

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

**AVALIAÇÃO EM ESCALA PILOTO DA REMOÇÃO E DOS EFEITOS
DA CILINDROSPERMOPSINA NO DESEMPENHO DE FILTROS
LENTOS CONVENCIONAIS DE AREIA**

DANIEL VALENCIA-CÁRDENAS

ORIENTADORA: YOVANKA PÉREZ GINORIS

TESE DE DOUTORADO EM TECNOLOGIA AMBIENTAL E RECURSOS HÍDRICOS

PUBLICAÇÃO: PPGTARH.TD-029/2023

BRASÍLIA/DF: OUTUBRO – 2023

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

AVALIAÇÃO EM ESCALA PILOTO DA REMOÇÃO E DOS EFEITOS DA
CILINDROSPERMOPSINA NO DESEMPENHO DE FILTROS LENTOS
CONVENCIONAIS DE AREIA

DANIEL VALENCIA-CÁRDENAS

TESE SUBMETIDA AO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL
DA FACULDADE DE TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA COMO
PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM TECNOLOGIA AMBIENTAL E RECURSOS HÍDRICOS

AVALIADO POR:

(Assinado digitalmente)

Profª. Yovanka Pérez Ginoris, Doutora (ENC/UnB)
Orientadora

(Assinado digitalmente)

Profª. Raquel Moraes Soares, Doutora (ENC/UnB)
Examinadora Interna

(Assinado digitalmente)

Profª. Lyda Patricia Sabogal-Paz, Doutora (EESC/USP)
Examinadora Externa

(Assinado digitalmente)

Prof. Maurício Luiz Sens, Doutor (ENS/UFSC)
Examinador Externo

BRASÍLIA/DF, 26 DE OUTUBRO DE 2023

FICHA CATALOGRÁFICA

VALENCIA-CÁRDENAS, DANIEL

Avaliação em escala piloto da remoção e dos efeitos da cilindropermopsina no desempenho de filtros lentos convencionais de areia.

xxii, 125 p., 210 × 297 mm (ENC/FT/UnB, Doutor, Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, 2023). Tese de Doutorado – Universidade de Brasília.

Faculdade de Tecnologia.

Departamento de Engenharia Civil e Ambiental.

- | | |
|--|--------------------|
| 1. Filtração lenta convencional em areia | 4. Microbiota |
| 2. Cilindropermopsina | I. ENC/FT/UnB |
| 3. <i>Schmutzdecke</i> | II. Título (série) |

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

VALENCIA-CÁRDENAS, D. (2023). Avaliação em escala piloto da remoção e dos efeitos da cilindropermopsina no desempenho de filtros lentos convencionais de areia. Tese de Doutorado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Publicação PPGTARH.TD 029/2022, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília/DF, 125 p.

CESSÃO DE DIREITOS

Autor: Daniel Valencia-Cárdenas.

Título: Avaliação em escala piloto da remoção e dos efeitos da cilindropermopsina no desempenho de filtros lentos convencionais de areia.

Grau: Doutor

Ano: 2023

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

(Assinado digitalmente)

Daniel Valencia-Cárdenas

dvalenciacar@gmail.com

*À minha família,
Meus pais, María Eugenia Cárdenas e Luis Carlos Valencia,
e minha irmã Ana María Valencia Cárdenas,
O apoio incondicional de vocês iluminou o caminho durante toda a jornada deste doutorado.
Foram a motivação que me impulsionou a concluir essa etapa tão desafiadora. Cada conquista
é também de vocês.
Obrigado por estarem sempre ao meu lado.*

*À Carla Simone Vizzotto,
Nos momentos mais difíceis, você foi meu refúgio. Sua presença me deu as forças que precisava
para continuar. Você não apenas apoiou, mas também acreditou em mim quando eu duvidei de
mim mesmo. Sua generosidade fez com que o impossível se tornasse possível nesta tese.
Obrigado por fazer parte desta vitória.*

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta tese representa não apenas o fechamento de um capítulo acadêmico, mas também a celebração de uma jornada desafiadora, enriquecedora e repleta de aprendizados. Portanto, é imprescindível expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas extraordinárias cuja colaboração e apoio foram fundamentais para a concretização deste trabalho. Cada contribuição, por menor que fosse, moldou não apenas o desenvolvimento da tese, mas também a minha trajetória como pessoa e como pesquisador.

Em primeiro lugar, dedico um agradecimento especial à minha família, cujo apoio incondicional, carinho e motivação foram os alicerces que sustentaram todas as minhas conquistas. Seu constante encorajamento não apenas impulsionou meu percurso acadêmico, mas também teve um impacto significativo em minha formação como ser humano. As palavras são insuficientes para expressar minha gratidão pela presença constante e pelo amor durante esta jornada.

Hernán Martínez, agradeço profundamente por ter me proporcionado a oportunidade única de realizar minha pós-graduação no Brasil. Seu acolhimento durante os primeiros anos em um novo país não apenas facilitou minha adaptação, mas também criou as bases para uma experiência acadêmica e pessoal gratificante. Sua mentoria e apoio foram cruciais, e por isso, expresso minha eterna gratidão.

À minha orientadora e amiga Yovanka Pérez Ginoris, dirijo palavras de apreço pela confiança depositada em mim e por acreditar nas minhas ideias. Sua orientação, ensinamentos valiosos e generosidade enriqueceram todo o percurso desta pesquisa. Além disso, agradeço pela parceria e amizade que se formaram ao longo dos anos e que, sem dúvida, são tesouros que levarei comigo ao trilhar novos caminhos.

À Professora Raquel Soares mereço meu reconhecimento pelas orientações precisas e contribuições indispensáveis para o desenvolvimento desta tese. Sua dedicação e comprometimento foram refletidos não apenas no âmbito científico, mas também na construção de relações que enriqueceram minha experiência no meio acadêmico.

Agradeço à Professora Cristina Brandão pela sua criteriosidade e exigência que permitiram desenvolver com sucesso essa pesquisa. Agradeço também pela compreensão e paciência que teve durante os momentos mais críticos na realização desta tese. Levo comigo o tão grande exemplo de pessoa e docente, que hoje me motivam a seguir seus passos.

Ao Professor Ricardo Krüger e à Dra. Rafaella Silveira por toda a colaboração e as suas contribuições para que as análises por técnicas de biologia molecular e bioinformática fossem possíveis.

À Sara Kollar, à Carla Alves, à Cássia Cavalcante e à Katyeny Manuela Silva, expresso minha gratidão pela colaboração constante, tornando o ambiente de mais amigável. O suporte nas análises laboratoriais, a paciência demonstrada nos momentos mais desafiadores e as risadas compartilhadas ao longo dos anos facilitaram o desenvolvimento da tese e também criaram laços que transcendem as fronteiras profissionais.

Carla Vizzotto, seu apoio científico e emocional foi uma bússola constante em minha jornada. Agradeço por cada instante dessa amizade, pelas batalhas compartilhadas e pelo suporte inestimável. Sua presença foi uma fonte de inspiração e fortaleza.

Aos meus amigos Alice Pereira, Thais Argenta, Stephanie Íris, Thays Tsuji, Andreia Almeida, Sarah Brito e Maria Elisa Costa, devo um agradecimento caloroso pela amizade sincera que construímos. Cada risada compartilhada e cada desafio superado juntos trouxeram leveza aos dias mais intensos. Essa camaradagem guardarei com carinho em minha memória.

A Matheus Ferreira, meu agradecimento pela amizade que nasceu no laboratório e floresceu para além dele. Seu apoio, conselhos e exemplo de iluminaram meu caminho, tornando essa jornada mais rica e significativa.

Às minhas irmãs de consideração, Isabela Marques, Larissa Silva e Letícia Silva, agradeço por sempre acreditarem em mim, pela presença constante e pelo carinho. Vocês são parte essencial da minha vida e história.

A Maria Aparecida Ferreira Coelho, minha gratidão por me acolher como parte de sua família. Sua hospitalidade, carinho e a sensação constante de estar em casa foram presentes preciosos que contribuíram significativamente para minha jornada.

À UnB, ao CNPq e à FAP-DF, expresso meu reconhecimento pelo apoio financeiro essencial para a realização desta tese. Sem esse suporte, muitos aspectos deste trabalho não teriam sido possíveis, e por isso, agradeço pela oportunidade de transformar ideias em realidade.

Encerro estes agradecimentos com profunda gratidão a cada pessoa mencionada e àquelas que, de alguma maneira, contribuíram para este percurso. Esta jornada foi marcada não apenas pelo

crescimento acadêmico, mas também pela construção de relações significativas. Levo comigo não apenas o conhecimento adquirido, mas também as memórias preciosas de uma colaboração valiosa que moldou minha trajetória de maneira indelével.

RESUMO

AVALIAÇÃO EM ESCALA PILOTO DA REMOÇÃO E DOS EFEITOS DA CILINDROSPERMOPSINA NO DESEMPENHO DE FILTROS LENTOS CONVENCIONAIS DE AREIA

Autor: Daniel Valencia-Cárdenas

Orientadora: Yovanka Pérez Ginoris

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos

Brasília, Outubro de 2023

A ocorrência de florações tóxicas de cianobactérias tem sido um assunto de interesse sanitário, especialmente quando ocorrem em mananciais de abastecimento. Cianotoxinas como a cilindropermopsina (CYN) apresentam um risco à saúde pública e um desafio para os sistemas de tratamento de água, já que essa toxina não é facilmente removida pelo tratamento convencional de água. A filtração lenta convencional é uma tecnologia ainda utilizada para o abastecimento de pequenas comunidades e tem um potencial para remover CYN. Nesse sentido, esta tese avaliou a eficiência de remoção de CYN por filtração lenta convencional em areia durante o amadurecimento e durante a operação de filtros amadurecidos, assim como a sua influência na remoção de outros parâmetros de qualidade da água e os seus impactos sobre a microbiota desenvolvida na *schmutzdecke*. Um sistema de filtração lenta convencional em escala piloto foi operado e submetido a períodos de contaminação do afluente com CYN. A eficiência do tratamento, avaliado pelos parâmetros de qualidade da água, não foi influenciado pela presença da cianotoxina, entretanto, o desenvolvimento da perda de carga foi determinado pela presença dessa substância durante o amadurecimento. A comunidade bacteriana também foi influenciada pela presença de CYN no amadurecimento. Os filtros amadurecidos removeram toxina até níveis inferiores a 1 µg/L. A composição das comunidades planctônica e bentônica dos filtros lentos amadurecidos não foi afetada pela exposição intermitente à CYN. A remoção da cianotoxina foi atribuída principalmente à biodegradação. Com este trabalho, sob as condições experimentais em que foi desenvolvido, verificou-se que a filtração lenta convencional é robusta e remove efetivamente CYN, sem impactos representativos sobre a microbiota que se desenvolve na camada biológica.

Palavras chave: Filtração lenta convencional em areia, cilindropermopsina, *schmutzdecke*, microbiota

ABSTRACT

PILOT-SCALE EVALUATION OF THE REMOVAL AND EFFECTS OF CYLINDROSPERMOPSIN ON THE PERFORMANCE OF CONVENTIONAL SLOW SAND FILTERS

Author: Daniel Valencia-Cárdenas

Supervisor: Yovanka Pérez Ginoris

Environmental Technology and Water Resources Post-Graduation Program

Brasilia, October 2023

The occurrence of toxic cyanobacterial blooms is a matter of public health interest, mainly when they occur in water supplies. Cyanotoxins such as cylindrospermopsin (CYN) present a risk to public health and a challenge for water treatment systems since conventional water treatment does not easily remove this toxin. Conventional slow sand filtration is still used to supply small communities and can potentially remove CYN. In this context, this thesis evaluated the removal efficiency of CYN by conventional slow sand filtration during the ripening period and the operation of ripened filters, as well as its influence on the removal of other water quality parameters and its impact on the microbiota developed in the *schmutzdecke*. A pilot-scale conventional slow sand filtration system was operated and exposed to periods of contamination of the affluent with CYN. Treatment efficiency, assessed by water quality parameters, was not influenced by cyanotoxin presence. However, the presence of this substance during the ripening period determined the development of head loss. The presence of CYN during the ripening period also influenced the bacterial community. The ripened filters removed the toxin to levels below 1 µg/L. The composition of the planktonic and benthic communities of the ripened slow sand filters was not affected by intermittent exposure to CYN. The removal of the cyanotoxin was attributed mainly to biodegradation. With this work, under the experimental conditions in which it was developed, it was verified that conventional slow filtration is robust and effectively removes CYN, without any representative impact on the microbiota that develops in the biological layer.

Keywords: Conventional slow sand filtration, cylindrospermopsin, *schmutzdecke*, microbiota

Sumário

1	Introdução	1
2	Objetivos	3
2.1	Objetivo geral	3
2.2	Objetivos específicos	3
3	Revisão bibliográfica	4
3.1	A cilindrospermopsina e seus desafios no tratamento de água para consumo humano	4
3.2	Filtração lenta convencional em areia como processo de tratamento de água para a remoção de cilindrospermopsina	7
3.2.1	Princípios e fundamentos da filtração lenta convencional em areia	7
3.2.1.1	Introdução	7
3.2.1.2	Características dos filtros lentos convencionais de areia	8
3.2.1.3	Métodos de controle	9
3.2.1.4	<i>Schmutzdecke</i> : A camada biologicamente ativa	10
3.2.1.5	Amadurecimento	14
3.2.2	Degradação de cilindrospermopsina no ambiente	14
3.2.3	Efeitos da cilindrospermopsina em organismos aquáticos	18
3.2.4	Remoção de cianobactérias e cianotoxinas por filtração lenta em areia	20
4	Metodologia	23
4.1	Considerações iniciais	23
4.2	Padrão sólido e extrato de <i>R. raciborskii</i> contendo cilindrospermopsina e 7-desoxi-cilindrospermopsina	24
4.2.1	Cultivo de <i>Raphidiopsis raciborskii</i>	24
4.2.2	Preparação do extrato	25
4.3	Água base e águas de estudo	25
4.4	Implementação e validação intralaboratorial do método de detecção e quantificação de cilindrospermopsina por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial	27
4.4.1	Produtos químicos e reagentes	27
4.4.2	Instrumentação analítica	27
4.4.3	Otimização dos parâmetros da espectrometria de massas sequencial	28
4.4.4	Implementação do método	28

4.4.5	Validação do método	29
4.4.5.1	Tempo de eluição	29
4.4.5.2	Seletividade	29
4.4.5.3	Limite de detecção e limite de quantificação	30
4.4.5.4	Faixa de trabalho e linearidade	31
4.4.5.5	Viés	31
4.4.5.6	Robustez	32
4.4.5.7	Análises estatísticas	32
4.4.6	Detecção de 7-desoxi-cilindrospermopsina	33
4.5	Descrição do sistema de filtração lenta convencional em escala piloto	34
4.5.1	Descrição e operação do sistema de filtração lenta convencional em areia	34
4.5.2	Caracterização da areia utilizada como meio filtrante e da camada suporte	38
4.6	Teste com traçador	39
4.7	Monitoramento dos parâmetros de operação e de qualidade da água	40
4.8	Análises microbiológicas	42
4.8.1	Amostragem	42
4.8.2	Análises da comunidade bacteriana	43
4.8.3	Análises das comunidades planctônica e bentônica	43
4.8.4	Processamento das análises microbiológicas	44
4.9	Delineamento das etapas experimentais	45
4.9.1	Avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina e 7-desoxi-cilindrospermopsina durante o amadurecimento de filtros lentos	45
4.9.2	Avaliação do tempo de operação, da remoção e dos efeitos da cilindrospermopsina em filtros lentos amadurecidos	46
4.10	Tratamento estatístico dos dados	47
5	Resultados e discussão	49
5.1	Implementação e validação interna do método de detecção e quantificação de cilindrospermopsina por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial	49
5.1.1	Otimização automática dos parâmetros da espectrometria de massas sequencial	49
5.1.2	Otimização manual da temperatura e dos parâmetros da cromatografia líquida	51
5.1.3	Validação do método	51
5.1.3.1	Tempo de eluição	51
5.1.3.2	Seletividade	52

5.1.3.3	Limite de detecção e limite de quantificação	53
5.1.3.4	Faixa de trabalho e linearidade	55
5.1.3.5	Viés	56
5.1.3.6	Robustez	58
5.1.4	Possível detecção de 7-desoxi-cilindropermopsina	62
5.2	Teste com traçador	62
5.3	Avaliação dos efeitos e da remoção de cilindropermopsina e 7-desoxi-cilindropermopsina durante o amadurecimento de filtros lentos convencionais	64
5.3.1	Monitoramento dos parâmetros operacionais e de qualidade da água	64
5.3.2	Remoção de cilindropermopsina e de 7-desoxi-cilindropermopsina	71
5.3.3	Análise comparativa do desempenho dos filtros lentos	74
5.3.4	Correlações entre os parâmetros operacionais, a qualidade da água bruta e a remoção dos parâmetros de qualidade da água durante o amadurecimento . . .	76
5.3.5	Caracterização da comunidade bacteriana dos filtros lentos	78
5.3.6	Caracterização das comunidades planctônica e bentônica dos filtros lentos . .	84
5.4	Avaliação do tempo de operação, da remoção e dos efeitos da cilindropermopsina em filtros lentos amadurecidos	88
5.4.1	Monitoramento dos parâmetros operacionais e de qualidade da água	88
5.4.2	Remoção de cilindropermopsina	94
5.4.3	Análise comparativa do desempenho dos filtros lentos	96
5.4.4	Caracterização das comunidades planctônica e bentônica nos filtros lentos . .	100
6	Conclusões, considerações finais e recomendações	105
6.1	Conclusões e considerações finais	105
6.2	Recomendações	107
	Referências	108

Lista de Figuras

Figura 3.1	Estrutura química da cilindropermopsina (CYN) e seus grupos funcionais. Fonte: Ohtani <i>et al.</i> (1992)	6
Figura 3.2	Estrutura química das variantes naturais da cilindropermopsina (CYN). (a) 7-Epi-cilindropermopsina (7-epiCYN); (b) 7-desoxi-cilindropermopsina (7-desoxiCYN); (c) 7-desoxi-desulfocilindropermopsina (7-desoxi-desulfoCYN); (d) 7-desoxi-desulfo-12-acetilcilindropermopsina (7-desoxi-desulfo-12-acetilCYN). Fontes: Norris <i>et al.</i> (1999), Banker <i>et al.</i> (2000) e Wimmer <i>et al.</i> (2014)	6
Figura 4.1	Mapa e localização do lago Paranoá e da Estação Experimental de Biologia onde foi captada a água de estudo utilizada neste trabalho. Elaborado por Gilliard Nunes	26
Figura 4.2	Esquema da instalação experimental de filtração lenta convencional em areia em escala piloto utilizada na realização deste trabalho. Figura do autor	35
Figura 4.3	Fotografia da instalação experimental de filtração lenta convencional em areia em escala piloto utilizada na realização deste trabalho. Fotografia capturada por Thatiane de Souza Tavares	36
Figura 4.4	Descrição e medidas dos componentes de cada filtro lento utilizada na realização deste trabalho. Figura do autor	37
Figura 4.5	Curva granulométrica obtida após peneiramento da areia utilizada neste estudo	38
Figura 5.1	Transições monitoradas durante a otimização automática dos parâmetros da espectrometria de massas sequencial (EM/EM)	50
Figura 5.2	Cromatogramas obtidos para diferentes concentrações de CYN pelo método de detecção e quantificação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) com os parâmetros da fonte de ionização e o perfil de eluição otimizados	52
Figura 5.3	Média da concentração de cilindropermopsina (CYN) nas amostras com as interferências selecionadas para a avaliação da seletividade do método de detecção e quantificação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) em cada uma das matrizes de água avaliadas neste estudo	53
Figura 5.4	Concentração medida pelo método de detecção e quantificação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) para cada solução de cilindropermopsina (CYN) preparada a 0,5 µg/L em cada uma das matrizes de água testadas neste trabalho	54

Figura 5.5	Regressões para a verificação da linearidade do método de detecção e quantificação de cilindrospermopsina (CYN) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) em diferentes faixas de concentrações de CYN para as matrizes de água ultrapura e de água do lago Paranoá estudadas neste trabalho	55
Figura 5.6	Resultados das medições de concentração de cilindrospermopsina (CYN) nas amostras para a determinação do viés do método de detecção e quantificação de cilindrospermopsina (CYN) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) em diferentes faixas de concentração para cada matriz de água avaliada	57
Figura 5.7	Cromatograma obtido na análise de amostras de extrato, contendo cilindrospermopsina (CYN) com indícios da presença de 7-desoxi-cilindrospermopsina (7-desoxiCYN) pelo método de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) com os parâmetros da fonte de ionização e o perfil de eluição otimizados	62
Figura 5.8	Condutividade elétrica medida no efluente de cada unidade filtrante durante a realização do teste com traçador para a determinação do tempo de renovação da água dentro do sistema de filtração	63
Figura 5.9	Contagens de <i>Escherichia coli</i> na água do lago Paranoá e nos efluentes de cada filtro nos 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento de filtros lentos	65
Figura 5.10	Valores de pH nas águas de estudo e nos efluentes de cada filtro nos 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento de filtros lentos	66
Figura 5.11	Turbidez das águas de estudo e dos efluentes de cada filtro nos 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento de filtros lentos	67
Figura 5.12	Cor verdadeira das águas de estudo e dos efluentes de cada filtro nos 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento de filtros lentos	68
Figura 5.13	Concentração de carbono orgânico total (COT) nas águas de estudo e nos efluentes de cada filtro nos 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento de filtros lentos	69

Figura 5.14 Séries temporais da (a) Perda de carga no primeiros 5 cm do meio filtrante e da (b) Taxa de filtração de cada filtro lento em 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento de filtros lentos	70
Figura 5.15 Fotografias da camada biologicamente ativa, desenvolvida em 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento dos filtros lentos (a) FL1, (b) FL2, (c) FL3 e (d) FL4, junto com os destaques, por análise de imagens, da espessura dessa camada dos filtros lentos (e) FL1, (f) FL2, (g) FL3 e (h) FL4	72
Figura 5.16 Séries temporais da água bruta e da água filtrada em 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento de filtros lentos. (a) Concentração de cilindrospermopsina (CYN); (b) Área dos picos como medida qualitativa da concentração de 7-desoxi-cilindrospermopsina (7-desoxiCYN)	73
Figura 5.17 Distribuição dos valores da perda de carga nos primeiros 5 cm do topo do meio filtrante durante 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) no amadurecimento de filtros lentos	75
Figura 5.18 Matrizes com os valores de correlação de Spearman entre os parâmetros de qualidade da água e a eficiência em 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento dos filtros lentos (a) filtro lento nº 1 (FL1), (b) filtro lento nº 2 (FL2), (c) filtro lento nº 3 (FL3) e (d) filtro lento nº 4 (FL4). Os espaços em branco representam os coeficientes não significativos (valores p com $\alpha > 0,05$)	77
Figura 5.19 Abundância relativa dos 18 filós identificados pelo sequenciamento de DNA em cada uma das amostras de água do lago Paranoá, com e sem cilindrospermopsina (CYN) e da areia dos filtros lentos depois de 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento dos filtros lentos	79
Figura 5.20 Abundância relativa dos filós Chloroflexi, Actinobacteria, OD1 e TM7 identificados pelo sequenciamento de DNA em cada uma das amostras de água do lago Paranoá, com e sem cilindrospermopsina (CYN) e da areia dos filtros lentos depois de 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento dos filtros lentos	81
Figura 5.21 Dendrograma de agrupamento dos resultados da análise de dissimilaridade de Bray-Curtis da diversidade bacteriana dos filtros após 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento das unidades filtrantes	83

Figura 5.22	Abundância relativa das classes taxonômicas identificadas em cada filtro lento após 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento das unidades filtrantes	84
Figura 5.23	Dendrograma de agrupamento dos resultados da análise de dissimilaridade de Bray-Curtis da diversidade das comunidades planctônica e bentônica dos filtros após 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento das unidades filtrantes	88
Figura 5.24	Contagens de coliformes totais e de <i>Escherichia coli</i> nas águas de estudo e nos efluentes das unidades filtrantes em cada um dos períodos de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos	90
Figura 5.25	Valores de pH das águas de estudo e dos efluentes das unidades filtrantes em cada um dos períodos de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos	91
Figura 5.26	Turbidez das águas de estudo e dos efluentes das unidades filtrantes em cada um dos períodos de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos	92
Figura 5.27	Cor verdadeira das águas de estudo e dos efluentes das unidades filtrantes em cada um dos períodos de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos	92
Figura 5.28	Concentração de carbono orgânico total (COT) nas águas de estudo e nos efluentes das unidades filtrantes em cada um dos períodos de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos	93
Figura 5.29	Parâmetros hidráulicos monitorados no sistema de filtração lenta em cada um dos períodos de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos. (a) Perda de carga nos primeiros 5 cm do topo do meio filtrante; (b) Taxa de filtração	94
Figura 5.30	Concentração de cilindrospermopsina (CYN) nas águas de estudo e nos efluentes das unidades filtrantes em cada um dos períodos de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos	95
Figura 5.31	Distribuições das contagens de coliformes totais nos efluentes das unidades filtrantes em cada um dos períodos de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos	97

Figura 5.32 Distribuições dos valores dos parâmetros hidráulicos monitorados nas unidades filtrantes em cada um dos períodos de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos. (a) Perda de carga nos primeiros 5 cm do topo do meio filtrante; (b) Taxa de filtração	98
Figura 5.33 Comparação das distribuições dos valores observados de (a) turbidez e de (b) carbono orgânico total (COT) em cada período de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos	100
Figura 5.34 Abundância relativa das classes taxonômicas identificadas em cada filtro lento no final da avaliação do desempenho dos filtros lentos amadurecidos	101
Figura 5.35 Dendrograma de agrupamento dos resultados da análise de dissimilaridade de Bray-Curtis da diversidade dos filtros no final da avaliação do desempenho dos filtros lentos amadurecidos	103

Lista de Tabelas

Tabela 3.1	Principais características da camada filtrante de areia dos filtros lentos convencionais. Fonte: adaptado de Bellamy <i>et al.</i> (1985), Tangerino <i>et al.</i> (2006), Logsdon (2008) e Crittenden <i>et al.</i> (2012)	9
Tabela 3.2	Principais grupos biológicos que se desenvolvem em sistemas de filtração lenta convencional em areia e a sua principal função. Fontes: Huisman e Wood (1974), Logsdon (1991) e Haig <i>et al.</i> (2015b, 2016)	11
Tabela 4.1	Fatores e níveis adotados no experimento fatorial para avaliar a robustez do método de detecção e quantificação de cilindrospermopsina (CYN) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) validado e utilizado neste trabalho	32
Tabela 4.2	Matriz de planejamento do experimento fatorial para a verificação da robustez do método de detecção e quantificação de cilindrospermopsina (CYN) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) validado e utilizado neste trabalho	33
Tabela 4.3	Características granulométricas da areia utilizada em este estudo	39
Tabela 4.4	Resumo das informações sobre o ponto de monitoramento, os equipamentos utilizados e os procedimentos para o acompanhamento da evolução dos parâmetros de qualidade da água e operacionais da filtração lenta em areia monitorados neste trabalho	41
Tabela 4.5	Limites de detecção e precisão das técnicas analíticas e dos equipamentos utilizadas para medição dos parâmetros de qualidade da água e operacionais da filtração lenta em areia estudados neste trabalho	42
Tabela 4.6	Interpretação do coeficiente de correlação de Spearman adotado nas análises estatísticas realizadas neste trabalho	48
Tabela 5.1	Valores automaticamente otimizados dos parâmetros da fonte de ionização do espectrômetro de massas ion trap 3200 Q TRAP no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) utilizado neste estudo	49
Tabela 5.2	Parâmetros otimizados automaticamente para as transições da cilindrospermopsina (CYN) m/z 176, 194 e 336 no modo monitoramento de reações múltiplas (MRM) no espectrômetro de massas ion trap 3200 Q TRAP usado neste estudo	50

Tabela 5.3	Temperatura da fonte de íons de eletronebulização e parâmetros da cromatografia líquida otimizados manualmente para a implementação do método de detecção e quantificação de cilindropermopsina (CYN) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM)	51
Tabela 5.4	Perfil de eluição otimizado manualmente para a detecção e quantificação de cilindropermopsina (CYN) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM)	51
Tabela 5.5	Resultado da análise de variância (ANOVA) para a verificação estatística da diferença entre as médias da medição de cada amostra para sua respectiva matriz .	54
Tabela 5.6	Cálculo dos parâmetros estatísticos para a determinação do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) do método de detecção e quantificação de cilindropermopsina (CYN) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) utilizado neste estudo	55
Tabela 5.7	Resultados das regressões lineares para cada faixa de trabalho do método com seu respectivo coeficiente de determinação	56
Tabela 5.8	Resultado da análise de variância (ANOVA) de dois fatores para a identificação da fonte de variação dos dados na análise do viés do método de detecção e quantificação de cilindropermopsina (CYN) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) utilizado neste trabalho	57
Tabela 5.9	Recuperação aparente calculada para cada matriz de água e para cada faixa de concentração de cilindropermopsina (CYN)	58
Tabela 5.10	Resultado da análise de variância (ANOVA) de quatro fatores para a classificação das fontes de variação dos dados na avaliação da robustez do método de detecção e quantificação de cilindropermopsina (CYN) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM)	60
Tabela 5.11	Resultado do teste de Tukey para identificar os pares que apresentaram diferenças significativas na avaliação da robustez do método de detecção e quantificação de cilindropermopsina (CYN) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM)	61
Tabela 5.12	Resultados do teste de Kruskal-Wallis para identificar diferenças no desempenho dos filtros em cada parâmetro avaliado em 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindropermopsina (CYN) durante o amadurecimento de filtros lentos	75

Tabela 5.13 Resultados do teste de Dunn para identificar as diferenças na perda de carga nos primeiros 5 cm do topo do meio filtrante entre os filtros em 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento de filtros lentos	76
Tabela 5.14 Abundância relativa da classes predominantes nas comunidades planctônica e bentônica identificadas no sistema de filtração lenta após um período de 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento dos filtros lentos	86
Tabela 5.15 Pares de filtros que apresentaram diferenças no teste de comparações múltiplas de Dunn separados por parâmetro em cada um dos períodos de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos	97
Tabela 5.16 Diferenças entre os períodos de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos apontadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn em cada parâmetro monitorado	99

ACRÔNIMOS

7-desoxi-desulfo-12-acetilCYN 7-desoxi-desulfo-12-acetilcilindrospermopsina

7-desoxi-desulfoCYN 7-desoxi-desulfocilindrospermopsina

7-desoxiCYN 7-desoxi-cilindrospermopsina

7-epiCYN 7-epi-cilindrospermopsina

ε porosidade

d_e diâmetro efetivo

ANOVA análise de variância

CD coeficiente de desuniformidade

CE energia de colisão

CL-EM/EM cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial

CLAE cromatografia líquida de alta eficiência

COD carbono orgânico dissolvido

COT carbono orgânico total

CXP potencial de saída da célula de colisão

CYN cilindrospermopsina

DP potencial de orifício

EM/EM espectrometria de massas sequencial

ENC Departamento de Engenharia Civil e Ambiental

ETA estação de tratamento de água

FL1 filtro lento nº 1

FL2 filtro lento nº 2

FL3 filtro lento nº 3

FL4 filtro lento nº 4

LD limite de detecção

LETC Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias

LQ limite de quantificação

LSA Laboratório de Saneamento Ambiental

MCYST microcistina

MOA matéria orgânica algogênica

MRM monitoramento de reações múltiplas

P.A. para análise

pb pares de bases

SISGEN Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional

Associado

UFRJ Universidade Federal do Rio de Janeiro

UnB Universidade de Brasília

1. INTRODUÇÃO

O acesso a água potável de qualidade é um desafio que exige constantes avanços no tratamento de água. A garantia da disponibilidade deste recurso é essencial para a saúde pública. Em meio a essa necessidade, emerge a importância de investigações aprofundadas que possam aprimorar os processos de tratamento existentes e oferecer novas abordagens para enfrentar os desafios emergentes na qualidade da água.

Outra preocupação está relacionada à contaminação dos mananciais de abastecimento. O aumento da ocorrência de microcontaminantes nos corpos hídricos brasileiros pode representar riscos à saúde humana e ao ambiente aquático. Dentre os microcontaminantes mais reconhecidos estão as cianotoxinas, destacando-se a cilindrospermopsina (CYN), uma cianotoxina produzida por algumas espécies de cianobactérias, que é reconhecida por causar efeitos adversos, como danos hepáticos e gastrointestinais em humanos, e ser tóxica para alguns protozoários aquáticos.

Dentre as técnicas existentes para a remoção de microcontaminantes, a filtração lenta convencional em areia sobressai por ser uma tecnologia de tratamento de água, de natureza sustentável, que não requer o uso de produtos químicos nem o consumo excessivo de energia e cuja operação simples e de baixo custo a torna acessível a pequenas comunidades em áreas rurais ou isoladas, sem acesso aos sistemas de abastecimento público. Além disso, a tecnologia se destaca por sua eficiência na remoção de partículas, micro-organismos patogênicos e substâncias orgânicas. Entretanto, o principal mecanismo de remoção atuante nesta tecnologia é biológico, comprometendo a eficiência do tratamento ao expor a microbiota responsável pelo desempenho a substâncias tóxicas como a CYN.

Até o momento, a literatura científica carece de estudos que explorem a remoção da CYN por filtração lenta em areia. Essa lacuna de conhecimento destaca a importância de desenvolver pesquisas nesse âmbito. Nesse contexto, este trabalho se concentrou na avaliação da remoção e dos efeitos da CYN no desempenho de filtros lentos de areia, considerando os possíveis impactos dessa toxina sobre a comunidade biológica presente nos filtros, tanto no amadurecimento quanto na operação de filtros maduros.

Os resultados deste estudo constatarem que a toxina não impactou significativamente o desempenho dos filtros lentos e apontaram uma relação entre a presença da cianotoxina e a perda de carga nos filtros durante o amadurecimento, sugerindo uma possível influência em nível microbiano.

A investigação da composição das comunidades bacteriana, planctônica e bentônica no biofilme dos filtros revela informações sobre a robustez da filtração lenta em areia diante da presença da CYN. A relação entre a diversidade da microbiota planctônica e bentônica, e a remoção de *Escherichia coli* destaca o potencial desta tecnologia no controle de micro-organismos patogênicos presentes na água. Além disso, a capacidade dos filtros amadurecidos de reduzir as concentrações de CYN a níveis indetectáveis oferece uma perspectiva positiva para a eficácia de remoção dessa cianotoxina.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a remoção e o impacto da cilindrospermopsina na eficiência do tratamento de água por filtração lenta convencional em areia, bem como a influência dessa cianotoxina na composição da microbiota presente na *schmutzdecke*, estabelecendo relações com o desempenho global das unidades filtrantes.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial que atenda às necessidades de detecção e quantificação de cilindrospermopsina para o tratamento de água para consumo humano.
- Avaliar a eficiência da filtração lenta convencional em areia na remoção de cilindrospermopsina durante o período de amadurecimento, identificando a composição da microbiota desenvolvida na *schmutzdecke* e a sua relação com o desempenho de filtros lentos;
- Avaliar o desempenho de filtros lentos de areia convencionais maduros durante a operação contínua, expostos intermitentemente à presença de cilindrospermopsina no afluente;
- Identificar as comunidades planctônica e bentônica desenvolvidas na *schmutzdecke* de filtros lentos convencionais de areia e analisar as relações entre a composição dessas comunidades e o desempenho dos filtros sob exposição intermitente à cilindrospermopsina no afluente.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A CILINDROSPERMOPSINA E SEUS DESAFIOS NO TRATAMENTO DE ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO

A cilindropermopsina (CYN) é uma cianotoxina produzida por algumas espécies de cianobactérias, sendo *Raphidiopsis raciborskii* a mais conhecida. Algumas cepas desta cianobactéria produzem também a variante 7-desoxi-cilindropermopsina (7-desoxiCYN) (Li *et al.*, 2001a). Além de *R. raciborskii*, outras 14 espécies de cianobactérias, pertencentes aos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Chrysochloris*, *Dolichospermum*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Raphidiopsis*, *Sphaerospermopsis* e *Umezakia*, têm sido relatadas como potenciais produtoras de CYN: (1) *Anabaena lapponica* (Spoof *et al.*, 2006); (2) *Anabaena planctonica* (Brient *et al.*, 2009); (3) *Aphanizomenon flos-aquae* (Preußel *et al.*, 2006); (4) *Aphanizomenon klebahnii* (Bláhová *et al.*, 2008); (5) *Aphanizomenon gracile* (Rücker *et al.*, 2007); (6) *Chrysochloris bergii* (previamente denominada como *Anabaena bergii*) (Schembri *et al.*, 2001); (7) *Chrysochloris ovalisporum* (previamente denominada como *Aphanizomenon ovalisporum*) (Banker *et al.*, 1997; Zapomělová *et al.*, 2012); (8) *Dolichospermum mendotae* (Akcaalan *et al.*, 2014); (9) *Lyngbya wollei* (Seifert *et al.*, 2007); (10) *Oscillatoria* sp. (Mazmouz *et al.*, 2010); (11) *Raphidiopsis curvata* (Li *et al.*, 2001b); (12) *Raphidiopsis mediterranea* (McGregor *et al.*, 2011); (13) *Sphaerospermopsis aphanizomenoides* (previamente denominada como *Aphanizomenon aphanizomenoides*) (Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2011, 2014) e (14) *Umezakia natans* (Harada *et al.*, 1994).

As cianobactérias produtoras de CYN são comumente encontradas formando florações em corpos d'água tropicais, subtropicais e áridos (Chorus e Bartram, 1999), não obstante, a CYN tem sido detectada em ambientes boreais e antárticos (Spoof *et al.*, 2006; Kleinteich *et al.*, 2014). Estudos têm identificado a presença dessa cianotoxina em corpos d'água ao redor do mundo, em concentrações de até 126 µg/L (Messineo *et al.*, 2010). Existe uma lacuna em relação à confirmação da presença de CYN na África (Berger *et al.*, 2006; Mohamed, 2007; Haande *et al.*, 2008; Fathalli *et al.*, 2011). Apenas no Egito, Mohamed (2007) mostrou que extratos de *R. raciborskii*, isolados nesse país, apresentaram efeitos hepatotóxicos em camundongos, similares à toxicidade da CYN. No Brasil, a presença da CYN tem sido relatada em várias regiões. Estudos têm identificado a ocorrência dessa cianotoxina em corpos d'água utilizados para abastecimento público (Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2011; Piccin-Santos e Bittencourt-Oliveira, 2012; Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2014), o que representa um desafio para as companhias de tratamento de água, que precisam adotar estratégias específicas para garantir a remoção eficiente

dessa cianotoxina e garantir a qualidade da água fornecida à população.

A contaminação por CYN pode afetar negativamente a qualidade da água de várias maneiras. Primeiramente, a CYN é reconhecida pelos seus efeitos tóxicos em diferentes órgãos. Devido a um surto de hepato-enterite em Palm Island, Austrália (Bourke *et al.*, 1983), esta cianotoxina foi inicialmente considerada como hepatotóxica. Porém, testes toxicológicos em camundongos têm demonstrado que também afeta rins, intestino delgado, pulmões (Hawkins *et al.*, 1997), timo e coração (Terao *et al.*, 1994), sendo os rins os órgãos mais sensíveis a esta toxina (Humpage e Falconer, 2003). Adicionalmente, a exposição à CYN por via oral pode ter consequências crônicas e promover a formação de tumores (Falconer e Humpage, 2001).

No ano de 1996, na cidade de Caruaru (PE, Brasil), foram confirmados pela primeira vez casos de letalidade humana pela exposição intravenosa a cianotoxinas (Carmichael *et al.*, 2001). Este acontecimento levou ao óbito a cerca de 60 pacientes de um centro de hemodiálise (Carmichael *et al.*, 2001). No fígado dos pacientes foi detectada microcistina (MCYST), porém, no carvão dos filtros e nas resinas de troca iônica do centro de hemodiálise, também foi detectada CYN (Carmichael *et al.*, 2001).

A CYN apresenta efeitos genotóxicos e citotóxicos (Humpage *et al.*, 2005). Os primeiros estudos dos impactos da CYN sobre células foram conduzidos por Runnegar *et al.* (1994), demonstrando que a CYN provoca morte celular e diminui os teores de glutathiona em culturas de hepatócitos de camundongos. Comprovações posteriores indicaram que a CYN inibe a síntese de glutathiona, o que contribui fortemente para a citotoxicidade dessa cianotoxina (Runnegar *et al.*, 1995), uma vez que a glutathiona é detoxificadora e controladora dos níveis de espécies reativas de oxigênio. As evidências atuais mostram que a morte celular induzida pela CYN é mediada pela geração de espécies reativas de oxigênio, o que causa danos no DNA, na fita simples ou dupla, interrompendo o ciclo celular e iniciando a apoptose (Máthé *et al.*, 2017).

As variantes da CYN (Figura 3.2) também apresentam toxicidade. De acordo com Banker *et al.* (2001), os efeitos tóxicos da CYN são atribuídos ao grupo uracilo (Figura 3.1), que está presente em todas as variantes relatadas. Anteriormente, acreditava-se que o grupo hidroxilo, presente no grupo hidroximetil-uracilo, tinha relevância na toxicidade da molécula, já que Norris *et al.* (1999) relatou que a variante 7-desoxiCYN (Figura 3.2b) não apresentou toxicidade nos seus ensaios. Contudo, estudos posteriores revelaram que a 7-desoxiCYN inibe a síntese de proteínas, similarmente à CYN (Looper *et al.*, 2005). Portanto, Wimmer *et al.* (2014) recomendaram incluir às variantes 7-desoxi-desulfocilindrospermopsina (7-desoxi-desulfoCYN)

e 7-desoxi-desulfo-12-acetilcilindrospermopsina (7-desoxi-desulfo-12-acetilCYN) como produtos potencialmente tóxicos de florações de cianobactérias produtoras de CYN.

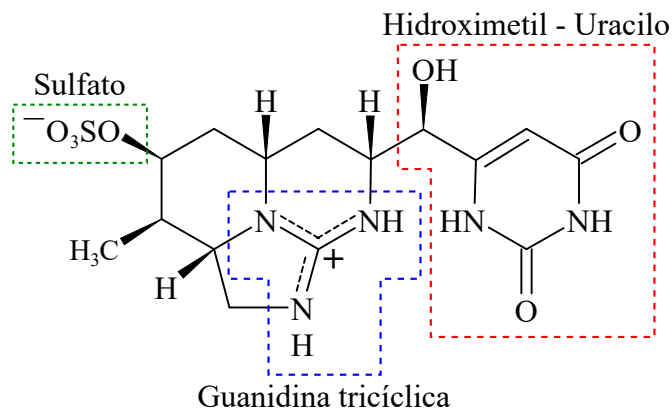


Figura 3.1: Estrutura química da cilindrospermopsina (CYN) e seus grupos funcionais.
Fonte: Ohtani *et al.* (1992)

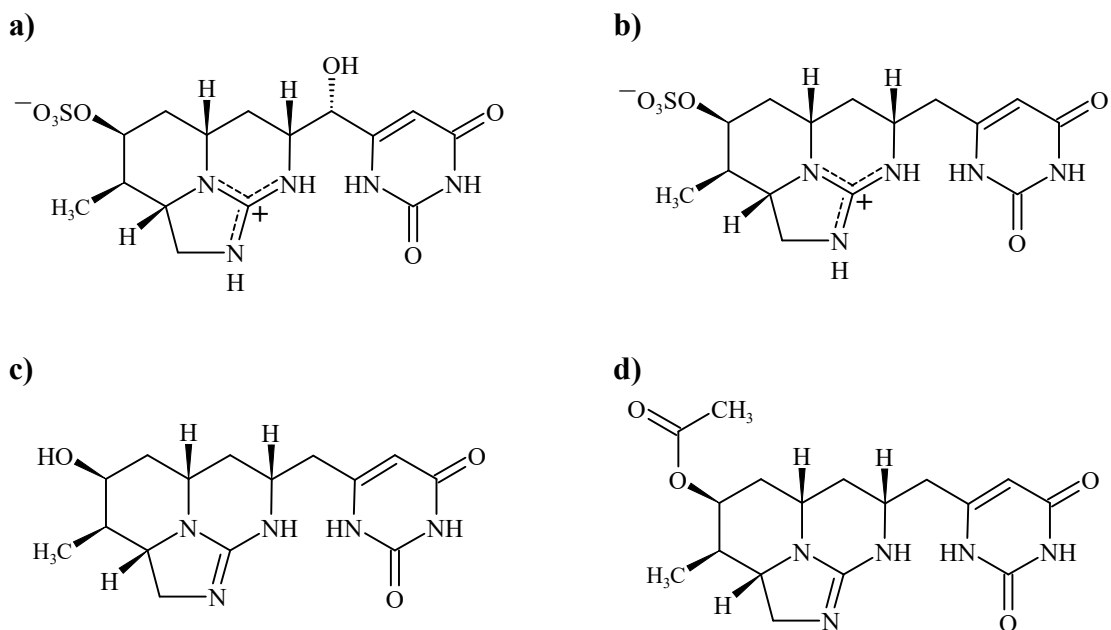


Figura 3.2: Estrutura química das variantes naturais da cilindrospermopsina (CYN).
(**a**) 7-Epi-cilindrospermopsina (7-epiCYN); (**b**) 7-desoxi-cilindrospermopsina (7-desoxiCYN);
(**c**) 7-desoxi-desulfocilindrospermopsina (7-desoxi-desulfoCYN);
(**d**) 7-desoxi-desulfo-12-acetilcilindrospermopsina (7-desoxi-desulfo-12-acetilCYN).
Fontes: Norris *et al.* (1999), Banker *et al.* (2000) e Wimmer *et al.* (2014)

Além dos efeitos já citados, a CYN causa impactos anormais no metabolismo do colesterol (Reisner *et al.*, 2004). Dado que o colesterol é precursor de hormônios esteroides (aldosterona, β -estradiol, cortisol, testosterona) (Nelson e Cox, 2014), essa toxina apresenta também um grande potencial como disruptor endócrino. De acordo com Young *et al.* (2008), em ensaios

in vitro, a CYN inibiu a produção de progesterona em células da granulosa humana, obtidas de mulheres sob tratamento de fertilização, podendo modificar a relação entre os níveis de progesterona e estrogênio, alterando o ciclo menstrual. Altas concentrações da cianotoxina (415,4 a 830,8 µg/L) durante 12 h induziram a apoptose em células de ovários de hamster (Gácsi *et al.*, 2009). Os mesmos autores relatam que houve uma indução da necrose em concentrações superiores (2,1 a 4,2 mg/L) e durante períodos de exposição mais longos (24 a 48 h). Rogers *et al.* (2007) mostraram em ensaios conduzidos em camundongos fêmeas gestantes que a CYN é letal em doses ≥ 32 µg/kg. Adicionalmente, a exposição no final da gestação causou uma diminuição no peso do filhote, parto prematuro e aumento da mortalidade pós-natal. Cabe destacar que as concentrações utilizadas nos trabalhos de Rogers *et al.* (2007) e Gácsi *et al.* (2009) foram altas em relação às concentrações que ocorrem naturalmente em ambientes aquáticos.

