advanced oxidation processes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 150, n. 2, p. 238-249, 2008.
- ALVES, M. S. A. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) – Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
- ARAUJO, L. M. R. **Estudo das interações fitoplâncton-protozooplâncton no reservatório de Barra Bonita, SP, com ênfase na toxicidade de microcistinas**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.
- ARAÚJO, K. S.; et al. Processos oxidativos avançados: uma revisão de fundamentos e aplicações no tratamento de águas residuais urbanas e efluentes industriais. **Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 11, n. 2, 2016.
- APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA, A., WEF Washington, D. C.: American Public Health Association, 2005.
- AZEVEDO, S. M. F. O.; BRANDÃO, C. C. S. **Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano**. Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 56p, 2003.
- AZEVEDO, S. M. F. O.; VASCONCELOS, V. M. Toxinas de cianobactérias: causas e consequências para a saúde pública. **Medicina on line**, v. 3, n. 1, p. 1-19, 1998.
- BARBOSA, A. S. **Remoção de *Microcystis aeruginosa* e microcistina-LR de águas superficiais com uso de filtro doméstico seguido de processo oxidativo avançado (UV/H₂O₂)**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2018.
- BAZRI, M. M.; BARBEAU, B.; MOHSENI, M. Impact of UV/H₂O₂ advanced oxidation treatment on molecular weight distribution of NOM and biostability of water. **Water Research**, v. 46, n. 16, p. 5297-5304, 2012.
- BAZRI, M. M. **Assimilable organic carbon formation during ultraviolet-hydrogen peroxide advanced oxidation treatment of surface water**. 2010. Tese Doutorado. University of British Columbia, 2010.
- BENDER, A. L.; von MUHLEN, C. A. **Imunologia Clínica na Prática Médica**, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação N° 5, de 28 de setembro de 2017. Dispõe sobre a Consolidação das normas sobre as ações e serviços de saúde

do Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União Nº 85, República Federativa do Brasil, DF, 03 mai. 2021. Seção 1, Suplemento – p. 127.

CARDOSO, A. S.; et al. Análise da presença do fitoplâncton em bacia integrante do Projeto de Integração do Rio São Francisco, região semiárida, Nordeste brasileiro. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 22, n. 2, 2017

CARVALHO, M. C.; et al. **Manual de cianobactérias planctônicas: legislação, orientações para o monitoramento e aspectos ambientais**. CETESB, São Paulo, 2013.

CARMICHAEL, W. W. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, n. 6, p. 445-459, 1992.

CARMICHAEL, W. W. **The toxins of cyanobacteria**. Scientific American, v. 270, n. 1, p. 78-86, 1994.

CENTURIONE FILHO, P. L.; DI BERNARDO, L. Procedimentos para execução de ensaios de flotação/filtração em equipamento de bancada. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 8, p. 39-44, 2003.

CUI, F. Y.; LIN, T.; MA, F. The excess propagation and research on biological control of the water flea of zooplankton in raw water. **Journal HIT**, v. 34, n. 3, p. 399-403, 2002.

CORAL, L. A. **Avaliação da pré-ozonização no controle de cianobactérias e degradação de microcistinas**. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

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

ESCOBAR, I. C.; RANDALL, A. A.; TAYLOR, J. S. Bacterial growth in distribution systems: effect of assimilable organic carbon and biodegradable dissolved organic carbon. **Environmental science & technology**, v. 35, n. 17, p. 3442-3447, 2001

FANG, J.; YANG, X.; MA, J.; SHANG, C.; ZHAO, Q. A. Characterization of algal organic matter and formation of DBPs chlor(am)ination. **Water Research**, v. 44, p. 5897-5906, 2010.

FERNANDES, L. F.; et al. Cianobactérias e cianotoxinas. Gestão integrada de mananciais de abastecimento eutrofizados, p. 369-388, 2005.

FIGUEIREDO, M.; SANTOS, E. P.; SCHMACHTENBERG, N. Processos oxidativos avançados: fundamentos e aplicação ambiental. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 79-91, 2014.

FRANCESCHINI, I. Maria et al. Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica. Artmed Editora, 2009.

GOTTSCHALK, C.; LIBRA, J. A.; SAUPE, A. Ozonation of water and wastewater: A practical guide to understanding ozone and its applications. **John Wiley & Sons**, 2009.

