UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA HIDRÁULICA E SANEAMENTO

ANDRÉIA VANESSA STOCCO ORTOLAN

ADSORÇÃO COM CARVÃO ATIVADO GRANULAR E DEGRADAÇÃO BIOLÓGICA PARA O TRATAMENTO AVANÇADO DE ÁGUAS DE ABASTECIMENTO: REMOÇÃO DE MICROCISTINA EM ESCALA LABORATORIAL

VERSÃO CORRIGIDA
São Carlos (SP)
2016

ANDRÉIA VANESSA STOCCO ORTOLAN

ADSORÇÃO COM CARVÃO ATIVADO GRANULAR E DEGRADAÇÃO BIOLÓGICA PARA O TRATAMENTO AVANÇADO DE ÁGUAS DE ABASTECIMENTO: REMOÇÃO DE MICROCISTINA EM ESCALA LABORATORIAL

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientador: Prof. Dr. Davi Gasparini Fernandes Cunha

São Carlos (SP)

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

O78a

Ortolan, Andréia Vanessa Stocco
Adorção com carvão ativado granular e degradação biológica para o tratamento avançado de águas de abastecimento: remoção de microcistina em escala laboratorial / Andréia Vanessa Stocco Ortolan; orientador Davi Gasparini Fernandes Cunha. São Carlos, 2016.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2016.

1. Adsorção. 2. Biodegradação. 3. Carvão ativado. 4. Cianotoxinas. 5. Tratamento de água de abastecimento. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **ANDRÉIA VANESSA STOCCO ORTOLAN.**

Título da dissertação: "Adsorção com carvão ativado granular e degradação biológica para o tratamento avançado de águas de abastecimento: remoção de microcistina em escala laboratorial ".

Data da defesa: 19/05/2016

Comissão Julgadora:	**Resultado:**
Prof. Dr. **Davi Gasparini Fernandes Cunha (Orientador)** (Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)	APROVADA
Prof. Dr. **Aparecido dos Reis Coutinho** (Universidade Metodista de Piracicaba/UNIMEP)	Aprovada
Prof. Dr. **Erich Kellner** (Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)	APROVADA

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:
Profa. Associada **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

Dedico este trabalho aos meus pais. À minha mãe Lucila, por sempre me fazer acreditar que sou capaz, pelo apoio e incentivo constante à busca pelos meus objetivos e felicidade. Ao meu pai Antonio, por me mostrar que, com dedicação e amor, o trabalho é sempre mais gratificante, e o retorno é sempre maior.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da minha vida e das pessoas que amo. Pela oportunidade de realizar esse trabalho, pelas pessoas que tenho ao meu redor e pela fé que me move.

Aos meus amores presentes no meu dia-a-dia. Meus pais, Lucila Regina Stocco Ortolan e Antonio Lasaro Ortolan, que são meu porto seguro e que me dão todo o suporte que preciso nessa caminhada. Meus irmãos, Ana Paula Stocco Ortolan Azevedo e Carlos Henrique Stocco Ortolan, que são meus exemplos de caráter e sei que posso sempre contar com eles. Meu namorado Rafael de Oliveira Coelho dos Santos, meu amor e companheiro há mais de sete anos, que me inspira, me dá forças e faz meus dias mais felizes! Obrigada pela paciência e apoio na minha busca pelo mestrado e por todas as outras buscas.

Ao meu orientador Davi Gasparini Fernandes Cunha, sempre presente na pesquisa. Obrigada pelo apoio, pelos conhecimentos transmitidos, dedicação e amizade nesses dois anos. Por ser um exemplo de pessoa e profissional.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos grandes amigos que fiz nessa caminhada, especialmente Amanda Menegante Neri, Gabriela Albino Marafão e Adilson de Jesus Chaves. Pelas risadas, desabafos e conselhos. Pelos momentos de amizade e carinho.

Aos amigos e companheiros do Biotace, que fizeram meus dias mais cafeinados e divertidos: Adilson de Jesus Chaves, Adriana Cristina Poli Miwa, Amanda Menegante Neri, Carolina Andrade, Gabriela Albino Marafão, Larissa Sene Araújo, Paulo Vagner dos Santos, Paulo Henrique Pereira, Sarah Vargas e Wesley Aparecido Saltarelli. Especialmente à Adriana pelo apoio técnico, ao Paulo Vagner pela orientação nos ensaios de cultura e de análise de toxina, e à Larissa pelas ajudas e discussões na pesquisa com o carvão. Agradeço também à professora Maria do Carmo Calijuri, pelo apoio e pela infraestrutura do laboratório.

Às amadas amigas de longa data, Beatriz Frasão Tonon e Tayná Fernanda Piloto Valderrama Sampaio, pela amizade sempre presente e apoio constante. O carinho de vocês é sempre muito importante e me ajudou muito nesta etapa de minha vida. À amiga e companheira de apartamento Priscila Ribeiro dos Santos, pelos dois anos de convivência diária, sempre com muito diálogo, alegria e sinceridade.

Ao Departamento de Hidráulica e Saneamento, pela oportunidade de realizar o mestrado. Em especial aos funcionários Maria Auxiliadora C. Altieri Pin (Sá), Priscila Carla

Toselli de Almeida (Pri), Rosemeire A. de Jesus e André Canale Garcia, pela atenção e informações.

Aos professores presentes na minha banca de qualificação, Lyda Sabogal Paz e Erich Kellner. Suas sugestões foram essenciais no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos pesquisadores da Unimep, pela atenção e apoio nas análises dos carvões, em especial Prof° Aparecido dos Reis Coutinho, Prof° Manoel Mendez, Profª Carla Fabiana Rombaldo e doutoranda Ana Carolina Plens.

À técnica Eloisa Pozzi do LPB, pelo apoio e orientação nas análises de biodegradação.

Aos membros da banca presentes na minha defesa, Prof° Aparecido dos Reis Coutinho e Prof° Erich Kellner, por aceitarem participar de um momento tão importante em minha vida profissional e pessoal.

À todos que contribuíram para a concretização e finalização desta etapa da minha vida. Muito obrigada!

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota."

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

ORTOLAN, A. V. S. **Adsorção com carvão ativado granular e degradação biológica para o tratamento avançado de águas de abastecimento: remoção de microcistina em escala laboratorial**. 2016. 94 f. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

As cianotoxinas, potencialmente prejudiciais à saúde dos homens e animais, são toxinas produzidas pelas cianobactérias e que podem estar presentes em reservatórios utilizados para captação de água para abastecimento, sobretudo em função do agravamento das condições sanitárias das bacias hidrográficas. Diante disso, torna-se fundamental que a água esteja adequada ao consumo humano em sua distribuição. Uma das formas de tratamento para remoção das cianotoxinas que vem sendo estudada é por meio do uso de carvão ativado granular (CAG), cuja eficiência depende de suas características intrínsecas e das condições operacionais. Outra possibilidade para remoção de tais toxinas se dá por meio da utilização de microrganismos capazes de promover sua biodegradação. A presente pesquisa analisou o potencial de remoção de microcistina por meio de adsorção por três diferentes CAGs comerciais (materiais de origem: casca de coco, mineral e osso) e por meio da degradação biológica por dois gêneros de bactérias. Para isso, foi utilizado um extrato de toxina produzido por meio do cultivo de *Microcystis aeruginosa* (cepa BB005) em meio WC, ao longo de 30 dias, com fotoperíodo de 12 h. Os carvões foram caracterizados de acordo com a massa específica aparente, umidade, pH, teor de cinzas, número de iodo, índice de azul de metileno e área superficial específica. Em seguida, foram realizados ensaios de adsorção com a microcistina (concentração inicial de 100 $\mu g.L^{-1}$) para construção de isotermas com tempo de equilíbrio de 1 h. As análises de toxina foram realizadas pelo método ELISA e os dados foram ajustados aos modelos matemáticos de Langmuir e de Freundlich. Os melhores resultados de adsorção foram obtidos a partir do carvão de origem mineral (99% de remoção), que apresentou valores maiores para número de iodo (710 $mgI_2.g^{-1}$), índice de azul de metileno (169 $mL.g^{-1}$), área superficial específica (911 $m^2.g^{-1}$) e porcentagem de microporos (70%), com melhor ajuste da isoterma obtido pelo modelo de Freundlich (R^2=0,88). Os ensaios de biodegradação da microcistina com os gêneros *Sphingomonas* sp. e *Brevundimonas* sp foram realizados com a toxina esterilizada e não esterilizada (concentração inicial de 75 $\mu g.L^{-1}$). Os resultados demonstraram que tais bactérias não foram capazes de degradar a toxina esterilizada. Entretanto, foi observada degradação nos ensaios em que a toxina não estava esterilizada (porcentagem de remoção de 98%), indicando a presença de algum microrganismo e/ou enzima atuante nesse processo, uma vez que o cultivo da cepa para obtenção do extrato não foi realizado sob condições de assepsia. Recomenda-se, para futuras pesquisas, a identificação do responsável pela biodegradação da microcistina, bem como a aplicação do carvão mineral em maior escala (filtro de leito fixo). Deste modo, será possível avaliar a formação de biofilme no leito de carvão, e comparar o desempenho da adsorção e da biodegradação na remoção do poluente-alvo em escala mais próxima à real.

Palavras-chave: Adsorção; Biodegradação; Carvão ativado; Cianotoxinas; Tratamento de água de abastecimento.

ABSTRACT

ORTOLAN, A. V. S. **Adsorption with granular activated carbon and biological degradation for advanced treatment of drinking water: removal of microcystin in laboratory scale.** 2016. 94 p. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

The cyanotoxins, which are potentially harmful to the health of humans and animals, are toxins produced by cyanobacteria. They can be found in reservoirs used for water supply, especially due to the degradation of sanitary conditions within the watersheds. Therefore, it is essential to assure potable water for human consumption in its distribution. The use of granular activated carbon (GAC) has been studied for advanced water treatment and cyanotoxins' removal. The efficiency of such technology depends on activated carbon intrinsic characteristics and operating conditions. Removing such toxins through biodegration by microrganisms is another possibility. The present study was perfomed in laboratory conditions and analyzed microcystin removal by adsorption by three commercial GACs (source materials: coconut shell, mineral and bone) and through the biological degradation by two genera of bacteria. An extract of toxin was produced by the cultivation of Microcystis aeruginosa (strain BB005), in medium WC throughout 30 days, with a 12 h photoperiod. The activated carbon samples were characterized regarding the apparent density, moisture, pH, ash content, iodine number, methylene blue index and specific surface area. Thereafter, adsorption experiments were conducted with microcystin (initial concentration of 100 $\mu g.L^{-1}$) for estimating isotherms considering an equilibrium time of 1 h. The toxin analyses were performed by the ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) and the data were adjusted to the mathematical models of Langmuir and Freundlich. The best adsorption results were obtained with the mineral carbon (removal percentages of 98%), which also showed the highest values for the iodine number (710 $mgI_2.g^{-1}$), methylene blue index (169 $mL.g^{-1}$), specific surface area (911 $m^2.g^{-1}$) and percentage of micropores (70%), with best adjustment of the isotherm through the Freundlich model (R^2 = 0.88). The biodegradation tests of microcystin with *Sphingomonas* sp. and *Brevundimonas* sp. were carried out with the sterile and non-sterile toxin (initial concentration of 75 $\mu g.L^{-1}$). The results showed that these bacteria were not able to promote degradation of the toxin when it was sterilized. However, the degradation was observed in those tests in which the toxin was not sterilized (reduction up to 98%), suggesting the presence of a microrganism and/or an enzyme responsible for this process, since the cultivation of the strain for obtaining the extract was not performed under sterile conditions. As for future research, it is recommendedthe identification of the factor responsible for the biodegradation of the microcystin, as well as the study of the use of the activated carbon from mineral source in a larger scale (fixed-bed filter). This would help to reach a scale closer to the real water treatment plants and evaluate the biofilm formation in the carbon bed, allowing the comparison of the performance of both adsorption and biodegradation processes in the removal of the target pollutant.

Keywords: Adsorption; Biodegradation; Activated carbon; Cyanotoxins; Drinking water treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura geral da microcistina. Nas posições de 1 a 7, podem ser encontrados diferentes aminoácidos. Exemplos de variantes da microcistina na tabela, de acordo com o aminoácido que é encontrado nas posições indicadas. Fonte: Cassini, Antunes e Keller (2013) e de Puddick et al. (2014) 32

Figura 2 – Representação esquemática da superfície específica de um adsorvente, que é composto por superfícies internas e externas. Fonte: Muranaka (2010) 39

Figura 3 - Tipos de isotermas que podem ser obtidas a partir da adsorção física de gases, em que a abscissa (P/P_0) corresponde à razão entre a pressão do gás e a pressão de vapor do gás utilizado, enquanto a ordenada reflete o volume de gás que é adsorvido pelo material adsorvente. Fonte: IUPAC (1985) 40

Figura 4 - Tipos de histereses que podem ser obtidas a partir da adsorção física de gases, em que a abscissa (P/P_0) corresponde à razão entre a pressão do gás e a pressão de vapor do gás utilizado, enquanto a ordenada reflete o volume de gás que é adsorvido pelo material adsorvente. Fonte: IUPAC (1985) 41

Figura 5 - Esquema das condições experimentais envolvidas no cultivo de M. aeruginosa em diferentes meios de cultura e condições de luz 53

Figura 6 - Armazenamento em garrafas PET de 2 L da cultura de *M. aeruginosa*, para posterior extração do extrato de toxina 54

Figura 7 – Ensaios de Número de Iodo (NI) e Índice de Azul de Metileno (IAM). (a) Titulação de tiossulfato de sódio referente ao ensaio da determinação do NI de acordo com a norma MB-3410 (ABNT, 1991). (b) Amostras de carvão mantidas sob agitação durante ensaio do IAM, de acordo com a norma japonesa JIS K 1474 (2014). 56

Figura 8 – Vista do ensaio de isotermas de adsorção de microcistina. Depois de agitação constante, as amostras foram filtradas em membranas de fibra de nylon de 0,45 µm..... 57

Figura 9 – Vista da incubadora em que o ensaio de biodegradação foi mantido sem luz por seis dias a 24°C, em erlenmeyers de 250 mL com meio de cultura Zinder, extrato de microcistina (parte do ensaio esterilizada, parte não) e as bactérias *Sphingomonas* sp. e *Brevundimonas* sp. 60

Figura 10 - Etapas referentes à metodologia da presente pesquisa, incluindo o cultivo e extração de microcistina, a caracterização das amostras de carvão ativado granular e os ensaios de bancada para construção das isotermas de adsorção e para os ensaios de degradação biológica da cianotoxina 61

Figura 11 - Curvas de crescimento da *M. aeruginosa* sob diferentes condições (meios de cultura: ASM-1, WC e BG-11; fotoperíodos de 12 e 24 h, sendo o fotoperíodo de 12 h representado na legenda pela letra F) estimada a partir da absorbância a 750 nm. Os valores representam as médias e seus respectivos desvios padrão 62

Figura 12 - Concentração de microcistina ($\mu g.L^{-1}$) após 20 e 30 dias de monitoramento a partir de diferentes condições de cultivo (meios de cultura: ASM-1, WC ou BG-11; fotoperíodos de 12 ou 24 h). Os valores representam as médias e seus respectivos desvios padrão..... 63

Figura 13 – Vista do fotobiorreator após 30 dias de cultivo da *M. aeruginosa* (cepa BB005) na condição observada com maior produção de toxina (meio WC e fotoperíodo de 12 h)..... 64

Figura 14 - Caracterização dos carvões 1, 2 e 3 (casca de coco, mineral e osso, respectivamente) conforme parâmetros de massa específica aparente ($g.cm^{-3}$), umidade (%), teor de cinzas (%), pH, número de iodo ($mg.g^{-1}$). Os valores correspondem às médias e seus respectivos desvios padrão..... 65

Figura 15 - Isotermas de adsorção de nitrogênio gasoso (N_2) a 77 K e distribuição dos poros do carvão 1 (matéria prima de origem: casca de coco). dV corresponde à derivada do gráfico

de volume dos poros [cc/nm/g, em que cc = cm^3], dS à derivada do gráfico da área superficial [m^2/nm/g]. 67

Figura 16 - Isotermas de adsorção de nitrogênio gasoso (N_2) a 77 K e distribuição dos poros do carvão 2 (matéria prima de origem: mineral). dV corresponde à derivada do gráfico de volume dos poros [cc/nm/g, em que cc = cm^3], dS à derivada do gráfico da área superficial [m^2/nm/g]. 68

Figura 17 - Isotermas de adsorção de nitrogênio gasoso (N_2) a 77 K e distribuição dos poros do carvão 3 (matéria prima de origem: osso). dV corresponde à derivada do gráfico de volume dos poros [cc/nm/g, em que cc = cm^3], dS à derivada do gráfico da área superficial [m^2/nm/g]. 69

Figura 18 - Resultados do tempo de equilíbrio testado para os carvões 1, 2 e 3 (matéria prima de origem: casca de coco, mineral e osso, respectivamente), sendo analisados os tempos 0, 1, 2, 4, 8 e 24 h 72

Figura 20 - Ajuste das isotermas de adsorção de microcistina para o modelo matemático de Langmuir, sendo os resultados obtidos para os carvões 1 (origem de casca de coco), 2 (origem mineral) e 3 (origem de osso) 74

Figura 21 - Ajuste das isotermas de adsorção de microcistina para o modelo matemático de Freundlich, sendo os resultados obtidos para os carvões 1 (origem de casca de coco), 2 (origem mineral) e 3 (origem de osso) 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gêneros de cianobactérias produtoras de cianotoxinas e seus efeitos em humanos pós-contaminação 29

Tabela 2 - Vantagens e desvantagens entre os usos dos carvões ativados granular (CAG) e em pó (CAP) 37

Tabela 3 - Classificação dos poros de carvão ativado de acordo com seus tamanhos, sendo eles microporos, mesoporos ou macroporos 39

Tabela 4 - Composição do meio ASM-1, incluindo fórmulas e concentrações dos reagentes ($g.100\ mL^{-1}$) utilizados na composição das soluções (soluções A, B, C e D) e o volume requerido de cada solução ($mL.L^{-1}$) para compor o meio final 50

Tabela 5 - Composição do meio BG-11, incluindo reagentes utilizados e suas concentrações da solução estoque ($g.L^{-1}$), o volume requerido de cada solução estoque para preparo de um litro de meio e a descrição da composição da solução de micronutrientes 51

Tabela 6 - Composição do meio WC, incluindo fórmulas e concentrações dos reagentes ($mg.L^{-1}$) e descrição das composições da solução de metal traço e de vitamina 52

Tabela 7 - Caracterização dos poros dos carvões ativados 1, 2 e 3 (origem coco, mineral e osso, respectivamente), incluindo: área superficial específica da teoria de adsorção de Brunauer, Emmet e Teller (ASE BET, $m^2.g^{-1}$), volume dos poros ($cm^3.g^{-1}$), proporção de microporos (%), formato e tamanho predominante dos poros (nm) 70

Tabela 8 - Constantes obtidas a partir dos ajustes das isotermas aos modelos matemáticos de Langmuir e de Freundlich para os carvões 1 (origem de casca de coco), 2 (origem mineral) e 3 (origem de osso) 75

Tabela 9 - Concentração de microcistina final ($\mu g.L^{-1}$) nas diferentes condições testadas no experimento de biodegradação 79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de Variância
ASE	Área Superficial Específica
ASTM	American Society for Testing and Materials
AWWA	American Water Works Association
b	Coeficiente de Langmuir a ser determinado experimentalmente
BET	Teoria de adsorção de Brunauer, Emmet e Teller
C_0	Concentração inicial do adsorvato ($mg.L^{-1}$)
CAB	Carvão Ativado Biológico
CAG	Carvão Ativado Granular
CAP	Carvão Ativado em Pó
Carvão 1	Carvão ativado granular de casca de coco
Carvão 2	Carvão ativado granular mineral
Carvão 3	Carvão ativado granular de osso
C_e	Concentração do adsorvato no equilíbrio ($mg.L^{-1}$ ou $mol.L^{-1}$)
ELISA	Ensaio do Imunoadsorvente Ligado à Enzima
ETA	Estação de Tratamento de Água
IAM	Índice de Azul de Metileno
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JIS	Japanese Industrial Standards
k	Coeficiente a ser determinado experimentalmente

LMC	Laboratório de Materiais Carbonos
LPB	Laboratório de Processos Biológicos
M	Massa do adsorvente (g)
MS	Ministério da Saúde
n	Coeficiente a ser determinado experimentalmente
NI	Número de Iodo
nLDFT	Non-local density function theory
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
q_e	Concentração de equilíbrio da fase adsorvente (mg adsorvato/g adsorvente)
q_{eo}	Massa adsorvida para $C_e = C_0$ (mg de adsorvato/g de carvão)
q_{max}	Coeficiente de Langmuir a ser determinado experimentalmente
R_L	Fator de separação ou parâmetro de equilíbrio
TU	Taxa de uso do carvão (g de CAG/L de água escoada)
TV	Taxa volumétrica (L de água filtrada/L de carvão)
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
UNIMEP	Universidade Metodista de Piracicaba
USP	Universidade de São Paulo
V	Volume da solução (L)
VMP	Valor Máximo Permitido
ρ_{cag}	Massa específica aparente do CAG (g/L)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 25
2. OBJETIVOS 27
2.1 Objetivo geral 27
2.2 Objetivos específicos 27
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 28
3.1 Cianobactérias e cianotoxinas 28
3.2 Tratamento avançado de águas de abastecimento 34
3.2.1 Adsorção com CAG 36
3.2.2 Adsorção de cianotoxinas com carvão ativado 45
3.2.3 Biodegradação de cianotoxinas 46
4. METODOLOGIA 49
4.1 Produção de microcistina 49
4.2 Caracterização de diferentes carvões comerciais 55
4.3 Isotermas de adsorção de microcistina 56
4.4 Pré-dimensionamento de filtros de carvão ativado 58
4.5 Ensaio de biodegradação 60
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 62
5.1 Produção de microcistina 62
5.2 Caracterização dos diferentes carvões comerciais 64
5.3 Isotermas de adsorção de microcistina 72
5.4 Ensaio de biodegradação 79
6. CONCLUSÕES 83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 85

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população urbana é um dos fatores que mais afeta a qualidade e a distribuição da água para consumo humano. Estudos têm relatado a ocorrência de contaminantes pouco conhecidos em águas residuárias e superficiais, mas pequena parcela reportou sua importância toxicológica ou os limites aceitáveis de consumo ou descarte (PAL et al., 2014). Esses contaminantes, os poluentes emergentes, estão relacionados ao consumo em larga escala de alguns produtos pela sociedade, incluindo os químicos sintéticos, como pesticidas, cosméticos, medicamentos, produtos de higiene pessoal e limpeza (GAVRILESCU et al., 2014). O desafio é lidar com o incremento da geração desses produtos, tendo em vista que seu consumo tende a aumentar. A falta de saneamento e o acesso a fontes de abastecimento de água de qualidade insatisfatória ainda afetam a maioria da população nos países em desenvolvimento, o que aumenta o risco de doenças devido à constante exposição a fontes de contaminação.

O despejo de efluentes sem tratamento prévio, principalmente em áreas urbanas densamente povoadas, e o uso indiscriminado de fertilizantes na agricultura podem aumentar significativamente a concentração de nitrogênio e fósforo nos cursos de água. A elevada disponibilidade destes nutrientes pode acarretar o fenômeno da eutrofização artificial, que aumenta a frequência de floração de algas e cianobactérias, além de estimular o desenvolvimento de macrófitas aquáticas nos sistemas aquáticos. Esse processo pode reduzir a transparência da água e as concentrações de oxigênio dissolvido, produzir odores desagradáveis, gerar morte de peixes além da produção das cianotoxinas, que são toxinas produzidas por algumas cianobactérias e que também são consideradas poluentes emergentes.

Existem diversos tipos de cianotoxinas, sendo a microcistina uma delas. Esta consiste em uma variação hepatotóxica dentre as cianotoxinas, sendo potencialmente prejudicial à saúde dos seres humanos e animais. Sua nomenclatura varia de acordo com o aminoácido que é encontrado em sua estrutura, como por exemplo, microcistina–LR, –RR e –LL. Sua ocorrência já foi reportada em diversas partes do mundo, incluindo no Brasil. Um dos casos mais graves, mundialmente reconhecido, foi a “Síndrome de Caruaru”, ocorrida em 1996 na cidade de Caruaru (PE) e relatada por Azevedo et al. (2002). Uma clínica de hemodiálise recebia pacientes para fazer o tratamento diário, sendo que eles passaram a apresentar sintomas como dor de cabeça, náusea e vômitos, seguido por algumas mortes. Mais tarde,

descobriu-se que a água usada no tratamento era captada de um reservatório com elevada concentração de cianotoxina e que não recebeu tratamento adequado para sua remoção. Outra ocorrência recentemente citada por Hauser-Davis et al. (2015) na Lago eutrófico de Jacarepaguá (Rio de Janeiro) foi a acumulação de microcistina em espécies de tilápia, aumentando o risco de contaminação da população local que pode consumir este alimento. Essas ocorrências chamam a atenção para a susceptibilidade da população com relação à toxina, aumentando a preocupação com a segurança e saúde.