Em termos de qualidade da água, o impacto da CYN está associado a questões como o comprometimento da potabilidade e a interferência nos processos de tratamento de água. De forma geral, a remoção de CYN no tratamento convencional de água é pouco eficiente, o que pode resultar em água com parâmetros de qualidade que não atendem os padrões estabelecidos. Isto torna necessária a aplicação de técnicas avançadas de tratamento de água como a oxidação (Senogles *et al.*, 2000; Hoeger *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2021), a adsorção em carvão ativado (Ho *et al.*, 2008, 2011) e a nanofiltração (Teixeira e Rosa, 2006). Ho *et al.* (2012b) sugerem o tratamento biológico como uma alternativa para a remoção de cianotoxinas, em vista de que são processos com poucos requerimentos tecnológicos, que geralmente possuem baixo custo de manutenção e operação. Estes processos biológicos são considerados "naturais", prescindindo da adição de químicos que podem produzir subprodutos tóxicos. A remoção de CYN por meio do tratamento biológico não é bem documentada. Além disso, a maioria dos estudos de remoção biológica dessa cianotoxina foram realizados em ensaios *in vitro* (Smith *et al.*, 2008; Dziga *et al.*, 2016), cujas condições experimentais não reproduzem os cenários e a dinâmica das populações microbianas que se estabelecem nos sistemas biológicos de tratamento que operam em escala real.

3.2. FILTRAÇÃO LENTA CONVENCIONAL EM AREIA COMO PROCESSO DE TRATAMENTO DE ÁGUA PARA A REMOÇÃO DE CILINDROSPERMOPSINA

3.2.1. Princípios e fundamentos da filtração lenta convencional em areia

3.2.1.1. Introdução

A filtração lenta convencional em areia é uma das primeiras técnicas de tratamento de água

conhecidas. Desde a construção do primeiro filtro lento, há mais de 200 anos, esta tecnologia foi a única técnica de tratamento de água utilizada até a aplicação da coagulação química seguida por filtração rápida no final do século XIX (Tangerino *et al.*, 2006).

Na década de 1990 foram promovidas pesquisas sobre filtração lenta em areia, permitindo um fluxo constante de publicações científicas abordando a influência de diferentes fatores no desempenho da tecnologia. Segundo Nakamoto *et al.* (2014), as principais áreas de interesse, nos estudos sobre filtração lenta, são o pré-tratamento, mecanismos, desempenho do processo, modelagem e aprimoramento dos processos. Vinculadas com estas áreas de interesse, existem algumas limitações e lacunas específicas como a descrição abrangente e quantitativa dos mecanismos fundamentais do processo, a relação entre a qualidade da água afluyente e as características e composição da camada biológica, a remoção de substâncias orgânicas naturais e sintéticas, previsão da duração das carreiras de filtração, métodos para incrementar as taxas e as carreiras de filtração e aprimoramento das tecnologias de limpeza.

Nos últimos anos, houve um redirecionamento das pesquisas sobre filtração lenta em areia, com um enfoque na sua aplicação em pequena escala. As pesquisas têm se concentrado na otimização dos parâmetros de projeto e a simplificação da operação e manutenção. Isto reflete a necessidade de soluções acessíveis e eficientes de tratamento de água para comunidades isoladas dos centros urbanos, onde o acesso a sistemas convencionais de tratamento pode ser limitado.

3.2.1.2. *Características dos filtros lentos convencionais de areia*

Os filtros lentos convencionais de areia são constituídos por uma camada suporte, uma camada de areia e uma coluna d'água. A camada suporte é formada por uma combinação de diferentes tamanhos de cascalho e tem como função a sustentação da camada de areia. A coluna d'água oferece a carga hidráulica necessária para vencer as perdas de carga do meio filtrante e cria um tempo de detenção para o tratamento da água bruta. A camada filtrante de areia influencia diretamente na qualidade microbiológica da água filtrada. Bellamy *et al.* (1985) indicam que a remoção de coliformes depende da profundidade desta camada. Os autores indicam que maiores profundidades representaram maiores remoções de coliformes. Entretanto, a partir de profundidades superiores a 0,5 m, a remoção não apresenta um aumento apreciável. A profundidade do meio filtrante também influencia na duração da carreira de filtração e na frequência de manutenção dos filtros. Quando as raspagens no topo do meio filtrante reduzem sua espessura até níveis entre 0,5 e 0,6 m, é necessário restaurar a profundidade ao seu valor original, já que assim é garantida uma margem de segurança em relação à remoção de bactérias

(Tangerino *et al.*, 2006; Logsdon, 2008). As principais características da camada filtrante de areia são o diâmetro efetivo (d_e), o coeficiente de desuniformidade (CD) e a porosidade (ϵ). Na Tabela 3.1 é apresentado o resumo de algumas características dos filtros lentos convencionais indicadas pela literatura especializada.

Tabela 3.1: Principais características da camada filtrante de areia dos filtros lentos convencionais. Fonte: adaptado de Bellamy *et al.* (1985), Tangerino *et al.* (2006), Logsdon (2008) e Crittenden *et al.* (2012)

Parâmetro	Valor
Taxa de filtração	1,8 a 9,6 m ³ /(m ² dia)
Diâmetro efetivo (d_e)	0,1 a 0,3 mm
Coeficiente de desuniformidade (CD)	<5 preferivelmente <2,5
Porosidade (ϵ)	0,4
Profundidade do meio filtrante	0,8 a 1,5 m

3.2.1.3. Métodos de controle

Durante a filtração lenta, a retenção de partículas no meio filtrante promove o aumento da perda de carga. A carga hidráulica disponível nos filtros é a responsável por vencer essas perdas de carga. Tanto a perda de carga quanto a carga hidráulica disponível são proporcionais à taxa de filtração (Di Bernardo e Dantas, 2005). A proporcionalidade entre esses três parâmetros permite a operação e controle dos filtros de quatro formas diferentes: **(1)** carga hidráulica constante e perda de carga variável; **(2)** carga hidráulica e perda de carga constantes; **(3)** carga hidráulica variável e perda de carga constante e **(4)** carga hidráulica e perda de carga variáveis..

Na filtração lenta convencional, o controle é feito principalmente por meio da operação com carga hidráulica e perda de carga variáveis. Essa é a forma de controle mais simples. Com o depósito de partículas no meio filtrante, a perda de carga aumenta gradativamente, provocando um aumento no nível d'água acima do meio filtrante, elevando a carga hidráulica proporcionalmente e, assim, a taxa de filtração é mantida constante. O final da carreira de filtração ocorre quando o nível d'água atinge a máxima carga disponível projetada.

Na filtração lenta convencional, as baixas taxas de filtração (de 3 a 9 m³/[m² dia]) e a utilização de areia com granulometria menor (de 0,1 a 0,3 mm) e menos uniforme, do que na filtração rápida, permite que as partículas sejam retidas nos primeiros centímetros do meio filtrante. Esse material forma uma camada adicional no topo do meio filtrante, conhecida como *schmutzdecke*, que funciona como uma camada filtrante adicional e é responsável pela retenção das partículas de menor tamanho e micro-organismos.

3.2.1.4. *Schmutzdecke*: A camada biologicamente ativa

Na *schmutzdecke* é realizada a remoção da maior parte do material orgânico e inorgânico em suspensão, além disso, nesta camada se desenvolve uma intensa atividade biológica. A atividade bioquímica e as interações ecológicas que se desenvolvem tanto na coluna d'água quanto na *schmutzdecke* são os principais responsáveis pelo desempenho e eficiência da filtração lenta em areia.

A comunidade microbiana da *schmutzdecke* desempenha um papel crucial no processo de filtração lenta, sendo responsável pela remoção de matéria orgânica e micro-organismos. Além disso, os aspectos ecológicos são complexos, uma vez que esses micro-organismos não ocorrem isoladamente, mas sim como uma comunidade que se desenvolve em função das substâncias e nutrientes afluentes ao sistema (Haig *et al.*, 2011; Haig, 2014). O desenvolvimento microbiano nos filtros lentos é influenciado por diversos fatores como o tempo de operação e variações espaciais. Calvo-Bado *et al.* (2003) mostraram que as maiores variações na diversidade podem ocorrer na primeira semana de operação, durante o período de adaptação e amadurecimento. Posteriormente, uma vez que as populações se adaptaram, a diversidade tendeu a permanecer constante. Em relação às variações espaciais, os autores apontaram que no primeiro centímetro do meio filtrante a comunidade é mais diversa e com maior atividade. Já no meio e no fundo da camada filtrante, a comunidade microbiana é menos diversa e a atividade biológica decai.

Haig *et al.* (2015a) avaliaram a estrutura espacial e temporal da comunidade microbiana de dois filtros lentos em escala real e a sua relação com a eficiência de remoção. Os autores coletaram areia em diferentes profundidades (0; 4; 10; 15; 20; 30; 40 e 50 cm) e locais de cada filtro, assim como amostras de água afluyente e efluente. Nesse estudo, a qualidade da água filtrada melhorou com o grau de amadurecimento, mantendo residuais de turbidez oscilando entre 0,2 e 2 uT e coliformes entre 2 e 900 NMP/100 mL. O tempo de operação dos filtros foi o fator de maior influência sobre a comunidade microbiana, já que o número e a densidade de unidades taxonômicas incrementaram em função do tempo, assim como a homogeneidade das espécies.

De acordo com Huisman e Wood (1974) e Logsdon (1991), os principais grupos biológicos presentes em filtros lentos são as algas, as bactérias, os protozoários e alguns invertebrados. Na Tabela 3.2 são apresentados os principais representantes de cada um desses grupos e o seu papel na eficiência de remoção.

Tabela 3.2: Principais grupos biológicos que se desenvolvem em sistemas de filtração lenta convencional em areia e a sua principal função. Fontes: Huisman e Wood (1974), Logsdon (1991) e Haig *et al.* (2015b, 2016)

Grupo	Categorias	Principais representantes	Função
Algas	Diatomáceas	<i>Asterionella</i> <i>Synedra</i>	Dada sua capacidade de fotossíntese, são produtores primários. Absorbem CO ₂ , nitratos e fosfatos e produzem oxigênio. O oxigênio é utilizado por outros organismos para realizar seus processos metabólicos e degradar parte da matéria orgânica
	Cianobactérias	<i>Microcystis</i>	
	Algas móveis	<i>Chlamydomonas</i> <i>Navicula</i>	
	Algas planctônicas	<i>Chlorella</i> <i>Scenedesmus</i>	
	Algas filamentosas	<i>Spirogyra</i> <i>Tribonema</i>	
Bactérias		Enterobacteriales	Oxidam e mineralizam parte da matéria orgânica e são alimento para alguns organismos superiores como protozoários e invertebrados
		Vibrionales	

Continua na próxima página

Tabela 3.2: Principais grupos biológicos que se desenvolvem em sistemas de filtração lenta convencional em areia e a sua principal função. Fontes: Huisman e Wood (1974), Logsdon (1991) e Haig *et al.* (2015b, 2016) (*Continuação da página anterior*)

Grupo	Categorias	Principais representantes	Função
Protozoários	Amebas	Rhizopoda	Por interações tróficas, tais como a predação, esses organismos removem micro-organismos como <i>E. coli</i>
		<i>Entamoeba</i>	
		<i>Dictyostelium</i>	
Ciliados	Ciliados	Ciliophora	
		<i>Vorticella</i>	
		<i>Tetrahymena</i>	
Flagelados	Flagelados	<i>Euglena</i>	

Continua na próxima página

Tabela 3.2: Principais grupos biológicos que se desenvolvem em sistemas de filtração lenta convencional em areia e a sua principal função. Fontes: Huisman e Wood (1974), Logsdon (1991) e Haig *et al.* (2015b, 2016) (*Continuação da página anterior*)

Grupo	Categorias	Principais representantes	Função	
Invertebrados	Rotíferos	Rotatoria	Usam como fonte de alimento partículas suspensas ou sedimentadas na interface água/areia	
	Cladóceros	Cladocera		
	Copépodos	Copepoda		
	Vermes aquáticos			Platyhelminthes
				Nematoda
				Annelida
	Larvas de insetos aquáticos			Odonata
				Ephemeroptera
				Plecoptera
				Diptera
		Trichoptera		

3.2.1.5. Amadurecimento

O período de amadurecimento, conforme definido por Visscher (1990), compreende o tempo desde o início da operação de um filtro lento convencional de areia até o momento em que as análises bacteriológicas do efluente atendem aos padrões locais de qualidade da água. Contudo, essa definição é ampla, pouco precisa e encontra desafios devido à variação nos padrões de qualidade da água entre diferentes localidades.

Haarhoff e Cleasby (1991) apontaram que determinar precisamente quando um filtro lento atinge o amadurecimento é uma questão complexa. Vários pesquisadores adotam critérios diversos, tais como a ausência de *E. coli* na água filtrada, contagens de coliformes abaixo de 1 NMP/100 mL e um aumento na remoção de *Giardia* de 99% para 100% para indicar o fim do período de amadurecimento (Haarhoff e Cleasby, 1991).

Uma vez amadurecido, Visscher (1990), dentre outros autores, sugeriram que a água filtrada torna-se adequada para distribuição e consumo humano. Nesse contexto, microcontaminantes como as cianotoxinas, especialmente a CYN devido à sua estabilidade no ambiente (Chiswell *et al.*, 1999), podem ser considerados critérios adicionais para determinar o amadurecimento dos filtros lentos convencionais de areia. A detecção de CYN em níveis acima das recomendações brasileiras e internacionais no efluente pode sobrepor-se aos tradicionais parâmetros bacteriológicos de qualidade da água. Assim, a concentração adequada da cianotoxina na água filtrada, a consistência ou o aumento da taxa de remoção dessa substância e a estabilização da sua concentração no efluente dentro dos limites recomendados podem também indicar o amadurecimento.

3.2.2. Degradação de cilindrospermopsina no ambiente

A degradação de CYN nos ambientes aquáticos pode ser influenciada por diferentes fatores abióticos. A luz solar é um dos fatores mais influentes, mostrando ser efetiva na degradação e na redução da sua toxicidade.

Chiswell *et al.* (1999) observaram que a CYN é rapidamente degradada pela luz solar na presença de material algogênico e pigmentos (clorofila-a, β -caroteno, xantofilas e ficobiliproteínas), atingindo remoções maiores que 90% em 72 h. Na ausência destes compostos, a CYN pura não foi degradada pela luz solar.

Os autores constataram, também, que a irradiação artificial (lâmpadas fluorescentes com emissão

máxima de 460 nm) não é eficiente em comparação com a luz solar. Adicionalmente, a irradiação com luz solar de soluções de CYN em presença de material algogênico, durante 7 dias, impediu danos em órgãos e tecidos quando injetadas em camundongos; enquanto as soluções não irradiadas levaram à morte em 2 a 3 dias em doses intraperitoneais de 0,096 mg/kg.

A concentração dos pigmentos algais liberados na água é determinante na degradação de CYN pela luz solar (Chiswell *et al.*, 1999). Porém, Wörmer *et al.* (2010) indicam que além de altas concentrações de pigmentos, a fotodegradação depende também de altas doses de irradiação UV-A (320 a 400 nm) e da concentração inicial de CYN. Em concentrações entre 1000 e 4000 µg/L, a decomposição pela radiação solar mostra-se mais favorável do que em concentrações menores, na ordem de 33,6 µg/L (Chiswell *et al.*, 1999; Wörmer *et al.*, 2010).

O pH e a temperatura não promovem uma degradação efetiva de CYN. Chiswell *et al.* (1999) relataram que a exposição de CYN a temperaturas de 4 a 50 °C e valores de pH entre 4 e 10 durante um período de 4 semanas resultou em decaimentos da concentração de 20%.

Por outro lado, nos processos biológicos, o pH e a temperatura são determinantes na eficiência da degradação. As maiores taxas de biodegradação relatadas por Smith *et al.* (2008) e Ho *et al.* (2012c,d) ocorreram entre 24 e 25 °C. Na faixa de temperatura de 20 a 30 °C, Mohamed e Alamri (2012) e Dziga *et al.* (2016) também observaram a maior capacidade de degradação biológica, em cepas isoladas de *Bacillus* sp. e *Aeromonas* sp., respectivamente. Segundo Mohamed e Alamri (2012), a biodegradação é influenciada pelo valor do pH, mostrando maior eficiência entre 7 e 8, perdendo eficácia entre 9 e 11. Similarmente, Dziga *et al.* (2016) encontraram que a faixa de valores de pH que favorece a biodegradação por *Aeromonas* sp. foi entre 6,5 e 8,0. Por conseguinte, valores de pH elevados impactam negativamente a biodegradação (Mohamed e Alamri, 2012).

Outros fatores como a concentração inicial de CYN podem influenciar a biodegradação. Os estudos de Smith *et al.* (2008), Mohamed e Alamri (2012) e Dziga *et al.* (2016) revelam que as taxas de biodegradação foram maiores em altas concentrações iniciais de CYN. Mohamed e Alamri (2012), utilizando concentrações de 10; 100 e 300 µg/L mostraram que quanto maior a concentração de CYN, maior é a sua taxa de decaimento. Smith *et al.* (2008) observaram uma degradação total quando a concentração inicial variou entre 13 e 76 µg/L. Quando a concentração inicial foi entre 3,0 e 6,8 µg/L, os autores verificaram residuais entre 19 % e 38 % da concentração inicial.

Smith *et al.* (2008) também constataram que a taxa de biodegradação parece estar correlacionada de forma linear com a concentração inicial da cianotoxina. As altas concentrações de CYN podem induzir a expressão de genes que sintetizam as enzimas responsáveis pela assimilação e degradação (Smith *et al.*, 2008; Mohamed e Alamri, 2012). Conseqüentemente, alguns micro-organismos conseguem desenvolver a capacidade de assimilar a cianotoxina como fonte de carbono quando a matéria orgânica presente é esgotada (Mohamed e Alamri, 2012). Como resultado, tem sido documentado o crescimento de micro-organismos em presença de CYN, mostrando um maior crescimento nas maiores concentrações dessa cianotoxina (Mohamed e Alamri, 2012; Dziga *et al.*, 2016).

Até a presente data, são escassos os micro-organismos isolados e caracterizados como degradadores de CYN. No entanto, o estudo de Mohamed e Alamri (2012) indicou que bactérias degradadoras de MCYST mostraram-se eficientes na degradação de CYN. Especificamente, esse estudo utilizou *Bacillus* sp. (linhagem AMRI-03), isolado de um reservatório saudita com floração de cianobactérias produtoras de MCYSTs não identificadas, para investigar a degradação de CYN. Os resultados destacaram que o crescimento dessa linhagem de *Bacillus* sp. não foi influenciado pela presença de CYN, mostrou um aumento associado à concentração inicial da cianotoxina e não apresentou uma fase lag. Com base nisso, Mohamed e Alamri (2012) sugeriram que bactérias degradadoras de MCYST podem possuir a capacidade de degradar CYN. A revisão conduzida por Ho *et al.* (2012b) identificou mais de 20 micro-organismos com aptidão para degradar MCYST. A maioria desses micro-organismos pertence à família Sphingomonadaceae, encontrada em diversos ambientes aquáticos, estações de tratamento de água e ao longo do sistema de abastecimento (Vaz-Moreira *et al.*, 2011), que podem ser de grande importância para a remoção de CYN em sistemas de tratamento biológico de água para consumo humano.

A degradação biológica de CYN tem mostrado resultados discrepantes, especialmente no contexto do histórico de florações de cianobactérias produtoras dessa toxina e na identificação de micro-organismos degradadores no ambiente aquático. Smith *et al.* (2008) e Ho *et al.* (2012c) relataram a biodegradação da toxina em corpos d'água australianos que apresentaram históricos de florações de cianobactérias produtoras da mesma. Smith *et al.* (2008) propuseram que a biodegradação da cianotoxina era viável somente em corpos d'água com histórico de florações de *R. raciborskii* produtora de CYN. Adicionalmente, Ho *et al.* (2012c) apontaram a possibilidade de que a biodegradação da molécula pode estar relacionada à temperatura e à estação do ano, variáveis que influenciam a presença dos micro-organismos degradadores dessa toxina. No

entanto, Wörmer *et al.* (2008) teria corroborado a sugestão de Smith *et al.* (2008) ao não observar biodegradação de CYN produzida por *C. ovalisporum*, em um lago artificial na Espanha com a presença dessa cianobactéria, em ensaios realizados ao longo de 40 dias.

A maioria dos estudos de biodegradação têm tido como ponto de referência a Austrália (Chiswell *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2008; Ho *et al.*, 2012a,b,c,d). Apesar da dominância australiana nas pesquisas, resultados obtidos na Alemanha (Klitzke *et al.*, 2010; Klitzke e Fastner, 2012), na Arábia Saudita (Mohamed e Alamri, 2012), no Canadá (Maghsoudi *et al.*, 2015) e na Polônia (Dziga *et al.*, 2016) têm indicado que há potencial de biodegradação em outros corpos d'água e, inclusive, sem histórico de florações.

Evidências têm apontado que os fatores chave para a biodegradação dessa cianotoxina são o desenvolvimento ou existência de condições favoráveis para a proliferação dos micro-organismos degradadores (Klitzke *et al.*, 2010), o entendimento do processo de biodegradação como uma função do consórcio microbiano presente na água e não apenas como a atividade de cepas isoladas (Santos, 2016) e a ocorrência sazonal de micro-organismos com capacidade de assimilação da cianotoxina (Ho *et al.*, 2012c).

Klitzke *et al.* (2010) verificaram que o fornecimento de um meio suporte, como sedimentos ou areia, permite a proliferação de micro-organismos com potencial de degradar CYN em águas sem histórico de florações de cianobactérias produtoras da referida substância. Demonstraram, também, que esses micro-organismos passam por uma fase de adaptação antes de iniciar a degradação da toxina, em função da necessidade de se adaptar e se desenvolver no meio suporte. A duração dessa fase lag pode ser reduzida com o contato da areia ou dos sedimentos com a CYN por um período determinado. O estudo investigou a biodegradação da cianotoxina em dois tipos de meio granular, sendo um deles areia proveniente de um filtro lento de uma estação de tratamento de água (ETA) em Berlim, Alemanha, e o outro sedimentos coletados de um manancial subterrâneo ao norte da cidade. Ambos os meios não haviam sido previamente expostos à CYN.

Os resultados do estudo de Klitzke *et al.* (2010) evidenciaram que, para uma concentração de 10 µg/L da toxina, a fase de adaptação durou aproximadamente 20 dias. Após 40 dias, constatou-se uma degradação de 92,3% na coluna de areia e de 98% no sedimento do manancial subterrâneo. A adição de matéria orgânica à água aumentou as taxas de degradação da cianotoxina, cuja natureza influenciou a duração da fase lag. A matéria orgânica mais facilmente assimilável foi preferencialmente metabolizada, prolongando a fase lag, enquanto a de maior

complexidade acelerou as taxas de degradação. O trabalho de Klitzke *et al.* (2010) tentou reproduzir as condições de biodegradação da CYN que ocorrem no ambiente. Não é precisamente uma avaliação da remoção da cianotoxina por meio da filtração lenta convencional em areia, devido a que as taxas de escoamento da água ($0,2 \text{ m}^3/[\text{m}^2 \text{ dia}]$) através dos meios não são praticadas na filtração lenta convencional. No entanto, as condições experimentais permitem certa associação com essa técnica de tratamento de água, especialmente no que diz respeito à disponibilização de um meio granular para a proliferação de micro-organismos degradadores e à degradação da toxina em meios não expostos previamente à sua presença.

Dado que na *schmutzdecke* se desenvolve uma atividade bioquímica e interações ecológicas, é de se esperar que a CYN seja removida por mecanismos biológicos como a biodegradação. Estudos indicam que a adsorção de CYN na areia do meio filtrante não é o principal mecanismo de remoção. Pesquisas realizadas por Klitzke *et al.* (2011) e Valencia-Cárdenas *et al.* (2023) demonstraram que meios arenosos, oriundos sistemas de filtração lenta, não adsorvem esta cianotoxina. Além disso, outros trabalhos, como o estudo de Grützmacher *et al.* (2002), corroboram essa constatação, demonstrando que a areia não adsorve outras toxinas, como a MCYST. Essas evidências reforçam a importância da biodegradação como o principal mecanismo atuante na remoção de CYN por filtração lenta convencional em areia.

3.2.3. Efeitos da cilindrospermopsina em organismos aquáticos

Diversos estudos têm apontado os efeitos da CYN em micro-organismos aquáticos. Os trabalhos têm se concentrado nos efeitos adversos sobre a sobrevivência, crescimento e comportamento desses organismos (Berry *et al.*, 2009). Entretanto, não se tem conhecimento sobre seus impactos específicos nos organismos aquáticos que podem ocorrer na camada biológica dos filtros lentos convencionais de areia.

A CYN tem apresentado efeitos agudos ou crônicos em algas, protozoários, macrófitas, invertebrados de água doce, peixes e anfíbios (Berry *et al.*, 2009; de la Cruz *et al.*, 2013; Scarlett *et al.*, 2020). Em microalgas, os resultados sobre a inibição do crescimento têm sido variados. Em estudos com *Chlorella vulgaris*, Campos *et al.* (2013) relataram uma inibição significativa do crescimento após a exposição a extratos brutos de *A. ovalisporum* e CYN purificada, enquanto Pinheiro *et al.* (2013) observaram um aumento na proliferação, possivelmente influenciado pelo aumento de nutrientes. Pinheiro *et al.* (2013) também mostraram que a CYN, em concentrações típicas do ambiente, não apresentou efeitos negativos no crescimento das microalgas *Nannochloropsis* sp. e *Chlamydomonas reinhardtii*. Por outro

lado, em cianobactérias, foi observada uma inibição significativa no crescimento e a ocorrência de necrose em células de *Microcystis aeruginosa*, quando expostas a concentrações de CYN variando entre 10 e 50 µg/L. Concentrações menores, na faixa de 1 a 5 µg/L, resultaram em uma leve redução das taxas de crescimento celular.

Em relação às bactérias e aos protozoários, Rasmussen *et al.* (2008) avaliaram o efeito antibiótico da CYN em células de *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados mostraram que essa cianotoxina não apresenta um efeito antibacteriano significativo em concentrações de até 300 µg/mL. Entretanto, foi verificado que *Naegleria lovaniensis*, um protozoário fagotrófico que habita em águas doces tropicais, foi muito mais susceptível à CYN em concentrações de 5 a 50 µg/mL. Os autores alertaram que a ingestão de células de cianobactérias produtoras, por protozoários, com susceptibilidade similar a *N. lovaniensis*, pode conduzir à morte desses organismos.

No que diz respeito à toxicidade da CYN em invertebrados, o estudo realizado por Nogueira *et al.* (2004) avaliou os efeitos de duas cepas de *R. raciborskii*, uma produtora de CYN e outra não produtora, em *Daphnia magna*. Ambas as cepas foram letais, sugerindo a presença de outras moléculas tóxicas produzidas pela cepa não produtora. Entretanto, a cepa produtora mostrou-se mais tóxica para esse crustáceo. A letalidade da CYN também foi observada em *Artemia salina*; Metcalf *et al.* (2002) constataram que em concentrações de 20 µg/L, a cianotoxina foi responsável pela mortalidade destes invertebrados.

Esses relatos mostram os efeitos negativos da CYN em todos os níveis tróficos que ocorrem em filtros lentos. Esses efeitos podem interferir na eficiência do tratamento de água por filtração lenta de diferentes formas. A toxicidade em protozoários, crustáceos e outros invertebrados pode prejudicar o mecanismo de predação, que é um dos principais responsáveis pela remoção de micro-organismos patogênicos. Embora bactérias não tenham mostrado sensibilidade à CYN em concentrações comuns no ambiente, é importante destacar que essa cianotoxina pode afetar negativamente microalgas e cianobactérias. A fotossíntese realizada por esses micro-organismos é responsável pela produção de oxigênio dissolvido na coluna d'água. Uma redução nos níveis de oxigênio dissolvido pode impactar o desenvolvimento das bactérias aeróbias, que são fonte de alimento para protozoários, crustáceos e invertebrados. Além disso, as bactérias aeróbias desempenham um papel essencial na oxidação e mineralização da matéria orgânica.

3.2.4. Remoção de cianobactérias e cianotoxinas por filtração lenta em areia

A filtração lenta convencional em areia tem sido largamente estudada na remoção de cianobactérias e cianotoxinas, com comprovada eficiência, particularmente, na remoção de *M. aeruginosa* e MCYSTs. Nesse contexto, Sá *et al.* (2002) demonstrou que a taxa de filtração influenciou significativamente a eficiência dos filtros lentos, sendo as taxas menores mais efetivas na remoção de células de *M. aeruginosa*. Por outro lado, foi apontada a necessidade de otimização dos parâmetros operacionais para garantir a aplicabilidade desta tecnologia no tratamento de águas contendo florações dessa cianobactéria. Nesse aspecto, Sá (2006) investigou a influência vários parâmetros de projeto para a remoção de *M. aeruginosa* e MCYSTs. Os resultados mostraram que, embora o tamanho efetivo da areia não tenha comprometido a qualidade da água filtrada, é importante ressaltar que o uso de tamanhos efetivos menores não é recomendável devido ao aumento da perda de carga que pode resultar na redução das carreiras de filtração. Em relação à espessura do meio filtrante, profundidades iguais ou menores que 0,60 m apresentaram uma maior ocorrência de traspasse de células. Além disso, foi observado um impacto negativo da presença de MCYSTs na água bruta sobre a remoção de coliformes.

O estudo conduzido por Grützmacher *et al.* (2002) avaliou a remoção de MCYSTs em filtros lentos convencionais de areia em escala real. Os pesquisadores realizaram dois experimentos distintos para abordar essa questão. No primeiro experimento, introduziram a cianotoxina de forma dissolvida na água afluente como um único pulso. No segundo experimento, simularam condições mais próximas da realidade, utilizando um afluente com células de *Planktothrix agardhii* ao longo de 26 dias. Na última condição, observou-se que a maioria das MCYSTs estiveram na forma intracelular.

No experimento inicial, Grützmacher *et al.* (2002) conseguiram alcançar uma remoção superior a 95%. Essa remoção foi principalmente atribuída ao processo de biodegradação. Já no segundo experimento, os pesquisadores perceberam remoções da cianotoxina superiores a 85% nos primeiros dias de operação dos filtros. Contudo, a diminuição da população de *P. agardhii* levou a um aumento na fração extracelular das MCYSTs, resultando em uma redução da remoção para valores inferiores a 60%. Essa diminuição foi associada ao aumento da fração extracelular das toxinas e às baixas temperaturas, inferiores a 4°C, que retardaram a biodegradação dessas substâncias. A influência da temperatura na eficácia do tratamento ressalta sua relevância em regiões com climas mais frios, onde a aplicação da filtração lenta convencional para esse propósito pode se tornar mais desafiadora durante as estações com temperaturas baixas.

A remoção de cianotoxinas também tem sido avaliada em filtros lentos domiciliares. Estes diferem dos filtros lentos convencionais, sobretudo, pelos materiais empregados na sua construção, pelas propriedades do meio filtrante, pelo regime de fluxo e pelas taxas de filtração adotadas (Freitas *et al.*, 2022). Terin e Sabogal-Paz (2019) investigaram a eficácia de filtros lentos domiciliares, operando com regimes de fluxo intermitente e contínuo, na remoção de células de *M. aeruginosa* e MCYST-LR. No estudo de Terin e Sabogal-Paz (2019), a concentração residual de MCYST-LR na maioria das amostras de água filtrada foi inferior a 1 µg/L, independentemente do regime de fluxo. Além disso, nos filtros operados com regime de fluxo intermitente, não foram identificadas diferenças entre os tempos de pausa de 4 e 12 h, indicando que esse parâmetro operacional não foi determinante na remoção de células de *M. aeruginosa* e de MCYST-LR.

A respeito do amadurecimento, a remoção de MCYSTs por filtração lenta em função do tempo de operação foi investigada por Messias e Brandão (2013). Os resultados indicaram que o tempo de amadurecimento foi um fator crucial para a eficiência de remoção da toxina. Os efluentes de filtros amadurecidos por pelo menos 10 dias apresentaram uma concentração residual inferior aos níveis estabelecidos na água para consumo humano na legislação brasileira. Foi observado também que, após o amadurecimento, a concentração de MCYSTs no afluente parece não influenciar à sua remoção, pois quando houve aumento dos teores da toxina na água bruta, a qualidade do efluente permaneceu estável.

Farias (2011) também investigou a influência do período de amadurecimento em filtros lentos precedidos por pré-filtração ascendente em pedregulho na remoção de *M. aeruginosa* e suas toxinas. Os resultados mostraram que o pré-filtro foi capaz de condicionar água bruta para ser tratada por filtração lenta. Entretanto, o amadurecimento dos filtros com água efluente desta unidade diminuiu a remoção de clorofila-a e turbidez quando comparado com o amadurecimento direto com água do lago Paranoá por 15 dias. Dessa forma, constata-se a importância de permitir um fluxo suficiente e constante de micro-organismos que colonizem o meio filtrante dos filtros lentos, com o propósito de favorecer o desenvolvimento da *schmutzdecke* e a atuação dos mecanismos biológicos no tratamento da água. Além disso, os resultados desse estudo indicaram que a presença de MCYSTs dissolvidas prejudicaram a remoção de coliformes totais e *E. coli*.

Em contraste, no trabalho de Salati (2010), os filtros não amadurecidos foram mais eficientes na remoção de MCYSTs extracelulares do que os filtros amadurecidos. Isto evidencia a possível participação do mecanismo de adsorção na areia limpa na redução da concentração da cianotoxina no efluente. Contra as evidências da maioria da literatura, o período de amadurecimento de

até 20 dias não garantiu efluentes com qualidade satisfatória e sem risco para a população em situações em que o manancial apresente floração tóxica de *M. aeruginosa*. Foi apontado que o desempenho foi comprometido pela ausência ou baixa densidade de bactérias especializadas na degradação de MCYST na água do lago Paranoá. Nesse sentido, Bourne *et al.* (2006) mostrou que a inoculação de *Sphingomonas* sp., uma bactéria com comprovada eficiência na degradação da cianotoxina, em filtros lentos resultou em um maior poder de degradação em relação aos filtros não inoculados.

Outras cianobactérias e cianotoxinas como *R. raciborskii* e saxitoxinas também têm sido objeto de menor número de estudos. Melo (2006) mostrou que, para concentrações elevadas de células de *R. raciborskii*, a filtração lenta como única etapa de tratamento não foi suficiente para garantir a qualidade da água tratada, além de aumentar aceleradamente a perda de carga. Foi também identificada uma interferência negativa na remoção de coliformes totais e *E. coli*, provocada pela presença de saxitoxinas na água bruta.

Todos os estudos aqui apresentados indicam que o principal mecanismo de remoção das cianotoxinas é a biodegradação. Entretanto, outros mecanismos como a adsorção no biofilme podem contribuir para a remoção dessas toxinas. Adicionalmente, as evidências apontam que a presença de cianotoxinas na água bruta tem impactos negativos na remoção de outros parâmetros, especialmente microbiológicos, como coliformes totais, *E. coli* e células de cianobactérias. Nesse contexto, é importante avaliar os efeitos das diferentes cianotoxinas nos sistemas de filtração lenta convencional, uma vez que se tratam de moléculas com características químicas bastante diferentes, dando atenção especial aos seus impactos sobre a microbiota responsável pela remoção dos diferentes parâmetros de qualidade da água. Dada a escassez de estudos relativos à CYN, a metodologia apresentada a seguir foi desenvolvida com o propósito de alcançar os objetivos propostos neste trabalho.

4. METODOLOGIA

4.1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Este trabalho foi desenvolvido empregando unidades de filtração lenta em escala piloto instaladas no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA) do Departamento de Engenharia Civil e Ambiental (ENC) da Universidade de Brasília (UnB). Com a metodologia aqui descrita, busco-se avaliar o potencial de remoção e os efeitos provocados pela cilindrospermopsina (CYN) em filtros lentos convencionais de areia. O trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

Etapa 1: Implementação e validação intralaboratorial do método de detecção e quantificação de CYN por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM).

Etapa 2: Montagem do sistema de filtração lenta em escala piloto e teste com traçador e hidráulico.

Etapa 3: Avaliação dos efeitos e da remoção de extrato algal contendo CYN a sua variante 7-desoxi-cilindrospermopsina (7-desoxiCYN) durante o amadurecimento de filtros lentos convencionais de areia.

Etapa 4: Avaliação do tempo de operação, da remoção e dos efeitos da CYN em filtros lentos convencionais de areia amadurecidos.

Esta pesquisa contou com a participação de profissionais, com conhecimentos específicos para o desenvolvimento de cada uma das etapas:

Etapa 1: O desenvolvimento e implementação do método de detecção e quantificação de CYN por CL-EM/EM foi auxiliado pela Dr^a. Katyeny Manuela da Silva. A validação intralaboratorial desse método foi realizada em parceria com o MSc. Matheus Almeida Ferreira.

Etapa 2: A montagem do sistema foi auxiliada pela Eng^a. Júlia Medina, a Eng^a. Thatiane de Souza Tavares e o Eng. Leon Mortari.

Etapas 3 e 4: Ambas as etapas foram conduzidas com o apoio da Eng^a. Thatiane de Souza Tavares e as análises microbiológicas foram auxiliadas pela Dr^a. Carla Simone Vizzotto e a Dr^a. Rafaella Silveira.

Para este estudo foram indispensáveis três materiais: **(1)** O padrão de CYN; **(2)** o extrato de *Raphidiopsis raciborskii* contendo CYN e 7-desoxiCYN, e **(3)** a água base. Esses elementos foram utilizados ao longo de todo o desenvolvimento do trabalho e, nas próximas seções, estão

apresentados com maiores detalhes.

4.2. PADRÃO SÓLIDO E EXTRATO DE *R. RACIBORSKII* CONTENDO CILINDROSPERMOPSINA E 7-DESOXI-CILINDROSPERMOPSINA

O padrão sólido, com pureza > 95%, foi adquirido da Eurofins/Abraxis (Eurofins/Abraxis, Warminster, PA, USA). Em suma, uma quantidade total de 1000 µg foi adquirida deste padrão.

O extrato foi preparado a partir de culturas de *R. raciborskii* na fase exponencial do crescimento. As culturas foram lisadas para liberar no meio a maior quantidade possível de CYN e demais metabolitos e material intracelular.

4.2.1. Cultivo de *Raphidiopsis raciborskii*

As células de *R. raciborskii* foram fornecidas pela Professora Sandra M. F. O. Azevedo do Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias (LETC) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e com colaboração da Professora Raquel M. Soares do ENC da UnB. As células foram cultivadas no LSA do ENC da UnB. O cultivo era unialgal, a cepa cultivada foi a CYP011K, conhecida por produzir CYN. Durante a realização deste trabalho, análises de CL-EM/EM sugeriram a presença de 7-desoxiCYN nas culturas de *R. raciborskii*. Na literatura consultada, a linhagem CYP011K não tem sido relatada como produtora de 7-desoxiCYN, portanto, é necessário realizar uma confirmação com material de referência para indiciar produção desta variante pela cepa cultivada no LSA.

O meio de cultura utilizado foi o meio ASM-1, o qual é amplamente usado em culturas de cianobactérias planctônicas (Gorham *et al.*, 1964 *apud* Carr e Whitton, 1982), cujo valor do pH foi ajustando entre 7 e 8.

O repique do cultivo foi feito a cada 14 dias, garantindo as melhores condições fisiológicas das células e um volume suficiente para cada uma das fases experimentais onde foi utilizado. A proporção volumétrica de inóculo utilizada foi de 1:10 (uma parte de inóculo para dez de volume total). Uma vez efetuado o repique, o novo cultivo permaneceu na sala de cultivos do LSA sob aeração mecânica constante.

As condições da sala de cultivo foram controladas, com uma temperatura de 24 °C e um foto-período de 12 h ao longo do tempo de crescimento. Após 14 dias a cultura era desmontada para a preparação do extrato. A densidade celular era de aproximadamente 10⁷ cel/mL.

4.2.2. Preparação do extrato

A preparação do extrato iniciou com o gelo e degelo 3 vezes consecutivas do volume total dos cultivos de *R. raciborskii*, promovendo assim a ruptura da parede celular. Após o último degelo, todas as culturas lisadas foram homogeneizadas e, posteriormente, filtradas em 3 filtros diferentes: **(1)** papel de filtro quantitativo faixa preta Nalgon 3551 de 12,5 cm de diâmetro e tamanho de poro de 7,5 µm; **(2)** membrana Millipore AP4004700 em microfibras de vidro, sem resina, de 47 mm de diâmetro e tamanho de poro de 0,7 µm e **(3)** membrana Millipore HAWP04700 em ésteres de celulose (nitrato 75 a 80% e acetato), de 47 mm de diâmetro e tamanho de poro de 0,45 µm. Este procedimento de filtração permitiu a remoção dos fragmentos remanescentes de células, resultando assim no extrato, com uma concentração de CYN entre 300 e 400 µg/L. Além disso, o extrato continha a forma análoga 7-desoxiCYN, mas não houve quantificação da sua concentração.

4.3. ÁGUA BASE E ÁGUAS DE ESTUDO

A água do lago Paranoá, um lago artificial localizado na cidade de Brasília/DF – Brasil, foi usada como base para a preparação das águas de estudo. A água foi coletada na Estação Experimental de Biologia da UnB, cujas coordenadas geográficas são 15°44'7,9"S e 47°52'53,1"W. Na Figura 4.1 é apresentada a localização do lago Paranoá e da Estação Experimental da Biologia.

Durante os ensaios de filtração foram utilizadas duas águas de estudo: **(1)** água do lago Paranoá que foi utilizada como controle e **(2)** água do lago Paranoá com CYN diluída. Na água do lago, estudos recentes não identificaram cianobactérias produtoras de CYN (Batista e Fonseca, 2018). Além disso, no estudo de Abbt-Braun *et al.* (2014), essa cianotoxina não foi detectada em amostras de água analisadas por CL-EM/EM. Neste estudo, as análises por CL-EM/EM também não identificaram a presença de CYN na água do lago Paranoá.

Na segunda água de estudo, a toxina foi adicionada ou por meio da diluição do extrato com concentração de CYN determinada, ou diluindo o padrão de CYN. O extrato foi utilizado na etapa de avaliação durante o amadurecimento, enquanto o padrão foi empregado na etapa que estudou os filtros já amadurecidos.

A concentração de CYN utilizada nas águas de estudo dependeu da etapa em que foram utilizadas. Para analisar a remoção da cianotoxina e seus impactos ao longo do amadurecimento, a concentração oscilou entre 9 e 39 µg/L, sendo sempre conhecida a concentração na água de estudo afluyente. Para investigar a remoção da toxina e seus efeitos em filtros maduros, a

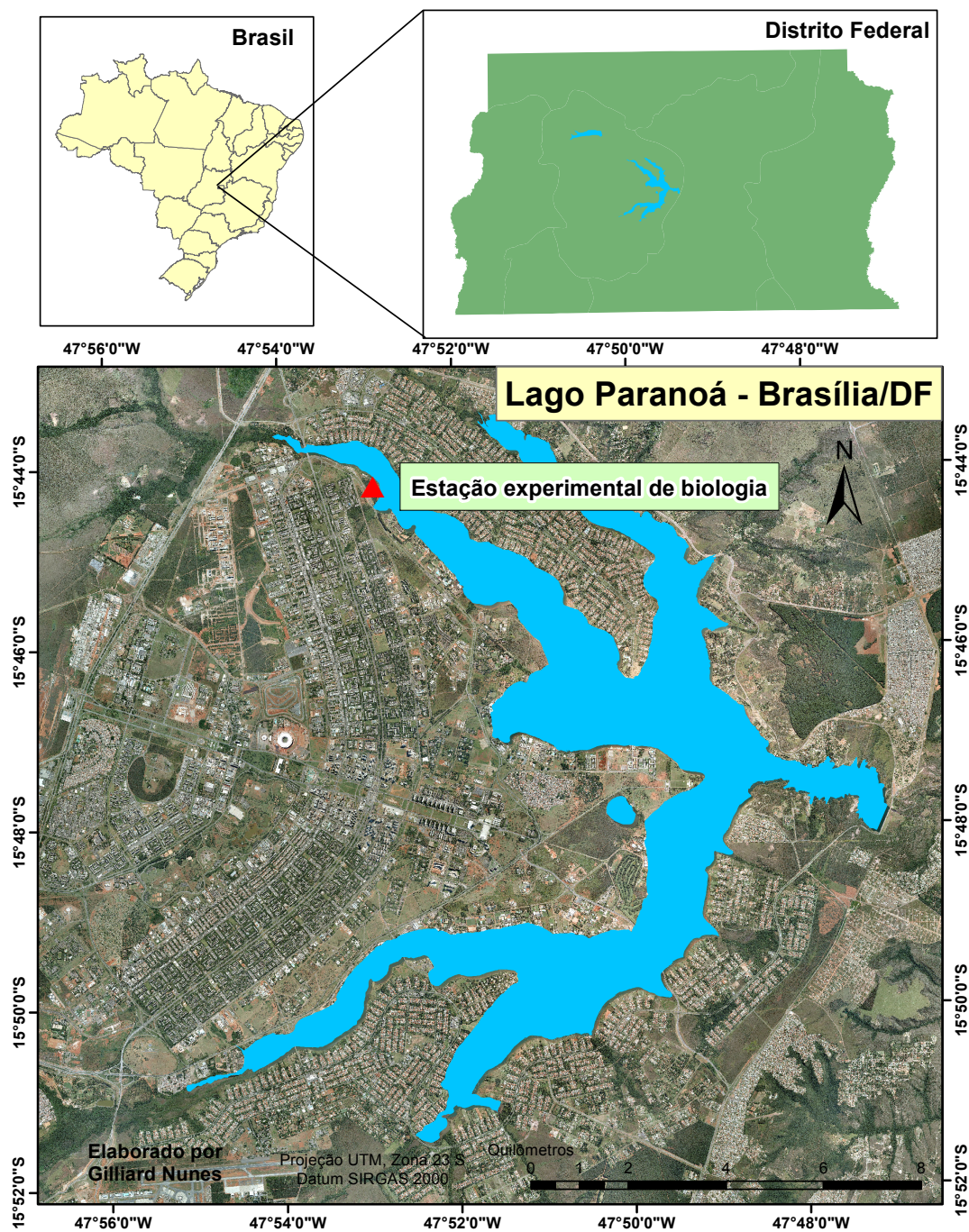


Figura 4.1: Mapa e localização do lago Paranoá e da Estação Experimental de Biologia onde foi captada a água de estudo utilizada neste trabalho. Elaborado por Gilliard Nunes

concentração situou-se na faixa de 0,5 a 2 $\mu\text{g/L}$. Essas faixas de concentrações correspondem a valores próximos dos comumente encontrados em florações de cianobactérias produtoras dessa cianotoxina (Saker e Eaglesham, 1999; Falconer e Humpage, 2006), em estudos de remoção e degradação da mesma (Ho *et al.*, 2011; Dziga *et al.*, 2016) e simulam as concentrações relatadas nos corpos hídricos brasileiros.

4.4. IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO INTRALABORATORIAL DO MÉTODO DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CILINDROSPERMOPSINA POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL

A seguir, encontra-se a descrição detalhada da metodologia empregada na implementação e validação intralaboratorial do método analítico para a detecção e quantificação de CYN nas amostras produzidas ao longo deste trabalho. A presença desta cianotoxina em corpos de água tem se tornado uma preocupação crescente. Portanto, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis e confiáveis para a identificação e quantificação dessa substância tóxica. Esta etapa se concentrou na utilização da CL-EM/EM como uma abordagem analítica avançada para a detecção e quantificação da CYN, com o intuito, não apenas de analisar as amostras obtidas durante o desenvolvimento deste estudo, também para fornecer informações valiosas para o monitoramento e controle da qualidade da água.

