



Universidade do Porto

Faculdade de Engenharia

FEUP

Desinfecção solar da água contaminada com cianobactérias usando colectores parabólicos compostos

Mestrado Integrado em Engenharia do Ambiente

Lídia Julieta Caldas Salgado

Dissertação de Mestrado submetida à Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Dissertação realizada sob a supervisão de:

Doutor Rui Alfredo da Rocha Boaventura (Orientador)

Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Doutor Vítor Manuel de Oliveira e Vasconcelos (Co-orientador)

Centro de Investigação Marinha e Ambiental da Universidade do Porto

Julho 2010

Resumo

Nos tempos que correm a eutrofização das águas tem vindo a ser uma presença comum nas águas do nosso planeta, muito largamente dependente das actividades do homem. O aumento de nutrientes presentes nas águas leva a um crescimento anormal de algas que podem provocar florescências. O presente trabalho incidirá no estudo das algas denominadas de cianobactérias. Estes microrganismos libertam toxinas para a água que provocam malefícios no ambiente, na saúde humana e animal, podendo mesmo em alguns casos levar à morte. Estas toxinas são denominadas de cianotoxinas e a que se irá destacar neste trabalho será a microcistina.

A eficiência da remoção destes microrganismos nas estações de tratamento é ainda pouco eficiente, face ao recurso aos métodos convencionais. Existe assim uma forte necessidade de se testarem métodos alternativos que consigam remover eficazmente as cianotoxinas das águas. Aponta-se como alternativa o recurso à desinfecção através da luz solar.

No que concerne a processos de eliminação de cianotoxinas através da luz solar, apresentam-se a fotólise e fotocatalise. Estes dois processos podem ocorrer também através da utilização de luz UV-Visível de lâmpadas artificiais que mostram ser a solução mais indicada para tratamento de grandes volumes de água.

A fotólise nem sempre mostra ser um processo eficaz.

A fotocatalise recorre ao uso de catalisadores que aceleram a reacção. O catalisador utilizado no presente trabalho é o dióxido de titânio que mostra ser bastante eficiente neste processo de desinfecção, contudo existe a desvantagem da sua remoção no fim da desinfecção das águas.

Quando estes dois processos se realizam através da luz solar, as instalações usadas são constituídas por Colectores Parabólicos Compostos (CPC's) que são conhecidos por serem colectores de baixa concentração. Este tipo de colectores têm temperaturas mais reduzidas que os outros tipos de colectores existentes, que se conhecem por colectores de calhas parabólicas.

O alvo de estudo incidirá na eficiência da remoção de cianobactérias e microcistinas das águas, através da luz UV-Visível de um reactor com uma lâmpada, testando-se o processo quando há adição de dióxido de titânio e quando não há nenhuma adição. Seguir-se-á a análise da eficiência da desinfecção da água face à exposição à luz solar em colectores compostos parabólicos, em ambos os processos, fotólise e fotocatalise.

A fotocatalise mostrou ser um processo mais eficaz que a fotólise, contudo tem o problema da remoção do TiO_2 no final do tratamento. A fotólise e fotocatalise recorrendo a luz solar não se mostrou de fácil aplicação comparativamente com o recurso que se fez à lâmpada UV-Visível.

Abstract

Nowadays the eutrophication of the waters has been a common presence in the waters of our planet, although highly dependent on human activities. The increase of nutrients present in the water leads to anormal growth of algae which could cause the blooms. Cyanobacteria as these algae are called will be the focus of this study. These organisms release toxins into the water causing dangerous harm to the environment, to the human and animal health, and in some cases may even lead to death. These toxins are called cyanotoxins, are known various kinds, in which we the *Microcystis-LR* toxin that will be the subject of this paper.

The removal efficiency of these microorganisms in the treatment plants is still not satisfactory compared to the use of conventional methods. Therefore, there is a strong need to test alternative methods that have the ability to effectively remove cyanotoxins from water. It's pointed out, as an alternative the use of disinfection by sunlight.

Regarding the process of elimination of cyanotoxins through the sunlight, we present the photolysis and photocatalysis. These two processes may also occur through the use of artificial UV light bulbs that turn out to be the most suitable solution for treating large volumes of water.

The photolysis is not always shown to be an efficient process.

The photocatalysis refers to the use of catalysts which accelerate the reaction. The catalyst used in this study is titanium dioxide that proves to be quite efficient in these processes, however there is disadvantage of removal of the catalyst at the end of the process.

When these two processes take place through the sunlight, the plants used are composed of Compound Parabolic Collector (CPC's) that are known to be collectors of low concentration. Such collectors have lower temperatures than the other types of existing sewers, which are known as parabolic trough collectors.

The aim of these study will focus on the removal efficiency of cyanobacteria and microcystins of water through the UV reactor with a lamp, testing the process with and without addition of titanium dioxide. It will follow by the analysis of efficiency of disinfection of water from exposure to sunlight in compound parabolic collectors, in both cases, photolysis and photocatalysis.

The photocatalysis proved to be more effective than photolysis, however, has the problem of removal of TiO₂ at the end of treatment. The photolysis and photocatalysis using sunlight was not easy to apply compared with the feature that made the lamp UV-Visible.

Aos meus pais, irmã e sobrinha.

Agradecimentos

A elaboração deste trabalho contou com o apoio de várias pessoas às quais ao concluir este trabalho, é com profundo reconhecimento que agradeço:

- Ao Professor Doutor Rui Boaventura, orientador científico desta dissertação, pelo suporte desta tese.

- Ao Professor Doutor Vítor Vasconcelos, co-orientador científico desta dissertação pelo apoio e interesse.

- Ao Doutor Vítor Vilar pela orientação, apoio e disponibilidade sempre prestados.

- À Engenheira Lúcia Xerez pela orientação, pelo conhecimento no assunto em causa, suporte, apoio, compreensão, disponibilidade, incentivo, ajuda, sinceridade, companhia, carinho e amabilidade, que foram cruciais para a realização desta tese e a quem eu devo uma profunda gratidão e reconhecimento. Por todos os conhecimentos que adquiri graças a ela, tanto ao nível profissional como a nível pessoal. Por fim, pela amizade que desenvolvemos com o decorrer desta tese.

- Aos meus pais, irmã, sobrinha e cunhado por acreditaram em mim, pela força e por ser por eles que luto diariamente.

- À Engenheira Joana Azevedo do Laboratório de Ecotoxicologia Genómica e Evolução do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental da Universidade do Porto pelos conhecimentos e apoio dados.

- Aos colegas em geral do Laboratório de Ecotoxicologia Genómica e Evolução pela companhia e boa disposição oferecidas ao longo da execução desta tese.

- Aos colegas em geral do Laboratory of Separation and Reaction Engineering da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto pela companhia e boa disposição oferecidas ao longo da execução desta tese.

- Aos colegas de mestrado pelo apoio, interesse e amizade.

- A todos os meus amigos que sempre me deram força e ajudaram a descomprimir nas horas vagas.

Índice

1. Introdução	11
1.1. Enquadramento e objectivos	11
1.2. Estrutura e Organização	13
2. Cianobactérias e toxinas	14
2.1. Cianobactérias	14
2.2. Toxinas produzidas por cianobactérias	16
2.3. Ambiente	18
2.4. Saúde Pública	19
2.5. Toxicidade nos animais	21
2.6. Métodos de detecção e análise das cianotoxinas	23
3. Métodos para remover cianobactérias de água potável	25
3.1. Tratamentos físicos	25
3.2. Tratamentos químicos	25
3.3. Efeitos da radiação solar nos microrganismos.....	27
4. Fotólise e Fotocatálise	29
4.1. Fotólise	29
4.2. Fotocatálise	31
4.3 Colectores Solares	36
5. Materiais e Métodos	38
5.1. Descrição do equipamento	38
5.2. Métodos utilizados.....	40
5.3. Procedimento Experimental	44
6. Resultados e Discussão	51
6.1. Desinfecção com lâmpada UV-Visível	51
6.2. Desinfecção solar através de colectores parabólicos compostos.....	53
7. Conclusão	74
8. Referências	76

Índice de Figuras

Figura 1. Carta de qualidade da água em função da abundância máxima de cianobactérias em águas doces portuguesas.	15
Figura 2. <i>Microcystis aeruginosa</i>	17
Figura 3. Florescência de cianobactérias	19
Figura 4. Reactor de laboratório com lâmpada UV-Visível da FEUP	38
Figura 5. Instalação piloto com CPC da FEUP.....	39
Figura 6. Câmara de Neubauer.	40
Figura 7. Área de contagem de câmara de Neubauer.	41
Figura 8. Instalação do Waters Sep-Pak Vacuum Manifold Millipore e das colunas Strata TM from phenomenex.	42
Figura 9. Fotografia do rotoevaporador BUCHI 461 Water Bath juntamente com a bomba de vácuo BUCHI Vacuum Pump V-700 e com o minichiller.....	43
Figura 10. Recta de calibração do HPLC	44
Figura 11. Cultura de <i>microcystis aeruginosa</i>	45
Figura 12. Número de células por mililitro durante 40 minutos de fotólise e fotocátalise.....	52
Figura 13. Número de células por mililitro por quantidade de energia UV acumulada ($\text{kJ}_{\text{UV}}/\text{L}$) dos processos de fotólise e fotocátalise solar	55
Figura 14. Número de células por mililitro por quantidade de energia UV acumulada ($\text{kJ}_{\text{UV}}/\text{L}$) nos processos de fotocátalise com 30 e 50 mg/L de TiO_2	57
Figura 15. Número de células por mililitro por quantidade de energia UV acumulada ($\text{kJ}_{\text{UV}}/\text{L}$) dos processos de fotólise e fotocátalise solar	59
Figura 16. Número de células por mililitro por quantidade de energia UV acumulada ($\text{kJ}_{\text{UV}}/\text{L}$) dos processos de fotólise e fotocátalise solar	60
Figura 17. Número de células por mililitro por quantidade de energia UV acumulada ($\text{kJ}_{\text{UV}}/\text{L}$) dos processos de fotocátalise das três experiências realizadas	61
Figura 18. Concentração de microcistina-LR ($\mu\text{g}/\text{L}$) por quantidade de energia UV acumulada ($\text{kJ}_{\text{UV}}/\text{L}$) na água filtrada e nos filtros da fotocátalise.....	64
Figura 19. Concentração de microcistina-LR ($\mu\text{g}/\text{L}$) por quantidade de energia UV acumulada ($\text{kJ}_{\text{UV}}/\text{L}$) na água filtrada e nos filtros da fotocátalise.....	66
Figura 20. Cromatogramas de HPLC-DAD de um padrão de microcistina-LR.....	67
Figura 21. Cromatogramas de HPLC-DAD de um padrão de microcistina-LR e cromatogramas dos Filtros A e D da Fotocatálise.....	68

Figura 22. Cromatograma de HPLC-DAD de um padrão de microcistina-LR e cromotogramas da água filtrada da amostra 2 e do Filtro 4, ambos da Fotólise	69
Figura 23. Espectro característico da Microcistina-LR.	70
Figura 24. Cromatograma de HPLC-DAD do meio 2 Água filtrada da fotólise e espectros relativos aos três picos assinalados.....	71

Índice de Tabelas

Tabela 1. Resumo das experiências de Fotólise e Fotocatálise através da lâmpada UV-Visível.....	46
Tabela 2. Resumo das experiências de Fotólise e Fotocatálise através da luz solar.	47
Tabela 3. Metodologia do Método de Extração da Fase Sólida SPE.	48
Tabela 4. Programa Gradiente.	49
Tabela 5. Tempo, T °C e pH das amostras de Fotólise com lâmpada UV-Visível.	51
Tabela 6. Tempo, T° C e pH das amostras de Fotocatálise com lâmpada UV-Visível.	52
Tabela 7. Hora, tempo, intensidade de radiação, pH e T °C das amostras de Fotólise através do uso de CPC's.....	54
Tabela 8. Hora, tempo, intensidade de radiação, pH e T °C das amostras de Fotocatálise através do uso de CPC's.....	55
Tabela 9. Hora, tempo, intensidade de radiação, volume, pH e Tº C das amostras de Fotólise através do uso de CPC's.....	56
Tabela 10. Hora, tempo, intensidade de radiação, volume, pH e Tº C das amostras de Fotólise através do uso de CPC's.....	58
Tabela 11. Hora, tempo, intensidade de radiação, volume, pH e T °C das amostras de Fotocatálise através do uso de CPC's.	58
Tabela 12. Dados referentes às amostras da Fotólise.	62
Tabela 13. Dados referentes às amostras da Fotólise	62
Tabela 14. Dados referentes às amostras de Fotocatálise.....	64
Tabela 15. Dados referentes às amostras de Fotocatálise.....	65
Tabela 16. Reaparecimento celular na instalação piloto.	72
Tabela 17. Reaparecimento celular no laboratório.	73

Símbolos e Abreviaturas

Abreviaturas	Significado
BC	Bandas de Condução
BET	Brunauer, Emmett and Teller
BV	Bandas de Valência
CAG	Carvão Activado Granular
CPC	Colector Parabólico Composto
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FEUP	Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto
HPLC-MS	High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometr
HPLC-PDA	High Performance Liquid Chromatography-Photo Diode Array
HPLC-UV	High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet
LC/MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LEGE	Laboratório de Ecotoxicologia Genómica e Evolução
LSRE	Laboratory of Separation and Reaction Engineering
MC-LA	Microcistina-LA
MC-LR	Microcistina-LR
MC-RR	Microcistina-RR
MC-YR	Microcistina-YR
OMS	Organização Mundial de Saúde
OI	Osiose Inversa
PM	Peso Molecular
POA	Processos de Oxidação Avançados
PTCs	Parabolic-Trough Collectors
SPE	Solid Phase Extraction
UV	Ultravioleta

1. Introdução

1.1. Enquadramento e objectivos

As cianobactérias são microrganismos procariontes e autotróficos que utilizam água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz para se desenvolverem. Quando se reúnem condições tais como ambientes de água doce, salgada ou salobra, em que o pH se situe entre os valores de 6 e 9 pois a maioria das espécies apresenta um melhor crescimento em águas neutro alcalinas, temperatura entre 15 °C a 30 °C, elevadas concentrações de nutrientes principalmente azoto e fósforo e condições estáveis, as cianobactérias podem crescer excessivamente e formar florescências. Em reservatórios de água para a produção de água para consumo humano as florescências originam muitos problemas para o abastecimento de água potável.

Algumas das consequências da eutrofização artificial é a redução do oxigénio dissolvido, a perda de biodiversidade aquática, a morte de várias espécies de peixes e de outros animais, aumento dos custos de tratamento e o aumento da proliferação de microalgas e cianobactérias. Este aumento da proliferação de florescências caracteriza-se pelo acentuado crescimento destes microrganismos na superfície da água, formando uma densa camada de células com vários centímetros de profundidade. Nestes ambientes tem sido observado um aumento do domínio de espécies de cianobactérias. Isto leva a que se observem conseqüentemente uma maior ocorrência de espécies de cianobactérias nas proximidades dos centros urbanos.

Conhecem-se vários tipos de cianotoxinas, contudo as que apresentam maior perigosidade são as Microcistinas, Nodularinas, Anatoxinas, Cilindrospermopsinas e Saxitoxinas. As cianotoxinas trazem diferentes tipos de efeitos na saúde e podem ser classificados como hepatotóxicos, neurotóxicos, dermatotóxicos ou promotores da inibição geral da síntese de proteínas de acordo com seu mecanismo de acção. As mais conhecidas são as microcistinas e será sobre estas toxinas que incidirá este trabalho. Normalmente são encontradas em águas doces. Caracterizam-se por ser hepatotoxinas. São conhecidas 90 tipos de microscistinas com diferentes variações estruturais, onde se identificam como as mais conhecidas as Microcistina-RR (MC-RR), Microcistina-YR (MC-YR), Microcistina-LR (MC-LR) e Microcistina-LA (MC-LA) (Carneiro, 2008).

Nas estações de tratamento de águas, os processos existentes não são ainda suficientes para a remoção das cianotoxinas nas águas. Por isso, tem-se apostado nas investigações relacionadas com a desinfecção solar, visto que é um método que tem a capacidade de eliminar certos agentes patogénicos e apresenta custos reduzidos.

No presente trabalho serão abordados os processos de fotólise e fotocátalise. Denomina-se de

fotólise, ao processo alternativo que recorre a radiação (UV) para desinfecção da água, onde se dá uma interacção irreversível da luz com a molécula causando-lhe uma destruição total ou parcial. Muito dos trabalhos de fotólise não se mostram muito aplicáveis para a remoção de microcistina nos processos de tratamento de águas. A fotocatalise heterogénea consiste na activação de um catalisador (também conhecido por semiconductor) por luz solar ou artificial. O catalisador mais frequentemente usado é o TiO_2 (dióxido de titânio) e o que será usado durante as experiências realizadas no âmbito deste trabalho.

Existem dois tipos de colectores solares, o de calhas parabólicas e o outro é o conhecido colector não-concentrador, que é conhecido por ter uma temperatura mais reduzida que os outros colectores. Um dos tipos de colector de baixa concentração é o chamado colector parabólico composto CPC's, que será o utilizado neste trabalho.

O objectivo geral deste trabalho é promover a desinfecção de águas contaminadas com cianobactérias utilizando um fotocatalisador e luz solar. Usar-se-á tecnologia baseada na geração fotocatalítica de radicais hidroxilo combinando a luz solar com dióxido de titânio.

Os objectivos específicos são:

1. Desinfecção de águas intencionalmente contaminadas com cianobactérias da espécie *Microcystis aeruginosa* previamente cultivadas em meio Z8 descrito por Kotai (1972).
2. Avaliar a foto-eficiência do catalisador dióxido de titânio (TiO_2) na eliminação de cianobactérias (*Microcystis aeruginosa*) e da toxina por esta produzida (microcistina-LR), utilizando uma instalação piloto com colectores parabólicos compostos em condições de radiação solar natural.

1.2. Estrutura e organização

1. Introdução

Breve exposição dos temas da presente tese. Definição dos objectivos e estrutura da tese.

2. Cianobactérias e toxinas

Definição teórica de cianobactérias e cianotoxinas, bem como exposição dos problemas ambientais, humanos e nos animais causados pela problemática das cianobactérias nas águas.

3. Métodos para remover cianobactérias de água potável

Exposição sobre os métodos convencionais no tratamento de águas aplicados à remoção de cianobactérias. Demonstração dos efeitos da luz solar nos microrganismos.

4. Fotólise e fotocatalise

Abordagem teórica sobre os processos de desinfecção implementados nesta tese. Exemplos de alguns estudos feitos anteriormente.

5. Materiais e Métodos

Apresentação dos equipamentos, metodologias e procedimento utilizados.

6. Resultados e Discussão

Exposição dos resultados obtidos

7. Conclusão

Exposição das conclusões do trabalho

2. Cianobactérias e toxinas

2.1. Cianobactérias

As cianobactérias ou algas azuis ou ainda cianofíceas (do grego: *cyano*, azul + *bacteria*, bactéria) são microrganismos procariontes e autotróficos que não possuem qualquer tipo de membrana nuclear a circunscrever o seu material genético e produzem o seu próprio alimento através da fotossíntese. Crê-se que há cerca de 3,5 biliões de anos estes organismos possam ter sido os responsáveis pelo aparecimento de oxigénio na atmosfera primitiva da Terra. Podem ser encontradas tanto na forma unicelular, como em colónias de seres unicelulares, ou ainda apresentarem-se em células organizadas em forma de filamentos. Necessitam de água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz. Apresentam uma distribuição ubíqua. As cianobactérias possuem a capacidade de produzirem toxinas, denominadas cianotoxinas, podem ser classificadas de Hepatotóxicas, Neurotóxicas, Dermatotóxicas ou Promotoras da inibição da síntese de proteínas. As mais perigosas são as Microcistinas, Nodularinas, Anatoxinas, Cilindrospermopsinas e Saxitoxinas (Carneiro et al, 2007).

São organismos problemáticos pois, para além de terem a capacidade de produzir grandes quantidades de biomassa ainda conseguem sintetizar outras substâncias tóxicas. Valores de pH elevados, escassez de dióxido de carbono dissolvido e elevada quantidade de fósforo são factores favoráveis à produção de biomassa de cianobactérias e de algas. Conhecem-se espécies capazes de sobreviver longos períodos na escuridão em ambiente natural. São frequentemente os primeiros organismos a colonizar áreas básicas das rochas e dos solos. Ao nível da reprodução são assexuadas. Algumas cianobactérias apresentam uma capacidade distinta para a nutrição heterotrófica. Há registos de cianobactérias muito pequenas (0,2 – 2 µm), tendo sido reconhecida como uma fonte potencial significativa na produção primária, em vários ambientes aquáticos. A morfologia básica das cianobactérias compreende formas unicelulares, coloniais e multicelulares filamentosas, podendo estas serem ou não ramificadas e portadoras ou não de células especializadas, os heterocistos. (Mur et al. (1999)). Actualmente, encontram-se identificados cerca de 150 géneros de cianobactérias englobando perto de 2000 espécies, de entre as quais pelo menos 40 são consideradas como produtoras de toxinas – as cianotoxinas.

Quando se reúnem condições tais como, ambientes de água doce, salgada ou salobra, em que o pH se situe entre os valores de 6 e 9 pois a maioria das espécies apresenta um melhor crescimento em águas neutro alcalinas, temperatura entre 15°C a 30 °C, elevadas concentrações de nutrientes principalmente azoto e fósforo e condições estáveis, as cianobactérias podem crescer excessivamente

e formar florescências. Em reservatórios de água para a produção de água para consumo humano as florescências originam muitos problemas para o abastecimento de água potável. No entanto, as crescentes preocupações relacionadas com as cianobactérias devem-se ao facto de estas produzirem toxinas (Codd, 2000); (Veiga, 2008).

Em Portugal não existem referências directas de casos de toxicidade de cianobactérias em termos humanos. Apesar de ocorrerem mortes de peixes em grande massa, não está provado que seja devido a cianotoxinas. Mas apesar de não haver esse registo sabe-se que há uma ligação com as toxinas das cianobactérias. (Vasconcelos, 1995).

Na figura 1 é representada a qualidade da água em função da abundância máxima de cianobactérias nas águas doces portuguesas (Vasconcelos, 1995).

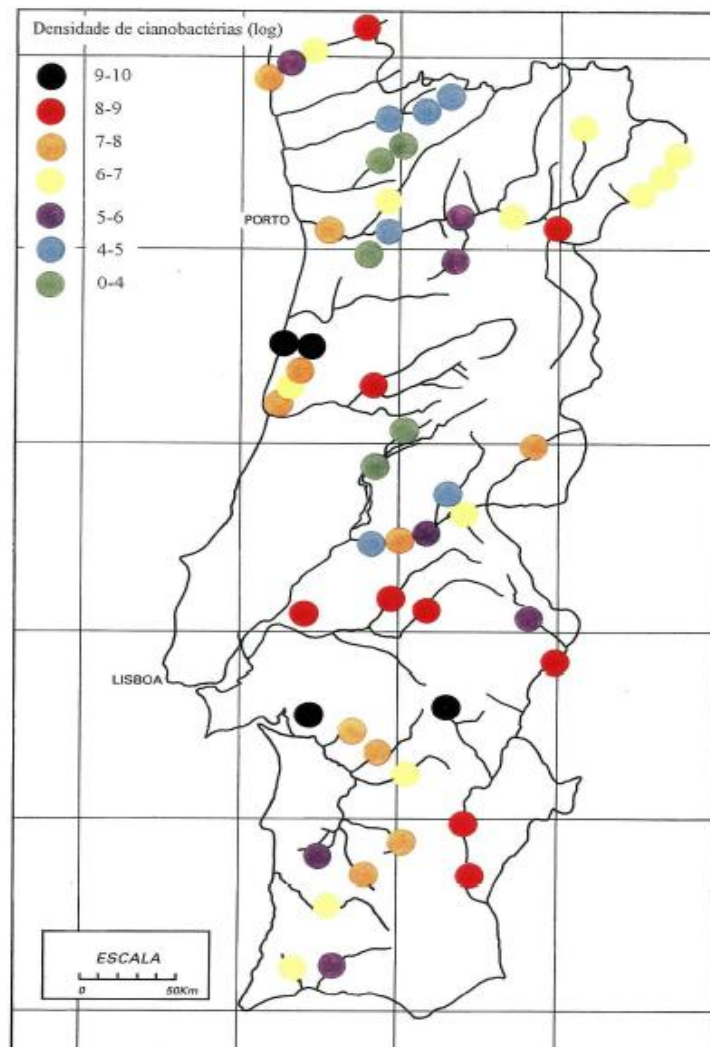


Figura 1. Carta de qualidade da água em função da abundância máxima de cianobactérias em águas doces portuguesas (Vasconcelos, 1995)

2.2. Toxinas produzidas por Cianobactérias

As cianobactérias são conhecidas por ter uma grande capacidade de produzirem gosto e odor desagradáveis à água, além de potentes toxinas (Carneiro et al, 2008). Sendo a água contaminada o principal meio de exposição do ser humano às cianotoxinas.