Com base no princípio de múltiplas barreiras, que preconiza a atenção à água desde o manancial até o momento de utilização pelo consumidor, a estação de tratamento de água (ETA) para abastecimento consiste na última etapa antes da distribuição para o consumo. Portanto, nesse estágio, a qualidade da água deve estar adequada do ponto de vista da saúde pública. Parcela significativa dos sistemas convencionais de tratamento de água não é capaz de remover cianotoxinas. Assim, estudos a respeito de operações unitárias, métodos e tecnologias para remover tais contaminantes se mostram relevantes por uma questão de segurança sanitária.

No Brasil, a Portaria do Ministério da Saúde (MS) n° 2914/2011 (BRASIL, 2011) dispõe sobre o padrão de potabilidade da água para o consumo humano, além de indicar procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água. De acordo com a Portaria, o valor máximo permitido (VMP) de microcistina em águas para abastecimento humano é de 1,0 $\mu g.L^{-1}$, sendo que nesse limite devem ser consideradas todas as variantes desta toxina que estejam presentes. Diante disso, reforça-se a importância do desenvolvimento e avaliação de técnicas de tratamento avançado de água de abastecimento.

O uso de carvão ativado para remoção das cianotoxinas vem sendo analisado e tem demonstrado resultados promissores. Entretanto, a elevada diversidade de estruturas e propriedades dos carvões ativados afeta a sua capacidade de adsorção. Portanto, torna-se necessária a caracterização de diferentes carvões a fim de conhecer suas características principais e correlaciona-las com sua potencialidade na adsorção dos poluentes-alvo, como a microcistina. Além disso, a utilização de técnicas de tratamento biológico vem ganhando destaque nos últimos anos com o emprego de uma comunidade diversificada de microrganismos para remoção de compostos recalcitrantes da água para consumo humano, compostos estes não eficientemente removidos por meio das técnicas físico-químicas tradicionais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O principal objetivo desta pesquisa foi estudar, em laboratório, a remoção de microcistina pelos fenômenos de adsorção com carvões ativados granulares (CAG) e de degradação biológica por diferentes gêneros de bactérias.

2.2 Objetivos específicos

Para atingir o objetivo geral, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

i. Determinar a condição mais favorável de cultivo de *Microcystis aeruginosa* para produção e extração de microcistina;

ii. Caracterizar diferentes CAGs comerciais, de acordo com normas e procedimentos padrões;

iii. Realizar testes de adsorção da microcistina com os diferentes carvões ativados;

iv. Pré-dimensionar filtros em escala de laboratório de acordo com o melhor resultado de adsorção obtido;

v. Realizar testes de biodegradação da microcistina como possível alternativa para sua remoção.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cianobactérias e cianotoxinas

As atividades antrópicas contribuem para a aceleração do processo de eutrofização dos sistemas aquáticos, incluindo os mananciais utilizados para abastecimento, o que pode gerar um aumento na densidade de cianobactérias. A eutrofização resulta de um aporte excessivo de nutrientes na água, o que ocasiona mudanças no ambiente, como o decréscimo no rendimento pesqueiro, a diminuição da qualidade da água, o comprometimento dos seus diversos usos e o aumento da produção de algas e de outras comunidades aquáticas, como as cianobactérias. A presença exacerbada de tais organismos fotossintetizantes é preocupante, pois pode conferir sabor e odor desagradáveis à água, entre outros inconvenientes. As florações de cianobactérias são favorecidas em ambientes com temperatura entre 15 e 30°C, níveis adequados de nutrientes inorgânicos (tais como fósforo e nitrogênio) e pH entre 6,0 e 9,0 (WHO, 1998), ou seja, condições comumente encontradas no ambiente.

Gkelis e Zaoutsos (2014) realizaram um estudo no lago Pamvotis altamente eutrofizado na Grécia e, ao combinarem seus resultados com dados de um período mais longo (25 anos), observaram que a temperatura da água e a carga de nutrientes influenciaram a dominância de cianobactérias neste lago e possivelmente em outros lagos. Com isso, concluíram que as mudanças antropogênicas e climáticas que estão ocorrendo podem contribuir para agravar ainda mais a situação no futuro, uma vez que algumas cianobactérias podem produzir as cianotoxinas, potencialmente perigosas para seres humanos e animais (PANTELIĆ, 2013), como algumas cepas dos gêneros *Microcystis*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaena*, entre outras (Tabela 1) (BERNARD, 2014).

Tabela 1 - Gêneros de cianobactérias produtoras de cianotoxinas e seus efeitos em humanos pós-contaminação

Gêneros	Toxinas	Efeitos
Anabaena, *Anabaenopsis,* ***Aphanizomenon*** *(incluindo Cuspidothrix), Cylindrospermum, Hydrocoleum,* ***Lyngbya****, Microcystis,* ***Oscillatoria****,* ***Phormidium****, Planktothrix, Raphidiopsis, Woronichinia*	Anatoxinas	Anatoxina-a: Paralisia progressiva, forte respiração abdominal, cianose, convulsão, morte por asfixia. Anatoxina-a(s): Paralisia progressiva, fraqueza muscular, diminuição da frequência respiratória e convulsões. Salivação intensa. Morte ocorre por falência respiratória.
Anabaena, *Anabaenopsis, Annamia,* ***Aphanizomenon****, Arthrospira, Calothrix, Fischerella, Geitlerinema, Gomphosphaeria, Hapalosiphon, Leptolyngbya, Limnothrix, Lyngbya, Merismopedia,* ***Microcystis****, Nostoc, Oscillatoria, Phormidium,* ***Planktothrix****, Plectonema, Pseudanabaena, Radiocystis, Spirulina, Synechococcus, Woronichinia*	Microcistinas	Prostração, pilo ereção, anorexia, vômitos, dor abdominal, diarreia, choque hipovolêmico e hemorragia intra-hepática.
Anabaena*,* ***Aphanizomenon*** *(incluindo Cuspidothrix),* ***Cylindrospermopsis****, Liminothrix,* ***Lyngbya****,* ***Phormidium****/Geitlerinema, Raphidiopsis, Scytonema*	Saxitoxinas	Paralisia progressiva dos músculos, diminuição dos movimentos, exagerada respiração abdominal, cianose, convulsão, parada respiratória e morte.
Aphanizomenon*,* ***Cylindrospermopsis****, Lyngbya, Oscillatoria, Raphidiopsis, Umezakia*	Cilindrospermopsinas	Desestruturação e necrose do fígado, danos em células renais, cardíacas, pulmonares e também da mucosa gástrica.
Nodularia	Nodularinas	Prostração, pilo ereção, anorexia, vômitos, dor abdominal, diarréia, choque hipovolêmico e

		hemorragia intra-hepática.
Trichodesmium	Palitoxina	*
Lyngbya	Lyngbyatoxina	Edema pulmonar, aumento da secreção gástrica, irritação gastrointestinal e promoção de tumor dérmico.
Limnothrix	Limnothrixtoxina	*
Lyngbya	Debromoaplysiatoxina	Irritação gastrointestinal.
Lyngbya, Phormidium, Schizothrix, Symploca	Aplysiatoxina	Irritação gastrointestinal.
Hydrocoleum, Trichodesmium	Ciguatoxina	*

*** Não foram encontradas informações na literatura sobre seus efeitos**

OBS: Em negrito, estão os gêneros mais frequentemente observados como produtores da cianotoxina correspondente

Fontes: Bernard (2014); Bortoli e Pinto (2015)

A liberação das cianotoxinas pelas cianobactérias ocorre principalmente durante o processo de senescência, morte e lise das células, mas ainda não há um consenso sobre todos os mecanismos envolvidos na disponibilização desses compostos para o ambiente aquático. De acordo com Morais (2012), há indícios de que a intensidade luminosa, a temperatura, os metais traço e os nutrientes influenciem sua produção. Este mesmo autor ainda cita que são realizados testes em laboratório que mimetizam as condições do ambiente a fim de se avaliar a produção das toxinas e que, embora os resultados ainda não sejam conclusivos, a maioria indica que quanto maior a concentração de fósforo, maior a produção de cianotoxinas. Isto contraria os resultados apresentados por Wilhelm et al. (2011), que, embora tenham encontrado forte relação entre a abundância de cianobactérias e o aumento da disponibilidade de nitrogênio e de fósforo, não observaram correlação significativa com a produção de toxinas. Além desses fatores, Calijuri, Alves e Santos (2006) enumeraram algumas hipóteses de produção que estariam vinculadas à proteção da espécie, à competição por recursos ou à busca por condições mais favoráveis de crescimento.

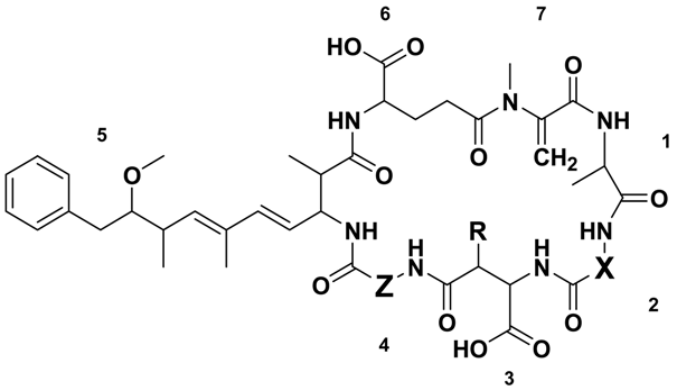
Preece, Moore e Hardy (2015) estudaram quatro lagos eutrofizados na região de Puget Sound, Washington, Estados Unidos, sendo observada uma transferência de microcistina da água doce dos lagos para a água marinha, além da sua bioacumulação em mexilhões. As concentrações máximas de toxinas nos lagos, nas águas marinhas e nos mexilhões foram de 2.700 $\mu g.L^{-1}$, 0,34 $\mu g.L^{-1}$ e 6,5 $\mu g.kg^{-1}$, respectivamente, indicando uma fonte de preocupação não apenas com o meio ambiente, como também com a segurança alimentar. Gkelis e Zaoutsos (2014) avaliaram a ocorrência de cianobactérias potencialmente tóxicas em seis lagos e reservatórios na Grécia, sendo encontradas espécies em todos eles, representando mais de 70% da comunidade fitoplanctônica. Além disso, foi relatada a presença de microcistina, cilindrospermopsina e saxitoxina, sendo que em metade das amostras, mais de uma cianotoxina foi detectada.

As cianotoxinas podem ser classificadas, segundo seus efeitos tóxicos, em neurotoxinas (e.g., anatoxina-a, anatoxina-a(s) e saxitoxina), hepatotoxinas (e.g., microcistina e nodularina) e dermatotoxinas (BORTOLI; PINTO, 2015). De acordo com Carmichael (1994), as neurotoxinas atuam nos neurônios. Em condições fisiológicas normais, a acetilcolina se liga aos seus receptores induzindo a contração muscular, enquanto que a acetilcolinesterase degrada a acetilcolina prevenindo uma superestimulação das células musculares. No caso da anatoxina-a ou da anatoxina-a(s), por exemplo, a toxina se liga irreversivelmente aos receptores no lugar da acetilcolina, mas não é capaz de ser degradada

pela acetilcolinesterase, provocando uma superestimulação muscular, fadiga e até paralisia, que pode ser fatal.

Segundo Calijuri, Alves e Santos (2006), o fígado normalmente concentra as toxinas na tentativa de degradá-las. No caso das hepatotoxinas, Yoo et al. (1995) afirmaram que o fígado concentra as toxinas por meio de mecanismos de transportes dos ácidos biliares, ocorrendo alterações no citoesqueleto das células do fígado e mudanças nas formas dessas células. Além disso, ocorre destruição das células do parênquima e sinusóides do fígado, levando dentro de minutos ou horas a uma hemorragia intra-hepática letal ou insuficiência hepática dentro de várias horas ou alguns dias. Já as dermatotoxinas não são letais, entretanto, são formadas por compostos bioativos capazes de causar irritação na pele caso ocorra contato com essa toxina (SILVA, SOUZA e DUTRA, 2014).

Estruturalmente, as cianotoxinas podem ser classificadas em três principais grupos: peptídeos cíclicos, alcaloides e lipopolissacarídeos (GOMES; OLIVEIRA; AZEVEDO, 2009). A microcistina, que é um peptídeo cíclico hepatotóxico (Figura 1), consiste na cianotoxina mais produzida pelas cianobactérias, sendo que a microcistina-LR é variante mais comum e tóxica (SHARMA et al., 2012) e, portanto, uma das mais estudadas (SORLINI; GIALDINI; COLLIVIGNARELLI, 2013).



Variante	[X]	[Z]
– **RR**	Arginina	Arginina
– **YR**	Tirosina	Arginina
– **LR**	Leucina	Arginina
– **LA**	Leucina	Alanina

Figura 1 - Estrutura geral da microcistina. Nas posições de 1 a 7, podem ser encontrados diferentes aminoácidos. Exemplos de variantes da microcistina na tabela, de acordo com o aminoácido que é encontrado nas posições indicadas. Fonte: Cassini, Antunes e Keller (2013) e de Puddick et al. (2014)

As posições 2 e 4 na estrutura são responsáveis pela nomenclatura das diferentes variantes, dependendo de cada resíduo de L-aminoácido que é encontrado (CARMICHAEL, 1994). Atualmente, existem pelo menos cerca de 100 variações de microcistina que já foram caracterizadas (PUDDICK et al., 2014).

A estrutura cíclica da microcistina garante resistência e estabilidade a hidrólises químicas, quando em pH próximo ao neutro e, além disso, mantém sua toxicidade mesmo após a fervura (CHORUS; BARTRAM, 1999). A microcistina é uma hepatotoxina inibidora das fosfatases PP1 e PP2A (WIEGAND; PFLUGMACHER, 2005), podendo causar proliferação descontrolada das células e desenvolvimento de câncer (DZIGA et al., 2013), ocorrência de colapso nos suprimentos energéticos (SANCHES et al., 2012) ou afetar os componentes estruturais das células do fígado. Isto porque pode ocorrer deformação dos hepatócitos, desestruturação do citoesqueleto e consequente acumulação de sangue, acarretando em choque circulatório (CARMICHAEL, 1994).

Merel et al. (2013) citaram três possíveis formas de contaminação humana pelas cianotoxinas: pela ingestão de água proveniente de um reservatório contaminado; pela ingestão acidental, inalação ou contato com a pele durante atividades recreacionais em ambientes eutrofizados; ou por meio da ingestão de alimentos que contêm a toxina bioacumulada.

Alguns estudos também reportaram efeitos da presença de microcistina em animais, como o levantamento bibliográfico de sintomas de contaminação por microcistina em diversos animais realizado por Chen et al. (2016), bem como no trabalho de Sedan et al. (2015). Neste último, foram testadas diferentes doses orais de microcisitina-LR em ratos (50 e 100 μg de MC-LR.kg^{-1} de peso corporal), administradas a cada 48 h durante um mês, a fim de verificar possíveis danos ao fígado e ao intestino. O fígado consiste no principal alvo da microcistina-LR e o intestino está relacionado diretamente com a absorção da toxina. Nas duas dosagens testadas, os resultados indicaram a presença da toxina em ambos os órgãos, bem como foram verificados danos nos mesmos (detecção de esteatose hepática e de redução nos linfócitos intra-epiteliais).

Na pesquisa de Li et al. (2016), ratos foram expostos a diferentes concentrações de microcistina-LR em sua água de beber (1, 5, 10, 20 e 40 μg.L^{-1}) e mantidos ao longo de 12 meses, para posterior estudo. Os resultados demonstraram que nesta exposição crônica, o pulmão foi o órgão mais vulnerável, além de danos à integridade do DNA mitocondrial.

Lévesque et al. (2014) realizaram um estudo com os moradores que residem no entorno de três lagos no Canadá que possuem histórico de floração de cianobactérias. A ideia foi investigar se existia alguma relação entre a incidência de sintomas nessas pessoas e a exposição diária às cianobactérias e cianotoxinas. Os resultados indicaram que o contato recreacional esteve relacionado apenas a sintomas gastrointestinais e, nas pessoas que

receberam água de abastecimento de uma fonte contaminada, foi observado um aumento nas dores musculares, gastrointestinais, e sintomas na pele e ouvido.

Essas pesquisas com animais e seres humanos demonstram as possibilidades de contaminação e o modo que as cianotoxinas podem prejudicar o sistema imunológico de seres vivos. Diante dessas e de outras possíveis consequências ainda não estudadas ocasionadas por contaminação com cianotoxinas, torna-se essencial o tratamento da água de abastecimento antes de sua distribuição, de modo a garantir a saúde da população. Com isso, observa-se também a necessidade de pesquisas que visem à remoção e o tratamento desses compostos de maneira eficaz e segura.

3.2 Tratamento avançado de águas de abastecimento

As Estações de Tratamento de Água (ETA) convencionais são compostas basicamente pelas etapas de coagulação, floculação, sedimentação, filtração e desinfecção (BRASIL, 2004), sendo capazes de remover parte significativa dos organismos, substâncias e outros materiais presentes na água, como areia, matéria orgânica, substâncias húmicas e microrganismos patogênicos. Os poluentes emergentes, como os resíduos farmacêuticos e produtos de higiene, podem ter efeitos nocivos na saúde humana e no ambiente (JIANG; ZHOU; SHARMA, 2013), tendo em vista que não são removidos, em geral, ao longo das etapas de tratamento mais comumente empregadas nas ETAs. As cianotoxinas também pertencem a esse grupo de poluentes e necessitam de técnicas avançadas de tratamento para sua remoção. Elas podem se apresentar em ETAs de duas formas: toxinas intracelulares (ligadas dentro das células das cianobactérias) e extracelulares (dissolvidas) (JURCZAK et al., 2005).

Pouco se sabe a respeito do comportamento das cianotoxinas no meio ambiente, embora estudos indiquem um potencial de acumulação em sedimentos de lagos (MAGHSOUDI et al., 2015). No entanto, existem estudos a respeito de diferentes técnicas para a remoção das cianobactérias ou das cianotoxinas das águas de abastecimento. Uma delas consiste na remoção de cianotoxinas por meio de mecanismos químicos, com o uso de agentes oxidantes (por exemplo, cloro). O estudo de Ma et al. (2012) relatou a resposta de células de *Microcystis aeruginosa* à presença de cloro em diferentes concentrações e tempo de contato prolongado, com o objetivo de analisar a liberação de toxinas e sua respectiva

degradação. A concentração inicial de toxinas intracelulares foi de 105 $\mu g.L^{-1}$ e as extracelulares estavam abaixo do limite de detecção. Foi constatado que tanto a liberação quanto a degradação dependeram do pH, tempo de contato e dose de cloro aplicada. Inicialmente, foi observada degradação das toxinas intracelulares em todas as doses de cloro testadas. Entretanto, os resultados indicaram que a cloração contribuiu significativamente para a liberação de toxinas extracelulares e de substâncias intracelulares, como toxinas e clorofila-a. A degradação dessas toxinas extracelulares só foi observada a partir dos tempos de contato correspondentes à liberação máxima dessas toxinas (tempos de contato de 60, 30 e 1 minutos em doses de cloro de 1,2, 1,6 e 2,0 $mg.L^{-1}$ em, respectivamente).

O trabalho de Rodríguez et al. (2007) comparou a remoção de anatoxina-a, microcistina-LR e cilindrospermopsina a partir de diferentes concentrações de agentes oxidantes (ozônio, permanganato e cloro). Houve variação de remoção das toxinas de acordo com os agentes químicos utilizados. A remoção de 95% foi possível a partir de variadas concentrações de ozônio da ordem de 0,25, 0,38 e 0,75 $mg.L^{-1}$ para o tratamento de microcistina-LR, cilindrospermopsina e anatoxina-a, respectivamente. O uso de 1,5 $mg.L^{-1}$ de permanganato removeu apenas 10% de cilindrospermopsina, ao passo que essa mesma concentração foi capaz de remover completamente a microcistina-LR. Aproximadamente 0,5 $mg.L^{-1}$ foi suficiente para remoção da anatoxina-a. O tratamento com cloro foi 100% eficaz na remoção de microcistina-LR e de cilindrospermopsina para dosagens de 3,0 e 1,5 $mg.L^{-1}$ respectivamente, não apresentando resultados satisfatórios para a anatoxina-a (remoção de 15% a uma concentração de 3,0 $mg.L^{-1}$). As conclusões principais deste estudo foram os tratamentos mais adequados para cada caso: permanganato para remoção de anatoxina-a e microcistina-LR; cloro para oxidação de cilindrospermopsina e microcistina-LR; e ozônio para todas as toxinas avaliadas.

Alguns pesquisadores analisaram a remoção física, como a técnica de microfiltração estudada por Sorlini, Gialdini e Collivignarelli (2013), que demonstraram a eficácia dessa tecnologia para a remoção de cianobactérias (cerca de 98% de eficiência) e de algas (98 a 99%). A eficiência de remoção de células das cianobactérias nas diferentes operações unitárias em uma ETA depende das espécies-alvo (Zamyadi et al., 2013), principalmente de sua morfologia (e.g, colonial, filamentosa ou unicelular). No entanto, mesmo que as cianobactérias sejam removidas, pode ocorrer liberação e transpasse das cianotoxinas na forma dissolvida.

Jurczak et al. (2005) estudaram a remoção de microcistina (variantes –LR, –RR e –YR) em uma ETA que capta água do reservatório de Sulejon (Polônia) entre 2002 e 2003. As

análises de toxina foram feitas a cada etapa do tratamento, que são: pré-oxidação, coagulação, filtro de areia, ozonização e cloração. A maior concentração de microcistina registrada na água afluente à ETA foi de 6,7 $\mu g.L^{-1}$, que foi associada à ocorrência de *bloom* no reservatório e lise das células. Dentre as etapas, a mais efetiva correspondeu à filtração, em que houve uma queda de 75,4% em relação à etapa anterior. Foi observado que houve completa remoção da microcistina ao final da ETA, indicando que esses processos foram suficientes para as concentrações afluentes.

A adsorção de cianotoxinas a partir de filtros com carvão ativado também tem demonstrado eficiência nos estudos realizados. Guerra et al. (2015) avaliaram a remoção de toxina simulando uma ETA incluindo as etapas de coagulação, floculação e sedimentação, seguida por filtro de areia. Ao final destas etapas foram adicionados filtros de CAG. Os dois CAGs estudados eram de casca de coco, diferenciados com relação à granulometria (14 x 40 mesh e 8 x 30 mesh). A água utilizada era do açude Acaunã (Itatuba, PB) e concentração de MC-LR inicial foi de 20 $\mu g,L^{-1}$. Os resultados indicaram que ao final do filtro de areia, foi observada remoção significativa de cor e turbidez, sendo pouco eficiente na remoção de microcistina. Isto poque, após a sedimentação, houve um decréscimo de apenas 13 a 14 % na concentração de toxina e o filtro de areia foi responsável pela remoção de 6 a 7%. Portanto, a água afluente aos filtros de CAGs estava com concentração de 18 $\mu g.L^{-1}$, indicando a necessidade de etapas complementares para remoção da microcistina. O uso de filtro de CAG demonstrou eficiência, uma vez que, em ambos os filtros, a remoção atingiu entre 75 e 85%.

3.2.1 Adsorção com CAG

O carvão ativado pode se encontrar na forma de CAG (granular) ou CAP (também chamado de pulverizado) com variações em relação à sua porosidade, material de origem e forma de ativação, alterando, portanto, a sua capacidade de adsorção.

O fenômeno de adsorção consiste em uma acumulação espontânea de um fluido ou um gás na superfície de um sólido devido às suas forças atrativas (VERAS, 2006), sendo que o adsorvente é o sólido sobre o qual ocorre a adsorção e o adsorvato representa a espécie adsorvida. Reali, Paz e Daniel (2013) afirmaram que a capacidade de adsorção está relacionada a diversos fatores como tamanho e estrutura dos poros, reatividade dos diferentes componentes do material, características do adsorvato e da água. Buchanan, Roddick e Poter

(2008) também relacionaram sua capacidade de adsorção devido à elevada superfície em relação ao seu volume. Dessa maneira, diferentes tamanhos de poros podem ser capazes de adsorver variadas moléculas, resultando em vantagens e desvantagens com relação ao uso de CAG ou CAP (Tabela 2).

Tabela 2 - Vantagens e desvantagens entre os usos dos carvões ativados granular (CAG) e em pó (CAP)

	CAG	**CAP**
Vantagens	Menor uso de carvão por volume de água	Baixo custo de implantação
	Recomendável na presença contínua de microcontaminantes	Possibilidade de alteração na dosagem e emprego sazonal
	Menor geração de subprodutos na desinfecção pela adsorção da matéria orgânica natural	Facilidade operacional no controle de contaminação ocasional por contaminantes orgânicos
Desvantagens	Pode ocorrer dessorção dos compostos orgânicos adsorvidos – e, ocasionalmente, o poluente efluente ser maior que o afluente	Eventuais superdosagens quando aplicado na captação ou na unidade de mistura rápida
		Maior quantidade de resíduos gerados na ETA
	Maior custo de implantação do sistema	Não reutilizável
		Menor desempenho

Fonte: AWWA (2012); Reali, Paz e Daniel (2013)

Com relação à diferença de usos, Reali, Paz e Daniel (2013) reforçaram que o CAG é recomendado quando há presença contínua de contaminantes na água a ser tratada (eg., cianotoxinas) e por meio de leitos fixos (filtros), enquanto que o CAP é utilizado em eventos esporádicos nas ETAs, ou seja, em situações emergenciais (e.g., contaminação acidental ou odor e gosto na água), em que o CAP é adicionado em forma de suspensão na água a ser tratada.