4.4.1. Produtos químicos e reagentes

O componente orgânico da fase móvel selecionada para este trabalho foi o metanol. Este produto químico, de grau CLAE, com pureza de 99,9%, foi adquirido da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil). Como modificador da fase móvel foi utilizado ácido acético glacial (CH₃COOH), grau CLAE, com pureza de 99,7% e foi adquirido da J.T Baker (J.T. Baker, Brasil). Na fração aquosa da fase móvel foi utilizada água ultrapura. Além dos elementos da fase móvel, nesta etapa foram preparadas soluções padrão de CYN. Conforme indicado no Item 4.3, para essas preparações foi utilizado padrão sólido da cianotoxina, dissolvido e diluído em diferentes concentrações.

A higienização dos materiais e vidrarias utilizadas em esta etapa foi feita com isopropanol e etanol, ambos alcoóis com grau de pureza para análise (P.A.) de $\geq 99,5\%$.

4.4.2. Instrumentação analítica

A separação cromatográfica foi feita usando um sistema de cromatografia líquida Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, Califórnia), equipado com bomba quaternária e degaseificador; acoplado a um espectrômetro de massas ion trap 3200 Q TRAP de triplo quadrupolo híbrido, Applied Biosystems/MDS Sciex (Sciex, Toronto, Canadá), provido com uma fonte de íons de eletronebulização (*electrospray*) operada em modo positivo usando um método de monitoramento de reações múltiplas (MRM). As análises cromatográficas foram executadas em uma coluna

Kromasil 100-5-C18 de fase reversa (Akzo Nobel, Bohus, Suécia), com dimensões de 150 × 4,6 mm e tamanho das partículas de enchimento de 5 µm. A coluna cromatográfica foi acoplada à sua respectiva pré-coluna, com dimensões de 3,0 × 4,6 mm e tamanho das partículas de enchimento de 5 µm.

A injeção das amostras foi realizada utilizando microseringas de 100 µL (Hamilton Company), entretanto o volume necessário para as análises foi de 20 µL por amostra.

Todas as amostras injetadas no sistema de CL-EM/EM foram filtradas em membranas filtrantes ou filtros de seringa com abertura de 0,22 µm antes de serem analisadas.

4.4.3. Otimização dos parâmetros da espectrometria de massas sequencial

Para a otimização foi preparada uma solução padrão de CYN em água ultrapura, obtida de um sistema de purificação de água Milli-Q[®] (referência C79625, Merck Millipore, Darmstadt, Hesse, Alemanha), com uma concentração de 50 µg/L. Essa solução foi injetada diretamente no espectrômetro de massas. Para fins da otimização, foi executada uma análise automática de espectrometria de massas sequencial (EM/EM), com a assistência do software Analyst 1.4.2 (Applied Biosystems/MDS SCIEX Instruments), para produzir fragmentos da molécula de CYN e monitorar as transições 416,1/194,3; 416,1/336,1 e 416,1/176,2. Essas transições foram selecionadas com base no trabalho de Guzmán-Guillén *et al.* (2012) e no método 545 da U.S. EPA (2015).

Os parâmetros otimizados automaticamente, para as transições selecionadas, foram as pressões da cortina de gás, do gás nebulizante e do gás secante; juntamente com a voltagem capilar, o potencial de orifício (DP), a energia de colisão (CE) e o potencial de saída da célula de colisão (CXP). Essa otimização gerou um método de MRM.

4.4.4. Implementação do método

O ponto de partida para a implementação foi o método 545 da U.S. EPA (2015), que foi adaptado para as condições e equipamentos disponíveis no LSA. A fase móvel utilizada foi composta por água ultrapura e metanol. Na água ultrapura foi adicionado CH₃COOH como modificador, a uma concentração de 0,15% v/v. A fase móvel utilizada foi igual à proposta no método 545 da U.S. EPA (2015).

O perfil de eluição, o tempo de corrida, o fluxo de fase móvel e a temperatura da fonte de íons

de eletronebulização foram otimizados manualmente. Diferentes combinações entre os quatro parâmetros foram testadas até obter a maior intensidade do sinal e a maior resolução possíveis. Para o perfil de eluição foram testados percentuais de metanol no fluxo da fase móvel entre 0% e 100%. O tempo da corrida oscilou entre 5 e 12 min. O fluxo de fase móvel testado esteve na faixa de 200 a 800 $\mu\text{L}/\text{min}$. Por último, a temperatura da fonte foi testada entre 120 e 700 $^{\circ}\text{C}$. A combinação dos quatro fatores que apresentou a maior intensidade do sinal e a maior resolução foi selecionada como condição de operação otimizada.

4.4.5. Validação do método

Uma vez otimizados os parâmetros da cromatografia líquida e da espectrometria de massas sequencial, iniciou-se o processo de validação do método. Primeiramente foi definido o tempo de eluição da CYN. Posteriormente foram avaliadas as características de desempenho do método, sendo estas: Seletividade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), faixa de trabalho, linearidade, viés e robustez. Cabe ressaltar que a validação do método foi feita separadamente para duas matrizes: Água ultrapura e água natural (água do lago Paranoá). Todo o processo de validação do método e as formas de avaliação das características de desempenho seguiram as indicações de Magnusson e Örnemark (2014) e Barwick (2019).

4.4.5.1. Tempo de eluição

Para determinar o tempo de eluição da CYN foram injetadas, em triplicata, soluções padrão de 1; 45 e 90 $\mu\text{g}/\text{L}$ e foi verificado o tempo de aparição do sinal (pico) para cada concentração. O tempo de eluição foi computado como a média de todos os tempos.

4.4.5.2. Seletividade

Para testar a seletividade do método foram analisadas amostras preparadas, onde deliberadamente foram introduzidas possíveis interferências em cada uma das matrizes. As interferências selecionadas para a matriz de água ultrapura foram:

1. Extrato de CYN contendo tanto a cianotoxina quanto a sua análoga 7-desoxiCYN e matéria orgânica algogênica (MOA). Esta interferência foi selecionada uma vez que, para avaliar o efeito da CYN durante o amadurecimento, foi utilizado esse extrato, diluído em água do lago Paranoá, como afluente da metade dos filtros em operação.
2. Ácidos húmicos. Essa substância foi selecionada devido à sua forte presença em águas naturais.
3. Extrato de CYN com adição de ácido húmico. Isto para verificar se existiu alguma

interação entre ambas as possíveis interferências.

Na matriz de água do lago Paranoá foi avaliada uma única interferência, a diluição do extrato. Além disso, por se tratar de uma matriz de água natural, com outras substâncias orgânicas dissolvidas, a água do lago também foi analisada sem a introdução de interferências.

As amostras com cada uma das interferências foram medidas sem adição do analito e, em seguida, foram medidas novamente depois de serem fortificadas com padrão de CYN, perfazendo uma concentração de 5 µg/L em cada uma das amostras. É importante destacar que as amostras com extrato como interferência já contavam com uma concentração de fundo de aproximadamente 1 µg/L.

A avaliação da seletividade do método foi feita verificando as diferenças entre as amostras com as interferências e o valor de referência de 5 µg/L, conforme indicado no Item 4.4.5.7.

4.4.5.3. Limite de detecção e limite de quantificação

O LD foi avaliado com o propósito de verificar qual é o valor crítico no qual o método consegue indicar um nível de CYN significativamente diferente de zero. Por sua vez, o LQ indica qual é a concentração mínima de CYN, que supera o seu valor crítico, na qual a quantificação feita pelo método é confiável (Magnusson e Örnemark, 2014).

Para estimar o LD, primeiramente foi definida a concentração de CYN próxima ao valor mínimo que se deseja do método. Neste caso, foi selecionada uma concentração de 0,5 µg/L. Essa concentração foi selecionada com o objetivo de verificar se o método consegue detectar a cianotoxina em concentrações inferiores aos limites permitidos na água para consumo humano, que são 1 µg/L no Brasil (Ministério da Saúde, 2021) e 0,7 µg/L de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2020).

Foram então preparadas 10 amostras de cada matriz, cada uma fortificada com 0,5 µg/L de CYN. Seguidamente, as medições de cada amostra foram submetidas a testes estatísticos, descritos no Item 4.4.5.7 para identificar possíveis diferenças nas medições. Posteriormente, foi calculado o desvio padrão corrigido, conforme se apresenta na Equação (4.1).

Com o desvio padrão corrigido foram calculados o LD e o LQ de acordo com as Equações (4.2) e (4.3), respectivamente. De acordo com Magnusson e Örnemark (2014), o fator adimensional k_0 adota como padrão o valor de 10.

$$S_0' = \frac{S_0}{\sqrt{n}} \quad (4.1)$$

S_0' — Desvio padrão corrigido
 S_0 — Desvio padrão das leituras de cada amostra
 n — Número de medições feitas por amostra ($n = 3$)

$$\text{LOD} = 3 \cdot S_0' \quad (4.2)$$

$$\text{LOQ} = k_Q \cdot S_0' = 10 \cdot S_0' \quad (4.3)$$

LOD — Limite de detecção
 LOD — Limite de quantificação
 S_0' — Desvio padrão corrigido
 k_Q — Fator adimensional ($k_Q = 10$)

4.4.5.4. Faixa de trabalho e linearidade

A faixa de trabalho e a linearidade foram avaliadas conjuntamente. A avaliação de ambas as características consistiu na injeção, em triplicata, de 10 padrões de calibração, preparados a partir do padrão sólido de CYN, em ambas as matrizes de água. A concentração dos padrões de calibração variou entre 0,5 e 90 µg/L. Esses limites foram definidos de acordo com as necessidades de quantificação deste trabalho, considerando, especialmente, os limites máximos permitidos na água para consumo humano.

A linearidade do método foi testada em 2 faixas de concentrações: Baixas concentrações e médias e altas concentrações. Estipulou-se que as baixas concentrações compreendem a faixa de 0,5 a 10 µg/L e foi avaliada usando padrões de calibração de 0,5; 1; 2; 5 e 10 µg/L. As médias e altas concentrações correspondem à faixa de 10 a 90 µg/L, que foi avaliada usando os padrões de calibração de 10; 15; 30; 45; 60; 75 e 90 µg/L. Para cada faixa de concentração e cada matriz de água foram realizadas regressões lineares, cujo coeficiente de determinação maior que 0,99 ($R^2 \geq 0,99$) foi usado com critério para a linearidade. A união de ambas as faixas de concentração foi definida como a faixa de trabalho do método.

4.4.5.5. Viés

A determinação do viés foi feita para duas concentrações, sendo uma da faixa de baixas concentrações e outra da faixa de médias e altas concentrações. Para definir o viés foram preparadas 20 amostras de cada matriz, dez delas fortificadas com 1 µg/L e outras dez fortificadas com 20 µg/L. As amostras foram analisadas em triplicata.

As medições feitas para cada amostra foram analisadas estatisticamente (Item 4.4.5.7) para identificar a principal fonte de variação dos dados.

O viés de $\pm 20\%$ foi definido como máximo aceitável em termos da recuperação aparente, calculada conforme a Equação (4.4).

$$R = \frac{\bar{x}}{x_{\text{ref}}} \times 100\% \quad (4.4)$$

R — Recuperação aparente
 \bar{x} — Média das medições das amostras
 x_{ref} — Concentração de referência

4.4.5.6. Robustez

A robustez foi avaliada com o intuito de medir a capacidade do método em realizar medições confiáveis diante mudanças nas condições operacionais (Barwick, 2019). Neste estudo foram selecionadas quatro possíveis mudanças operacionais que podem interferir nas medições feitas pelo método.

Para determinar o efeito de cada condição nas medidas e para classificar os fatores de acordo com o efeito de cada um nas medições foi realizado um experimento fatorial com 4 fatores e 2 níveis (2^4). Os fatores considerados foram a concentração do modificador da fase móvel, a mudança de analista, a temperatura e o pH da amostra. Cada um desses fatores contou com 2 níveis, que são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Fatores e níveis adotados no experimento fatorial para avaliar a robustez do método de detecção e quantificação de cilindrospermopsina (CYN) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) validado e utilizado neste trabalho

Fator	Nível 1	Nível 2
Modificador [% v/v]	0,10	0,20
Analista	Analista 1	Analista 2
Temperatura da amostra [°C]	4	20
pH da amostra	4	8

De acordo como os fatores e seus níveis foram realizados 16 experimentos, nos quais foram avaliadas todas as combinações possíveis entre eles e a resposta do método em termos da área do pico diante cada condição. Seguidamente foram calculados os efeitos principais e de interação dos fatores selecionados. Na Tabela 4.2 pode se observar a matriz de planejamento dos 16 ensaios com cada uma das combinações avaliadas.

4.4.5.7. Análises estatísticas

Durante o processo de validação, todos os conjuntos de dados obtidos foram submetidos ao teste

Tabela 4.2: Matriz de planejamento do experimento fatorial para a verificação da robustez do método de detecção e quantificação de cilindrospermopsina (CYN) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) validado e utilizado neste trabalho

Ensaio	Efeitos			
	Concentração de CH ₃ COOH na fase móvel [% v/v]	Analista	Temperatura [°C]	pH
1	0,1	Analista 1	20	4
2	0,1	Analista 1	20	8
3	0,1	Analista 1	4	4
4	0,1	Analista 1	4	8
5	0,1	Analista 2	20	4
6	0,1	Analista 2	20	8
7	0,1	Analista 2	4	4
8	0,1	Analista 2	4	8
9	0,2	Analista 1	20	4
10	0,2	Analista 1	20	8
11	0,2	Analista 1	4	4
12	0,2	Analista 1	4	8
13	0,2	Analista 2	20	4
14	0,2	Analista 2	20	8
15	0,2	Analista 2	4	4
16	0,2	Analista 2	4	8

de normalidade de Shapiro-Wilk. Os resultados confirmaram a normalidade dos dados, com valores de $\alpha > 0,05$. Como a distribuição dos dados mostrou-se semelhante a uma distribuição normal, as diferenças entre eles foram então avaliadas utilizando análises de variância (ANOVAs), com um nível de significância de $\alpha = 0,05$. Quando as análises apresentaram significância com $\alpha \leq 0,05$, procedeu-se à aplicação do teste Tukey para identificar quais grupos apresentavam diferenças significativas entre si.

4.4.6. Detecção de 7-desoxi-cilindrospermopsina

A cepa de *R. raciborskii* utilizada para a preparação do extrato de CYN mostrou indícios da produção 7-desoxiCYN. Por este motivo, o processo de otimização dos parâmetros da espectrometria de massas sequencial também foi orientado para a detecção dessa variante. Além das transições para a identificação e quantificação de CYN, a análise automática para a produção de fragmentos da 7-desoxiCYN monitorou as transformações 400,30/194,30; 362,18/194,30

e 320,17/194,30. Essas transformações foram selecionadas por serem comprovadamente apropriadas para a identificação dessa molécula (Norris *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001a; Seifert *et al.*, 2007).

Dada a falta de material padronizado e de referência para a 7-desoxiCYN, o método não foi validado para a quantificação desta substância. Os resultados das análises deste parâmetro foram utilizados de forma qualitativa e relativa. Entretanto, a detecção desta variante permitiu fazer algumas inferências em relação à sua remoção relativa, usando a área dos picos.

4.5. DESCRIÇÃO DO SISTEMA DE FILTRAÇÃO LENTA CONVENCIONAL EM ESCALA PILOTO

4.5.1. Descrição e operação do sistema de filtração lenta convencional em areia

Para o desenvolvimento dos ensaios de filtração foi montado um sistema de filtração lenta convencional em areia em escala piloto. Esse sistema foi constituído por (a) dois reservatórios de 60 L para a alimentação da água de estudo; (b) dois reservatórios intermediários de nível constante e com vertedor tipo tulipa; (c) duas bombas dosadoras; (d) uma bomba peristáltica; (e) quatro filtros lentos e (f) recipientes para a coleta de amostras como se observa nas Figuras 4.2 e 4.3.

Os filtros lentos de areia foram alimentados em paralelo pela bomba peristáltica e operaram sob a condição de taxa de filtração constante e nível de água variável. A taxa de filtração foi monitorada diariamente por meio de medições da vazão efluente e a área da seção transversal dos filtros. O controle da taxa foi realizado ajustando diariamente a vazão de operação da bomba peristáltica. Destaca-se que esses ajustes não alteravam significativamente a vazão de operação, pois o propósito foi manter a exatidão da taxa de filtração adotada de $2 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \text{ dia})$.

Com o intuito de evitar oscilações na vazão afluente aos filtros, foram utilizados os reservatórios intermediários de nível constante e com vertedor tipo tulipa. O vertedor permitiu a recirculação do afluente para os reservatórios de alimentação, evitando o desperdício de água de estudo.

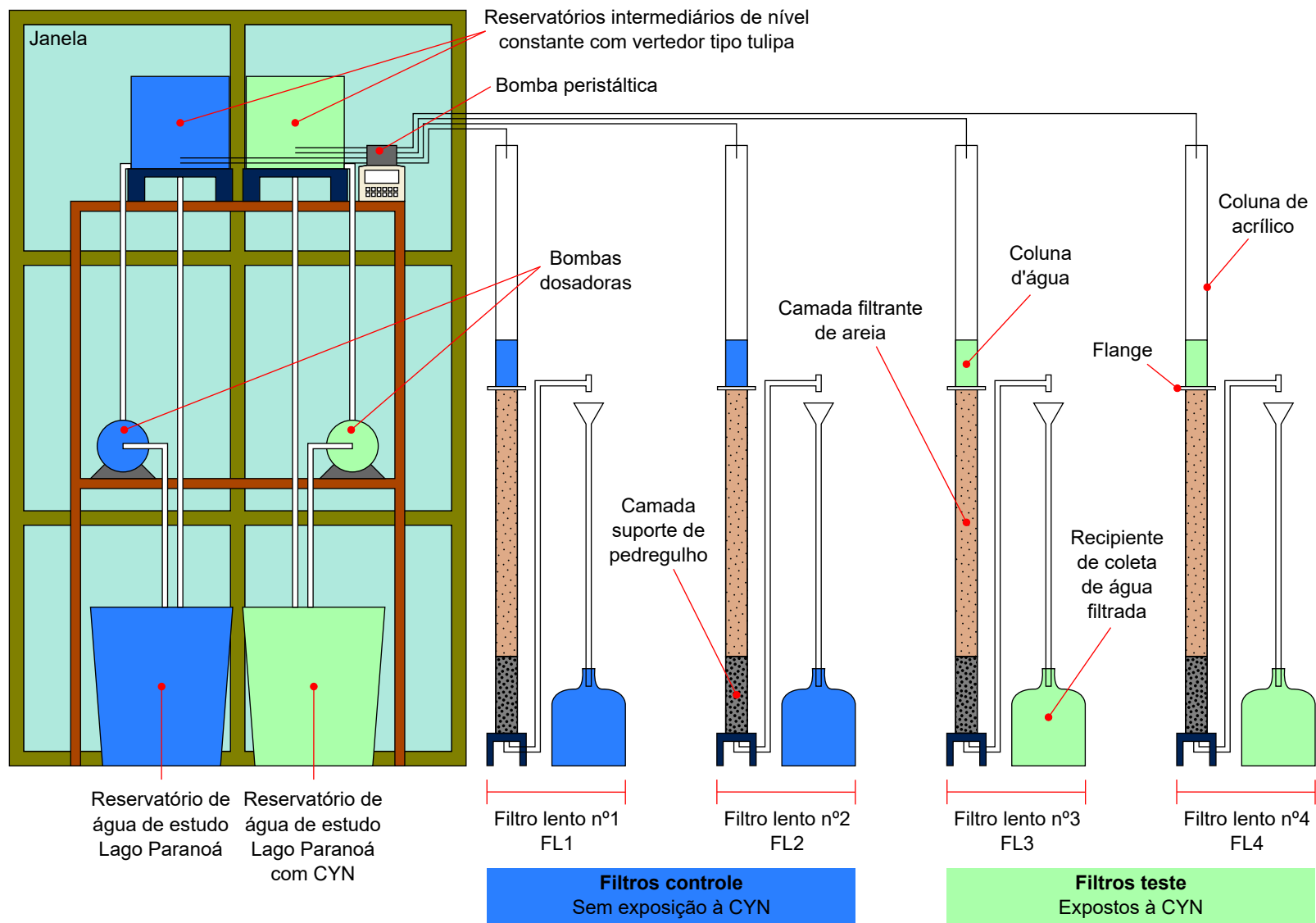


Figura 4.2: Esquema da instalação experimental de filtração lenta convencional em areia em escala piloto utilizada na realização deste trabalho.

Figura do autor



Figura 4.3: Fotografia da instalação experimental de filtração lenta convencional em areia em escala piloto utilizada na realização deste trabalho. Fotografia capturada por Thatiane de Souza Tavares

O sistema de filtração lenta foi alocado próximo de uma janela, a qual permitiu a entrada de luz solar na ala do LSA onde estava instalado. Alguns autores (Ho *et al.*, 2006; Sá, 2006; Taira, 2008; Almeida, 2018, entre outros) construíram as suas colunas de filtração em acrílico transparente, o mesmo material selecionado neste estudo. Este material permite a exposição do meio filtrante à luz solar. Para diminuir e minimizar o efeito da incidência de luz sobre o meio filtrante, que promove o crescimento excessivo de algas (Tangerino *et al.*, 2006) e a degradação (fotodegradação) da CYN (Chiswell *et al.*, 1999), a parte externa das colunas de filtração foi coberta com papel de alumínio durante a operação do sistema, como ilustrado na Figura 4.4.

A espessura da camada suporte foi de 30 cm, com três subcamadas de 10 cm, selecionada com base nas recomendações de projeto propostas por Visscher (1990) e Ferreira Filho (2017). A profundidade do meio filtrante foi de 1,05 m, selecionada com base no trabalho de Sá (2006)

por ser uma profundidade com melhor desempenho na remoção dos parâmetros de qualidade da água, células de *Microcystis aeruginosa* e microcistina (MCYST). Essa profundidade do meio filtrante atende também às recomendações de projeto propostas por Crittenden *et al.* (2012).

A perda de carga nos filtros foi medida por meio de 11 tomadas piezométricas distribuídas em diferentes profundidades do meio filtrante, com um maior número próximo ao topo, para acompanhar a perda de carga associada à *schmutzdecke* nos primeiros centímetros do meio filtrante, como apresentado na Figura 4.4.

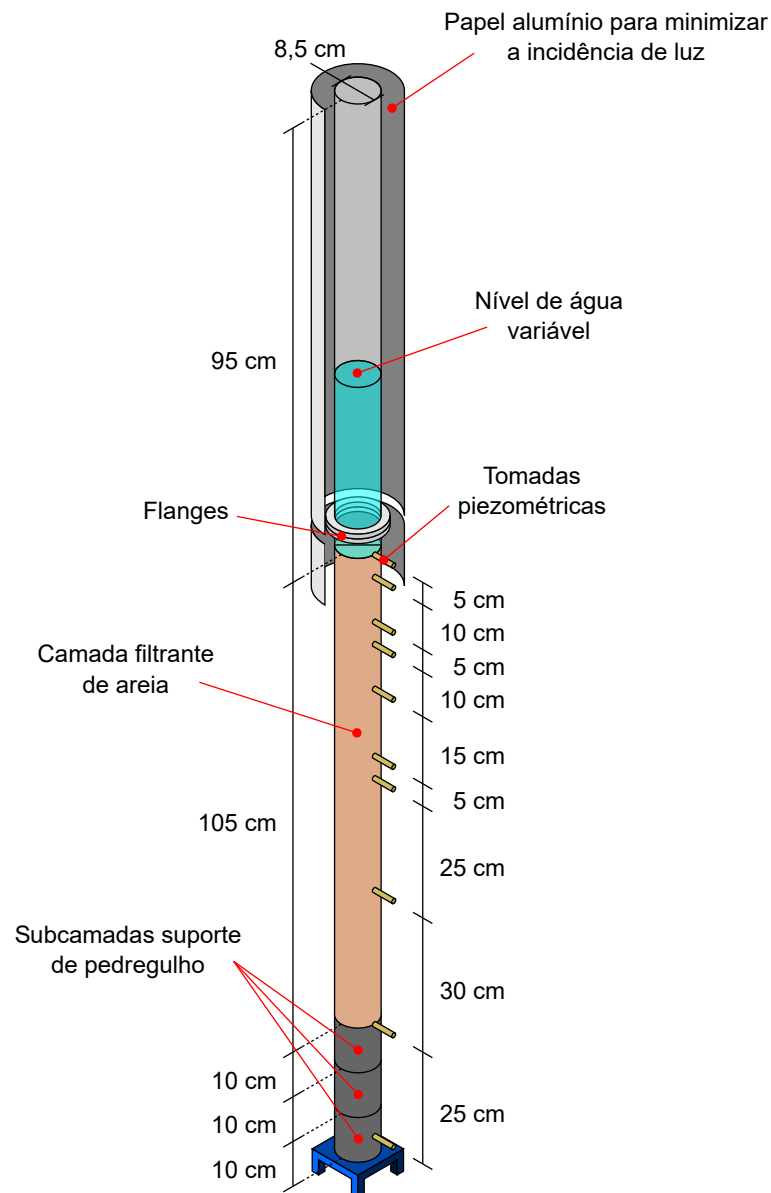


Figura 4.4: Descrição e medidas dos componentes de cada filtro lento utilizada na realização deste trabalho. Figura do autor

4.5.2. Caracterização da areia utilizada como meio filtrante e da camada suporte

As características da areia utilizada como meio filtrante foram semelhantes às utilizadas nos estudos de Sá (2006) e Almeida (2018). A areia empregada neste estudo foi adquirida de uma empresa especializada na produção de areia para filtros. O pedregulho da camada suporte estava disponível no LSA e já tinha sido usado em outros trabalhos. Antes de serem utilizados para preencher as colunas de filtração, a areia e o pedregulho passaram por um processo de limpeza, que consistiu em múltiplas lavagens com água da torneira, seguido de secagem a temperatura ambiente, por um período de aproximadamente uma semana. Tal procedimento foi necessário para remover impurezas aderidas aos grãos de areia e aos seixos do pedregulho, atendendo à norma ABNT NBR 11799 (ABNT, 2016).

Posteriormente, a areia e o pedregulho foram caracterizados quanto à granulometria, seguindo as indicações de norma ABNT NBR 11799 (ABNT, 2016). Com esse propósito, a areia e o pedregulho foram peneirados no Laboratório de Geotecnia do ENC da UnB em um peneirador automático. Para caracterizar a areia foram dispostas em série as peneiras com aberturas de 0,15; 0,25; 0,3; 0,425; 0,595; 0,71; 0,85 e 1 mm. Em seguida, uma fração da areia foi colocada no topo da série de peneiras (1 mm) e foi acionado o peneirador automático. Este procedimento foi repetido até peneirar toda a areia. A caracterização granulométrica da camada suporte seguiu o mesmo procedimento descrito para a areia. Entretanto, as aberturas das peneiras utilizadas para a camada suporte foram 1; 2; 4,76; 6,30; 19,1 e 31,7 mm. Na Figura 4.5 é apresentada a curva da distribuição granulométrica da areia utilizada como meio filtrante.

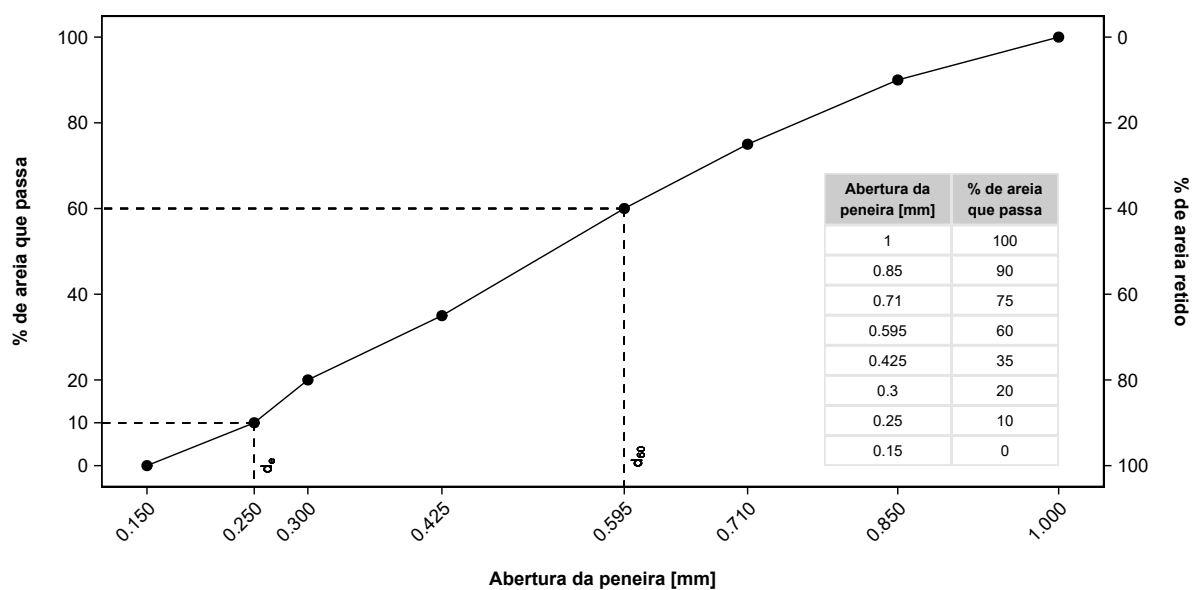


Figura 4.5: Curva granulométrica obtida após peneiramento da areia utilizada neste estudo

A partir das informações da distribuição granulométrica da areia foram definidos o d_e e o d_{60} e foi calculado o coeficiente de desuniformidade. Estas características do meio filtrante são apresentadas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Características granulométricas da areia utilizada em este estudo

Característica	Valor
Diâmetro efetivo (d_e) [mm]	0,25
Tamanho dos grãos [mm]	0,15 – 1,00
Coeficiente de desuniformidade (CD)	2,38
Porosidade (ϵ)	0,4
Profundidade do meio filtrante [cm]	105

4.6. TESTE COM TRAÇADOR

Uma vez montados os filtros, foi realizado um teste com traçador antes do início da operação do sistema de filtração. O teste teve como propósito definir o tempo de detenção hidráulico, necessário para realizar as amostragens da água bruta e da água filtrada. Para o teste com foi dissolvida em água destilada uma quantidade de NaCl que conferiu uma condutividade de 850 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Essa água foi alimentada ao sistema de filtração a uma taxa de aproximadamente 2 $\text{m}^3/(\text{m}^3 \text{ dia})$. No efluente de cada filtro foi medida manualmente a condutividade elétrica, sem utilização de sonda e, portanto, a frequência medição foi de 60 min. Quando a condutividade no efluente foi próxima de 800 $\mu\text{S}/\text{cm}$, a condutividade passou a ser monitorada a cada 30 min. O ensaio finalizou quando a condutividade do efluente atingiu o valor de 850 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Dado que o regime de escoamento pode ser considerado laminar e assemelha-se a um fluxo de pistão, o tempo que o traçador (NaCl) leva desde a entrada até a saída de cada filtro pode ser visto como o período necessário para que um elemento de fluido atravesse todo o volume do filtro. Para este estudo, a realização desse teste específico para determinar o tempo de detenção hidráulica mostrou-se apropriada. Com base nesse tempo, foi possível determinar os momentos ideais para coletar amostras após a inoculação de CYN e/ou a renovação da água em estudo.

Outros estudos, onde foram realizados testes com traçador em sistemas de filtração lenta similares, operando em modo contínuo, mostraram um desvio padrão da média do tempo de detenção hidráulico entre 20 e 80 min (Freitas e Sabogal-Paz, 2019; Andreoli e Sabogal-Paz, 2020; Sabogal-Paz *et al.*, 2020; Hojo *et al.*, 2022). Dado que o teste com traçador neste trabalho não teve réplica e considerando os desvios padrão de pesquisas semelhantes, o tempo de detenção hidráulico determinado experimentalmente foi acrescentado em 60 min com o intuito de garantir

a completa renovação da água dentro do sistema de filtração.

4.7. MONITORAMENTO DOS PARÂMETROS DE OPERAÇÃO E DE QUALIDADE DA ÁGUA

No presente trabalho foram acompanhados e monitorados os seguintes parâmetros de qualidade da água: **(a)** alcalinidade, **(b)** carbono orgânico total (COT) **(c)** CYN, **(d)** coliformes totais, **(e)** cor verdadeira, **(f)** 7-desoxiCYN (qualitativamente), **(g)** *Escherichia coli*, **(h)** perda de carga nos primeiros 5 cm de profundidade do meio filtrante, **(i)** pH, **(j)** taxa de filtração e **(k)** turbidez.

Parte dos parâmetros de qualidade da água foram avaliados conforme às indicações da APHA (2012) contidas na obra *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. As amostras foram coletadas tanto nas águas de estudo como nos efluentes dos filtros. Cabe lembrar que as amostras de água filtrada foram coletadas, pelo menos, depois do tempo de renovação da água, acrescido em 1 h, contabilizado a partir do momento em que foram coletadas as amostras das águas de estudo. Na Tabela 4.4 encontram-se resumidas algumas informações sobre o ponto de monitoramento, os equipamentos utilizados e os procedimentos analíticos indicados pela literatura. Na Tabela 4.5 estão os limites mínimos e máximos e a precisão das técnicas e dos equipamentos utilizados para medir os parâmetros de qualidade da água.

Todos os parâmetros citados na Tabela 4.4 foram medidos imediatamente depois das coleta de amostras. Unicamente a CYN, a 7-desoxiCYN e o COT foram medidos depois de um período de armazenamento. As amostras da cianotoxina e a sua análoga foram filtradas em filtros de seringa com abertura de 0,22 µm, armazenadas em vials de vidro limpos e congeladas a -14 °C por um período inferior a 30 dias até o momento da análise. As amostras para COT foram coletadas, filtradas em membrana de fibra de vidro com abertura de 0,7 µm e preservadas a 4 °C, por no máximo 24 h antes de serem analisadas.

As análises de coliformes totais foram realizadas na água do lago Paranoá e na água de estudo com padrão de CYN diluído. Os extratos de algas apresentam altos níveis de atividade de β-D-galactosidase, interferindo nas contagens de coliformes totais pelo método do substrato cromogênico (Davies *et al.*, 1994; Tryland e Fiksdal, 1998; Pisciotta *et al.*, 2002). A atividade enzimática dos extratos algais provoca resultados falso positivos, uma vez que os indicadores nutrientes, utilizados no teste Colilert, são metabolizados pela enzima β-galactosidase dos coliformes. Dessa forma, contagens de coliformes totais na água de estudo com extrato de CYN não foram realizadas, pois neste trabalho também observaram-se resultados falso positivos.

Tabela 4.4: Resumo das informações sobre o ponto de monitoramento, os equipamentos utilizados e os procedimentos para o acompanhamento da evolução dos parâmetros de qualidade da água e operacionais da filtração lenta em areia monitorados neste trabalho

Parâmetro	Ponto de monitoramento	Equipamentos	Procedimento (APHA, 2012)
Alcalinidade	Águas de estudo	pHmetro EVEN PHS-3E	2320
COT	Águas de estudo e água filtrada	Analizador de carbono SHIMADZU TOC-L CSH	NA
CYN e 7-desoxiCYN	Águas de estudo e água filtrada	Espectrômetro de massas 3200 Q TRAP	NA
Coliformes totais e <i>E. coli</i>	Águas de estudo e água filtrada	Seladora e cartelas Quany-Tray IDEXX	9223
Cor verdadeira	Águas de estudo e água filtrada	Espectrofotômetro HACH DR 5000	2120C
Perda de carga	Camada de areia e camada suporte	Tomadas piezométricas	NA
pH	Águas de estudo e água filtrada	pHmetro EVEN PHS-3E	NA
Taxa de filtração	Vazão efluente	NA	NA
Turbidez	Águas de estudo e água filtrada	Turbidímetro HACH 2100 NA	2130

NA — Não se aplica

Tabela 4.5: Limites de detecção e precisão das técnicas analíticas e dos equipamentos utilizadas para medição dos parâmetros de qualidade da água e operacionais da filtração lenta em areia estudados neste trabalho

Parâmetro	Limite mínimo	Limite máximo	Precisão
Alcalinidade (mg CaCO ₃ /L)	10	500	±1
CYN (µg/L)	0,350	90,000	±0,001
Coliformes totais e <i>E. coli</i> (NMP/100 mL)	1	2419,6	±1
Cor verdadeira (uH)	0	500	±1
Perda de carga (cm)	0	100	±0,1
pH	0,01	13,99	±0,01
Turbidez (uT)	0,00	99,90	±0,01

4.8. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

O objetivo das análises microbiológicas foi avaliar a composição da microbiota e fazer comparações entre os filtros, permitindo assim, inferir sobre os efeitos da CYN no seu desenvolvimento e no desempenho das unidades filtrantes. Neste trabalho, as análises microbiológicas abrangeram as comunidades bacteriana, planctônica e bentônica. Por algumas limitações, neste texto são apresentadas as análises da microbiota bacteriana da etapa que avaliou o período de amadurecimento. Na etapa onde se avaliaram os filtros lentos já amadurecidos, as análises microbiológicas apresentadas estão focadas nas comunidades planctônica e bentônica.

4.8.1. Amostragem

O procedimento de coleta de amostras resultou da adaptação das metodologias usadas por Taira (2008) e Bichai *et al.* (2010). Para a amostragem, a água sobre o meio filtrante foi drenada por sifonamento, deixando apenas um nível mínimo de água para manter a areia submersa. Em seguida, a parte superior de cada coluna de filtração foi retirada a partir do local da flange de conexão (ver Figuras 4.2 e 4.4), para facilitar o acesso manual ao topo do meio filtrante. Posteriormente, frações dos primeiros 3 cm do topo do meio filtrante foram coletadas com o auxílio de tubos Falcon estéreis de 50 mL, retirando aproximadamente 100 cm³ de areia úmida de cada filtro. A metade da areia retirada de cada filtro (~50 cm³) foi utilizada para as análises da comunidade bacteriana. A fração restante de areia coletada foi utilizada para as análises das comunidades planctônica e bentônica.

4.8.2. Análises da comunidade bacteriana

Junto com a areia, foram coletados 1000 mL de água de cada reservatório de alimentação do sistema de filtração. O volume coletado de cada reservatório foi dividido em duas alíquotas de 500 mL e filtrado em membrana de ésteres de celulose com abertura de 0,45 µm, com o propósito de reter particulados que serviram como amostras da comunidade bacteriana das águas de estudo. As membranas e a areia coletada de cada filtro foram divididas em duas amostras e armazenadas em ultracongelador a -80 °C até o momento da extração de DNA.

Antes de realizar a extração de DNA, as amostras de areia e água foram submetidas a um processo de gelo e degelo três vezes consecutivas para melhoria no processo de lise celular e liberar a maior quantidade de material genético. Posteriormente, o DNA presente nas amostras de areia e de água foi extraído usando os kits DNeasy PowerSoil e AllPrep PowerViral DNA/RNA, respectivamente, seguindo as indicações do fabricante (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha).

A biblioteca de DNA foi preparada utilizando *Herculase II Fusion DNA Polymerase Nextera XT Index V2 Kit (Illumina)* e o sequenciamento metagenômico bacteriano, das regiões V3 e V4 do gene 16S rDNA (*metabarcoding*), foi realizado em plataforma *Illumina MiSeq*, pela empresa Macrogen Inc (Seoul, Coréia do Sul), gerando *reads paired-end* de 300 pares de bases (pb). Todo o processamento do material genético foi realizado conforme a Lei da Biodiversidade, Lei 13.123/2015, regulamentada pelo decreto nº 8.772, de 11 de maio de 2016. O envio está registrado no acesso cadastrado sob o código A6B9BDB no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN).

As sequências de DNA recebidas foram refinadas pela Dr^a. Rafaella Silveira. Os resultados do refinamento das sequências foram processados na plataforma Galaxy (The Galaxy Community, 2022) e analisados na plataforma online MicrobiomeAnalyst 2.0, disponível em <https://www.microbiomeanalyst.ca/>, com o propósito de quantificar e identificar os grupos bacterianos presentes.

4.8.3. Análises das comunidades planctônica e bentônica

Imediatamente depois da coleta para estas análises, as frações de areia foram transferidas para Erlenmeyers de 1 L previamente esterilizados em autoclave. Cada Erlenmeyer continha 500 mL de água do Lago Paranoá, previamente filtrada em membrana de ésteres de celulose, com abertura de 0,22 µm. Seguidamente, a água foi esterilizada em autoclave. Essa água foi usada para minimizar o estresse dos micro-organismos planctônicos e bentônicos presentes na areia

coletada. Os Erlenmeyers contendo a água e a areia foram agitados em um agitador orbital SI600R (Lab Companion) por 2 min a 150 rpm. Em seguida, os frascos foram deixados em repouso por 30 s para permitir que parte da areia sedimentasse. Após este período de repouso, alíquotas do sobrenadante foram retiradas dos Erlenmeyers.

O sobrenadante coletado foi dividido em três alíquotas de 100 mL cada uma. Uma das alíquotas foi utilizada imediatamente para o reconhecimento e quantificação do plâncton e dos bentos *in vivo*. As outras duas alíquotas foram fixadas conforme as indicações de Bicudo e Menezes (2006) para confirmar as contagens feitas *in vivo* e para melhor identificação dos micro-organismos com muita mobilidade, cuja caracterização *in vivo* não foi possível. Uma das alíquotas foi fixada usando formaldeído P.A. com concentração aproximada de 40%. O volume utilizado foi equivalente ao 4% do volume da amostra. A última alíquota foi fixada com uma solução de lugol, que foi gotejada lentamente até que a coloração da alíquota fosse de tonalidade conhaque ou chá carregado. As amostras fixadas foram armazenadas em frascos cor âmbar e protegidas da incidência de luz.

Um volume de 1 mL de cada alíquota foi, então, colocado em uma câmara de Sedgewick-Rafter para visualizar os micro-organismos usando um microscópio óptico Leica modelo DM LB2, com um aumento de 200 vezes. As amostras foram diluídas na mesma água filtrada e esterilizada do Lago Paranoá, quando necessário. Por fim, os organismos identificados por microscopia ótica, pela Prof^a. Yovanka Pérez Ginoris, nas amostras do meio filtrante de cada filtro foram contabilizados e classificados usando a obra de Streble e Krauter (1987) como referência.

4.8.4. Processamento das análises microbiológicas

As análises das comunidades bacteriana, planctônica e bentônica foram realizadas buscando identificar os principais grupos de cada uma que ocorreram na camada biológica dos filtros lentos. Após identificados e classificados, foi calculada a abundância relativa dos grupos nessas comunidades e foi feita uma análise visual da composição da microbiota. Posteriormente, para confirmar as observações realizadas sobre a diferenciação das composições, foi feita uma análise de dissimilaridades de Bray-Curtis, que permitiu o agrupamento por semelhança da composição da microbiota de cada filtro. Com isso, foi possível atestar se a estrutura de cada comunidade desenvolvida na *schmutzdecke* apresentou diferenças entre as unidades de filtração lenta.

4.9. DELINEAMENTO DAS ETAPAS EXPERIMENTAIS

Todas as etapas de avaliação do desempenho do sistema de filtração seguiram, de forma geral, o mesmo delineamento experimental. Ao dar partida ao sistema, acompanharam-se os valores dos parâmetros de operação e de qualidade da água de interesse (ver Item 4.7). A frequência de monitoramento dependeu da etapa em desenvolvimento e dos objetivos de cada uma. Cabe lembrar que o monitoramento dos parâmetros de qualidade da água foram medidos nas águas de estudo e, depois do tempo de detenção hidráulico (ver Item 4.6), acrescido em 1 h, foram medidos nos efluentes dos filtros. Dado que o teste com traçador e hidráulico não teve réplica, o acréscimo de 1 h após o tempo de detenção hidráulico experimental foi adotado como margem de segurança para garantir a renovação completa da água dentro do sistema de filtração lenta, conforme justificado no Item 4.6.

4.9.1. Avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina e 7-desoxi-cilindrospermopsina durante o amadurecimento de filtros lentos

O objetivo desta etapa, desenvolvida entre os dias 05/06/2022 e 09/07/2022, foi avaliar os efeitos e a remoção de CYN durante o amadurecimento. A configuração do sistema de filtração contou com dois filtros controle, o filtro lento nº 1 (FL1) e o filtro lento nº 2 (FL2), os quais receberam durante todo o ensaio de filtração água do lago Paranoá. O filtro lento nº 3 (FL3) e o filtro lento nº 4 (FL4), denominados filtros teste, receberam durante o tempo de operação água do lago Paranoá contendo extrato de CYN, em concentrações que oscilaram entre 9,06 e 38,80 µg/L. A frequência de renovação da água bruta foi diária. Os parâmetros de operação e de qualidade da água também foram monitorados diariamente durante o ensaio. O sistema (Figura 4.2) operou com uma taxa de filtração constante, de aproximadamente 2 m³/(m² dia), e nível de água variável.

Conforme apresentado no Item 3.2.1.5, nesta etapa o amadurecimento do sistema de filtração foi definido pela taxa de remoção, já que os níveis de CYN no efluente prevaleceram sobre tradicionais parâmetros bacteriológicos de qualidade da água (ausência de *E. coli*). De acordo com os ensaios de Smith *et al.* (2008), em concentrações entre 1 e 76 µg/L, a biodegradação natural de CYN atingiu, em média, reduções de aproximadamente 40% da concentração inicial em 40 dias. Com base nisso, os filtros lentos utilizados neste trabalho foram considerados maduros quando a remoção da cianotoxina foi maior ou igual a 40% em duas amostragens consecutivas. Entretanto, foi definido um limite de 40 dias para o amadurecimento, caso o critério da taxa de remoção não fosse atendido. Este limite foi determinado com base no trabalho de Klitzke *et al.* (2010), que relataram uma degradação superior a 92% em areia limpa, própria

de filtros lentos em 40 dias.

4.9.2. Avaliação do tempo de operação, da remoção e dos efeitos da cilindrospermopsina em filtros lentos amadurecidos

Esta etapa visou a avaliação dos efeitos e da remoção de CYN em filtros já amadurecidos e foi realizada entre os dias 08/11/2022 e 21/01/2023. O critério para indicar o amadurecimento do sistema de filtração nesta etapa foram os parâmetros bacteriológicos de qualidade da água. Contagens de coliformes totais menores ou iguais a 1 NMP/100 mL e ausência de *E. coli* na água filtrada, em duas amostragens consecutivas, definiram o fim do período de amadurecimento, seguindo a definição de Visscher (1990), apresentada no Item 3.2.1.5.

Antes do início desta etapa, os filtros foram submetidos ao processo de raspagem e *resanding*, para eliminar a maior quantidade possível de resíduos e biomassa remanescente da etapa anterior.

A operação do sistema também foi sob regime de nível da água variável e taxa constante ($2 \text{ m}^3/[\text{m}^2 \text{ dia}]$). O ensaio se estendeu por 74 dias, com renovação diária da água bruta. A carreira de filtração teve três períodos de estudo: (1) Período de amadurecimento; (2) período de contaminação 1 e (3) período de contaminação 2.

Nos primeiros 42 dias, todos os filtros receberam água do lago Paranoá. Este foi o período de amadurecimento, onde o monitoramento dos parâmetros operacionais e de qualidade da água foi feito semanalmente. Ao finalizar esse período, os filtros atenderam aos critérios adotados e foram considerados amadurecidos.