A estas toxinas dá-se o nome de cianotoxinas. Os géneros de cianobactérias mais conhecidos intitulam-se de *Microcystis*, *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Oscillatoria*, *Planktothrix* e *Aphanocapsa*, sendo as mais perigosas as Microcistinas, Nodularinas, Anatoxinas, Cilindrospermopsinas e Saxitoxinas, visto serem substâncias que quando ingeridas ou simplesmente, o contacto com a água contaminada, produzem efeitos nefastos nos seres vivos terrestres, aquáticos e humanos. Uma determinada estirpe de cianobactérias pode produzir mais que uma variante de cianotoxina, contudo nem todas as cianobactérias produzem cianotoxinas e nem todas são tóxicas (Fernandes, 2008).

As cianotoxinas podem ter diversos tipos de efeitos na saúde e podem ser classificados por, hepatotóxicos, neurotóxicos, dermatotóxicos ou promotores da inibição geral da síntese de proteínas, de acordo com seu mecanismo de acção (Campinas et al, 2002); (Carneiro et al, 2008).

Segundo as suas estruturas químicas, as toxinas de cianobactérias são classificadas como alcalóides, peptídeos cíclicos ou Lipopolissacarídeos, com pesos moleculares que variam entre 165 e 1000 (Campinas et al, 2002); (Carneiro et al, 2008).

O crescimento e produção de cianobactérias são directamente afectados pelas condições ambientais, tais como a idade das culturas, temperatura, luz, nutrientes, salinidade, pH e concentrações de micronutrientes. A maioria das toxinas é produzida sob condições que são favoráveis ao seu crescimento. Por exemplo, *Planktothrix* é um género de cianobactérias que prefere baixas intensidades de luz para o crescimento, *Anabaena* moderadas e *Aphanizomenon* elevadas intensidades de luz (Sivonen et al, 1999).

2.2.1. Microcistinas

As cianotoxinas mais conhecidas são as microcistinas, que normalmente são encontradas em águas doces. Caracterizam-se por ser hepatotoxinas e também peptídeos cíclicos formados por sete aminoácidos (heptapeptídeos cíclicos) de pesos moleculares (PM's) entre 800 e 1100. São conhecidas 90 tipos de microcistinas com diferentes variações estruturais, onde se identificam como as mais conhecidas as Microcistina-RR (MC-RR), Microcistina-YR (MC-YR), Microcistina-LR (MC-LR) e Microcistina-LA (MC-LA) (Sivoneon et al, 1999), (Carneiro et al, 2008).

É na fase exponencial de crescimento que a quantidade de microcistina aumenta, contudo a libertação para a água de toxinas dissolvidas dá-se mais na fase de velhice, morte ou lise das células, apesar de também poder haver morte ou lise durante a fase exponencial de crescimento (Sivonen et al, 1999).

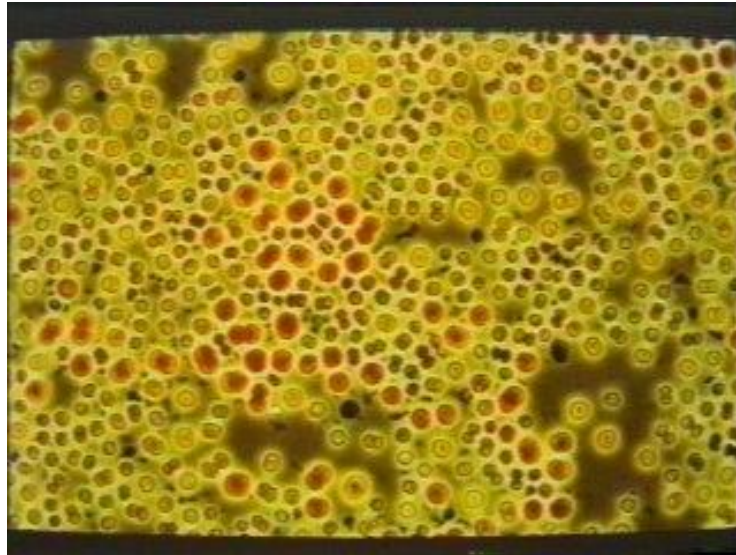


Figura 2. *Microcystis aeruginosa* Fonte: <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/images/images.html>
Consultado em: 2/07/2010.

2.2.2. Neurotoxinas, Hepatoxinas, Dermotoxinas e Citotoxinas

As cianotoxinas podem classificar-se, de acordo com a sua toxicidade nos mamíferos, em neurotoxinas, hepatotoxinas e dermatotoxinas. As Neurotoxinas apresentam um elevado grau de toxicidade e estruturalmente são classificadas como alcalóides. O seu alvo é o sistema neuromuscular, visto que interferem nos neurónios e nas células musculares (Vasconcelos, 1995). São conhecidas a saxitoxina, a anatoxina-a e as anatoxina-a(s). A saxitoxina actua ao nível dos canais de sódio dos axónios, bloqueando-os e impedindo a propagação do impulso nervoso (Andrade, 2007).

As anatoxinas agem sobre a fenda sináptica. A anatoxina-a simula a acetilcolina, ligando-se ao seu receptor (Andrade, 2007), que provocam a despolarização duradoura que resulta em bloqueio da ligação neuro-muscular e conseqüente relaxamento (Fernandes, 2008). A anatoxina-a, interfere com o funcionamento do sistema nervoso o que leva à morte em poucos minutos devido à paralisia dos músculos respiratórios. (Campinas et al., 2002). A anatoxina-a(s) inibe a acção da acetilcolinesterase, impedindo a degradação da acetilcolina. (Andrade, 2007). Apresenta uma sintomatologia que provoca

salivação (Fernandes, 2008). Nas duas resulta duma grande estimulação muscular que leva até à fadiga e posterior paralisação. As mortes resultam da paragem respiratória e/ou cardíaca.

As hepatotoxinas são péptidos cíclicos, que actuam por inibição das fosfatases proteicas PP1 e PP2. São hidrofílicas, pois não atravessam as membranas celulares, sendo assim transferidas para o fígado através de transportadores iónicos presentes nos canais biliares e no intestino delgado, onde provocam atrofio sobre a estrutura dos hepatócitos, impedindo o contacto entre eles e levando a que ocorram hemorragias que fazem aumentar o peso do fígado e que poderão ser fatais (Fernandes, 2008) e têm como órgão alvo o fígado, órgão no qual provoca, destruição interna levando a uma situação extrema, à hemorragia intra-hepática, choque hipovolémico e morte. A sua produção foi detectada em *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria* e *Cylindrospermopsis* (Andrade, 2007).

As dermatoxinas são lipopolissacarídeos existentes na membrana externa da parede celular das cianobactérias. Basta um simples contacto com a pele ou com as mucosas corporais para que se desenvolva uma reacção alérgica. As dermatoxinas apresentam uma produção ubíqua dentro das cianobactérias, contudo, o seu grau de toxicidade não é tão elevado como o de outros lipopolissacarídeos, desaparecendo os sintomas se o contacto for cessado. (Andrade, 2007)

As citotoxinas inibem a síntese proteica causando alterações citológicas essencialmente no fígado, podendo também atingir o baço, os rins, os pulmões e coração. (Fernandes, 2008).

2.3. Ambiente

O ser humano tem grande necessidade de usar os recursos hídricos para diversas actividades, tais como abastecimento público, indústria, agricultura, rega, navegação, recreio, entre outras. Apesar destas actividades dependerem geograficamente da localização onde estão inseridas, todas elas provocam danos na qualidade dos recursos hídricos. Estas actividades antropogénicas causam contaminação da água com impactos que aceleram os processos de eutrofização, que provoca um enriquecimento artificial dos ecossistemas através do aumento das concentrações de nutrientes na água, principalmente compostos nitrogenados e fosfatados, aliados a um aumento de temperatura, que resultam num aumento dos processos naturais da produção biológica em rios, lagos, e albufeiras. As descargas de esgoto doméstico e industrial dos centros urbanos e das regiões onde predomina a agricultura, tal como o uso intenso de fertilizantes são as principais fontes de eutrofização dos recursos hídricos. Algumas das consequências da eutrofização artificial é a redução do oxigénio

dissolvido, a perda de biodiversidade aquática, a morte de várias espécies de peixes, aumento dos custos de tratamento e o aumento da proliferação de microalgas e cianobactérias. (Veiga, 2008)

Estes aumentos das florescências de cianobactérias caracterizam-se pelo acentuado crescimento destes microrganismos na superfície da água, formando uma densa camada de células com vários centímetros de profundidade. Nestes ambientes tem sido observado um aumento do domínio de espécies de cianobactérias. Isto leva a que se observem conseqüentemente uma maior ocorrência de espécies de cianobactérias nas proximidades dos centros urbanos (Azevedo et al., 1994).



Figura 3. Florescência de cianobactérias Fonte: http://www.medonline.com.br/med_ed/med3/fig6.jpg
Consultado em: 1/07/2010

A formação de camadas de células na superfície da água dificulta as trocas de ar, altera a viscosidade do meio, faz com que haja uma diminuição da zona eufótica, altera o odor e o sabor da água e ainda pode provocar situações de anóxia, devido à morte massiva das cianobactérias, contudo existem outros factores que podem provocar situações de anóxia (Fernandes, 2008).

2.4. Saúde Pública

As toxinas das cianobactérias libertam-se das células e logo se difundem nas águas dos rios e dos lagos com a ajuda das fortes correntes e da acção do vento. Só recentemente é que se identificaram os riscos associados a cianobactérias tóxicas nas águas destinadas à produção de água para consumo humano, sendo ainda um grande desafio a sua remoção nos tratamentos de água. A monitorização das cianobactérias e cianotoxinas é uma prática pouco comum em muitos países; contudo quando estas são detectadas devem ser tomadas medidas de controlo ao longo dos pontos críticos do sistema de abastecimento da água. Uma das prioridades na avaliação da eficiência dos sistemas de tratamento de água é a remoção de cianotoxinas. (Veiga, 2008)

Normalmente o consumo de toxinas de cianobactérias em águas de abastecimento deve-se ao desconhecimento da presença destas. Contudo, ainda há casos em que existe deficiência na operação dos sistemas de tratamento da água.

A ocorrência de intoxicações agudas por microcistina apresenta uma grande dispersão geográfica. Foram assim já descritas intoxicações causadas por cianobactérias em países como Austrália, Inglaterra, China e África do Sul. No Brasil foi registado em 1988, o caso em que 200 pessoas foram intoxicadas pelo consumo de água de um reservatório em Itaparica (Bahia), nas quais 88 pessoas morreram (Kuiper-Goodman et al., 1999).

Contudo só em 1996 é que foi confirmado o primeiro caso de mortes humanas relacionadas com cianotoxinas, quando 123 pacientes renais crónicos que foram submetidos a sessões de hemodiálise numa clínica brasileira da cidade de Caruaru, passaram a apresentar um quadro clínico compatível com uma grave hepatotoxicose. Desses, 54 pacientes vieram a falecer até 5 meses após o início dos sintomas. As análises confirmaram a presença de microcistina e cilindrospermopsina, no carvão activado utilizado no sistema de purificação de água da clínica, e de microcistina em amostras de sangue e fígado dos pacientes intoxicados. Além disso, as contagens das amostras do fitoplâncton do reservatório que abastecia a cidade demonstraram uma dominância de géneros de cianobactérias comumente relacionados com a produção de cianotoxinas (Kuiper-Goodman et al., 1999).

Foram detectadas ainda outras evidências que levam a crer que a exposição a microcistina provocaram doenças em seres humanos, tal como em 1931 nos Estados Unidos da América, em que 15% da população apresentou gastroenterite aguda durante 2 semanas após a ingestão de água contaminada com microcistinas após tratamento deficitário. Esta mesma toxina causou também pneumonia, dores de cabeça, dores abdominais, vómitos e diarreia em soldados ingleses que treinaram em águas contaminadas (Kuiper-Goodman et al., 1999).

Em Harare (Zimbabwe) as crianças que viviam numa área da cidade fornecida por um reservatório de água com microcistinas desenvolveram gastroenterites enquanto outras crianças que não utilizavam o mesmo reservatório de água não padeceram de nenhuma doença (Kuiper-Goodman et al., 1999).

O surto mais letal verificado por causa das toxinas de cianobactérias, deu-se no Brasil quando uma represa desenvolveu uma florescência de cianobactérias, resultando 88 mortes na maioria crianças (Kuiper-Goodman et al., 1999).

Outra grande manifestação de toxicidade de cianobactérias na população ocorreu numa ilha ao largo da costa oriental do norte da Austrália onde no espaço de uma semana inúmeras crianças desenvolveram hepato-enterite, num total de 140 crianças e 10 adultos, a quem foram exigidos tratamentos hospitalares. *Cylindrospermopsis raciborskii* foi identificada como a cianobactéria responsável por este episódio (Kuiper-Goodman et al., 1999).

Dentro das populações humanas, as pessoas com maior risco de lesões causadas por cianotoxinas são as crianças e indivíduos que já tenham lesões em órgãos sensíveis às toxinas de cianobactérias, tais como pessoas com hepatite, com cirrose, com lesões hepáticas tóxicas provenientes de outras fontes, com danos nos rins ou em diálise (Kuiper-Goodman et al., 1999).

Embora a toxicidade aguda, seja o problema mais evidente no envenenamento de cianobactérias, a toxicidade crónica também é um problema presente. Curtas exposições a toxinas podem resultar em graves doenças a longo prazo. Em particular, a possibilidade de se desenvolverem cancros e tumores. No leste do sul da China, as cianobactérias são abundantes nas águas superficiais e aí pode-se verificar que os casos de carcinoma hepatocelular são mais abundantes. Aponta-se que a microcistina seja a maior causadora deste flagelo (Kuiper-Goodman et al., 1999).

Foi estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que o valor guia provisório para a variante microcistina-LR (MC-LR) é de 1µg/L para esta toxina nas águas de consumo humano. Águas com concentrações inferiores a este valor são consideradas seguras do ponto de vista de saúde pública. Este valor estabelecido pela OMS teve em consideração unicamente os efeitos agudos da MC-LR, não estando abrangidos os efeitos crónicos e cancerígenos (Andrade, 2007).

2.5. Toxicidade nos animais

Numerosos casos de envenenamento foram verificados em animais, e tal facto veio comprovar que se deve ter elevada preocupação com os perigos para a saúde dos seres vivos expostos a cianobactérias. Os primeiros relatos de intoxicação por cianobactérias foram da morte de bovinos,

ovinos, cães, cavalos e porcos após ingestão de uma espuma contaminada com Nodularina no Lago Alexandria, Austrália em 1878 (Kuiper-Goodman et al., 1999).

Uma das mais evidentes intoxicações em mamíferos foi quando se registaram mortes em ovelhas que beberam água de uma barragem agrícola contaminada com neurotóxicos, na Austrália. Os investigadores detectaram altas concentrações de saxitoxinas, tanto na barragem, como na saliva das ovelhas mortas (Kuiper-Goodman et al., 1999).

A principal lesão, que se verifica nos animais mortos por cianotoxinas é a hepatotoxicose, ou seja envenenamento do fígado. Também se verificou em muitos animais de estimação a neurotoxicose que provocam insuficiência respiratória. Ao longo do tempo tem-se verificado casos frequentes de intoxicações em animais por causa da ingestão de água contaminada com cianobactérias, contudo também se verificaram casos de cães que morreram após banho em águas contaminadas. Registaram-se também mortes, em diferentes espécies de animais, tais como, patos, aves aquáticas e até mesmo rinocerontes. À parte os casos de morte por envenenamento, também se verificam danos com prejuízos ao longo do tempo tais como insuficiência hepática (Kuiper-Goodman et al., 1999).

Para além do contacto directo com águas contaminadas com cianobactérias, tem sido sugerido que uma fonte adicional de intoxicação nos animais terrestres é a bioacumulação na cadeia alimentar. Como exemplo tem-se os mexilhões de água doce que acumulam microcistina e saxitoxinas. Estes animais são, por sua vez uma fonte de alimento para ratos de água, ratos almiscarados e aves. E assim como acontece com estes animais, é possível acontecer também com os seres humanos (Kuiper-Goodman et al., 1999).

Foram também registados casos de morte em peixes, ao mesmo tempo que apareceram florescências, contudo é ainda difícil apurar se estas mortes foram causadas por cianotoxinas, ou se amónia ou morte por asfixia. Tanto os peixes, como os restantes animais que apresentaram sintomas de intoxicação por microcistina apresentam uma sensibilidade maior na fase de desenvolvimento, do que quando já são adultos.

Em níveis tróficos mais baixos, como por exemplo, o zooplankton verifica-se que a sensibilidade às cianotoxinas, depende assim do género e da espécie em questão (Sivonen et al., 1999); (Fernandes, 2008).

2.6. Métodos de detecção e análise das cianotoxinas

Os métodos de detecção e análise de cianotoxinas variam de acordo com o tipo de informação que facultam, podendo recorrer a métodos químicos, bioquímicos, biológicos ou imunológicos.

Quando são feitas análises em campo, utilizam-se testes rápidos e de baixo custo para avaliar o risco, bem como reunir todas as medidas que devem ser implementadas. No laboratório podem ser feitas análises mais profundas onde se determinam com maior precisão a identidade e quantidade de cianotoxinas. Os métodos analíticos a que se recorre durante a realização destas análises podem ser divididos em físico-químicos, bioquímicos e biológicos. Os mais conhecidos métodos físico-químicos são o HPLC-UV, HPLC-PDA, eletroforese capilar e LC/MS. Para os métodos bioquímicos, temos o ensaio de inibição de fosfatase, ensaio de inibição de acetilcolinesterase e ELISA (imunológico). E por fim, para os métodos biológicos temos os bioensaios e os testes de toxicidade. Adaptam-se diferentes métodos analíticos às diferentes cianotoxinas, assim para amostras com nodularinas, microcistina e cilindrospermopsina usam-se os sistemas de HPLC acoplados a PDA ou espectroscopia de massas. Para amostras de saxitoxinas, o método utilizado é HPLC com detecção por fluorescência (Sousa, 2009).

Quando se utiliza o método de HPLC tem que existir um passo de pré purificação da amostra antes da sua injeção no sistema. Ou, quando se tratam de amostras de água deve-se concentra-las (Vasconcelos, 1995).

Quando se utiliza este método tem que se fazer passar a amostra por uma coluna de sílica – C18 (fase reversa), com um gradiente de acetonitrilo e água, ambos com ácido trifluoracético (fase móvel). As microcistinas vão ficando retidas durante mais ou menos tempo neste sistema consoante polaridade. À saída da coluna está um detector fotodíodo (PDA) que capta a absorção pelas substâncias que por aí passam. É um método que requer instrumentação especializada, cuidados na preparação das amostras e a comparação com os 3 padrões existentes da toxina. Esta técnica também é utilizada para as outras cianotoxinas. Assim, para microcistina é utilizada espectrofotometria a 238 nm, para anatoxina-a é utilizada a 227 nm e para outras neurotoxinas, como a saxitoxina e neosaxitoxina são detectadas por fluorometria (Fernandes, 2008).

Após a extracção do material liofilizado com soluções de butanol/metanol/água ou com ácido acético a 5% é possível realizar a análise de fluorescências de cianobactérias. O que se extraiu deve ser evaporado e purificado num cartucho com um gel de sílica-ODS. Para se obter uma fracção mais purificada (recuperada com metanol a 80% ou 100%) deve-se preceder uma etapa de lavagem com água e metanol a 20%. Os solventes a usar no sistema de HPLC podem variar, mas o mais usual são as

combinações de acetonitrilo ou metanol em acetato de amónio ou sulfato de sódio (Vasconcelos, 1995).

Ao que se refere à técnica HPLC-MS, é que esta foi uma associação entre o HPLC e a espectrometria de massa (MS) para análise da cilindrospermopsina.

O método ELISA aproveita a especificidade dos anticorpos de coelho contra microcistina-LR, para detectar a concentração de moléculas de microcistina-LR, -RR, -YR e nodularinas de forma selectiva. A especificidade do anticorpo para estas cianotoxinas deve-se essencialmente aos dois aminoácidos nelas presentes: Adda e arginina. Através de padrões de microcistina com concentrações conhecidas e de uma reacção colorimétrica anticorpo/antigene, é traçada uma recta padrão com o fim de obter a concentração de microcistina presentes na amostra. Hoje em dia são comercializados kits, que são largamente utilizados em laboratórios de monitorização de microcistinas e nodularinas na água. O kit possui uma gama de sensibilidade de 0,1 ng/ml (Fernandes, 2008)

3. Métodos para remover cianobactérias de água potável

3.1. Tratamentos físicos:

- Carvão activado

Existem dois tipos de carvão activado que são utilizados no tratamento de água para remoção de vestígios orgânicos. Temos o Carvão Activado Granular (CAG) que é geralmente usado em reactores de fluxo através da coluna e o Carvão Activado em Pó, que normalmente é adicionado directamente na água antes da coagulação e filtração. A remoção do gosto e dos odores causados pelas cianobactérias foram um dos motivos iniciais do uso de carvões activados na água. Hoje em dia são utilizados para uma ampla gama de contaminantes. Estudos sistemáticos realizados por Hoffman em 1976, revelaram que os processos de sedimentação, floculação, filtração e cloração não conseguem eliminar as toxinas das cianobactérias. Contudo o mesmo estudo revelou que a filtração com carvão activado em pó foi capaz de eliminar toxinas, embora isso dependesse dos níveis de dose adicionados. Não existe uma correspondência entre a eficácia de remoção de microcistina-LR e a teoria de absorção BET (Brunauer, Emmett and Teller), que mostra que quanto maior a superfície disponível do sólido, maior a adsorção. Em estações de tratamento de águas o desempenho do carvão activado pode ser reduzido e ainda pouco se sabe, do destino das microcistinas adsorvidas pelo carvão activado. As microcistina mais hidrofóbicas (microcistina-LW) também mostraram ser mais largamente removidas, comparativamente com a microcistina-LR (Lawton et al., 1999).

- Osmose Inversa

A Osmose Inversa (OI) tem sido utilizada na dessalinização de águas salobras e estuarinas, para fornecer água potável. A OI é similar aos métodos de filtração, na medida em que separa um líquido dissolvido numa mistura ou em suspensão. Estudos com microcistina-LR e microcistina-RR apresentaram taxas de retenção superior a 95% e embora este método pareça ser adequado à produção de água potável, é preciso lembrar que este processo não destrói as toxinas das cianobactérias da água. (Lawton et al., 1999).

3.2. Tratamentos químicos

- Cloração

O cloro tem sido usado como um reagente para tratamento de água desde o século passado. O cloro dissolve-se na água formando ácido hipocloroso, que quando atinge valores de pH acima de 5 começa a dissociar-se e a formar iões de hipoclorito. A indissociação da molécula de ácido hipocloroso

é conhecida como o agente mais eficaz de desinfecção.

Ao nível da remoção de microcistina pela aplicação do cloro, foram realizados trabalhos iniciados por Hoffmann, 1976; Keijola et al. e Himberg et al., 1988 que logo concluíram que o processo era ineficaz. Apesar de Keijola e Himberg não terem registado valores de pH nos seus trabalhos, Hoffman apresentou um valor de pH de 8,5 e conseqüente observou-se uma dependência do valor de pH na eficiência de remoção de microcistina.