O carvão ativado pode ser obtido a partir de diversas matérias primas, tais como casca de coco, madeira, osso de animais, plástico, pneus, entre outras. Para isso, a matéria-prima de origem é submetida aos processos de carbonização e ativação a fim de criar uma superfície capaz de adsorver contaminantes (BRANDÃO; SILVA, 2006). Os autores ainda afirmaram

que forças químicas são responsáveis por manter os adsorvatos na superfície, tais como: pontes de hidrogênio, interações dipolo-dipolo e forças de van der Walls, sendo que o processo de adsorção de moléculas pelo material adsorvente pode ser descrito conforme a Equação 1, em que A é o adsorvato; B é o adsorvente; A.B é o adsorvato adsorvido ao adsorvente.

$$A + B \rightleftarrows A.B \qquad \text{(Equação 1)}$$

As moléculas do adsorvato vão se acumulando na superfície do carvão ativado até que a adsorção (→) seja igual à dessorção (←), alcançando-se o equilíbrio. O fenômeno de dessorção pode ocorrer devido a alterações na concentração de outros compostos ou pela diminuição na concentração do adsorvato no afluente.

Existem diversos fatores intervenientes na cinética de adsorção que são de suma importância para o sucesso da remoção de microcontaminantes (ZAGO, 2010), como as cianotoxinas. Masschelein (1992) cita a temperatura e o pH como exemplos destes, sendo que a temperatura é capaz de afetar a concentração de equilíbrio e a taxa de adsorção, e faixas maiores de pH normalmente prejudicam a adsorção. Pendleton, Schumann e Wong (2001) constataram que em faixas menores de pH houve maior adsorção de microcistina, levantando algumas hipóteses para justificar essa ocorrência. Por exemplo, ao diminuir o pH, a solubilidade da molécula de microcistina também diminui, e portanto, espera-se maior afinidade com a superfície do carvão. Gautam et al. (2015) estudaram a adsorção de tartrazina com carvão ativado de origem vegetal, e também verificaram que quanto menor o pH, maior foi a remoção da substância estudada e, quanto maior a temperatura, mais favorecida foi a adsorção. A faixa de pH estudada foi de 2 a 10 e as temperaturas analisadas foram de 30, 40 e 50°C.

Outro fator que influencia o processo de adsorção é o formato dos poros do sólido adsorvente. Por exemplo, os poros em formato cônico são eficientes na adsorção de partículas pequenas e grandes, enquanto que poros no formato cilíndrico podem ser obstruídos por uma molécula grande ou uma partícula coloidal, logo na entrada do poro, reduzindo sua eficiência (MASSCHELEIN, 1992). O carvão de origem vegetal (e.g., casca de coco) caracteriza-se por poros de estrutura cilíndrica e, o mineral, por estrutura cônica (OLIVEIRA; AZEVEDO, 2004). Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, 1985), os poros podem ser classificados de acordo com seu tamanho, conforme a Tabela 3.

Tabela 3 - Classificação dos poros de carvão ativado de acordo com seus tamanhos, sendo eles microporos, mesoporos ou macroporos

Classificação	Diâmetro (nm)
Microporos	< 2,0
Mesoporos	2,0 a 50,0
Macroporos	> 50,0

Fonte: IUPAC (1985)

A caracterização do carvão ativado inclui parâmetros como: área superficial, distribuição dos tamanhos dos poros, número de iodo, índice de azul de metileno, teor de umidade e de cinzas, entre outros.

A superfície específica consiste na área superficial total por unidade de massa do adsorvente. De acordo com Muranaka (2010), seu cálculo considera toda a superfície do material, incluindo as superfícies internas (que considera as paredes dos microporos) e externas (inclui a superfície não porosa e as paredes dos meso e macroporos) (Figura 2). A superfície interna apresenta energia de adsorção duas vezes maior do que a superfície externa, devido à menor distância entre as paredes dos microporos.

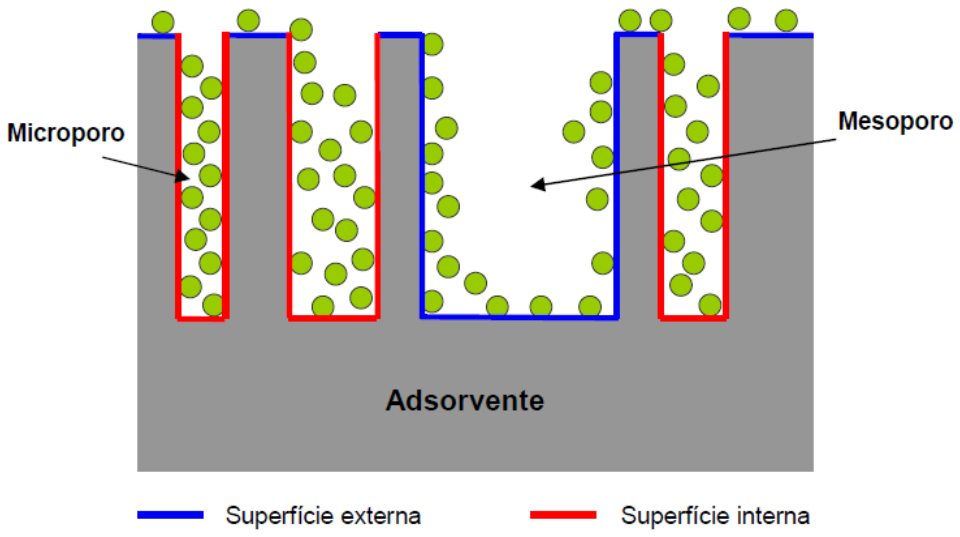


Figura 2 – Representação esquemática da superfície específica de um adsorvente, que é composto por superfícies internas e externas. Fonte: Muranaka (2010)

Uma das formas de se expressar a superfície específica do carvão ativado, em $m^2.g^{-1}$, é por meio da técnica BET, calculada de acordo com a equação sugerida por Brunauer, Emmett e Teller (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938). A isoterma BET pode ser obtida por meio da adsorção do gás nitrogênio (N_2) a 77 K (BRANDÃO; SILVA, 2006), medindo-se as

características de saturação do carvão com este único composto gasoso (MASSCHELEIN, 1992), resultando em dados como a área superficial, volume e distribuição dos tamanhos dos poros.

O estudo das isotermas auxilia no entendimento dos complexos mecanismos de interação entre o adsorvato e o adsorvente (GAUTAM et al., 2015). Segundo as recomendações da IUPAC (1985), a maioria das isotermas obtidas pela adsorção física de gases se apresenta de acordo com um dos seis tipos representados de acordo com a Figura 3, em que a abscissa (P/P_0) corresponde à pressão relativa, ou seja, a razão entre a pressão do gás e a pressão de vapor do gás utilizado, enquanto a ordenada reflete o volume de gás que é adsorvido pelo material adsorvente.

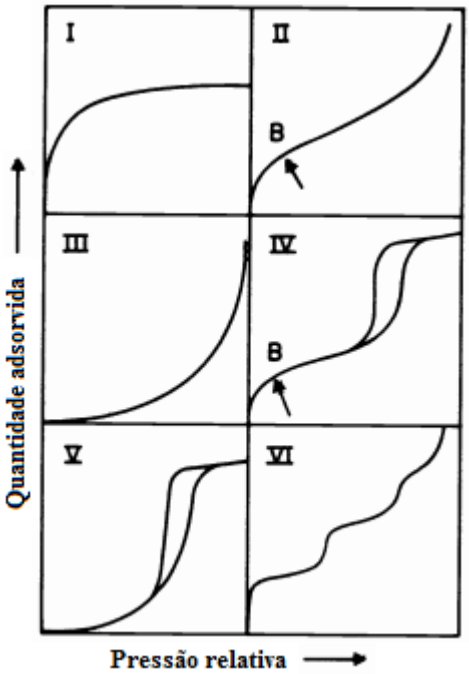


Figura 3 - Tipos de isotermas que podem ser obtidas a partir da adsorção física de gases, em que a abscissa (P/P_0) corresponde à razão entre a pressão do gás e a pressão de vapor do gás utilizado, enquanto a ordenada reflete o volume de gás que é adsorvido pelo material adsorvente. Fonte: IUPAC (1985)

O Tipo I de isoterma é côncavo em relação ao eixo das abscissas e tende a um valor constante. É uma isoterma comumente encontrada e característica de sólidos microporosos e de área superficial menor. A isoterma do Tipo II corresponde a forma normalmente obtida em adsorvente macroporoso ou não-poroso, ocorrendo adsorção em mono e multicamadas, sendo que o ponto B indica a fase em que a monocamada se completou e ocorreu o início da adsorção em multicamada.

A isoterma Tipo III não é comum e, por se apresentar convexa em relação a todo o eixo das abscissas, não apresenta um ponto B. O Tipo IV é mais comum para adsorventes com mesoporos e ocorre quando as curvas de adsorção e dessorção não coincidem, ocorrendo o fenômeno chamado histerese.

O Tipo V é incomum de ocorrer e está relacionado ao Tipo III, uma vez que as interações entre adsorvato e adsorvente são fracas. Por fim, o Tipo VI ocorre em superfícies uniformes não-porosas, e é constituído por degraus, em que cada degrau representa uma camada adsorvida.

A histerese ocorre quando as curvas de adsorção e dessorção não coincidem, sendo que há quatro classificações baseadas em suas formas de acordo com a IUPAC (Figura 4).

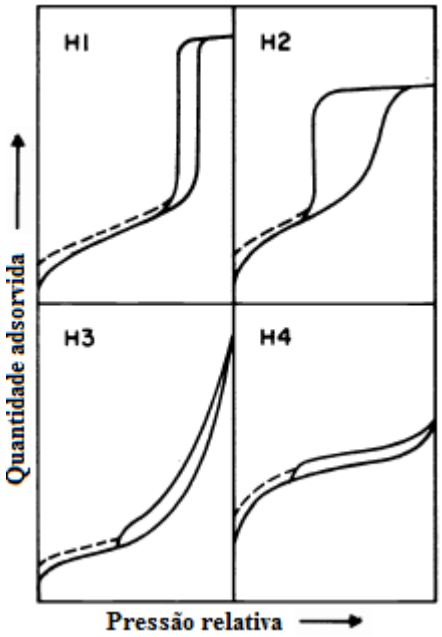


Figura 4 - Tipos de histereses que podem ser obtidas a partir da adsorção física de gases, em que a abscissa (P/P_0) corresponde à razão entre a pressão do gás e a pressão de vapor do gás utilizado, enquanto a ordenada reflete o volume de gás que é adsorvido pelo material adsorvente. Fonte: IUPAC (1985)

A ocorrência de histerese no trecho que corresponde a múltiplas camadas é normalmente associada à condensação capilar em estruturas com mesoporos. Dois tipos mais extremos podem ser observados nos casos H1 e H4. Em H1, há elevada absorção de gás (eixo das ordenadas) visto que é caracterizada por dois traços verticais e praticamente paralelos, enquanto que em H4, eles permanecem também paralelos, mas próximos a horizontal, evidenciando uma variação na pressão relativa (eixo das abscissas). Os tipos H2 e H3 podem ser considerados intermediários desses dois extremos.

Existem algumas relações entre o tipo de histerese e a estrutura dos poros. O tipo H1 é normalmente associado à baixa variação na distribuição dos poros. A IUPAC afirma que, embora seja característico de muitos adsorventes porosos, na histerese do tipo H2 não é possível definir uma distribuição dos formatos e tamanhos dos poros. O tipo H3, que não apresenta qualquer limitação na adsorção a altas pressões relativas, está relacionado a poros com formato de fendas, assim como o tipo H4.

Além das análises citadas que incluem adsorção na fase gasosa, também é possível caracterizar a distribuição dos poros no carvão por meio de análises que envolvam a adsorção em fase líquida de alguns adsorvatos específicos, como é o caso do azul de metileno e do iodo (JAGUARIBE et al., 2005).

O Índice de Azul de Metileno (IAM) indica a mesoporosidade do carvão. Isto porque, para ser adsorvida, a molécula de azul de metileno requer poros com abertura de no mínimo 1,3 nm, ainda que apresente diâmetro médio de 0,8 nm (BARTON, 1987). Este índice consiste na massa de azul de metileno que é adsorvido quando a concentração residual é de 0,24 $mg.L^{-1}$ (KURODA, 2006). Por outro lado, o número de iodo (NI) é definido como a massa de iodo adsorvida, em mg por g de carvão ativado, e pode ser um indicativo da microporosidade do carvão (SAKA, 2012). Müller, Raya-Rodriguez e Cybis (2009) observaram uma correlação significativa entre esse índice e a microporosidade dos CAPs analisados (R^2 = 0,96). A molécula de iodo possui dimensão aproximada de 1 nm e é adsorvida, portanto, pelos microporos (LIMA, 2014). No Brasil, a norma EB-2133 (ABNT, 1991) sugere valores de referência para alguns parâmetros, recomendando para o número de iodo um limite mínimo de 600 $mg.g^{-1}$ para carvões a serem utilizados no tratamento de água.

Fatores como a massa específica aparente e teor de cinzas também são importantes para a caracterização do carvão ativado. A massa específica aparente é utilizada para se estimar a massa de carvão necessária para preencher o volume de um leito adsortivo (LIMA, 2014), sendo que AWWA (2012) recomenda que seu valor seja superior a 0,20 $g.cm^{-3}$ enquanto que a ABNT (1991) sugere um valor para massa específica aparente entre 0,20 e 0,75 $g.cm^{-3}$. O teor de cinzas, que é afetado pelo seu processo de fabricação e pela origem da matéria prima (LIMA, 2014), indica a pureza do carvão (BRANDÃO; SILVA, 2006), sendo recomendado um teor máximo de 8% de acordo com AWWA (2012). Além desses fatores, devem ser considerados outros, como pH e teor de umidade. O pH pode fornecer dados dos agrupamentos químicos ligados à superfície do carvão que podem influenciar na adsorção, por serem de natureza ácida, básica ou neutra (MARSOLLA, 2015). Com relação ao teor de umidade, Marsolla (2015) afirmou que a água presente no carvão ativado é resultante da

combinação entre a umidade superficial e a inerente ao produto, sendo que AWWA (2012) e ABNT (1991) recomendam um valor de até 8%.

Ainda que esses parâmetros sejam importantes para a caracterização do carvão, a elaboração de uma isoterma para a avaliação da remoção de determinado composto consiste no melhor indicador de potencialidade para o uso de um determinado tipo de carvão (DI BERNARDO; DANTAS, 2005). As isotermas são representadas graficamente pela relação entre a concentração de equilíbrio do adsorvato em solução (C_e) e a massa de adsorvato por unidade de adsorvente (q_e) (MCCABE, SMITH e HARRIOTT, 1993; GUERRA, 2012). Após o equilíbrio da solução, é possível determinar a concentração final do adsorvato por meio da Equação 2:

$$q_e = \frac{V}{M} \cdot (C_0 - C_e) \qquad \text{(Equação 2)}$$

Em que:

q_e: concentração de equilíbrio da fase adsorvente (mg adsorvato/g adsorvente);

C_0: concentração inicial do adsorvato em solução (mg adsorvato/L solução);

C_e: concentração de equilíbrio do adsorvato em solução (mg adsorvato/L solução);

V: volume da solução (L);

M: massa do adsorvente (g).

As isotermas podem ser descritas por muitos modelos matemáticos, mas os mais comuns são os de Langmuir e o de Freundlich (MÜLLER, 2008). O modelo de Langmuir assume que a superfície do adsorvente é homogênea (MARSOLLA, 2015) e, portanto, não descreve os dados de adsorção tão precisamente (GUERRA, 2012). O modelo é representado conforme a Equação 3 e na forma linearizada de acordo com a Equação 4:

$$q_e = \frac{q_{max} . b . C_e}{1 + b . C_e} \qquad \text{(Equação 3)}$$

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_{max} . b . C_e} + \frac{1}{q_{max}} \qquad \text{(Equação 4)}$$

Em que:

q_e: massa de adsorvato por unidade de adsorvente (mg.g^{-1} ou mol.g^{-1});

C_e: concentração do adsorvato no equilíbrio (mg.L^{-1} ou mol.L^{-1});

b, q_{max}: coeficientes a serem determinados experimentalmente.

Guerra (2012) afirma que a constante b está relacionada à energia de adsorção, enquanto que q_{max}, à concentração de uma camada de recobrimento do adsorvente pelo adsorvato. Existe também outra constante, denominada fator de separação ou parâmetro de equilíbrio (R_L), que é um indicador adimensional do processo de adsorção e que é definida conforme a Equação 5:

$$R_L = \frac{1}{1 + b.C_0} \qquad \text{(Equação 5)}$$

Em que:

C_0: concentração inicial do adsorvato (mg.L^{-1});

b: constante de Langmuir (L.mg^{-1}).

O valor da constante R_L indica se o tipo de isoterma é desfavorável ($R_L > 1$), linear ($R_L = 1$), favorável ($0 < R_L < 1$) ou irreversível ($R_L = 0$) (HALL et al., 1966; SALMAN; HAMEED, 2010; KONER; PAL; ADAK, 2012).

A equação de Freundlich consiste em um modelo empírico que descreve sistemas heterogêneos (HAMEED et al., 2009), sendo utilizada para ajustar dados experimentais de adsorção de solutos em superfícies sólidas (ZAGO, 2010). Devido à sua proximidade de correlação com os dados experimentais, consiste no modelo mais utilizado na descrição dos processos de adsorção para água de abastecimento (COELHO; VAZZOLER; LEAL, 2012). O modelo é representado conforme a Equação 6 e na forma linearizada de acordo com a Equação 7:

$$q_e = k\,.\,C_e^{\frac{1}{n}} \qquad \text{(Equação 6)}$$

$$\log q_e = \frac{1}{n}\,.\log C_e + \log k \qquad \text{(Equação 7)}$$

Em que:

q_e: massa de adsorvato por unidade de adsorvente ($mg.g^{-1}$ ou $mol.g^{-1}$);

C_e: concentração do adsorvato no equilíbrio ($mg.L^{-1}$ ou $mol.L^{-1}$);

k, *n*: coeficientes a serem determinados experimentalmente.

A constante *k* está em função da capacidade de adsorção do adsorvato pelo adsorvente (GUERRA, 2012), portanto, quanto maior seu valor, maior sua capacidade de adsorção (PIZA, 2008), ao passo que o coeficiente *n* está relacionado com a força de ligação da adsorção (GUERRA, 2012), ou seja, indica a existência de afinidade entre adsorvato e adsorvente (PIZA, 2008).

3.2.2 Adsorção de cianotoxinas com carvão ativado

Devido às variadas características que o carvão ativado pode apresentar, algumas pesquisas avaliaram o uso de carvão ativado para remoção de cianotoxinas, demonstrando resultados eficientes. Ho et al. (2011) compararam a remoção de microcistina e de cilindrospermopsina de amostras de água da entrada de três ETAs a partir de dois tipos de CAP comerciais. Embora não haja referência sobre a origem dos carvões, os resultados apresentaram uma melhor adsorção para o CAP de diâmetro efetivo menor, uma vez que, para este, foram necessárias menores doses de carvão para atingir o limite de toxinas estabelecido pela OMS (1 $\mu g.L^{-1}$). O mesmo trabalho também indicou que não houve diferença significativa entre os tempos de contato utilizados (30, 45 e 60 minutos).

No trabalho de Müller, Raya-Rodriguez e Cybis (2009), cinco tipos de CAP (origens variando entre dois de madeira, casca de coco, osso e antracito) foram caracterizados e utilizados para adsorção de microcistina. Constatou-se que os carvões de madeira apresentaram maior volume de mesoporos (0,21 e 0,28 $cm^3.g^{-1}$) enquanto que o de coco, maior volume de microporos (1,29 $cm^3.g^{-1}$) e menor de mesoporos (0,13 $cm^3.g^{-1}$). Os resultados demonstraram melhores resultados para o carvão de origem madeira, seguidos pelos de coco, osso e antracito. O melhor resultado foi relacionado às características encontradas pelo carvão de madeira, incluindo maiores valores do número do iodo, da capacidade máxima adsortiva e do volume de microporos secundários e mesoporos.

Huang, Cheng e Cheng (2007) também relacionaram as características do carvão ativado com a capacidade de adsorção de microcistina. Foram considerados três tipos de CAG para remoção da toxina. Além disso, foi analisado o comportamento da adsorção na presença de matéria orgânica natural, uma vez que foi coletada água para estudo em uma estação de tratamento de água antes do processo de cloração. Os resultados confirmaram que a capacidade de adsorção aumentou para os carvões com maior volume de mesoporos e macroporos. Além disso, houve uma redução na capacidade de adsorção da microcistina na presença de matéria orgânica devido à competição pelos poros.

Pendleton, Schumman e Wong (2001) utilizaram carvões à base de madeira e de coco para a remoção de microcistina-LR. Os carvões de madeira continham microporos e mesoporos, enquanto que os de coco eram essencialmente microporosos. Ao diminuir o pH da solução, foi observado um aumento na capacidade adsortiva dos carvões. Entretanto, características como a superfície química e o volume de microporos primários não tiveram influência na capacidade de adsorção da toxina. Portanto, os autores sugeriram que a combinação de microporos secundários e mesoporos são os principais critérios a serem selecionados na escolha de um adsorvente para esta finalidade.

Albuquerque Júnior et al. (2006) analisaram a remoção de [D-Leucina^{1}]microcistina-LR a partir do uso de carvões ativados obtidos de resíduos agrícolas brasileiros, tais como madeira de pinus e bagaço de cana-de-açúcar. A concentração inicial de toxina utilizada foi de 11 $mg.L^{-1}$, sendo que os carvões de cana-de-açúcar e de madeira obtiveram remoção máxima de 98,73 e 99,27%, respectivamente, e adsorção em monocamada de 161,3 e 200 $\mu g.mg^{-1}$. De acordo com os autores, os carvões a serem utilizados em ETAs para este tipo de poluente-alvo devem ter porosidade mínima de 0,35 $cm^{3}.g^{-1}$ de volume de microporos secundários e 0,39 $cm^{3}.g^{-1}$ de volume de mesoporos.

3.2.3 Biodegradação de cianotoxinas

O CAG é usualmente utilizado no tratamento de água de abastecimento, uma vez que é capaz de adsorver grande parte das substâncias presentes na água, além possibilitar a colonização de bactérias e protozoários devido aos seus macroporos (YAPSAKLI; ÇEÇEN, 2010), e com isso favorecer a formação de biofilme. Os filtros de CAG que possibilitam a formação do biofilme são normalmente denominados, por alguns autores, de filtros de carvão

ativado biológicos (CAB) (VELTEN et al., 2011). Esses pesquisadores relataram que há uma considerável mudança na eficiência do filtro quando o mesmo passa de CAG para CAB. No caso da filtração para remoção de cianotoxinas, depois de um período necessário para a formação do biofilme, a remoção tende a ocorrer por ambos os fenômenos (biodegradação e adsorção) (MEREL et al., 2013).

Wang et al. (2007) compararam a remoção de MC-LR e MC-LA a partir de três tipos de filtros, sendo um de CAG esterilizado (adsorção), um de areia (biodegradação) e um de CAG convencional (adsorção e biodegradação). No filtro de CAG esterilizado, foi observada diminuição na capacidade de adsorção ao final de seis meses, passando de completa remoção para cerca de 70 e 40 % de MC-LR e MC-LA, respectivamente. Esta redução foi relacionada à competição da matéria orgânica com a toxina pelos sítios de adsorção. No filtro de areia, não foi observada remoção e somente a partir de sete meses que as toxinas foram completamente removidas, sendo isto atribuído à formação de biofilme e, portanto, à biodegradação. No filtro de CAG convencional, foi observada completa remoção das toxinas, exceto por uma leve queda inesperada próxima aos 30 dias, que foi atribuída ao início da remoção pelo processo de biodegradação. Fatores como a temperatura e a densidade inicial de bactérias interferiram na capacidade de adsorção, sendo as maiores remoções ocorrendo a 25 e 30 °C (a 22 e 40 °C não foi observada remoção) e para maiores densidades bacterianas (melhor resultado para 7,6 x 10^7 células.mL^{-1}). Não foram identificados os microrganismos responsáveis pela biodegradação.

A possibilidade de biodegradação das cianotoxinas em filtros aumenta a necessidade de pesquisas que identifiquem microrganismos potencialmente capazes de degradá-las. A biodegradabilidade das cianotoxinas pode variar de acordo com a sua estrutura química, condições intrínsecas da molécula e com as características ambientais. Ho et al. (2012) destacaram que a microcistina-LR é mais facilmente degradada biologicamente que as saxitoxinas e Alves (2011) citou que as microcistinas são suscetíveis à degradação por algumas bactérias encontradas em ambientes naturais (e.g., rios e reservatórios).