HAMMES, F. A.; EGLI, T. New method for assimilable organic carbon determination using flow-cytometric enumeration and a natural microbial consortium as inoculum. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 9, p. 3289-3294, 2005.

HUANG, C.-R.; SHU, H.-Y. The reaction kinetics, decomposition pathways and intermediate formations of phenol in ozonation, UVO_3 and UVH_2O_2 processes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 41, n. 1, p. 47-64, 1995

IKEHATA, K.; EL-DIN, M. G. Aqueous pesticide degradation by hydrogen peroxide/ultraviolet irradiation and fenton-type advanced oxidation processes: a review. **Journal of Environmental Engineering**, v. 5, n. 2, p. 81-135, 2006.

JARDIM, F. A.; et al. Fatores determinantes das florações de cianobactérias na água do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. 2014.

JUDD, W. S.; et al. Sistemática Vegetal:- Um Enfoque Filogenético. Artmed Editora, 2009

Van Der KOOIJ, D. Assimilable organic carbon as an indicator of bacterial regrowth. **Journal-American Water Works Association**, v. 84, n. 2, p. 57-65, 1992.

MADIGAN, M. T.; et al. Microbiologia de Brock - 14^a Edição. Artmed Editora, 2016., p 5-18.

MARCELINO, R.B.P.; et al. Tendências e desafios na aplicação de tecnologias avançadas para o tratamento de efluentes industriais não biodegradáveis. **Revista UFMG**, v. 20, n. 2, p. 358-383, 2013.

MOMENTI, T. J. **Processo anaeróbio conjugado com processos oxidativos avançados (POA) no tratamento dos efluentes do processo industrial de branqueamento da polpa celulósica**. 2006. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

NOYES, Robert. Handbook of pollution control processes. Noyes Publications, 1991.

ROCHA, V. S. **Determinação de carbono orgânico assimilável em amostras de água – Estudo de comparação do método de determinação da concentração de ATP com o método clássico de contagem de colônias**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biológica, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2007.

SARATHY, S. R.; MOHSENI, M. The fate of natural organic matter during UV/H_2O_2 advanced oxidation of drinking water. **Canadian Journal of Civil Engineering**, v. 36, n. 1, p. 160-169, 2009.

SOARES, M. C. S.; HUSZAR, V. L. M.; ROLAND, F. Phytoplankton dynamics in two tropical rivers with different degrees of human impact (Southeast Brazil). **River Research and Applications**, v. 23, p. 698-714, 2007.

SOTERO-SANTOS, R. B.; et al. Toxicity of a cyanobacteria bloom in Barra Bonita reservoir (middle Tiete river, Sao Paulo, Brazil). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n. 2, p. 163-170, 2006.

SIQUEROLO, L. V. **Efeitos do processo oxidativo UV/H₂O₂ na formação de carbono orgânico assimilável e trihalometanos na presença de cianobactérias.** 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

SUHETT, A. L.; et al. O papel da foto-degradação do carbono orgânico dissolvido (cod) nos ecossistemas. **Oecologia Brasiliensis**, v. 10, n. 2, p. 6, 2006.

TANBER, G. Toxin leaves 500,000 in northwest Ohio without drinking water, Reuters, 2014. Disponível em: < <http://www.reuters.com/article/us-usa-water-ohio-idUSKBN0G20L120140802>>. Acesso em: 19jun de 2019.

TEIXEIRA, C. P. A. B.; JARDIM, W. F. Processos Oxidativos Avançados – Caderno Temático, vol. 3. Universidade Estadual de Campinas–UNICAMP, p. 6-13, 2004.

TEIXEIRA, M. R.; ROSA, M. J. Comparing dissolved air flotation and conventional sedimentation to remove cyanobacterial cells of *Microcystis aeruginosa* Part II. The effect of water background organics. **Separation and Purification Technology**, v. 53, n. 1, p. 126-134, 2007.

TOOR, R.; MOHSENI, M. UV-H₂O₂ based AOP and its integration with biological activated carbon treatment for DBP reduction in drinking water. **Chemosphere**, v. 66, n. 11, p. 2087-2095, 2007

VON GUNTEN, U. Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. **Water Research**, v. 37, n. 7, p. 1443-1467, 2003.