Até à data, não houve relato de uso de dióxido de cloro para o tratamento de microcistina. Este tem sido aplicado de forma eficaz para o tratamento de muitos compostos orgânicos e acredita-se que pode ter aplicações na destruição de microcistina, contudo é um método que está dependente da dose adequada e da manutenção dos níveis de cloro residual, sendo ainda desconhecida a formação de produtos nocivos (Lawton et al., 1999).

- Ozonização

O ozono é um gás instável, com um alto potencial de oxidação e é usado para tratamento de água através da dispersão do gás. É amplamente utilizada para o tratamento de água potável mas é caro e por vezes é imprevisível. O ozono combinado com luz UV mostra ser eficaz na destruição de uma vasta gama de compostos orgânicos.

Rositano, 1998 e colegas descobriram que 99% de microcistina foi removida em 15 segundos, quando tratados com $0,05 \text{ mg dm}^{-3}$ de ozono. As suas investigações descobriram que o ozono, juntamente com cloro, peróxido de hidrogénio e permanganato de potássio tornou-se mais eficaz na destruição da microcistina-LR, o que corresponde a um maior potencial de oxidação do ozono.

Os estudos apresentados sugerem que a ozonização é um método eficaz para a remoção de microcistina presentes na água potável, mostrando ser um método promissor. Embora, ainda seja importante caracterizar a decomposição dos sub-produtos e das suas implicações potenciais para a saúde. (Lawton et al., 1999)

- Permanganato

É um agente oxidante capaz de destruir compostos orgânicos e microrganismos. Geralmente ataca os grupos funcionais com ligações múltiplas e com anéis de benzeno. Usando 1 mg dm^{-3} de solução de permanganato de potássio foi removido 95% de $200 \mu\text{g}$ de solução de microcistina-LR em 30 minutos. Foi feita uma comparação entre a oxidação de microcistina-LR quando se utilizava cloro e depois com permanganato de potássio, e os resultados mostraram uma curva de declínio semelhante para os dois oxidantes. No entanto, observou-se que o permanganato removia mais rapidamente a

microcistina. Não foram caracterizados nenhuns subprodutos de decomposição. Este reagente parece ser uma promessa na remoção das microcistina mas, o estudo ainda é pouco detalhado (Lawton et al., 1999).

- Peróxido de hidrogénio

O peróxido de hidrogénio é um oxidante eficaz, mas apresenta desvantagens no tratamento de águas. É aplicado no tratamento de efluentes de fábricas de papel, na perfuração lamas e em outros tipos de efluentes orgânicos. A eficácia de oxidação do peróxido de hidrogénio pode ser reforçada pela irradiação com luz UV. Pesquisas demonstraram que o peróxido de hidrogénio é relativamente ineficaz na degradação de microcistina LR, com apenas 17% de remoção em 60 minutos após o tratamento com 20 mg dm⁻³ de solução de peróxido. Não se verificou nenhuma destruição após 10 minutos. No entanto quando se combinou H₂O₂ com o ozono, as toxinas foram todas removidas em 30 segundos. Não há relatos do uso de UV/H₂O₂ para o tratamento de águas contendo microcistina. Este reagente mostra-se assim pouco promissor para a remoção de microcistina, mas se combinado com H₂O₂ ou com UV, demonstrou ser muito poderoso (Lawton et al., 1999).

3.3. Efeitos da radiação solar nos microrganismos

Desde 1877, que remontam os relatos que a luz solar serve como agente para matar microrganismos. Nos tempos que correm, tem-se dado maior importância a estes estudos visto que, obter água potável através desta técnica, apresenta custos muito reduzidos. As pesquisas feitas têm-se concentrado mais em volumes de água reduzidos, tais como garrafas. Este método tem-se revelado simples e com sucesso pois, uma ampla variedade de agentes patogénicos são eliminados. A técnica de desinfetar águas com a luz solar é muito apropriada para uso doméstico, mas já não apresenta as mesmas vantagens para volumes de água maiores. A resistência dos microrganismos à radiação solar tem sido estudada por vários autores, e a bactéria mais frequentemente escolhida é a *E. coli* visto ser um “alvo fácil” para a desinfecção, dado que é relativamente simples a sua inactivação por radiação solar. Estudos realizados mostraram que *E. coli* são facilmente inactivadas pela luz solar seguindo-se outros coliformes tais como Gram-negativos e depois *Enterococcus*. Outros casos há, como por exemplo a bactéria *Bacillus cereus* que não é inactivada só com a radiação solar. Cada amostra responde à luz solar de acordo com a sua natureza e resistência (Blanco-Galvez et al., 2006).

4. Fotólise e fotocatalise

4.1. Fotólise

Denomina-se de fotólise, ao processo alternativo que recorre a radiação (UV) para desinfecção da água, onde se dá uma interacção irreversível da luz com a molécula causando-lhe uma destruição total ou parcial. Hoje em dia, é um processo muito em voga nos países europeus e o seu desenvolvimento tem vindo a aumentar, dado que é sistema barato comparativamente com os processos usuais de desinfecção com cloro. Normalmente, é mais usada quando a água apresenta baixa turvação e cor, visto que é necessária uma penetração da luz no meio. É uma alternativa muito viável para pequenas povoações mais isoladas, dado que tem um baixo custo, tem uma operação prática dos reactores comerciais e é uma solução para a dependência destas povoações às estações de tratamento de água, que normalmente se encontram distantes e não garantem eficazmente o nível de abastecimento (Donaire).

A luz solar caracteriza-se pela energia do fóton, a qual é inversamente proporcional ao comprimento de onda λ . Quando uma molécula absorve um fóton origina a sua fotólise e esta energia deve ser superior à energia de ligação que foi quebrada. Só os fótons mais energéticos provenientes da região do ultravioleta do espectro electromagnético é que são capazes de causar este tipo de reacção. Costumam-se situar numa faixa entre 40 a 400 nm de comprimento de onda, entre os raios X e a luz visível. A radiação ultravioleta é então dividida em UV-C de 200 a 280 nm, UV-B de 280 a 315 nm e UV-A de 315 a 400nm. Sendo a UV-C, a luz mais eficiente na inactivação de bactéria e vírus num curto tempo de contacto sendo assim a mais utilizada na desinfecção (Assalin, 2001).

A oxidação fotolítica pode ocorrer por vários métodos e para que ocorra, é necessário que o composto absorva a luz no mesmo comprimento de onda que é emitido pela fonte de luz. Se este não for o caso, a degradação fotolítica pode ainda ser alcançada através de um relé ou sensibilizante que absorva a luz e iniciem a reacção de decomposição. Em muitos casos, há uma transferência de electrões da molécula do estado animado ao estado fundamental, gerando um anião radical de superóxido. O catião radical formado por este processo pode ser hidrolisado. Em alguns casos, por exemplo, na degradação fotolítica de halogenados alifáticos e compostos aromáticos, podem ser formados radicais *via* ruptura homolítica que posteriormente reagem com o oxigénio. Este processo foi aplicado a uma ampla gama de substratos orgânicos, incluindo compostos clorados aromáticos e alifáticos, nitrotoluenos, fenóis e derivados de petróleo. (Lawton et al., 1999).

Quando se faz a desinfecção com ultravioleta, deve-se ter em atenção a dose a ser utilizada tal como quando se usa uma substância química, como o cloro, que se tem em atenção a concentração

dessa substância em mg/L. Para tal, a dose de radiação ultravioleta pode-se quantificar como sendo o produto da intensidade de radiação bactericida (W/cm^2) pelo tempo de exposição:

$$D = I \times t \quad (1)$$

Onde:

D = dose de radiação ultravioleta (Ws/cm^2);

I = intensidade de radiação bactericida (W/cm^2);

T = tempo de exposição (s).

Na determinação da irradiação total incidente sobre um detector utiliza-se um aparelho denominado de radiómetro.

Quando se pretende calcular a fracção de sobrevivência usa-se a seguinte fórmula:

$$\frac{N}{N_0} = f(D) \quad (2)$$

Onde N_0 e N são respectivamente, densidade de microrganismos antes e depois da aplicação da radiação ultravioleta, e $f(D)$ representa a função da dose (Assalin, 2001).

A fotólise tem vindo a tornar-se uma alternativa na desinfecção de vírus e bactérias, uma vez que é um processo de baixo custo e onde não se formam subprodutos tóxicos.

Ao contrário dos outros desinfectantes, a radiação ultravioleta atinge principalmente os ácidos nucleicos dos microrganismos, promovendo reacções fotoquímicas, que inactivam os vírus e bactérias (Donaire).

Neste processo de desinfecção está muito dependente a qualidade da água a ser desinfectada, pois tem-se observado uma diminuição da eficiência da desinfecção em águas onde a concentração de sólidos suspensos seja alta.

A radiação ultravioleta provoca a morte dos microrganismos ou bloqueia o processo reprodutivo dos mesmos sendo estes os mecanismos processados na desinfecção. Pode também ocorrer a morte celular devido ao rompimento das membranas celulares através de determinadas doses de absorção da radiação UV. Se forem doses pequenas também podem inibir as células de se reproduzir (Assalin, 2001).

Quando for empregue uma desinfecção de água através da radiação Uv deve-se ter em atenção à resistência dos microrganismos à radiação UV, a necessidade do uso combinado com um desinfetante químico, a qualidade da água, mais especificamente a concentração de sólidos suspensos e por fim a dificuldade em determinar e controlar a dose de radiação UV no processo de desinfecção. (Assalin, 2001).

Tsuji et al investigaram o efeito da luz solar sobre a microcistina-LR e RR. Só a irradiação teve efeito sobre as microcistina apresentando 86% das toxinas após 26 dias de fotólise. A adição de pigmentos fotossintéticos naturais reforçou o processo de destruição em mais 95% nos 29 dias seguintes. A taxa de destruição mostrou-se dependente da concentração de pigmento. Trabalhos posteriores de Tsuji et al. mostraram que a microcistina-LR poderia ser completamente destruída num espaço de 10 minutos sob uma luz UV de intensidade de 2550 centímetros $W\ cm^{-2}$ (Lawton, et al 1999).

Muito dos trabalhos de fotólise não se mostram muito aplicáveis para a remoção de microcistina nos processos de tratamento de águas.

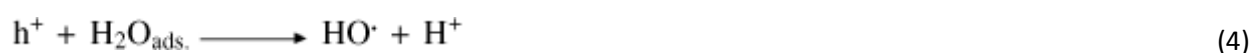
4.2. Fotocatálise

Quando se procede ao tratamento de águas deve-se ter em conta o tipo de processo que se deve utilizar, pois há que ter em atenção a natureza e as propriedades físico-químicas das águas ou efluentes a tratar. Quando os processos convencionais de tratamento não são suficientes implementa-se muito hoje em dia, nos países industrializados os Processos de Oxidação Avançados (POA's). Os POA baseiam-se na formação de radicais livres hidroxila ($\cdot OH$) que vão mineralizar poluentes orgânicos em formas não tóxicas, como CO_2 e H_2O . Estes radicais livres hidroxila são gerados em reacções fotocatalisadas ou quimicamente catalisadas e têm como característica, ser altamente oxidantes. Os POA são vistos como uma alternativa de sucesso, uma vez que conseguem destruir os poluentes e não apenas transferi-los de uma fase para outra como acontece em alguns tratamentos convencionais. Dentre os POA destaca-se a fotocatalise heterogénea, cujo processo abrange reacções redox induzidas pela radiação, na superfície catalisadores tais como, TiO_2 , CdS , ZnO , WO_3 , ZnS , BiO_3 e Fe_2O_3 (Ferreira et al., 2004).

Durante a década de setenta foram realizados estudos para se obter combustíveis a partir de materiais baratos, através da transformação da energia solar em energia química. Esses estudos foram realizados em células fotoeletroquímicas e foi durante essas pesquisas que surgiu a fotocatalise heterogénea. Durante essa mesma década foi descrita a experiência que mostrava a oxidação da água

em suspensão de TiO_2 irradiado numa célula fotoeletroquímica, que conseguia gerar hidrogénio e oxigénio. Foi a partir desta época que muito se fez em prol do entendimento dos processos fotocatalíticos envolvendo a oxidação da água e iões inorgânicos. A primeira descrição onde se demonstrava uma total mineralização de clorofórmio e tricloroetileno para iões inorgânicos, durante a iluminação de suspensão de TiO_2 , levou que se abrisse portas à possibilidade da aplicação da fotocatalise à desinfecção de águas, visto que é um potencial método de destruição de poluentes (Nogueira et al., 1998).

A fotocatalise heterogénea consiste na activação de um catalisador (também conhecido por semiconductor) por luz solar ou artificial. O catalisador mais frequentemente usado é o TiO_2 e caracteriza-se por bandas de valência (BV) e bandas de condução (BC) sendo a região entre elas chamada de "bandgap". A absorção de fotões com energia superior à energia de "bandgap" faz com que haja uma ascensão de um electrão da banda de valência para a banda de condução. Este processo gera uma lacuna (h^+) na banda de valência, lacunas tais, que mostram potenciais bastante positivos na faixa de +2,0 a +3,5 V. Este potencial é suficientemente positivo para originar radicais HO^\bullet a partir de moléculas de água adsorvidas na superfície do catalisador que podem de seguida oxidar o contaminante orgânico:



Onde:

H^+ = lacuna fotogerada (do inglês, hole);

e^- = electrão fotogerado;

BV = banda de valência do semiconductor;

BC = banda de condução do semiconductor.

A eficiência da fotocatalise está dependente da competição entre o electrão que é retirado da superfície do catalisador e do processo de recombinação do par electrão/lacuna, no qual resulta na libertação de calor. (Nogueira et al., 1998).



O TiO_2 é o catalisador mais frequentemente utilizado em processos fotocatalíticos devido à sua activação perante a luz solar, à insolubilidade na água, à estabilidade química em ampla faixa de pH, à possibilidade de imobilização em sólidos, ao baixo custo e à ausência de toxicidade. (Assalin et al., 2001).

Quando se utiliza o catalisador TiO_2 existe uma limitação na absorção de radiações até 385 nm devido à sua “band gap” de 3,2 V. Radiações com este comprimento de onda são conseguidos através de uma lâmpada germicida (30 W), cuja emissão é de 254 nm e também com uma lâmpada de luz negra (30 W) que emite 300 a 425 nm, cuja intensidade luminosa máxima é de 365 nm e favorecem a excitação do TiO_2 , cujo comprimento de onda é menor que 380 nm. (Assalin et al., 2001). Existe também a possibilidade da utilização da luz solar na fotocatalise para activação do catalisador. O seu “band gap” é de 3,2 V, por isso é necessária descoberta de novos catalisadores que apresentem uma maior absorção na região do visível para desenvolver a técnica de fotocatalise utilizando a luz solar (Nogueira et al., 1998).

As vantagens de se utilizar a fotocatalise são: amplo espectro de compostos orgânicos que podem ser mineralizados, possibilidade da não utilização de receptores adicionais de electrões, tais como H_2O_2 , possibilidade de reutilização do fotocatalisador, e possibilidade do uso da radiação solar como fonte de luz para activar o catalisador (Ferreira et al., 2004).

Algumas das desvantagens da fotocatalise são: falta de um desinfectante para se manter a boa qualidade da água. Necessidade de utilização de um desinfectante secundário, pois as espécies oxidantes formadas pelo processo fotocatalítico, tais como o radical hidroxila possuem um tempo de vida curto (Assalin et al., 2001).

4.2.1. Alguns estudos semelhantes já realizados

No que concerne à destruição de cianotoxinas através da fotocatalise, temos os seguintes estudos:

- *Robertson et al. (1997)* avaliaram a destruição de toxinas de cianobactérias por semicondutores de fotocatalise.

A utilização de semicondutores de fotocatalise para a destruição de poluentes ambientais é uma técnica bem estabelecida. Foram iluminadas na presença de ar e de um catalisador TiO_2 (1% m / v de TiO_2 Degussa P-25) 10 soluções aquosas de microcistina-LR (pH 4, 33° C) usando uma lâmpada de xenon UV (280 W 400 UVASpot Lamp, Uvalight Technology Ltd, a saída espectral 330-450 nm). A experiência foi realizada numa série de soluções contendo diferentes concentrações de microcistina-LR. As concentrações (mg/L) utilizadas foram bastante superiores às que ocorrem naturalmente (nM-pM). Foi possível quantificar a toxina directamente por HPLC, sem ser necessário o processamento multi-passos, que é necessário quantificar a níveis muito mais baixos encontrados no meio ambiente. A destruição da microcistina-LR deu-se rapidamente, tendo sido observado para todas as concentrações, até ao mais alto nível testado (200 mg/L), com a toxina virtualmente indetectável após 40 minutos. Foi sugerido que, concentrações pequenas de poluentes que possam estar presentes na água potável são rapidamente removidas por esta técnica. As amostras que foram iluminados sem TiO_2 não exibiram nenhuma degradação.

Foram agitados frascos contendo solução de toxina, mais TiO_2 à temperatura ambiente e no escuro, utilizando um agitador balão por 24 horas. A dissolução de microcistina-LR foi separada do catalisador e quantificados por HPLC.

Os resultados preliminares demonstraram que este sistema também pode ser aplicado com sucesso na destruição de outras classes de toxinas de cianobactérias. A remoção eficiente de microcistina e os benefícios da supressão relatada de outros contaminantes orgânicos indica que a fotocatalise é um método mais apropriado para o tratamento de água potável para abastecimento.

- *Shephard et al. (1998)* estudaram a degradação fotocatalítica de toxinas microcistina de cianobactérias na água. Os resultados das experiências iniciais sobre a degradação fotocatalítica de microcistina LR YR mostram que tanto com oxigénio, como gás de purga, e ainda um catalisador de carga de 1 g/l, os níveis de contaminantes microcistina caíram abaixo do limite de detecção no prazo de 20 minutos. Foi também verificado que, quanto maior a concentração inicial de microcistina, mais rápido é a sua taxa de degradação.

Foi também estudada a influência que o TiO_2 tem na ausência de irradiação UV, durante a remoção de microcistina da água. Foi assim demonstrado que, as concentrações de microcistina

diminuíram uma média de apenas 11%, por um período de mais de 60 minutos. Assim, é notório o papel essencial da radiação UV para a realização de degradação. Foi aqui analisado que, a fotólise pode conseguir a destruição de microcistina mas esta depende da intensidade da luz. Os resultados obtidos tiveram como particularidade, o uso de extracto de algas dissolvido em água destilada. A fim de estabelecer maior simplicidade do método, a água da matriz utilizada para as experiências, foi obtida a partir de uma lagoa costeira hipertrófica local. O uso da água natural do lago não tratado resultou numa lenta decomposição de microcistina. Observou-se também que para a água destilada, aumentando a carga do catalisador, as taxas de decomposição foram também mais rápidas.

- *Robertson et al.(1998)*, estudaram os processos que influenciam a destruição da microcistina-LR por fotocatalise TiO_2 . Foram relatados os factores que influenciam a taxa de destruição de toxinas na superfície do catalisador. Foi observado um isótopo cinético primário quando a destruição foi realizada num solvente de água pesada. Foram também observados compostos hidroxilados como produtos do processo de destruição. Verificou-se também que, não existe destruição quando o processo foi investigado sob uma atmosfera de azoto. Os materiais enunciados no artigo foram: Microcistina-LR, que foi purificada a partir de uma amostra natural de *Microcystis aeruginosa*. As células de cianobactérias foram extraídas em metanol, seguido por cromatografia de fase reversa C18. A purificação final foi realizada por cromatografia preparativa C18 de fase reversa. O dióxido de titânio (Degussa P-25) foi utilizado como receptor. A experiência a que recorreram foi a fotocatalise, onde se iluminou na presença de ar e de um catalisador TiO_2 (1% m/v de chorume TiO_2 Degussa P-25) as soluções aquosas de microcistina-LR (reação em pH 4 e temperatura 33 °C), usando uma lâmpada de xenon UV (280 W UVASpot 400 Lâmpada, Tecnologia Luz UVA, saída espectral 330-450 nm). O mesmo procedimento foi adoptado para as experiências realizadas com a água pesada. A destruição da microcistina-LR foi investigada tanto na água (H_2O) como em solventes de água pesada (D_2O). A taxa de destruição das toxinas nos solventes de água pesada (D_2O) foi significativamente menor do que a observada na água (H_2O). Os intermediários da destruição foram investigados através de espectrometria de massa. Este é um produto muito estável, como é testemunhado pelo facto de que ela está presente até 100 minutos. A rápida perda da toxicidade durante o decorrer do tratamento fotocatalítico também seria consistente com um ataque a essa ligação. Quando a destruição foi investigada sob atmosfera de azoto foi observado o desaparecimento da toxina. Testes de toxicidade das soluções tratadas por esse método confirmaram que os subprodutos do processo fotocatalítico não são tóxicos.

4.3. Colectores solares

Os processos fotocatalíticos são conhecidos, por utilizarem unicamente energia em alta com curtos comprimentos de onda para a promoção das reacções fotoquímicas. Para garantir uma conversão eficiente de fotões incidente a transportar, o desenho de um reactor solar é de extrema importância. Existem assim dois tipos de colectores solares, colector de calhas parabólicas e o outro é conhecido como colector não-concentrador, que é famoso por ter uma temperatura mais reduzida que os outros colectores (Blanco-Galvez et al., 2006).

Os colectores devem ter o fluido directamente exposto à radiação solar e devem ser transparentes. Os seus componentes reflectores devem ser optimizados de modo a reflectir um determinado comprimento de onda e não apresentam necessidade de insolação térmica, visto que a temperatura não desempenha um papel importante, sendo esse o motivo de terem surgido variantes dos colectores no que diz respeito à sua temperatura, podendo existir dispositivos solares de elevada, média ou baixa temperatura (Blanco-Galvez et al., 2006).

Em 1980, surgiram as primeiras projecções de fotoreactores e estas eram baseadas em colectores de calha parabólica (parabolic-trough collectors, PTC's) por duas razões. A primeira razão devia-se ao facto de ser uma tecnologia relativamente madura e facilmente adaptável. Em segundo lugar, no que diz respeito a sistemas de concentração disponíveis, os PTC's foram considerados os mais adequados para este tipo de aplicação. No início de 1990, alguns grupos de investigadores, tentaram usar colectores solares não-concentradores como uma alternativa para os PTC's, visto estes últimos serem inadequados para aplicações fotocatalíticas por várias razões: a água é demasiadamente aquecida, o fluxo de radiação é muito alto, a maior parte dos fotões não são utilizados eficientemente e o seu custo é elevado, pois possuem sistemas de procura de sol. Os colectores solares não-concentradores caracterizam-se por serem sistemas estáticos pois não possuem mecanismos de procura do sol. São geralmente dispositivos de placa plana, orientados para o equador numa inclinação específica que depende da latitude do local. (Blanco-Galvez et al., 2006).

Os seus tubos também estão disponíveis numa grande variedade de materiais e tamanhos. Apresentam como suas principais vantagens, simplicidade, pequenos custos de fabrico, as estruturas de apoio são fáceis e baratas de instalar, a área necessária para a sua instalação é reduzida, são mais económicos que os PTC's, uma vez que não existem peças móveis ou mecanismos de monitorização. No entanto, a sua recolha de luz solar é menos eficiente dada a sua orientação fixa. Um dos tipos de colector de baixa concentração é o chamado colector parabólico composto CPC's, utilizado em aplicações térmicas (Blanco-Galvez et al., 2006).

4.3.1. CPC's

CPC's é a abreviatura para os conhecidos colectores parabólicos compostos. Estes colectores combinam as características e vantagens dos concentradores parabólicos e dos colectores de placa plana. Enquanto concentram a radiação solar, também retêm a radiação estática e a radiação difusa, característica dos colectores de placa plana. São normalmente escolhidos por serem uma boa opção para aplicações com experiências fotoquímicas por diversos grupos de investigadores.

O factor de concentração de um colector CPC é dado por:

$$R_{C, CPC} = \frac{1}{\sin \theta_a} = \frac{A}{2\pi r} \quad (7)$$

Para aplicações fotocatalíticas o valor do semi-ângulo de aceitação (θ_a) está entre 60° e 90° . Esta gama de aceitação permite que o receptor recolha, tanto a luz directa, como grande parte da luz difusa ($1/RC$), com a adicional vantagem de diminuir os erros de ambas as superfícies e alinhamento do tubo receptor, que se tornam importantes para alcançar um reactor de baixo custo. Um caso especial é aquele em que $\theta_a = 90^\circ$ e $RC = 1$ (colector não-concentrador). Quando isso acontece, todas as radiações UV que atingem a área do CPC (directa e difusa) podem ser colectadas e redireccionadas para o reactor. Se o CPC for concebido para um ângulo de aceitação de $+90^\circ$ e -90° , todas as radiações difusas podem ser colectadas (Malato et al, 2009).