No Brasil, ainda existem poucos estudos sobre a remoção biológica de cianotoxinas e de outros compostos sintetizados pelas cianobactérias (MINILLO et al., 2013). Alves (2011) analisou o potencial de 35 bactérias isoladas de um sistema de abastecimento público na degradação da microcistina-XR. Os resultados apontaram que houve degradação da toxina por seis das bactérias isoladas, sendo elas dos gêneros *Pseudomonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Microbacterium* sp., *Agromyces* sp., *Bacillus* sp. e *Acinetobacter* sp. De acordo com a pesquisadora, esta última foi considerada como o primeiro relato da linhagem capaz de

degradar a microcistina-XR. Outro resultado importante na pesquisa foi a não formação de subprodutos tóxicos devido à biodegradação.

Park et al. (2001) analisaram a degradação da microcistina por bactéria do gênero *Sphingomonas* isolada de um lago hipertrófico. A bactéria foi incubada em temperaturas diferentes (5, 10, 20 e 30°C) e foi possível constatar que essa variável teve significativa influência na taxa de degradação, uma vez que quanto maior a temperatura, maior foi a taxa de degradação. Além disso, foram realizados testes em meio livre de nutrientes orgânicos, ou seja, em meio contendo apenas a microcistina e nutrientes inorgânicos. O resultado foi uma degradação quatro vezes mais rápida do que em meio contendo nutrientes orgânicos, sugerindo que esse gênero de bactéria pode utilizar, com viabilidade, a microcistina como fonte de carbono e energia. Isso corrobora a afirmação de Amé et al. (2006), que ressaltaram que a microcistina pode conter um elevado valor nutricional, seja como fonte de energia ou de aminoácidos, bem como ser utilizada como fonte de carbono e de nitrogênio pelos microrganismos.

Li et al. (2015) verificaram alguns fatores que contribuíram para a biodegradabilidade das microcistinas. Para isso, foram coletadas amostras mensais no ano de 2010 do lago Kasumigaura no Japão e do filtro biológico que trata sua água, e adicionava-se uma concentração inicial de microcistina de 100 $\mu g.L^{-1}$. Foram testadas variantes de microcistinas isoladas e em conjunto (MC-LR, RR e YR). Foi observada significativa variação sazonal na degradação, que dependeu da abundância dos biodegradadores. Estes, por sua vez, aumentaram conforme a elevação da temperatura da água, da concentração de clorofila-a e de microcistina das amostras coletadas. Além disso, não houve nenhuma diferença aparente na biodegradabilidade das diferentes variantes, separadas ou em conjunto.

Zhang, Pan e Yan (2010) analisaram o potencial de degradação da MC-RR a partir de uma bactéria do gênero *Sphingopyxis* sp. (USTB-05), isolada do Lago Dianchi (China). A concentração inicial de MC-RR foi de 50,2 $mg.L^{-1}$. Após um dia de fase lag, a toxina foi completamente degradada em três dias, atingindo uma taxa de degradação diária de 16,7 $mg.L^{-1}$.

Eleuterio e Batista (2010) verificaram a degradação da MC-LR a partir de três fontes: inóculo de filtro de antracito, inóculo do lago Mead (Las Vegas, Nevada) e cultura pura de *Sphingomonas* sp. (ACM-3926). A concentração inicial de toxina foi de 100 $\mu g.L^{-1}$, sendo testadas amostras apenas com a toxina e amostras com fonte extra de carbono. Os resultados de degradação diária apenas com a toxina foram de 12,5, 11,2 e 13,8 $\mu g.L^{-1}$ para os inóculos do filtro, do lado Mead e da *Sphingomonas* sp., respectivamente e, com a fonte extra de

carbono foram de 7,2, 5,3 e 12,1 µg.L^{-1}. Esses resultados indicaram que a fonte adicional de carbono inibiu a degradação da toxina. Além disso, foi identificada a bactéria *Morganella morganii* no filtro de antracito e no lago Mead, sendo que neste também havia *Pseudomonas paucimobilis*.

Esses resultados indicam a viabilidade de pesquisas que contribuam para o entendimento e aplicação da biodegradação de cianotoxinas.

4. METODOLOGIA

4.1 Produção de microcistina

Compreender as condições mais adequadas para o cultivo de *M. aeruginosa*, bem como sua relação com a produção de toxinas, pode oferecer subsídios para estudos sobre o tratamento da água, a dinâmica de cianobactérias em sistemas aquáticos e a avaliação do estado trófico dos sistemas aquáticos. O objetivo desta etapa da pesquisa foi avaliar o crescimento de uma cepa de cianobactéria *M. aeruginosa* em diferentes meios de cultura e considerando diferentes tempos de exposição de luz (fotoperíodo), bem como sua relação com a produção de microcistina. Foi identificada a condição de maior produção de microcistina para ajudar no desenvolvimento de futuras pesquisas científicas em diversas áreas do conhecimento.

A cepa estudada de *M. aeruginosa* (BB005) foi isolada a partir de amostra do reservatório de Barra Bonita, São Paulo, Brasil (coordenadas geográficas da barragem: 22º 31' 15"S e 48º 31' 43" W) e está depositada na coleção de Microalgas Cultura (WDCM835), UFSCar, coordenada pelo professor Armando Augusto Henriques Vieira. Três meios de cultura diferentes foram testados: ASM-1, BG-11 e WC, todos em tubos de cultura de vidro (50 mL de volume) com tampa de rosca. Estes meios foram esterilizados (121 °C durante 20 minutos) com o pH previamente ajustado para 8,0 e tamponado com TRIS a 0,5 g.L^{-1}. Esses meios foram testados para observar se eles iriam influenciar a concentração da toxina final devido às suas características, uma vez que possuem diferentes composições em relação a macro e micronutrientes (Tabelas 4, 5 e 6 dos meios ASM-1, BG-11 e WC, respectivamente).

Tabela 4 - Composição do meio ASM-1, incluindo fórmulas e concentrações dos reagentes (g.100 mL^{-1}) utilizados na composição das soluções (soluções A, B, C e D) e o volume requerido de cada solução ($mL.L^{-1}$) para compor o meio final

Solução	**Reagente**	**Reagente ($g.L^{-1}$)**	**Solução (mL) / L de ASM-1**
A	$NaNO_3$	8,50	20
	$MgCl_2.6H_2O$	2,05	
	$MgSO_4.7H_2O$	2,45	
	$CaCl_2.2H_2O$	1,45	
B	KH_2PO_4	8,70	2,0
	$Na_2HPO_4.12H_2O$	17,80	
C	H_3BO_3	24,80	0,1
	$MnCl_2.4H_2O$	13,90	
	$FeCl_3.6H_2O$	10,80	
	$ZnCl_2$	3,35	
	$CoCl_2.6H_2O$	0,19	
	$CuCl_2.2H_2O$	0,014	
D	$EDTA.Na_2$	18,6	0,4

Fonte: Gorham et al. (1964).

Tabela 5 - Composição do meio BG-11, incluindo reagentes utilizados e suas concentrações da solução estoque ($g.L^{-1}$), o volume requerido de cada solução estoque para preparo de um litro de meio e a descrição da composição da solução de micronutrientes

Reagente	**Solução estoque ($g.L^{-1}$)**	**Solução (mL) / L de BG-11**
$NaNO_3$	150	10
K_2HPO_4	40	1
$MgSO_4.7H_2O$	75	1
$CaCl_2.2H_2O$	36	1
Ácido Cítrico	6	1
Citrato de amônio férrico	6	1
Na_2EDTA	1	1
Carbonato de sódio	20	1
Micronutrientes	*	1

***Solução de micronutrientes**	
Reagente	**Solução estoque ($g.L^{-1}$)**
H_3BO_3	2,86
$MnCl.4H_2O$	1,81
$ZnSO_4.7H_2O$	0,222
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,39
$CuSO_4.5H_2O$	0,079
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	0,049

Fonte: Rippka et al. (1979).

Tabela 6 - Composição do meio WC, incluindo fórmulas e concentrações dos reagentes ($mg.L^{-1}$) e descrição das composições da solução de metal traço e de vitamina

Reagente	Solução estoque ($mg.L^{-1}$)	Solução (mL) / L de WC
$CaCl_2.2H_2O$	36,76	1
$MgSO_4.7H_2O$	36,97	1
$NaHCO_3$	12,6	1
K_2HPO_4	8,71	1
$NaNO_3$	85,01	1
$Na_2SiO_3.9H_2O$	28,42	1
Solução de metal traço	*	1
Solução de vitamina	**	1

*** Solução de metal traço**

Reagente	Solução estoque ($g.L^{-1}$)	Solução final (em 1 litro)
$Na_2.EDTA$	-	4,36 g
$FeCl_3.6H_2O$	-	3,15 g
$CuSO_4.5H_2O$	10,0	1 mL
$ZnSO_4.7H_2O$	22,0	1 mL
$CoCl_2.6H_2O$	10,0	1 mL
$MnCl_2.4H_20$	180,0	1 mL
$Na_2MoO_4.2H_2O$	6,0	1 mL
H_3BO_3	-	1,00 g

**** Solução de vitamina**

Reagente	Solução estoque ($g.L^{-1}$)	Solução final (em 1 litro)
Tiamina	-	100 mg
Biotina	0,5	1 mL
Vitamina B12	0,5	1 mL

Fonte: Guillard e Lorenzen (1972).

Dois repiques foram realizados. O primeiro foi mantido durante um período de 14 dias e foi efetuado para possibilitar a aclimatação da *M. aeruginosa* nas diferentes condições. Este foi utilizado como inóculo para o segundo repique, o qual foi cultivado durante 30 dias para o experimento de concentração da toxina. Em ambas as inoculações, foi mantido um volume total de 20 mL de cultura em cada tubo com 10% de inóculo (18 mL correspondendo

ao meio de cultura e 2 mL para *M. aeruginosa*). Cada meio de cultura foi testado em duas condições diferentes de exposição à luz. No segundo repique, as amostras foram cultivadas em triplicata, para validar o experimento (Figura 5).

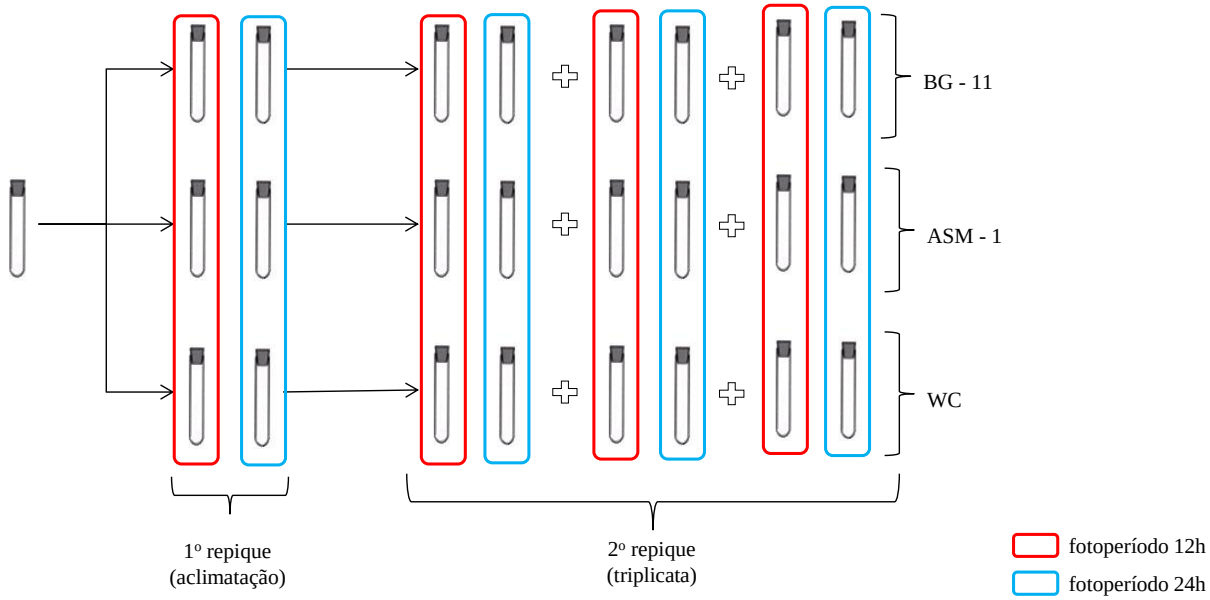


Figura 5 - Esquema das condições experimentais envolvidas no cultivo de *M. aeruginosa* em diferentes meios de cultura e condições de luz

Durante o período do experimento, as culturas foram expostas a duas condições de luz: i) fotoperíodo de 12 h; ou ii) fotoperíodo de 24 h. O cultivo com fotoperíodo de 12 h foi mantido em uma sala com temperatura ambiente de 24 ± 1 °C e intensidade da luz de 60 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$, fornecida por lâmpadas de tubo fluorescentes. O outro cultivo também foi mantido sob a mesma temperatura, mas em uma incubadora com um fotoperíodo de 24 h por dia. Estas condições de cultura foram selecionadas com base nas características com o qual a cepa foi depositada e também de acordo com resultados prévios obtidos por Santos (2009), que utilizou a mesma cepa para estudos de produção de microcistina.

As curvas de crescimento foram construídas a partir da leitura diária da absorbância das culturas utilizando um espectrofotômetro (750 nm). As fases lag, exponencial e estacionária foram assim estimadas em diferentes meios de cultura.

A fim de avaliar a concentração de microcistina, as culturas do segundo repique foram mantidas durante 30 dias com a análise correspondente da concentração da toxina após 20 e 30 dias de cultivo.

A extração da cianotoxina seguiu o método proposto por Törökne et al. (2004) e Yilmaz et al. (2008). Uma sequência de quatro etapas de congelamento e de descongelamento

da amostra permitiu a liberação de toxinas intracelulares da cianobactéria por lise celular. A quantificação de microcistina ($\mu g.L^{-1}$) foi realizada pelo método bioquímico do Ensaio do Imunoadsorvente Ligado à Enzima - ELISA. Para verificar se houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) na produção de toxina entre as diferentes condições analisadas, foi utilizado o programa estatístico Design Expert – versão 7, com auxílio de Análise de Variância (ANOVA).

Para as próximas etapas do trabalho, foi necessário cultivar a *M. aeruginosa* a fim de extrair a microcistina. A cepa de *M. aeruginosa* foi submetida às condições do resultado de maior produção de microcistina e foi realizado repique a cada 15 dias para aumento do volume, chegando-se em um volume final de cultivo em torno de 160 L. Devido ao elevado volume, este último cultivo foi desenvolvido em um fotobiorreator aeróbio e sem condições de assepsia. Ao final de 30 dias de cultivo, a cultura foi armazenada em garrafas PET de 2 L (Figura 6) e a toxina foi extraída seguindo o método de Törökne et al. (2004) e Yilmaz et al. (2008). Para utilização da microcistina, o extrato foi centrifugado a 4°C e a 11.000 rpm por 10 minutos, armazenando o sobrenadante para posterior utilização.

Figura 6 - Armazenamento em garrafas PET de 2 L da cultura de *M. aeruginosa*, para posterior extração do extrato de toxina

Destaca-se que o extrato utilizado foi do produto de lise das células de *M. aeruginosa* e não de um extrato purificado. Ou seja, além da microcistina, o extrato continha compostos orgânicos de origem intracelular que não foram removidos na centrifugação e, portanto, poderiam competir com a microcistina pelos sítios de adsorção do carvão ativado. A

vantagem é que esta situação se aproxima da realidade, uma vez que a água coletada de um lago eutrofizado provavelmente conterá compostos orgânicos além da toxina (BRANDÃO; SILVA, 2006).

4.2 Caracterização de diferentes carvões comerciais

Foram analisados três CAG comerciais, sendo cada um fabricado a partir de matéria prima diferente: casca de coco (Carvão 1), mineral (Carvão 2) e osso (Carvão 3). Os parâmetros avaliados foram: pH, teor de cinzas, massa específica aparente, umidade, índice de azul de metileno (IAM), número de iodo (NI), distribuição dos poros e área superficial (superfície BET).

Para massa específica aparente, umidade e NI, seguiram-se as recomendações da ABNT (1991), mais especificamente as normas MB-3413, MB-3414 e MB-3410. O NI consiste na massa de iodo adsorvida pelo carvão ativado depois de um determinado tempo, sendo o iodo residual determinado a partir da titulação com uma solução de tiossulfato de sódio (Figura 7a). O pH, o teor de cinzas e o IAM foram determinados de acordo com a norma japonesa JIS K 1474 (2014). No ensaio de IAM foi adicionada uma solução de concentração conhecida de azul de metileno em uma massa de carvão ativado, mantida sob agitação por um determinado tempo (Figura 7b). Em seguida, o material foi filtrado e foi feita a leitura da absorbância do residual de azul de metileno, sendo a concentração determinada a partir de uma curva de calibração.

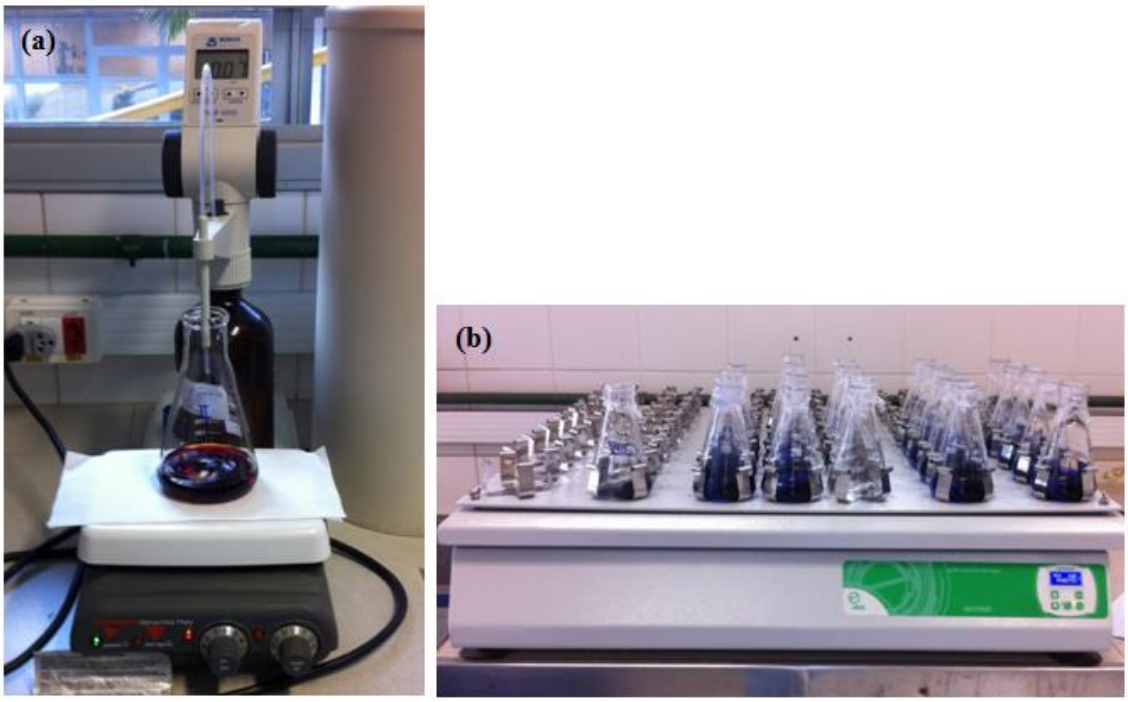


Figura 7 – Ensaios de Número de Iodo (NI) e Índice de Azul de Metileno (IAM). (a) Titulação de tiossulfato de sódio referente ao ensaio da determinação do NI de acordo com a norma MB-3410 (ABNT, 1991). (b) Amostras de carvão mantidas sob agitação durante ensaio do IAM, de acordo com a norma japonesa JIS K 1474 (2014).

A área superficial foi obtida a partir do ajuste dos dados de adsorção de N_2 a 77 K na equação de BET. Para isso, foi estabelecida uma parceria com o Laboratório de Materiais Carbonos (LMC) da UNIMEP de Santa Bárbara do Oeste (SP), que possui o equipamento Autosorb-1 (Quantachrome Corporation). A distribuição dos poros foi obtida pelo método NLDFT (Non-Local Density Function Theory) e, a área superficial de microporos, pelo método comparativo *t-plot*.

4.3 Isotermas de adsorção de microcistina

Foram realizados ensaios de adsorção a fim de avaliar a remoção da microcistina a partir dos três CAG comerciais. Para isso, inicialmente foi necessário determinar o tempo de equilíbrio de adsorção de cada carvão. Neste ensaio, foram fixadas a concentração de toxina e a dosagem de carvão, variando-se apenas o tempo de contato das amostras, a fim de se determinar o tempo de equilíbrio ideal para cada carvão. Os carvões foram lavados com água deionizada e secos em estufa a 105 °C por 3 h antes da pesagem. A dosagem considerada de carvão ativado foi de 50 $mg.L^{-1}$ e a concentração inicial de microcistina, 30 $\mu g.L^{-1}$. A toxina

foi diluída em água deionizada, uma vez que a concentração do extrato de microcistina era da ordem de 400 $\mu g.L^{-1}$. Os tempos testados foram de 0, 1, 2, 4, 8 e 24 h para todos os carvões, sendo que as amostras foram submetidas à agitação constante (200 rpm). O ensaio foi realizado em duplicata, em erlenmeyers de 250 mL e com um volume total de amostra de 100 mL.

Depois de determinado o tempo de adsorção, foram conduzidos ensaios para determinar a capacidade adsortiva dos carvões ativados, ou seja, foram construídas as isotermas de adsorção segundo a metodologia proposta pela norma D3860-98 da American Society for Testing and Materials - ASTM (2014), que consiste em adicionar diferentes massas de carvão ativado em recipientes contendo uma mesma concentração de microcistina (BRASIL; BRANDÃO, 2005). Para tais ensaios, os carvões foram lavados com água deionizada, secos em estufa a 105 °C por 3 h e triturados em um moinho de facas. As amostras foram peneiradas em peneira de 300 µm. Antes da pesagem dos carvões, os mesmos foram secos novamente em estufa a 105 °C. As dosagens de cada carvão utilizadas para os ensaios foram de 20, 50, 100, 250, 500 e 1000 $mg.L^{-1}$, com concentração inicial de toxina de 100 $\mu g.L^{-1}$ e agitação constante de 200 rpm. O ensaio foi realizado em erlenmeyers de 250 mL, em temperatura de 27 ± 1°C, volume total de 100 mL e em duplicata (Figura 8).

Figura 8 – Vista do ensaio de isotermas de adsorção de microcistina. Depois de agitação constante, as amostras foram filtradas em membranas de fibra de nylon de 0,45 µm

Foi utilizado o método bioquímico do ELISA em todos os ensaios para a quantificação de microcistina ($\mu g.L^{-1}$). Depois de construídas as isotermas, os dados foram aplicados aos modelos matemáticos de Langmuir e de Freundlich a fim de observar o melhor ajuste.

4.4 Pré-dimensionamento de filtros de carvão ativado

De acordo com Di Bernardo e Dantas (2005), é possível determinar a área da coluna de CAG a partir dos coeficientes das isotermas de Freundlich do composto a ser removido. Para isso, é necessário estimar o tempo de contato necessário, que depende da vida útil do carvão. O tempo de contato está relacionado com a espessura da camada de carvão (normalmente entre 1 e 4 m) e com a taxa de aplicação (entre 150 e 800 $m^3.m^{-2}.dia^{-1}$). Portanto, ao fixar uma dessas duas variáveis, calcula-se a outra, o que permite estimar a área da coluna do CAG. As Equações 8 e 9 auxiliam no início dos cálculos.

$$TV = \frac{q_{eo} \cdot \rho_{cag}}{(C_0 - C_e)} \qquad \text{(Equação 8)}$$

$$TU = \frac{C_0 - C_e}{q_{eo}} \qquad \text{(Equação 9)}$$

Em que:

TV: taxa volumétrica (L de água filtrada/L de carvão);

TU: taxa de uso do carvão (g de CAG/L de água escoada);

q_{eo}: massa adsorvida para $C_e = C_0$ (mg de adsorvato/g de carvão);

C_0: concentração inicial do adsorvato (mg/L);

C_e: concentração do adsorvato – média em toda coluna (mg/L);

ρ_{cag}: massa específica aparente do CAG (g/L).

A partir das equações 10 e 11 e assumindo-se um tempo de regeneração do CAG, calcula-se o volume de água que passará pela coluna nesse tempo e o volume de carvão necessário.

$$V_{água} = Q\ .\ 365\ (dias.ano^{-1})\ .\ T \qquad (Equação\ 10)$$

$$V_{CAG} = \frac{V_{água}}{TV} \qquad (Equação\ 11)$$

Onde:

$V_{água}$: volume total de água que passará pela coluna em *T* anos (L água);

Q: vazão afluente (L.dia^{-1});

V_{CAG}: volume de carvão ativado granular necessário (L CAG).

A partir desses resultados, e, assumindo-se uma taxa de aplicação superficial, é possível calcular a área e a altura da coluna do filtro em planta, de acordo com as Equações 12 e 13.

$$ACP = \frac{Q}{Tx} \qquad (Equação\ 12)$$

$$H_C = \frac{V_{CAG}}{ACP} \qquad (Equação\ 13)$$

Em que:

ACP = Área da coluna em planta (m^2);

Q: vazão afluente (m^3.dia^{-1});

Tx: Taxa de aplicação superficial assumida (m^3.m^{-2}.dia^{-1});

H_C: Altura da coluna (m).