Entre os dias 43 e 47, por meio da diluição de padrão de CYN na água do lago Paranoá, foi realizado o primeiro período de contaminação nos filtros FL3 e FL4. Nesse período, os filtros FL1 e FL2 continuaram recebendo apenas água do lago livre de toxina. O segundo período de contaminação ocorreu do dia 70 ao dia 74, onde novamente, na água do lago afluente aos filtros FL3 e FL4, foi diluído padrão de CYN, enquanto os filtros FL1 e FL2 continuaram sendo alimentados com água do lago sem toxina. Entre os dias 48 e 69 de operação, todos os filtros foram alimentados com água do lago sem cianotoxina. O intervalo de 23 dias entre os períodos de contaminação foi escolhido para permitir uma semana de observação dos efeitos da exposição à CYN nos filtros, seguida por duas semanas para assegurar a recuperação e restabilização da microbiota, conforme a estratégia metodológica de Haig *et al.* (2016).

Os períodos de contaminação iniciaram com uma concentração de CYN na água bruta de

0,5 µg/L. A concentração de toxina aumentou gradualmente durante os três primeiros dias de cada período (0,5 µg/L no primeiro dia, 1 µg/L no segundo dia e 2 µg/L no terceiro dia), representando o crescimento exponencial de cianobactérias produtoras dessa toxina no manancial de abastecimento. Nos dois dias posteriores, a concentração permaneceu constante em 2 µg/L, simulando a fase estacionária de crescimento de uma floração. Essa concentração da cianotoxina é um valor comumente encontrado em ambientes aquáticos brasileiros. Durante os 5 dias de cada período de contaminação, a frequência de monitoramento dos parâmetros operacionais e de qualidade da água foi diária.

Os experimentos foram conduzidos usando períodos de contaminação para representar ambientes aquáticos naturais, onde a concentração de CYN dissolvida não é constante ao longo do tempo. Essa abordagem foi utilizada para simular o comportamento da produção de CYN durante o ciclo natural de crescimento de cianobactérias produtoras da toxina, conforme a relação entre as fases de crescimento e a concentração da CYN dissolvida relatada por Davis *et al.* (2014).

4.10. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Uma vez finalizados os ensaios de filtração de cada etapa experimental, os conjuntos de dados obtidos foram agrupados em seis categorias: (1) Água do lago Paranoá (controle), (2) água de estudo (contendo extrato de CYN ou padrão de CYN diluído), (3) FL1, (4) FL2, (5) FL3 e (6) FL4. Esse agrupamento foi feito com o intuito de identificar diferenças no funcionamento dos filtros e avaliar a sua eficiência em relação à remoção dos parâmetros de qualidade da água.

Feito o agrupamento, cada uma das séries foi submetida ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk para definir o tipo de testes comparativos a serem aplicados, paramétricos ou não paramétricos. Como grande parte dos dados falharam no teste de normalidade, optou-se por realizar testes não paramétricos. Neste trabalho, o teste não paramétrico utilizado para detectar as diferenças entre os grupos de dados foi o teste de Kruskal-Wallis. Quando foram detectadas diferenças entre os grupos, foi feita, em seguida, uma comparação múltipla para verificar quais grupos apresentaram comportamentos distintos entre si. O teste de comparação múltipla não paramétrico utilizado foi o teste de Dunn. Para ambos os testes foi definido um nível de significância de $\alpha = 0,05$.

Por último, para identificar possíveis correlações entre os parâmetros monitorados foi aplicado o teste de correlação de Spearman, que também é um teste não paramétrico. As correlações baseadas no coeficiente de Spearman foram interpretadas de acordo com a Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Interpretação do coeficiente de correlação de Spearman adotado nas análises estatísticas realizadas neste trabalho

Coeficiente de correlação de Spearman		Interpretação
Positivo	Negativo	
0,0 a 0,2	-0,2 a 0,0	Correlação muito fraca
0,2 a 0,4	-0,4 a -0,2	Correlação fraca
0,4 a 0,7	-0,7 a -0,4	Correlação moderada
0,7 a 0,9	-0,9 a -0,7	Correlação forte
0,9 a 1,0	-1,0 a -0,9	Correlação muito forte

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software estatístico R, com o auxílio dos pacotes tidyverse e rstatix.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO INTERNA DO MÉTODO DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CILINDROSPERMOPSINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL

5.1.1. Otimização automática dos parâmetros da espectrometria de massas sequencial

Como foi dito na Item 4.4.3, a análise automática, assistida pelo software Analyst 1.4.2 (Applied Biosystems/MDS SCIEX Instruments), otimizou os parâmetros da fonte de ionização do espectrômetro de massas para a produção dos fragmentos da molécula de cilindropermopsina (CYN) que resultaram nas transições 416,1/194,3; 416,1/336,1 e 416,1/176,2. Os parâmetros otimizados e seu respectivo valor ótimo são apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Valores automaticamente otimizados dos parâmetros da fonte de ionização do espectrômetro de massas ion trap 3200 Q TRAP no modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM) utilizado neste estudo

Parâmetro	Valor otimizado
Cortina de gás [psi]	20
Gás nebulizante [psi]	40
Gás secante [psi]	40
Voltagem capilar [V]	5000

As transições monitoradas durante a otimização dos parâmetros da fonte de ionização podem ser observadas na Figura 5.1. A transição 416,1/194,3 foi selecionada para a quantificação, já que apresentou a maior intensidade, e as transições 416,1/336,1 e 416,1/176,2 para confirmação da detecção de CYN.

Para cada uma das transições monitoradas também foram otimizados o potencial de orifício (DP), a energia de colisão (CE) e o potencial de saída da célula de colisão (CXP). Os valores aprimorados para esses parâmetros são apresentados na Tabela 5.2.

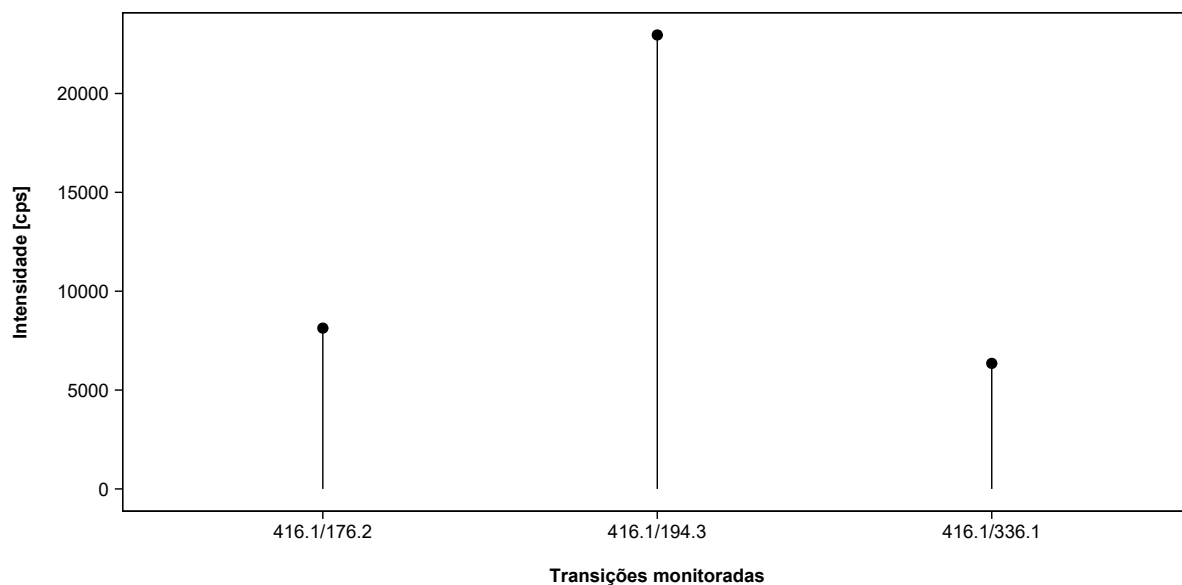


Figura 5.1: Transições monitoradas durante a otimização automática dos parâmetros da espectrometria de massas sequencial (EM/EM)

Tabela 5.2: Parâmetros otimizados automaticamente para as transições da cilindrospermopsina (CYN) m/z 176, 194 e 336 no modo MRM no espectrômetro de massas ion trap 3200 Q TRAP usado neste estudo

Íon precursor [m/z]	Íon produto [m/z]	Potencial de orifício (DP) [V]	Energia de colisão (CE) [eV]	Potencial de saída da célula de colisão (CXP) [V]
416,09	176,20	56,00	45,00	4,00
416,09	194,30	56,00	43,00	4,00
416,09	336,10	56,00	29,00	6,00

5.1.2. Otimização manual da temperatura e dos parâmetros da cromatografia líquida

O perfil de eluição, o tempo de corrida, o fluxo de fase móvel e a temperatura da fonte de íons de eletronebulização foram alterados manualmente até a obtenção de um sinal (pico) intenso e simétrico. Como indicado na Item 4.4.4, os valores adotados para cada uma dessas propriedades estiveram restritos às suas respectivas faixas. Depois de vários testes, os valores otimizados do tempo de corrida, do fluxo da fase móvel e da temperatura da fonte de íons de eletronebulização são apresentados na Tabela 5.3. O perfil de eluição que apresentou o melhor desempenho está descrito na Tabela 5.4.

Tabela 5.3: Temperatura da fonte de íons de eletronebulização e parâmetros da cromatografia líquida otimizados manualmente para a implementação do método de detecção e quantificação de cilindrospermopsina (CYN) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM)

Parâmetro	Valor otimizado
Tempo de corrida [min]	12
Fluxo da fase móvel [$\mu\text{L}/\text{min}$]	550
Temperatura da fonte de íons de eletronebulização [$^{\circ}\text{C}$]	450

Tabela 5.4: Perfil de eluição otimizado manualmente para a detecção e quantificação de cilindrospermopsina (CYN) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM)

Tempo [min]	Água ultrapura + CH_3COOH 0,15 % v/v [%]	Metanol grau CLAE [%]
0,0	90	10
0,5	70	30
8,0	10	90
10,0	10	90
10,5	90	10
12,0	90	10

5.1.3. Validação do método

5.1.3.1. Tempo de eluição

A validação iniciou com a definição do tempo de eluição da CYN. Na Figura 5.2 podem-se observar os cromatogramas obtidos para cada uma das concentrações de solução padrão utilizadas.

De acordo com os cromatogramas da Figura 5.2, o tempo de eluição médio da CYN foi 6,625 min. Esse tempo foi usado como referência para o tempo de aparição dos sinais de detecção ao

longo do processo de validação. A aparição de sinais em tempos anteriores ou posteriores é indicativo de possíveis interferências na detecção, desajuste dos parâmetros de cromatografia ou de espectrometria de massas sequencial e/ou degradação da CYN durante o armazenamento de amostras. Uma vez conhecido o tempo de eluição, continuou-se com a avaliação da seletividade do método.

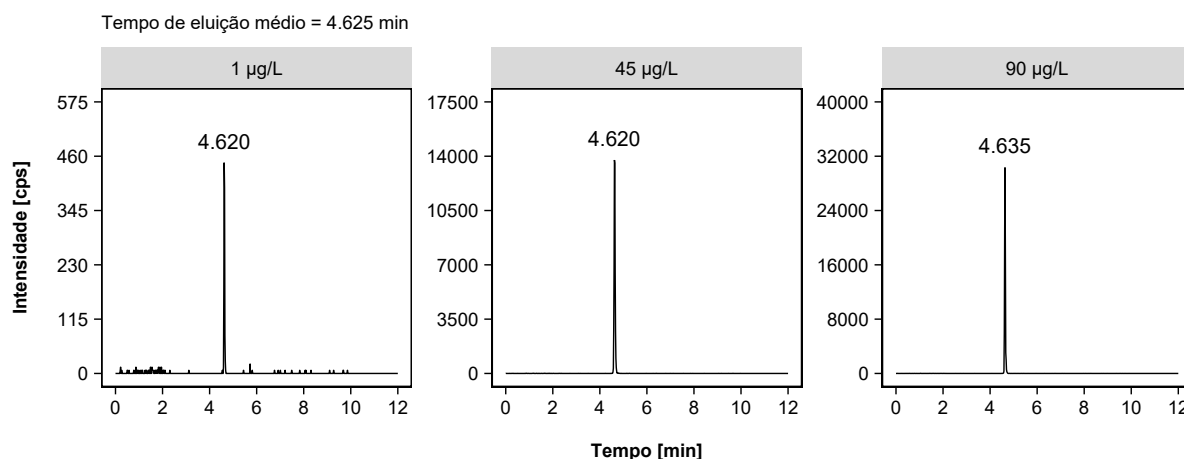


Figura 5.2: Cromatogramas obtidos para diferentes concentrações de CYN pelo método de detecção e quantificação por CL-EM/EM com os parâmetros da fonte de ionização e o perfil de eluição otimizados

5.1.3.2. Seletividade

A seletividade foi testada com o intuito de verificar se o método responde unicamente ao analito, mesmo em presença de outras substâncias que podem estar presentes nas amostras. A seletividade foi testada tanto na matriz de água ultrapura quanto na matriz de água do lago Paranoá, utilizando extrato de CYN, ácidos húmicos e uma combinação entre ambos como possíveis interferências à seletividade. Na Figura 5.3 é apresentada a precisão das medidas tomadas, em cada matriz com as suas respectivas interferências.

As concentrações medidas em cada amostra apresentaram oscilações próximas ao valor de referência estabelecido, fixado em 5 µg/L. A média resultante de todas as medições, englobando todas as amostras, foi calculada em 4,831 µg/L. A análise de variância (ANOVA), com um valor p de 0,934, indicou que as diferenças entre a média geral, a média de cada amostra e o valor de referência não foram estatisticamente significativas.

A partir desses resultados, concluiu-se que o método analítico utilizado demonstrou ser seletivo, mostrando uma resposta específica apenas à CYN, apesar das interferências introduzidas e da matriz de água em que o analito estava diluído. Essa constatação valida a capacidade do método

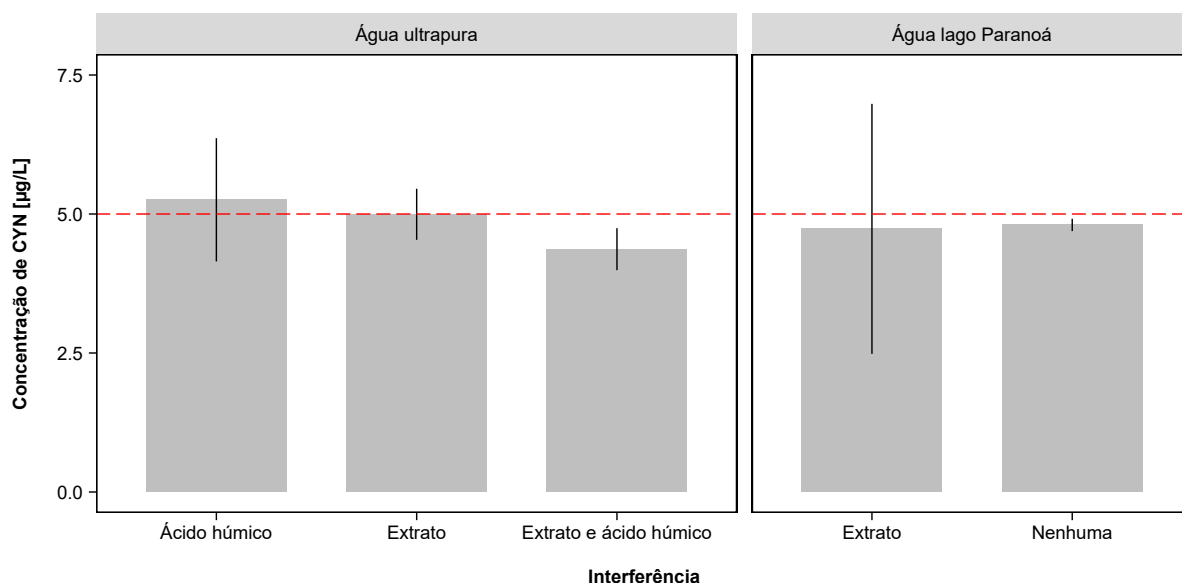


Figura 5.3: Média da concentração de cilindrospermopsina (CYN) nas amostras com as interferências selecionadas para a avaliação da seletividade do método de detecção e quantificação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) em cada uma das matrizes de água avaliadas neste estudo

em identificar a cianotoxina, mesmo diante de possíveis fatores interferentes e da diversidade das amostras analisadas.

5.1.3.3. Limite de detecção e limite de quantificação

Depois de demonstrar que o método foi seletivo para a CYN foram definidos o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ). Na Figura 5.4 são apresentados os *box plots* com as concentrações medidas de cada uma das 10 amostras fortificadas preparadas para cada matriz avaliada.

Nota-se que a concentração medida de todas as amostras, em ambas as matrizes, apresentam oscilações entre si, porém, próximas ao valor de referência de 0,5 µg/L. Os resultados da ANOVA apontaram diferenças significativas na matriz de água do lago Paranoá, com um valor p de 0,05. Os resultados dessa análise são apresentados na Tabela 5.5.

Como os resultados da ANOVA, para a matriz de água do lago, mostraram um valor de α na margem de não significância, o teste de Tukey não identificou diferenças entre as amostras analisadas. Portanto, foi considerado que estas não foram diferentes entre si. Além disso, também foi possível mostrar a importância de realizar um maior número de injeções, já que o aumento da quantidade das observações evita interpretações equivocadas na quantificação de CYN.

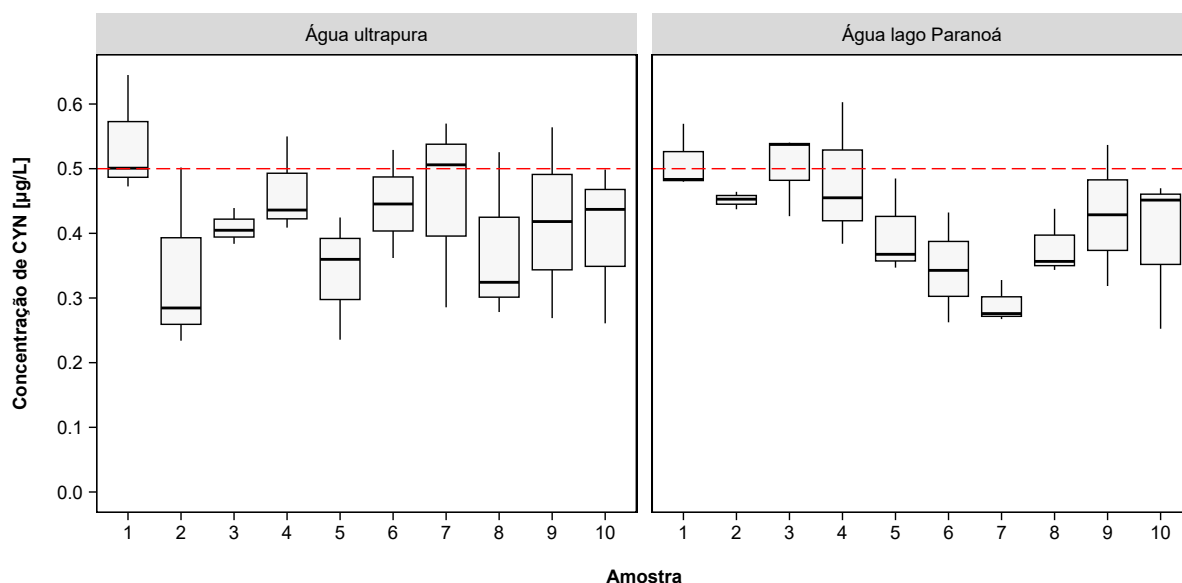


Figura 5.4: Concentração medida pelo método de detecção e quantificação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) para cada solução de cilindrospermopsina (CYN) preparada a 0,5 µg/L em cada uma das matrizes de água testadas neste trabalho

Tabela 5.5: Resultado da análise de variância (ANOVA) para a verificação estatística da diferença entre as médias da medição de cada amostra para sua respectiva matriz

Matriz	Estatística F	Valor p	Significância ($p < 0,05$)
Água ultrapura	0,869	0,567	ns
Água lago Paranoá	2,396	0,050	*

ns — Sem diferença significativa

* — Diferença significativa na margem de não significância

Sem diferenças significativas entre as amostras de cada matriz, foram então calculados o LD e o LQ. Os resultados são apresentados na Tabela 5.6.

Os valores de ambos os limites, em ambas as matrizes, atenderam às necessidades de detecção e quantificação deste trabalho. Os limites igualmente atenderam às exigências de controle de qualidade da água no âmbito internacional, situando-se em valores inferiores a 0,7 µg/L e foram similares aos relatados na validação do método de quantificação e detecção de CYN por CL-EM/EM realizada por (Guzmán-Guillén *et al.*, 2012). No entanto, a aplicação do método para a quantificação da CYN em outros corpos hídricos, empregando diferentes materiais e equipamentos, exige uma nova validação destas características de desempenho.

Tabela 5.6: Cálculo dos parâmetros estatísticos para a determinação do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) do método de detecção e quantificação de cilindrospermopsina (CYN) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) utilizado neste estudo

Matriz	S_0	$S_0' = \frac{S_0}{\sqrt{n}}$	LD [$\mu\text{g/L}$]	LQ [$\mu\text{g/L}$]
Água ultrapura	0,0609	0,0351	0,11	0,35
Água lago Paranoá	0,0705	0,0407	0,12	0,41

S_0 — Desvio padrão entre as médias das amostras

S_0' — Desvio padrão entre as médias das amostras corrigido

n — Número de medições feitas para cada amostra ($n = 3$)

5.1.3.4. Faixa de trabalho e linearidade

Na Figura 5.5 são apresentadas as relações lineares entre a concentração de CYN e a área do pico obtida em cada faixa de concentração testada.

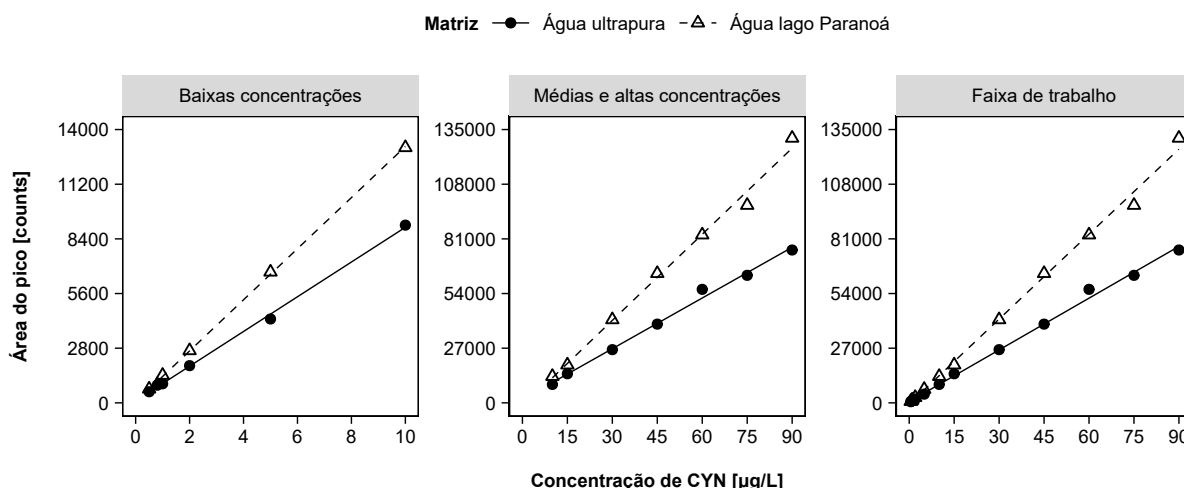


Figura 5.5: Regressões para a verificação da linearidade do método de detecção e quantificação de cilindrospermopsina (CYN) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) em diferentes faixas de concentrações de CYN para as matrizes de água ultrapura e de água do lago Paranoá estudadas neste trabalho

Na comparação de cada uma das matrizes, pode se observar que, para a mesma concentração, a área do pico é maior na matriz de água do lago Paranoá. Isso pode ter sido ocasionado pelas compostos presentes nessa matriz, os quais podem ter intensificado o sinal e, conseqüentemente, aumentado a área dos picos. Entretanto, a linearidade foi testada em momentos diferentes para cada matriz, o que pode acarretar diferenças na separação cromatográfica, uma vez que pode ter ocorrido volatilização do CH_3COOH da fase móvel utilizada.

Apesar das diferenças na relação concentração \times área do pico, em ambas as matrizes foi

observado um ajuste linear, com coeficiente de determinação superior a 0,99 ($R^2 > 0,99$), o que demonstra que o método é linear para uma faixa de trabalho entre 0,5 e 90 µg/L. Na Tabela 5.7 são apresentadas as equações das regressões lineares com os respectivos coeficientes de determinação para cada faixa de concentração.

Tabela 5.7: Resultados das regressões lineares para cada faixa de trabalho do método com seu respectivo coeficiente de determinação

Faixa de concentrações	Matriz	Equação	R^2
De 0,5 a 10 µg/L	Água ultrapura	$y = 889,3x + 99,12$	0,9984
	Água lago Paranoá	$y = 1309,0x + 42,49$	0,9996
De 10 a 90 µg/L	Água ultrapura	$y = 834,8x + 1696,66$	0,9940
	Água lago Paranoá	$y = 1418,2x - 1816,26$	0,9930
De 0,5 a 90 µg/L	Água ultrapura	$y = 852,3x + 577,47$	0,9968
	Água lago Paranoá	$y = 1398,9 - 584,70$	0,9963

5.1.3.5. Viés

O viés do método foi avaliado com o intuito de verificar as diferenças entre a concentração medida e uma concentração de referência. Adicionalmente, por meio de uma ANOVA de dois fatores, foi identificada a principal fonte de variação dos dados, que pode influenciar no viés do método.

Na Figura 5.6 são apresentados os resultados das concentrações medidas em cada amostra, separados por matriz e por faixa de concentrações. Os resultados indicaram que as medições realizadas na matriz de água ultrapura, em ambas as faixas de concentração, apresentaram maior proximidade com o valor de referência. Por outro lado, as concentrações médias das amostras da matriz de água do lago exibiram valores inferiores em relação ao referencial. Uma possível explicação para essa discrepância foi o tempo decorrido entre as análises. A avaliação da matriz de água do lago foi conduzida 12 dias após a avaliação na água ultrapura. Fatores como a mudança da fase móvel, a volatilização do CH_3COOH , a limpeza da coluna de cromatografia e o desempenho de equipamentos auxiliares, como o gerador de nitrogênio, puderam ter influenciado esses resultados em função do tempo entre as análises.

Os resultados da ANOVA de dois fatores, apresentados na Tabela 5.8, revelaram que a principal fonte de diferenças nos dados foi a concentração, sendo responsável por 93,53% da variação

total. Isso sugere que a precisão do método esteve mais relacionada à faixa de concentração de cada amostra do que à matriz em que a CYN foi diluída. Por consequência, cada faixa de concentrações exigiu curvas de calibração distintas (ver Item 5.1.3.4). Com base nos resultados do teste de Tukey, todos os pares de amostras foram considerados diferentes entre si, exceto o par de matrizes na concentração de 1 µg/L, que apresentou um valor *p* ajustado de 0,975.

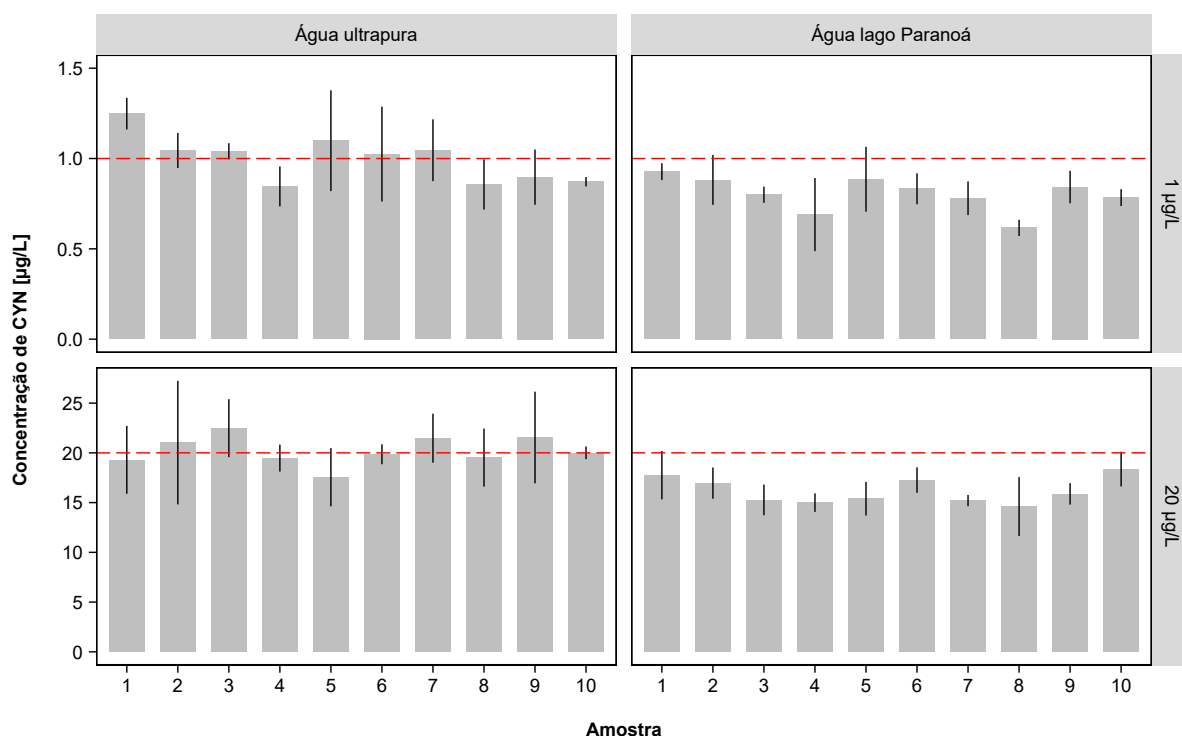


Figura 5.6: Resultados das medições de concentração de cilindropermopsina (CYN) nas amostras para a determinação do viés do método de detecção e quantificação de cilindropermopsina (CYN) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) em diferentes faixas de concentração para cada matriz de água avaliada

Tabela 5.8: Resultado da análise de variância (ANOVA) de dois fatores para a identificação da fonte de variação dos dados na análise do viés do método de detecção e quantificação de cilindropermopsina (CYN) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) utilizado neste trabalho

Efeito	Percentual da variação total [%]	Estatística F	Valor <i>p</i>	Significância (<i>p</i> < 0,05)
Matriz	1,41	42,00	$2,31 \times 10^{-9}$	****
Concentração	93,53	2784,32	$6,23 \times 10^{-83}$	****
Matriz × Concentração	1,17	34,70	$3,84 \times 10^{-8}$	****

**** — Diferença altamente significativa em um nível de confiança excepcionalmente alto

Observou-se que a recuperação aparente foi superior a 80% em todos os casos, superando assim o limite de 20% estabelecido para o viés. Os resultados foram condicentes com o trabalho de (Guzmán-Guillén *et al.*, 2012), quem admitiram oscilações entre 80% e 110% no percentual de recuperação. Os dados do presente estudo podem ser encontrados na Tabela 5.9, que apresenta os resultados de todas as avaliações. As maiores recuperações foram observadas na matriz de água ultrapura, com valores de 99,72 e 101,12% para as concentrações de 1 e 20 µg/L, respectivamente. Essa maior recuperação pode ser atribuída à ausência de outras substâncias que poderiam interferir no processo de quantificação. Em contraste, a recuperação das amostras da matriz de água do lago situou-se entre 80 e 81%. Apesar disso, as amostras dessa matriz mantiveram um viés inferior a 20%. Concluiu-se que o viés do método é inferior a 20%. No entanto, destacou-se que esse valor pode ser ainda menor se forem utilizadas faixas de concentrações para realizar a calibração das medidas.

Tabela 5.9: Recuperação aparente calculada para cada matriz de água e para cada faixa de concentração de cilindrospermopsina (CYN)

Matriz	Concentração de referência [µg/L]	Concentração média medida [µg/L]	Desvio padrão	Recuperação aparente [%]
Água ultrapura	1	0,997	0,181	99,72
	20	20,223	3,036	101,12
Água lago Paranoá	1	0,804	0,130	80,38
	20	16,168	1,904	80,84

5.1.3.6. Robustez

Como foi dito no Item 4.4.5.6, esta característica de desempenho mostra a capacidade do método em realizar medições confiáveis diante mudanças nas condições operacionais. Para identificar e classificar a influência de cada condição operacional testada foi realizada uma ANOVA de quatro fatores. Dessa forma, foi possível indicar a ordem em que cada um dos fatores avaliados e as interações entre eles incidiram nas medições.

Entre os fatores analisados, destacou-se a concentração do modificador da fase móvel, que exerceu um papel significativo na robustez do método. Como apresentado na Tabela 5.10, foi constatado que este influenciou a variação observada nos ensaios, sendo responsável pelo 13,20% da variabilidade total, com um valor *p* de 0,011. Essa influência foi relevante na avaliação do viés (Item 5.1.3.5), onde foi identificado que o tempo entre as análises de cada matriz de água pôde ter alterado a concentração do modificador devido à volatilização do CH₃COOH.

Por outro lado, os demais fatores e suas interações apresentaram contribuições menores, sendo cada um responsável por menos de 6% da variação total. O teste de Tukey (Tabela 5.11) revelou que as interações da concentração do modificador com a temperatura da amostra e com a mudança de analista também apresentaram diferenças, mas essas estiveram na margem de não significância.

Tabela 5.10: Resultado da análise de variância (ANOVA) de quatro fatores para a classificação das fontes de variação dos dados na avaliação da robustez do método de detecção e quantificação de cilindropermopsina (CYN) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM)

Efeito	Percentual da variação total [%]	Estatística F	Valor <i>p</i>	Significância (<i>p</i> < 0,05)
Modificador	13,20	7,341	0,011	*
pH × Temperatura × Modificador	5,34	2,971	0,094	ns
Temperatura × Analista	4,84	2,691	0,111	ns
Temperatura × Modificador	4,45	2,476	0,125	ns
Temperatura × Analista × Modificador	2,59	1,442	0,239	ns
Analista	2,27	1,261	0,270	ns
pH × Temperatura × Analista × Modificador	1,77	0,985	0,329	ns
pH × Temperatura × Analista	1,67	0,929	0,342	ns
pH × Analista × Modificador	1,41	0,785	0,382	ns
pH	1,35	0,751	0,393	ns
pH × Temperatura	1,18	0,659	0,423	ns
pH × Modificador	0,91	0,507	0,482	ns
pH × Analista	0,87	0,486	0,491	ns
Analista × Modificador	0,35	0,194	0,662	ns
Temperatura	0,22	0,124	0,727	ns

ns — Sem diferença significativa

* — Diferença significativa na margem de não significância

Tabela 5.11: Resultado do teste de Tukey para identificar os pares que apresentaram diferenças significativas na avaliação da robustez do método de detecção e quantificação de cilindrospermopsina (CYN) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM)

Efeito	Grupo 1	Grupo 2	Valor p ajustado	Significância ($p < 0,05$)
Modificador	0,1 % v/v	0,2 % v/v	0,0107	*
Temperatura \times Modificador	4 °C \times 0,1 % v/v	4 °C \times 0,2 % v/v	0,0237	*
Analista \times Modificador	Analista 1 \times 0,1 % v/v	Analista 2 \times 0,2 % v/v	0,0499	*
Temperatura \times Analista \times Modificador	4 °C \times Analista 1 \times 0,1 % v/v	4 °C \times Analista 2 \times 0,2 % v/v	0,0253	*

* — Diferença significativa na margem de não significância

Em síntese, o método demonstrou robustez frente às variações de temperatura e pH das amostras, bem como em sua aplicação por diferentes analistas. Contudo, enfatiza-se a importância de adotar cuidados na preparação da fase móvel, pois variações na concentração do CH_3COOH podem comprometer essa robustez.

5.1.4. Possível detecção de 7-desoxi-cilindrospermopsina

Juntamente com a CYN, o método identificou um sinal que sugere um potencial para a detecção de 7-desoxi-cilindrospermopsina (7-desoxiCYN). Ainda é necessária a confirmação com material de referência para a detecção da variante. Embora sem validação para sua quantificação, o protocolo de CL-EM/EM implementado contribuiu para realizar observações relativas à remoção desta molécula análoga no sistema de filtração lenta. A possível identificação de 7-desoxiCYN mostrou-se satisfatória, uma vez que, no mesmo cromatograma, houve separação considerável dos sinais de ambas substâncias. Ainda que com uma intensidade menor, o sinal atribuído à 7-desoxiCYN foi detectado, aproximadamente, aos 4,8 min, enquanto a CYN era observada em média aos 4,635 min. Na Figura 5.7 é apresentado um cromatograma onde podem ser observados ambos os sinais separados durante a análise de uma amostra de extrato.

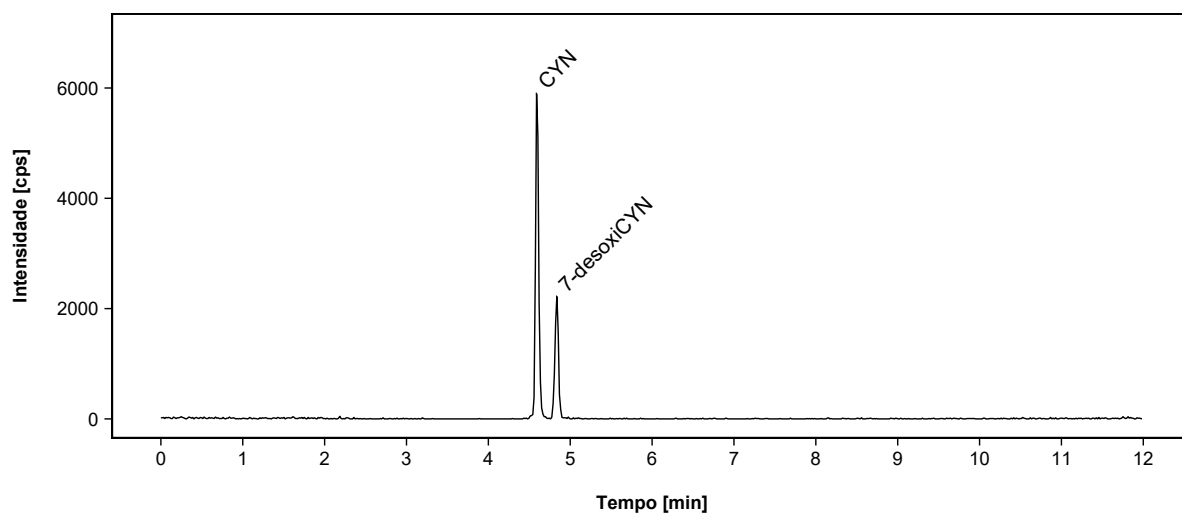


Figura 5.7: Cromatograma obtido na análise de amostras de extrato, contendo cilindrospermopsina (CYN) com indícios da presença de 7-desoxi-cilindrospermopsina (7-desoxiCYN) pelo método de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) com os parâmetros da fonte de ionização e o perfil de eluição otimizados

5.2. TESTE COM TRAÇADOR

Estes testes foram conduzidos com o intuito de determinar o tempo de renovação da água dentro do sistema de filtração e, assim, definir o período entre as amostragens da água bruta e da água

filtrada.

A Figura 5.8 mostra que o tempo de residência experimental da água foi de 14 h para todos os filtros. Dessa forma, a água destilada presente nos interstícios do meio filtrante e na camada de suporte foi completamente renovada em um período de 14 h. O teste de Kruskal-Wallis não revelou diferenças significativas entre os resultados obtidos, como indicado pelo valor p de 0,767.

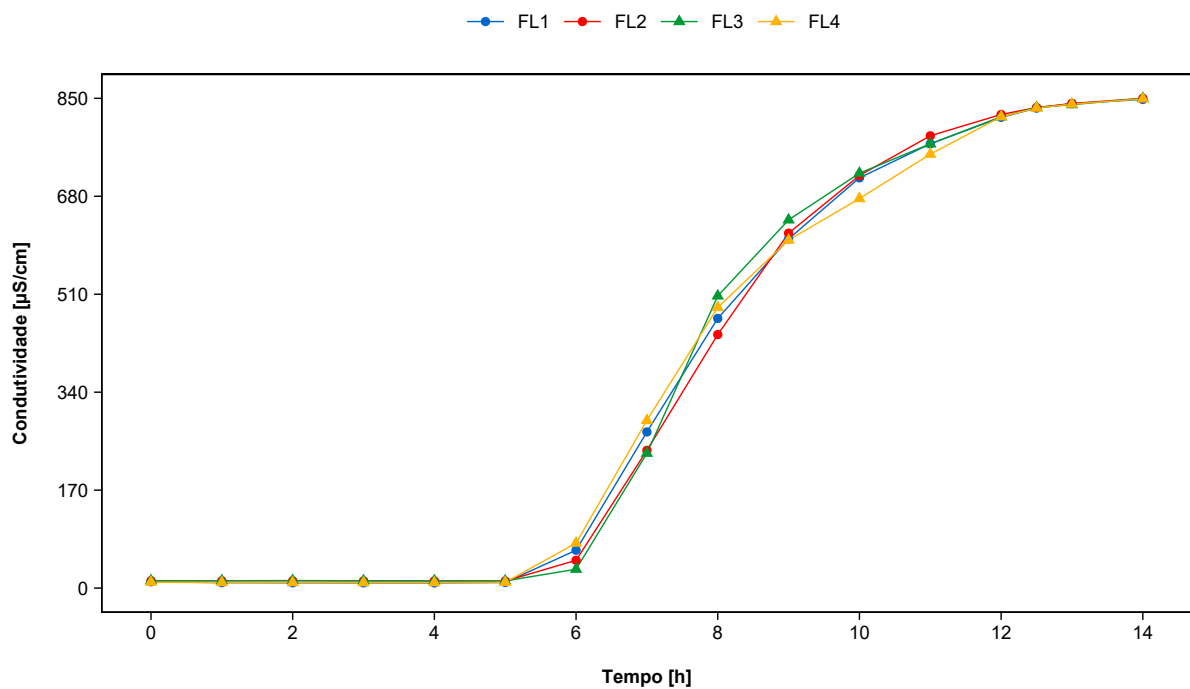


Figura 5.8: Condutividade elétrica medida no efluente de cada unidade filtrante durante a realização do teste com traçador para a determinação do tempo de renovação da água dentro do sistema de filtração

Ao considerar o tempo de detenção experimental, foi possível estabelecer o momento inicial para a coleta de amostras da água de estudo e dos efluentes, evitando assim a possibilidade de resultados subestimados devido ao efeito de diluição causado pelo volume de água presente em cada uma das unidades filtrantes.

5.3. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS E DA REMOÇÃO DE CILINDROSPERMOPSINA E 7-DESOXI-CILINDROSPERMOPSINA DURANTE O AMADURECIMENTO DE FILTROS LENTOS CONVENCIONAIS

5.3.1. Monitoramento dos parâmetros operacionais e de qualidade da água

A avaliação dos efeitos e da remoção de CYN durante o amadurecimento foi realizada em uma carreira de filtração de 35 dias. Durante esse período os filtros FL1 e FL2 foram alimentados com água proveniente do lago Paranoá; enquanto os filtros FL3 e FL4 foram alimentados com água do lago onde foi diluído extrato de CYN, com uma concentração que oscilou entre 9,06 e 38,80 µg/L, com um valor médio em torno de 20 µg/L. A concentração da toxina foi determinada diariamente no afluente dos filtros teste (FL3 e FL4). Cada par de filtros foi alimentado com aproximadamente 60 L da respectiva água de estudo, que foi renovada diariamente durante a operação do sistema de filtração.

A densidade de *Escherichia coli* na água do lago Paranoá mostrou grandes flutuações ao longo da carreira de filtração, com uma alta dispersão e a ocorrência de valores extremos ao longo do tempo. A variação foi de até três ordens de grandeza, apresentando valores entre 5,2 e 2419,6 NMP/100 mL. Apesar das oscilações, a qualidade da água filtrada não foi influenciada, como indica a Figura 5.9. Nos efluentes dos filtros FL1, FL2, FL3 e FL4, as contagens de *E. coli* se mantiveram em níveis indetectáveis durante o 94,12%, o 88,24%, o 94,12% e o 91,18% do tempo de operação, respectivamente. Durante os primeiros 10 dias foi detectada esta bactéria nas amostras dos efluentes dos filtros FL3 (dia 6) e FL4 (dia 10), sendo este tempo condicente com o tempo de amadurecimento de filtros lentos alimentados com água do lago Paranoá em pesquisas anteriores (Melo, 2006; Salati, 2010; Almeida, 2018). Entretanto, por se tratar de um método de quantificação de micro-organismos que se baseia em probabilidades estatísticas, é possível que, conforme relatado por Kloot *et al.* (2006), as contagens de *E. coli* foram superestimadas, dentro da margem de exatidão do teste Colilert, nos dias 6 e 10 para os filtros FL3 e FL4, respectivamente.

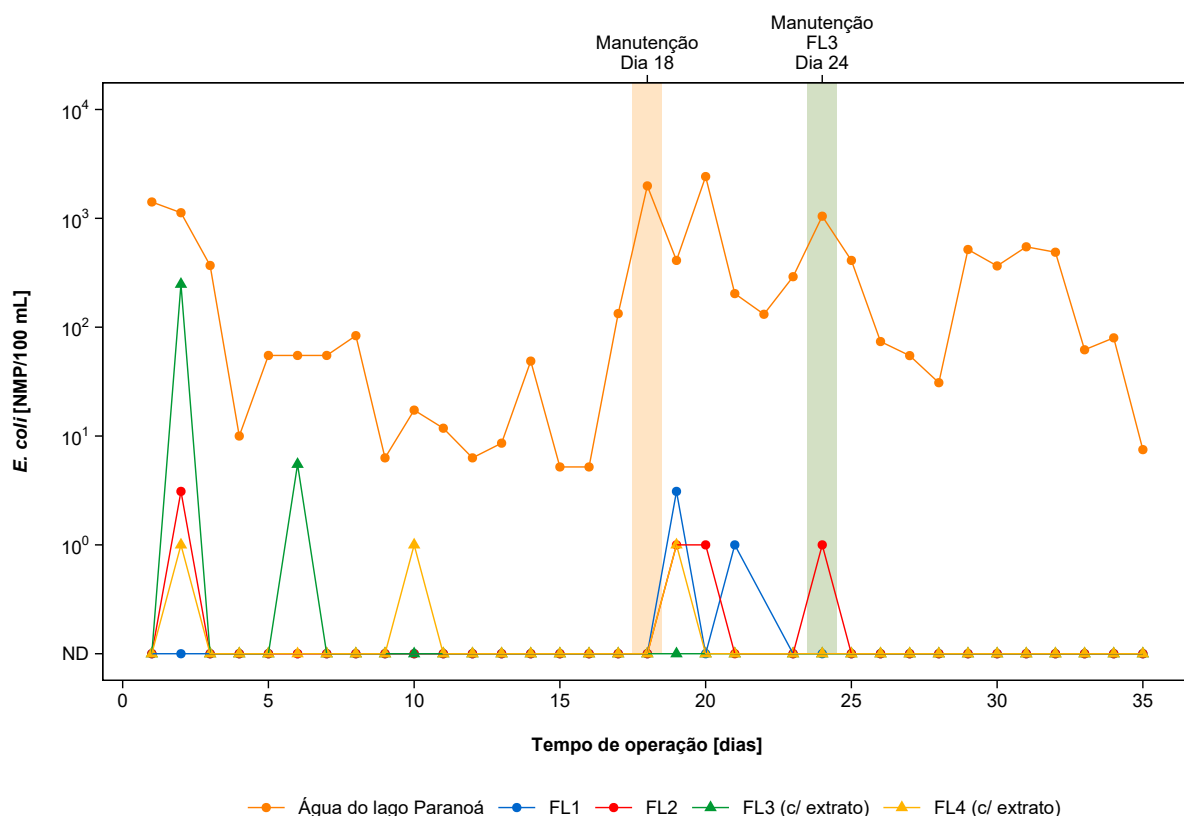


Figura 5.9: Contagens de *E. coli* na água do lago Paranoá e nos efluentes de cada filtro nos 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento de filtros lentos

O período de amadurecimento dos estudos prévios não deve ser comparado com este, dado que nesta pesquisa foi inibida a incidência de luz sobre os filtros. Isto pode ter acarretado uma diferenciação na microbiota que colonizou os filtros já que, sem luz, micro-organismos fotossintetizantes estão fortemente limitados e podem condicionar o crescimento de outros que dependem do oxigênio advento da fotossíntese. A presença de *E. coli* foi identificada novamente no período compreendido entre os dias 19 e 24, resultado atribuído a um procedimento de manutenção no sistema para o restabelecimento da perda de carga que foi realizado no 18º dia de operação. Este procedimento consistiu na uniformização e nivelamento do topo do meio filtrante usando um pente sem resuspender o material depositado. Os resultados sugerem que a presença de CYN, 7-desoxiCYN e matéria orgânica algogênica (MOA) dissolvida não interferiram no desempenho dos filtros lentos depois de 10 dias de operação.