Resumindo, as vantagens dos CPC's, as suas condições de escoamento turbulento fazem com possa haver uma ausência de vaporização dos compostos voláteis, falta de acompanhamento, ausência de sobreaquecimento, uso potencial de radiação solar directa e difusa, baixo custo, propriedades à prova de intempéries e alta eficiência quântica e óptica. Possuem assim as vantagens dos sistemas concentradores e não-concentradores e nenhuma das desvantagens. Sendo a melhor opção para os processos fotocatalíticos solares. (Blanco-Galvez et al., 2006).

5. Materiais e Métodos

5.1. Descrição do equipamento

5.1.1. Lâmpada UV-Visível

Os ensaios foram realizados num reactor à escala laboratorial, que se encontrava no LSRE (Laboratory of Separation and Reaction Engineering) da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. O reactor possui uma capacidade de 850 mL e é constituído por uma lâmpada UV-Visível Heraeus Noblelight GmbH (2,20 A; 94,2 V e 159,2 W).



Figura 4. Reactor de laboratório com lâmpada UV-Visível

5.1.2. Colector Parabólico Composto

Os ensaios foram realizados numa instalação piloto com Colectores Parabólicos Compostos que se encontravam na cobertura do Departamento de Engenharia Química, da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. Esta é constituída por quatro tubos de vidro de borosilicato ligados em série. Cada tubo mede 1500 mm de comprimento, 50 mm de diâmetro e 1,8 mm de espessura e a área de irradiação de 0,91 m². Cada tubo contém um espelho de alumínio anodizado e uma estrutura de alumínio para sustentação.



Figura 5. Instalação piloto com CPC's da FEUP

O Colector apresenta também dois tanques de recirculação de polipropileno com capacidade de 21 L. É ainda constituído por uma bomba de recirculação de arraste electromagnético e duas válvulas de regulação do caudal.

A instalação tem um radiómetro UV-A montado para que seja possível medir a radiação solar instantânea (W/m^2) e a energia acumulada (W/h), apresenta um pico de medição a 360 nm e uma gama de resposta entre 300 e 400 nm. Este encontra-se ligado a um sistema de aquisição de dados (LS3200 e MAC-3580, DESIGN Instruments, S.A.).

Para calcular a quantidade de energia UV acumulada ($Q_{UV,n}$ kJ/L) que é adquirida em qualquer superfície, em igual posição relativamente ao sol, por unidade de volume de água no interior do reactor, no intervalo de tempo Δt , utiliza-se a equação representada em baixo:

$$Q_{UV,n} = Q_{UV,n-1} + \Delta t_n \overline{UV}_{G,n} \frac{A_r}{V_t}; \quad \Delta t_n = t_n - t_{n-1} \quad (8)$$

Onde,

- t_n é o tempo que corresponde à amostra n de água,
- V_t o volume total do reactor,

- A_r a área de superfície iluminada do colector,
- $\overline{UV}_{G,n}$ a radiação UV solar média medida durante o período Δt_n .

5.2. Métodos Utilizados

5.2.1. pH e Temperatura

As amostras foram submetidas a medição de pH e temperatura através de um medidor de pH de bancada modelo HANNA HI4522.

5.2.2. Contagem de células

As amostras foram submetidas a contagem de células através da metodologia tradicional de contagem de células utilizando câmara de Neubauer (Área = 0,0025 mm², Profundidade = 0,100 mm).

Na contagem de células não existe um limite de detecção mínimo.

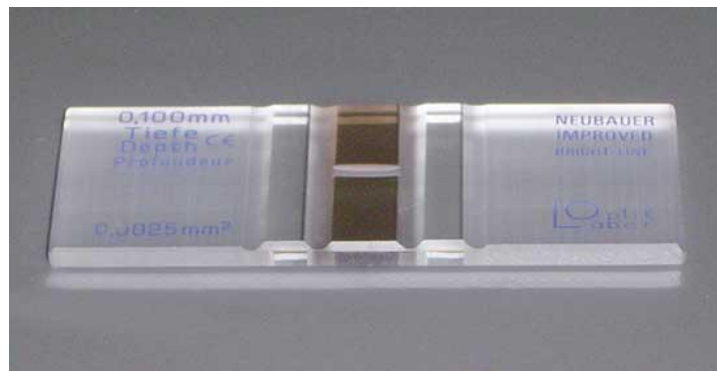


Figura 6. Câmara de Neubauer

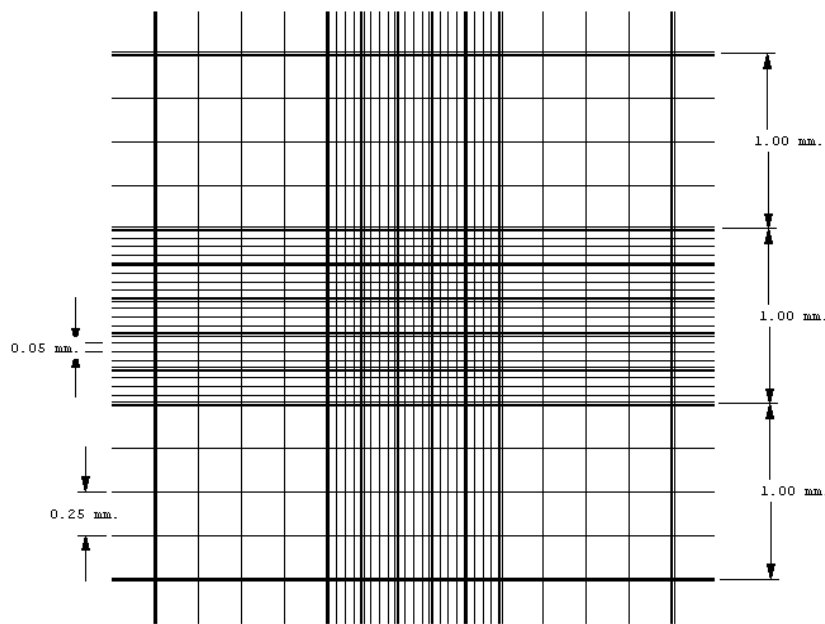


Figura 7. Área de contagem de câmara de Neubauer

5.2.3. Método de Extração da Fase Sólida SPE

O Método SPE (Solid Phase Extraction) é um processo de separação no qual os compostos que se encontram dissolvidos ou suspensos nas misturas líquidas são separados dos outros compostos da mistura de acordo com as suas propriedades físicas e químicas. É um método normalmente usado para concentrar ou purificar amostras para análise.

O material utilizado neste processo consistia num Waters Sep-Pak Vacuum Manifold Millipore conectado a uma bomba de vácuo utilizando colunas Strata™ from phenomenex (55µm, 70 Å) 10 g/60 mL ou colunas Waters Sep-Pak Vac 6cc C₁₈ – 500 mg conforme o volume a ser tratado. Este material encontrava-se no LEGE (Laboratório de Ecotoxicologia Genómica e Evolução) do CIIMAR da Universidade do Porto.



Figura 8. Instalação do Waters Sep-Pak Vacuum Manifold Millipore e das colunas StrataTM from phenomenex

5.2.4. Método de evaporação das amostras

Para este método recorreu-se a um rotovapor que evaporou as amostras para que o solvente fosse retirado da amostra, concentrando assim as toxinas para posterior análise.

O material a que se recorreu foi um rotoevaporador BUCHI 461 Water Bath que trabalhava em conjunto com uma bomba de vácuo BUCHI Vacuum Pump V-700 e com um minichiller Minichiller, Huber que tinha que estar com temperaturas entre $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ e os $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$. A temperatura do banho era de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, a pressão era de 337 m bar e o ponto de ebulição era a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Figura 9. Fotografia do rotoevaporador BUCHI 461 Water Bath juntamente com a bomba de vácuo BUCHI Vacuum Pump V-700 e com o minichiller

5.2.5. High-performance liquid chromatography (HPLC)

Técnica que permite separar os compostos de uma mistura, e é utilizada para identificar, quantificar e purificar os componentes individuais da mistura. O aparelho a que se recorreu era Alliance Waters e2695 Separation Module juntamente com Waters 2998 Photodiode Array Detector.

Este aparelho tem um limite de detecção de 0,12 $\mu\text{g/ml}$.

Em baixo são descritas as condições do aparelho:

- Condições do HPLC

- Fase Móvel

A: Metanol + 0,1 % TFA (ácido trifluoracético);

B: Água Milli-Q + 0,1 % TFA (ácido trifluoracético);

Ambas as soluções foram filtradas por 0,2 μm e submetidas ao ultrasom.

A recta de calibração do HPLC é a que se apresenta de seguida.

Sendo a equação da recta a que é apresentada no gráfico.

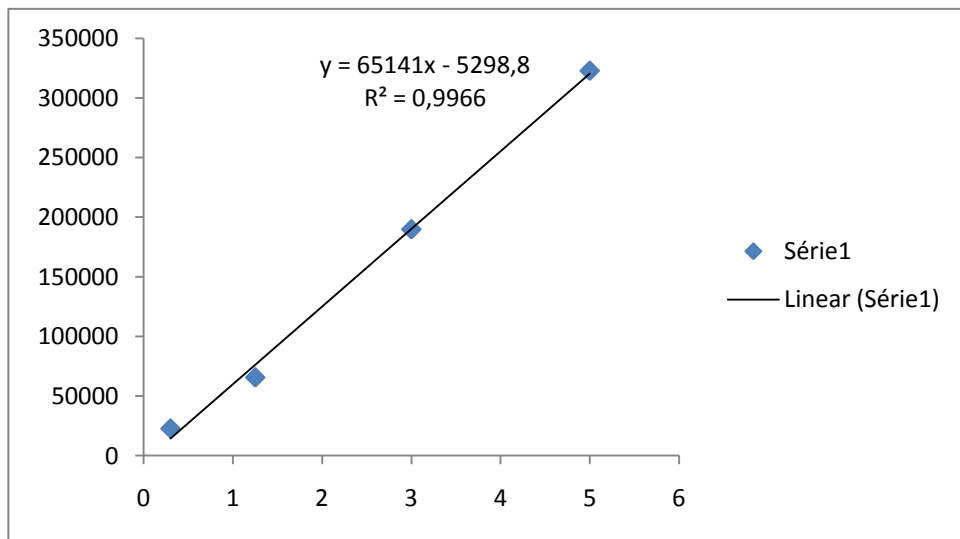


Figura 10. Recta de calibração do HPLC

- Quantificação

A concentração de microcistina (ppm) é obtida a partir da recta calculada com os vários pontos fornecidos ou através da fórmula:

$$C(\text{ppm}) = \frac{(\text{Conc. standard} \times \text{Área sample})}{\text{Área standard}} \quad (9)$$

5.3. Procedimento experimental

5.3.1. Cultivo de cianobactérias

Neste trabalho usaram-se Cianobactérias *Microcystis aeruginosa*. O meio de cultura recorreu a balões contendo a cultura em crescimento que foram mantidos numa sala de cultura sob temperatura de 25 °C, com um período de luz de 14 horas por dia entre as 7 h e as 21 h durante 1 mês.



Figura 11. Cultura de *microcystis aeruginosa*

5.3.2. Obtenção da água contaminada com cianobactérias

Para realização das experiências utilizou-se água de abastecimento público submetida a processos descloração através da circulação da água no próprio reactor fotocatalítico com tanque semi-aberto para volatilização do cloro durante 24 horas. O pH da água foi controlado antes e após a descloração e adicionado hidróxido de sódio (NaOH) com o objectivo de se obter valores entre 7,7 e 8,0 semelhante ao meio de crescimento das algas, as quais foram adicionadas posteriormente.

5.3.3. Desinfecção da água

Os processos fotocatalíticos foram realizados no LSRE (Laboratory of Separation and Reaction Engineering) da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto através de lâmpada UV-Visível e colectores parabólicos compostos (CPC's) com UV de fonte solar. Em todas as experiências realizadas foram retiradas amostras do inoculo com o intuito de se quantificar o número de células presentes nesse meio de cultura.

5.3.3.1. Desinfecção com lâmpada UV-Visível

Realizou-se uma experiência de fotocatalise e outra de fotólise no foto-reactor à escala laboratorial com lâmpada UV-Visível, com o objectivo de se contar as células presentes nas amostras.

Tabela 1. Resumo das experiências de Fotólise e Fotocatálise através da lâmpada UV-Visível

	Desinfecção com lâmpada UV-Visível	
	Fotólise	Fotocatálise
Volume de água no reactor	750 mL	750 mL
Volume de Cianobactérias (M. aeruginosa)	100 mL	100 mL
TiO ₂	-	200 mg/L
Tempo de duração da experiência (min)	40	40
Contagem de células (meio de cultura adicionado)	✓	✓

5.3.3.1. Desinfecção solar através de Colectores Parabólicos Compostos

Foram realizadas duas experiências iniciais de fotólise e fotocátalise usando colectores solares com a finalidade de se observar o número final de células após os processos. De seguida realizou-se uma experiência de fotocátalise com o intuito de concluir acerca da quantidade de TiO₂ aplicado na desinfecção. Por último, realizou-se mais duas experiências de fotólise e de fotocátalise onde eram retiradas amostras para contagem celular e análise de cianotoxinas.

Após adição das algas à água e homogeneização foi retirada uma amostra dada como controle, antes de se adicionar o catalisador, no caso da fotocátalise.

A todas as amostras destinadas à contagem de células foi adicionada Solução de Lugol para fixar as mesmas e posteriormente observa-las ao microscópio.

As amostras destinadas à realização da análise das microcistina foram filtradas imediatamente após a colecta. O líquido filtrado foi armazenado sob refrigeração, e os filtros congelados e levados para o LEGE (Laboratório de Ecotoxicologia Genómica e Evolução) para realização das análises.

Tabela 2. Resumo das experiências de Fotólise e Fotocatálise através da luz solar

	Desinfecção solar				
	1ª Experiência		2ª Experiência	3ª Experiência	
	Fotólise	Fotocatálise	Fotocatalise	Fotólise	Fotocatálise e
Volume de água no tanque	20 L	20 L	15 L	20 L	20 L
Volume de Cianobactérias	250 mL	250 mL	95 mL	300 mL	300 mL
TiO ₂	-	50 mg/L	30 mg/L	-	30 mg/L
Nº de amostras	9 (em duplicado)*	9 (em duplicado)*	9	6 (em quadruplicado)* + 6 (em duplicado)**	6 (em quadruplicado)* + 6 (em duplicado)**
Volume das amostras	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL + 1 L	10 mL + 1 L
Tempo de duração da experiência	6,5 horas	6,5 horas	2 horas	6 horas	2 horas
Contagem de células	✓	✓	✓	✓	✓
Análises às toxinas	×	×	×	✓	✓

*Para contagem de células

**Para análise de toxinas

5.3.4. Contagens de células

As amostras foram levadas para o LEGE (Laboratório de Ecotoxicologia Genómica e Evolução) para que se proceder à contagem na câmara de Neubauer.

5.3.5. Determinação da concentração de microcistina-LR

As análises do teor de microcistina-LR foram realizadas no LEGE.

5.3.5.1. Método de Extração da Fase Sólida SPE

As amostras de 1 L filtradas eram precedidas do tratamento pelo Método SPE (Solid Phase Extraction).

Antes de analisar a concentração de toxinas presentes nas amostras, foi realizada a determinação em 100 mL no meio de cultura pura.

A metodologia empregue nesta etapa guia-se pela adição de solventes na ordem indicada na tabela 3.

Tabela 3. Metodologia do Método de Extração da Fase Sólida SPE

Passo	Solvente	Volume (mL) para cultura pura	Volume (mL) para amostra
Passo 1	MeOH 100%	20	100
Passo 2	H ₂ O	20	100
Passo 3	MeOH 20%	20	100
Amostra	H ₂ O or MeOH 100%	100	1000
Lavagem	MeOH 20%	20	100
Extração	MeOH 80%	10	60

Após esta etapa, o volume de 10 ou 60 mL recolhido na etapa de extração seguiu para o processo de evaporação.

5.3.5.2. Tratamento dos filtros

Os filtros foram lavados num gobelé com 30 mL de metanol 100% para remoção das células.

Submeteu-se o metanol contendo as células ao ultrassom (Vibra cell da Sonics & Materials) de 60 Hz por um período de 3 minutos em banho de gelo, para causar lise das células fazendo com que as toxinas que se encontravam no seu interior fossem libertadas para o meio.

Centrifugou-se as soluções numa centrífuga Thermo Electron Corporation da Sorvall Legend RT Centrifuge, recolheu-se o sobrenadante e deixou-se estar em repouso a uma temperatura de 4 °C durante uma noite. No dia seguinte procedeu-se à sua evaporação no Rotovapor.

5.3.5.3. Evaporação das amostras

Nesta etapa as amostras foram submetidas a uma evaporação através do método referido.

Após evaporação, as amostras que foram tratadas por SPE foram ressuspensas em 300 µL de metanol para cromatografia 50%. As amostras provenientes dos fitros foram resuspendidas em 1500 µL de metanol 50% e centrifugadas (centrifuga Eppendorf Centrifuge 5417 R) para separação das partículas sólidas que estavam em suspensão. Retirou-se 300 µL do sobrenadante para ser corrido no HPLC.

5.3.5.4. High-performance liquid chromatography (HPLC)

Nesta etapa as amostras foram introduzidas no HPLC para se determinar as toxinas presentes.

Programa Gradiente do HPLC

Tabela 4. Programa Gradiente do HPLC

Tempo (min)	Canal A Acetonitrilo (%)	Canal B Água ultra pura (%)
0	55	45
5	65	35
10	80	20
15	100	0
15.5	55	45
20	55	45

Deve-se ligar o sistema HPLC com 30 minutos de antecedência antes da primeira injeção:

- Temperatura da coluna: 40 °C;
- DAD a 238 nm;
- Coluna: Lichrospher 100 RP-18 (5 µm), 250 * 4 mm;
- Volume da injeção: 20 µL;
- Caudal: 0,9 mL/min;
- Duração: 20 minutos.

5.3.6. Reaparecimento celular

Foram retiradas duas amostras em duplicata relativas à fotólise e fotocátalise dos tanques após terem permanecido por 22 dias no escuro. Foram feitas contagens para determinação do número de células.

Foi levada água da instalação para o laboratório, onde permaneceu 22 dias à luz ambiente do laboratório. Retiraram-se amostras em duplicata relativamente à fotólise e fotocátalise e procedeu-se às contagens do número de células.

6. Resultados e Discussão

Os resultados apresentados nem sempre podem ser comparados com estudos anteriores visto que os estudos existentes incidem na detecção de cianotoxinas e não ao recurso que se fez no presente trabalho à contagem de células. Os estudos realizados com fotólise e fotocátalise, com o intuito de se desinfetar águas contaminadas com cianobactérias, utilizam os reactores laboratoriais com lâmpada UV-Visível, não havendo ainda resultados obtidos em estudos anteriores deste tipo de desinfecção para a luz solar.

6.1. Desinfecção com lâmpada UV-Visível

O primeiro ensaio refere-se à desinfecção da água com cianobactérias através da fotólise e fotocátalise por lâmpada UV-Visível, com o objectivo de se determinar o número de células presentes nas amostras retiradas ao longo de 40 minutos de experiência. A primeira amostra retirada no tempo inicial ($t=0$) foi retirada com o intuito de se quantificar o número de células antes da experiência começar.

Tabela 5. Tempo, T °C e pH das amostras de fotólise com lâmpada UV-Visível

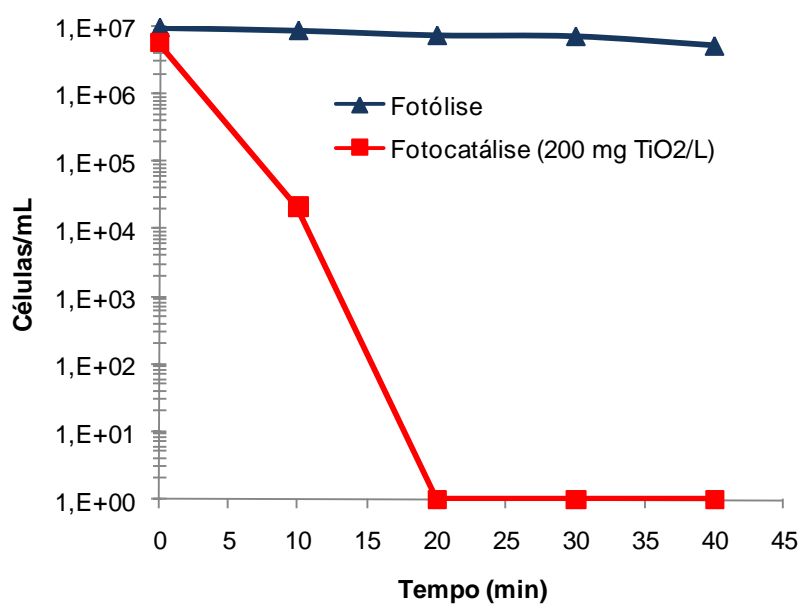
Amostra	Tempo	Temperatura	pH
0 (controle)	0	17,9	8,9
1	10	21,9	8,9
2	20	19,5	8,7
3	30	19,9	8,6
4	40	20,2	8,1

A contagem do meio de cultura apresentou um valor de $1,00 \times 10^7$ cel/mL.

Tabela 6. Tempo, T °C e pH das amostras de Fotocatálise com lâmpada UV-Visível

Amostra	Tempo	Temperatura	pH
0 (controle)	0	19	7,7
1	10	21,2	8
2	20	22,4	8
3	30	24	7,7
4	40	25,2	7,8

A contagem do meio de cultura apresentou um valor de $1,40 \times 10^7$ cel/mL.

**Figura 12.** Número de células por mililitro durante 40 minutos de fotólise e de fotocatalise

Analisando o processo de desinfecção por fotólise pode-se observar que houve um decréscimo de células ao longo do tempo de exposição à radiação UV. No momento inicial (tempo=0) observou-se $9,80 \times 10^6$ células/mL e no momento final (tempo = 40 min) observou-se $5,23 \times 10^6$ células/mL o que significa que houve uma redução de quase 50% das células presentes no início do tratamento, contudo os 40 minutos não são ainda suficientes dado que ainda se observam

células nas amostras retiradas. O gráfico mostra a tendência para o decrescimento celular mas este é pouco acentuado, dado que para se conseguir uma redução total de células teria que ampliar o tempo de exposição à luz UV e sem garantias que estas possam desaparecer totalmente.

No processo fotocatalítico, onde se usou 200 mg/L de TiO_2 , o mesmo já não é observado visto que ao fim de 20 minutos de desinfecção já não se encontra nenhuma célula nas amostras retiradas. A experiência iniciou-se com $5,70 \times 10^6$ células/mL, ao fim de 10 minutos encontram-se apenas $2,13 \times 10^4$ células/mL e ao fim de 20 minutos já não é encontrada nenhuma célula. Na figura 12 é possível observar o decrescimento abrupto que as células sofreram com esta desinfecção.

O pH não apresenta variação suficiente e a temperatura óptima de crescimento para as cianobactérias está entre 15 °C e 30 °C, como a temperatura deste ensaio está dentro deste intervalo não se apontam influências da temperatura no processo.

Robertson et al, 1997, realizaram um ensaio de desinfecção de águas, por luz UV de uma lâmpada, ao longo de 40 minutos, semelhante ao efectuado neste trabalho. Contudo o objectivo do trabalho realizado Robertson et al foi a determinação da concentração de toxinas de cianobactérias e não a determinação do número de células/mL realizado no ensaio deste trabalho. Os autores também puderam observar que a luz da lâmpada UV é suficiente para desinfectar a água contaminada com toxinas de cianobactérias em 40 minutos. Também verificaram que amostras expostas à luz UV sem adição de TiO_2 não mostram evidências de acentuada degradação.