O pré-dimensionamento de filtro de CAG foi realizado para o carvão que apresentou o melhor resultado para as isotermas de adsorção, de acordo com as Equações 8 a 13.

4.5 Ensaio de biodegradação

O ensaio de biodegradação foi realizado em triplicata, em erlenmeyers de 250 mL com tampões de gaze e algodão, mantidos por seis dias em uma incubadora sem luz a 24°C (Figura 9). O meio de cultura selecionado foi o meio Zinder (ZINDER et al., 1984), uma vez que não possui fonte orgânica, sendo previamente esterilizado a 121°C por 20 minutos.

Figura 9 – Vista da incubadora em que o ensaio de biodegradação foi mantido sem luz por seis dias a 24°C, em erlenmeyers de 250 mL com meio de cultura Zinder, extrato de microcistina (parte do ensaio esterilizada, parte não) e as bactérias *Sphingomonas* sp. e *Brevundimonas* sp.

As bactérias inoculadas foram a *Sphingomonas* sp. e a *Brevundimonas* sp., gentilmente cedidas pela técnica Eloisa Pozzi Gianotti do Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da USP de São Carlos (SP), que estavam isoladas e mantidas em glicerol a 50% em freezer a -80˚C. Para reativação das bactérias, as mesmas foram cultivadas em meio nutriente Broth, sendo posteriormente centrifugadas a 6.000 rpm por 6 minutos e ressuspensas em solução salina de NaOH a 0,9%.

Cada erlenmeyer continha meio de cultura, bactéria e microcistina, exceto pelos controles que eram compostos apenas pelo meio de cultura e toxina. Foram testadas três condições variando-se as bactérias:

I) *Sphingomonas* sp.;

II) *Brevundimonas* sp.;

III) *Sphingomonas* sp.+ *Brevundimonas* sp.

Cada condição foi inoculada com 10% de volume de bactéria (correspondendo, em cada experimento, a 5,6 x 10^6 UFC.mL^{-1} de *Sphingomonas* sp. e 6,3 x 10^6 UFC.mL^{-1} de *Brevundimonas* sp.) e a concentração inicial de toxina foi de 75 µg.L^{-1}. Além disso, o ensaio foi repetido para duas variações do extrato de toxina:

I) Toxina esterilizada [antes da inoculação com a(s) bactéria(s)];

II) Toxina bruta, sem esterilização.

No primeiro caso, o ensaio foi realizado com a toxina esterilizada a fim de garantir que não haveria qualquer outro microrganismo capaz de degradar ou interferir no ensaio. Para a esterilização, o extrato foi filtrado em membrana de 0,22 µm dentro da capela, sob condições de assepsia. Já no segundo caso, optou-se por utilizar o extrato bruto, que provavelmente possui outras substâncias ou microrganismos além da microcistina, uma vez que o cultivo da *M. aeruginosa* foi realizado sem condições de assepsia. Foi feita essa opção a fim de averiguar se haveria interferência no ensaio devido a essa condição menos controlada da toxina. A quantificação de microcistina (µg.L^{-1}) foi realizada pelo método ELISA.

O resumo das três etapas descritas referentes à metodologia pode ser observado na Figura 10.

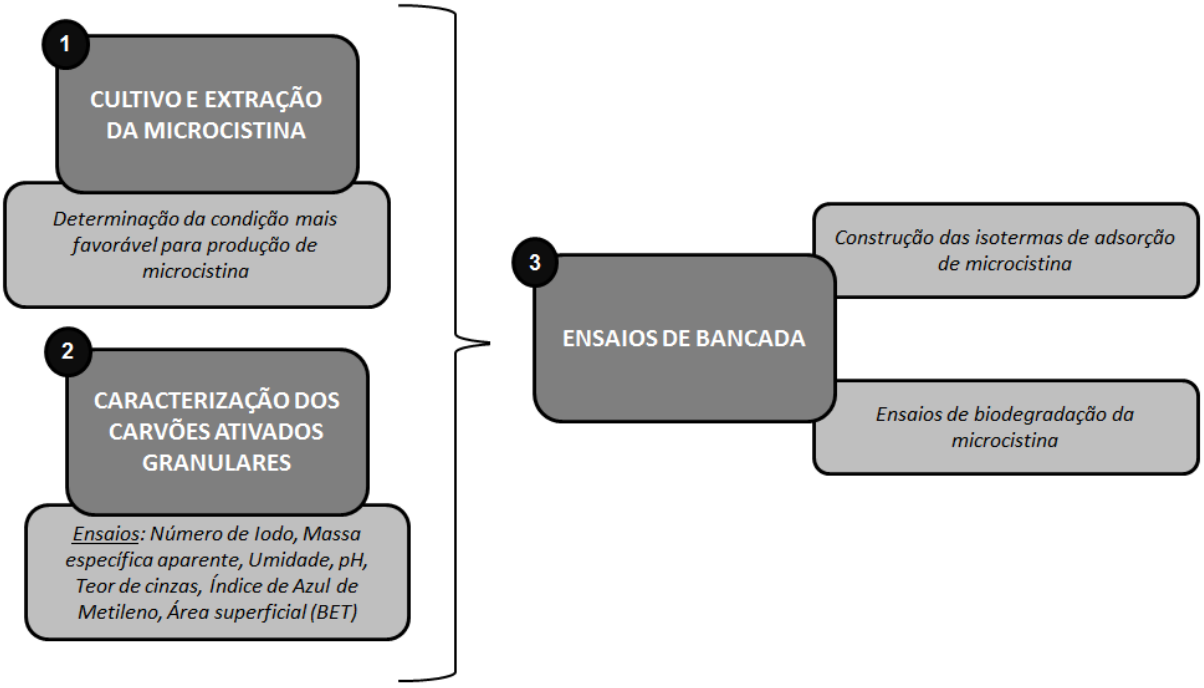


Figura 10 - Etapas referentes à metodologia da presente pesquisa, incluindo o cultivo e extração de microcistina, a caracterização das amostras de carvão ativado granular e os ensaios de bancada para construção das isotermas de adsorção e para os ensaios de degradação biológica da cianotoxina

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de microcistina

A Figura 11 apresenta os resultados do monitoramento das leituras diárias de absorbância das culturas, que foram cultivadas em diferentes meios de cultura e fotoperíodos. Todas as curvas mostraram padrões de crescimento semelhantes, com maiores taxas de crescimento ocorrendo até 5 dias do início do cultivo, seguida por uma fase de crescimento contínuo. Nenhuma fase estacionária foi observada durante estes 30 dias de monitoramento.

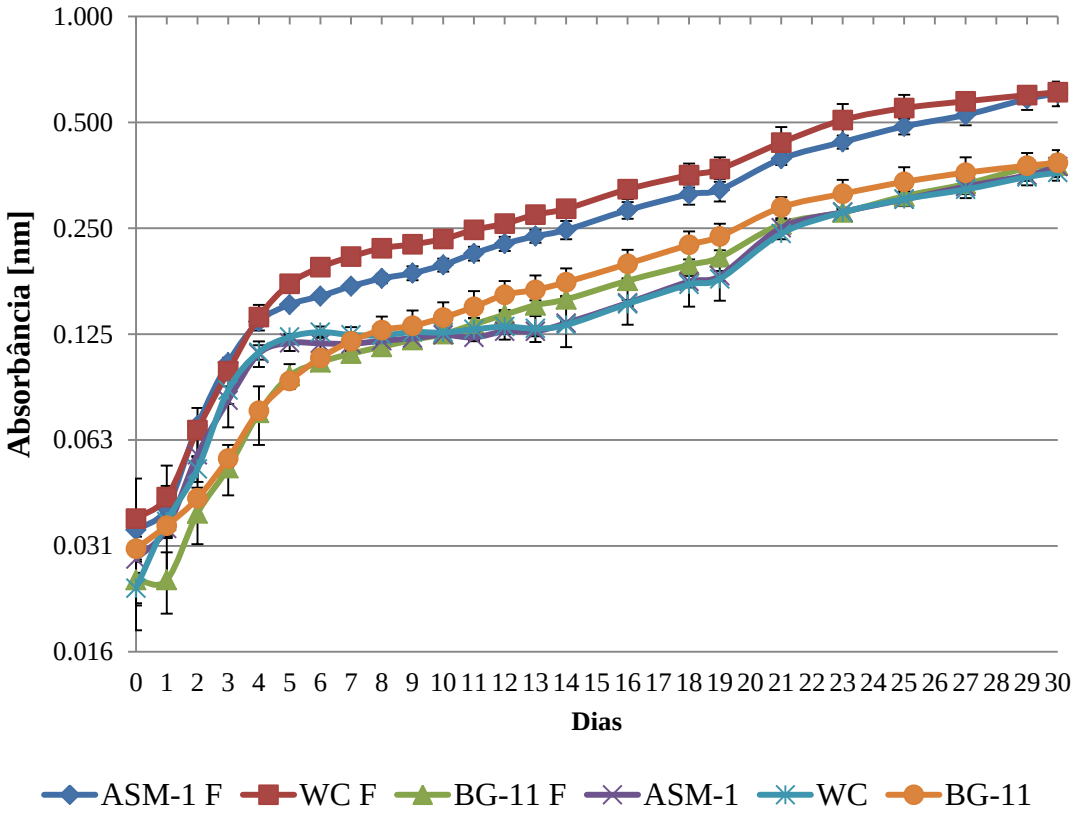


Figura 11 - Curvas de crescimento da *M. aeruginosa* sob diferentes condições (meios de cultura: ASM-1, WC e BG-11; fotoperíodos de 12 e 24 h, sendo o fotoperíodo de 12 h representado na legenda pela letra F) estimada a partir da absorbância a 750 nm. Os valores representam as médias e seus respectivos desvios padrão

O monitoramento da absorbância também permitiu identificar em qual condição a cepa de *M. aeruginosa* provavelmente produziu mais biomassa, uma vez que a produção de biomassa pode ser estimada a partir da absorbância. Os resultados indicaram que a leitura de absorbância mais elevada ocorreu no cultivo realizado no meio WC com o fotoperíodo de 12

h. Já a acumulação de toxinas foi mais elevada após 30 dias de cultivo para todas as condições analisadas ($p < 0,05$, ANOVA) (Figura 12). Estudos de Giraldi (2014) indicaram que na fase de crescimento exponencial houve maior taxa de produção de toxina. No entanto, na fase estacionária, ocorreu maior acúmulo da concentração de toxina devido ao maior tempo de cultivo.

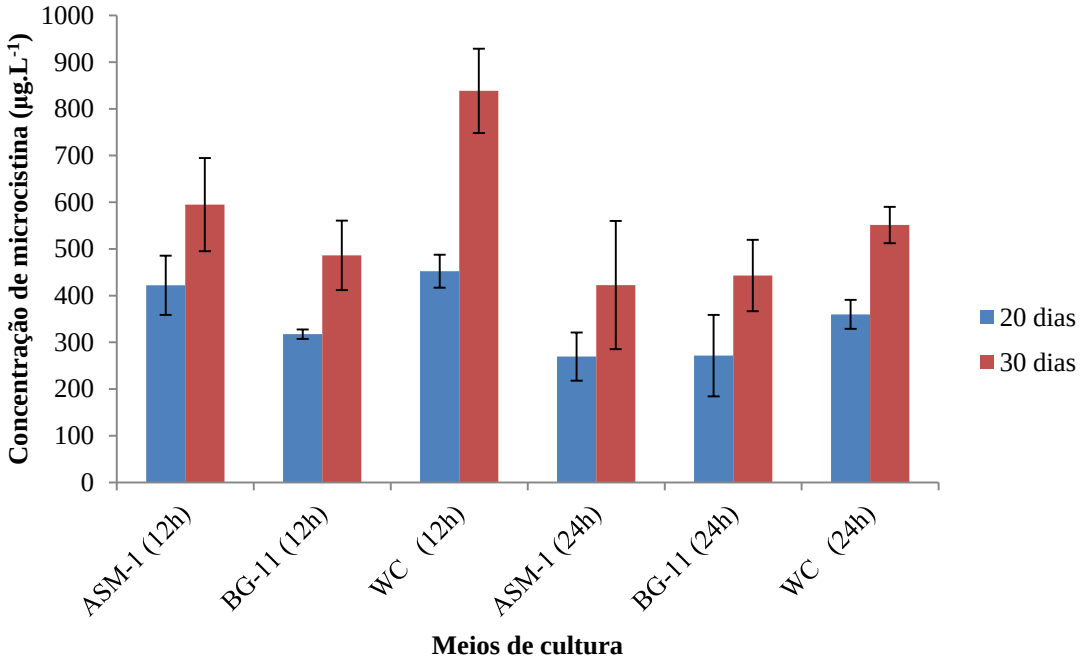


Figura 12 - Concentração de microcistina ($\mu g.L^{-1}$) após 20 e 30 dias de monitoramento a partir de diferentes condições de cultivo (meios de cultura: ASM-1, WC ou BG-11; fotoperíodos de 12 ou 24 h). Os valores representam as médias e seus respectivos desvios padrão

Verificando-se a homocedasticidade, a independência e a normalidade dos dados, foi possível utilizar a ANOVA para análise dos dados a partir do programa Design Expert. Observou-se que os três fatores (fotoperíodo, meio de cultura e dias de cultivo) interferiram na concentração de microcistina ($p < 0,05$), sendo que ao considerar os diferentes meios, o fotoperíodo e os dias de cultivo apresentaram, respectivamente, efeito global negativo e efeito global positivo. O efeito negativo se deu uma vez que quanto maior o fotoperíodo, menor foi a concentração de toxina, enquanto que o positivo, quanto maior o tempo, maior a concentração de toxina. Ao comparar os fotoperíodos, não houve diferença de concentração de toxina entre ASM-1 e BG-11 ($p > 0,05$), ao contrário do meio WC ($p < 0,05$). Portanto, de acordo com todos os resultados, as condições em que a cepa de *M. aeruginosa* é cultivada afeta significativamente a concentração de microcistina. Há evidências de que a intensidade da luz, temperatura, metais traço e nutrientes são fatores que influenciam a produção de

cianotoxinas (MORAIS, 2012), sendo que o presente trabalho também indicou influência do fotoperíodo. As análises realizadas pela presente pesquisa sugeriram que a condição de maior produção de toxina e de biomassa para a cepa BB005 foi obtida com o cultivo em meio WC e um fotoperíodo de 12 h, após 30 dias ($p < 0,05$). O cultivo em fotobiorreator foi realizado nessas condições (Figura 13).

Figura 13 – Vista do fotobiorreator após 30 dias de cultivo da *M. aeruginosa* (cepa BB005) na condição observada com maior produção de toxina (meio WC e fotoperíodo de 12 h)

5.2 Caracterização dos diferentes carvões comerciais

A etapa de caracterização dos carvões 1, 2 e 3 (casca de coco, mineral e osso, respectivamente) incluiu variáveis como pH, massa específica aparente, umidade e teor de cinzas, conforme Figura 14. Os valores representados correspondem à média dos resultados obtidos para cada carvão e seus respectivos desvios padrão.

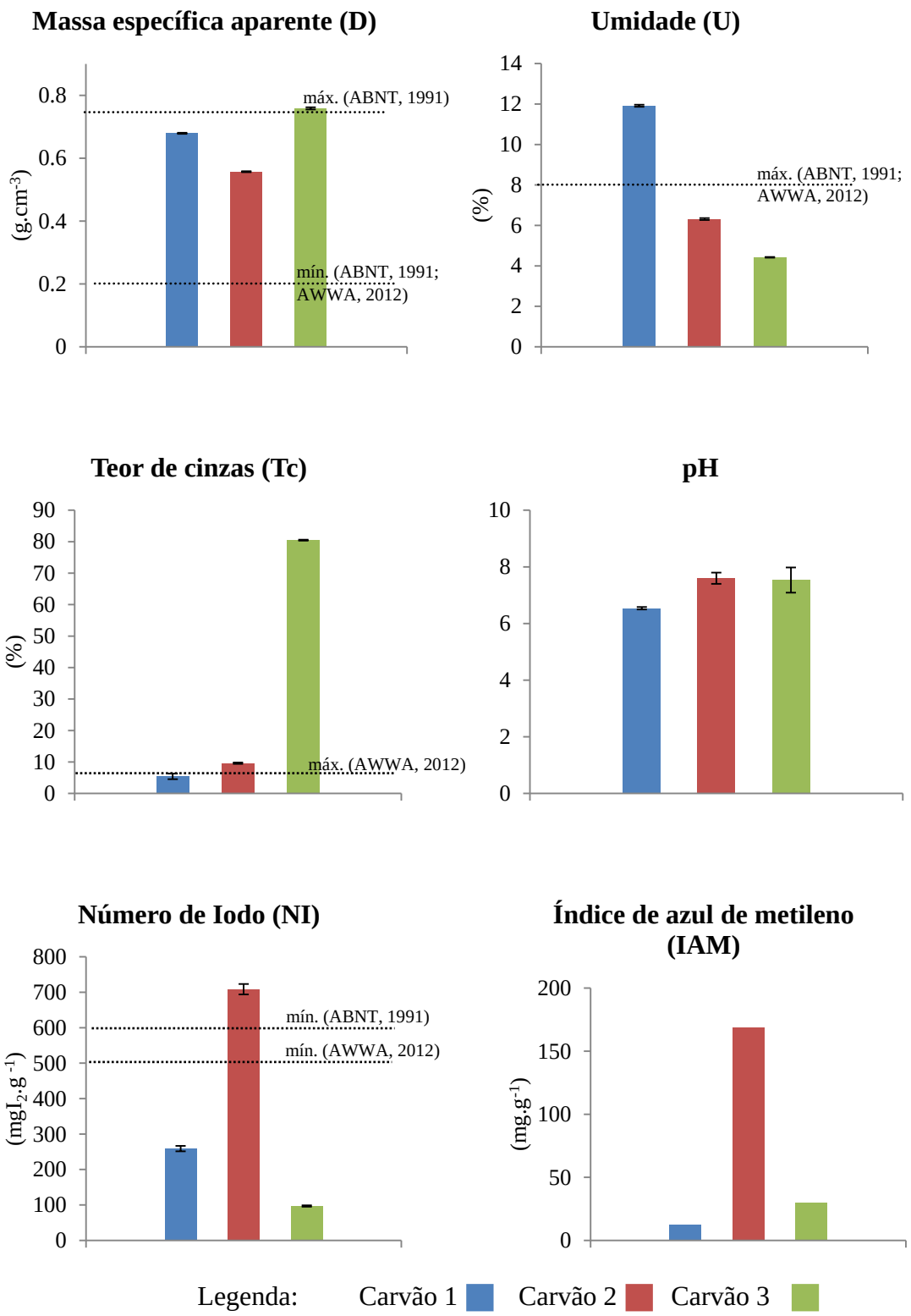


Figura 14 - Caracterização dos carvões 1, 2 e 3 (casca de coco, mineral e osso, respectivamente) conforme parâmetros de massa específica aparente ($g.cm^{-3}$), umidade (%), teor de cinzas (%), pH, número de iodo ($mg.g^{-1}$). Os valores correspondem às médias e seus respectivos desvios padrão

De acordo com a Figura 14, verificou-se para massa específica aparente que os três carvões estudados estão acima do valor mínimo sugerido pelas normas. A ABNT (1992) sugere um valor máximo, sendo que os carvões 1 e 2 se encontraram dentro deste limite, e no caso do carvão 3 houve um pequeno excedente. Portanto, para este parâmetro, todos os carvões foram considerados satisfatórios.

No caso da umidade, apenas o carvão 1 não se enquadrou no limite sugerido. Entretanto, este foi o único carvão que esteve dentro do limite sugerido para o teor de cinzas, indicando maior pureza do material. Constatou-se que o carvão 3 atingiu um teor de cinzas muito elevado quando comparado ao limite máximo. Os valores de pH para todos os carvões apresentaram faixas próximas a neutra, e portanto, provavelmente não haverá interferência de grupos ácidos ou básicos em sua superfície que possam influenciar no processo de adsorção.

Os carvões 1 e 2 apresentaram, respectivamente, 3 e 7 vezes maior NI comparados ao carvão 3. Entretanto, o NI foi satisfatório apenas para o carvão 2, indicando maior quantidade de microporos quando comparado com os outros carvões analisados. Nos ensaios de Müller, Raya-Rodriguez e Cybis (2009), os dados de NI para CAPs foram de 921, 619 e 98 $mgI_2.g^{-1}$, sendo os materiais de origem de coco, mineral e osso, respectivamente. É possível perceber que o de osso apresentou valor semelhante ao carvão 3, também de osso. Huang, Cheng e Cheng (2007) observaram valores de NI significativamente maiores, como 1020 $mgI_2.g^{-1}$ para CAG de coco e 1000 para CAGs mineral e de madeira. Brasil e Brandão (2005) observaram uma relação positiva entre o número de iodo e a remoção de microcistina ao comparar quatro diferentes CAPs, sendo que as maiores remoções ocorrem para carvões com maiores NI. Por outro lado, Donati et al. (1994) não observaram em seu trabalho relação entre o NI e a remoção de microcistina, e portanto, afirmaram que é um índice que não deve ser utilizado isoladamente para indicar a eficácia do carvão.

Não existe atualmente norma brasileira que estabeleça o valor mínimo exigido para o IAM, entretanto observou-se que o maior valor foi obtido para o carvão 2, seguido pelos carvões 3 e 1. Kuroda et al. (2005) avaliaram o comportamento de quatro CAGs e seis CAPs na remoção de microcistina, além de estimar a contribuição de microporos e mesoporos a partir no NI e do IAM, respectivamente. Concluíram que o IAM pode ser utilizado como ferramenta simples para estimativa do volume de mesoporos, além de observarem uma relação positiva entre o IAM do carvão e sua capacidade de adsorver microcistina.

As isotermas obtidas a partir da adsorção do nitrogênio a 77 K e as distribuições dos poros realizadas são apresentadas nas Figuras 15, 16 e 17, para os carvões 1, 2 e 3, respectivamente.

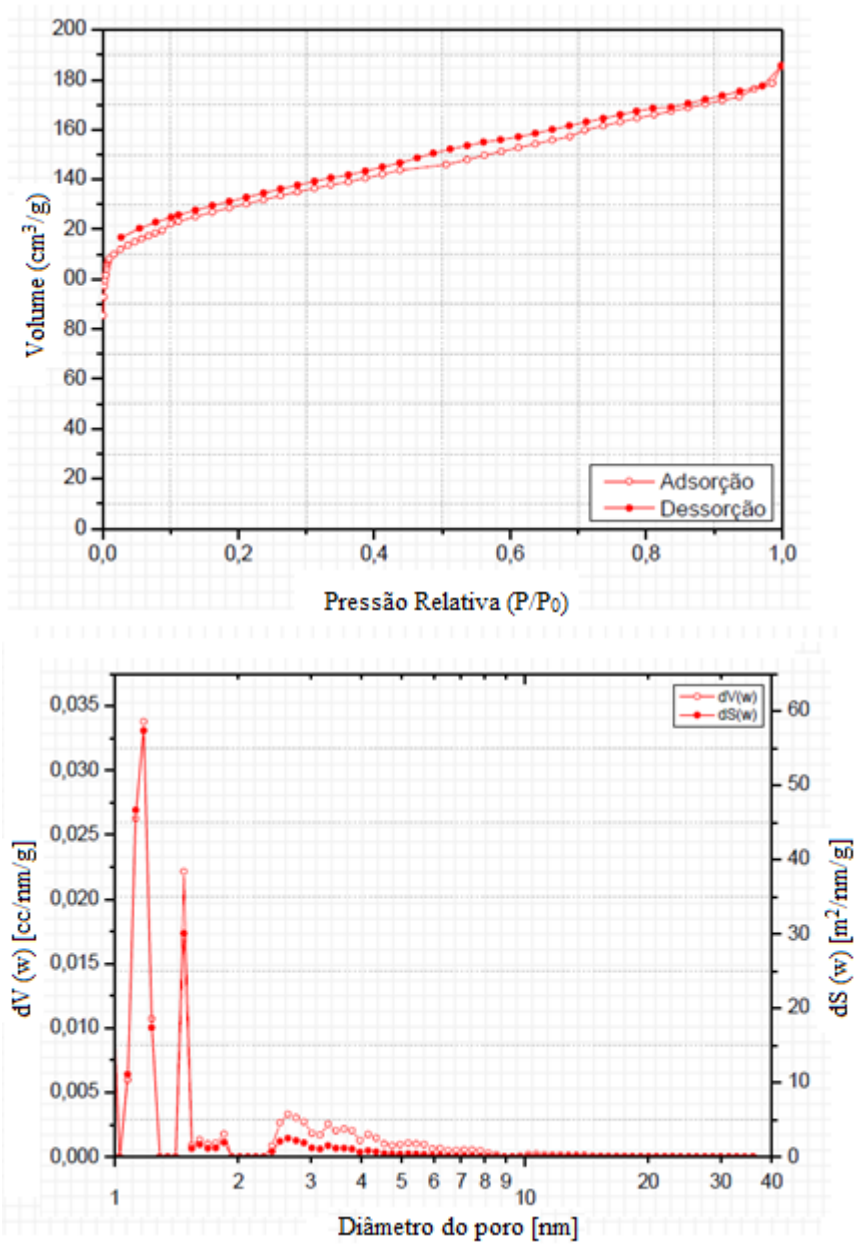


Figura 15 - Isotermas de adsorção de nitrogênio gasoso (N_2) a 77 K e distribuição dos poros do carvão 1 (matéria prima de origem: casca de coco). dV corresponde à derivada do gráfico de volume dos poros [cc/nm/g, em que cc = cm^3], dS à derivada do gráfico da área superficial [m^2/nm/g].