Ao abordar os aspectos físico-químicos da qualidade da água, na Figura 5.10 podem ser observados os valores de pH registrados ao longo da operação do sistema. O pH se manteve na faixa de 6,5 a 8,0 tanto na água do lago Paranoá quanto nos efluentes dos filtros lentos. Esses

valores são típicos de ambientes aquáticos naturais e não comprometeram o funcionamento do sistema. Entretanto, o pH da água do lago com extrato de CYN diluído, a partir do 15º dia de operação, apresentou valores inferiores a 6,5. Essa redução do pH da água do lago com extrato pode ter estado associada ao próprio extrato. De acordo com Dubinsky e Rotem (1974), o crescimento das algas pode reduzir significativamente o pH do meio de cultura. Conseqüentemente, a diluição de extrato na água do lago contribuiu na diminuição do pH dessa água de estudo. De acordo com Mohamed e Alamri (2012) e Dziga *et al.* (2016), a eficiência de biodegradação da CYN diminui em valores de pH fora da faixa de 6,5 a 8,0. Com um afluente nessas condições, é possível que os processos responsáveis pela degradação biológica da cianotoxina tenham sido menos eficazes durante a carreira de filtração.

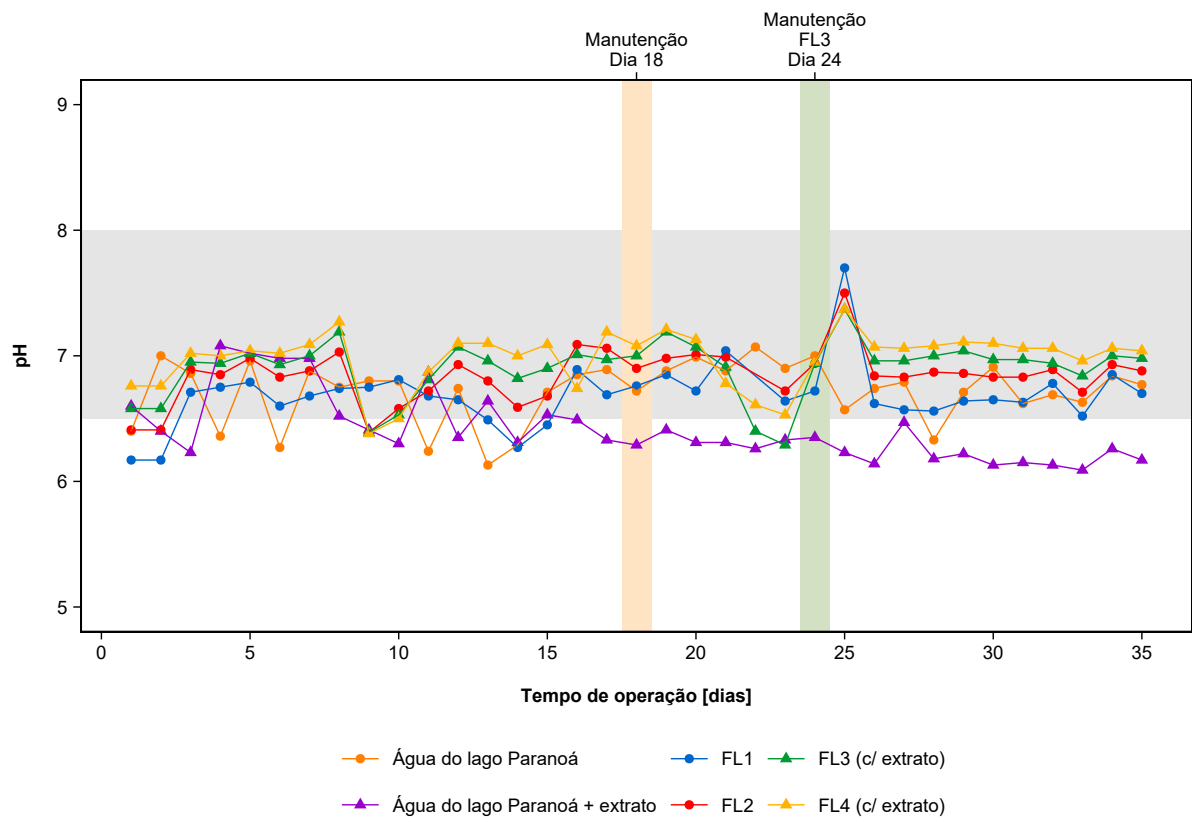


Figura 5.10: Valores de pH nas águas de estudo e nos efluentes de cada filtro nos 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento de filtros lentos

Na Figura 5.11 são apresentados os valores da turbidez na água bruta e na água filtrada durante o período de funcionamento do sistema de filtração. No afluente apresentaram-se valores menores que 10 uT, os quais atenderam às recomendações de qualidade da água para tratamento por filtração lenta (Logsdon, 1991, 2008). Nos efluentes foram observados valores inferiores a

1 uT desde o início da carreira de filtração. Entretanto, até o 10º dia de operação, a turbidez oscilou entre 0,40 e 1,15 uT. Após esse período, a água filtrada apresentou residuais de turbidez menores que 1 uT em todas as amostras, atendendo às exigências da Portaria 888 do Ministério da Saúde (2021) para água tratada por filtração lenta. Observa-se também que os níveis deste parâmetro nos efluentes dos filtros foi estável, independentemente das suas oscilações na água bruta. A robustez do sistema de filtração também não foi afetada pela presença de CYN na água bruta, uma vez que os conjuntos de filtros expostos e não expostos apresentaram desempenhos semelhantes na redução de turbidez.

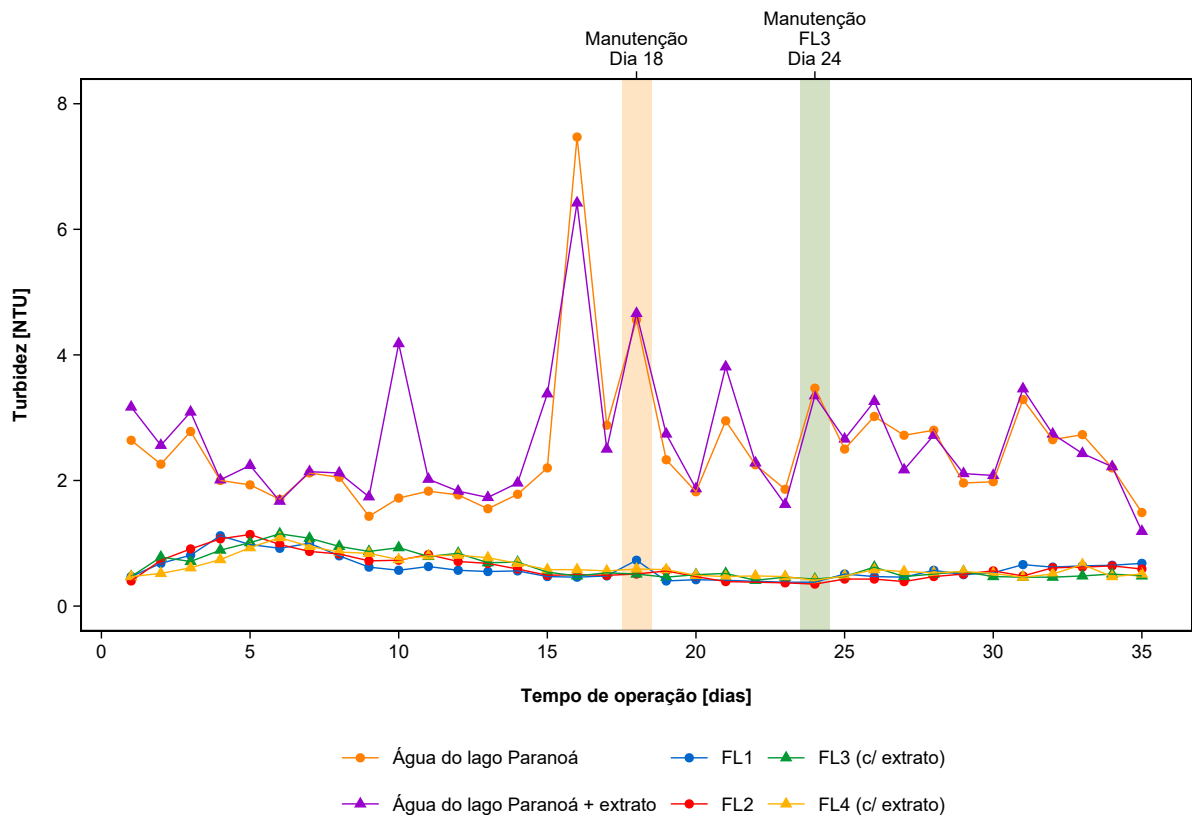


Figura 5.11: Turbidez das águas de estudo e dos efluentes de cada filtro nos 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento de filtros lentos

Assim como a turbidez, a cor verdadeira situou-se dentro dos limites recomendados para tratamento por filtração lenta (Logsdon, 2008). Na água do lago Paranoá, este parâmetro variou entre 2 e 8 uH, enquanto a mesma água, com adição de extrato de CYN, apresentou valores de 2 a 11 uH, como se observa na Figura 5.12. Os maiores níveis de cor observados na água com extrato podem ter sido consequência do material algôgênico, composto em parte por pigmentos, presente no extrato. Em relação aos efluentes, não se identificou um padrão

de estabilização na água filtrada, com valores que oscilaram entre 1 e 9 uH. De acordo com Souza *et al.* (2017), a baixa remoção de cor verdadeira é atribuída ao não desenvolvimento da *schmutzdecke*. Isto pode indicar que, a microbiota responsável pela degradação de substâncias dissolvidas que conferem cor à água, ainda não estava estabilizada no meio filtrante e foi sensível às oscilações deste parâmetro no afluente. Contudo, a remoção média ao longo de todo o tempo de operação se situou na faixa de 40% a 55%. Dado que tanto os filtros expostos à CYN, à 7-desoxiCYN e à MOA quanto os não expostos seguiram a mesma dinâmica, com oscilações sem padrão de estabilização e em torno dos mesmo valores, pode se inferir que a presença do extrato na água bruta não teve efeito relevante e substancial no desempenho dos filtros lentos no relativo à cor verdadeira.

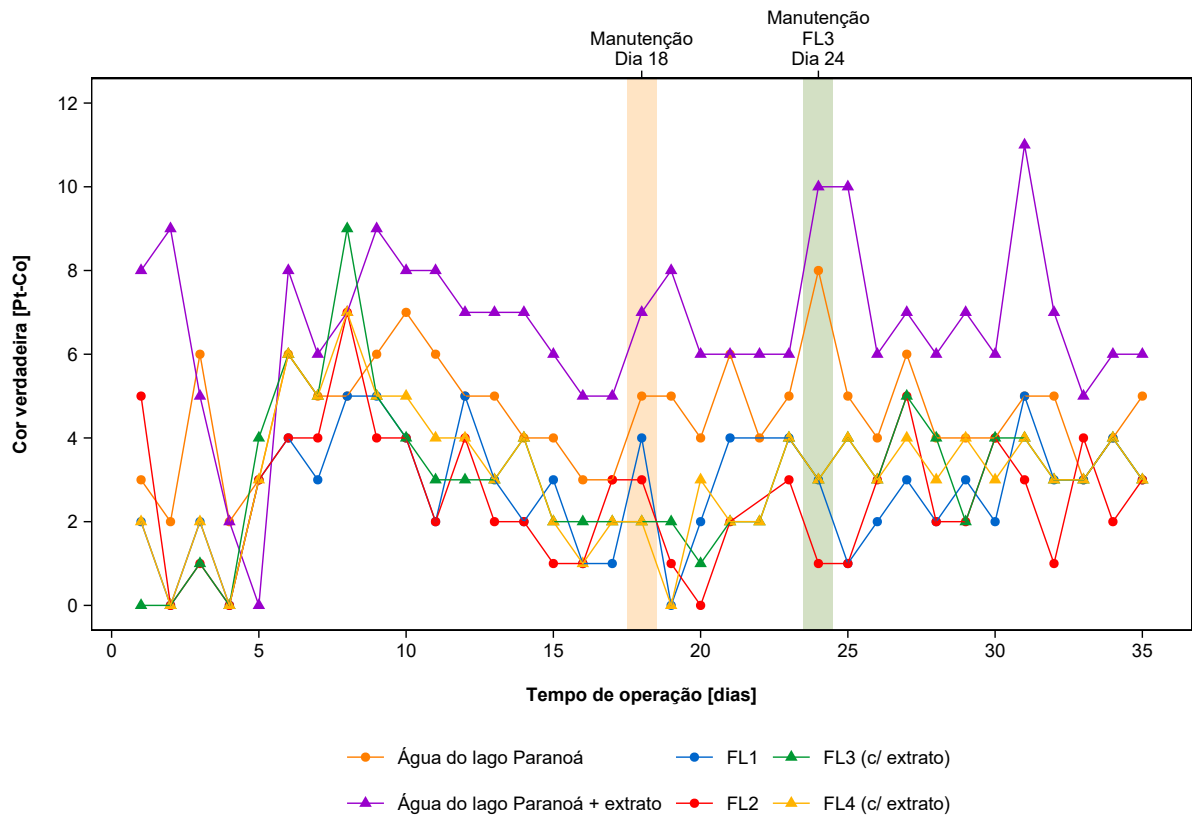


Figura 5.12: Cor verdadeira das águas de estudo e dos efluentes de cada filtro nos 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento de filtros lentos

A concentração de carbono orgânico total (COT) apresentou valores médios em torno de 5 mg/L em ambos os afluentes do sistema de filtração lenta. Concentrações similares de carbono orgânico dissolvido (COD) e de COT na água bruta têm sido relatadas nos estudos de Haig (2014) e Souza *et al.* (2017). De acordo com as referências citadas, o teor de matéria orgânica na água bruta

deste estudo esteve dentro dos valores usuais para pesquisas de tratamento de água por filtração lenta. Na Figura 5.13 é possível observar que na água do lago Paranoá com extrato de CYN diluído, a concentração de COT foi, em média, 22% superior à água do lago. Da mesma forma que a cor verdadeira, essa ocorrência foi principalmente associada à presença de MOA originária do extrato. Os dados de COT foram coletados a partir do 6º dia de operação, momento em que os teores deste parâmetro já apresentavam uma estabilização em torno de 3,4 mg/L, correspondendo a uma remoção média de 27%.

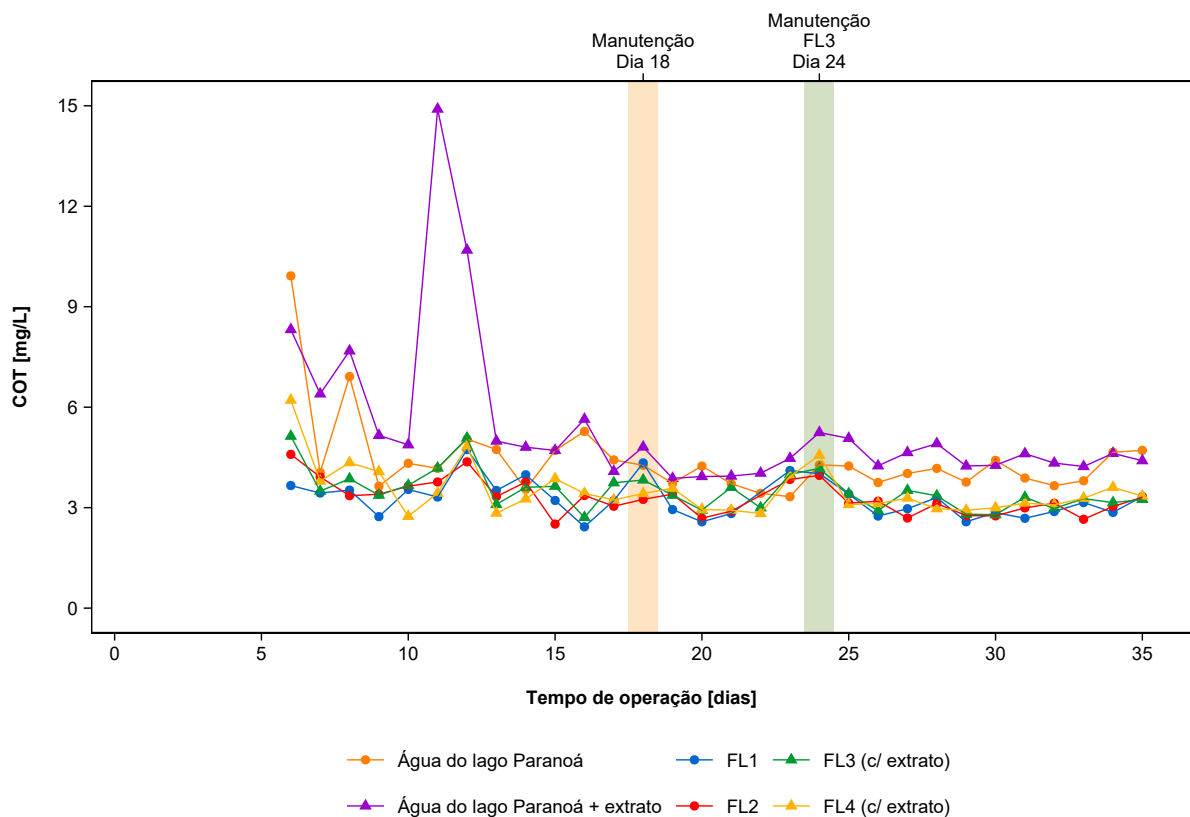


Figura 5.13: Concentração de carbono orgânico total (COT) nas águas de estudo e nos efluentes de cada filtro nos 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento de filtros lentos

No que concerne aos parâmetros hidráulicos, nas Figuras 5.14a e 5.14b é apresentada a perda de carga medida e a taxa de filtração que foi constatada em cada um dos filtros, respectivamente. Ao analisar a Figura 5.14b, nota-se que a taxa de filtração foi constante, apresentando pequenas oscilações em torno de $2 \text{ m}^3/(\text{m}^2 \text{ dia})$. Por outro lado, na Figura 5.14a é possível apreciar, em termos gerais, uma notória diferença na perda de carga nos primeiros 5 cm do meio filtrante entre os pares de filtros que receberam água do lago Paranoá (FL1 e FL2) e os que receberam água do lago com extrato de CYN (FL3 e FL4).

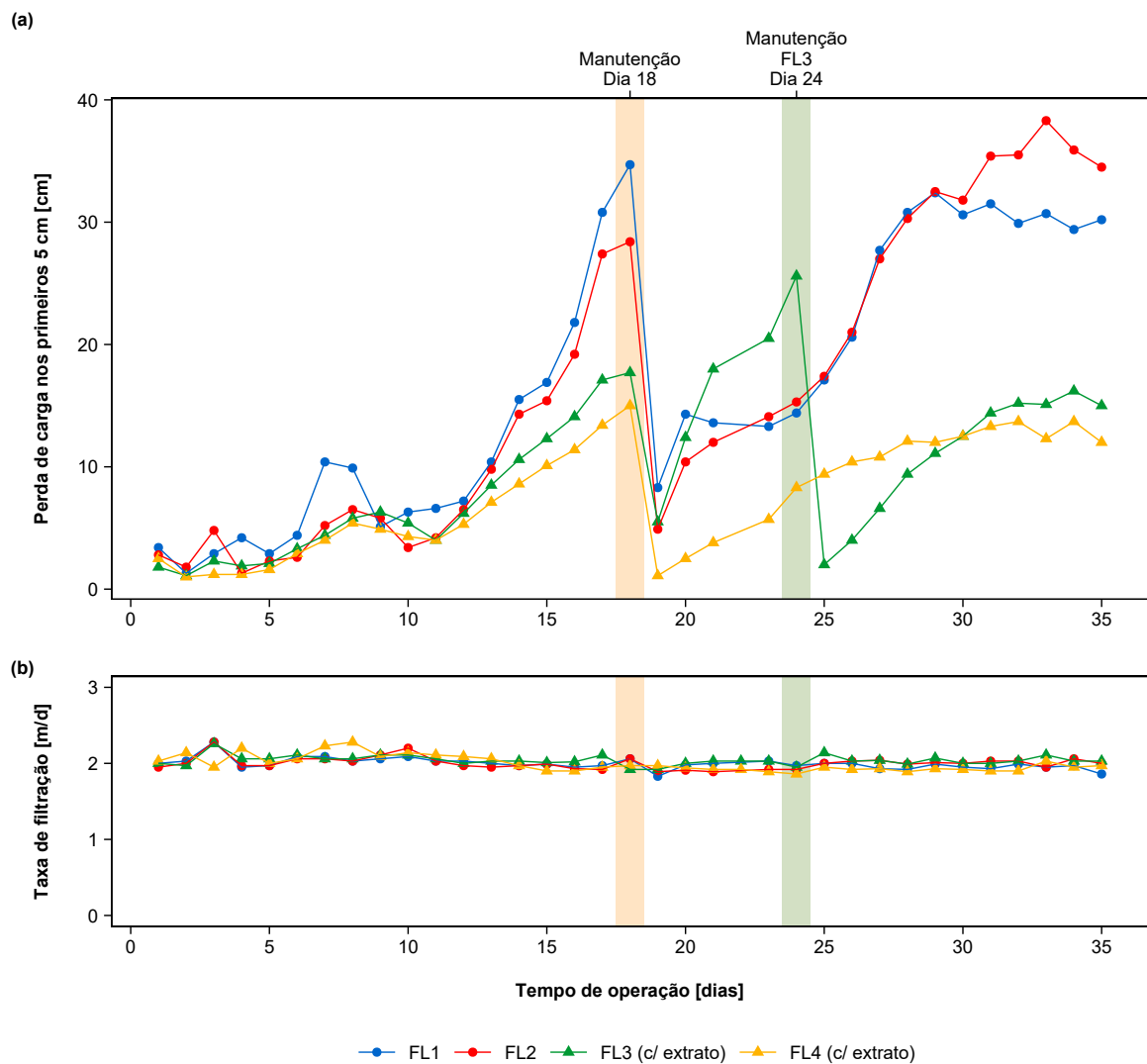


Figura 5.14: Séries temporais da (a) Perda de carga no primeiros 5 cm do meio filtrante e da (b) Taxa de filtração de cada filtro lento em 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento de filtros lentos

No início da carreira de filtração, até o 12º dia de operação, a perda de carga em todos os filtros foi similar. Esse período de 12 dias está próximo ao tempo de amadurecimento relatado em estudos anteriores de filtros lentos alimentados com água do lago Paranoá (Sá, 2006; Almeida, 2018). Depois do 12º dia, percebe-se um aumento desproporcional entre a perda de carga dos filtros FL1 e FL2 (sem adição de extrato de CYN) e os filtros FL3 e FL4 (com extrato de CYN), que se estendeu até o 18º dia. Após uma manutenção realizada nesse momento, a perda de carga foi restabelecida, porém, o desenvolvimento da perda de carga continuou apresentando a mesma distinção entre o par de filtros alimentados com água do lago Paranoá e o par de filtros que receberam extrato diluído na água do lago. No 24º dia de operação, o mesmo procedimento de

manutenção realizado no 18º dia foi aplicado no FL3, restabelecendo assim a perda de carga desse filtro (ver Figura 5.14a). Entretanto, o desempenho desse filtro não sofreu nenhuma alteração nos dias subsequentes.

Nos últimos 5 dias de operação houve uma estabilização deste parâmetro hidráulico. A perda de carga nos filtros alimentados com água e extrato oscilou entre 10 e 20 cm, enquanto a variação nos filtros que não receberam extrato foi duas vezes maior, situando-se entre 30 e 40 cm. Acredita-se que essa diferença entre os pares de filtros, expostos e não expostos, possa estar relacionada à presença de CYN e de MOA, próprias das culturas de *Raphidiopsis raciborskii*. O aumento da perda de carga está relacionado com o acúmulo de impurezas no meio filtrante e, conseqüentemente, uma redução no volume de espaços vazios. De acordo com isso, é provável que a ocupação desses espaços, por parte dos micro-organismos que colonizaram o topo do meio filtrante, tenha sido influenciado pelo extrato de CYN.

Como resultado dessa provável diferenciação no processo de colonização dos espaços vazios, os filtros FL1 e FL2, que apresentaram uma maior perda de carga, mostraram uma maior espessura da camada biologicamente ativa em relação aos filtros com menor perda de carga (FL3 e FL4), que foram alimentados com água do lago Paranoá e extrato de CYN. A camada biológica de cada um dos filtros é exibida na Figura 5.15, onde também, por meio de análise de imagens, destaca-se a espessura das camadas.

5.3.2. Remoção de cilindrospermopsina e de 7-desoxi-cilindrospermopsina

A CYN mostrou uma concentração média de aproximadamente 20 µg/L, como se observa na Figura 5.16a. Essa concentração correspondeu a valores próximos dos comumente encontrados em florações de cianobactérias produtoras dessa cianotoxina (Saker e Eaglesham, 1999; Falconer e Humpage, 2006) e em estudos de remoção e degradação da mesma (Ho *et al.*, 2011; Dziga *et al.*, 2016). No Brasil, a concentração de CYN em águas naturais não ultrapassa 10 µg/L. Essa concentração foi utilizada com o intuito de acentuar os possíveis efeitos da mesma nos filtros lentos. Usufruindo da capacidade do método de quantificação de CYN, para a detecção de 7-desoxiCYN, o níveis desta variante da cianotoxina também foram acompanhados ao longo do tempo, utilizando como referência as áreas dos sinais de detecção. O perfil temporal da variante é apresentado na Figura 5.16b.

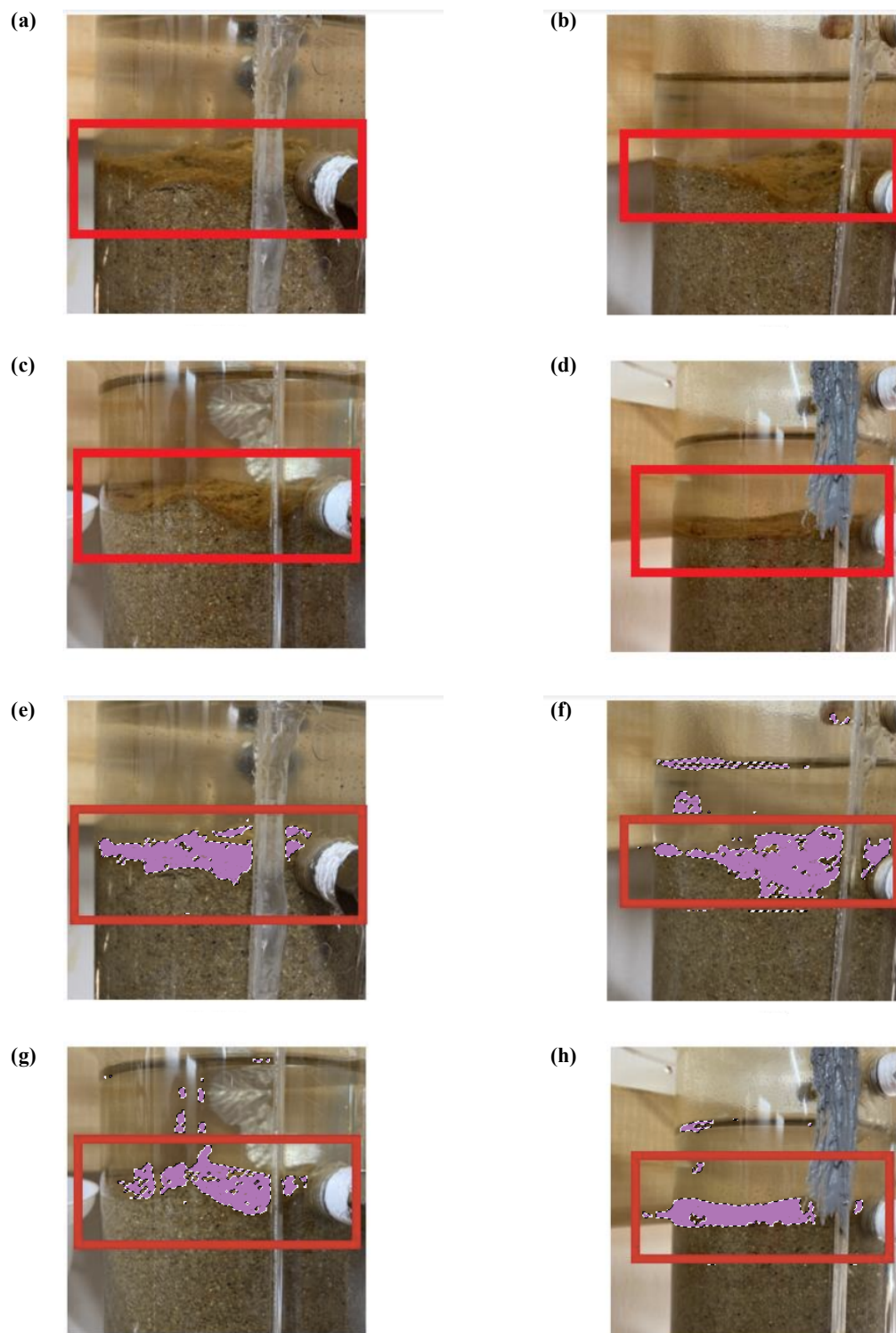


Figura 5.15: Fotografias da camada biologicamente ativa, desenvolvida em 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindropermopsina (CYN) durante o amadurecimento dos filtros lentos (a) FL1, (b) FL2, (c) FL3 e (d) FL4, junto com os destaques, por análise de imagens, da espessura dessa camada dos filtros lentos (e) FL1, (f) FL2, (g) FL3 e (h) FL4

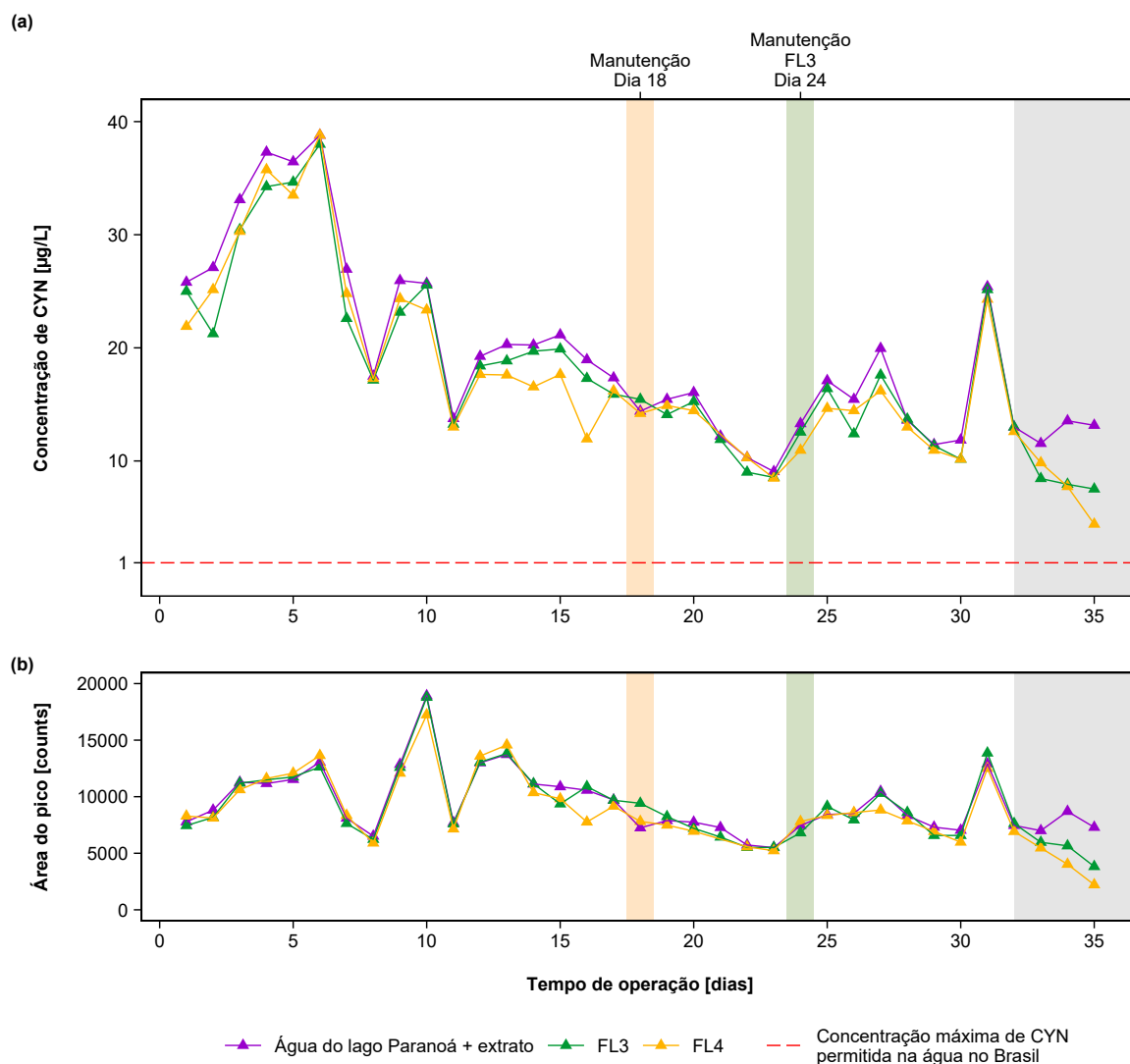


Figura 5.16: Séries temporais da água bruta e da água filtrada em 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento de filtros lentos. (a) Concentração de cilindrospermopsina (CYN); (b) Área dos picos como medida qualitativa da concentração de 7-desoxi-cilindrospermopsina (7-desoxiCYN)

A CYN apresentou uma grande variação da concentração na água de estudo, oscilando entre 9,06 e 38,80 µg/L. A variabilidade pode ser resultado das próprias flutuações de produção da cianotoxina pelas culturas utilizadas na preparação do extrato e pelo período de armazenamento do mesmo. A pesar do volume total de extrato ter sido homogeneizado antes da sua utilização, este foi armazenado em diversos recipientes plásticos, que foram alocados em freezers distribuídos pelo Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA). Variações na potência de cada freezer, incidentes como a falta temporária de energia elétrica e o tempo em que cada recipiente permaneceu congelado podem haver sido responsáveis pela ampla faixa de variação

na concentração de CYN afluente aos filtros lentos.

Não foi verificada uma remoção significativa da cianotoxina e da sua variante 7-desoxiCYN ao longo do amadurecimento do sistema. A redução da concentração de CYN, nos primeiros 30 dias de operação, oscilou entre 6% e 10% no efluente dos filtros. Considerando que o padrão de remoção da CYN e da sua análoga foram semelhantes, pode-se inferir que não houve uma predileção da microbiota por qualquer um dos substratos. Pelo contrário, pode ter ocorrido uma metabolização homogênea independentemente da existência ou ausência de grupos funcionais na molécula. As oscilações na concentração do afluente foram acompanhadas no efluente até o 32º dia de operação. Na Figura 5.16 observa-se que a partir desse dia, a concentração da CYN apresentou uma taxa de remoção superior comparada com os dias anteriores. Nos três últimos dias de funcionamento, a eficiência de remoção aumentou de 26,88% para 42,81% no FL3 e de 14,81% para 66,46% no FL4. Relativo à 7-desoxiCYN, a diminuição da área dos sinais, nesse mesmo período, foi de 14,74% para 47,56% no FL3 e de 21,86% para 69,66% no FL4. A partir dessas constatações foi possível sugerir que a fase lag, onde ocorreu o estabelecimento da microbiota e dos processos metabólicos responsáveis pela degradação da toxina e da sua variante, teve uma duração de 33 dias. O trabalho de Klitzke *et al.* (2010) é coerente com os resultados obtidos neste estudo, já que esses autores relataram uma fase lag de 20 dias para a degradação em meios granulares, com concentrações de CYN de até 10 µg/L.

5.3.3. Análise comparativa do desempenho dos filtros lentos

Neste estudo, o desempenho dos quatro filtros lentos foi comparado por meio da aplicação do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O objetivo foi identificar as potenciais discrepâncias entre as unidades do sistema de filtração e assim realizar inferências sobre o impacto que teve a presença de CYN e 7-desoxiCYN no amadurecimento dos filtros lentos. Na Tabela 5.12 é apresentado o resultado do teste para cada um dos parâmetros de interesse monitorados durante o funcionamento dos filtros lentos.

Os resultados do teste de Kruskal-Wallis confirmaram as observações feitas durante o monitoramento do sistema, reafirmando que o extrato de CYN não influenciou a eficiência de remoção dos filtros. A única diferença verificada ocorreu na perda de carga nos primeiros 5 cm do topo do meio filtrante. Como foi discutido, esse processo pode ter ocorrido devido à influência do extrato na abundância ou na riqueza dos micro-organismos que se estabeleceram no topo do meio filtrante. Dessa forma, considera-se que houve uma distinção na ocupação dos espaços vazios, que diferenciaram o desenvolvimento da perda de carga nos filtros expostos e

Tabela 5.12: Resultados do teste de Kruskal-Wallis para identificar diferenças no desempenho dos filtros em cada parâmetro avaliado em 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento de filtros lentos

Parâmetro	Estatística Kruskal-Wallis	Valor p	Significância ($p < 0,05$)
<i>E. coli</i>	0,939	0,816	ns
Turbidez	0,520	0,914	ns
Cor verdadeira	3,008	0,39	ns
COT	3,679	0,298	ns
Perda de carga	16,395	0,000941	***
CYN	0,055	0,815	ns
7-DesoxiCYN	0,076	0,783	ns

ns — Sem diferença significativa

*** — Diferença altamente significativa

não expostos ao extrato.

Na Figura 5.17 é mostrada a distribuição dos valores da perda de carga nos primeiros 5 cm do topo do meio filtrante durante a operação do sistema. É notória a diferença deste parâmetro operacional entre os filtros não expostos (FL1 e FL2) e os expostos ao extrato de CYN (FL3 e FL4). Os filtros FL1 e FL2 apresentaram valores mais distribuídos, indicando que o desenvolvimento da perda de carga, em um mesmo período de tempo, foi maior. Já os filtros FL3 e FL4 concentraram a perda de carga em valores inferiores, o que resultou na diferenciação estatística verificada para este parâmetro.

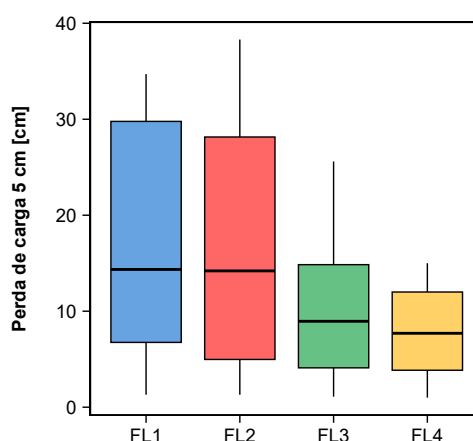


Figura 5.17: Distribuição dos valores da perda de carga nos primeiros 5 cm do topo do meio filtrante durante 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) no amadurecimento de filtros lentos

O teste de Dunn, apresentado na Tabela 5.13, atestou que as diferenças na perda de carga foram

provocadas pelos filtros alimentados com água do lago Paranoá (FL1 e FL2) e pelo filtro FL4. Dessa forma, concluiu-se que o desenvolvimento da perda de carga em filtros lentos pode estar possivelmente associado à presença de CYN, 7-desoxiCYN e MOA durante o amadurecimento destas unidades.

Tabela 5.13: Resultados do teste de Dunn para identificar as diferenças na perda de carga nos primeiros 5 cm do topo do meio filtrante entre os filtros em 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento de filtros lentos

Grupo 1	Grupo 2	Valor p ajustado	Significância ($p < 0,05$)
FL1	FL2	1	ns
FL1	FL3	0,1150	ns
FL1	FL4	0,0024	**
FL2	FL3	0,3515	ns
FL2	FL4	0,0120	*
FL3	FL4	1	ns

ns — Sem diferença significativa

* — Diferença significativa na margem de não significância

** — Diferença significativa

5.3.4. Correlações entre os parâmetros operacionais, a qualidade da água bruta e a remoção dos parâmetros de qualidade da água durante o amadurecimento

As possíveis correlações entre os parâmetros operacionais, a qualidade da água bruta e a qualidade do efluente durante o processo de amadurecimento de filtros lentos foram avaliadas empregando o teste de correlação de Spearman, uma ferramenta robusta para avaliar as relações monotônicas entre variáveis, sem a restrição de pressupostos de normalidade. As correlações consideradas foram aquelas que apresentaram um nível de significância de 5% (valor $p < 0,05$).

A Figura 5.18 apresenta as matrizes de correlação, com os coeficientes de Spearman que apresentaram um valor $p < 0,05$. As matrizes das Figuras 5.18a e 5.18b correspondem aos filtros que não foram expostos ao extrato de CYN. Neste par de filtros, nota-se que a remoção de turbidez teve uma correlação positiva com o tempo de operação, a perda de carga e com os níveis de *E. coli* e turbidez no afluente. As correlações foram moderadas (de acordo com a Tabela 4.6) e são características de sistemas de filtração lenta. O aumento do tempo de operação aumenta a remoção da turbidez devido à deposição de partículas no topo do meio filtrante, o que consequentemente contribui com o desenvolvimento da perda de carga.

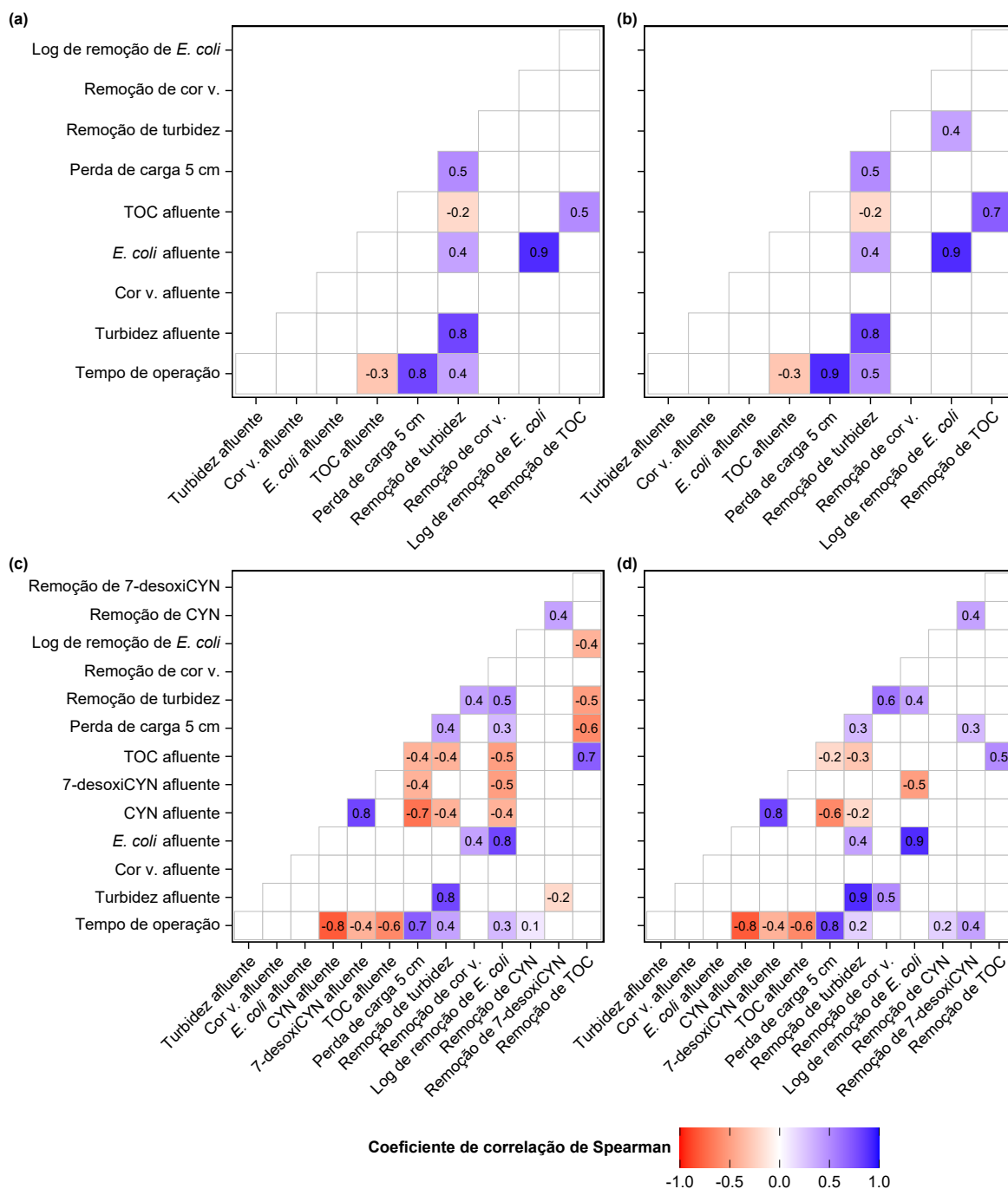


Figura 5.18: Matrizes com os valores de correlação de Spearman entre os parâmetros de qualidade da água e a eficiência em 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospormopsina (CYN) durante o amadurecimento dos filtros lentos **(a)** FL1, **(b)** FL2, **(c)** FL3 e **(d)** filtro lento nº 4 (FL4). Os espaços em branco representam os coeficientes não significativos (valores p com $\alpha > 0,05$)

Em relação aos filtros que foram alimentados com água do lago Paranoá com extrato de CYN diluído, os coeficientes de correlação de Spearman são apresentados nas Figuras 5.18c e 5.18d. Destacam-se as correlações negativas entre a remoção de *E. coli* e os níveis de CYN e de 7-desoxiCYN no afluente, especialmente no FL3 (Figura 5.18c). Neste estudo foi observado

que o extrato de CYN não influenciou a remoção de *E. coli*. Portanto, as correlações negativas foram promovidas no início da operação do sistema. Nos primeiros dias da carreira de filtração, as concentrações de CYN foram superiores às observadas nos dias posteriores e as contagens de *E. coli* ainda não estavam estáveis nos filtros expostos. Nesse sentido, pode ter havido uma influência negativa e de forma moderada na remoção desta bactéria. Assim, existe a possibilidade de que a cianotoxina contribuiu para prolongar a fase lag, atrasando a não detecção de *E. coli* no efluente dos filtros.