Comparando o método de fotólise com fotocatalise rapidamente se conclui que a fotocatalise é mais eficiente que a fotólise. Isto deve-se ao facto do TiO_2 servir como catalisador que acelera a reacção com a exposição à luz UV.

A técnica de desinfecção das águas através da luz UV de lâmpadas é uma técnica sugerida para tratamentos de grandes quantidades de água, como por exemplo, nas estações de tratamento visto ser um método rápido e eficiente.

6.2. Desinfecção solar através de Colectores Parabólicos Compostos

A água contaminada com cianobactérias foi submetida a dois processos de fotólise e três de fotocatalise, através de colectores solares, com a finalidade de se determinar o número de células por mililitro na água das amostras após os processos, assim como determinar a presença de toxinas.

6.2.1. Primeira Experiência

Nesta etapa inicial submeteu-se água contaminada com cianobactérias aos processos de fotocatalise e de fotólise através de CPC's por um período de 6,5 horas com o intuito de se determinar o número de células presentes na água.

A quantidade de algas que se adicionou foi a mesma, a cultura também era a mesma e os processos decorreram os dois em simultâneo, estando assim os dois expostos à mesma intensidade de radiação solar.

No processo fotocatalítico foi usada uma quantidade de 50 mg/L de TiO₂.

Tabela 7. Hora, tempo, intensidade de radiação, pH e T °C das amostras de Fotólise através do uso de CPC's

Amostra	Hora	Tempo (min)	I (W/m ²)	pH	T (°C)
0	10:50	0	0	7,8	21,10
1	11:20	30	32,25	7,8	26,90
2	11:50	60	37,5	7,6	34,20
3	12:20	90	41	7,7	35,02
4	13:20	150	44,2	7,6	39,00
5	14:20	210	46,57	7,4	40,10
6	15:20	270	45,33	7,7	38,20
7	16:20	330	36,2	7,7	36,90
8	17:20	390	25,5	7,4	29,10

Tabela 8. Hora, tempo, intensidade de radiação, pH e T °C das amostras de Fotocatálise através do uso de CPC's

Amostra	Hora	Tempo (min)	I (W/m ²)	pH	T (°C)
A	10:50	0	0	7,9	21,50
B	11:20	30	32,25	7,7	24,70
C	11:50	60	37,5	7,5	35,20
D	12:20	90	41	7,6	34,08
E	13:20	150	44,2	7,5	39,00
F	14:20	210	46,57	7,3	41,30
G	15:20	270	45,33	7,6	39,20
H	16:20	330	36,2	7,6	35,90
I	17:20	390	25,5	7,2	29,10

A contagem do meio de cultura para a fotólise e fotocatalise apresentou um valor de $5,25 \times 10^6$.

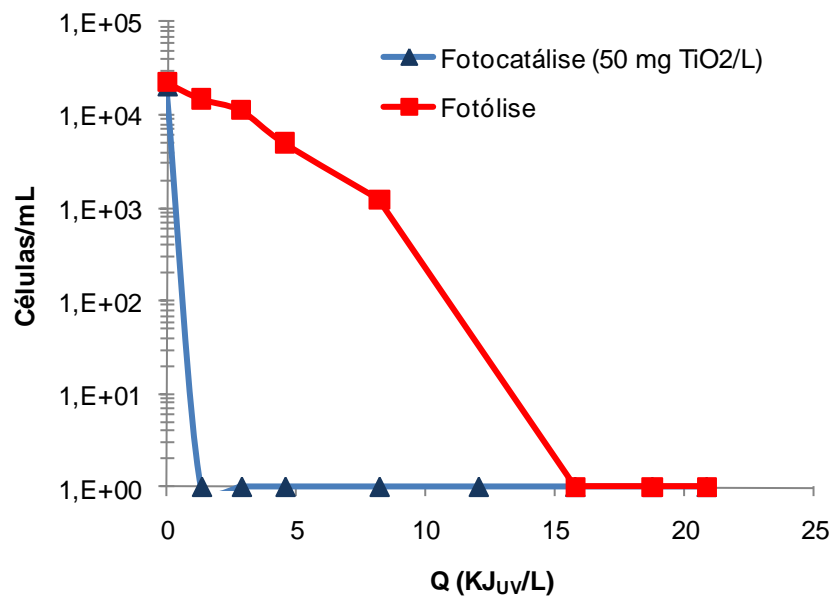


Figura 13. Número de células por mililitro por quantidade de energia UV acumulada (kJ_{UV}/L) dos processos de fotólise e fotocatalise solar

Pode-se analisar que o processo de fotólise apresenta um decréscimo de células/mL ao longo do tempo e quando a quantidade de energia UV acumulada atinge valores de 15,8 kJ/L, ou seja,

ao fim de 270 minutos, não se observam mais células na água. Iniciou-se o processo com $2,25 \times 10^4$ células/mL e estas ao fim dos primeiros 30 minutos de experiência decaem significativamente.

Relativamente ao processo fotocatalítico pode-se verificar que, ao fim de 30 minutos de experiência já não se observavam células nas amostras. A primeira amostra continha $2,00 \times 10^4$ células/mL e com o arrancar do processo estas desaparecem abruptamente. Bastam assim $1,2 Q_{uv}$ (kJ/L) para que as cianobactérias sejam degradadas.

Pode-se verificar a diferença de eficiência de um processo para o outro, sendo que a fotocatalise é a mais eficiente e num curto espaço de tempo, pois a combinação da desinfecção solar com o TiO_2 tem-se mostrado bastante eficiente.

6.2.2. Segunda Experiência

De seguida realizou-se uma experiência de fotocatalise, com uma quantidade diferente de titânio com o intuito de se verificar se com a diminuição desta quantidade, o processo continuaria eficaz. Na figura 14 faz-se uma comparação entre a fotocatalise ocorrida nesta experiência e a fotocatalise ocorrida na experiência anterior (1ª experiência).

Tabela 9. Hora, tempo, intensidade de radiação, pH e T °C das amostras de fotocatalise através do uso de CPC's

Amostra	Hora	Tempo (min)	I (W/m ²)	pH	T (°C)
0	10:20	0	0	8	21,00
1	10:25	5	17,18	7,9	23,70
2	10:35	15	8,74	7,5	25,00
3	10:50	30	7,75	7,6	29,08
4	11:05	45	13,08	7,5	34,38
5	11:40	80	27,6	8	38,00
6	11:50	90	22,44	7,7	38,80
7	12:05	105	33,02	7,9	41,20
8	12:20	120	30,32	7,6	41,70

A contagem do meio de cultura para a fotocatalise apresentou um valor de $8,55 \times 10^6$.

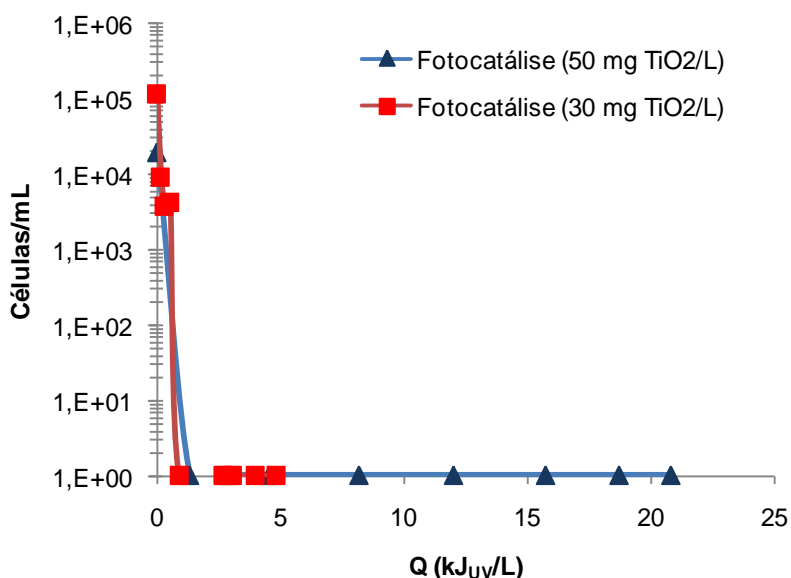


Figura 14. Número de células por mililitro por quantidade de energia UV acumulada (kJ_{UV}/L) nos processos de fotocatalise com 30 e 50 mg/L de TiO₂

Na figura 14 é possível verificar que, com uma quantidade menor de TiO₂ (30 mg/L), o processo também é eficaz, visto que ao fim de 0,9 kJ_{UV}/L já não se verificam células na água, ou seja, ao fim de 45 minutos de exposição à radiação solar.

Os dois processos não se iniciam com o mesmo número de células, têm tempos de exposição à luz solares diferentes e as intensidades a que estão expostos também são diferentes visto que as experiências foram realizadas em dias diferentes. No processo fotocatalítico (50 mg TiO₂/L) ao fim de 30 minutos já não se encontravam células, enquanto no processo fotocatalítico (30 mg TiO₂/L) estas só desapareceram ao fim de 45 minutos e ao fim de 30 minutos ainda eram apresentadas $4,38 \times 10^3$ células. Assim com 1,3 kJ_{UV}/L no processo fotocatalítico (50 mg TiO₂/L) não se observam células e no processo fotocatalítico (30 mg TiO₂/L) estas desaparecem ao fim de 0,9 kJ_{UV}/L.

Esta experiência tinha elevada importância visto que se pretendia determinar a eficiência do TiO₂ quando se usava uma quantidade menor, pois ao adicionarem-se menores quantidades de titânio, o processo de remoção deste é mais simples. O uso de menores quantidades de TiO₂, experimentalmente também é mais viável pois as cianobactérias têm uma grande tendência a agregarem-se a outras partículas, o que dificulta as contagens de células uma vez que estas podem ser encobertas pelo titânio ao agregarem-se a este, contudo é ainda uma hipótese não comprovada.

6.2.3. Terceira Experiência

A terceira experiência consistiu na desinfecção de água contaminada com cianobactérias usando CPS's através do processo de fotólise e fotocatalise durante 6 e 2 horas, respectivamente. Esta experiência teve o como objectivo mais uma vez, quantificar o número de células presentes na água e determinar a presença de toxinas.

Foram usados 30 mg/L de TiO_2 .

Tabela 10. Hora, tempo, intensidade de radiação, volume, pH e T °C das amostras de fotólise através do uso de CPC's

Amostra	Hora	Tempo (min)	I (W/m^2)	V (L)	pH	T (°C)
0	11:00	0	0	20	8,00	24,80
1	11:30	30	26,42	18	7,95	25,20
2	12:00	60	25,52	16	7,80	26,50
3	13:00	120	30,5	14	7,77	32,00
4	14:00	180	32,35	10	7,95	36,60
5	17:00	360	22,96	8	7,90	33,00

Tabela 11. Hora, tempo, intensidade de radiação, volume, pH e T °C das amostras de fotocatalise através do uso de CPC's

Amostra	Hora	Tempo (min)	I (W/m^2)	V (L)	pH	T (°C)
A	11:00	0	0	20	7,83	24,3
B	11:05	5	16,25	18	8,27	24,9
C	11:15	15	25,83	16	7,71	26,3
D	11:30	30	26,42	14	7,74	28,4
E	12:00	60	25,52	10	7,89	35,6
F	13:00	120	30,5	8	7,74	39,4

A contagem do meio de cultura para a fotólise e fotocatalise apresentou um valor de $6,55 \times 10^6$.

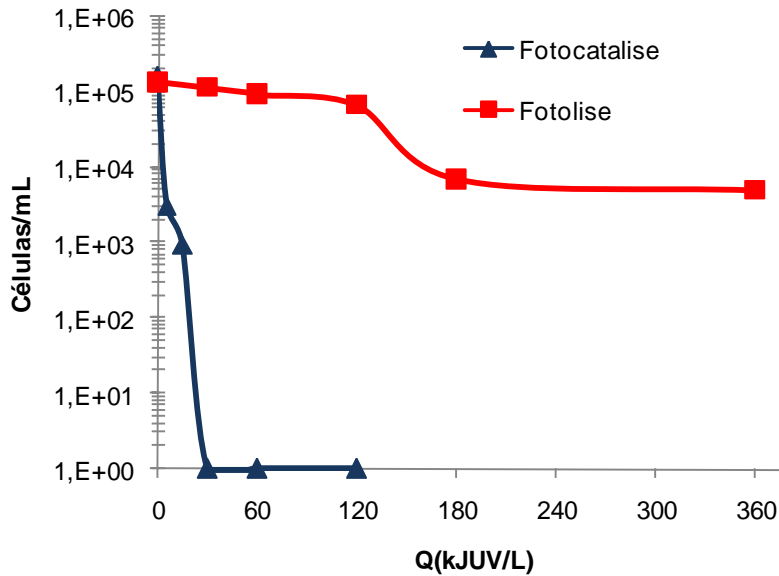


Figura 15. Número de células por mililitro por quantidade de energia UV acumulada ($\text{kJ}_{\text{UV}}/\text{L}$) dos processos de fotólise e fotocatalise solar

Como se pode verificar, mais uma vez o processo de fotocatalise é mais eficiente que o processo de fotólise. Enquanto no processo de fotocatalise quando se tem $1,3 \text{ kJ}_{\text{UV}}/\text{L}$ já não se observam mais células, ou seja ao fim de 30 minutos, no processo de fotólise estas não chegam a desaparecer mesmo com um tempo de exposição solar maior.

Robertson et al, 2005 fizeram um estudo comparativo entre a fotocatalise usando TiO_2 e a fotólise em três microrganismos patogénicos diferentes e concluíram que a fotocatalise é mais eficiente do que a fotólise nos três casos estudados.

De seguida serão apresentados dois gráficos resumo com as duas experiências de fotólise e outro com as três experiências de fotocatalise para que possam ser comparadas.

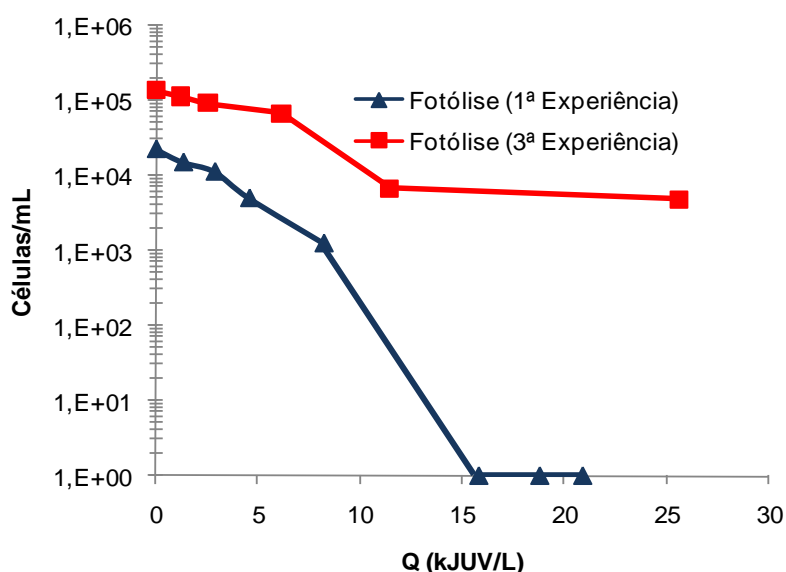


Figura 16. Número de células por mililitro por quantidade de energia UV acumulada (kJ_{UV}/L) dos processos de fotólise das duas experiências realizadas

Na 1ª experiência o tempo de exposição solar é de 6 horas e meia e na 3ª Experiência é de 6 horas, mesmo sendo tempos de exposição solar idênticos, pode-se observar que na 1ª experiência dá-se o desaparecimento das células enquanto na 3ª Experiência estas não chegam a desaparecer. Tal deve-se ao facto das experiências terem sido realizadas em dias diferentes logo a intensidade solar foi diferente, assim como a energia UV acumulada. O número inicial de células também foi diferente. Na 1ª Experiência contabilizou-se um valor inicial de $2,25 \times 10^4$ de células por mililitro enquanto na 3ª Experiência contabilizou-se um valor inicial de $1,35 \times 10^5$ o que mostra que, valores iniciais de células diferentes podem ter também influência nas diferenças de resultados dos processos. Outro motivo pode ser também devido ao facto das células provirem de culturas diferentes o que tem influencia visto que a idade desta tem um peso na sua degradação. Assim na 1ª Experiência o inoculo continha células mais velhas enquanto na 2ª Experiência o inoculo utilizado continhas células mais novas.

A fotólise é um processo moroso e nem sempre viável visto que as células podem não degradar.

Shephard e tal, 1998, concluíram que a fotólise pode conseguir a destruição de microcistina mas esta depende da intensidade da luz.

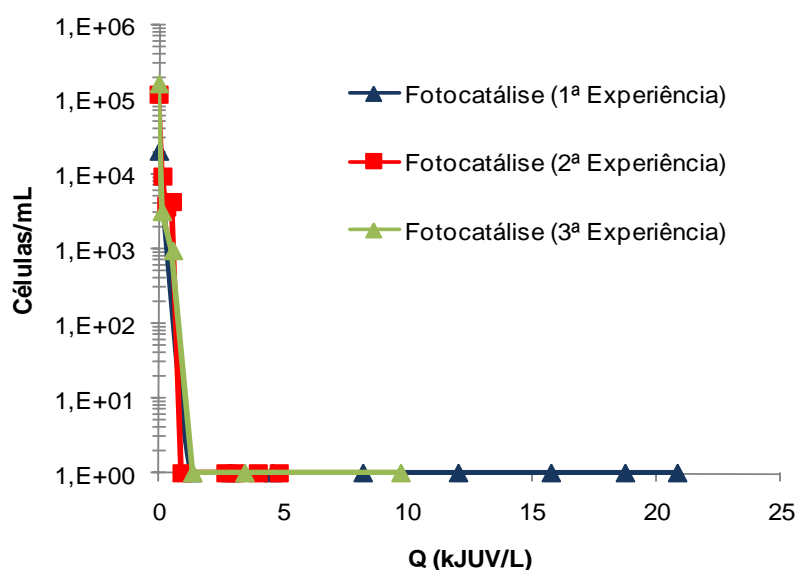


Figura 17. Número de células por mililitro por quantidade de energia UV acumulada (kJ_{UV}/L) dos processos de fotocatalise das três experiências realizadas

Na 1ª Experiência de fotocatalise o tempo de exposição solar foi de 6 horas e meia e na 2ª e 3ª Experiências o tempo de exposição foi de 2 horas. Na 1ª e 3ª Experiências as células desaparecem ao fim de 30 minutos, ou seja, a uma energia UV acumulada correspondente de 1,3 kJ_{UV}/L para ambas as experiências o que revela que esta energia é a suficiente para que as células desapareçam. Na 2ª Experiência as células desapareceram ao fim de 45 minutos, ou seja, a uma energia acumulada correspondente de 0,9 kJ_{UV}/L.

Esta diferença de valores deve-se ao facto de terem sido usadas diferentes quantidades de TiO₂, 50 mg/L na 1ª Experiência e 30 mg/L na 2ª Experiência e 3ª Experiência. O tempo de exposição solar também varia, bem como a intensidade solar e a quantidade de energia UV acumulada, visto que estas experiências foram realizadas em diferentes dias. A quantidade de células inicial nas três diferentes experiências também influencia, assim para a 1ª Experiência começou-se com uma quantidade de 2,0 × 10⁴ células por mililitro. Na 2ª Experiência começou-se com uma quantidade de 1,19 × 10⁵ células por mililitro e por fim na 3ª Experiência começou-se com uma quantidade de 1,6 × 10⁵ células por mililitro. O inoculo utilizado nas diferentes experiências também deve ser tido em conta visto que a idade das células também influencia na sua capacidade de degradação.

O pH não apresenta variação suficiente nas três experiências e a temperatura óptima de crescimento para as cianobactérias está entre 15 °C e 30 °C, como as temperaturas destes ensaios não variam muito em relação a este intervalo, não se apontam influências da temperatura no processo.

No geral, o processo fotocatalítico é um processo eficiente que reduz o número de células presentes na água em pouco tempo de exposição solar mesmo usando menores quantidades de TiO₂.

6.2.3.1. Análise das toxinas

Ainda nesta experiência foram feitas as análises às toxinas presentes. Estas toxinas são libertadas para o meio quando as células sofrem lise.

Tabela 12. Dados referentes às amostras da Fotólise

Amostra	Hora	Tempo (min)	I (W/m ²)	V (L)	Q _{UV} (kJ/L)	pH	T (°C)
0	11:00	0	0	20	0,00	8,00	24,80
1	11:30	30	26,42	18	1,21	7,95	25,20
2	12:00	60	25,52	16	2,52	7,80	26,50
3	13:00	120	30,5	14	6,11	7,77	32,00
4	14:00	180	32,35	10	11,43	7,95	36,60
5	17:00	360	22,96	8	25,60	7,90	33,00

Tabela 13. Dados referentes às amostras da Fotólise

Amostra	Número de Células por mL	microcistina-LR (ug/L)água	microcistina-LR pg/cell água	microcistina-LR (ug/L)filtro	microcistina-LR pg/cell
0	1,35E+05	0,0	0,0	1,554	0,012
1	1,14E+05	0,0	0,0	1,448	0,305
2	9,38E+04	0,0	0,0	1,363	0,359
3	6,72E+04	4,7320	0,014	0,426	0,006
4	6,88E+03	0,4870	1,363	0,0	0,0
5	5,00E+03	2,5910	0,104	0,0	0,0

Através das tabelas 12 e 13 podemos observar que a concentração da toxina microcistina-LR em $\mu\text{g/L}$ presente na água filtrada, não foi detectada nas três primeiras amostras, contudo esta aparece no filtro e também se pode verificar que foram observadas células quando se realizou a contagem das amostras.

Na amostra 0 já era de prever que as toxinas não aparecessem na água filtrada pois o processo de fotólise ainda não tinha iniciado, logo as células não tinham sofrido degradação para que as toxinas fossem libertadas. As toxinas apareceram no filtro pois encontravam-se no interior das células.

As amostras 1 e 2 também não apresentam toxinas na água filtrada por uma explicação semelhante à que acontece na amostra 0. Dado que o processo de fotólise é pouco eficiente, as células ainda não sofreram degradação suficiente para que fossem libertadas toxinas para a água, apresentando-se assim dentro das células e aparecendo só no filtro.

Na amostra 3 é identificada microcistina-LR na água filtrada e no filtro, bem como são observadas células nas amostras. Aqui o processo de fotólise começa a provocar algumas degradações nas células e estas libertam toxinas para a água.

Nas amostras 4 e 5 são encontradas microcistina-LR na água filtrada mas não no filtro, embora tenham sido enumeradas contagens de $6,88 \times 10^3$ células por mL na amostra 4 e $5,00 \times 10^3$ células por mL na amostra 5, o que pode ser explicado pela baixa concentração da toxina presente nas células não identificada pela sensibilidade do HPLC.

O resultado discutido é apresentado no gráfico 17 que nos mostra a concentração de Microcistina-LR por quantidade de energia UV acumulada tanto para a água filtrada como para o filtro.