O carvão 1 apresentou isoterma do Tipo II segundo a classificação da IUPAC, caracterizada pela presença de microporos devido aos pontos de inflexão em baixas pressões relativas (inferior a 0,1), seguida de adsorção em múltiplas camadas, indicando a presença de mesoporos na estrutura do material. A ausência de histerese consiste na característica microporosa do material, indicando a presença de poros no formato tipo fenda na superfície do material. A partir do método NLDFT (Non-Local Density Funciton Theory), observa-se a predominância de microporosidade na distribuição dos poros, uma vez que há concentração

de picos na região abaixo de 2 nm, especialmente na região supermicroporosa (entre 1,0 e 1,5 nm).

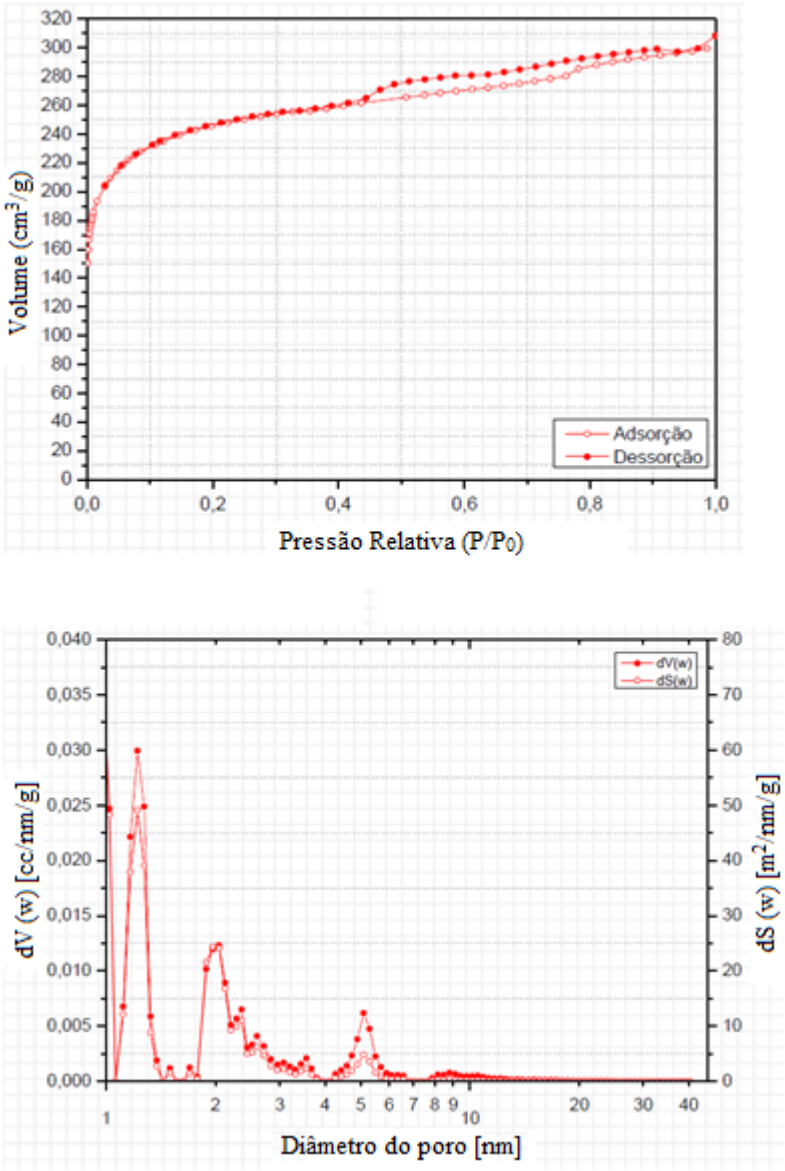


Figura 16 - Isotermas de adsorção de nitrogênio gasoso (N_2) a 77 K e distribuição dos poros do carvão 2 (matéria prima de origem: mineral). dV corresponde à derivada do gráfico de volume dos poros [cc/nm/g, em que cc = cm^3], dS à derivada do gráfico da área superficial [m^2/nm/g].

O carvão 2 apresentou isoterma do Tipo I, caracterizada pela presença de microporos devido ao ponto de inflexão (causado pela formação da monocamada adsorvida), seguida por adsorção em múltiplas camadas, indicando a existência de mesoporos. A histerese obtida, classificada como do tipo H4 de acordo com a classificação da IUPAC, consiste na predominância de microporos, mas com presença significativa de mesoporos, indicando poros do tipo fenda e cilíndrico, em especial na região de mesoporosidade. A ocorrência de uma

distribuição de poros mais ampla caracteriza a existência de micro e mesoporos na estrutura do material. Observa-se que em pressões relativas próximas à unidade há um aumento na capacidade de adsorção devido à saturação do nitrogênio a 77K. Esta saturação indica a ocorrência da condensação capilar no interior dos poros, que indica que a estrutura porosa apresenta poros de dimensões iguais a 50 nm, ou seja, macroporos.

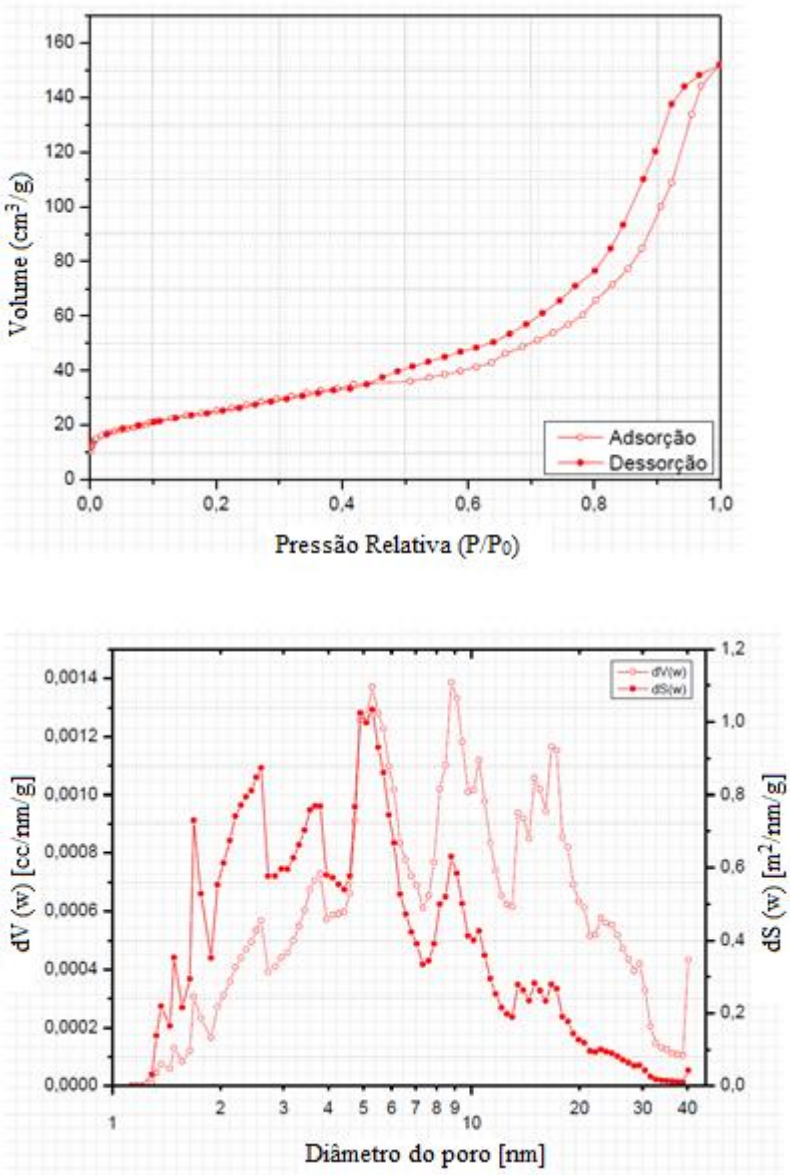


Figura 17 - Isotermas de adsorção de nitrogênio gasoso (N_2) a 77 K e distribuição dos poros do carvão 3 (matéria prima de origem: osso). dV corresponde à derivada do gráfico de volume dos poros [cc/nm/g, em que cc = cm^3], dS à derivada do gráfico da área superficial [m^2/nm/g].

O carvão 3 apresentou isotermas do Tipo II segundo a classificação da IUPAC, caracterizadas pela presença de microporos devido aos pontos de inflexão em baixas pressões relativas, seguida de adsorção em múltiplas camadas, indicando uma distribuição de poros

mais ampla, apresentando microporos e mesoporos na estrutura do material. A histerese obtida, classificada como do tipo H4 segundo a classificação da IUPAC, consiste em comportamento semelhante ao carvão 2, indicando a presença de poros tipo fenda e cilíndrico na superfície do material, apresentando comportamento favorável para adsorção de líquidos.

Comparando-se a distribuição dos poros das Figuras 15, 16 e 17, observou-se que a quantidade adsorvida de N_2 por unidade de massa e por unidade de dimensão do poro varia para cada carvão, uma vez que os carvões 1, 2 e 3 adsorveram no máximo 0,033, 0,030 e 0,0014 $cc.nm^{-1}.g^{-1}$, respectivamente, indicando que os carvões 1 e 2 apresentaram maior capacidade de adsorção de N_2. Donati et al. (1994) citam que o material de origem do carvão influencia sua distribuição de poros, e, portanto, justifica essa diferença entre os valores obtidos.

A área superficial específica (ASE) BET e os volumes totais de poros são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Caracterização dos poros dos carvões ativados 1, 2 e 3 (origem coco, mineral e osso, respectivamente), incluindo: área superficial específica da teoria de adsorção de Brunauer, Emmet e Teller (ASE BET, $m^2.g^{-1}$), volume dos poros ($cm^3.g^{-1}$), proporção de microporos (%), formato e tamanho predominante dos poros (nm).

	Carvão 1	**Carvão 2**	**Carvão 3**
ASE BET ($m^2.g^{-1}$)	478	911	80
Volume total de poros ($cm^3.g^{-1}$)	0,3	0,5	0,2
Volume de mesoporos ($cm^3.g^{-1}$)	0,1	0,1	0,2
Porcentagem de microporos (%)	54,3	70,0	não identificado
Formato dos poros	fenda	fenda e cilíndrico	Cilíndrico
Tamanho predominante dos poros (nm)	1,4 (supermicroporos)	1,3 (supermicroporos)	8,8 (mesoporos)

Os carvões 1 e 2 apresentaram valores de ASE BET, respectivamente, 6 e 11 vezes maiores comparados ao carvão 3, sendo que foi verificada correlação significativa entre essa variável e a porcentagem de microporos (R^2 = 0,99), confirmando a afirmação de Marsola (2015), que diz que há uma relação entre maior área superficial específica do carvão para um

maior número de microporos. No trabalho de Viana-Veronezi et al. (2009), foi verificada essa relação inclusive com dados do NI, ou seja, quanto maior a superfície específica, maior foi volume de microporos e do NI. Essa mesma situação pôde ser observada nos casos dos carvões apresentados na Tabela 7 e na Figura 14, em que o carvão 2 apresentou os maiores valores. Müller, Raya-Rodriguez e Cybis (2009) observaram para os CAPs de coco, mineral e osso, valores de ASE BET de 857, 611 e 126 $m^2.g^{-1}$, respectivamente, ou seja, o carvão de osso também apresentou o menor valor. O menor valor de ASE BET para o carvão 3 indicou que o material é essencialmente constituído por mesoporos.

Foi possível observar correlação significativa entre o volume total de poros e o de microporos (R^2 = 0,92). Nas duas variáveis, o carvão 3 apresentou os menores valores, e, o carvão 2, os maiores. O levantamento de alguns trabalhos por Brandão e Silva (2006) mostrou que, para carvões de origem vegetal, a porcentagem de microporos variou entre 58 e 84%, enquanto que para os de origem mineral e animal, a variação diminuiu para 16 a 50%. A Tabela 7 indicou que o carvão 1 (coco) esteve próximo à essa porcentagem, entretanto, o carvão 2 (mineral) apresentou porcentagem acima do esperado por Brandão e Silva (2006), enquanto que no carvão 3 (osso) não foi identificada a presença de microporos.

Donati et al. (1994) investigaram o uso de oito carvões ativados para a remoção de microcistina. Os carvões com maiores volumes de mesoporos foram mais eficazes na remoção da toxina, sendo que os autores afirmaram que houve baixa correlação entre a capacidade de adsorção de microcistina com o volume de microporos dos carvões, assim como para a ASE BET e o NI. No estudo de Müller, Raya-Rodriguez e Cybis (2009) também foi obtida baixa correlação entre a capacidade de adsorção de microcistina e a área superficial dos CAPs analisados.

O trabalho de Lee e Walker (2006) observou a remoção de microcistina com o uso de dois CAPs comerciais, sendo um de madeira (ASE BET 640 $m^2.g^{-1}$ e volume de micro e mesoporos predominantes) e outro de coco (ASE BET 752,8 $m^2.g^{-1}$ e volume de microporos predominantes). A remoção atingiu cerca de 80% e 20%, respectivamente. Os autores relacionaram a melhor eficiência do CAP de madeira devido à presença de mesoporos em sua estrutura, não apresentando relação com a ASE BET.

Os CAGs de coco analisados por Guerra et al. (2015) apresentaram ASE BET semelhantes entre si (374 e 402 $m^2.g^{-1}$), além do volume total de poros (0,225 e 0,229 $cm^3.g^{-1}$) e de porcentagem de microporos (92 a 93%). Ainda que os carvões fossem predominantemente microporosos, ao analisar a remoção de microcistina, foi observada remoção de até 85% de sua concentração inicial (20 $\mu g.L^{-1}$).

O formato dos poros influencia no processo de adsorção, sendo que os resultados indicaram que o carvão 1 apresenta poros em forma de fenda, contrariando a afirmação de Oliveira e Azevedo (2004) que cita que o carvão de origem vegetal é caracterizado por apresentar estrutura cilíndrica.

5.3 Isotermas de adsorção de microcistina

O resultado para o ensaio de tempo de equilíbrio foi obtido a partir da relação entre os tempos testados e seus respectivos resultados para a massa de toxina adsorvida em µg por mg de carvão (q_e) (Figura 18).

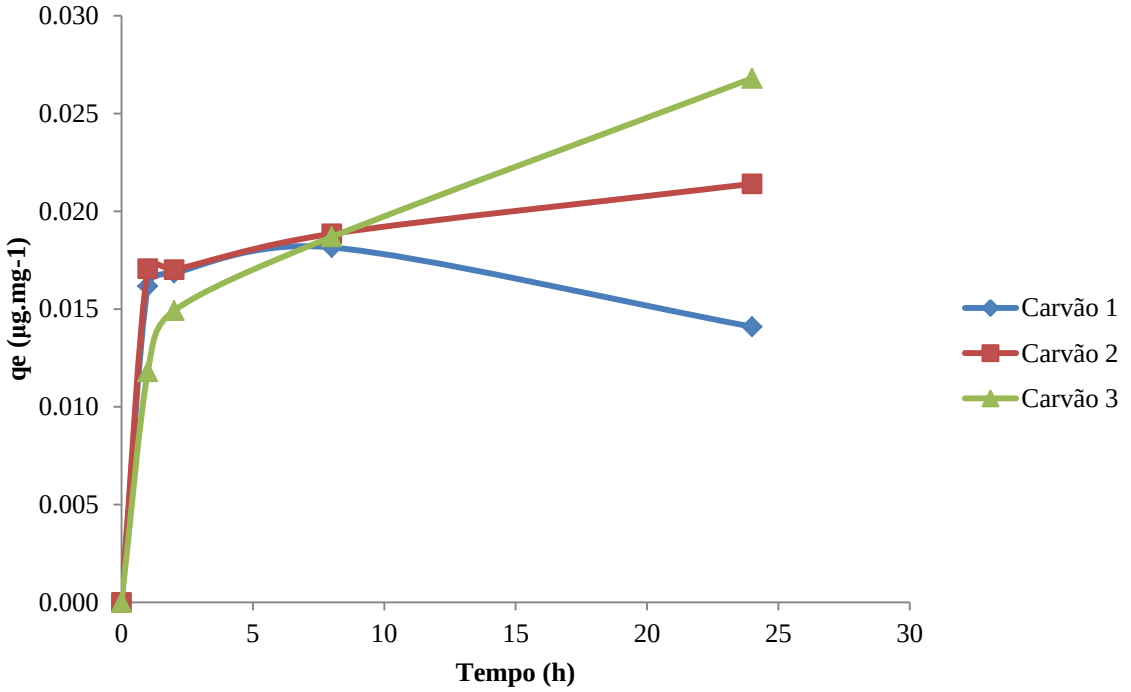


Figura 18 - Resultados do tempo de equilíbrio testado para os carvões 1, 2 e 3 (matéria prima de origem: casca de coco, mineral e osso, respectivamente), sendo analisados os tempos 0, 1, 2, 4, 8 e 24 h

Observou-se que todos os carvões apresentaram maior taxa de adsorção de microcistina por massa de carvão no início do ensaio. Depois de 1 h, não foram observadas remoções significativas, exceto após 24 h do início do teste. Entretanto, a adoção deste tempo seria inviável, uma vez que, considerando sistemas em escala real, o tempo de detenção hidráulica em uma ETA normalmente é de cerca de 2 h (VIANA-VERONEZI et al., 2009). A norma D3860-98 (ASTM, 2014) propõe o tempo de equilíbrio de 2 h, entretanto, sugere que

seja realizado um ensaio para verificar se é suficiente para que ocorra o equilíbrio. Devido à pequena diferença de remoção entre 1 e 2 h (28, 29 e 20% em 1 h e 29, 29, e 25% em 2 h, para os carvões 1, 2 e 3, respectivamente), foi estipulado o tempo de 1 h como o tempo de equilíbrio ideal. Observa-se que o carvão 3 apresentou uma menor afinidade com a microcistina quando comparado com os outros carvões, uma vez que demorou pouco menos de 4 h para alcançar a mesma eficiência de remoção que os outros alcançaram em torno de 1 h.

Para as massas de carvões analisadas, os ensaios de adsorção com a microcistina atingiram remoção da ordem de 98, 99 e 78% para os carvões 1, 2 e 3, respectivamente. Foi possível realizar análise de regressão linear entre as características dos carvões e as concentrações remanescentes de toxina nos ensaios de adsorção. Foi observado que o teor de cinzas e ASE BET apresentam relação positiva com a capacidade de adsorção da microcistina (R^2 = 0,99 e 0,74, respectivamente), ao contrário do IAM (R^2 = 0,18). Esses resultados contrariam os apresentados por Donati et al. (1994) e Müller, Raya-Rodriguez e Cybis (2009), que não observaram relação entre a ASE e a capacidade de remoção, mas sim com o volume de mesoporos (e, portanto, indiretamente com o IAM) no caso de Donati et al. (1994).

Foi observada relação entre o NI e a capacidade de adsorção de toxina (R^2 = 0,52), resultando na equação linear $y = -0{,}0358x + 24{,}258$, em que y representa a concentração remanescente de toxina, e x, o NI, sugerindo que estes parâmetros estejam relacionados. A partir desse ajuste e considerando-se as condições deste ensaio, o NI necessário do carvão para atingir o limite de 1,0 $\mu g.L^{-1}$ de toxina determinado pela Portaria n° 2914/2011, seria de 650 $mg.g^{-1}$, ou seja, próximo ao limite já estabelecido pela ABNT (1991). Brasil e Brandão (2005) também observaram relação entre a maior capacidade de adsorção e maior NI.

Não foi possível identificar a variante de microcistina presente no extrato utilizado, uma vez que o teste ELISA determina a concentração total de toxina, mas não distingue as diferentes variantes. Entretanto, Pyo e Moon (2005) testaram três tipos de carvões ativados para remoção de microcistina –LR e –RR, sendo que não foi observada influência no comportamento na remoção das toxinas devido ao aminoácido diferente. Entretanto, nos ensaios de Cook e Newcomb (2002) e de Ho et al. (2011), a remoção de microcistina dependeu da variante, sendo melhor a eficiência de adsorção na ordem: RR > YR > LR > LA.

As isotermas obtiveram comportamentos diferentes para cada carvão, sendo que os dados foram ajustados de acordo com os modelos matemáticos de Langmuir (Figura 19) e de Freundlich (Figura 20). Almeida (2015) também analisou a remoção de microcistina por

carvão ativado, fez ajuste aos dois modelos e observou melhor resposta ao modelo de Freundlich.

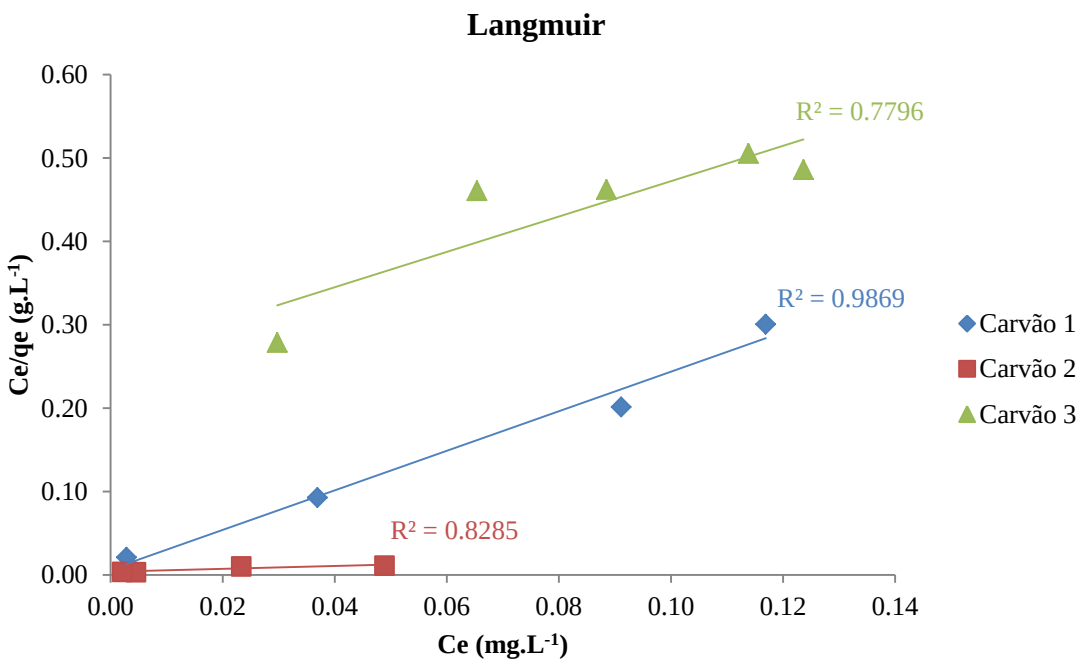


Figura 19 - Ajuste das isotermas de adsorção de microcistina para o modelo matemático de Langmuir, sendo os resultados obtidos para os carvões 1 (origem de casca de coco), 2 (origem mineral) e 3 (origem de osso)

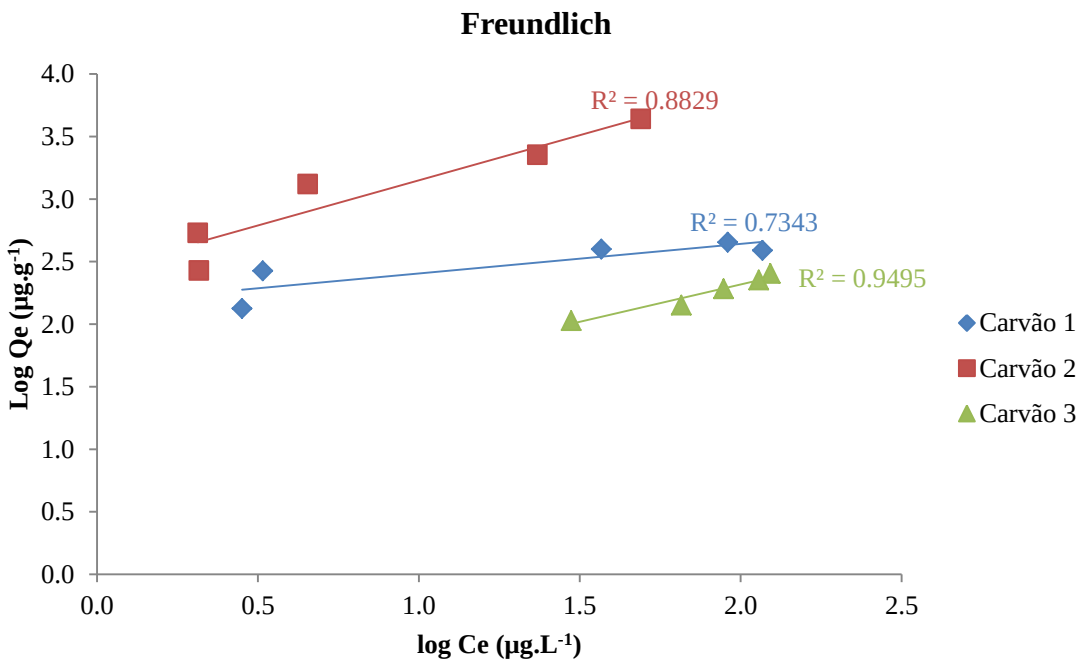


Figura 20 - Ajuste das isotermas de adsorção de microcistina para o modelo matemático de Freundlich, sendo os resultados obtidos para os carvões 1 (origem de casca de coco), 2 (origem mineral) e 3 (origem de osso)

A partir das equações das retas obtidas pelos ajustes aos modelos matemáticos de Langmuir (Figura 19) e de Frendlich (Figura 20), foi possível calcular as constantes de cada modelo (Tabela 8), a fim de analisar e comparar os melhores resultados.