5.3.5. Caracterização da comunidade bacteriana dos filtros lentos

O sequenciamento do DNA coletado nas águas afluentes ao sistema de filtração lenta, na areia limpa e na areia dos filtros lentos gerou, em média, um total de 159 576 *reads* por amostra. A análise das sequências identificou 18 filos diferentes, com distintas abundâncias entre as amostras. Na Figura 5.19 é apresentada a abundância relativa dos filos identificados em cada uma das amostras, tanto de água quanto de areia.

Em termos gerais, observam-se variações na composição da comunidade bacteriana entre as amostras. As amostras de água do lago (com e sem CYN) apresentaram composições similares entre si, enquanto as amostras de areia dos filtros lentos mostraram uma estrutura da microbiota bacteriana diferente à observada no ambiente aquático natural. Isto é resultado das condições ambientais e operacionais dos filtros lentos, que promoveram uma dinâmica diferente, devido a fatores como a luminosidade, o tempo de detenção da água nos filtros e as características físico-químicas da areia, dentre outros. A composição bacteriana também se diferenciou entre os filtros expostos e não expostos à CYN, dando indícios de que tanto a cianotoxina quanto a MOA associada ao extrato, podem ter influenciado a configuração da comunidade bacteriana.

Nas amostras de água do lago Paranoá (com e sem CYN), o filo Proteobacteria foi dominante, contribuindo com mais de 66% à composição da comunidade bacteriana. Destaca-se que na água sem toxina, proteobactérias constituíram mais de 86% da composição da comunidade bacteriana; enquanto na água com toxina dissolvida, a participação média do filo foi de 68%. Essa redução na proporção das proteobactérias foi influenciada, aparentemente, por um aumento na fração do filo Bacteroidetes, que na água do lago foi de aproximadamente 8,2% e, em contato com o extrato, foi em média de 18,4%. O incremento da participação do filo Bacteroidetes pode ser explicado pela introdução, na água de estudo, de bactérias desse grupo, que estão associadas a culturas de *R. raciborskii* da cepa CYP011K (Vizzotto, 2021).

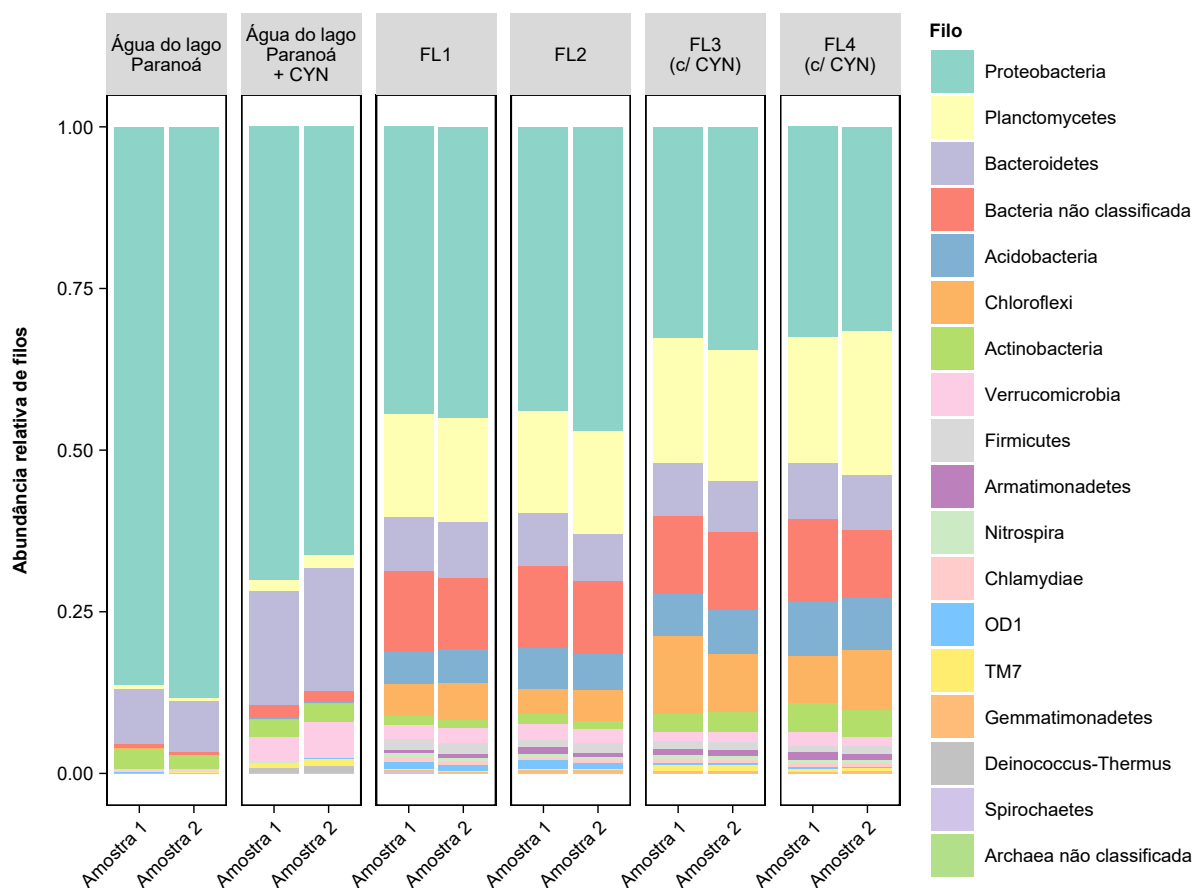


Figura 5.19: Abundância relativa dos 18 filios identificados pelo sequenciamento de DNA em cada uma das amostras de água do lago Paranoá, com e sem cilindrospermopsina (CYN) e da areia dos filtros lentos depois de 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento dos filtros lentos

Dado que as proteobactérias constituem um dos filios mais extensos e adaptáveis no Domínio Bacteria, elas podem ser encontradas em uma variedade de ambientes em todo o mundo. A sua adaptabilidade, a versatilidade do metabolismo (fotossíntese, quimiossíntese e respiração) e a capacidade de fixação de nitrogênio de algumas espécies permitem que este filo seja dominante em ambientes aquáticos. A dominância deste filo mostrou que na água do lago Paranoá podem existir bactérias potencialmente degradadoras de CYN. O gênero *Aeromonas*, apontado como degradador da CYN (Dziga *et al.*, 2016), e os gêneros *Burkholderia*, *Methylobacillus*, *Morganella*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis* e *Stenotrophomonas*, indicados como degradadores de microcistinas (MCYSTs) (Ho *et al.*, 2012b) e potenciais degradadores de CYN (Mohamed e Alamri, 2012), pertencem ao filo Proteobacteria. Contudo, certos gêneros deste filo, tais como *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio* e *Helicobacter*, são reconhecidos como agentes patogênicos humanos.

Em relação aos filtros lentos, a microbiota bacteriana apresenta uma maior riqueza de filios e

uma distribuição mais homogênea dos grupos dominantes quando comparada com a água do lago Paranoá. Embora em menor proporção, as proteobactérias também foram dominantes na camada biológica. Os filtros sem exposição a CYN mostraram uma abundância relativa de proteobactérias de 45%. Por sua vez, nos filtros expostos à toxina, este grupo apresentou uma participação de 33% na microbiota bacteriana. O filo Planctomycetes também foi dominante em todos os filtros e manteve a sua contribuição para a comunidade bacteriana oscilando entre 15% e 20%.

A redução da proporção do filo Proteobacteria nos filtros expostos a CYN revelou outras mudanças importantes na composição da microbiota bacteriana em relação aos filtros controle. Como se observa na Figura 5.20, a parcela de bactérias do filo Chloroflexi aumentou de 4,8% nos filtros controle para 9,3% nas unidades filtrantes expostas à cianotoxina. Também se destacam os filos OD1 e TM7; estes grupos não foram dominantes, com abundâncias relativas médias inferiores a 1,5% em todas as amostras. O destaque para esses grupos foi devido à sua ocorrência, pois nos filtros sem contato com a CYN, os percentuais dos filos OD1 e TM7 na estrutura da comunidade bacteriana foram, em média, de 1,10% e 0,06%, respectivamente. Os filtros amadurecidos em contato com o extrato diluído apresentaram uma inversão nas proporções, com percentuais de 0,30% e de 0,64% para os grupos OD1 e TM7, respectivamente. Junto com os filos Chloroflexi, OD1 e TM7, a contribuição das actinobactérias também se diferenciou entre os filtros controle (FL1 e FL2) e os filtros teste (FL3 e FL4), apresentando abundâncias relativas médias de 1,4% e 3,7% respectivamente.

O estudo de Haig (2014) também relatou uma diminuição da contribuição das proteobactérias nas amostras de areia de filtros lentos convencionais em escala real quando comparadas com a água afluenta a esses filtros. Dentre os filos identificados no trabalho de Haig (2014), mais de 66% também foram reconhecidos, em proporções distintas, no presente trabalho. Isto reforça que a diversidade da camada biológica pode estar atrelada às condições ambientais e de operação dentro dos filtros lentos, sobrepondo-se à diversidade do manancial; já que, na pesquisa de Haig (2014), os mananciais eram reservatórios temperados, localizados na Escócia e este trabalho utilizou água de um lago tropical.

A composição bacteriana da camada biológica dos filtros lentos foi um retrato das condições em que esta comunidade se desenvolveu. Exceto as proteobactérias, os filos Planctomycetes, Bacteroidetes, Acidobacteria, Chloroflexi, Actinobacteria, Verrucomicrobia e Firmicutes são grupos diversos de bactérias com características ecológicas, fisiológicas e metabólicas distintas.

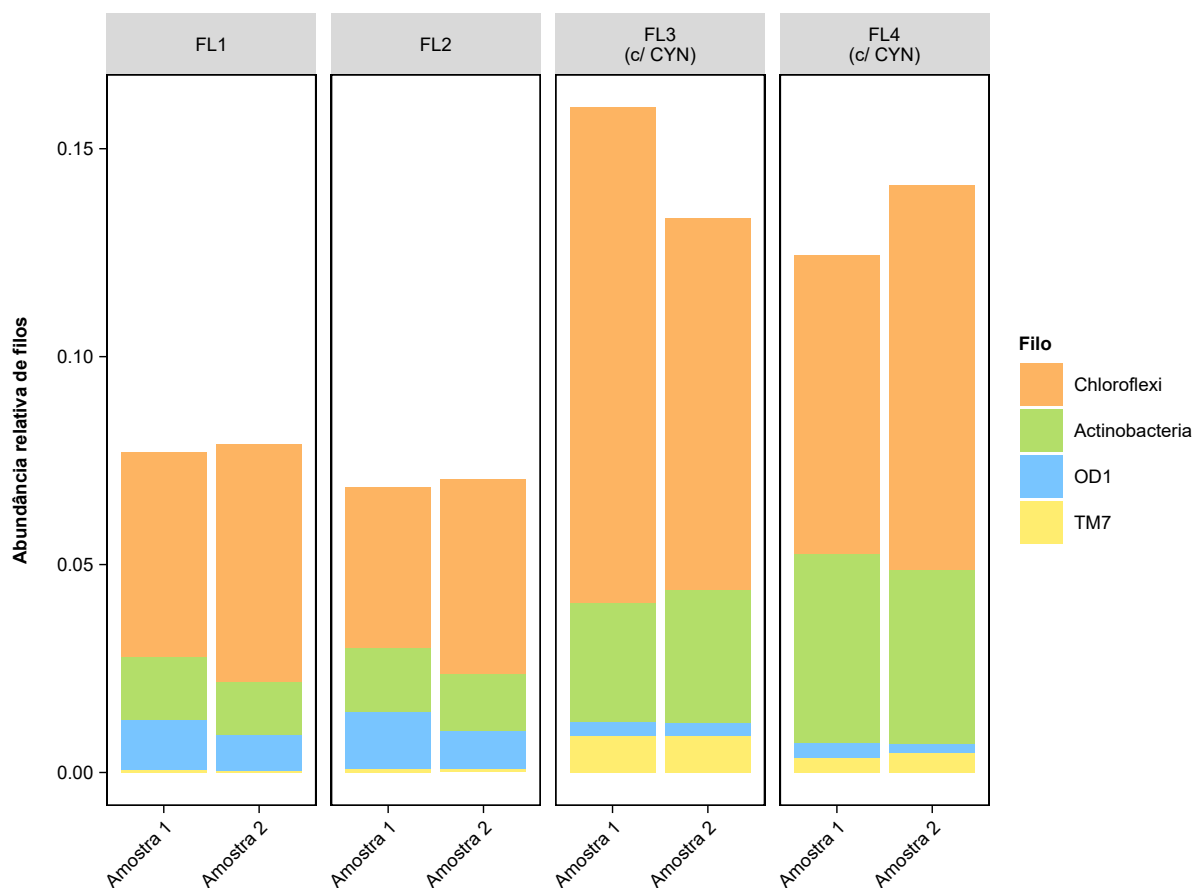


Figura 5.20: Abundância relativa dos filos Chloroflexi, Actinobacteria, OD1 e TM7 identificados pelo sequenciamento de DNA em cada uma das amostras de água do lago Paranoá, com e sem cilindrospermopsina (CYN) e da areia dos filtros lentos depois de 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento dos filtros lentos

No entanto, há algumas semelhanças e padrões gerais que podem explicar a sua dominância na *schmutzdecke* e a sua não predominância na água do lago.

Em termos de habitat, os filos mencionados previamente podem ser encontrados em uma ampla variedade de habitats, incluindo solo, água (doce e salgada), sedimentos, trato gastrointestinal de animais e plantas, ambientes extremos (por exemplo, fontes termais, solos ácidos) e ambientes contaminados. Em relação ao metabolismo, muitas espécies nesses filos são heterotróficas, obtendo energia e nutrientes a partir da decomposição de matéria orgânica. Dado o aumento do COT na água, advindo do extrato de CYN, é razoável inferir que a maior abundância de cada filo nos filtros expostos à toxina (FL3 e FL4) foi resultado, possivelmente, de uma maior concentração de matéria orgânica disponível, estimulando a proliferação das bactérias heterotróficas, especialmente pertencentes aos filos Chloroflexi e Actinobacteria.

Ainda sobre o metabolismo dos filos Planctomycetes, Bacteroidetes, Acidobacteria, Chloroflexi,

Actinobacteria, Verrucomicrobia e Firmicutes, algumas espécies são facultativas ou têm a capacidade de realizar metabolismo anaeróbico. Dessa forma, é possível que a redução da incidência de luz na coluna d'água não impactou o crescimento de certos grupos bacterianos, pois o oxigênio dissolvido, gerado durante a fotossíntese, não foi essencial para seu metabolismo e pode ser tóxico para as bactérias estritamente anaeróbias.

Também é importante destacar que as relações simbióticas podem ter desempenhado um papel relevante na diversificação da microbiota bacteriana nos filtros. Os planctomicetos podem associar-se a microalgas, líquens e briófitas, dentre outros organismos. O crescimento de algumas bactérias do filo Planctomycetes é sustentado pelos substratos providenciados por microalgas. Nos filtros lentos, foram identificados os filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia e Gemmatimonadetes, os quais também participam de consórcios com os planctomicetos. Nessa forma de simbiose, os nutrientes vitais para o crescimento dos planctomicetos são fornecidos por outros grupos bacterianos presentes no consórcio, estabelecendo uma interdependência mútua (Kaboré *et al.*, 2020). A predominância dos filos Proteobacteria, Planctomycetes e Bacteroidetes nos filtros lentos pode sugerir que houve uma formação de associações, que propiciaram o crescimento conjunto das bactérias desses filos. Além disso, a mudança desses grupos de um ambiente pelágico (lago) para um ambiente de substrato sólido (areia do meio filtrante) pode ter favorecido a proximidade e a formação de associações entre eles.

Quanto às relações simbióticas, também é relevante salientar que, conforme mencionado por Santos (2016), a biodegradação das cianotoxinas pode ser resultado de ação ou atividade do consórcio microbiano como um todo, não se limitando apenas à atividade de espécies isoladas. A formação de associações entre planctomicetos e outros grupos bacterianos pode ter contribuído para o aumento da remoção de CYN no final do período de amadurecimento.

Para confirmar as diferenças observadas na composição da comunidade bacteriana, desenvolvida na *schmutzdecke* e na água afluenta, foi feita uma análise de dissimilaridades de Bray-Curtis. Essa análise permitiu construir o dendrograma apresentado na Figura 5.21. Nele é possível observar que as réplicas de cada uma das amostras foram agrupadas no mesmo clado, o que significa que ambas as réplicas de cada amostra não se mostraram diferentes entre si.

De forma geral, as amostras foram separadas em dois grandes grupos, um que corresponde às amostras de água do lago Paranoá, com e sem extrato de CYN diluído, e outro com as amostras de areia. A princípio, isto confirma as observações realizadas sobre a microbiota bacteriana, reforçando que o ambiente dentro dos filtros moldou a sua composição. A ligeira diferença

entre a água do lago Paranoá, com e sem CYN, promovida pelo aumento na fração do filo Bacteroidetes, também foi evidenciada no dendrograma da Figura 5.21, tendo em vista que houve uma separação entre ambas no clado correspondente às amostras de água (vermelho superior). No clado das amostras de areia, observou-se uma separação nítida entre a composição da comunidade bacteriana dos filtros expostos (FL3 e FL4) e dos não expostos (FL1 e FL2) a CYN, revelando que o desenvolvimento bacteriano durante o amadurecimento dos filtros lentos pode ter sido influenciado pelo contato constante com o extrato de CYN.

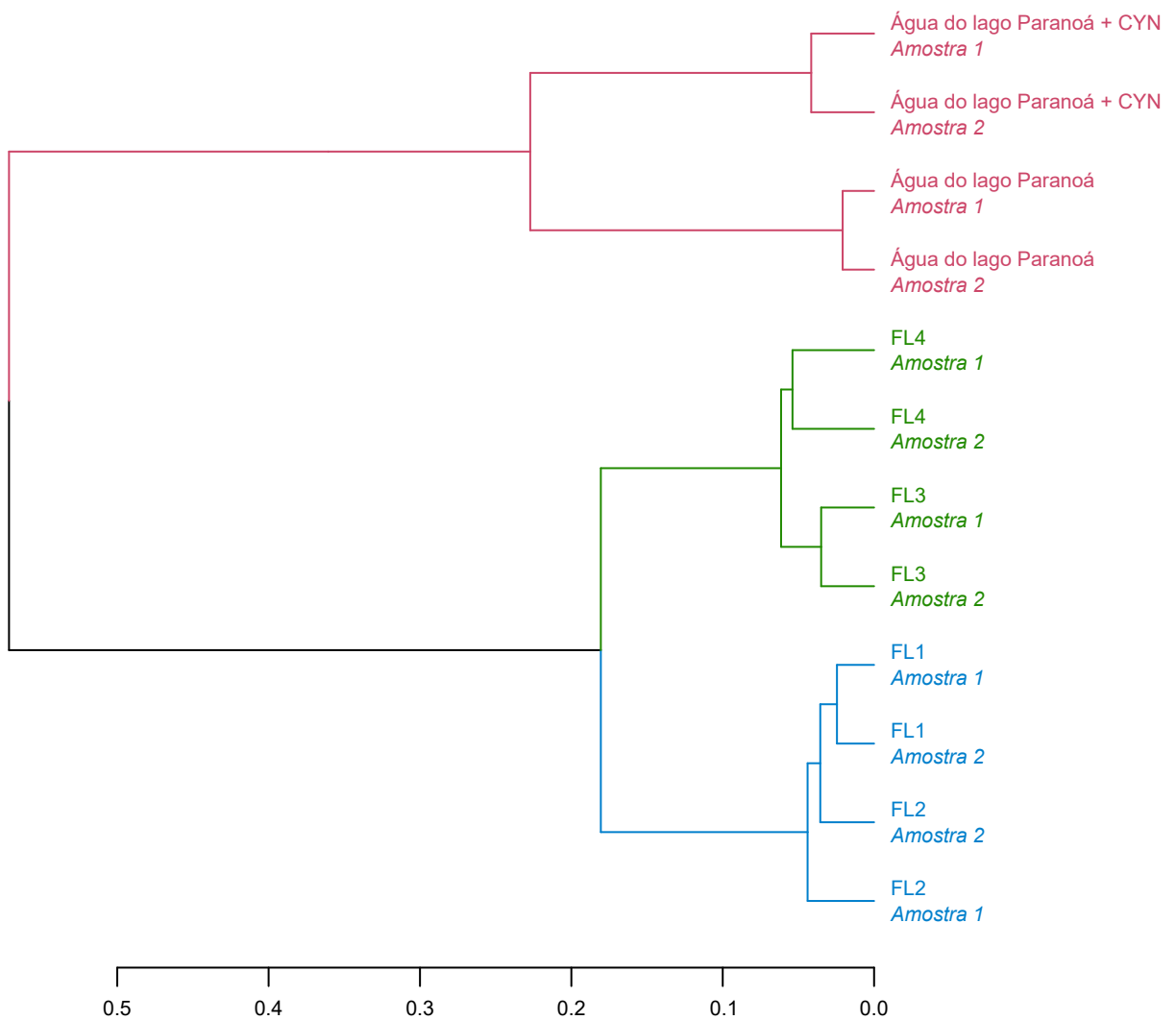


Figura 5.21: Dendrograma de agrupamento dos resultados da análise de dissimilaridade de Bray-Curtis da diversidade bacteriana dos filtros após 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento das unidades filtrantes

Uma vez que não se conhecem efeitos tóxicos da CYN nas bactérias (Rasmussen *et al.*, 2008), é viável que a variação na composição entre os filtros amadurecidos, com e sem a presença da cianotoxina, foi consequência da alteração na qualidade da água de entrada devido à introdução de MOA do extrato, e não necessariamente dos potenciais efeitos tóxicos da CYN na microbiota. De forma análoga, a estrutura da comunidade bacteriana pode ter tido influência sobre o

desenvolvimento da perda de carga nos filtros lentos, pois houve uma correspondência entre os filtros com maior e menor perda de carga e microbiotas bacterianas com menor e maior abundância relativa de filós, respectivamente.

5.3.6. Caracterização das comunidades planctônica e bentônica dos filtros lentos

Por meio de observações por microscopia óptica do plâncton e dos bentos que se desenvolveram nos filtros lentos, foi possível identificar 10 classes taxonômicas pertencentes a diferentes Reinos. A Figura 5.22 ilustra a proporção relativa dessas classes após 35 dias de amadurecimento do sistema de filtração lenta.

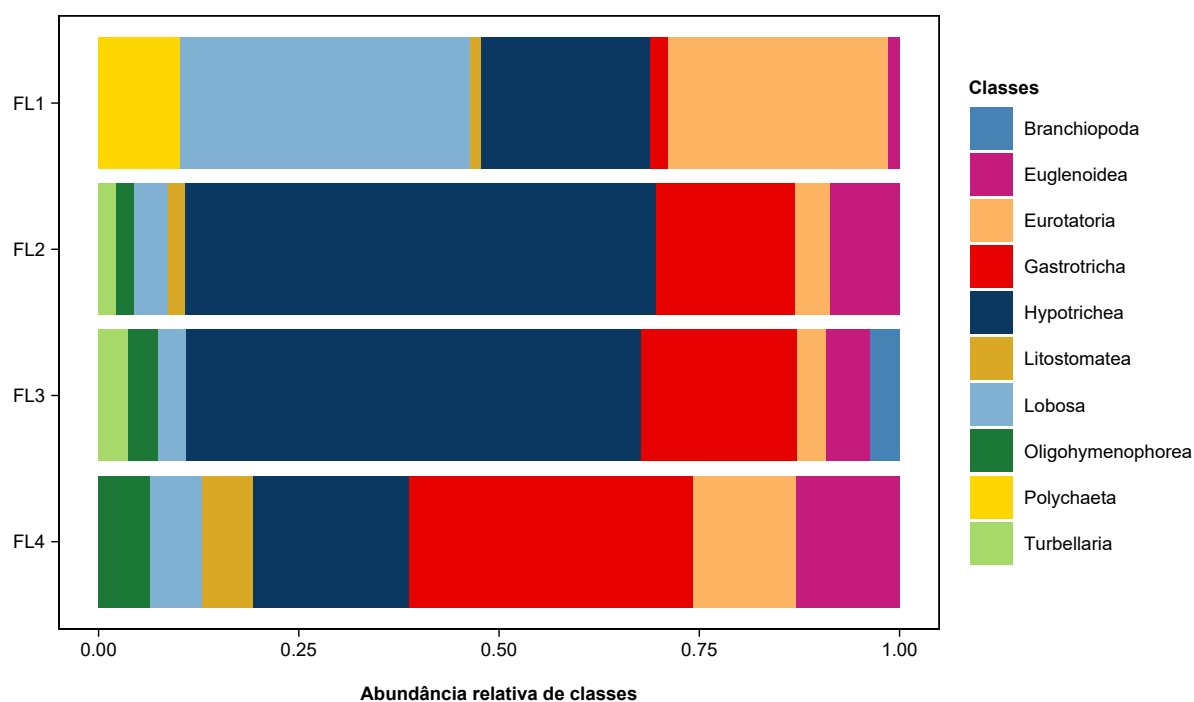


Figura 5.22: Abundância relativa das classes taxonômicas identificadas em cada filtro lento após 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento das unidades filtrantes

Sousa *et al.* (2017) documentou previamente algumas das classes taxonômicas identificadas como componentes da microbiota do lago Paranoá. Além disso, em pesquisas anteriores, essas mesmas classes também foram detectadas em sistemas de filtração lenta que utilizaram água proveniente desse lago (Taira, 2008; Salati, 2010; Farias, 2011; Almeida, 2018)

A composição das comunidades planctônica e bentônica apresentou semelhanças entre os filtros FL2 e FL3. Em contrapartida, os filtros FL1 e FL4 mostraram variações na composição das comunidades, as quais se distinguiram tanto entre si quanto em relação aos filtros FL2 e FL3. Isso sugere que a esta composição não esteve, aparentemente, associada à presença de CYN, já que

foi observada uma semelhança na composição entre um dos filtros não expostos à cianotoxina e um dos filtros expostos. Além disso, foi possível deduzir que as comunidades não estavam completamente estabelecidas. Segundo as informações de Haig (2014) e Haig *et al.* (2015a), é esperado que filtros lentos amadurecidos demonstrem uniformidade em suas composições, o que não foi constatado nos conjuntos de filtros que foram alimentados com a mesma água de estudo. Um outro ponto importante a ressaltar é que, dado que o extrato de CYN não pareceu influenciar a composição da comunidade, outros fatores desempenharam um papel mais proeminente na definição dessa composição.

Com base na composição observada, torna-se evidente que um fator de notável importância como possível influência direta foi a disposição do sistema de filtração no interior do LSA. Os filtros foram organizados seguindo uma sequência crescente de distância em relação a uma das janelas do laboratório, com o FL1 na proximidade e o FL4 na extremidade distante. Apesar das precauções tomadas para minimizar a exposição à luz nos filtros, a dinâmica do laboratório e a localização das unidades de filtração possibilitaram a penetração de pequenas quantidades de luz. Isso provavelmente propiciou o desenvolvimento de diferentes tipos de micro-organismos à medida em que a distância de cada filtro em relação à janela aumentava.

É importante destacar que, apesar das variações na comunidade planctônica e bentônica entre os filtros, foi confirmado que a eficiência não diferiu entre si. Dessa forma, o desempenho não pode ser atribuído a um grupo específico ou a proporções específicas entre as classes. Esses resultados indicam que a diversidade exerce uma função de maior destaque na eficiência, uma vez que diferentes grupos e classes de micro-organismos alcançaram níveis equivalentes de remoção. Isso respalda as descobertas apresentadas por Haig *et al.* (2015a), quem indicaram que a eficiência está diretamente relacionada com a diversificação da comunidade microbiana.

Observou-se uma predominância das classes Lobosa, Eurotatoria, Gastrotricha e Hypotrichea em proporções diferentes em cada filtro. Na Tabela 5.14 é apresentada a abundância relativa destas classes predominantes em cada um dos filtros. Nos filtros FL2 e FL3 predominou a classe Hypotrichea, com abundâncias relativas de 58,70% e 56,71%, respectivamente. Nos filtros FL1 e FL4, esta classe representou o 21,01% e o 19,35% da composição, respectivamente. A classe Hypotrichea foi representada pelos protozoários ciliados do gênero *Aspidisca*. Os ciliados deste gênero possuem uma morfologia que lhes confere uma vantagem adaptativa para se fixarem e colonizarem as superfícies dos meios filtrantes utilizados. Os cílios móveis permitem que esses micro-organismos capturem partículas suspensas na água, incluindo bactérias e pequenas

algas. Esse processo de filtração ativa pode ter contribuído para a remoção de matéria orgânica e micro-organismos presentes na água bruta, contribuindo assim para a melhoria da qualidade da água tratada.

Tabela 5.14: Abundância relativa da classes predominantes nas comunidades planctônica e bentônica identificadas no sistema de filtração lenta após um período de 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento dos filtros lentos

Classe	Abundância relativa [%]			
	FL1	FL2	FL3	FL4
Lobosa	36,23	4,35	3,66	6,45
Eurotatoria	27,54	4,35	3,66	12,90
Gastrotricha	2,17	17,39	19,51	35,48
Hypotrichea	21,01	58,70	56,71	19,35

A classe Gastrotricha exibiu predominância no FL4, representando 35,48% da totalidade da microbiota. Já nos filtros FL2 e FL3, essa classe figurou como a segunda mais preponderante, constituindo 17,39% e 19,51% da composição da microbiota, respectivamente. De maneira diferente, no FL1 a participação da classe na comunidade microbiana alcançou 2,17%. Os gastrótricos são pequenos animais que estabelecem uma interação direta com o processo de tratamento de água. Sua característica de seletividade alimentar, que envolve a sucção de bactérias, detritos, ciliados, diatomáceas, algas e flagelados, torna-os componentes essenciais da cadeia trófica dos sistemas aquáticos (Streble e Krauter, 1987). Ao digerir essas partículas presentes na água bruta, os gastrótricos podem ter contribuído com a remoção de micro-organismos indesejados como *E. coli* nos filtros onde ocorreram.

Diferentemente dos outros filtros, no FL1 predominaram as classes Lobosa e Eurotatoria. Nesta unidade, ambos os táxons corresponderam ao 36,23% e ao 27,54% da microbiota, enquanto nos outros filtros, a participação dessas classes na composição oscilou entre 3% e 13%. Em todos os filtros, a classe Lobosa foi caracterizada por amebas nuas. Contudo, no FL1, foi observado um predomínio de testáceas em relação às amebas nuas. Comparativamente, as amebas nuas e as testáceas desempenham papéis distintos e complementares no contexto do tratamento de água por filtração lenta. As amebas nuas se caracterizam pelas suas habilidades de fagocitose e pinocitose, as quais permitem que capturem presas móveis por meio da extensão de seus pseudópodes (fagocitose) e que absorvam substâncias líquidas e macromoléculas (pinocitose) (Streble e Krauter, 1987). Dessa forma, é provável que esses processos tenham participado da remoção de *E. coli*, material particulado e substâncias orgânicas dissolvidas como CYN

e 7-desoxiCYN presentes nos afluentes do sistema de filtração. Por outro lado, as testáceas se destacam por abrigarem-se em cascas mineralizadas e empregam diferentes mecanismos para a aquisição de alimento. Dentre suas presas estão bactérias, cianobactérias, flagelados, diatomáceas, algas verdes e ciliados (Streble e Krauter, 1987). Isso pode explicar a eficiência de remoção de *E. coli* no FL1, onde não ocorreram, na mesma proporção, outras classes predadoras de bactérias identificadas no filtro análogo FL2.

O grupo Eurotatoria compreendeu as subdivisões Monogononta e Digononta, sendo que esta última ocorreu exclusivamente nos filtros FL1 e FL4, nos quais essa classe se apresentou em proporções superiores às dos filtros FL2 e FL3. A abundância relativa dessa classe na composição microbiana foi de 27,54%, 4,35%, 3,66% e 12,90% nos filtros FL1, FL2, FL3 e FL4, respectivamente. Os micro-organismos pertencentes a essa classe são comumente chamados de Rotíferos, se alimentam de partículas orgânicas suspensas na água, como algas, bactérias, detritos orgânicos e outros micróbios. Por meio da coroa ciliada, estes micro-organismos capturam seu alimento, destacando-se alguns patógenos. Os rotíferos são de grande interesse sanitário, tendo em vista que sua presença é comumente interpretada como um indicador de elevada qualidade da água e, também, estudos evidenciaram a sua capacidade de predação de oocistos de *Cryptosporidium* (Fayer *et al.*, 2000; Stott *et al.*, 2003).

Para evidenciar as semelhanças entre a composição microbiana dos filtros, foi calculado o índice de diversidade de Shannon e, a partir deste, foi feita uma análise de dissimilaridades de Bray-Curtis para agrupar os filtros por similaridade. O FL4 sobressaiu dentre os outros por apresentar um índice de 1.74, enquanto os demais filtros apresentaram índices em torno de 1,4. O FL1 apresentou um índice de 1,49, seguido pelos filtros FL3 e FL4 com índices de 1,40 e 1,35, respectivamente. A análise de dissimilaridades confirmou os resultados da microscopia óptica, separando individualmente aos filtros FL1 e FL4 e agrupando aos filtros FL2 e FL3, como se ilustra na Figura 5.23.

O FL1 apresentou a composição microbiana mais diferenciada e, portanto, foi agrupado em um clado separado dos outros filtros. Neste filtro ocorreram, de forma geral, as mesmas classes identificadas nas outras unidades do sistema de filtração. Entretanto, a proporção destas classes foi destoante dos outros filtros. A fração dos grupos preponderantes não foi observada em nenhum outro filtro. O FL4 também apresentou divergências em relação aos outros, motivo pelo qual foi agrupado separadamente. Apesar disso, algumas proporções da composição da microbiota foram semelhantes nos filtros FL2 e FL3, situando ao FL4 no mesmo clado destas

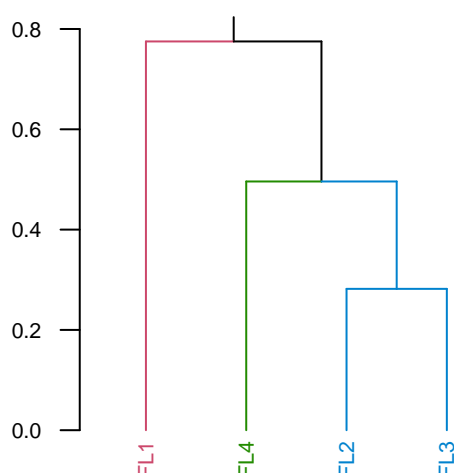


Figura 5.23: Dendrograma de agrupamento dos resultados da análise de dissimilaridade de Bray-Curtis da diversidade das comunidades planctônica e bentônica dos filtros após 35 dias de avaliação dos efeitos e da remoção de cilindrospermopsina (CYN) durante o amadurecimento das unidades filtrantes

unidades. Por último, por apresentarem uma abundância relativa semelhante, os filtros FL2 e FL3 foram agrupados juntos. Esta análise indicou que a composição da microbiota durante o amadurecimento não foi influenciada pela presença de CYN e de 7-desoxiCYN. Os fatores que influenciaram as comunidades planctônica e bentônica não foram completamente elucidados, porém, a disposição do sistema de filtração dentro do LSA se destacou como um dos possíveis fatores, já que o FL1 foi o mais próximo da fonte de luz incidente pela janela do LSA (ver Figura 4.2) e foi agrupado separadamente dos outros filtros na análise de dissimilaridades de Bray-Curtis (ver Figura 5.23).

5.4. AVALIAÇÃO DO TEMPO DE OPERAÇÃO, DA REMOÇÃO E DOS EFEITOS DA CILINDROSPERMOPSINA EM FILTROS LENTOS AMADURECIDOS

5.4.1. Monitoramento dos parâmetros operacionais e de qualidade da água

O monitoramento do sistema de filtração foi classificado em três períodos de tempo: (1) Amadurecimento (2) período de contaminação 1 e (3) período de contaminação 2. Os filtros FL1 e FL2 foram utilizados como controle e receberam água do lago Paranoá durante toda a carreira de filtração. Por outro lado, os filtros FL3 e FL4 foram alimentados com água do lago durante o amadurecimento e água do lago com CYN dissolvida apenas nos períodos de contaminação. É importante destacar que antes do início dos ensaios, o sistema de filtração já tinha sido usado na etapa experimental anterior a esta e que os filtros iniciaram a operação depois do processo de raspagem e *resanding*. Nesta etapa, diferentemente da anterior, também não foi

necessária a realização de procedimento de manutenção para restabelecer a perda de carga dos filtros.

O amadurecimento durou 42 dias, verificado pelas contagens de coliformes totais ≤ 1 NMP/100mL e pela ausência de *E. coli* nas amostragens dos dias 29 e 36. Cada período de contaminação foi mantida por 5 dias. O primeiro período de contaminação foi realizado entre o 43° e o 47° dia de operação e a segunda entre o 70° e o 74° dia.

Nesta etapa, o amadurecimento foi duas vezes mais logo do que em estudos anteriores de tratamento de água do lago Paranoá por filtração lenta em areia (Melo, 2006; Salati, 2010; Almeida, 2018). Provavelmente, esse comportamento foi devido a uma incidência insuficiente de luz sobre os filtros. Essa carência pode ter inibido o metabolismo primário do fitoplâncton (fotossíntese), causando uma falta de oxigênio dissolvido na coluna de água sobre o meio filtrante (Kelkar *et al.*, 2009) e, conseqüentemente, prejudicando grupos de micro-organismos aeróbios que são chave no amadurecimento (Weber-Shirk e Dick, 1997a).

As contagens de coliformes totais reduziram gradativamente até o final do período de amadurecimento. Como se mostra na Figura 5.24a, nesse momento, este parâmetro atingiu valores menores ou iguais a 1 NMP/100 mL. Durante o primeiro período de contaminação, a densidade de coliformes totais no efluente de todos os filtros apresentou um aumento aproximado de de uma ordem de magnitude, quando comparada com os últimos dias do amadurecimento. Este parâmetro alcançou valores de $1,18 \times 10^5$ e $1,13 \times 10^5$ NMP/100 mL na água do lago Paranoá e na água do lago com CYN dissolvida, respectivamente. O incremento nas águas de estudo foi de duas ordens de magnitude em relação ao final do processo de amadurecimento. De acordo com Logsdon (1991), existe uma relação direta entre a concentração de coliformes no afluente e no efluente. Assim, um crescimento nos teores deste grupo de bactérias na água de estudo se refletem na água filtrada. Conseqüentemente, essa pode ter sido uma das causas do acréscimo nos níveis de coliformes totais na água tratada.

O segundo período de contaminação foi aplicado três semanas depois. Neste período, a densidade de coliformes totais na água filtrada decaiu para valores iguais ou menores que 1 NMP/100 mL. Isto pode ter sido um indício da diversificação e uniformização da comunidade microbiana do biofilme ao longo do tempo. Nos filtros FL3 e FL4 isso pode indicar que a concentração de CYN na água bruta não apresentou efeitos tóxicos no plâncton e/ou no bento com capacidade de predação de bactérias do grupo coliformes. Estes resultados corroboram os estudos prévios de Unger e Collins (2008) e Haig *et al.* (2015a) quem observaram que maiores tempos de operação

favoreceram a remoção dos parâmetros microbiológicos de qualidade da água.

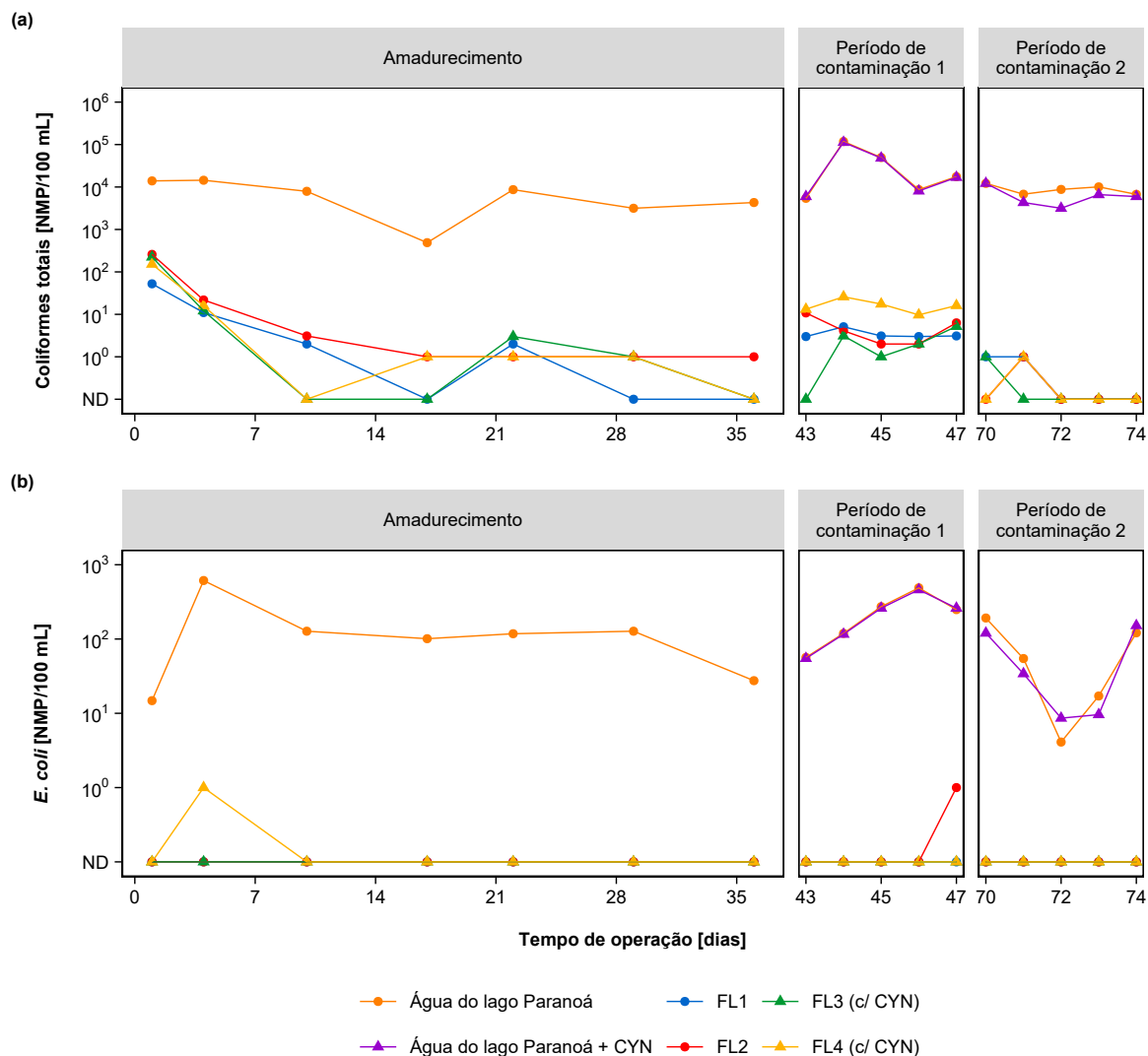


Figura 5.24: Contagens de coliformes totais e de *E. coli* nas águas de estudo e nos efluentes das unidades filtrantes em cada um dos períodos de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos

Na Figura 5.24b observa-se que durante toda a carreira de filtração, os filtros lentos receberam, em média, água bruta com uma densidade de *E. coli* de 152,18 NMP/100 mL. Desde o início da operação, tanto os filtros expostos quanto os filtros não expostos à CYN produziram água com uma concentração desta bactéria inferior ao limite de detecção do teste Colilert de 1 NMP/100 mL. A proliferação da microbiota remanescente depois do processo de raspagem e *resanding*, antes do começo dos ensaios desta etapa, foi apontada como a principal responsável desse resultado. Crittenden *et al.* (2012) explicam que, após uma sequência de carreiras de filtração, a comunidade desenvolvida ao longo da profundidade do meio filtrante pode se estabelecer, facilitando o seu

subsequente crescimento. A ausência de *E. coli* observada nos períodos de contaminação indica que a CYN não teve um impacto significativo sobre os micro-organismos e mecanismos envolvidos na sua remoção. A robustez da filtração lenta na redução dos níveis da bactéria foi evidenciada pela eficiência dos filtros que se manteve constante ao longo do tempo de operação e apesar da exposição dos filtros FL3 e FL4 à CYN.

Em relação aos parâmetros físico-químicos de qualidade da água, as Figuras 5.25, 5.26, 5.27 e 5.28 apresentam os valores do pH, da turbidez, da cor verdadeira e do COT medidos na água bruta e na água filtrada durante os três períodos de monitoramento. Tanto o pH da água bruta quanto o da água filtrada se manteve constante, oscilando entre 6 e 7, como se observa na Figura 5.25. De acordo com Mohamed e Alamri (2012) e Dziga *et al.* (2016), a biodegradação de CYN é favorecida na faixa de pH entre 6,5 e 8,0. Por conseguinte, é possível inferir que o pH da água não interferiu nos processos de biodegradação que podem ter ocorrido neste trabalho.

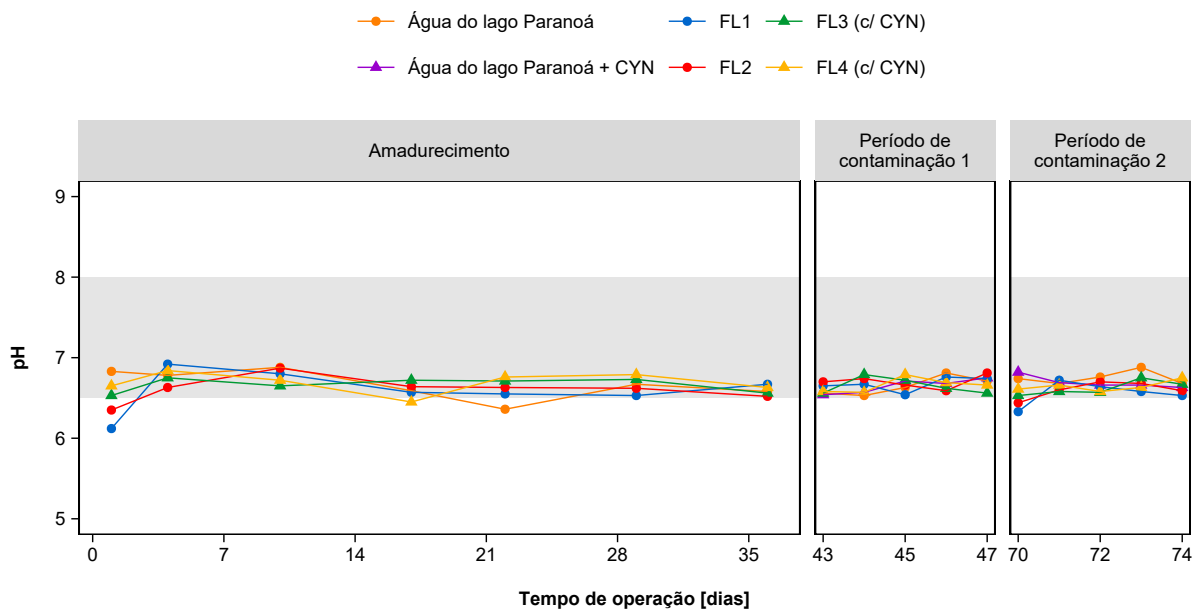


Figura 5.25: Valores de pH das águas de estudo e dos efluentes das unidades filtrantes em cada um dos períodos de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos

A remoção de turbidez (Figura 5.26), de cor verdadeira (Figura 5.27) e de COT (Figura 5.28) foi uniforme durante as três fases da operação do sistema de filtração, indicando que a CYN não influenciou a eficiência dos filtros FL3 e FL4. A turbidez da água filtrada variou entre 0,18 e 0,40 uT, atendendo ao padrão de ≤ 1 uT estabelecido pela legislação brasileira para a filtração lenta (Ministério da Saúde, 2021). A remoção de cor verdadeira foi de aproximadamente 55%,

com valores médios de 11 e 5 uH no afluente e no efluente dos filtros, respectivamente. A concentração média de COT na água bruta oscilou entre 3,874 e 5,638 mg/L, com remoções de aproximadamente 33%, que resultaram em residuais em torno de 3,165 mg/L.