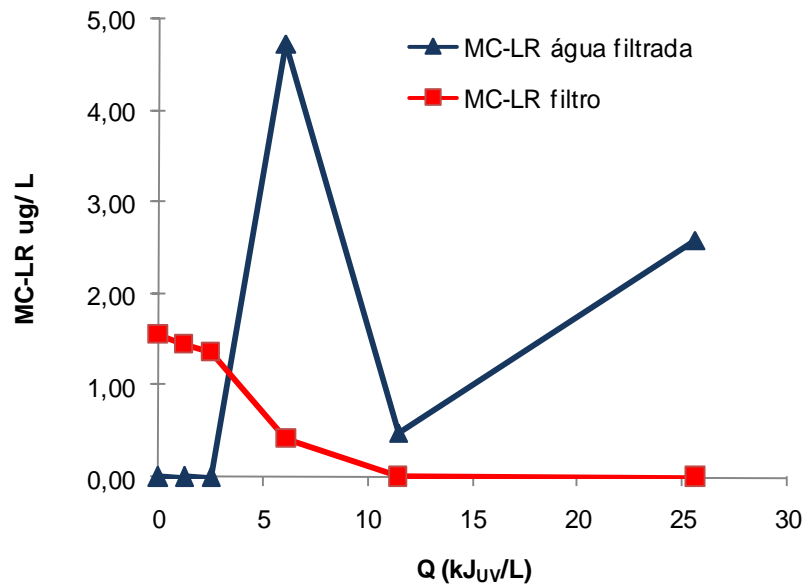


Figura 18. Concentração de microcistina-LR ($\mu\text{g/L}$) por quantidade de energia UV acumulada ($\text{kJ}_{\text{UV}}/\text{L}$) na água filtrada e nos filtros da fotólise

Tabela 14. Dados referentes às amostras de Fotocatálise

Amostra	Hora	Tempo (min)	I (W/m^2)	V (L)	Q_{UV} (kJ/L)	pH	T ($^{\circ}\text{C}$)
A	11:00	0	0	20	0,00000	7,83	24,3
B	11:05	5	16,25	18	0,12383	8,27	24,9
C	11:15	15	25,83	16	0,56668	7,71	26,3
D	11:30	30	26,42	14	1,34320	7,74	28,4
E	12:00	60	25,52	10	3,44340	7,89	35,6
F	13:00	120	30,5	8	9,71847	7,74	39,4

Tabela 15. Dados referentes às amostras de Fotocatálise

Amostra	Número de Células por mL	microcistina-LR (ug/L)água	microcistina-LR pg/cell água	microcistina-LR (ug/L)filtro	microcistina-LR pg/cell filtro
A	1,60E+05	0,0	0,0	1,866	0,012
B	3,13E+03	0,452	2,860	0,0	0,0
C	9,38E+02	0,0	0,0	0,0	0,0
D	0,0	0,0	0,0	0,522	0,0
E	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
F	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Nas tabelas 14 e 15 podemos observar que na amostra A são contabilizadas células nas amostras e foram também detectadas toxinas no filtro, porém estas toxinas não se apresentam na água filtrada. Tal motivo deve-se ao facto do processo fotocatalítico ainda não ter iniciado.

Na amostra B são contabilizadas células nas amostras, bem como são detectadas toxinas na água filtrada mas não no filtro. Isto pode dever-se ao facto do HPLC não ter sensibilidade suficiente para detectar as toxinas ou ainda a amostra retirada para análise de toxina eventualmente pode não ter células, tendo em vista que podem não estar bem distribuídas na água devido à sua capacidade de se aglomerarem umas às outras como mecanismo de defesa em situações desfavoráveis à sua sobrevivência. Existe também a hipótese das toxinas terem sido degradadas pelos pigmentos fotossintéticos da clorofila. O mesmo pode explicar a não ocorrência de toxina no filtro da amostra C.

As amostras C, D, E e F não apresentaram toxinas na água filtrada o que pode ser explicado pela elevada eficiência do TiO_2 que rapidamente destrói a toxina. Para os filtros das respectivas amostras, apenas foi encontrada microcistina-LR na amostra D, o que pode representar a presença de algumas células remanescentes, que não tenha sido possível detectá-las na contagem de células devido à possibilidade de estas se aglomerarem ao TiO_2 dificultando a sua visualização.

O resultado discutido é apresentado figura 18 que nos mostra a concentração de Microcistina-LR por quantidade de energia UV acumulada tanto para a água filtrada como para o filtro.

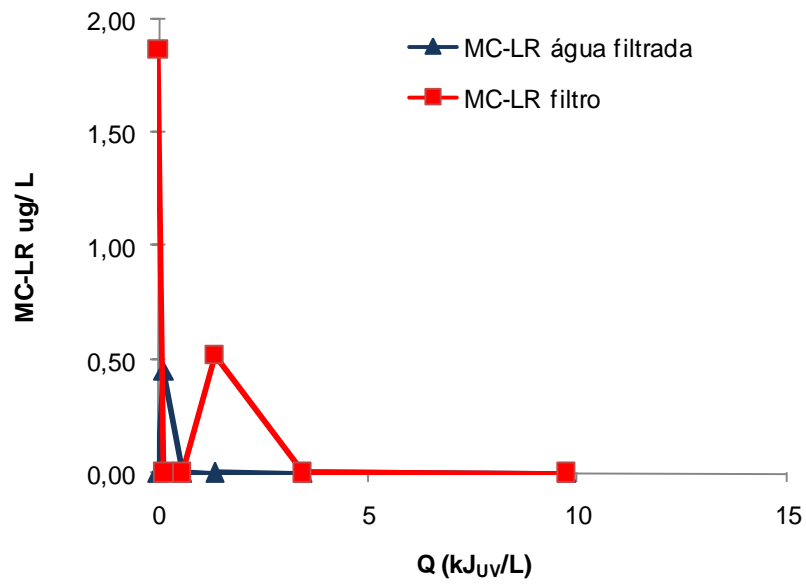
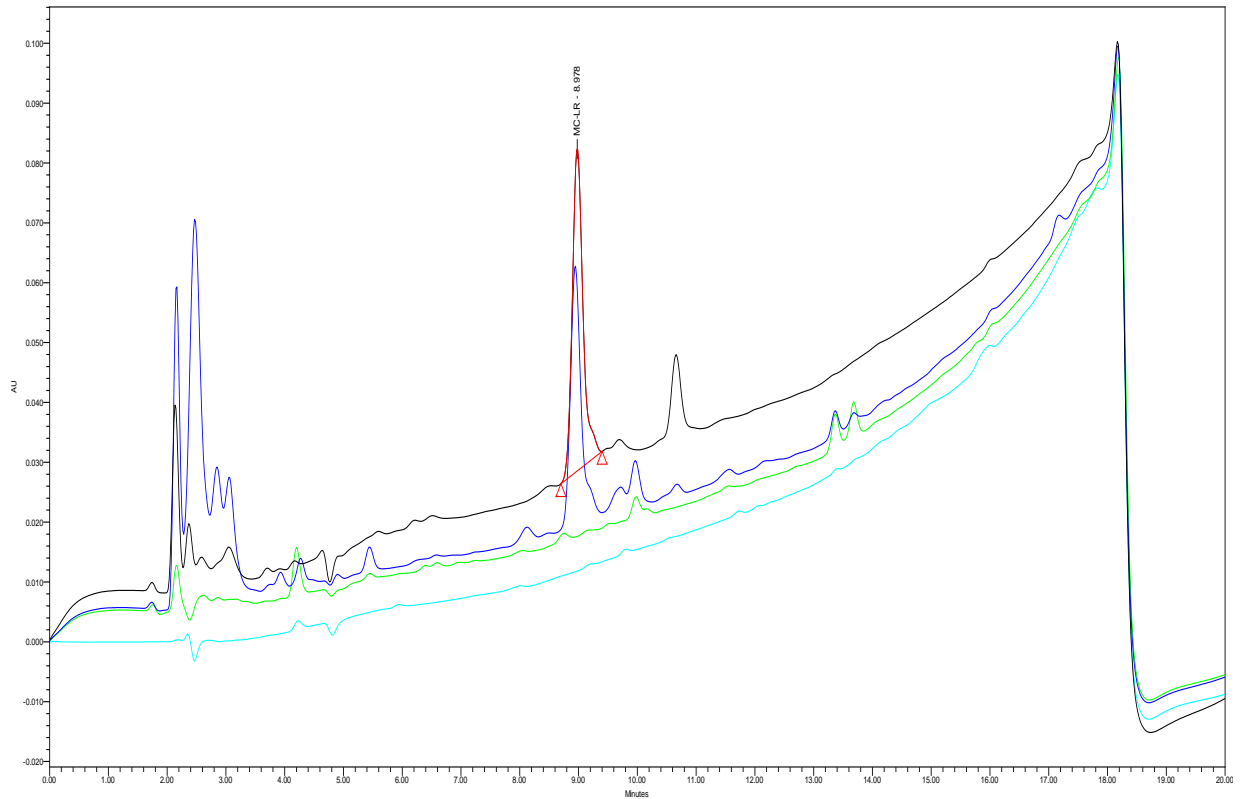


Figura 19. Concentração de microcistina-LR ($\mu\text{g/L}$) por quantidade de energia UV acumulada ($\text{kJ}_{\text{UV}}/\text{L}$) na água filtrada e nos filtros da fotocatalise

6.2.3.2. Cromatogramas

Foram seleccionados alguns cromatogramas com resultado positivo para microcistina-LR e outros com resultados negativos, estão representados no Anexo I.



-----Padrão de MC-LR (purificado de *Microcystis aeruginosa*)

-----Fase particulada (filtro)

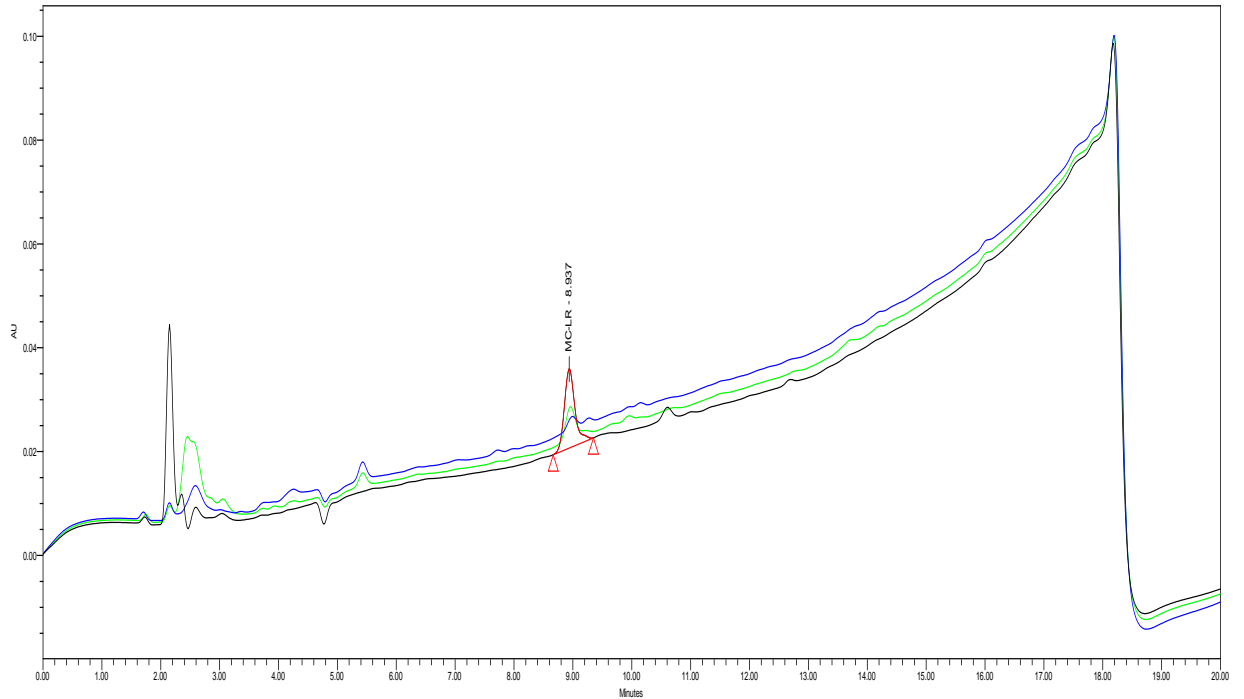
-----Fase dissolvida

-----Branco

Figura 20. Cromatogramas de HPLC-DAD de um padrão de microcistina-LR

A figura 20 representa os cromatogramas HPLC-DAD referentes a um padrão de microcistina-LR, de um branco (sistema) e cromatogramas respectivos da cultura *Microcystis aeruginosa* (fases particulada e dissolvida) estas últimas são referentes à amostragem do inóculo retirado para

quantificação de toxina nas células utilizadas nas experiências conforme foi descrito no tópico 5.3.3. da metodologia.



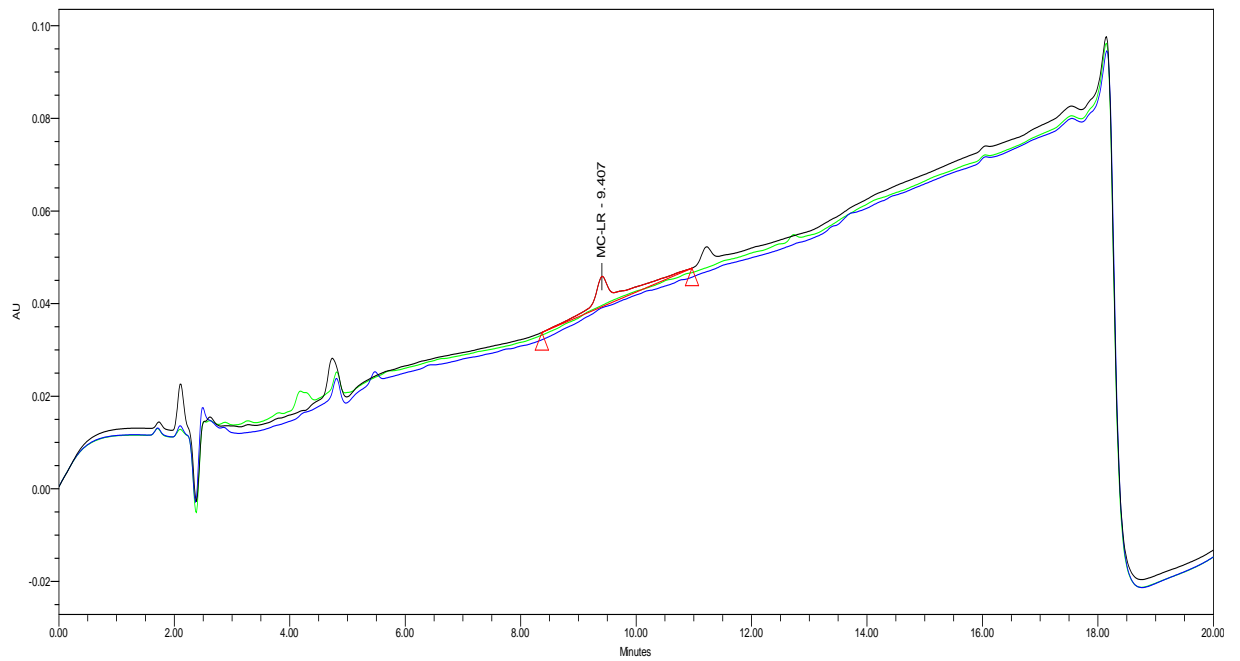
----- Padrão de MC-LR (purificado de *Microcystis aeruginosa*) (5 µg/mL)

-----A Filtro - Fotocatálise

-----D Filtro - Fotocatálise

Figura 21. Cromatogramas de HPLC-DAD de um padrão de microcistina-LR e cromatogramas dos Filtros A e D da Fotocatálise.

Na figura 21 constam os cromatogramas das amostras A e D do processo de fotocatalise referentes aos filtros em que observa-se resultados positivos para ambas mediante presença de picos no limite e tempo de detecção do padrão de microcistina-LR (5 µg/mL)



----- Padrão de MC-LR (purificado de *Microcystis aeruginosa*) (0.3 µg/mL)

----- 2 Água Filtrada - Fotólise

----- 4 Filtro – Fotólise

Figura 22. Cromatograma de HPLC-DAD de um padrão de microcistina-LR e cromogramas da água filtrada da amostra 2 e do Filtro 4, ambos da Fotólise.

As amostras 2 (água) e 4 (filtro) provenientes do tratamento de fotólise representadas em cromatograma na figura 22 não apresentaram picos de microcistina-LR.

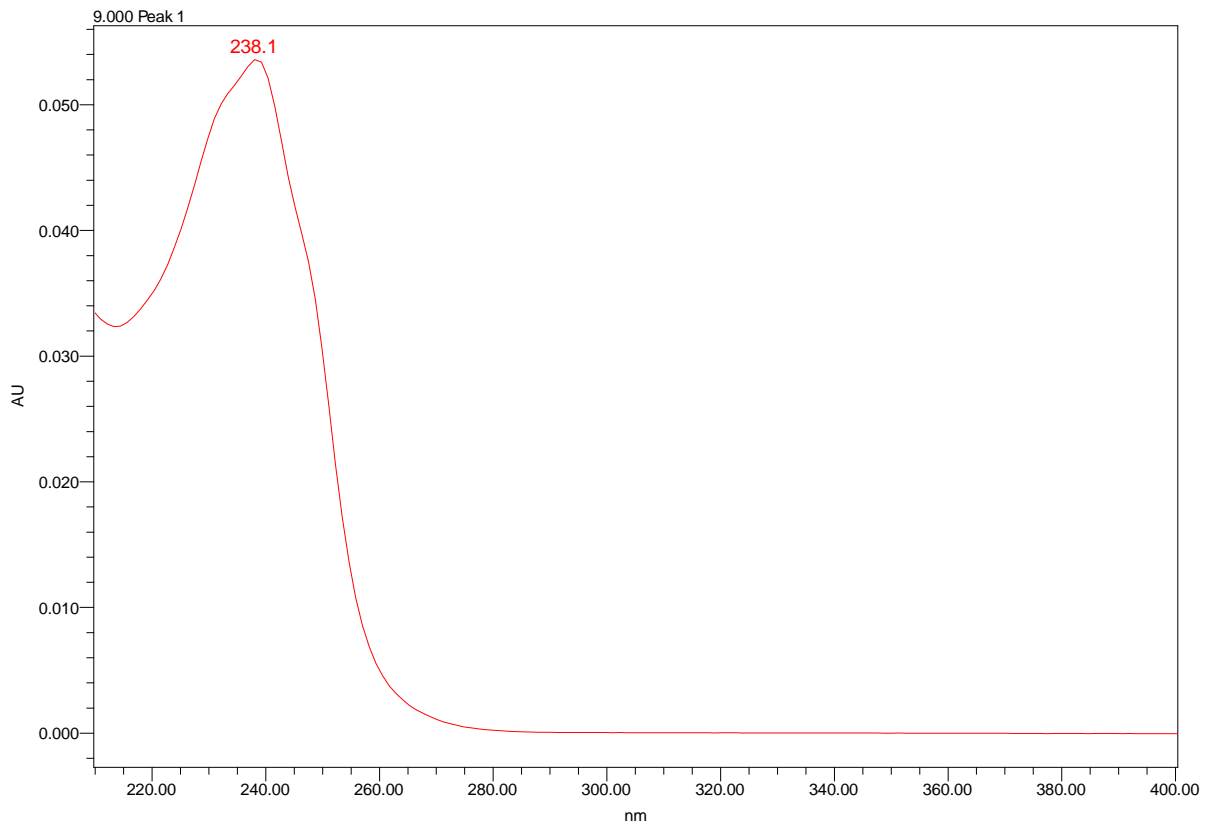
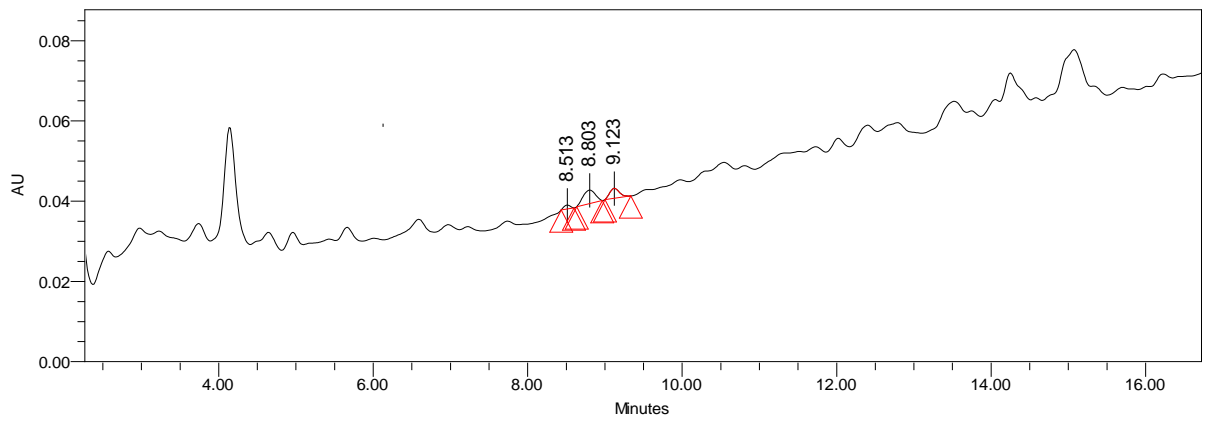


Figura 23. Espectro característico da Microcistina-LR

Na figura 23 está representado o espectro característico da Microcistina-LR. Apresenta-se o pico no respectivo tempo de retenção para o padrão de Microcistina-LR.

Desinfecção solar da água contaminada com cianobactérias usando colectores parabólicos compostos



2 Água Filtrada - Fotólise

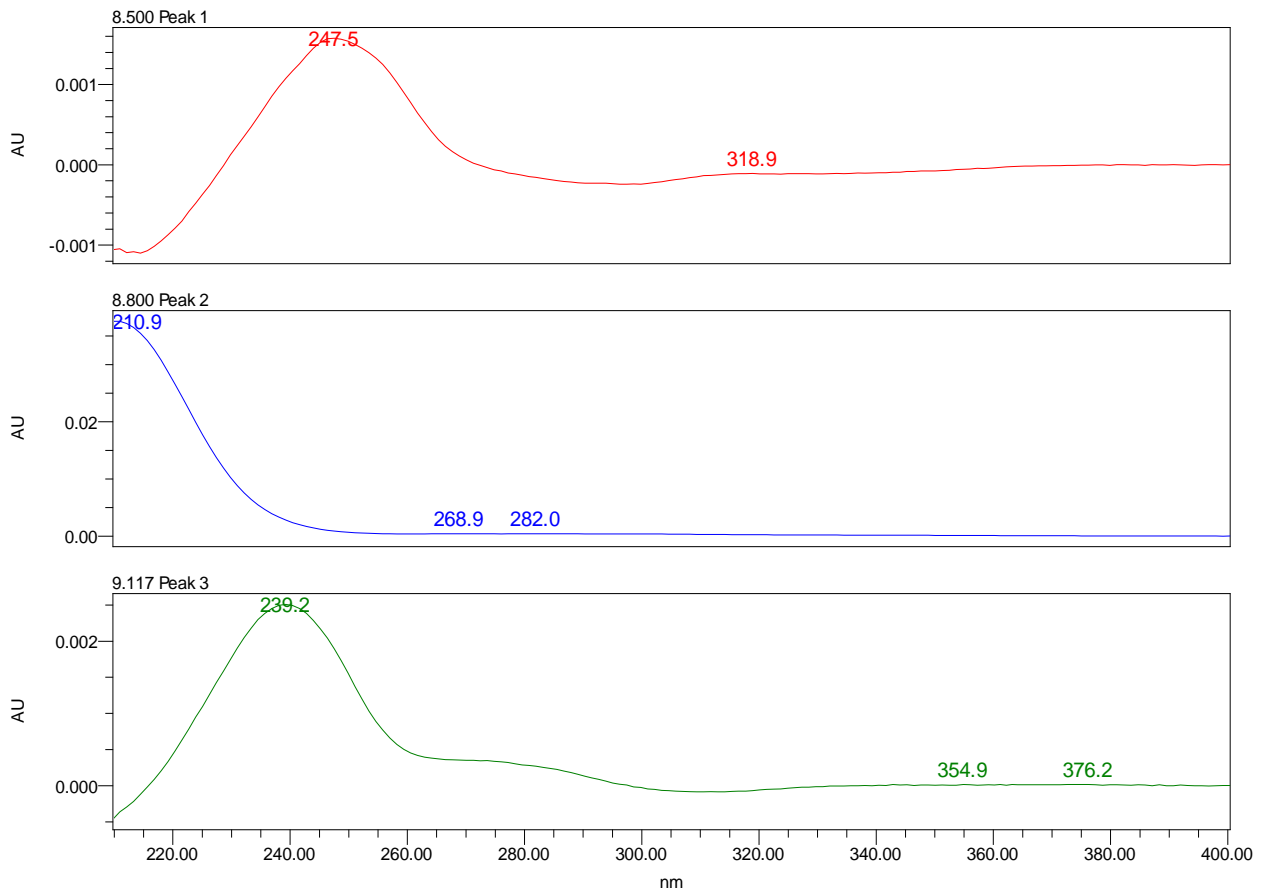


Figura 24. Cromatograma de HPLC-DAD do meio 2 Água filtrada da fotólise e espectros relativos aos três picos assinalados

Na figura 24 está exemplificado um dos casos, em que existe no cromatograma picos ao mesmo tempo de retenção do padrão de Microcistina-LR mas estes não reproduzem o espectro característico da mesma. Perante estes resultados consideramos a amostra negativa. Podendo estes picos representar a presença de outras substâncias, tais como sub-produtos de degradação da microcistina.