Tabela 8 - Constantes obtidas a partir dos ajustes das isotermas aos modelos matemáticos de Langmuir e de Freundlich para os carvões 1 (origem de casca de coco), 2 (origem mineral) e 3 (origem de osso)

	Langmuir				**Freundlich**		
	q_{max} (mg.g^{-1})	b (L.mg^{-1})	R_L	R^2	n	k (µg.g^{-1}).(L.µg^{-1})$^{1/n}$	R^2
Carvão 1	0,42	359,30	0,02	0,99	4,23	147,40	0,73
Carvão 2	5,76	45,68	0,14	0,83	1,38	268,04	0,88
Carvão 3	0,47	8,15	0,47	0,78	1,67	13,19	0,95

Analisando-se as constantes de Langmuir e considerando que q_{max} equivale à concentração máxima de uma camada de recobrimento do adsorvente pelo adsorvato (GUERRA, 2012), os valores dessa variável apontaram o carvão 2 com a melhor capacidade de adsorção de microcistina dentre os carvões analisados, seguido pelos carvões 3 e 1. Esses valores foram menores do que os CAGs analisados por Huang, Cheng e Cheng (2007), em que os carvões de origem de coco, mineral e madeira, apresentaram capacidade de adsorção de MC-LR de 16,1, 17,5 e 83,3 mg.g^{-1}, respectivamente. Os autores relacionaram esse aumento na capacidade, dentre outros fatores, com o maior volume de mesoporos, que apresentou valores de 0,089, 0,175 e 0,760 m^2.g^{-1}. Entretanto, os experimentos foram realizados a partir de água Milli-Q, ou seja, não houve competição da matéria orgânica com a toxina pelos sítios de adsorção e a concentração inicial de toxina foi de 250 µg.L^{-1}. Mohamed, Carmichael e El-Sharouny (1999) observaram valores similares aos apresentados na Tabela 8, uma vez que os CAGs de madeira e de coco apresentaram capacidade máxima de 5 e 3,9 mg.g^{-1}, respectivamente, em ensaios com concentração inicial de microcistina de 2 mg.L^{-1}. Müller, Raya-Rodriguez e Cybis (2009) obtiveram adsorção máxima de 6,74, 2,66 e 3,31 mg.g^{-1} para os CAPs de coco, mineral e osso, respectivamente, sendo a concentração inicial de toxina de 100 µg.L^{-1}.

A constante *b*, relacionada com a energia de adsorção, aumenta com o crescimento das forças das ligações de adsorção (DI BERNARDO; DANTAS, 2005), portanto, observa-se maior força de ligação para o carvão 1, seguido pelos carvões 2 e 3. Além dessas constantes, é

possível observar que para todos os carvões, R_L esteve entre zero e um, caracterizando adsorção favorável para todos os casos.

Analisando-se as constantes de Freundlich, observa-se que o maior valor de *k* foi obtido para o carvão 2, demonstrando uma maior afinidade do adsorvato por este adsorvente, seguido pelos carvões 1 e 3. Brasil e Brandão (2005) afirmaram que *k* está relacionado com a capacidade adsortiva do carvão e utilizaram este parâmetro como representativo para selecionar o carvão de melhor capacidade de remoção de microcistina. Mohamed, Carmichael e El-Sharouny (1999) observaram valores de *k* de 501,2 e 331,1 $(\mu g.g^{-1}).(L.\mu g^{-1})^{1/n}$ em CAGs de madeira e de coco, respectivamente.

No caso da constante *n*, valores entre 1 e 10 indicam um processo de adsorção favorável (TONG et al., 2011) e Di Bernardo e Dantas (2005) também citam que quando apresentada na forma $\frac{1}{n}$, a ligação é mais forte quanto menor for seu valor. Deste modo, a ligação mais favorável foi obtida pelo carvão 1, seguido pelos carvões 3 e 2. Müller, Raya-Rodriguez e Cybis (2009) também citaram que o elevado valor de *n* está relacionado com a irreversibilidade do processo, e, portanto, a microcistina estaria ainda mais fortemente aderida ao carvão.

Observa-se que o coeficiente de correlação linear (R^2) de Langmuir foi maior apenas para o carvão 1, provavelmente indicando natureza mais homogênea do adsorvente. Os carvões 2 e 3 apresentaram R^2 maior para o ajuste de Freundlich, que consiste no modelo que considera superfícies como sendo heterogêneas (HAMEED et al., 2009).

Para ambos os modelos, observou-se que o carvão 2 apresentou maior afinidade pela microcistina quando comparado aos demais. Na etapa de caracterização, este carvão foi o único que esteve de acordo com o exigido pela norma ABNT para o número de iodo, que recomenda valores superiores a 600 $mgI_2.g^{-1}$, além de apresentar maior porcentagem de microporos, de ASE BET, presença de poros em ambos os formatos (fenda e cilíndrico) e maior valor de IAM, embora a análise de regressão linear do IAM não tenha apresentado relação entre este índice e a capacidade de adsorção de toxina. Os resultados de distribuição dos poros também indicaram uma distribuição de poros mais ampla, caracterizando a existência também de mesoporos na estrutura do material, o que certamente influenciou positivamente no processo de adsorção da microcistina. Pendleton, Schumann e Wong (2001) afirmaram que, para a seleção de um material adsorvente que seja capaz de remover a microcistina, deve ser levado em consideração que ela é uma molécula relativamente grande [diâmetro estimado da MC-LR de 1,2 a 2,6 nm, de acordo com Müller, Raya-Rodriguez e

Cybis (2009)], e portanto a combinação de microporos secundários e mesoporos é o principal critério a ser considerado na seleção de um adsorvente para esta finalidade. Outro fator favorável neste carvão foi o menor valor de *n* obtido no ajuste de Freundlich. Isto porque o CAG utilizado em filtros é normalmente reaproveitado, ao contrário dos CAPs em que não há reaproveitamento do seu material após o uso. Portanto, é vantajoso que a força de ligação entre a microcistina e o CAG seja menor (BRASIL; BRANDÃO, 2005).

Di Bernardo e Dantas (2005) citaram que é possível determinar as dimensões de uma coluna de CAG a partir dos coeficientes das isotermas de Freunclich e das Equações 6, 8 e 9. A partir disso, considerando-se que o carvão 2 apresentou os melhores resultados para adsorção da microcistina e que obteve melhor ajuste com o modelo de Freundlich (maior R^2), foi possível efetuar o pré-dimensionamento de um filtro de CAG em escala laboratorial considerando-se uma vazão de 51 $L.dia^{-1}$ e uma concentração afluente de 100 $\mu g.L^{-1}$ de microcistina (C_e). As etapas dos cálculos são descritas conformes os itens abaixo.

i. Dados do carvão:

$$k = 268{,}0402$$

$$\frac{1}{n} = 0{,}7219$$

$$Massa\ específica\ aparente\ (\rho) = 0{,}5573\ g.cm^{-3} = 557{,}3\ g.L^{-1}$$

ii. Equação 6 para $q_e = q_{eo}$, tem-se:

$$q_{eo} = 268{,}0402\ (mg.g^{-1}).(L.mg^{-1})^{0{,}7219}.0{,}1\ (mg.L^{-1})^{0{,}7219}$$

$$q_{eo} = 50{,}8510\ mg.g^{-1}$$

iii. Equação 8, com $C_e = 0$:

$$TV = \frac{50{,}8510\ (mg.g^{-1}).557{,}3\ (g.L^{-1})}{0{,}1\ (mg.L^{-1})}$$

$$TV = 283.392{,}9\ L\ água\ .L\ CAG^{-1}$$

iv. Equação 9:

$$TU = \frac{0{,}1\ (mg.L^{-1})}{50{,}8510\ (mg.g^{-1})}$$

$$TU = 0{,}001966\ g\ CAG\ .L\ água\ tratada^{-1}$$

v. Tempo assumido de regeneração do CAG: 2 anos

vi. Volume total de água que passará pela coluna em 2 anos (Equação 10):

$$V_{água} = 51\ (L.dia^{-1}).365\ (dias.ano^{-1}).2\ (anos) = \ 37.230\ L\ água$$

vii. Volume de carvão necessário (V_{CAG}) (Equação 11):

$$V_{CAG} = \frac{37.230\ (L\ água)}{283.392{,}9\ (L\ água.L\ CAG^{-1})}$$

$$V_{CAG} = 0{,}1314\ L\ CAG$$

$$Massa\ de\ CAG = 557{,}3\ (kg.m^{-3}).0{,}1314.10^{-3}\ (m^3\ CAG) = \ 0{,}0732\ kg\ CAG$$

viii. Taxa de aplicação superficial assumida: 180 $m^3.m^{-2}.dia^{-1}$

ix. Área da coluna em planta (A_{CP}) (Equação 12):

$$ACP = \frac{51\ .\ 10^{-3}\ (m^3.dia^{-1})}{180\ (m^3.m^{-2}.dia^{-1})}$$

$$ACP = 2{,}8334\ .\ 10^{-4}\ m^2$$

x. Altura da coluna (H_C) (Equação 13):

$$H_C = \frac{0{,}1314\ .\ 10^{-3}\ (m^3\ CAG)}{2{,}8332\ .\ 10^{-4}\ (m^2)}$$

$$H_C = 0{,}4637\ m = 46{,}37\ cm$$

Ou seja, para a continuação da pesquisa com o uso do carvão 2 em projetos de filtros de bancada, é suficiente um filtro com altura de leito de CAG de aproximadamente 47 cm e diâmetro de 19 mm (área em planta de 2,8 cm^2), com vazão de 51 $L.dia^{-1}$ e concentração afluente de microcistina de 100 $\mu g.L^{-1}$.

5.4 Ensaio de biodegradação

A etapa de biodegradação foi monitorada ao longo de seis dias. A concentração inicial de toxina foi de 75 $\mu g.L^{-1}$, enquanto que a concentração ao final do experimento pode ser observada, para cada caso, na Tabela 9.

Tabela 9 - Concentração de microcistina final ($\mu g.L^{-1}$) nas diferentes condições testadas no experimento de biodegradação

Gêneros das bactérias inoculadas	**Concentração de microcistina ($\mu g.L^{-1}$) (dia 6)**	
	Esterilizada	**Sem esterilizar**
Sphingomonas sp.	*	1,7
Brevundimonas sp.	*	1,6
Sphingomonas sp. + *Brevundimonas* sp.	*	2,2
Controle	*	4,4

* Não houve remoção

Constatou-se que em todas as condições em que foi adicionada a toxina esterilizada, não foi observada biodegradação, uma vez que as concentrações não diminuíram ao final do experimento. Isso sugere que as espécies estudadas neste caso não atuaram na degradação da microcistina.

Ao analisar os resultados obtidos a partir dos estudos com a toxina bruta, ou seja, sem esterilização, houve uma queda acentuada da concentração de toxina ao final do experimento, quase chegando à completa degradação da toxina em todas as condições testadas (máxima eficiência de 98%). Esse resultado sugere que a degradação não ocorreu somente devido às bactérias inoculadas, uma vez que houve queda de microcistina também para o controle, que continha apenas o extrato de toxina e o meio de cultura. Esse fato indica a existência de algum microrganismo ou substância presente no extrato de microcistina utilizado que seja capaz de degradar eficientemente a própria toxina, levantando hipóteses sobre esse fenômeno. Vale relembrar que o extrato de toxina utilizado foi extraído da cultura de *M. aeruginosa* realizada sem condições de assepsia.

O estudo realizado por Wilhelm et al. (2011) no lago Tai em Taihu (China) correlacionou dados de nutrientes, concentração de cianotoxinas e de comunidades microbianas presentes neste lago eutrofizado. Os resultados indicaram uma forte correlação

entre a concentração de microcistina e a diversidade de bactérias, sugerindo que as bactérias podem estar relacionadas com eventos de florações ou estarem associadas à disponibilidade de nutrientes no sistema aquático. Diante desse resultado e considerando o resultado obtido no ensaio de biodegradação do presente trabalho, é possível presumir a coexistência entre bactérias e microcistina, presentes no extrato bruto.

A partir disso, outra hipótese levantada foi que, além da coexistência da toxina com algum microrganismo, se seria possível que este fosse capaz de degradar a própria toxina ao longo do tempo. O trabalho de Giaramida et al. (2013) vai ao encontro dessa hipótese, uma vez que foi investigado se a exposição à microcistina era capaz de afetar a comunidade microbiológica presente em seis lagos escoceses. Os resultados indicaram que não só a microcistina foi capaz de afetar a fisiologia e a estrutura da comunidade bacteriana, como também a estrutura da comunidade estava associada com a meia vida da microcistina. Isto porque devido à alteração ocasionada, as comunidades passam então a ser capazes de degradar própria toxina. Simultaneamente, o trabalho de Edwards et al. (2008) demonstrou que o fenômeno de biodegradação não depende necessariamente de exposição prévia de algum microrganismo à toxina. Isto porque na pesquisa foram coletadas amostras de quatro lagos e dois rios. Todos os lagos tinham histórico de ocorrência de *blooms* de cianobactérias, sendo que em três deles também já foi detectada microcistina, enquanto que os rios não tinham nenhum histórico de *bloom* ou toxina. Foi adicionada microcistina às amostras a fim de verificar a biodegradação e em todos os casos a microcistina foi degradada.

Apesar de não terem sido encontrados trabalhos que relatem a capacidade da *Brevundimonas* sp. de promover a degradação da microcistina, diversos autores identificaram espécies de *Shingomonas* sp. capazes disso, ainda que normalmente essas espécies degradem apenas variantes específicas da microcistina, como observado por Imanishi et al. (2005) e Valeria et al. (2006).

O estudo de Imanishi et al. (2005) indicou que as enzimas das bactérias *Sphingomonas sp.* (cepa B-9) que degradam a toxina, hidrolisam, de forma seletiva, a ligação peptídica Adda presente na estrutura dos peptídeos cíclicos de algumas cianotoxinas, e, portanto, as toxinas que não possuem essa ligação peptídica, não são degradadas. Os autores explicaram que o processo de degradação da MC-LR consiste em uma sequência de hidrólises das ligações peptídicas Arg-Adda, Ala-Leu e Adda-Glu, formando três subprodutos não tóxicos, dentre eles, o Adda. Na pesquisa, foi isolada a cepa B-9 do gênero *Sphingomonas* sp. do lago Tsukui (Japão) que é capaz de degradar a MC-LR até a formação do subproduto atóxico Adda. Ao inocular a cepa com microcistinas e nodularinas, foi observado que os peptídeos cíclicos que

continham a ligação peptídica Arg-Adda foram quase que completamente degradados até Adda. Entretanto, a MC-LF, que continha a ligação peptídica Phe-Adda no lugar da Arg-Adda, e a 6(Z)-Adda-MC-LR e 6(Z)-Adda-MC-RR, que são isômeros geométricos do resíduo Adda, não foi degradada.

Ishii, Nishijima e Abe (2004) observaram que a bactéria 7CY, também do gênero *Sphingomonas* sp., foi capaz de degradar completamente a MC-LF e outras variantes (–LY, –LW, –LF e –LR). Portanto, não houve influência da presença da ligação peptídica Arg-Adda, como descrito por Imanishi et al. (2005). Entretanto, foi observado que a bactéria só foi capaz de degradar a nodularina-Har (variante de nodularina que possui a homoarginina no lugar da arginina) na presença da MC-RR. Isto porque a degradação da nodularina-Har ocorreu por outra enzima bacteriana, advinda ou da MC-RR ou dos produtos da degradação desta.

Valeria et al. (2006) isolaram uma espécie de *Sphingomonas* sp. (CBA4) do reservatório de São Roque (Córdoba, Argentina), que foi capaz de degradar completamente 200 $\mu g.L^{-1}$ de MC-RR em 36 h. Os autores observaram que a biodegradação ocorreu inicialmente pela desmetilação da MC-RR, gerando subprodutos que foram degradados em até 72 h. Além disso, citaram que essa forma inicial de degradação não havia sido documentada anteriormente e, portanto, demonstraram a possibilidade de diferentes vias de degradação para cada variante de microcistina.

Hu et al. (2012) verificaram a potencialidade da cepa EMB, isolada na cidade de Wuxi Taihu (China) e membro do grupo *Bacillus* sp., em degradar as variantes MC-RR e MC-LR com concentrações iniciais de 2,99 e 2,15 $mg.L^{-1}$, respectivamente. Foi constatada completa degradação em 24 h, sem fase lag. De acordo com os autores, este gênero ainda não tinha sido reportado como capaz de degradar a microcistina. Análises indicaram que esta espécie continha gene homólogo ao *mlrA*, que codifica uma enzima específica capaz de romper o peptídeo cíclico da toxina. Estudos de Saito et al. (2003) detectaram genes homólogos ao *mlrA* em outras bactérias do gênero *Sphingomonas* sp. (MD-1 e Y2) e que são capazes de degradar a toxina. As bactérias MD-1 e Y2 foram isoladas dos lagos japoneses Kasumigaura e Suwa, respectivamente. Os autores afirmam que isto já tinha sido relatado para a *Sphingomonas* sp. (MJ-PV), isolada de um lago australiano.

O gene *mlrA* também foi reportado por Alamri (2012), presente na bactéria *Bacillus flexus* (SSZ01). A bactéria, isolada do lago Tendaha (Arábia Saudita), foi capaz de degradar completamente uma concentração inicial de MC-RR de 10 $mg.L^{-1}$ em quatro dias. Dziga et al. (2016) confirmaram que a presença dos genes do grupo *mlr* em algumas bactérias está relacionada com a degradação da microcistina, sendo as enzimas MlrA, MlrB e MlrC

responsáveis por isto. O que acontece, de acordo com os pesquisadores, é que a enzima específica MlrA lineariza a molécula de microcistina. Deste modo, as enzimas MlrB e MlrC degradam os heptapeptídeos até a formação de aminoácidos individuais.

Diante das hipóteses levantadas e dos estudos apresentados, há indícios da existência de algum microrganismo presente no extrato de toxina bruto que seja capaz de degradá-la (isoladamente ou associado a outro microrganismo) eficientemente em tempo relativamente curto. Este microrganismo pode, por exemplo, possuir o gene *mlr*, capaz de degradar a microcistina. Existe também a possibilidade das espécies inoculadas serem capazes de degradar na presença de alguma enzima, e, portanto, esta enzima estar presente no extrato bruto. A junção dessas possibilidades também poderia ocorrer, ou seja, coexistência de microrganismo e de enzima específica no extrato bruto, que os tornam capazes de degradar a toxina independente das espécies de bactérias inoculadas. Não foi possível neste trabalho realizar o levantamento e a identificação do responsável pela degradação, entretanto, torna-se de grande interesse sua identificação em futuras pesquisas.

6. CONCLUSÕES

Com base na avaliação laboratorial da remoção de microcistina pelos processos de adsorção com carvão ativado granular e biodegradação com vistas ao tratamento avançado de águas de abastecimento, foi possível concluir que:

- As condições de cultivo da cepa de *M. aeruginosa* influenciaram na produção de microcistina. Como o objetivo do cultivo foi a extração da toxina para utilização nos ensaios de adsorção, foi vantajosa a identificação da condição de maior produção de toxina, sendo ela: 10% de inóculo da *M. aeruginosa* (BB005) cultivada ao longo de 30 dias em meio de cultura WC, 24°C, fotoperíodo de 12 h;

- O melhor resultado de adsorção de toxina foi obtido pelo carvão de origem mineral. Diante das características e condições avaliadas, sua melhor capacidade foi relacionada, entre outras características, com o maior volume de microporos e presença de mesoporos. A porcentagem de microporos presente em sua estrutura foi estimada pela isoterma de adsorção de N_2 e indiretamente pelo Número de Iodo, sendo o carvão de origem mineral o único, dentre os analisados, que esteve acima do limite estabelecido pela ABNT (1991) (600 $mgI_2.g^{-1}$). Além disso, foi observado maior valor de IAM e distribuição de poros mais ampla, caracterizando também a presença de mesoporos em sua estrutura;

- Nos ensaios de biodegradação, foi observado que a molécula de microcistina pode ser degradada, apesar dos resultados indicarem que as espécies de bactérias inoculadas (*Sphingomonas* sp. e *Brevundimonas* sp.) não foram capazes disso isoladamente. O ensaio com uso da toxina sem esterilização resultou em quase completa degradação em um tempo relativamente curto, levantando algumas hipóteses sobre essa ocorrência, tais como: existência de microrganismo presente no extrato de toxina bruto capaz de degradá-la; presença de enzima no extrato bruto que permitiu que as espécies de bactérias inoculadas degradassem a toxina; presença de microrganismo e enzima específica, ambos no extrato bruto, responsáveis pela degradação.

- Recomenda-se o aprofundamento dos estudos de adsorção com o carvão de origem mineral em escala maior, ou seja, filtro de leito fixo. Para isso, foi pré-dimensionado um filtro

com altura de leito de CAG de aproximadamente 47 cm e diâmetro de 19 mm, considerando-se uma vazão de 51 $L.dia^{-1}$ e concentração afluente de microcistina de 100 $\mu g.L^{-1}$. Deste modo, será possível observar o comportamento do fenômeno de adsorção em escala mais próxima à real, avaliar a influência de fatores intervenientes sobre seu funcionamento, bem como encontrar condições que aumentem sua eficiência.

- Recomenda-se também o aprofundamento das análises para identificação do microrganismo e/ou enzima que foi responsável pela biodegradação da toxina de forma eficiente. Diante dos resultados, também será possível estudar o fenômeno de biodegradação em filtros, ao permitir que haja formação de biofilme no leito do carvão ativado. A partir disso, torna-se interessante verificar a eficiência do carvão ativado a partir dos processos de remoção física (adsorção) e de remoção biológica (biodegradação) e, portanto, comparar qual processo se apresenta mais vantajoso para o tratamento avançado de águas de abastecimento para remoção de microcistina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAMRI, S. A. Biodegradation of microcystin-RR by *Bacillus flexus* isolated from a Saudi freshwater lake. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 4, p. 435 – 440, 2012.

ALBUQUERQUE JÚNIOR, E. C.; MENDEZ, M. O.; COUTINHO, A. R.; FRANCO, T. T. Equilíbrio termodinâmico e cinético de adsorção da [D-Leucina[1]]Microcistina-LR por carvão. *In*: XXXII Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados, 2006. **Anais...** ENEMP 2006, Maringá, PR, 2006.

ALMEIDA, A.R. **Estudo da retenção da toxina de *Microcystis aeruginosa* no bagaço de cana-de-açucar e no carvão ativado**. 2015. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

ALVES, M. G. **Degradação da microcistina-XR por bactérias isoladas de sistema de abastecimento público de água**. 2011. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2011.

AMÉ, M. V.; ECHENIQUE, J. R.; PFLUGMACHER, S.; WUNDERLIN, D. A. Degradation of Microcystin-RR by *Sphingomonas* sp. CBA4 isolated from San Roque reservoir (Córdoba – Argentina). **Biodegradation**, v. 17, n. 5, p. 447 – 455, 2006.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). *ASTM D 3860-98 (2014)*: Standard Practice for Determination of Adsorptive Capacity of Activated Carbon by Aqueous Phase Isotherm Technique. West Conshohocken, PA, 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS (ABNT). *ABNT EB-2133*. Especificação do carvão ativado pulverizado. Rio de Janeiro, 1991.

_____. *ABNT MB-3410*. Determinação do número de iodo. Rio de Janeiro, 1991.

_____. *ABNT MB-3413*. Determinação da massa específica aparente. Rio de Janeiro, 1991.

_____. *ABNT MB-3414*. Determinação da umidade. Rio de Janeiro, 1991.

AWWA – American Water Works Association. **Water treatment plant design**. Capítulo 16: Activated carbon adsorption (BRADY, R.; MORAN, M.). Colorado: McGraw-Hill, 5ª ed, 2012.

AZEVEDO, S. M. F. O.; CHARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, S.; SHAW, G. R.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru – Brazil. **Toxicology**, v. 181, p. 441 – 446, 2002.

BARTON, S. S. The adsorption of methylene blue by active carbon. **Carbon**, v. 25, n. 3, p. 343 – 350, 1987.