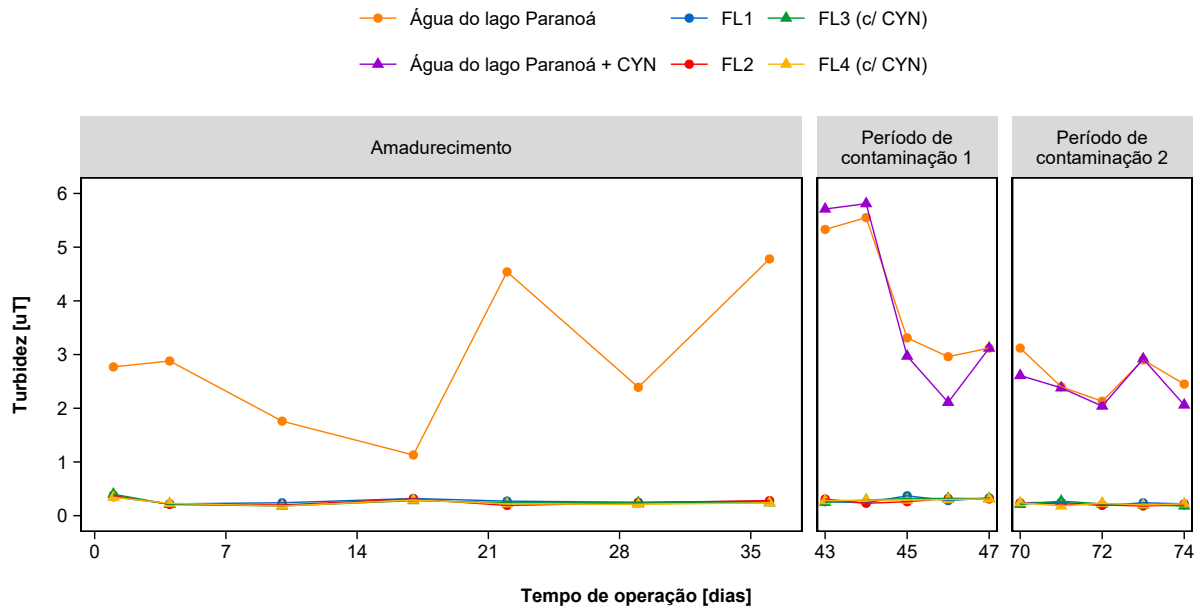


Figura 5.26: Turbidez das águas de estudo e dos efluentes das unidades filtrantes em cada um dos períodos de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos

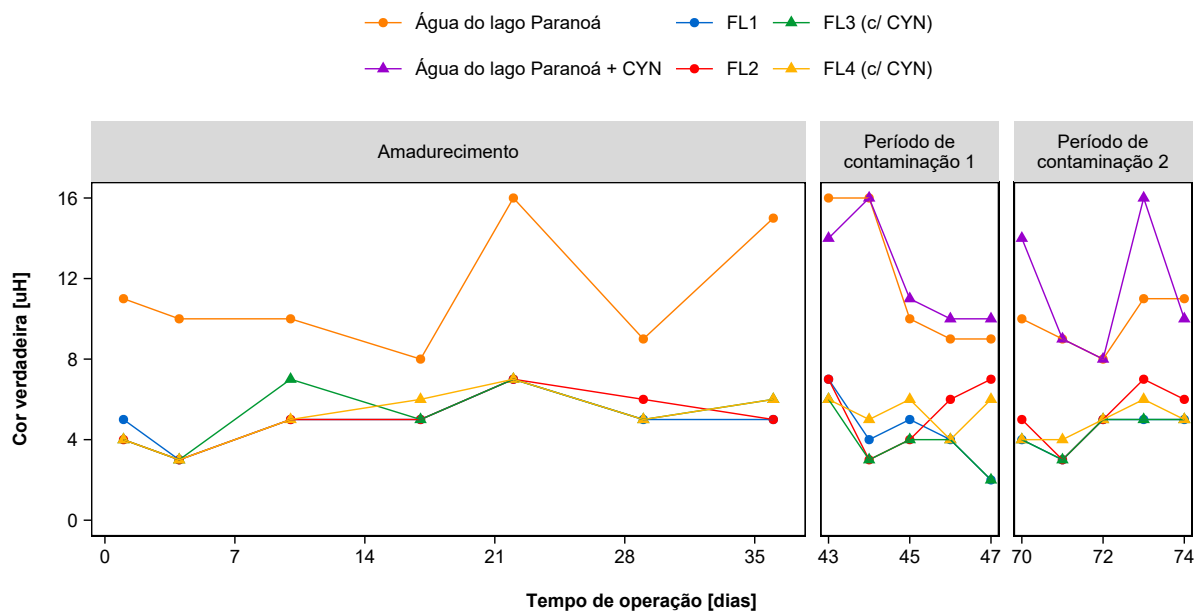


Figura 5.27: Cor verdadeira das águas de estudo e dos efluentes das unidades filtrantes em cada um dos períodos de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos

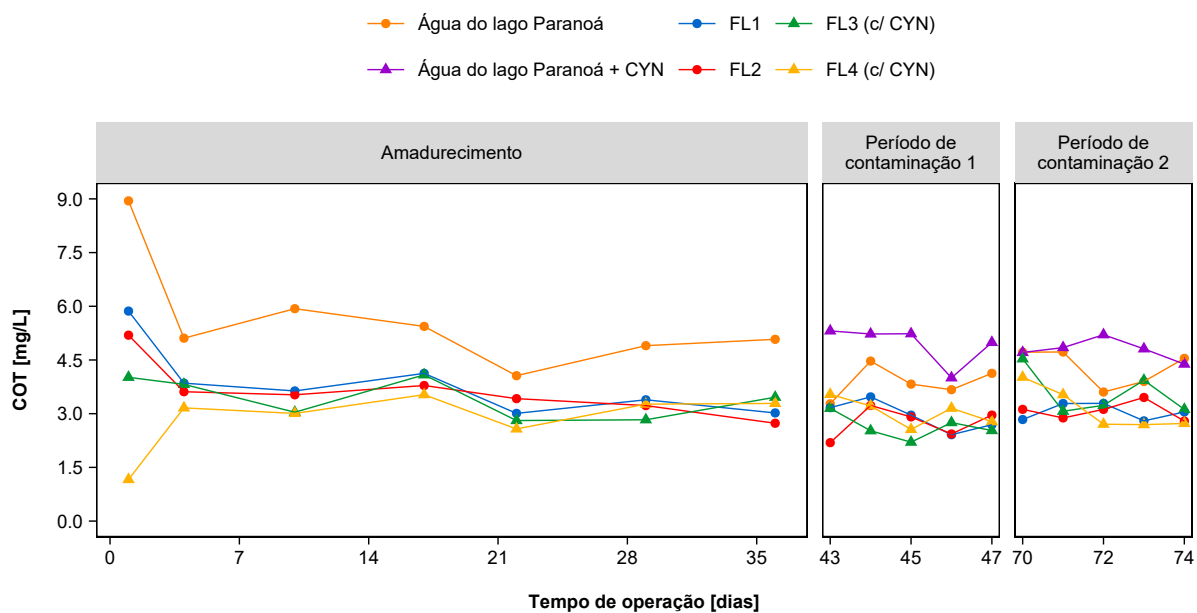


Figura 5.28: Concentração de carbono orgânico total (COT) nas águas de estudo e nos efluentes das unidades filtrantes em cada um dos períodos de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos

Em relação à perda de carga, foram observadas algumas oscilações ao longo do amadurecimento. Destaca-se que durante o amadurecimento das unidades filtrantes, a perda de carga dos filtros FL1 e FL2 foi maior que a dos filtros FL3 e FL4. Esse comportamento também foi observado na etapa experimental anterior e se manteve, apesar da raspagem e o *resanding*, nesta etapa subsequente. Contudo, como se observa na Figura 5.29a, durante os períodos de contaminação, houve uma estabilização e a perda de carga mostrou valores similares. De acordo com Haig *et al.* (2015a), o tempo de operação contribui para uma maior diversidade e uniformidade de espécies. Isto implica uma maior estabilidade operacional em sistemas de filtração lenta. Dessa forma, pode-se explicar como a perda de carga se manteve constante durante os períodos de contaminação. Apenas o filtro FL3 mostrou um aumento diferenciado da perda de carga, especialmente no segundo período de contaminação. Apesar disso, a Figura 5.29b indica que a taxa de filtração não foi afetada.

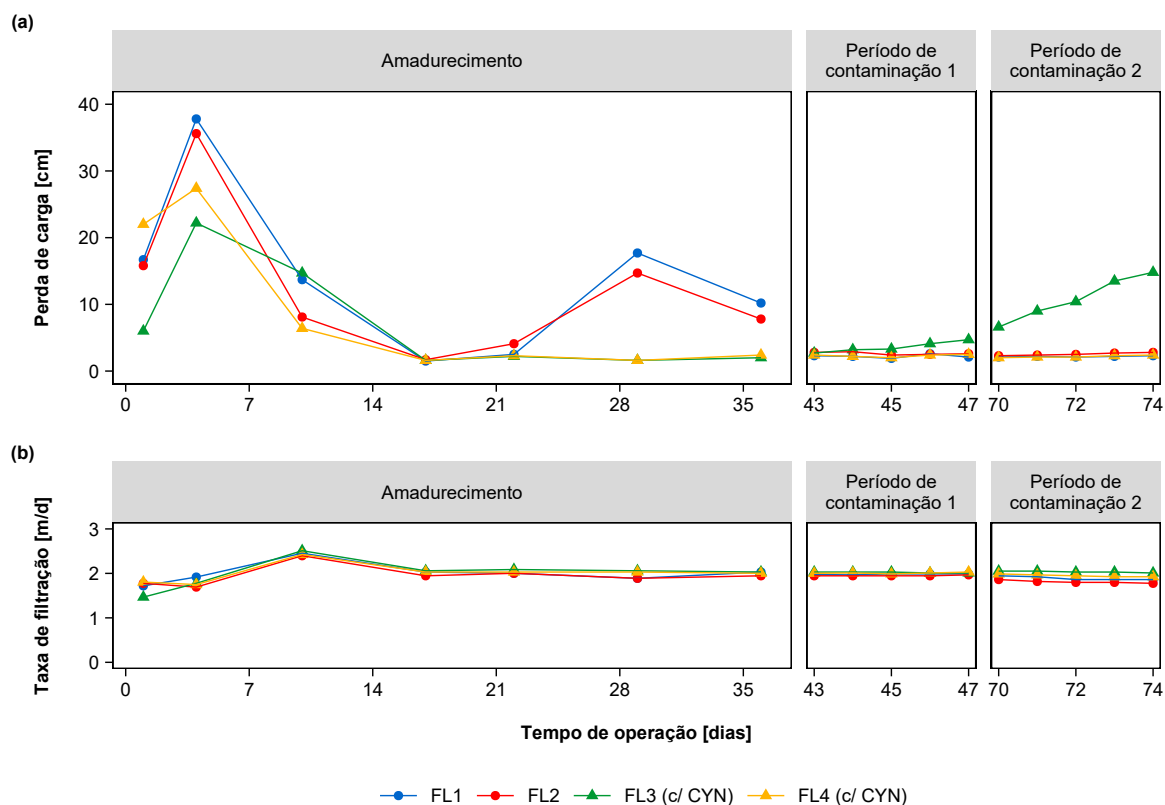


Figura 5.29: Parâmetros hidráulicos monitorados no sistema de filtração lenta em cada um dos períodos de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos. (a) Perda de carga nos primeiros 5 cm do topo do meio filtrante; (b) Taxa de filtração

5.4.2. Remoção de cilindrospermopsina

Os resultados da remoção de CYN nos filtros FL3 e FL4 são apresentados na Figura 5.30. Os resultados revelaram uma redução na concentração de esta toxina até níveis indetectáveis por CL-EM/EM, quando os filtros eram considerados amadurecidos. O amadurecimento de ambas as unidades filtrantes submetidas aos períodos de contaminação garantiu a estabilidade da atividade biológica na *schmutzdecke*, a qual contribuiu com a diminuição dos níveis de CYN nos efluentes. As informações coletadas apontam que a robustez dos processos biológicos, alcançada pela maturação dos filtros, desempenhou um papel crucial na eficiência de remoção da cianotoxina.

Ambos os filtros lentos removeram mais do 33% da concentração inicial de CYN desde o primeiro dia dos períodos de contaminação. A eficiência de remoção aumentou gradativamente ao longo do tempo, inclusive com o aumento dos teores da cianotoxina na água bruta. Os melhores resultados foram observados no segundo período de contaminação, que foi aplicado três

semanas depois da finalização do primeiro, sugerindo que a microbiota que colonizou os filtros, tornou-se mais estável e eficiente conforme o aumento do tempo de operação. Esse padrão já foi constatado em estudos anteriores (Haig *et al.*, 2015a). Nesse sentido, destaca-se que maiores tempos de funcionamento do sistema permitem a diversificação da microbiota, a estabilização da atividade biológica e a adaptação dos micro-organismos às oscilações na qualidade da água afluyente.

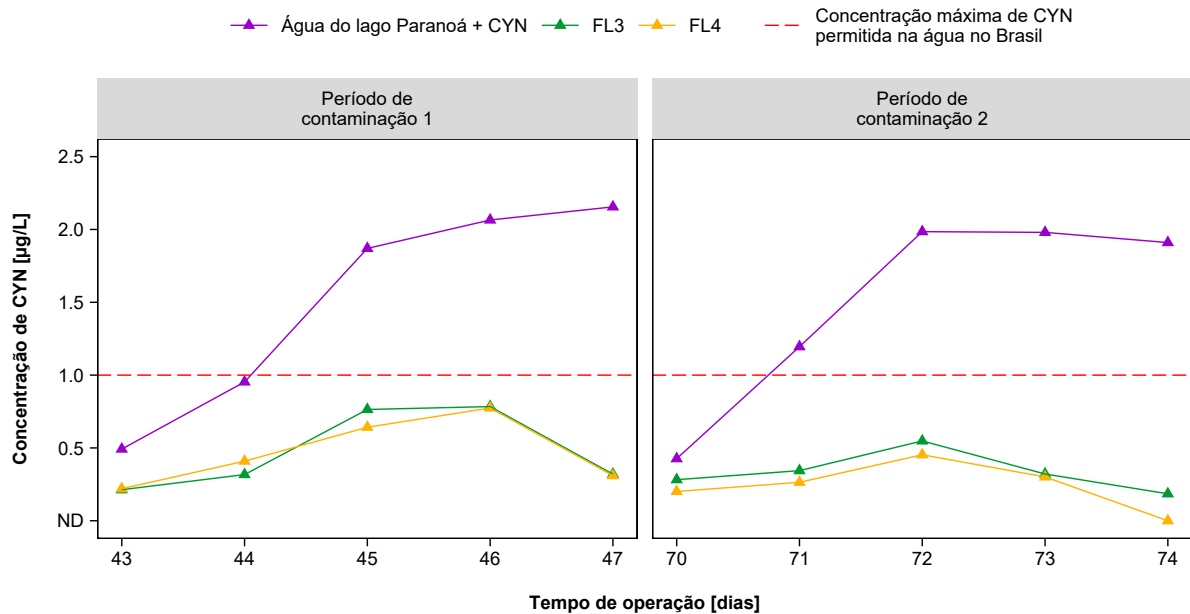


Figura 5.30: Concentração de cilindrospermopsina (CYN) nas águas de estudo e nos efluentes das unidades filtrantes em cada um dos períodos de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos

Durante o primeiro período de contaminação, as concentrações residuais máximas de CYN nos efluentes dos filtros FL3 e FL4 foram 0,784 e 0,774 µg/L, respectivamente. Já no último período de contaminação, os residuais alcançaram valores máximos de 0,548 e 0,453 µg/L nos filtros FL3 e FL4, respectivamente. No final do segundo período, no efluente do FL4 não foi detectada a presença da cianotoxina. Em ambos os períodos de contaminação, a concentração de CYN na água filtrada permaneceu abaixo do limite máximo estabelecido no Brasil, de 1 µg/L, na água para consumo humano (Ministério da Saúde, 2021).

Os resultados demonstram que, sob as condições experimentais em que o trabalho foi desenvolvido, a filtração lenta pode remover CYN, condicionando a água filtrada dentro dos níveis aceitáveis estabelecidos pela legislação brasileira. Durante o desenvolvimento do estudo, esses resultados foram obtidos quando os filtros estiveram devidamente amadurecidos e a concentração da cianotoxina na água bruta foi de até 2 µg/L. Essa constatação também é promissora em relação

aos padrões internacionais recomendados pela WHO (2020) de 0,7 µg/L para a concentração de CYN na água para consumo humano. É necessária a realização de estudos que validem esses resultados em escala real.

Quanto aos mecanismos que contribuíram para a remoção da CYN, a biodegradação destaca-se como o principal mecanismo, embora neste estudo, os efluentes dos filtros FL3 e FL4 não foram submetidos a análises para identificar possíveis subprodutos da biodegradação da cianotoxina. Este estudo também não comprovou outros mecanismos como a adsorção em biofilmes (Wu *et al.*, 2010).

5.4.3. Análise comparativa do desempenho dos filtros lentos

Dentro de cada período de monitoramento do sistema de filtração lenta, os quatro filtros foram comparados entre si para identificar possíveis diferenças. Para avaliar as diferenças ao longo do tempo, o desempenho de cada filtro foi comparado com seu equivalente nas distintas fases da operação.

Em relação aos parâmetros de qualidade da água, com exceção dos coliformes totais, o teste de Kruskal-Wallis não revelou diferenças significativa entre os filtros em nenhum dos três estágios da carreira de filtração. No primeiro período de contaminação, a diferença entre os filtros, relativa aos coliformes totais, foi indicada por um valor p de 0,00961. O teste de comparações múltiplas de Dunn, cujos resultados são apresentados na Tabela 5.15, indicou diferenças entre os filtros FL3 e FL4 nesta fase do monitoramento, com um valor p ajustado de 0,00774.

Na Figura 5.31 é possível observar a distribuição das contagens de coliformes durante as fases da operação do sistema de filtração. Na ilustração são perceptíveis as variações apontadas pelo teste de Dunn. As concentrações de coliformes totais do FL4 no primeiro período de contaminação sobressaíram, ocasionando a diferenciação desta unidade filtrante com a sua análoga, o FL3. Também se destacam as diferenças entre os períodos de contaminação, com uma maior segregação dos dados durante o amadurecimento que reduziu conforme o desenvolvimento das fases do monitoramento, atingindo uma consolidação dos dados em torno dos níveis de não detecção no último período de operação do sistema.

Tabela 5.15: Pares de filtros que apresentaram diferenças no teste de comparações múltiplas de Dunn separados por parâmetro em cada um dos períodos de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos

Fase	Parâmetro	Grupo 1	Grupo 2	Valor <i>p</i> ajustado	Significância
Período 1	Coliformes totais	FL3	FL4	0,00774	**
	Perda de carga	FL1	FL3	0,00788	**
		FL3	FL4	0,0177	*
	Taxa de filtração	FL2	FL3	0,00108	**
		FL2	FL4	0,0220	*
Período 2	Perda de carga	FL1	FL3	0,00647	**
		FL3	FL4	0,00535	**
	Taxa de filtração	FL2	FL3	0,000458	***

* — Diferença significativa na margem de não significância

** — Diferença significativa

*** — Diferença altamente significativa

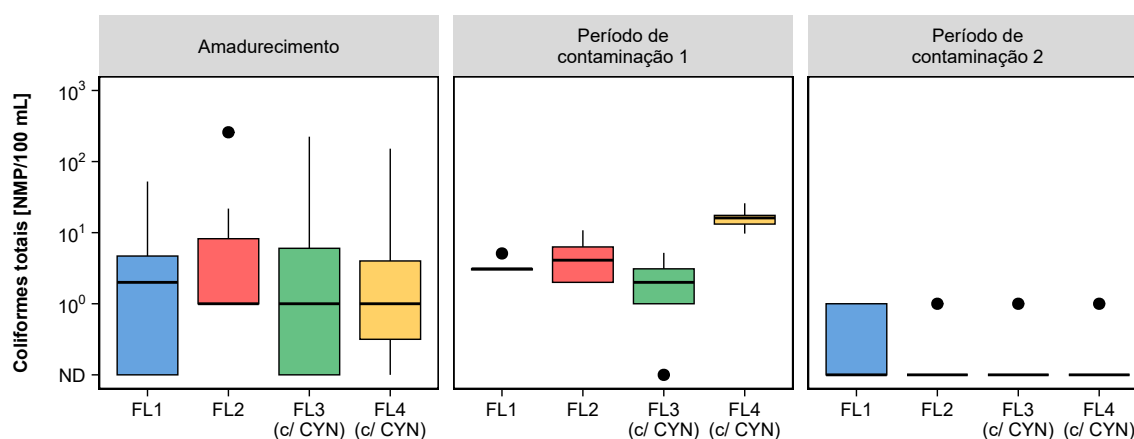


Figura 5.31: Distribuições das contagens de coliformes totais nos efluentes das unidades filtrantes em cada um dos períodos de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos

Destes resultados pode-se inferir que, provavelmente, a exposição de filtros lentos amadurecidos à CYN, em concentrações de até 2 µg/L, não interferiu na remoção dos parâmetros de qualidade da água. Em relação aos coliformes totais, não foi possível inferir se a CYN teve efeito na sua remoção, uma vez que o teste de Dunn não apontou diferenças entre os filtros não expostos e os filtros expostos.

Ao avaliar os parâmetros hidráulicos em cada filtro, o teste de Kruskal-Wallis não revelou

diferenças estatisticamente relevantes no período do amadurecimento. Todavia, em cada um dos períodos de contaminação, constataram-se diferenças entre os filtros, conforme se ilustra nos *box plots* comparativos da Figura 5.32a. Com base nos resultados do teste de Dunn, apresentados na Tabela 5.15, no filtro FL3 foram identificadas as maiores diferenças na perda de carga, quando comparado com os outros filtros estudados. O aumento deste parâmetro, observado nos períodos de contaminação, pode ser hipoteticamente atribuído ao tipo de micro-organismos que se estabeleceram e colonizaram esse filtro, os quais se alojaram nos espaços vazios no topo do meio filtrante em proporções distintas das demais unidades do sistema de filtração. Acredita-se que esse alojamento tenha prejudicado a passagem da água pelo meio filtrante, ocasionando um aumento na perda de carga.

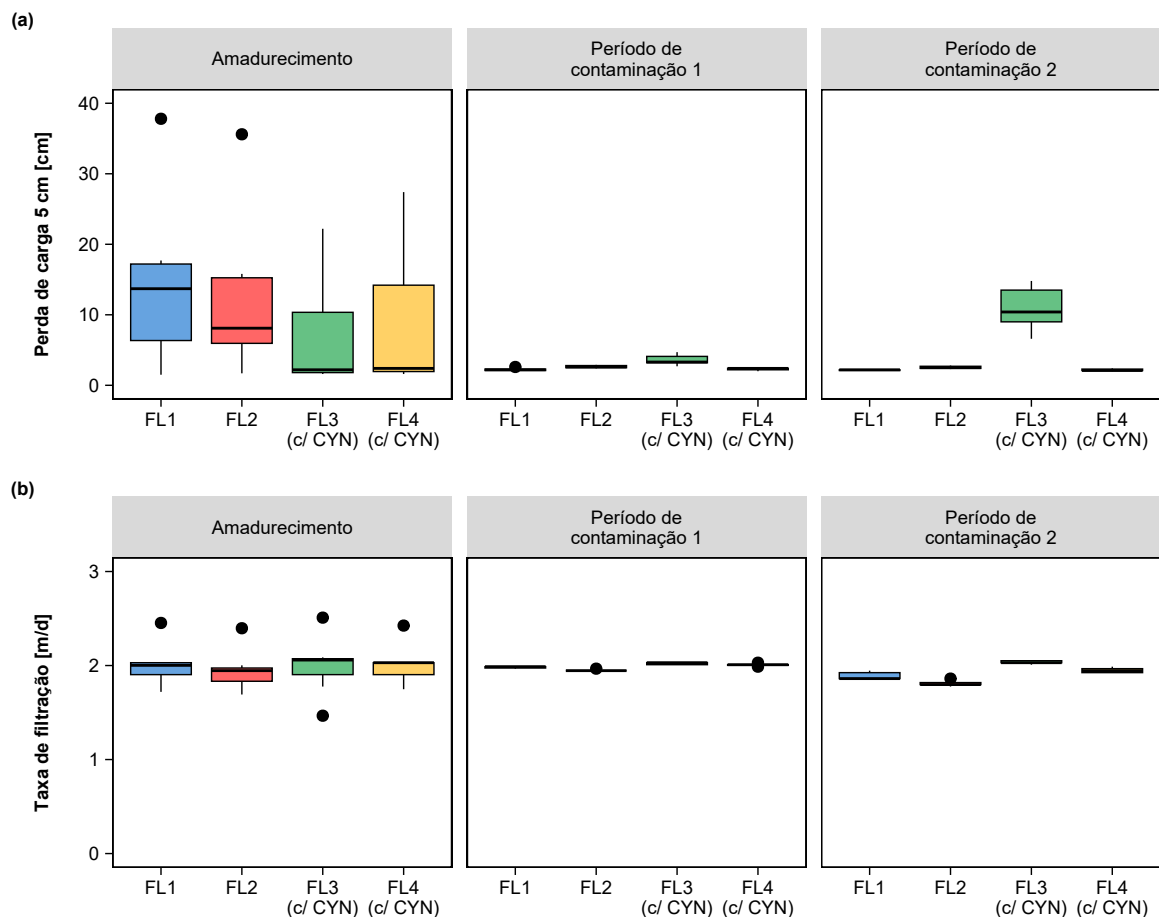


Figura 5.32: Distribuições dos valores dos parâmetros hidráulicos monitorados nas unidades filtrantes em cada um dos períodos de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos. **(a)** Perda de carga nos primeiros 5 cm do topo do meio filtrante; **(b)** Taxa de filtração

As diferenças entre os filtros em cada um dos períodos de operação do sistema foram,

principalmente, relacionadas aos parâmetros hidráulicos. Fora os coliformes totais, isto indica que o desempenho e a remoção dos parâmetros de qualidade da água foram similares nas unidades do sistema de filtração, apesar da presença de CYN na água bruta.

Por outro lado, ao comparar o desempenho de cada filtro nas diferentes fases do monitoramento, foram observadas diferenças na remoção de turbidez e COT. Na Tabela 5.16 são apresentados os resultados do teste de Dunn que respaldam estas constatações. Devido à maior redução dos níveis de turbidez no segundo período, apresentaram-se disparidades estatísticas entre ambas as fases de monitoramento em todos os filtros. A Figura 5.33a ilustra esse comportamento, que é esperado em sistemas de filtração lenta. A deposição de material particulado no topo do meio filtrante ao longo do tempo diminui os espaços vazios e incrementa a retenção das partículas de turbidez (Weber-Shirk e Dick, 1997b).

Tabela 5.16: Diferenças entre os períodos de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos apontadas pelo teste de comparações múltiplas de Dunn em cada parâmetro monitorado

Unidade	Parâmetro	Grupo 1	Grupo 2	Valor <i>p</i> ajustado	Significância
FL1	Turbidez	Período 1	Período 2	0,0538	ns
FL2	Turbidez	Período 1	Período 2	0,0422	*
FL3	COT	Período 1	Período 2	0,0438	*
	Turbidez	Período 1	Período 2	0,0244	*
FL4	Turbidez	Período 1	Período 2	0,0296	*

ns — Sem diferença significativa

* — Diferença significativa na margem de não significância

Em relação aos residuais de COT no efluente dos filtros, a unidade FL3 mostrou variações com significância estatística entre ambos os períodos de contaminação. Essa observação é evidenciada na Figura 5.33b. As possíveis causas das variações significativas não foram claras, já que são necessárias mais evidências. Em comparação com as outras unidades, o FL3 apresentou a menor diversidade zooplânctônica. Entretanto, as bactérias são os organismos mais importantes na degradação de matéria orgânica e a composição da comunidade bacteriana não foi avaliada nesta etapa.

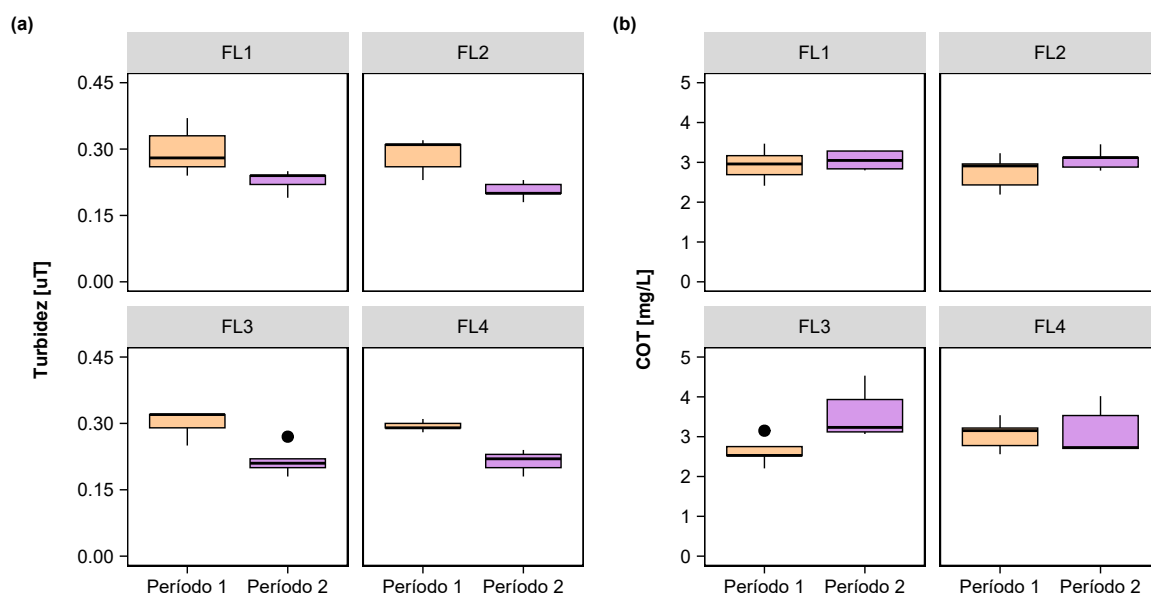


Figura 5.33: Comparação das distribuições dos valores observados de (a) turbidez e de (b) carbono orgânico total (COT) em cada período de monitoramento do sistema durante a avaliação do desempenho de filtros lentos amadurecidos

5.4.4. Caracterização das comunidades planctônica e bentônica nos filtros lentos

A análise por microscopia óptica da microbiota que colonizou e se desenvolveu nos filtros lentos ao longo da carreira de filtração identificou 13 classes taxonômicas de diferentes Reinos. A Figura 5.34 mostra a abundância relativa dessas classes no final da operação do sistema de filtração lenta.

Algumas das classes identificadas, entre outras, foram previamente relatadas como parte da comunidade microbiana do lago Paranoá (Sousa *et al.*, 2017). Além disso, em estudos anteriores, essas mesmas classes também foram observadas em sistemas de filtração lenta usando água desse lago (Taira, 2008; Salati, 2010; Farias, 2011; Almeida, 2018).

A composição da microbiota foi influenciada pelas condições ambientais e operacionais predominantes, que foram específicas para cada ecossistema das unidades filtrantes (Joubert e Pillay, 2008; Haig *et al.*, 2015a). Considerando isso, os protozoários da classe Imbricatea e as amebas da classe Lobosa foram predominantes em todos os filtros. Entretanto, a proporção de cada uma variou entre os filtros expostos e não expostos à CYN. A classe Lobosa predominou sobre a Imbricatea nos filtros não expostos, enquanto a classe Imbricatea apresentou uma proporção maior em comparação com a classe Lobosa nos filtros expostos. Os filtros FL1 e FL2 exibiram uma proporção de 40,11% e de 53,08% da classe Lobosa, respectivamente, enquanto

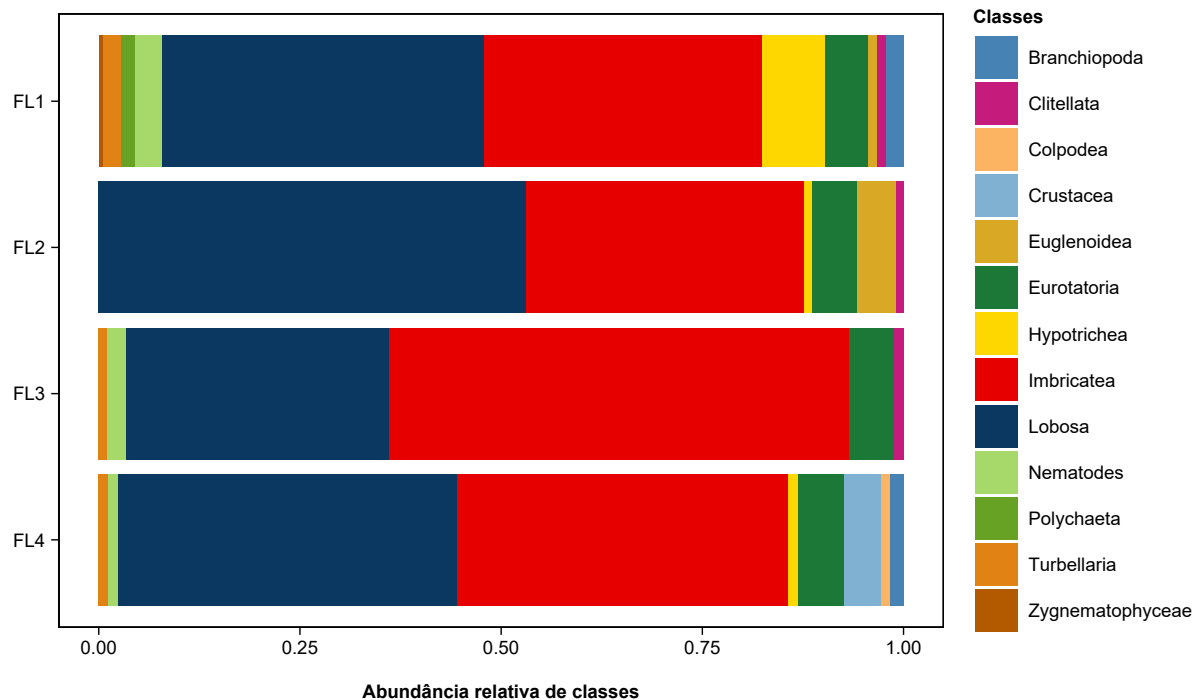


Figura 5.34: Abundância relativa das classes taxonômicas identificadas em cada filtro lento no final da avaliação do desempenho dos filtros lentos amadurecidos

nos filtros FL3 e FL3 essa proporção foi de 32,77% e 42,29%, respectivamente. Por outro lado, a proporção da classe Imbricatea nos filtros FL1 e FL2 foi de 34,54% e 34,60%, respectivamente, enquanto nos filtros FL1 e FL2 foi de 57,06% e 41,14%, respectivamente. A maior proporção da classe Imbricatea nos filtros expostos à CYN sugere uma maior resistência a essa cianotoxina quando comparada com a classe Lobosa.

Entre os representantes da classe Imbricatea, os protozoários do gênero *Euglypha*, que ocorrem naturalmente em ambientes aquáticos com pouca contaminação (Streble e Krauter, 1987), foram dominantes. Esses organismos são abundantes em ambientes aquáticos ricos em oxigênio e com uma alta diversidade de espécies planctônicas (Streble e Krauter, 1987). As espécies do gênero *Euglypha* desempenham um papel importante no ecossistema, alimentando-se de bactérias, algas e outros microrganismos presentes no ambiente em que ocorrem.

Os representantes da classe Lobosa nos filtros incluíram micro-organismos dos gêneros *Arcella*, *Centropyxis* e *Amoeba*. A espécies desses gêneros são encontradas em uma variedade de habitats aquáticos, como lagos, lagoas, pântanos e rios. As espécies do gênero *Arcella* são frequentemente encontradas em sedimentos ou vegetação em decomposição, onde se alimentam de bactérias, algas e detritos orgânicos. As espécies do gênero *Centropyxis* são comumente encontradas em sedimentos e na camada superficial de solos úmidos, alimentando-se de partículas orgânicas em

suspensão e bactérias. O gênero *Amoeba* pode ocorrer em uma variedade de ambientes aquáticos e alimentando-se, principalmente, de bactérias, algas e outros micro-organismos. É importante observar que a maior parte da microbiota encontrada nos filtros é nativa de sedimentos. Portanto, é natural encontra-los no topo do meio filtrante, que pode se considerar relativamente semelhante a esse substrato.

A remoção de coliformes totais e *E. coli* no sistema de filtração pode ser atribuída à ocorrência e à predominância das espécies pertencentes às classes Imbricatea e Lobosa, que se alimentam principalmente de bactérias e partículas orgânicas em suspensão, sugerindo assim a atuação do mecanismo de predação. É interessante notar que, apesar das proporções ligeiramente diferentes, as classes predominantes foram as mesmas em todos os filtros, indicando que a presença de CYN dissolvida não afetou significativamente a alta eficiência de remoção de coliformes totais e de *E. coli*.

A classe Eurotatoria, representada pelos grupos Digononta, Monogononta e *Lecane*, foi encontrada nos filtros em proporções entre 5% e 6%. Esses micro-organismos, conhecidos como rotíferos, são amplamente distribuídos em lagos, lagoas, rios, córregos e áreas úmidas. Sua ocorrência é geralmente considerada um indicador de boa qualidade da água.

Os micro-organismos da classe Eurotatoria se alimentam de partículas orgânicas suspensas na água como algas, bactérias, detritos orgânicos e outros micro-organismos. Alguns rotíferos são filtradores e têm estruturas especializadas como a coroa ciliada para capturar partículas de alimento suspensas na água. Além de contribuir na ciclagem de nutrientes em ecossistemas aquáticos, os rotíferos também desempenham um papel importante no controle da população de outros micro-organismos. Os rotíferos também têm sido de grande interesse sanitário, já que estudos demonstraram a predação de oocistos de *Cryptosporidium* por diferentes espécies desse grupo (Fayer *et al.*, 2000; Stott *et al.*, 2003). A ocorrência de rotíferos em filtros lentos mostra o potencial de controle de patógenos que a filtração lenta oferece no tratamento de água para consumo humano.

Os filtros estudados apresentaram composições da microbiota semelhantes. No entanto, em algumas unidades filtrantes ocorreram outras classes taxonômicas, que as diferenciaram entre si. Assim, os índices de diversidade de Shannon foram calculados para cada filtro. O FL1 teve um índice de diversidade de Shannon de 1,57, enquanto os filtros FL2, FL3 e FL4 tiveram índices de 1,10; 1,04 e 1,31, respectivamente. Esses resultados indicaram que a exposição à CYN não parece ser um fator determinante na diversidade da microbiota. Os filtros FL1 e FL4, que foram

expostos e não expostos, respectivamente, apresentaram os maiores índices de diversidade de Shannon. Isso sugere que outros fatores podem ter desempenhado um papel mais significativo na diversidade observada.

Um fator que provavelmente influenciou as ligeiras diferenças na diversidade da microbiota foi o posicionamento do sistema de filtração. Os filtros foram dispostos em ordem crescente de distância de uma das janelas do laboratório, sendo o FL1 o mais próximo e o FL4 o mais distante. O FL1 apresentou a maior diversidade em comparação com as outras unidades. Apesar de todos os cuidados tomados para evitar a incidência de luz sobre os filtros, a rotina do laboratório e a localização do sistema de filtração permitiram a passagem de pequenas parcelas de luz, que provavelmente promoveram a ocorrência de micro-organismos fotossintetizantes. A análise por microscopia óptica da microbiota do FL1 revelou a ocorrência de microalgas do gênero *Micrasterias*, pertencentes à classe Zygnematophyceae. Essas algas representaram aproximadamente 0,56% das classes taxonômicas identificadas nesse filtro (Figura 5.34). Além da sua contribuição para a produção de oxigênio, as microalgas desse gênero são conhecidas por formar colônias e biofilmes (Krohn-Molt *et al.*, 2017), fornecendo habitat, abrigo e fonte de alimento para uma variedade de organismos aquáticos como pequenos invertebrados e protozoários (Wetzel, 1983). A presença de *Micrasterias* no FL1 pode ter sido um dos fatores que contribuíram para o maior índice de diversidade observado nesse filtro, explicando também a maior riqueza de classes observada em comparação com as outras unidades de filtrantes.

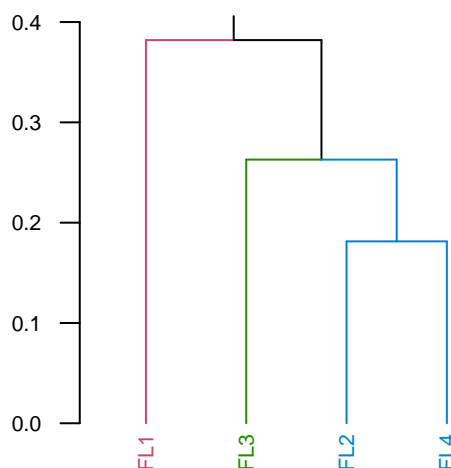


Figura 5.35: Dendrograma de agrupamento dos resultados da análise de dissimilaridade de Bray-Curtis da diversidade dos filtros no final da avaliação do desempenho dos filtros lentos amadurecidos

Os resultados da análise de dissimilaridades de Bray-Curtis mostraram que os filtros FL1

e FL3 foram os mais diferenciados dentre os quatro avaliados. A Figura 5.35 apresenta o dendrograma do agrupamento de dados, mostrando a dissimilaridade na diversidade da comunidade nesses filtros em comparação com as unidades FL2 e FL4. O FL1 se destacou como o mais dissimilar devido, provavelmente, a uma combinação de vários fatores, incluindo a localização do sistema de filtração, a incidência de luz que favoreceu o desenvolvimento de microrganismos fotossintetizantes, a formação de colônias e biofilmes pela ocorrência microalgas e a consequente criação de habitats e abrigo para outros organismos aquáticos. Em contrapartida, o FL3 apresentou a menor riqueza de classes, o que pode ter contribuído para sua distinção dos demais.

6. CONCLUSÕES, CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES

6.1. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de detecção e quantificação de cilindrospermopsina (CYN) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (CL-EM/EM) mostrou-se seletivo, linear e robusto. A faixa de trabalho e os limites de detecção e quantificação atendem às necessidades dos sistemas de tratamento de água para consumo humano. A robustez do método foi influenciada pela concentração do modificador da fase móvel, CH₃COOH, portanto, recomenda-se utilizar a fase aquosa o mais recente possível. Adicionalmente, este método é capaz de detectar a variante 7-desoxi-cilindrospermopsina (7-desoxiCYN).

De forma geral, os resultados sugeriram que a presença CYN não interferiu no desempenho dos filtros lentos em escala piloto alimentados com água do lago Paranoá. Durante o amadurecimento, concentrações médias da toxina de 20 µg/L não influenciaram na remoção de nenhum dos parâmetros avaliados. Em filtros já amadurecidos, a eventual exposição intermitente à toxina também não comprometeu o desempenho do sistema de filtração.

O desenvolvimento da perda de carga mostrou-se sensível à presença de CYN na água bruta, especialmente durante o período de amadurecimento. Presume-se que o processo de colonização do topo do meio filtrante tenha sido influenciado pelo extrato da toxina, já que os filtros amadurecidos com presença de CYN no seu afluente apresentaram uma menor espessura da camada biologicamente ativa e uma perda de carga inferior.

A remoção média de CYN durante o amadurecimento foi equivalente a 9,10%. Apesar disso, notou-se que, a partir do 32º dia de operação, a remoção de CYN aumentou em até 66%, sugerindo que em carreiras de filtração mais longas, os filtros lentos podem atingir a maturidade em relação à CYN.

O extrato de CYN na água afluente promoveu uma diferenciação da diversidade bacteriana nos filtros lentos durante o amadurecimento. As unidades filtrantes que receberam água do lago Paranoá com extrato diluído apresentaram uma maior e mais homogênea abundância relativa dos filos dominantes em comparação com os filtros que não foram expostos.

As semelhanças, em termos de habitat e metabolismo, entre os filos Proteobacteria, Planctomycetes, Bacteroidetes, Acidobacteria, Chloroflexi, Actinobacteria, Verrucomicrobia e Firmicutes permitiram a sua predominância durante o amadurecimento de filtros lentos. A

versatilidade do metabolismo das diferentes espécies e as relações simbióticas que estes grupos podem desenvolver foram os possíveis fatores chave para favorecer o seu crescimento na camada biológica.

A composição das comunidades planctônica e bentônica não se mostrou influenciada pela presença de CYN. Durante o amadurecimento, essa comunidade apresentou classes taxonômicas em proporções diferentes em cada filtro. Os grupos predominantes alternaram entre as classes Lobosa, Eurotatoria, Gastrotricha e Hypotrichea. As espécies pertencentes a estas classes se caracterizam por se alimentar de partículas em suspensão e bactérias, o que pode ser associado a não detecção de *Escherichia coli* no efluente de todos os filtros. A abundância relativa de classes em cada filtro pode ser um indicativo da importância da diversidade de organismos planctônicos e bentônicos na remoção de *E. coli*, já que diferentes proporções de cada grupo atingiram remoções equivalentes.

Em filtros já amadurecidos, a remoção de bactérias do grupo coliformes não apresentou diferenças entre os filtros submetidos aos períodos de contaminação e os filtros que receberam apenas água do lago Paranoá livre de CYN. Isso pode indicar que a concentração de CYN na água bruta não apresentou efeitos tóxicos na biota planctônica e bentônica com capacidade de predação de bactérias do grupo coliformes.

Filtros lentos amadurecidos conseguem reduzir concentrações de CYN de 2 µg/L na água bruta até níveis indetectáveis por CL-EM/EM. As informações coletadas apontam que a robustez dos processos biológicos, alcançada pela maturação dos filtros, desempenhou um papel crucial na eficiência de remoção da cianotoxina.

Nos filtros amadurecidos e submetidos a períodos de contaminação com CYN, a composição da microbiota planctônica e bentônica mostrou predominância das classes Lobosa e Imbricatea em todos os filtros. Um maior tempo de operação pode ter sido o responsável pela estabilização e a similaridade entre as abundâncias relativas. Os micro-organismos pertencentes a essas classes também são predadores de bactérias, dessa forma, esses protozoários podem ter sido responsáveis, em parte, pela remoção de coliformes totais e *E. coli*.

As divergências na abundância relativa de organismos planctônicos e bentônicos não foram associadas à CYN. É possível que outros fatores, não avaliados neste estudo, tenham sido responsáveis pelas diferentes composições das comunidades planctônica e bentônica observadas.

