



PUCRS

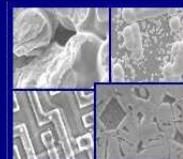
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E  
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Faculdade de Engenharia

Faculdade de Física

Faculdade de Química



PGETEMA

**OZONIZAÇÃO NO TRATAMENTO DA ÁGUA PARA REMOÇÃO DE  
MICROCISTINA-LR E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE POR  
LC-MS/MS**

**ANDREA FERREIRA MACHADO**

QUÍMICA

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA  
E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

**Porto Alegre**

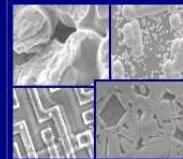
**Agosto, 2008**



PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E  
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Faculdade de Engenharia  
Faculdade de Física  
Faculdade de Química



PGETEMA

# **OZONIZAÇÃO NO TRATAMENTO DA ÁGUA PARA REMOÇÃO DE MICROCISTINA-LR E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE POR LC-MS/MS**

**ANDREA FERREIRA MACHADO**

QUÍMICA

ORIENTADOR: PROF. DR. MARÇAL JOSÉ RODRIGUES PIRES

Dissertação realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre  
Agosto, 2008**

## **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Marçal José Rodrigues Pires**  
**Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais**  
**Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**

---

**Prof. Dr. (Nome do Co-orientador(a))**  
**Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais**  
**Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**

---

**Prof. Dr. (Nome do participante da banca)**  
**(Nome do Depto. ou Programa onde atua)**  
**(Nome da Instituição onde atua)**

---

**Prof. Dr. (Nome do participante da banca)**  
**(Nome do Depto. ou Programa onde atua)**  
**(Nome da Instituição onde atua)**

*À Deus, pelo amor, misericórdia e  
fortaleza.*

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais que foram os grandes incentivadores para minha educação.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Marçal José Rodrigues Pires agradeço a orientação neste estudo, mas principalmente por confiar no meu trabalho e me auxiliar sempre que preciso em questões técnicas relacionadas ou não a este estudo.

À Bioensaios Análises e Consultoria Ambiental Ltda. por todo apoio em poder usar suas instalações, equipamentos e materiais do laboratório durante a parte experimental deste trabalho. Agradeço à Ellen e ao Alexandre pelo incentivo prestado. Ao Alexandre meu muito obrigado por sempre estar disposto a me auxiliar na execução dos ensaios e por toda força.

À Bióloga Patrícia Bender pela execução e esclarecimentos do teste de toxicidade.

À bolsista Marta Eliza Hammerschmitt e ao colega Alexandre Praprocki pelo auxílio nos experimentos com ozônio. Ao Alexandre agradeço ainda os esquemas de ozonização.

Ao Marcelo por se disponibilizar a me auxiliar na revisão deste trabalho.

À minha equipe de trabalho na Bioensaios pela compreensão.

As queridas amigas e companheiras de sala Sabrina e Helena por toda força, incentivo, envio de arquivos por *e-mail*... Valeu meninas!

À minha amigona Patrícia Carneiro por todo incentivo sempre.

À minhas tias Beatriz e Sirlei Machado pela torcida.

À minha mana Simone e ao meu cunhado Vanderlei por toda força nas digitações, mesmo na madrugada e nos finais de semana. Vocês foram muito importantes neste trabalho.

Aos meus pais por todo incentivo sempre. Ao meu pai que foi o grande idealizador deste mestrado e à minha mãe por toda força e companheirismo. Obrigado a vocês pela torcida!

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA .....</b>	<b>5</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>6</b>
<b>SUMÁRIO .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>14</b>
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	<b>15</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS.....</b>	<b>16</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>18</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>19</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Toxinas de cianobactérias .....</b>	<b>23</b>
3.1.1. Hepatotoxinas.....	24
3.1.2. Métodos para determinação de microcistinas .....	25
<b>3.2. Espectrometria de massas.....</b>	<b>26</b>
3.2.1. Princípios da técnica.....	26
3.2.2. Fontes de íons .....	28
3.2.2.1. Ionização por eletronebulização (ESI, do inglês <i>Electrospray</i> ) .....	28
3.2.3. Tipos de espectrômetro de massas.....	29
3.2.3.1. Analisadores de massa Quadripolar.....	30
3.2.4. Espectrometria de massas seqüencial (MS/MS) .....	30
<b>3.3. Validação de métodos analíticos.....</b>	<b>32</b>
3.3.1. Especificidade e seletividade.....	33
3.3.2. Linearidade .....	33
3.3.3. Exatidão .....	34
3.3.3.1. Recuperação.....	34
3.3.3.2. Repetitividade .....	35