BERNARD, C. Les cyanobactéries et leurs toxines. **Revue francophone des laboratoires**, n. 460, p. 53 – 68, 2014.

BORTOLI, S.; PINTO, E. Cianotoxinas: características gerais, histórico, legislação e métodos de análises. *In*: **Ecologia de reservatórios e interfaces**. Orgs: POMPÊO, M.; MOSCHINI-CARLOS, V.; NISHIMURA, P. Y.; SILVA, S. C. DA; DOVAL, J. C. L. – São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, v. 12, 460 p., 2015

BRANDÃO, C. C. S.; SILVA, A. S. Remoção de cianotoxinas por adsorção em carvão ativado. *In*: **Contribuição ao estudo da remoção de cianobactérias e microcontaminantes orgânicos por meio de técnicas de tratamento de água para consumo humano**. Valter Lucio de Padua (coordenador). Programa de Pesquisas em Saneamento Básico - PROSAB/FINEP, p. 415 – 465, 2006.

BRASIL, C. P. **Avaliação da Remoção de Microcistina em Água de Abastecimento Público por Diferentes Carvões Ativados em Pó Produzidos no Brasil.** 2004. 114 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) – Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2004.

BRASIL, C. P.; BRANDÃO, C. C. S. Avaliação da remoção de microcistina em água de abastecimento público por diferentes carvões ativados em pó produzidos no Brasil. *In:* 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. **Anais eletrônicos**... Campo Grande, MS, 2005.

BRASIL. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 dez. 2011.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, n. 2, p. 309 – 319, 1938.

BUCHANAN, W.; RODDICK, F.; PORTER, N. Removal of VUV pre-treated natural organic matter by biologically activated carbon columns. **Water Research**, v. 42, n. 13, p. 3335 – 3342, 2008.

CALIJURI, M do C.; ALVES, M. S. A.; SANTOS, A. C. A dos. **Cianobactérias e Cianotoxinas em Águas Continentais**. São Carlos, ed Rima, 109 p., 2006.

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

CASSINI, S. T. A.; ANTUNES, P. W. P.; KELLER, R. Validação de método analítico livre de acetonitrila para análise de microcistinas por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1208 – 1213, 2013.

CHEN, L.; CHEN, J.; ZHANG, X.; XIE, P. A review of reproductive toxicity of microcystins. **Journal of Hazardous Materials**, v. 301, p. 381 – 399, 2016.

CHORUS, I., BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water**. WHO, E. and F.N. Spoon, London and New York, 1999.

COELHO, E. R. C.; VAZZOLER, H.; LEAL, W. P. Emprego do carvão ativado para remoção de atrazina em água de abastecimento público. **Engenharia Sanitária e Ambiental** , v.17, n.4, p. 421 – 428, 2012.

COOK, D.; NEWCOMBE, G. Removal of microcystin variants with powdered activated carbon. **Water Science Techonology: Water Supply**, v. 2, n. 5-6, p. 201 – 207, 2002.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A. Di B. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. São Carlos: RiMa, v. 2, 2ª ed, 792 p., 2005.

DONATI, C.; DRIKAS, M.; HAYES, R.; NEWCOMBE, G. Microcystin-LR adsorption by powdered activated carbon. **Water Research**, v. 28, n. 8, p. 1735 – 1742, 1994.

DZIGA, D.; WASYLEWSKI, M.; WLADYKA, B.; NYBOM, S.; MERILUOTO, J. Microbial degradation of microcystins. **Chemical Research in Toxicology**, v. 26, n. 6, p. 841 – 842, 2013.

DZIGA, D.; ZIELINSKA, G.; WLADYKA, B.; BOCHENSKA, O.; MAKSYLEWICZ, A.; STRZALKA, W.; MERILUOTO, J. Characterization of Enzymatic Activity of MlrB and MlrC Proteins Involved in Bacterial Degradation of Cyanotoxins Microcystins. **Toxins**, v. 8, n. 3, p. 76, 2016.

EDWARDS, C.; GRAHAM, D.; FOWLER, N.; LAWTON, L. A. Biodegradation of microcystins and nodularin in freshwaters. **Chemosphere**, v. 73, n. 8, p. 1315 – 1321, 2008.

ELEUTERIO, L.; BATISTA, J. R. Biodegradation studies and sequencing of microcystin-LR degrading bacteria isolated from a drinking water biofilter and a fresh water lake. **Toxicon**, v. 55, n. 8, p. 1434 – 1442, 2010.

GAUTANM, P. K.; GAUTAM, R. K.; MBANERJEE, S.; LOFRANO, G.; SANROMAN, A.; CHATTOPADHYAYA, M. C.; PANDEYM J. D. Preparation of activated carbon from Alligator weed (*Alternenthera philoxeroids*) and its application for tartrazine removal: Isotherm, kinetics and spectroscopic analysis. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 3, n. 4, p. 2560 – 2568, 2015.

GAVRILESCU, M.; DEMNEROVÁ, K.; AAMAND, J.; AGATHOS, S.; FAVA, F. Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. **New Biotechnology**, v. 31, p. 1 – 10, 2014.

GIARAMIDA, L.; MANAGE, P. M.; EDWARDS, C.; SINGH, B. K.; LAWTON, L. A. Bacterial communities' response to microcystins exposure and nutrient availability: Linking degradation capacity to community structure. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 84, p. 111 – 117, 2013.

GIRALDI, L. A. **Efeitos da concentração de micronutrients no crescimento e na produção de saxitoxina em *Cylindrospermopsis raciborskii***. 2014. 119 f. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

GKELIS, S.; ZAOUTSOS, N. Cyanotoxin occurrence and potentially toxin producing cyanobacteria in freshwaters of Greece: A multi-disciplinary approach. **Toxicon**, v. 78, p. 1 – 9, 2014.

GOMES, A. M. da A.; OLIVEIRA, A. C. P. de; AZEVEDO, S. M. F. de O. e. Efeito de diferentes concentrações de carbono orgânico dissolvido e bactérias na degradação de microcistinas (cianotoxina). **Oecologia Brasiliensis**, v. 13, n. 2, p. 402 – 412, 2009.

GORHAN, P.; MACLACHLAV, J.R.; HAMMER, V.T.; KIM, W. K. Isolation and culture of toxic strains of Anabaena flos-aquae (Lyngb.) de Bréb. Verh. **Internationale Vereinigung fuer Theoretische und Angewandte Limnologie Verhandlungen**, v. 15, p. 796 – 804, 1964.

GUERRA, A. de B. **Avaliação em escala de bancada do emprego de carvão ativado granular na remoção de microcistina-LR na potabilização de águas eutrofizadas do semiárido nordestino**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Centro de Ciências e Tecnologias, Universidade Estadual da Paraíba, PB, 2012.

GUERRA, A. de B.; TONUCCI, M. C.; CEBALLOS, B. S. O. de; GUIMARÃES, H. R. C.; LOPES, W. S.; AQUINO, S. F. de; LIBÂNIO, M. Remoção de microcistina-LR de águas eutrofizadas por clarificação e filtração seguidas de adsorção em carvão ativado granular. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 20, n. 4, p. 603 – 612, 2015.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllid-c. **Journal of Phycology**, v. 8, p. 10 – 14, 1972.

HALL, K.; EAGLETON, L. C.; ACRIVOS, A.; VERMEULEN, T. Pore- and solid-diffusion kinetics in fixed-bed adsorption under constant- pattern conditions. **Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals**, v. 5, n. 2, p. 212 – 223, 1966.

HAMEED, B.H. ; SALMAN, J.M.; AHMAD, A.L. Adsorption isotherm and kinetic modeling of 2,4-D pesticide on activated carbon derived from date stones. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, n. 1, p. 121–126, 2009.

HAUSER-DAVIS, R. A.; LAVRADAS, R. T.; LAVANDIER, R. C.; ROJAS, E. G. A.; GUARINO, A. W. S.; ZIOLL, R. L. Accumulation and toxic effects of microcystin in tilapia (*Oreochromis niloticus*) from an eutrophic Brazilian lagoon. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 112, p. 132 – 136, 2015.

HO, L.; GRASSET, LAMBLING, P.; BUSTAMANTE, H.; DUKER, P.; NEWCOMBE, G. Application of powdered activated carbon for the adsorption of cylindrospermopsin and microcystin toxins from drinking water supplies. **Water Research**, v. 45, n. 9, p. 2954 – 2964, 2011.

HO, L.; TANG, T.; MONIS, P.T.; HOEFEL, D. Biodegradation of multiple cyanobacterial metabolites in drinking water supplies. **Chemosphere**, v. 87, n. 10, p. 1149 – 1154, 2012.

HU, L.; ZHANG, F.; LIU, C.; WANG, M. Biodegradation of Microcystins by *Bacillus* sp. strain EMB. **Energy Procedia**, v. 16, p. 2054 – 2059, 2012.

HUANG, W-J.; CHENG, B-L.; CHENG, Y-L. Adsorption of microcystin-LR by three types of activated carbon. **Journal of Hazardous Materials**, v. 141, n. 1, p. 115 – 122, 2007.

IMANISHI, S.; KATO, H.; MIZUNO, M.; TSUJI, K.; HARADA, K. Bacterial Degradation of Microcystins and Nodularin. **Chemical Research in Toxicology**, v. 18, n. 3, p. 591 – 598, 2005.

ISHII, H.; NISHIJIMA, M.; ABE, T. Characterization of degradation process of cyanobacterial hepatotoxins by a gram-negative aerobic bacterium. **Water Research**, v. 38, n. 11, p. 2667 – 2676, 2004.

IUPAC (1985). Recommendations for the Characterization of Porous Solids. *In*: **Pure and applied chemistry**, v. 57, n. 4, p. 603 – 619, 1985.

JAGUARIBE, E. F.; MEDEIROS, L. L.; BARRETO, M. C. S.; ARAUJO, L. P. The performance of activated carbons from sugarcane bagasse, babassu, and coconut shells in removing residual chlorine. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 22, n. 1, p. 41 – 47, 2005.

JAPANESE INDUSTRIAL STANDARD (JIS). *JIS K 1474*: Test methods for activated carbon. Tokyo, 2014.

JIANG, J. Q.; ZHOU, Z.; SHARMA, V. K. Occurrence, transportation, monitoring and treatment of emerging micro-pollutants in waste water — A review from global views. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 292 – 300, 2013.

JURCZAK, T.; TARCZYNSKA, M.; IZYDORCZYK, K.; MANKIEWICZ, J.; ZALEWSKI, M.; MERILUOTO, J. Elimination of microcystins by water treatment processes — examples from Sulejow Reservoir, Poland. **Water Research**, v. 39, n. 11, p. 2394 – 2406, 2005.

KONER, S.; PAL, A.; ADAK, A. Use of Surface Modified Silica gel factory Waste for Removal of 2,4-D Pesticide from Agricultural Wastewater: A case study. **Internacional Journal of Environmental Research**, v. 6, n. 4, p. 995 – 1006, 2012.

KURODA, E. K. **Remoção de células e subprodutos de *Microcystis* spp. por dupla filtração, oxidação e adsorção**. 2006. 267 f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Departamento de Hidráulica e Saneamento. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2006.

KURODA, E.K.; ALBUQUERQUE JR., E. C.; DI BERNARDO, L.; TROFINO, C. J. Caracterização e escolha do tipo de carvão ativado a ser empregado no tratamento de águas contendo microcistinas. *In*: 23° Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Campo Grande. **Anais** eletrônicos I-072, p. 1 – 9, 2005.

LEE, J.; WALKER, H.W. Effect of process variables and natural organic matter on removal of microcystin-LR by PAC-UF. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 23, p. 7336 – 7342, 2006.

LÉVESQUE, B.; GERVAIS, M.C.; CHEVALIER, P.; GAUVIN, D.; ANASSOUR-LAOUAN-SIDI, E.; GINGRAS, S.; FORTIN, N.; BRISSON, G.; GREER, C.; BIRD, D.

Prospective study of acute health effects in relation to exposure to cyanobacteria. **Science of the Total Environment**, v. 466, p. 397 – 403, 2014.

LI, J.; SHIMIZU, K.; AKASAKO, H.; LU, Z.; AKIYAMA, S.; GOTO, M.; UTSUMI, M.; SUGIURA, N. Assessment of the factors contributing to the variations in microcystins biodegradability of the biofilms on a practical biological treatment facility. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 463 – 472, 2015.

LI, X.; XU, L.; ZHOU, W.; ZHAO, Q.; WANG, Y. Chronic exposure to microcystin-LR affected mitochondrial DNA maintenance and caused pathological changes of lung tissue in mice. **Environmental Pollution**, v. 210, p. 48 – 56, 2016.

LIMA, L. **Avaliação da remoção de sulfametoxazol, diclofenaco e 17β-estradiol em águas por adsorção em carvão ativado granular**. 2014. 78 f. Dissertação (mestrado em Engenharia Civil). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Ilha Solteira, São Paulo, Brasil, 2014.

MA, M.; LIU, R.; LIU, H.; QU, J. Chlorination of Microcystis aeruginosa suspension: Cell lysis, toxin release and degradation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 217, p. 279 – 285, 2012.

MAGHSOUDI, E.; PRÉVOST, M.; VO DUY, S.; SAUVÉ, S.; DORNER, S. Adsorption characteristics of multiple microcystins and cylindrospermopsin on sediment: Implications for toxin monitoring and drinking water treatment. **Toxicon**, v. 103, p. 48 – 54, 2015.

MARSOLLA, L. D. **Avaliação da adsorção do herbicida 2,4-D em carvão ativado em pó utilizando água com diferentes qualidades**. 2015. 105 f. Dissertação (mestrado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Tecnológico, Vitória, ES, 2015.

MASSCHELEIN, W. J. **Unit Processess in Drinking Water Treatment**. Environmental Science and Pollution Control Series; 3. Marcel Dekker, INC, 1992.

MCCABE, W. L.; SMITH, J. C.; HARRIOTT, P. **Unit operations of chemical engineering**. New York: McGraw-Hill, 1993.

MEREL, S.; WALKER, D.; CHICANA, R.; SNYDER, S.; BAURÈS, S.; THOMAS, O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. **Environment International**, v. 59, p. 303 – 327, 2013.

MINILLO, A.; FREITAS, S. C. de; ISIQUE, W. D.; PRADO, H. F. A. do; DIMITROV, M. R.; PAIXÃO, D. A. A.; LEMOS, E. G. de M.; TANGERINO, E. P. Biodegradação da hepatotoxina (D-Leu1)-microcistina-LR por bactérias presentes em filtros biológicos de carvão. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 18, n. 3, p. 205 – 214, 2013.

MOHAMED, Z. A.; CARMICHAEL, W. W.; EL-SHAROUNY, H. M. Activated Carbon removal efficiency of microcystins in an aqueous cell extract of *Microcystis aeruginosa* and *Oscillatoria tenuis* strains isolated from Egyptian freshwaters. **Environmental Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 197 – 201, 1999.

MORAIS, A. de A. **Avaliação de Técnicas Convencionais de Tratamento de Água para consumo humano na remoção de cianobactérias e cianotoxinas e processos oxidativos para remoção de microcistinas**. 2012. 159 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

MÜLLER, C. C. **Avaliação da utilização de carvão ativado em pó na remoção de microcistina em água para abastecimento público**. 2008. 121 f. Dissertação (mestrado em Ecologia) – Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2008.

MÜLLER, C.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T.; CYBIS, L. F. Adsorção em carvão ativado em pó para remoção de microcistina de água de abastecimento público. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 14, n. 1, p. 29 – 38, 2009.

MURANAKA, C. T. **Combinação de adsorção por carvão ativado com Processo Oxidativo Avançado (POA) para tratamento de efluentes contendo fenol.** 2010. 165 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2010.

OLIVEIRA, A. C. P. de O.; AZEVEDO, S. M. F. de O. Avaliação da Capacidade de Adsorção e Saturação de Microcistinas Por Carvão Ativado Granular Utilizados em Sistema de Purificação de Água de Centro de Diálise. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 26, n. 3, p. 121 – 128, 2004.

PAL, A.; HE, Y.; JEKEL, M.; REINHARD, M.; GIN, K. Y-H. Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. **Environment International**, v. 71, p. 46 – 62, 2014.

PANTELIĆ, D.; SVIRČEV, Z.; SIMEUNOVIĆ, J.; VIDOVIĆ, M.; TRAJKOVIĆ, I. Cyanotoxins: Characteristics, production and degradation routes in drinking water treatment with reference to the situation in Serbia. **Chemosphere**, v. 91, n.4, p. 421 – 441, 2013.

PARK, H. D.; SASAKI, Y.; MARUYAMA, T.; YANAGISAWA, E.; HIRAISHI, A.; KATO, K. Degradation of the Cyanobacterial Hepatotoxin Microcystin by a New Bacterium Isolated from a Hypertrophic Lake. **Environmental toxicology**, v. 16, n. 4, p. 337 – 343, 2001.

PENDLETON, P.; SCHUMANN, R.; WONG, S. H. Microcystin-LR Adsorption by Activated Carbon. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 240, n. 1, p. 1 – 8, 2001.

PIZA, A. V. de T. **Avaliação da capacidade adsortiva de carvões ativados para a remoção de diuron e hexazinona**. 2008. 103 f. Dissertação (mestrado em Tecnologia Ambiental) – Departamento de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental. Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 2008.

PREECE, E. P.; MOORE, B. C.; HARDY, F. J. Transfer of microcystin from fresh water lakes to Puget Sound, WA and toxin accumulation in marine mussels (*Mytilus trossulus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 98 – 105, 2015.

PUDDICK, J.; PRINSEP, M.R.; WOOD, S.A.; KAUFONONGA, S.A.F.; CARY, S.C.; HAMILTON, D.P. High levels of structural diversity observed in microcystins from

Microcystis CAWBG11 and characterization of six new microcystin congeners. **Marine Drugs**, v. 12, n. 11, p. 5372 – 5395, 2014.

PYO, D.; MOON, D. Adsorption of Microcystin LR by Activated Carbon Fibers. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 26, n. 12, p. 2089 – 2092, 2005.

REALI, M. A. P.; PAZ, L. P. S.; DANIEL, L. A. Tratamento de água para consumo humano. *In*: **Engenharia Ambiental: conceitos, tecnologia e gestão** / *Coord:* CALIJURI, M. do C.; CUNHA, D. G. F. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

RIPPKA, R.; J. DERUELLES; J. WATERBURY; M. HERDMAN; R. STANIER. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, n.1, p. 1 – 61, 1979.

RODRÍGUEZ, E.; ONSTAD, G. D.; KULL, T. P. J.; METCALF, J. S.; ACERO, J. L.; GUNTEN, U. V. Oxidative elimination of cyanotoxins: Comparison of ozone, chlorine, chlorine dioxide and permanganate. **Water Research**, v. 41, n.15, p. 3381 – 3393, 2007.

SAITO, T.; OKANO, K.; PARK, H.D.; ITAYAMA, T.; INAMORI, Y.; NEILAN, B. A.; BURNS, B. P.; SUGIURA, N. Detection and sequencing of the microcystin LR-degrading gene, *mlrA*, from new bacteria isolated from Japanese lakes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, n.2, p. 271 – 276, 2003.

SAKA, C. BET, TG–DTG, FT-IR, SEM, iodine number analysis and preparation of activated carbon from acorn shell by chemical activation with $ZnCl_2$. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 95, p. 21–24, 2012.

SALMAN, J.M.; HAMEED, B.H. Adsorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and carbofuran pesticides onto granular activated carbon. **Desalination**, v. 256, n. 1, p. 129 – 135, 2010.

SANCHES, S. M.; PRADO, E. L. do; FERREIRA, I. M.; BRAGA, H. F.; VIEIRA, E. M. Presença da toxina microcistina em água, impactos na saúde pública e medidas de controle. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 2, p. 181 – 187, 2012.

SANTOS, P. V. **Interação entre *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Microcystis aeruginosa*: implicações no crescimento de culturas e na produção de microcistinas**. 2009. 92f. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

SEDAN, D.; LAGUENS, M.; COPPARONI, G.; ARANDA, J. O.; GIANNUZZI, L.; MARRA, C. A.; ANDRINOLO, D. Hepatic and intestine alterations in mice after prolonged exposure to low oral doses of Microcystin-LR. **Toxicon**, v. 104, p. 26 – 33, 2015.

SHARMA, V. K.; TRIANTIS, T. M.; ANTONIOU, M. G.; HE, X.; PELAEZ, M.; HAN, C.; SONG, W.; O'SHEA, K. E.; CRUZ, A. A. de la; KALOUDIS, T.; HISKIA, A.; DIONYSIOU, D. D. Destruction of microcystins by conventional and advanced oxidation processes: A review. **Separation and Purification Technology**, v. 91, p. 3 – 17, 2012.

SILVA, A. C.; SOUZA, A. M.; DUTRA, I. S. Ocorrência de algas cianofíticas em água de dessedentação de bovinos criados extensivamente. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 5, p. 415 – 420, 2014.

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

TÖRÖKNE, A; ASZTALOS, M.; BÁNKINÉ, M.; BICKEL, H.; BORBÉLY, G.; CARMELI, S.; CODD, G. A.; FASTNER, J.; HUANG, Q.; HUMPAGE, A.; METCALF, J. S.; RÁBAI, E.; SUKENIK, A.; SURÁNYI, G.; VASAS, G.; WEISZFEILER, V. Interlaboratory comparison trial on cylindrospermopsin measurement. **Analytical Biochemistry**, v. 332, n. 2, p. 280 – 284, 2004.

VALERIA, A. M.; RICARDO, E. J.; STEPHAN, P; ALBERTO, W. D. Degradation of Microcystin-RR by *Sphingomonas* sp. CBA4 isolated from San Roque reservoir (Córdoba – Argentina). **Biodegradation**, v. 17, n. 15, p. 447 – 455, 2006.

VELTEN, S.; BOLLER, M.; KÖSTER, O.; HELBING, J.; WEILENMANN, H-U.; HAMMES, F. Development of biomass in a drinking water granular active carbon (GAC) filter. **Water Research**, v. 45, n. 19, p. 6347 – 6354, 2011.

VERAS, D. F. **Remoção dos perturbadores endócrinos 17β-estradiol e p-nonilfenol por Diferentes Tipos de Carvão Ativado em Pó (CAP) produzidos no Brasil – Avaliação em Escala de Bancada**. 2006. 135 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) – Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2006.

VIANA-VERONEZI, M.; GIANI, A.; MELO, C. da S.; GOMES, L. L.; LIBÂNIO, M. Avaliação da remoção de saxitoxinas por meio de técnicas de tratamento das águas de abastecimento. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 14, n. 2, p. 193 – 204, 2009.

WANG, H.; HO, L.; LEWIS, D. M.; BROOKES, J. D.; NEWCOMB, G. Discriminating and assessing adsorption and biodegradation removal mechanisms during granular activated carbon filtration of microcystin toxins. **Water Research**, v. 41, n. 18, p. 4262 – 4270, 2007.

WHO (1998). **Guidelines for drinking-water quality**, 2nd ed. Addendum to Vol. 2. Health criteria and other supporting information. World Health Organization, Geneva, 1998.

WIEGAND, C.; PFLUGMACHER, S. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, n. 3, p. 201 – 218, 2005.

WILHELM, S. W.; FARNSLEY, S. E.; LECLEIR, G. R.; LAYTON, A. C.; SATCHWELL, M. F.; DEBRUYN, J. M.; BOYER, G. L.; ZHU, G.; PAERL, H. W. The relationships between nutrients, cyanobacterial toxins and the microbial community in Taihu (Lake Tai), China. **Harmful Algae**, v. 10, n. 2, p. 207 – 215, 2011.

YAPSAKLI, K.; ÇEÇEN, F. Effect of type of granular activated carbon on DOC biodegradation in biological activated carbon filters. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 355 – 362, 2010.

YILMAZ, M.; PHLIPS, E. J.; SZABO, N. J.; BADYLAK, S. A comparative study of Florida strains of Cylindrospermopsis and Aphanizomenon for cylindrospermopsin production. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 130 – 139, 2008.

YOO, R. S.; CARMICHAEL, W. W.; HOEHN, R. C.; HRUDEY, S. E. **Cyanobacterial (blue-green algas) toxins: a resource guide.** American Water Works Association, 1995.

ZAGO, J. F. **Influência das características físico-químicas de carvões ativados na adsorção de saxitoxinas**. 2010. 182 f. Tese (Doutorado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos), Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2010.

ZAMYADI, A.; DORNER, S.; SAUVÉ, S.; ELLIS, D.; BOLDUC, A.; BASTIEN, C.; PRÉVOST, M. Species-dependence of cyanobacteria removal efficiency by different drinking water treatment processes. **Water Research**, v. 47, n. 8, p. 2689 – 2700, 2013.

ZHANG, M.; PAN, G.; YAN, H. Microbial biodegradation of microcystin-RR by bacterium *Sphingopyxis* sp. USTB-05. **Journal of Environmental Sciences,** v. 22, n.2, p. 168 – 175, 2010.

ZINDER, S. H.; CARDWELL, S. C.; ANGUISH, T.; LEE, M. KOCH, M. Methanogenesis in a thermophilic (58 C) anaerobic digestor: Methanothrix sp. as an important aceticlastic methanogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 796 – 807, 1984.