6.2.3.3. Reaparecimento celular

No final da 3ª Experiência a água contida na instalação não foi removida com o intuito de se observar se ao fim de algum tempo havia reaparecimento de células, tanto no tanque da fotólise como no da fotocátalise. Estes tanques eram opacos, não estando a água exposta a luz solar. Assim ao fim de 22 dias foram retiradas amostras dos tanques correspondentes à fotocátalise e fotólise e pode-se observar:

Tabela 16. Reaparecimento celular na instalação piloto

Fotocátalise				Fotólise			
Contagem	Contagem	Média	Células/mL	Contagem	Contagem	Média	Células/mL
3	0	1,5	$3,75E \times 10^3$	1	1	2	$3,75 \times 10^3$

Assim verifica-se que podem reaparecer células na água depois de ter sofrido os processos de fotocátalise e fotólise, uma vez que basta uma única célula não identificada não ter sido destruída para que rapidamente encontre condições óptimas e se reproduza, dado que uma das características destas células é reproduzirem-se facilmente.

Recolheu-se amostras dos tanques e estas foram levadas para o laboratório onde permaneceram à luz ambiente do laboratório. Pode-se assim observar que ao fim de 22 dias:

Tabela 17. Reaparecimento celular no laboratório

Fotocatálise				Fotólise			
Contagem	Contagem	Média	Células/mL	Contagem	Contagem	Média	Células/mL
0	3	1,5	$3,75 \times 10^3$	2	2	2	$5,00 \times 10^3$

Assim verifica-se que também nestas amostras as células reapareceram ao fim de 22 dias.

7. Conclusão

As cianobactérias apresentam um problema para a qualidade das águas. Quando estas libertam toxinas para o meio podem causar vários problemas ambientais e para a saúde dos seres vivos, podendo mesmo levar à morte em alguns casos.

Existe uma grande necessidade de prevenção, controlo e tratamento de cianobactérias nas águas para consumo, assim como avaliar a eficiência da remoção destes microrganismos das águas. Há também uma forte necessidade de serem implementados novos métodos de tratamento de águas, uma vez que quando realizado de uma forma inadequada pode não ser suficiente para a remoção das toxinas.

O recurso à fotólise e fotocátalise mostra ser um desafio para desinfecção de águas contaminadas com cianobactérias. Neste trabalho foram estudados os dois processos recorrendo a luz artificial através do uso de lâmpada UV-Visível e depois recorrendo a luz solar.

Tanto para o caso da luz artificial recorrendo ao uso de lâmpada UV-Visível, como para o caso de aplicação de luz solar, a experiência de fotocátalise mostrou-se mais eficaz na remoção de cianobactérias do que o processo de fotólise. Assim pode-se concluir que o processo de fotólise não é o mais indicado na remoção de cianobactérias das águas, visto ser um processo moroso e nem sempre eficaz.

A fotocátalise recorrendo ao catalisador TiO_2 mostrou ser um método rápido e eficaz contudo traz a problemática da remoção do TiO_2 no final do tratamento, dado que é sempre preferível o tratamento de águas recorrendo o mínimo possível ao recurso a substâncias químicas devido aos problemas adjacentes à sua remoção, aos resíduos causados e à viabilidade económica do tratamento. Pode concluir que usando menor quantidade de TiO_2 o processo mostra ser eficaz.

Em termos de realização prática o tratamento por fotólise/fotocátalise solar não é de fácil aplicação às estações de tratamento sendo assim um método a recorrer em aldeias mais isoladas que não tenham acesso a água tratada pelas estações de tratamento. Para as estações de tratamento é sugerido o recurso à luz UV-Visível artificial com o recurso a lâmpadas.

Pode-se concluir também que a quantidade de células com que se inicia os processos tem influência na eficiência destes e se o processo não for suficientemente eficaz basta uma célula sobreviver para que possa haver reprodução e reaparecimento de contaminações nas águas.

Sugere-se que futuramente se façam experiências com outros catalisadores ou que o se experimente a eficiência do processo com o TiO_2 imobilizado. Sugere-se também que o processo de

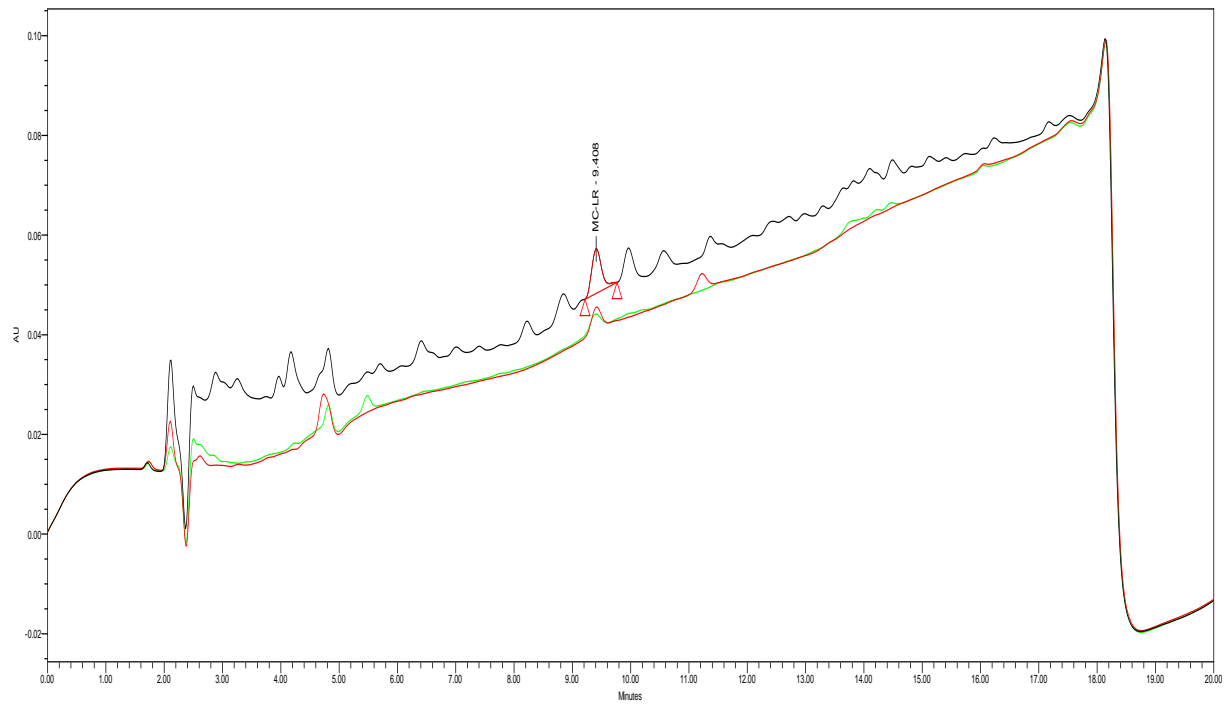
detecção das toxinas, seja feita por outros métodos analíticos mais sensíveis. Devem também ser estudadas outros tipos de cianotoxinas.

8.Referências

- 1) Andrade, M. S. B., Avaliação de efeitos citotóxicos, morfológicos e ultraestruturais de microcistina em células Vero, *in Faculdade de Ciências da Universidade do Porto*, 2007. P: 1 - 7.
- 2) Assalin, M. R., Aplicação da fotólise e da fotocatalise heterogénea na desinfecção de águas contaminadas com E.coli, *in Faculdade de Engenharia Civil da Universidade Estadual de Campinas*, 2001. P: 4 – 19.
- 3) Azevedo, S. M. F. O., Evans, W. R., Carmichael, W. W., Namikoshi, M., First Report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, *Journal of Applied Phycology*, 1994. P: 261 – 265.
- 4) Blanco-Galvez, J., Fernández-Ibáñez, P., Malato-Rodíguez, S., Solar Photocatalytic Detoxification and Disinfection of Water: Recent Overview, *Journal of Solar Energy Engineering*, 2006. P: 1 – 9.
- 5) Campinas, M., Teixeira, M.R., Lucas, H., Rosa, M. J., Previsão da Capacidade de Remoção de cianobactérias e cianotoxinas na ETA de Alcantarilha, *in Universidade do Minho*, 2002. P: 1 – 6.
- 6) Carneiro, T. G., Leite, F., Cianobactérias e suas Toxinas, *Revista Analytica nº 32*, 2008. P: 1 - 6.
- 7) Codd, G. A., Cyanobacterial Toxins, the Perception of Water Quality, and the Prioritisation of Eutrophication Control, *Ecological Engineering*, 2000. P: 51 – 60.
- 8) Donaire, P. P. R., Aplicação da Fotólise na Desinfecção de Águas, XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, *in Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental*. P: 2 – 3.
- 9) Fernandes, S. S., Biodisponibilidade de Cianotoxinas em Bivalves, *in Faculdade de Ciências da Universidade do Porto*, 2008. P: 9 – 20.
- 10) Ferreira, I. V. L., Daniel, L. A., Fotocatálise heterogênea com TiO₂ aplicada ao tratamento de esgoto sanitário secundário, *SciELO Brasil*, 2004.
- 11) Hoffman, J. R. H., *Water SA*, 1976. P: 2, 58.
- 12) Keijola, A. M., Himberg, K., Esala, K. A. L., Sivonen, K., Hiisvirta, L., *Toxic. Assess.* 1988. P: 3, 643.
- 13) Kuiper-Goodman, T., Falconer, I., Fitzgerald, J., Human Health Aspects, in *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, 1999. P: 125 – 135.
- 14) Lawton, L. A., Robertson, K. J., Physico-chemical treatment methods for the removal of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) from potable waters, *Chem. Soc. Rev.*, 1999. P: 217 – 224.

- 15) Malato, S., Fernández-Ibáñez, P., Maldonado, M. I., Blanco, J., Gernjak, W., Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends, *Catalyses Today*, 2009. P: 11 – 14.
- 16) Mur, L. R., Skulberg, O. M., Utkilen, H., Cyanobacteria in the Environment, in *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, 1999. P: 25 – 48.
- 17) Nogueira, R. F. P., Wilson, F. J., A Fotocatálise Heterogénea e sua Aplicação Ambiental, *Química Nova* 21(1), 1998. P: 1 – 3.
- 18) Robertson, J. M. C., Robertson, P. K. J., Lawton, L. A., A comparison of the effectiveness of TiO₂ photocatalysis and UVA photolysis for the destruction of three pathogenic micro-organisms, *Science Direct* 175, 2005. P: 51 – 56.
- 19) Robertson, P. K. J., Lawton, L. A., Munch, B., Rouzade, J., Destruction of cyanobacterial toxins by semiconductor photocatalysis, *Chem. Commun.*, 1997. P: 393 – 394.
- 20) Robertson, P. K. J., Lawton, L. A., Cornish B. J. P. A., Jaspars M., Processes influencing the destruction of microcystin-LR by TiO₂ photocatalysis, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 116, 1998. P: 215 – 219.
- 21) Rositano, J., Nicholson, B. C., Pieronne, P., *Ozone Sci. Technol.*, 1998. P: 20, 223.
- 22) Shephard, G. S., Stockenstrom, S., Villiers, D., Engelbrecht, W. J., Sydenham, E. W., Wessels, G. F. S., Photocatalytic Degradation of Cyanobacterial Microcystin Toxins in Water, *Elsevier Science*, 1998. P: 1895 – 1901.
- 23) Sivonen, K., Jones, G., Cyanobacterial Toxins, in *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*, 1999. P: 55 – 102.
- 24) Sousa, R. M., Cianobactérias e Suas Toxinas, in *Universidade Federal do Piauí*, 2009.
- 25) Vasconcelos, V. M. O., Toxicologia de Cianobactérias, in *Faculdade de Ciências da Universidade do Porto*, 1995. P: 8 – 16.
- 26) Veiga, N. C. A. R., Cianobactéria Tóxica na Água Para Consumo Humano, in *Artigo Científico apresentado ao concurso do curso de Gestão Ambiental das Faculdades Integradas Vianna Junior do 1º semestre de 2008*, 2008. P: 5 – 10.

Anexos

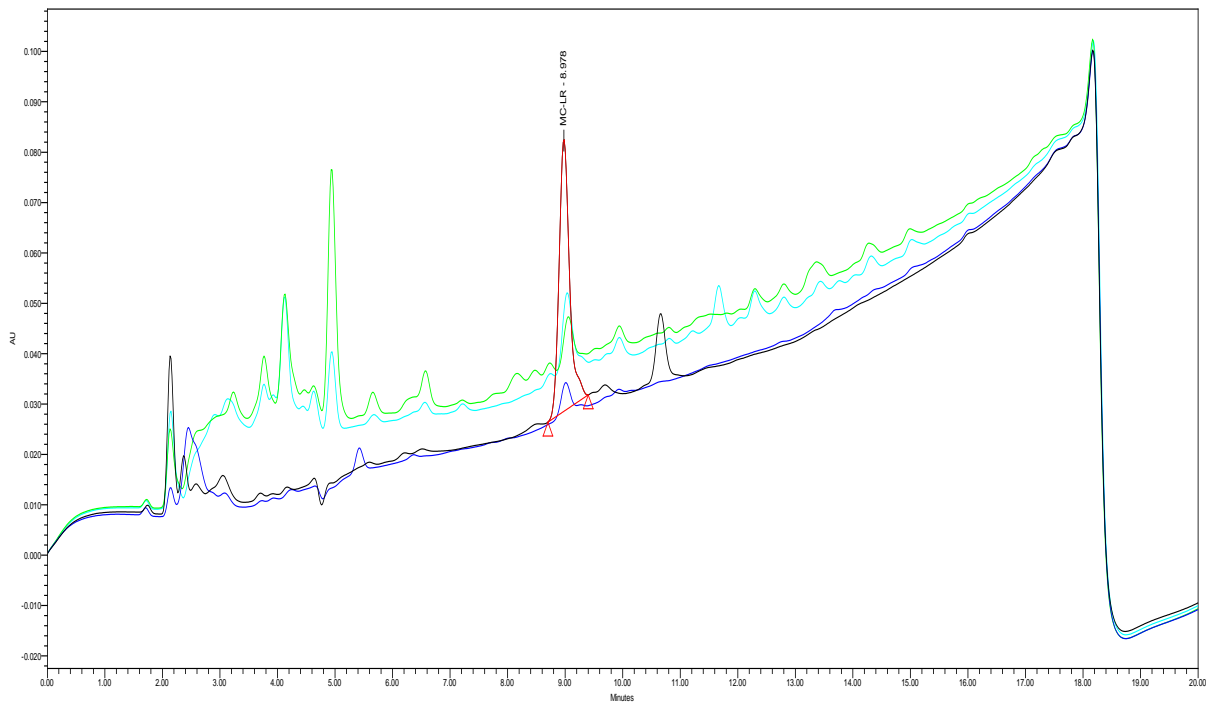


----- B Água filtrada - Fotocatalise

----- E Filtro - Fotocatalise

----- Padrão de MC-LR (purificado de *Microcystis aeruginosa*) (0.3 µg/mL)

Figura I. Cromatogramas de HPLC-DAD de um padrão de microcistina-LR (0,3 µg/mL) e cromatogramas respectivos B e E Filtro



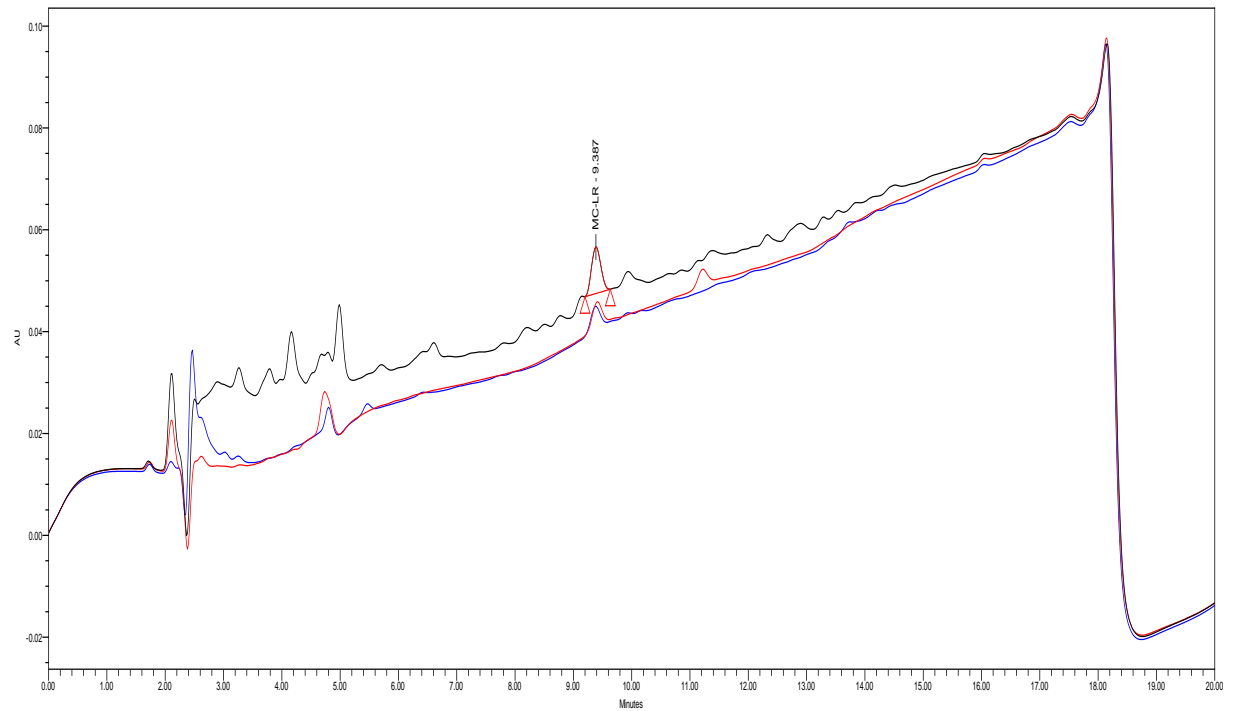
----- Padrão de MC-LR (purificado de *Microcystis aeruginosa*) (11.7 µg/mL)

----- 5 Água filtrada - Fotólise

----- 3 Água filtrada - Fotólise

----- 0 Filtro - Fotólise

Figura II. Cromatogramas de HPLC-DAD de um padrão de microcistina-LR (11.7 µg/mL) e cromatogramas respectivas amostras 3 e 5 da água filtrada e amostra 0 do filtro, ambos os três da fotólise.

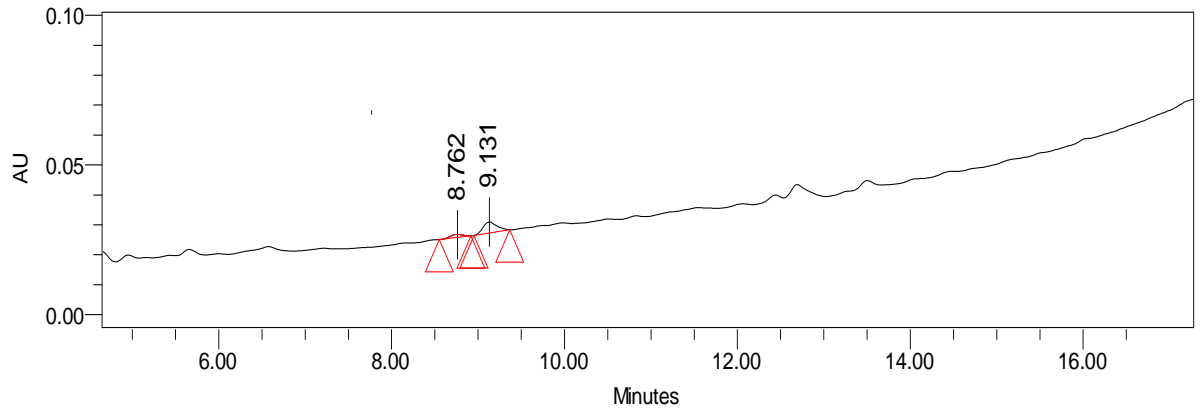


----- 4 Água filtrada - Fotolise

----- 2 Filtro - Fotolise

----- Padrão de MC-LR (purificado de *Microcystis aeruginosa*) (0.3 µg/mL)

Figura III. Cromatogramas de HPLC-DAD de um padrão de microcistina-LR (0.3 µg/mL) e cromatogramas respectivos às amostras 4 Água da água filtrada e 2 do Filtro, ambos da fotólise.



----- A Água filtrada - Fotocatálise

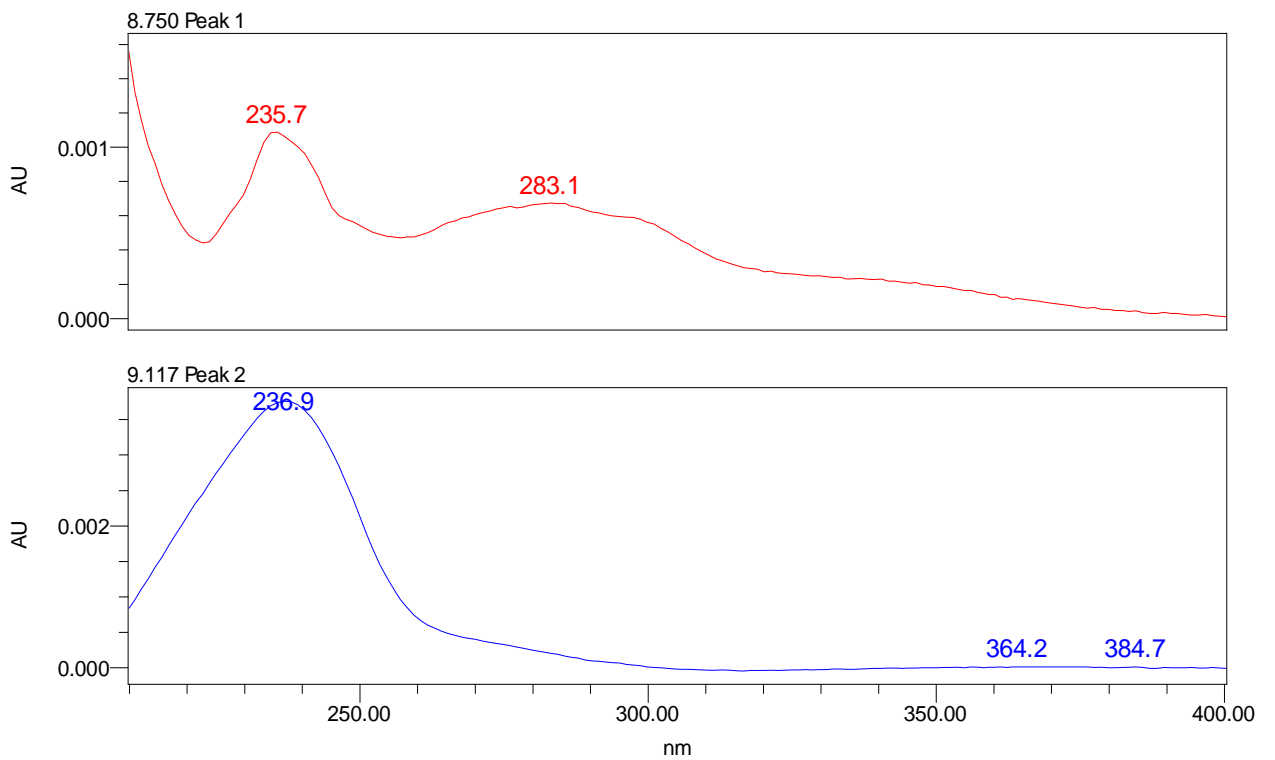
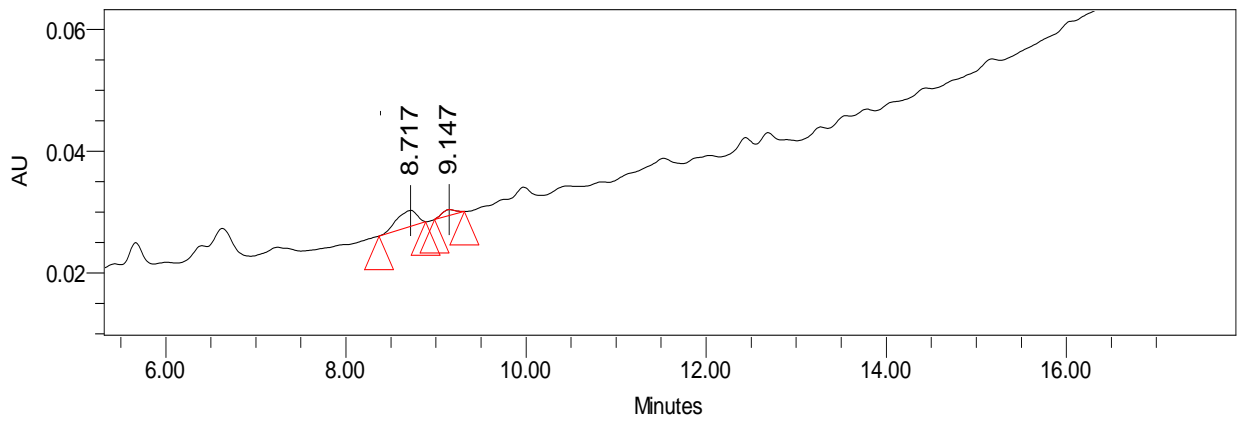