6.2. RECOMENDAÇÕES

De acordo com os resultados deste trabalho, recomenda-se:

Realizar a validação do método de detecção e quantificação de CYN por CL-EM/EM para a variante 7-desoxiCYN, usufruindo a capacidade do método para detectá-la.

Investigar a influência de outros fatores na remoção de CYN durante o amadurecimento como a exposição à luz, a concentração de oxigênio dissolvido, a sazonalidade e a taxa de filtração.

Avaliar a relação que existe entre a qualidade da água afluyente e a composição da microbiota bacteriana que se desenvolve em filtros lentos.

Estender as análises por técnicas de biologia molecular da biota da camada biológica, de forma que a influência da CYN possa ser avaliada em outros grupos microbianos como protozoários.

Avaliar o pré-condicionamento dos filtros lentos como estratégia de otimização da remoção de CYN.

REFERÊNCIAS

- Abbt-Braun, G., Börnick, H., Brandão, C. C. S., Cavalcanti, C. B. G., Cavalcanti, C. P., Frimmel, F. H., Majewsky, M., Steiniger, B., Tröster, M. e Worch, E. (2014). Water quality of tropical reservoirs in a changing world – the case of Lake Paranoá, Brasília, Brazil. Em: *Integrated water resource management in Brazil*. Ed. por Lorz, C., Makeschin, F. e Weiss, H. London: IWA Publishing. Cap. 6, pp. 73–95.
- ABNT (2016). Material filtrante — Areia, antracito e pedregulho — Especificação. Norma NBR 11799. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas, p. 11.
- Akcaalan, R., Köker, L., Oğuz, A., Spoof, L., Meriluoto, J. A. O. e Albay, M. (2014). First report of cylindrospermopsin production by two cyanobacteria (*Dolichospermum mendotae* and *Chrysoosporum ovalisporum*) in Lake Iznik, Turkey. *Toxins (Basel)*: 6(11), pp. 3173–3186. DOI: [10.3390/toxins6113173](https://doi.org/10.3390/toxins6113173).
- Almeida, M. C. (2018). Avaliação do uso de mantas sintéticas não tecidas e areia grossa na filtração lenta em escala domiciliar - estudo comparativo. Diss. de mestr. Brasília: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília.
- Andreoli, F. C. e Sabogal-Paz, L. P. (2020). Household slow sand filter to treat groundwater with microbiological risks in rural communities. *Water Research*: 186, p. 116352. DOI: [10.1016/j.watres.2020.116352](https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116352).
- APHA (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Ed. por Clesceri, L. S., Greenberg, A. E. e Eaton, A. D. 22^a ed. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation (WEF). ISBN: 978-087553-013-0.
- Banker, R., Carmeli, S., Hadas, O., Teltsch, B., Porat, R. e Sukenik, A. (1997). Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (cyanophyceae) isolated from lake Kinneret, Israel. *Journal of Phycology*: 33(4), pp. 613–616.
- Banker, R., Carmeli, S., Werman, M., Teltsch, B., Porat, R. e Sukenik, A. (2001). Uracil moiety is required for toxicity of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin. *Journal*

- of Toxicology and Environmental Health: Part A*: 62 (4), pp. 281–188. DOI: [10.1080/009841001459432](https://doi.org/10.1080/009841001459432).
- Banker, R., Teltsch, B., Sukenik, A. e Carmeli, S. (2000). 7-Epicylindrospermopsin, a Toxic Minor Metabolite of the Cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from Lake Kinneret, Israel. *Journal of Natural Products*: 63 (3), pp. 387–389. DOI: [10.1021/np990498m](https://doi.org/10.1021/np990498m).
- Barwick, V. J., ed. (2019). Planning and reporting method validation studies – Supplement to Eurachem guide on the fitness for purpose of analytical methods. 1ª ed. LGC.
- Batista, B. D. e Fonseca, B. M. (2018). Fitoplâncton da região central do lago Paranoá (DF): Uma abordagem ecológica e sanitária. *Engenharia Sanitária e Ambiental*: 23 (2), pp. 229–241. DOI: [10.1590/S1413-41522018169124](https://doi.org/10.1590/S1413-41522018169124).
- Bellamy, W. D., Hendricks, D. W. e Logsdon, G. S. (1985). Slow Sand Filtration: Influences of Selected Process Variables. *Journal American Water Works Association*: 77 (12), pp. 62–66.
- Berger, C., Ba, N., Gugger, M., Bouvy, M., Rusconi, F., Couté, A., Troussellier, M. e Bernard, C. (2006). Seasonal dynamics and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* in Lake Guiers (Senegal, West Africa). *FEMS Microbiology Ecology*: 57 (3), pp. 355–366. DOI: [10.1111/j.1574-6941.2006.00141.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00141.x).
- Berry, J. P., Gibbs, P. D. L., Schmale, M. C. e Saker, M. L. (2009). Toxicity of cylindrospermopsin, and other apparent metabolites from *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum*, to the zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Toxicon*: 53 (2), pp. 289–299. DOI: [10.1016/j.toxicon.2008.11.016](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.11.016).
- Bichai, F., Barbeau, B., Dullemont, Y. e Hijnen, W. (2010). Role of predation by zooplankton in transport and fate of protozoan (oo)cysts in granular activated carbon filtration. *Water Research*: 44 (4), pp. 1072–1081. DOI: [10.1016/j.watres.2009.09.001](https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.001).
- Bicudo, C. e Menezes, M. (2006). Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições. 2ª ed. RiMa, p. 552. ISBN: 857656064X.
- Bittencourt-Oliveira, M. d. C., Piccin-Santos, V., Kujbida, P. e Moura, A. d. N. (2011). Cylindrospermopsin in Water Supply Reservoirs in Brazil Determined by Immunochemical

- and Molecular Methods. *Journal of Water Resource and Protection*: 3 (6), pp. 349–355. DOI: [10.4236/jwarp.2011.36044](https://doi.org/10.4236/jwarp.2011.36044).
- Bittencourt-Oliveira, M. d. C., Piccin-Santos, V., Moura, A. d. N., Aragão-Tavares, N. K. C. e Cordeiro-Araújo, M. K. (2014). Cyanobacteria, microcystins and cylindrospermopsin in public drinking supply reservoirs of Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*: 86 (1), pp. 297–310. DOI: [10.1590/0001-3765201302512](https://doi.org/10.1590/0001-3765201302512).
- Bláhová, L., Babica, P., Adamovský, O., Kohoutek, J., Maršálek, B. e Bláha, L. (2008). Analyses of cyanobacterial toxins (microcystins, cylindrospermopsin) in the reservoirs of the Czech Republic and evaluation of health risks. *Environmental Chemistry Letters*: 6 (4), pp. 223–227. DOI: [10.1007/s10311-007-0126-x](https://doi.org/10.1007/s10311-007-0126-x).
- Bourke, A. T. C., Hawea, R. B., Neileon, A. e Stallraan, N. D. (1983). An outbreak of hepato-enteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. *Toxicon*: 21 (3), pp. 45–48. DOI: [10.1016/0041-0101\(83\)90151-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(83)90151-4).
- Bourne, D. G., Blakeley, R. L., Riddles, P. e Jones, G. J. (2006). Biodegradation of the cyanobacterial toxin microcystin LR in natural water and biologically active slow sand filters. *Water Research*: 40 (6), pp. 1294–1302. DOI: [10.1016/j.watres.2006.01.022](https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.01.022).
- Brient, L., Lengronne, M., Bormans, M. e Fastner, J. (2009). First occurrence of cylindrospermopsin in freshwater in France. *Environmental Toxicology*: 24 (4), pp. 415–420. DOI: [10.1002/tox.20439](https://doi.org/10.1002/tox.20439).
- Calvo-Bado, L. A., Pettitt, T. R., Parsons, N., Petch, G. M., Morgan, J. A. W. e Whipps, J. M. (2003). Spatial and Temporal Analysis of the Microbial Community in Slow Sand Filters Used for Treating Horticultural Irrigation Water. *Applied and Environmental Microbiology*: 69 (4), pp. 2116–2125. DOI: [10.1128/aem.69.4.2116-2125.2003](https://doi.org/10.1128/aem.69.4.2116-2125.2003).
- Campos, A., Araújo, P., Pinheiro, C., Azevedo, J., Osório, H. e Vasconcelos, V. M. (2013). Effects on growth, antioxidant enzyme activity and levels of extracellular proteins in the green alga *Chlorella vulgaris* exposed to crude cyanobacterial extracts and pure microcystin and cylindrospermopsin. *Ecotoxicology and Environmental Safety*: 94, pp. 45–53. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2013.04.019](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.04.019).

- Carmichael, W. W., Azevedo, S. M. F. O., An, J. S., Molica, R. J. R., Jochimsen, E. M., Lau, S., Rinehart, K. L., Shaw, G. R. e Eaglesham, G. K. (2001). Human Fatalities from Cyanobacteria: Chemical and Biological Evidence for Cyanotoxins. *Environmental Health Perspectives*: 109 (7), pp. 663–668.
- Carr, N. G. e Whitton, B. A. (1982). The Biology of Cyanobacteria. Em: *Botanical Monographs*. Ed. por Burnett, J. H., Baker, H. G., Beevers, H. e Whatley, F. R. Vol. 19. University of California Press, p. 688. ISBN: 9780520047174.
- Chen, L., Zhao, C., Dionysiou, D. D. e O’Shea, K. E. (2015). TiO₂ photocatalytic degradation and detoxification of cylindrospermopsin. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*: 307-308, pp. 115–122. DOI: [10.1016/j.jphotochem.2015.03.013](https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2015.03.013).
- Chiswell, R. K., Shaw, G. R., Eaglesham, G. K., Smith, M. J., Norris, R. L., Seawright, A. A. e Moore, M. R. (1999). Stability of Cylindrospermopsin, the Toxin from the Cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii*: Effect of pH, Temperature, and Sunlight on Decomposition. *Environmental Toxicology*: 14, pp. 155–161.
- Chorus, I. e Bartram, J., ed. (1999). Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. 1^a ed. London e New York: Spon Press. ISBN: 0-203-47807-X.
- Crittenden, J. C., Trussell, R. R., Hand, D. W., Howe, K. J. e Tchobanoglous, G. (2012). MWH’s Water Treatment: Principles and Design. 3^a ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, p. 1920.
- Davies, C. M., Apte, S. C., Peterson, S. M. e Stauber, J. L. (1994). Plant and algal interference in bacterial β -D-galactosidase and β -D-glucuronidase assays. *Applied and Environmental Microbiology*: 60 (11), pp. 3959–3964.
- Davis, T. W., Orr, P. T., Boyer, G. L. e Burford, M. A. (2014). Investigating the production and release of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by *Cylindrospermopsis raciborskii* over a natural growth cycle. *Harmful Algae*: 31, pp. 18–25. DOI: [10.1016/j.hal.2013.09.007](https://doi.org/10.1016/j.hal.2013.09.007).
- de la Cruz, A. A., Hiskia, A., Kaloudis, T., Chernoff, N., Hill, D., Antoniou, M. G., He, X., Loftin, K., O’Shea, K. E., Zhao, C., Pelaez, M., Han, C., Lynch, T. J. e Dionysiou, D. D. (2013).

- A review on cylindrospermopsin: the global occurrence, detection, toxicity and degradation of a potent cyanotoxin. *Environmental Science Processes & Impacts*: 15 (11), pp. 1979–2003. DOI: [10.1039/c3em00353a](https://doi.org/10.1039/c3em00353a).
- Di Bernardo, L. e Dantas, A. D. B. (2005). Métodos e técnicas de tratamento de água. 2ª ed. Vol. 1. São Carlos: RiMa, p. 784.
- Dubinsky, Z. e Rotem, J. (1974). Relations between algal populations and the pH of their media. *Oecologia*: 16, pp. 53–60. DOI: [10.1007/BF00345087](https://doi.org/10.1007/BF00345087).
- Dziga, D., Kokociński, M., Maksylewicz, A., Czaja-Prokop, U. e Barylski, J. (2016). Cylindrospermopsin Biodegradation Abilities of *Aeromonas* sp. Isolated from Rusalka Lake. *Toxins (Basel)*: 8 (3), pp. 55–64. DOI: [10.3390/toxins8030055](https://doi.org/10.3390/toxins8030055).
- Falconer, I. R. e Humpage, A. R. (2001). Preliminary Evidence for In Vivo Tumour Initiation by Oral Administration of Extracts of the Blue-Green Alga *Cylindrospermopsis raciborskii* Containing the Toxin Cylindrospermopsin. *Environmental Toxicology*: 16 (2), pp. 192–195. DOI: [10.1002/tox.1024](https://doi.org/10.1002/tox.1024).
- Falconer, I. R. e Humpage, A. R. (2006). Cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water supplies: Cylindrospermopsins. *Environmental Toxicology*: 21 (4), pp. 299–304. DOI: [10.1002/tox.20194](https://doi.org/10.1002/tox.20194).
- Farias, N. J. V. (2011). Desempenho de filtros lentos, com diferentes períodos de amadurecimento, precedidos de pré-filtração em pedregulho no tratamento de águas contendo células tóxicas de *Microcystis aeruginosa*. Diss. de mestr. Brasília: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília.
- Fathalli, A., Jenhani, A. B. R., Moreira, C., Azevedo, J., Welker, M., Romdhane, M., Antunes, A. e Vasconcelos, V. M. (2011). Genetic variability of the invasive cyanobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* from Bir M'cherga reservoir (Tunisia). *Archives of Microbiology*: 193 (8), pp. 595–604. DOI: [10.1007/s00203-011-0704-y](https://doi.org/10.1007/s00203-011-0704-y).
- Fayer, R., Trout, J. M., Walsh, E. e Cole, R. (2000). Rotifers ingest oocysts of *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*: 47 (2), pp. 161–163. DOI: [10.1111/j.1550-7408.2000.tb00026.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2000.tb00026.x).

- Ferreira, M. A., Brandão, C. C. S. e Ginoris, Y. P. (2021). Oxidation of cylindrospermopsin by fenton process: A bench-scale study of the effects of dose and ratio of H₂O₂ and Fe(II) and kinetics. *Toxins (Basel)*: 13 (9), p. 604. DOI: [10.3390/toxins13090604](https://doi.org/10.3390/toxins13090604).
- Ferreira Filho, S. S. (2017). Tratamento de água: concepção, projeto e operação de estações de tratamento. 1ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 472. ISBN: 9788535287400.
- Freitas, B. L. S. e Sabogal-Paz, L. P. (2019). Pretreatment using *Opuntia cochenillifera* followed by household slow sand filters: Technological alternatives for supplying isolated communities. *Environmental Technology*: 41 (21), pp. 2783–2794. DOI: [10.1080/09593330.2019.1582700](https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1582700).
- Freitas, B. L. S., Terin, U. C., Fava, N. M. N., Maciel, P. M. F., Garcia, L. A. T., Medeiros, R. C., Oliveira, M., Fernandez-Ibañez, P., Byrne, J. A. e Sabogal-Paz, L. P. (2022). A critical overview of household slow sand filters for water treatment. *Water Research*: 208, p. 117870. DOI: [10.1016/j.watres.2021.117870](https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117870).
- Gácsi, M., Antal, O., Vasas, G., Máthé, C., Borbély, G., Saker, M. L., Gyori, J., Farkas, A., Vehovszky, Á. e Bánfalvi, G. (2009). Comparative study of cyanotoxins affecting cytoskeletal and chromatin structures in CHO-K1 cells. *Toxicology in Vitro*: 23 (4), pp. 710–718. DOI: [10.1016/j.tiv.2009.02.006](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.02.006).
- Gorham, P. R., McLachlan, J., Hammer, U. T. e Kim, W. K. (1964). Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*: 15 (2), pp. 796–804. DOI: [10.1080/03680770.1962.11895606](https://doi.org/10.1080/03680770.1962.11895606).
- Grützmacher, G., Böttcher, G., Chorus, I. e Bartel, H. (2002). Removal of microcystins by slow sand filtration. *Environmental Toxicology*: 17 (4), pp. 386–394. DOI: [10.1002/tox.10062](https://doi.org/10.1002/tox.10062).
- Guzmán-Guillén, R., Prieto Ortega, A. I., González, A. G., Soria-Díaz, M. E. e Cameán, A. M. (2012). Cylindrospermopsin determination in water by LC-MS/MS: Optimization and validation of the method and application to real samples. *Environmental Toxicology and Chemistry*: 31 (10), pp. 2233–2238. DOI: [10.1002/etc.1954](https://doi.org/10.1002/etc.1954).
- Haande, S., Rohrlack, T., Ballot, A., Røberg, K., Skulberg, R., Beck, M. e Wiedner, C. (2008). Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria)

- isolates from Africa and Europe. *Harmful Algae*: 7(5), pp. 692–701. DOI: [10.1016/j.hal.2008.02.010](https://doi.org/10.1016/j.hal.2008.02.010).
- Haarhoff, J. e Cleasby, J. L. (1991). Biological and physical mechanisms in slow sand filtration. Em: *Slow sand filtration*. Ed. por Logsdon, G. S. Reston, Virginia, USA: ASCE. Cap. 2, pp. 19–68.
- Haig, S. J. (2014). Characterising the Functional Ecology of Slow Sand Filters through Environmental Genomics. Tese de dout. School of Engineering, College of Science e Engineering, University of Glasgow.
- Haig, S. J., Collins, G., Davies, R. L., Dorea, C. C. e Quince, C. (2011). Biological aspects of slow sand filtration: Past, present and future. *Water Science & Technology: Water Supply*: 11 (4), pp. 468–472. DOI: [10.2166/ws.2011.076](https://doi.org/10.2166/ws.2011.076).
- Haig, S. J., Gauchotte-Lindsay, C., Collins, G. e Quince, C. (2016). Bioaugmentation Mitigates the Impact of Estrogen on Coliform-Grazing Protozoa in Slow Sand Filters. *Environmental Science & Technology*: 50 (6), pp. 3101–3110. DOI: [10.1021/acs.est.5b05027](https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05027).
- Haig, S. J., Quince, C., Davies, R. L., Dorea, C. C. e Collins, G. (2015a). The relationship between microbial community evenness and function in slow sand filters. *mBio*: 6 (5), p. 12. DOI: [10.1128/mBio.00729-15](https://doi.org/10.1128/mBio.00729-15).
- Haig, S. J., Schirmer, M., D’Amore, R., Gibbs, J., Davies, R. L., Collins, G. e Quince, C. (2015b). Stable-isotope probing and metagenomics reveal predation by protozoa drives *E. coli* removal in slow sand filters. *ISME J*: 9 (4), pp. 797–808. DOI: [10.1038/ismej.2014.175](https://doi.org/10.1038/ismej.2014.175).
- Harada, K.-I., Ohtani, I., Iwamoto, K., Suzuki, M., Watanabe, M. F., Watanabe, M. e Terao, K. (1994). Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon*: 32 (1), pp. 73–84. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90023-X](http://dx.doi.org/10.1016/0041-0101(94)90023-X).
- Hawkins, P. R., Chandrasena, N. R., Jones, G. J., Humpage, A. R. e Falconer, I. R. (1997). Isolation and toxicity of *Cylindrospermopsis raciborskii* from an ornamental lake. *Toxicon*: 35 (3), pp. 341–346.

- Ho, L., Dreyfus, J., Boyer, J., Lowe, T., Bustamante, H., Duker, P., Meli, T. e Newcombe, G. (2012a). Fate of cyanobacteria and their metabolites during water treatment sludge management processes. *Science of the Total Environment*: 424 (1), pp. 232–238. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2012.02.025](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.025).
- Ho, L., Lambling, P., Bustamante, H., Duker, P. e Newcombe, G. (2011). Application of powdered activated carbon for the adsorption of cylindrospermopsin and microcystin toxins from drinking water supplies. *Water Research*: 45 (9), pp. 2954–2964. DOI: [10.1016/j.watres.2011.03.014](https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.014).
- Ho, L., Meyn, T., Keegan, A., Hoefel, D., Brookes, J., Saint, C. P. e Newcombe, G. (2006). Bacterial degradation of microcystin toxins within a biologically active sand filter. *Water Research*: 40 (4), pp. 768–774. DOI: [10.1016/j.watres.2005.12.009](https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.12.009).
- Ho, L., Sawade, E. e Newcombe, G. (2012b). Biological treatment options for cyanobacteria metabolite removal: A review. *Water Research*: 46 (5), pp. 1536–1548. DOI: [10.1016/j.watres.2011.11.018](https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.018).
- Ho, L., Slyman, N., Kaeding, U. e Newcombe, G. (2008). Optimizing PAC and chlorination practices for cylindrospermopsin removal. *Journal American Water Works Association*: 100 (11), pp. 88–96. DOI: [10.1002/j.1551-8833.2008.tb09776.x](https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.2008.tb09776.x).
- Ho, L., Tang, T., Monis, P. T. e Hoefel, D. (2012c). Biodegradation of multiple cyanobacterial metabolites in drinking water supplies. *Chemosphere*: 87 (10), pp. 1149–1154. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2012.02.020](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.020).
- Ho, L., Tang, T., Hoefel, D. e Vigneswaran, B. (2012d). Determination of rate constants and half-lives for the simultaneous biodegradation of several cyanobacterial metabolites in Australian source waters. *Water Research*: 46 (17), pp. 5735–5746. DOI: [10.1016/j.watres.2012.08.003](https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.08.003).
- Hoeger, S. J., Shaw, G. R., Hitzfeld, B. C. e Dietrich, D. R. (2004). Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in two Australian drinking water treatment plants. *Toxicon*: 43 (6), pp. 639–649. DOI: [10.1016/j.toxicon.2004.02.019](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.02.019).
- Hojo, L. Y. C. P., Rezende, R. V. d. P., Lautenschlager, S. R. e Sabogal-Paz, L. P. (2022). Household slow sand filters operating in continuous and intermittent flows: Computational

- fluid dynamics simulation and validation by tracer experiments. *Chemical Engineering Science*: 247, p. 117058. DOI: [10.1016/j.ces.2021.117058](https://doi.org/10.1016/j.ces.2021.117058).
- Huisman, L. e Wood, W. E. (1974). Slow sand filtration. Vol. 16. Geneva: World Health Organization (WHO), p. 122.
- Humpage, A. R. e Falconer, I. R. (2003). Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in male Swiss albino mice: determination of no observed adverse effect level for deriving a drinking water guideline value. *Environmental Toxicology*: 18 (2), pp. 94–103. DOI: [10.1002/tox.10104](https://doi.org/10.1002/tox.10104).
- Humpage, A. R., Fontaine, F., Froscio, S. M., Burcham, P. e Falconer, I. R. (2005). Cylindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health: Part A*: 68 (9), pp. 739–753. DOI: [10.1080/15287390590925465](https://doi.org/10.1080/15287390590925465).
- Joubert, D. E. e Pillay, B. (2008). Visualisation of the microbial colonisation of a slow sand filter using an Environmental Scanning Electron Microscope. *Electronic Journal of Biotechnology*: 11, pp. 119–125. DOI: [10.2225/vol11-issue2-fulltext-12](https://doi.org/10.2225/vol11-issue2-fulltext-12).
- Kaboré, O. D., Godreuil, S. e Drancourt, M. (2020). Planctomycetes as host-associated bacteria: A perspective that holds promise for their future isolations, by mimicking their native environmental niches in clinical microbiology laboratories. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*: 10, p. 519301. DOI: [10.3389/fcimb.2020.519301](https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.519301).
- Kelkar, P. S., Tajne, D. S. e Dhage, S. S. (2009). Effect of shading on performance of slow sand filters. *Journal American Water Works Association*: 101 (12), pp. 69–76. DOI: [10.1002/j.1551-8833.2009.tb10011.x](https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.2009.tb10011.x).
- Kleinteich, J., Hildebrand, F., Wood, S. A., Cirés, S., Agha, R., Quesada, A., Pearce, D. A., Convey, P., Küpper, F. C. e Dietrich, D. R. (2014). Diversity of toxin and non-toxin containing cyanobacterial mats of meltwater ponds on the Antarctic Peninsula: a pyrosequencing approach. *Antarctic Science*: 26 (5), pp. 521–532. DOI: [10.1017/s0954102014000145](https://doi.org/10.1017/s0954102014000145).
- Klitzke, S., Apelt, S., Weiler, C., Fastner, J. e Chorus, I. (2010). Retention and degradation of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in sediments: The role of sediment preconditioning

- and DOM composition. *Toxicon*: 55 (5), pp. 999–1007. DOI: [10.1016/j.toxicon.2009.06.036](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.036).
- Klitzke, S., Beusch, C. e Fastner, J. (2011). Sorption of the cyanobacterial toxins cylindrospermopsin and anatoxin-a to sediments. *Water Research*: 45 (3), pp. 1338–1346. DOI: [10.1016/j.watres.2010.10.019](https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.10.019).
- Klitzke, S. e Fastner, J. (2012). Cylindrospermopsin degradation in sediments: The role of temperature, redox conditions, and dissolved organic carbon. *Water Research*: 46 (5), pp. 1549–1555. DOI: [10.1016/j.watres.2011.12.014](https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.014).
- Kloot, R. W., Radakovich, B., Huang, X. e Brantley, D. D. (2006). A comparison of bacterial indicators and methods in rural surface waters. *Environmental Monitoring and Assessment*: 121 (1-3), pp. 275–287. DOI: [10.1007/s10661-005-9121-5](https://doi.org/10.1007/s10661-005-9121-5).
- Krohn-Molt, I., Alawi, M., Förstner, K. U., Wiegandt, A., Burkhardt, L., Indenbirken, D., Thieß, M., Grundhoff, A., Kehr, J., Tholey, A. e Streit, W. R. (2017). Insights into microalga and bacteria interactions of selected phycosphere biofilms using metagenomic, transcriptomic, and proteomic approaches. *Frontiers in Microbiology*: 8, p. 14. DOI: [10.3389/fmicb.2017.01941](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01941).
- Li, R., Carmichael, W. W., Brittain, S., Eaglesham, G. K., Shaw, G. R., Mahakhant, A., Noparatnaraporn, N., Yongmanitchai, W., Kayaf, K. e Watanabe, M. M. (2001a). Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from a Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Toxicon*: 39 (7), pp. 973–980.
- Li, R., Carmichael, W. W., Brittain, S., Shaw, G. R., Liu, Y. e Watanabe, M. M. (2001b). First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (cyanobacteria). *Journal of Phycology*: 37 (6), pp. 1121–1126.
- Logsdon, G. S., ed. (1991). Slow sand filtration. 1^a ed. Reston, Virginia, USA: ASCE.
- Logsdon, G. S. (2008). Water filtration practices: including slow sand filters and precoat filtration. 1^a ed. United States: American Water Works Association, p. 295.

- Looper, R. E., Runnegar, M. T. C. e Williams, R. M. (2005). Synthesis of the putative structure of 7-deoxycylindrospermopsin: C7 oxygenation is not required for the inhibition of protein synthesis. *Angewandte Chemie International Edition English*: 44 (25), pp. 3879–3881. DOI: [10.1002/anie.200500520](https://doi.org/10.1002/anie.200500520).
- Maghsoudi, E., Fortin, N., Greer, C., Duy, S. V., Fayad, P., Sauve, S., Prevost, M. e Dorner, S. (2015). Biodegradation of multiple microcystins and cylindrospermopsin in clarifier sludge and a drinking water source: Effects of particulate attached bacteria and phycocyanin. *Ecotoxicology and Environmental Safety*: 120, pp. 409–417. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2015.06.001](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.001).
- Magnusson, B. e Örnemark, U., ed. (2014). Eurachem guide: The fitness for purpose of analytical methods – a laboratory guide to method validation and related topics. 2^a ed. LGC. ISBN: 978-91-87461-59-0.
- Máthé, C., M-Hamvas, M., Garda, T., Beyer, D. e Vasas, G. (2017). Cellular Effects of Cylindrospermopsin (Cyanobacterial Alkaloid Toxin) and its Potential Medical Consequences. *Current Medicinal Chemistry*: 24 (1), pp. 91–109. DOI: [10.2174/09298673236661610281](https://doi.org/10.2174/09298673236661610281).
- Mazmouz, R., Chapuis-Hugon, F., Mann, S., Pichon, V., Méjean, A. e Ploux, O. (2010). Biosynthesis of cylindrospermopsin and 7-epicylindrospermopsin in *Oscillatoria* sp. strain PCC 6506: identification of the *cyr* gene cluster and toxin analysis. *Applied and Environmental Microbiology*: 76 (15), pp. 4943–4949. DOI: [10.1128/AEM.00717-10](https://doi.org/10.1128/AEM.00717-10).
- McGregor, G. B., Sendall, B. C., Hunt, L. T. e Eaglesham, G. K. (2011). Report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from *Raphidiopsis mediterranea* Skuja (Cyanobacteria/Nostocales). *Harmful Algae*: 10 (4), pp. 402–410. DOI: [10.1016/j.hal.2011.02.002](https://doi.org/10.1016/j.hal.2011.02.002).
- Melo, A. E. S. (2006). Avaliação da Filtração Lenta na Remoção de Células de *Cylindrospermopsis raciborskii* e saxitoxinas. Diss. de mestr. Brasília: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília.
- Messias, O. M. S. e Brandão, C. C. S. (2013). Influência do tempo de amadurecimento dos filtros lentos em areia na remoção de microcistinas: Avaliação em escala piloto. Em: *27º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental*. Goiânia, Brasil: ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, p. 9.

- Messineo, V., Melchiorre, S., Di Corcia, A., Gallo, P. e Bruno, M. (2010). Seasonal succession of *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Aphanizomenon ovalisporum* blooms with cylindrospermopsin occurrence in the volcanic Lake Albano, Central Italy. *Environmental Toxicology*: 25 (1), pp. 18–27. DOI: [10.1002/tox.20469](https://doi.org/10.1002/tox.20469).
- Metcalf, J. S., Lindsay, J., Beattie, K. A., Birmingham, S., Saker, M. L., Törökne, A. K. e Codd, G. A. (2002). Toxicity of cylindrospermopsin to the brine shrimp *Artemia salina*: comparisons with protein synthesis inhibitors and microcystins. *Toxicon*: 40 (8), pp. 1115–1120. DOI: [10.1016/S0041-0101\(02\)00105-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00105-8).
- Ministério da Saúde (2021). Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Portaria nº 888 de 2021. Brasília: Diário Oficial da União, p. 21.
- Mohamed, Z. A. (2007). First report of toxic *Cylindrospermopsis raciborskii* and *Raphidiopsis mediterranea* (Cyanoprokaryota) in Egyptian fresh waters. *FEMS Microbiology Ecology*: 59 (3), pp. 749–761. DOI: [10.1111/j.1574-6941.2006.00226.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00226.x).
- Mohamed, Z. A. e Alamri, S. A. (2012). Biodegradation of cylindrospermopsin toxin by microcystin-degrading bacteria isolated from cyanobacterial blooms. *Toxicon*: 60 (8), pp. 1390–1395. DOI: [10.1016/j.toxicon.2012.10.004](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.10.004).
- Nakamoto, N., Graham, N. J. D., Collins, M. R. e Gimbel, R., ed. (2014). Progress in Slow Sand and Alternative Biofiltration Processes: Further Developments and Applications. 1ª ed. London: IWA Publishing.
- Nelson, D. L. e Cox, M. M. (2014). Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6ª ed. New York: W.H.Freeman e Company, p. 1220. ISBN: 9781429234146.
- Nogueira, I. C. G., Saker, M. L., Pflugmacher, S., Wiegand, C. e Vasconcelos, V. M. (2004). Toxicity of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology*: 19 (5), pp. 453–459. DOI: [10.1002/tox.20050](https://doi.org/10.1002/tox.20050).
- Norris, R. L., Eaglesham, G. K., Pierens, G., Shaw, G. R., Smith, M. J., Chiswell, R. K., Seawright, A. A. e Moore, M. R. (1999). Deoxycylindrospermopsin, an Analog of Cylindrospermopsin

- from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology*: 14 (1), pp. 163–165. DOI: [10.1002/\(SICI\)1522-7278\(199902\)14:1<163::AID-TOX21>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-7278(199902)14:1<163::AID-TOX21>3.0.CO;2-V).
- Ohtani, I., Moore, R. E. e Runnegar, M. T. C. (1992). Cylindrospermopsin: A Potent Hepatotoxin from the Blue-Green Alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Journal of the American Chemical Society*: 114 (20), pp. 7941–7942. DOI: [10.1021/ja00046a067](https://doi.org/10.1021/ja00046a067).
- Piccin-Santos, V. e Bittencourt-Oliveira, M. d. C. (2012). Toxic Cyanobacteria in Four Brazilian Water Supply Reservoirs. *Journal of Environmental Protection*: 3 (1), pp. 68–73. DOI: [10.4236/jep.2012.31009](https://doi.org/10.4236/jep.2012.31009).
- Pinheiro, C., Azevedo, J., Campos, A., Loureiro, S. e Vasconcelos, V. M. (2013). Absence of negative allelopathic effects of cylindrospermopsin and microcystin-LR on selected marine and freshwater phytoplankton species. *Hydrobiologia*: 705, pp. 27–42. DOI: [10.1007/s10750-012-1372-x](https://doi.org/10.1007/s10750-012-1372-x).
- Pisciotta, J. M., Rath, D. F., Stanek, P. A., Flanery, D. M. e Harwood, V. J. (2002). Marine bacteria cause false-positive results in the Colilert-18 rapid identification test for *Escherichia coli* in Florida waters. *Applied and Environmental Microbiology*: 68 (2), pp. 539–544.
- Preußel, K., Stüken, A., Wiedner, C., Chorus, I. e Fastner, J. (2006). First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon*: 47 (2), pp. 156–162. DOI: [10.1016/j.toxicon.2005.10.013](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.10.013).
- Rasmussen, J. P., Cursaro, M., Froschio, S. M. e Saint, C. P. (2008). An examination of the antibiotic effects of cylindrospermopsin on common gram-positive and gram-negative bacteria and the protozoan *Naegleria lovaniensis*. *Environmental Toxicology*: 23 (1), pp. 36–43. DOI: [10.1002/tox.20311](https://doi.org/10.1002/tox.20311).
- Reisner, M., Carmeli, S., Werman, M. e Sukenik, A. (2004). The cyanobacterial toxin cylindrospermopsin inhibits pyrimidine nucleotide synthesis and alters cholesterol distribution in mice. *Toxicological Sciences*: 82 (2), pp. 620–627. DOI: [10.1093/toxsci/kfh267](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh267).
- Rogers, E. H., Zehr, R. D., Gage, M. I., Humpage, A. R., Falconer, I. R., Marr, M. e Chernoff, N. (2007). The cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin, induces fetal toxicity in the mouse after exposure late in gestation. *Toxicon*: 49 (6), pp. 855–864. DOI: [10.1016/j.toxicon.2006.12.009](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.12.009).

- Rücker, J., Stüken, A., Nixdorf, B., Fastner, J., Chorus, I. e Wiedner, C. (2007). Concentrations of particulate and dissolved cylindrospermopsin in 21 *Aphanizomenon*-dominated temperate lakes. *Toxicon*: 50 (6), pp. 800–809. DOI: [10.1016/j.toxicon.2007.06.019](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.06.019).
- Runnegar, M. T. C., Kong, S.-M., Zhong, Y.-Z., Ge, J.-L. e Lu, S. C. (1994). The Role of Glutathione in the Toxicity of a Novel Cyanobacterial Alkaloid Cylindrospermopsin in Cultured Rat Hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*: 201 (1), pp. 235–241. DOI: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1694>.
- Runnegar, M. T. C., Kong, S.-M., Zhong, Y.-Z. e Lu, S. C. (1995). Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*: 49 (2), pp. 219–225. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(94\)00466-8](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(94)00466-8).
- Sá, J. C. (2006). Influência das características da camada filtrante e da taxa de filtração na eficiência de remoção de *Microcystis aeruginosa* e microcistina na filtração lenta em areia. Tese de dout. Brasília: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília.
- Sá, J. C., Oliveira, A. C. P., Azevedo, S. M. F. O. e Brandão, C. C. S. (2002). Remoção de *Microcystis aeruginosa* pelo processo de filtração lenta. Em: *XXVII Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental*. Cancún, México: Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, p. 10.
- Sabogal-Paz, L. P., Campos, L. C., Bogush, A. e Canales, M. (2020). Household slow sand filters in intermittent and continuous flows to treat water containing low mineral ion concentrations and Bisphenol A. *Science of the Total Environment*: 702, p. 135078. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2019.135078](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135078).
- Saker, M. L. e Eaglesham, G. K. (1999). The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissues of the Redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Toxicon*: 37 (7), pp. 1065–1077. DOI: [10.1016/S0041-0101\(98\)00240-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00240-2).
- Salati, D. S. (2010). Desempenho da filtração lenta com diferentes períodos de amadurecimento no tratamento de águas cotendo elevadas densidades de células tóxicas de *Microcystis aeruginosa*. Diss. de mest. Brasília: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília.

- Santos, A. A. (2016). Dinâmica da microcistina-LR na lagoa de Jacarepaguá (RJ): Aspectos físicos, químicos e biológicos. Diss. de mest. Rio de Janeiro: Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Scarlett, K. R., Kim, S., Lovin, L. M., Chatterjee, S., Scott, J. T. e Brooks, B. W. (2020). Global scanning of cylindrospermopsin: Critical review and analysis of aquatic occurrence, bioaccumulation, toxicity and health hazards. *Science of the Total Environment*: 738, p. 139807. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.139807](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139807).
- Schembri, M. A., Neilan, B. A. e Saint, C. P. (2001). Identification of Genes Implicated in Toxin Production in the Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental Toxicology*: 16 (5), pp. 413–421. DOI: [10.1002/tox.1051](https://doi.org/10.1002/tox.1051).
- Seifert, M., McGregor, G. B., Eaglesham, G. K., Wickramasinghe, W. e Shaw, G. R. (2007). First evidence for the production of cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin by the freshwater benthic cyanobacterium, *Lyngbya wollei* (Farlow ex Gomont) Speziale and Dyck. *Harmful Algae*: 6 (1), pp. 73–80. DOI: [10.1016/j.hal.2006.07.001](https://doi.org/10.1016/j.hal.2006.07.001).
- Senogles, P., Shaw, G. R., Smith, M. J., Norris, R. L., Chiswell, R. K., Mueller, J., Sadler, R. e Eaglesham, G. K. (2000). Degradation of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin, from *Cylindrospermopsis raciborskii*, by chlorination. *Toxicon*: 38 (9), pp. 1203–1213.
- Smith, M. J., Shaw, G. R., Eaglesham, G. K., Ho, L. e Brookes, J. D. (2008). Elucidating the factors influencing the biodegradation of cylindrospermopsin in drinking water sources. *Environmental Toxicology*: 23 (3), pp. 413–421. DOI: [10.1002/tox.20356](https://doi.org/10.1002/tox.20356).
- Sousa, F. D. R., Rangel, E. R., Silva, M. L. C., Joko, C. Y. e Elmoor-Loureiro, L. M. A. (2017). An update for cladoceran fauna (Crustacea, Branchiopoda) from Lake Paranoá, central Brazil, with the first description of a male of *Leydigiopsis ornata* Daday, 1905. *Nauplius*: 25, p. 13. DOI: [10.1590/2358-2936e2017029](https://doi.org/10.1590/2358-2936e2017029).
- Souza, F. H., Mondardo, R. I. e Sens, M. L. (2017). Drinking water treatment using upflow slow sand filtration systems in high density *Cylindrospermopsis raciborskii* cyanobacteria water. *Desalination and Water Treatment*: 79, pp. 1–8. DOI: [10.5004/dwt.2017.20817](https://doi.org/10.5004/dwt.2017.20817).
- Spoof, L., Berg, K. A., Rapala, J., Lahti, K., Lepisto, L., Metcalf, J. S., Codd, G. A. e Meriluoto, J. A. O. (2006). First observation of cylindrospermopsin in *Anabaena lapponica* isolated

- from the boreal environment (Finland). *Environmental Toxicology*: 21 (6), pp. 552–560. DOI: [10.1002/tox.20216](https://doi.org/10.1002/tox.20216).
- Stott, R., May, E., Ramírez, E. e Warren, A. (2003). Predation of *Cryptosporidium* oocysts by protozoa and rotifers: Implications for water quality and public health. *Water Science & Technology*: 47 (3), pp. 77–83. DOI: [10.2166/wst.2003.0166](https://doi.org/10.2166/wst.2003.0166).
- Streble, H. e Krauter, D. (1987). Atlas de los microorganismos de agua dulce: La vida en una gota de agua: Libro de clasificación con 1700 ilustraciones. Barcelona: Ediciones Omega. SA., p. 357.
- Taira, R. (2008). Remoção de oocistos de *Cryptosporidium* na filtração lenta, precedida ou não de filtração ascendente em pedregulho. Diss. de mest. Brasília: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos, Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília.
- Tangerino, E. P., Campos, L. C. e Brandão, C. C. S. (2006). Filtração lenta. Em: *Contribuição ao estudo da remoção de cianobactérias e microcontaminantes orgânicos por meio de técnicas de tratamento de água para consumo humano*. Ed. por Pádua, V. L. 1ª ed. Rio de Janeiro: ABES RJ. Cap. 6, pp. 237–274.
- Teixeira, M. R. e Rosa, M. J. (2006). Integration of dissolved gas flotation and nanofiltration for *M. aeruginosa* and associated microcystins removal. *Water Research*: 40 (19), pp. 3612–3620. DOI: [10.1016/j.watres.2006.06.006](https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.006).
- Terao, K., Ohmori, S., Igarashi, K., Ohtani, I., Watanabe, M. F., Harada, K.-I., Ito, E. e Watanabe, M. (1994). Electron microscopic studies on experimental poisoning in mice induced by cylindrospermopsin isolated from blue-green alga *Umezakia natans*. *Toxicon*: 32 (7), pp. 833–843. DOI: [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(94\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(94)90008-6).
- Terin, U. C. e Sabogal-Paz, L. P. (2019). *Microcystis aeruginosa* and microcystin-LR removal by household slow sand filters operating in continuous and intermittent flows. *Water Research*: 150, pp. 29–39. DOI: [10.1016/j.watres.2018.11.055](https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.055).
- The Galaxy Community (2022). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. *Nucleic Acids Research*: 50(W1), W345–W351. DOI: [10.1093/nar/gkac247](https://doi.org/10.1093/nar/gkac247).

- Tryland, I. e Fiksdal, L. (1998). Enzyme characteristics of β -D-galactosidase- and β -D-glucuronidasepositive bacteria and their interference in rapid methods fordetection of waterborne coliforms and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*: 64 (3), pp. 1018–1023.
- U.S. EPA (2015). Determination of cylindrospermopsin and anatoxin-a in drinking water by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS). Method 545. United States Environmental Protection Agency, p. 34.
- Unger, M. e Collins, M. R. (2008). Assessing *Escherichia coli* removal in the *schmutzdecke* of slow-rate biofilters. *Journal American Water Works Association*: 100 (12), pp. 60–73. DOI: [10.1002/j.1551-8833.2008.tb09799.x](https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.2008.tb09799.x).
- Valencia-Cárdenas, D., Tavares, T. S., Silveira, R., Brandão, C. C. S., Soares, R. M. e Ginoris, Y. P. (2023). Evaluation of the removal and effects of cylindrospermopsin on ripened slow sand filters. *Toxins (Basel)*: 15 (9), p. 543. DOI: [10.3390/toxins15090543](https://doi.org/10.3390/toxins15090543).
- Vaz-Moreira, I., Nunes, O. C. e Manaia, C. M. (2011). Diversity and antibiotic resistance patterns of *Sphingomonadaceae* isolates from drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*: 77 (16), pp. 5697–5706. DOI: [10.1128/AEM.00579-11](https://doi.org/10.1128/AEM.00579-11).
- Visscher, J. T. (1990). Slow sand filtration: design, operation, and maintenance. *Journal American Water Works Association*: 82 (6), pp. 67–71. DOI: [10.1002/j.1551-8833.1990.tb06979.x](https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.1990.tb06979.x).
- Vizzotto, C. S. (2021). Diversidade bacteriana associada a culturas de cianobactérias dos recifes de Abrolhos. Tese de dout. Brasília: Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília.
- Weber-Shirk, M. L. e Dick, R. I. (1997a). Biological mechanisms in slow sand filters. *Journal American Water Works Association*: 89 (2), pp. 72–83.
- Weber-Shirk, M. L. e Dick, R. I. (1997b). Physical-chemical mechanisms in slow sand filters. *Journal American Water Works Association*: 89 (1), pp. 75–86.
- Wetzel, R. G. (1983). Recommendations for future research on periphyton. Em: *Periphyton of Freshwater Ecosystems*. Ed. por Wetzel, R. G. Dordrecht: Springer Netherlands. Cap. 43, pp. 339–346. ISBN: 978-94-009-7293-3. DOI: [10.1007/978-94-009-7293-3_45](https://doi.org/10.1007/978-94-009-7293-3_45).

- WHO (2020). Cyanobacterial toxins: cylindrospermopsins. Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality and Guidelines for safe recreational water environments WHO/HEP/ECH/WSH/2020.4. Geneva, Switzerland: World Health Organization (WHO), p. 31.
- Wimmer, K. M., Strangman, W. K. e Wright, J. L. C. (2014). 7-Deoxy-desulfo-cylindrospermopsin and 7-deoxy-desulfo-12-acetylcylindrospermopsin: Two new cylindrospermopsin analogs isolated from a Thai strain of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Harmful Algae*: 37, pp. 203–206. DOI: [10.1016/j.hal.2014.06.006](https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.06.006).
- Wörmer, L., Cirés, S., Carrasco, D. e Quesada, A. (2008). Cylindrospermopsin is not degraded by co-occurring natural bacterial communities during a 40-day study. *Harmful Algae*: 7 (2), pp. 206–213. DOI: [10.1016/j.hal.2007.07.004](https://doi.org/10.1016/j.hal.2007.07.004).
- Wörmer, L., Huerta-Fontela, M., Cirés, S., Carrasco, D. e Quesada, A. (2010). Natural Photodegradation of the Cyanobacterial Toxins Microcystin and Cylindrospermopsin. *Environmental Science & Technology*: 44 (8), pp. 3002–3007.
- Wu, Y., He, J. e Yang, L. (2010). Evaluating adsorption and biodegradation mechanisms during the removal of microcystin-RR by periphyton. *Environmental Science & Technology*: 44 (16), pp. 6319–6324. DOI: [10.1021/es903761y](https://doi.org/10.1021/es903761y).
- Young, F. M., Micklem, J. e Humpage, A. R. (2008). Effects of blue-green algal toxin cylindrospermopsin (CYN) on human granulosa cells in vitro. *Reproductive Toxicology*: 25 (3), pp. 374–380. DOI: [10.1016/j.reprotox.2008.02.006](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.02.006).
- Zapomělová, E., Skácelová, O., Pumann, P., Kopp, R. e Janeček, E. (2012). Biogeographically interesting planktonic Nostocales (Cyanobacteria) in the Czech Republic and their polyphasic evaluation resulting in taxonomic revisions of *Anabaena bergii* Ostefeld 1908 (*Chrysoosporum* gen. nov.) and *A. tenericaulis* Nygaard 1949 (*Dolichospermum tenericaule* comb. nova). Em: *Phytoplankton responses to human impacts at different scales*. Ed. por Salmaso, N., Naselli-Flores, L., Cerasino, L., Flaim, G., Tolotti, M. e Padisák, J. 1^a ed. Developments in Hydrobiology. Springer, pp. 353–365. ISBN: 0018-8158. DOI: [10.1007/s10750-012-1034-z](https://doi.org/10.1007/s10750-012-1034-z).