Figura IV. Cromatograma de HPLC-DAD da amostra A de água filtrada de fotocatalise e espectros relativos aos três picos assinalados

Desinfecção solar da água contaminada com cianobactérias usando colectores parabólicos compostos



----- D Água Filtrada - fotocatalise

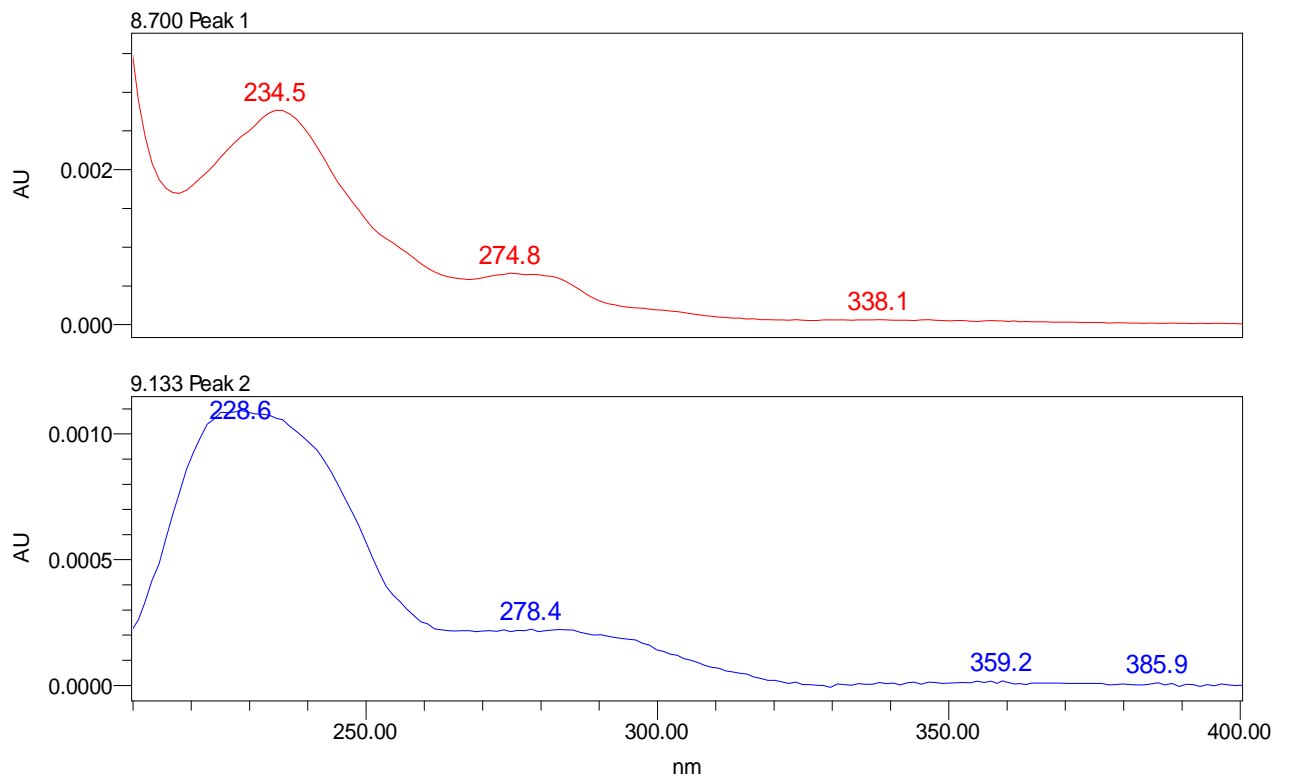
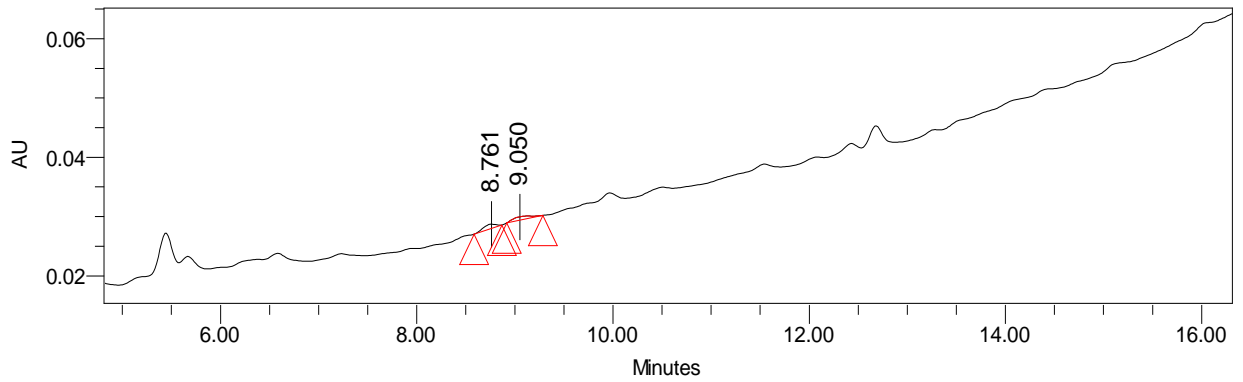


Figura V. Cromatograma de HPLC-DAD da amostra D da água filtrada da fotocatalise e espectros relativos aos três picos assinalados

Desinfecção solar da água contaminada com cianobactérias usando colectores parabólicos compostos



----- F Água filtrada – Fotocatálise

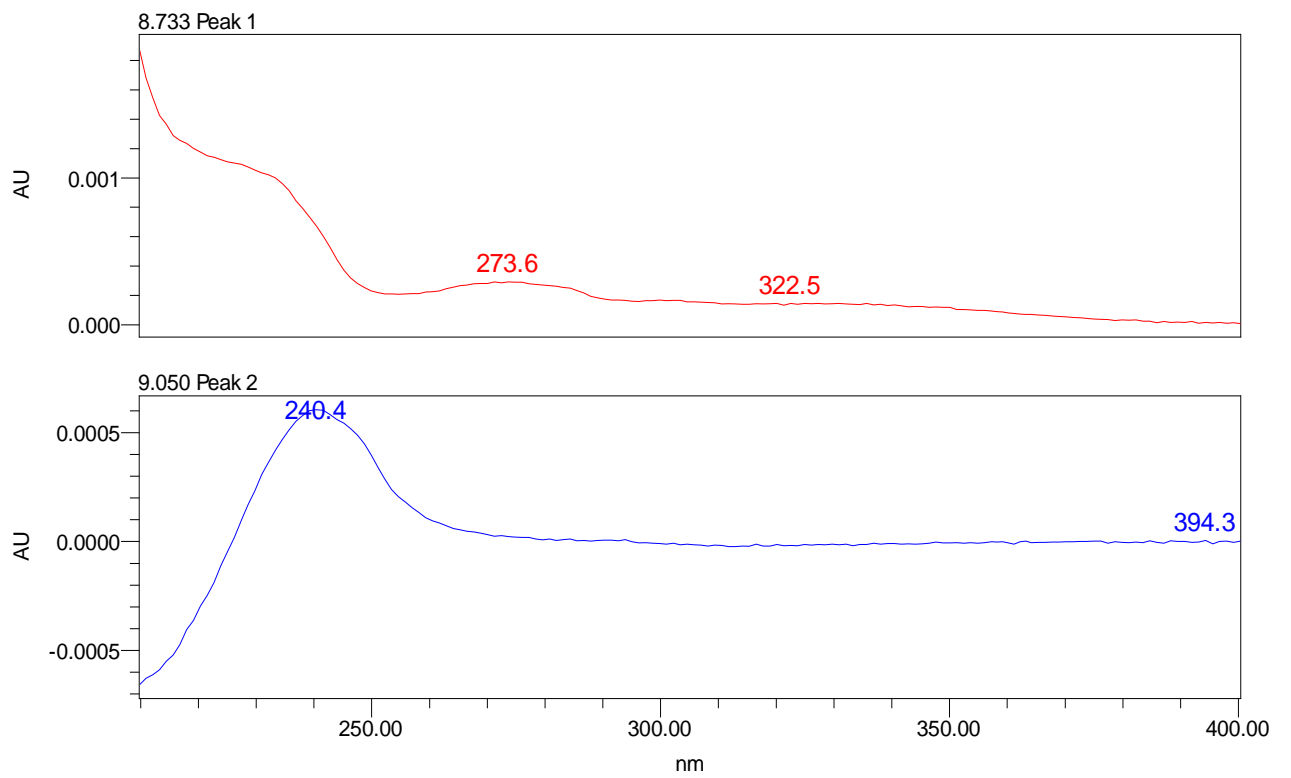
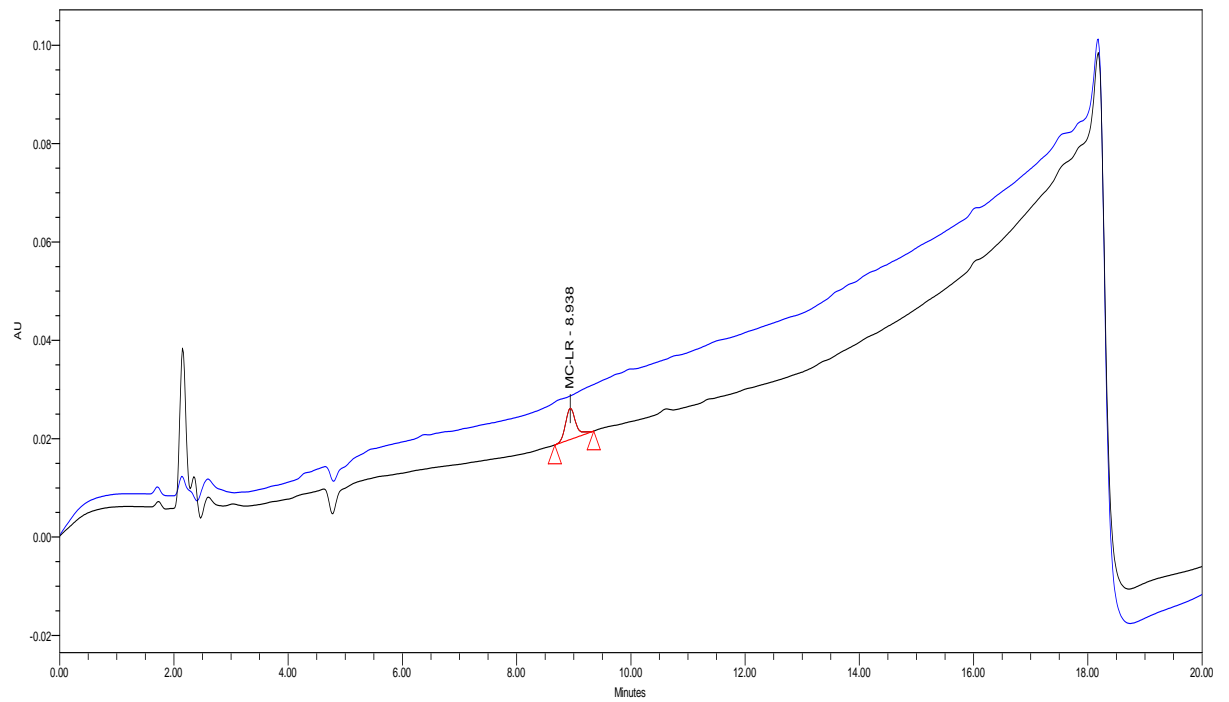


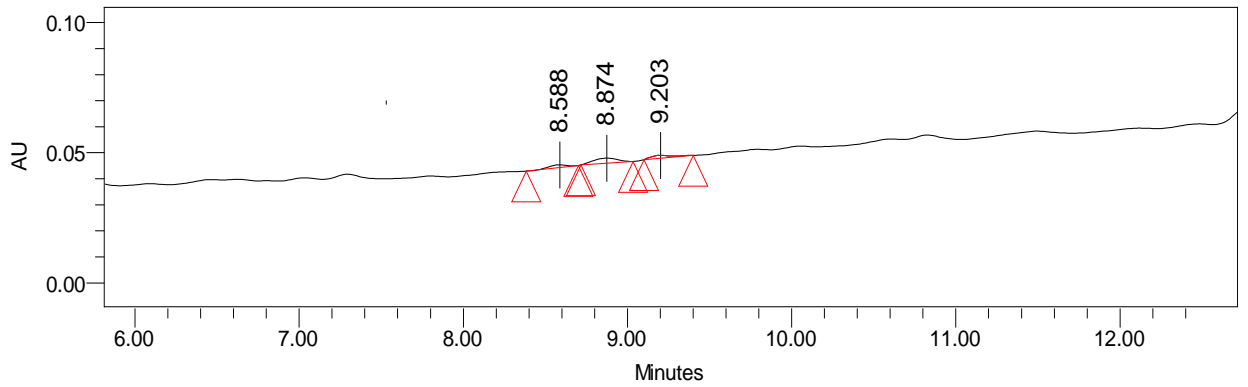
Figura VI. Cromatograma de HPLC-DAD da amostra F de água filtrada da fotocatalise e espectros relativos aos três picos assinalados



----- Padrão de MC-LR (purificado de *Microcystis aeruginosa*) (0.3 µg/mL)

----- 5 Filtro - Fotólise

Figura VII. Cromatograma de HPLC-DAD de um padrão de microcistina-LR (0.3 µg/mL) e cromatograma do Filtro 5 da fotólise.



----- C Água filtrada – Fotocatálise

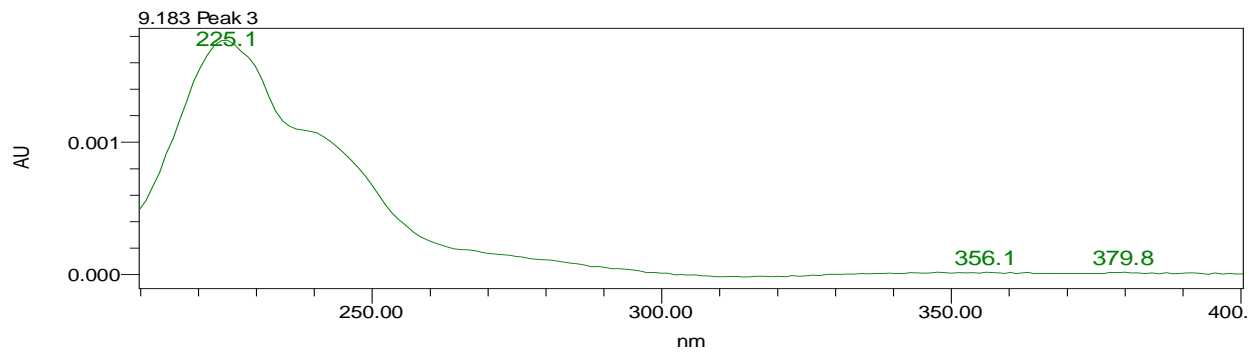
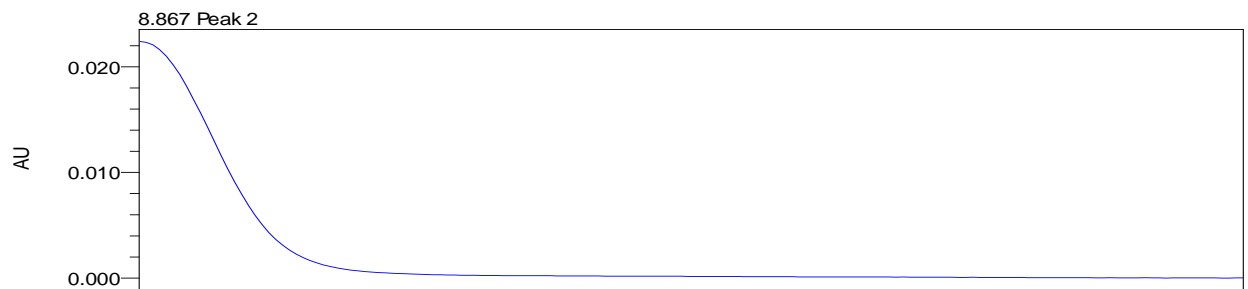
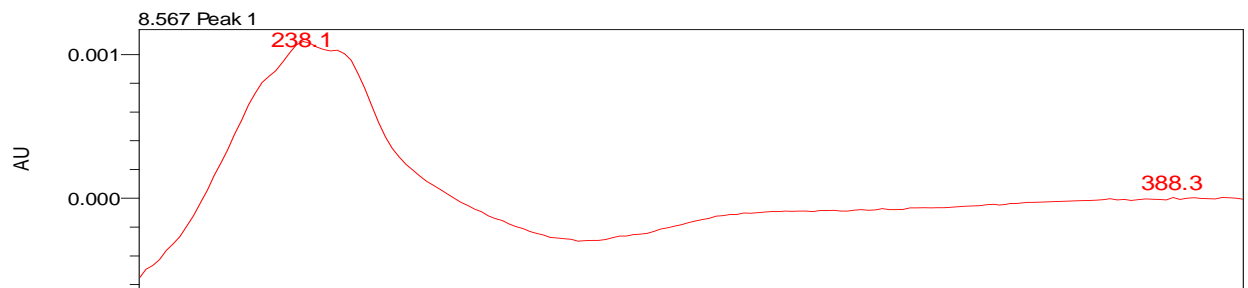
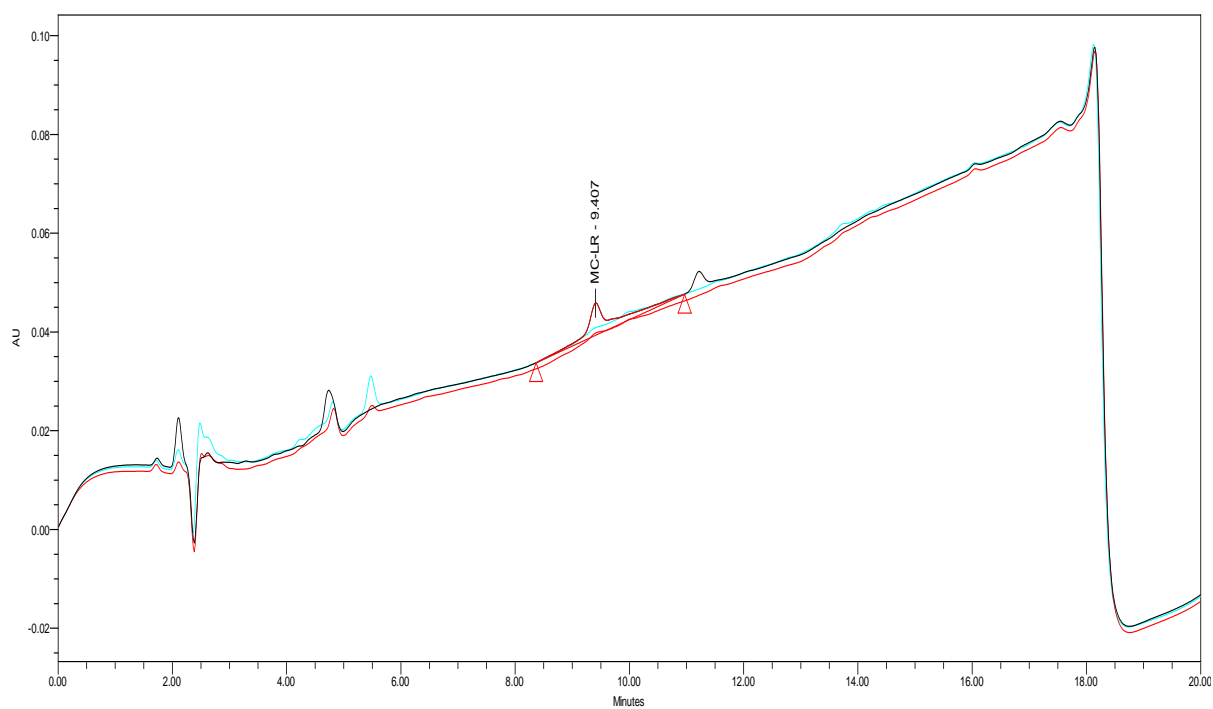


Figura VIII. Cromatograma de HPLC-DAD da amostra C de água filtrada e espectros relativos aos três picos assinalados

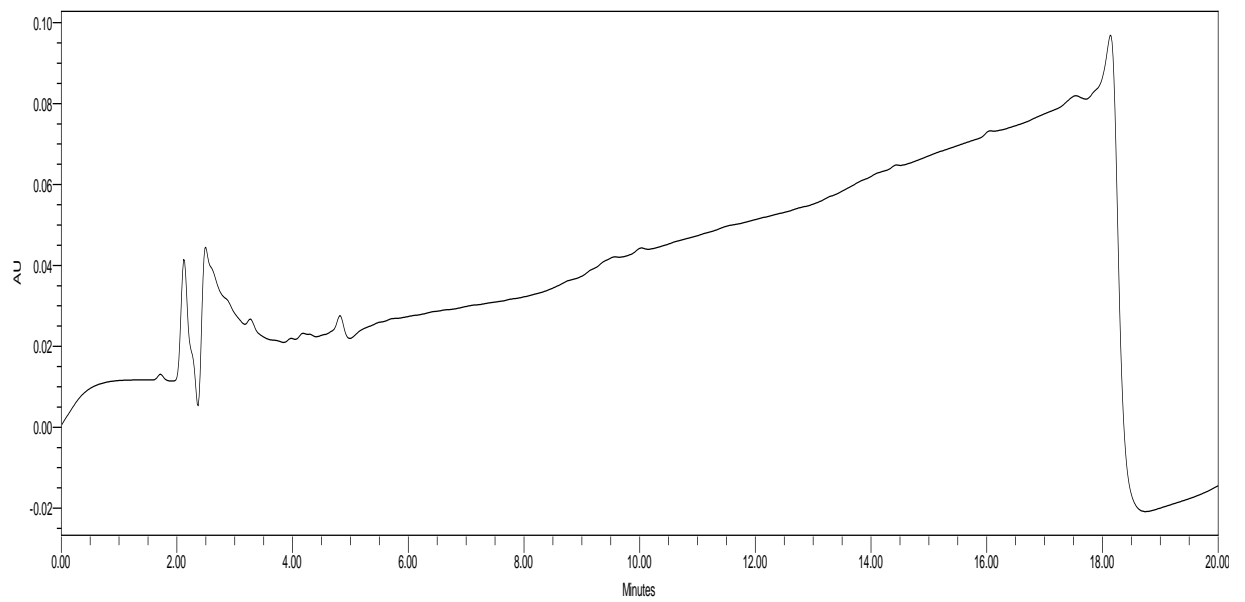


----- Padrão de MC-LR (purificado de *Microcystis aeruginosa*) (0.3 µg/mL)

----- B Filtro - Fotocatalise

----- E Filtro - Fotocatalise

Figura IX. Cromatograma de HPLC-DAD de um padrão de microcistina-LR (0.3 µg/mL) e cromatogramas respectivos às amostras B e E, ambos da fotocatalise.



----- E Água Filtrada – Fotocatálise

Figura X. Cromatograma de HPLC-DAD da amostra E da água filtrada da fotocatalise.