3.3.3.3. Reprodutibilidade .....	36
3.3.4. Limite de detecção do equipamento (LODE).....	36
3.3.5. Limite de detecção do método (LOD).....	36
3.3.6. Limite de quantificação (LOQ) .....	37
3.3.7. Incerteza da medição (U).....	37
<b>3.4. Remoção de cianotoxinas nas estações de tratamento de água .....</b>	<b>37</b>
3.4.1. Ozonização .....	39
3.4.1.1. Ação do ozônio na oxidação de microcistinas .....	41
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1. Reagentes e materiais .....</b>	<b>42</b>
<b>4.2. Instrumentação.....</b>	<b>43</b>
<b>4.3. Substância de referência.....</b>	<b>43</b>
4.3.1. Preparação das soluções .....	43
4.3.1.1. Soluções estoque de MC-LR .....	43
4.3.1.2. Soluções de calibração de MC-LR.....	44
4.3.1.3. Soluções de MC-LR preparadas para ozonização .....	44
<b>4.4. Preparação da amostra.....</b>	<b>45</b>
<b>4.5. Análise de MC-LR.....</b>	<b>45</b>
4.5.1. Otimização do analito .....	46
4.5.2. Parâmetros da fonte de íons.....	47
4.5.3. Otimização das condições cromatográficas.....	47
4.5.3.1. Estudo da fase móvel .....	47
4.5.3.2. Coluna cromatográfica .....	48
<b>4.6. Validação do método de determinação de MC-LR .....</b>	<b>49</b>
4.6.1. Procedimento geral.....	49
4.6.2. Especificidade e seletividade.....	50
4.6.3. Linearidade .....	51
4.6.4. Limite de detecção do equipamento (LODE).....	51
4.6.5. Limite de detecção do método (LOD).....	51
4.6.6. Limite de quantificação (LOQ) .....	52
4.6.7. Exatidão .....	52
4.6.7.1. Recuperação, repetitividade e reprodutibilidade.....	52
4.6.8. Incerteza da medição (U).....	53

<b>4.7. Tratamento das amostras por ozonização.....</b>	<b>53</b>
4.7.1. Ensaio 1 .....	56
4.7.2. Ensaio 2 .....	56
4.7.3. Ensaio 3 .....	56
4.7.4. Ensaio 4 .....	56
4.7.5. Ensaio 5 .....	57
4.7.6. Ensaio 6 .....	58
4.7.7. Ensaio 7 .....	59
4.7.8. Ensaio 8 .....	60
4.7.9. Ensaio 9 .....	60
4.7.10. Ensaio 10 .....	61
4.7.10.1. Preparo da solução tampão pH 2 .....	62
4.7.11. Determinação da concentração de ozônio nas soluções.....	62
<b>4.8. Determinação da cinética da reação entre MC-LR e o ozônio .....</b>	<b>62</b>
<b>4.9. Determinação de parâmetros de qualidade da água .....</b>	<b>64</b>
4.9.1. pH .....	64
4.9.2. Condutividade .....	64
4.9.3. Absorbância de luz ultravioleta em 254 nm (UV 254 nm) .....	64
<b>4.10. Cálculos de determinação da concentração de MC-LR.....</b>	<b>65</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>66</b>
<b>5.1. Condições do sistema LC- MS/MS.....</b>	<b>66</b>
5.1.1. Otimização do analito .....	66
5.1.2. Otimização das condições cromatográficas.....	69
5.1.2.1. Estudo da fase móvel .....	69
5.1.2.2. Coluna cromatográfica.....	70
<b>5.2. Validação do método de determinação de MC-LR .....</b>	<b>75</b>
5.2.1. Especificidade e seletividade .....	75
5.2.2. Linearidade .....	75
5.2.3. Limite de detecção do equipamento (LODE).....	78
5.2.4. Limite de detecção do método (LOD) e de quantificação (LOQ).....	79
5.2.5. Exatidão .....	79
5.2.5.1. Recuperação, repetitividade e reprodutibilidade .....	79
5.2.6. Incerteza da medição (U).....	80
<b>5.3. Tratamento das amostras por ozonização.....</b>	<b>84</b>

<b>5.4. Testes com amostra real .....</b>	<b>91</b>
5.4.1. Avaliação da toxicidade .....	93
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>95</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>97</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Estrutura geral de microcistinas.....	25
Figura 3.2. Componentes de um espectrômetro de massas..	26
Figura 3.3. Dispositivo para ionização por eletronebulização..	29
Figura 3.4. Analisador de massas quadriolar.....	31
Figura 3.5. Esquema do sistema de ESI-MS/MS.....	32
Figura 3.6. Reatividade do ozônio em solução aquosa.....	39
Figura 3.7. Proposta de sítios de ataque do ozônio para molécula de MC-LR.....	41
Figura 4.1. Fluxograma do procedimento de preparação de amostras de águas para análise de MC-LR.....	46
Figura 4.2. Sistema de tratamento das amostras (soluções de MC-LR em água ultrapura) por ozonização utilizando ar/O <sub>3</sub> ..	54
Figura 4.3. Sistema de ozonização de água ultrapura utilizando O <sub>2</sub> /O <sub>3</sub> sob resfriamento em banho de gelo a aproximadamente 4 °C....	55
Figura 5.1. Espectro de massas de MC-LR (1 mg L <sup>-1</sup> ) obtido em modo “Q1 Scan”, com ionização positiva (A) e negativa (B).....	67
Figura 5.2. Espectro de massas de MC-LR (1 mg L <sup>-1</sup> ) obtido em modo MS/MS onde é possível verificar as fragmentações de maior intensidade (m/z 135 e 40).....	68
Figura 5.3. Representação gráfica da otimização da fase móvel utilizando acetonitrila e metanol como componentes orgânico e cetato de amônio (ACNH <sub>4</sub> ) e ácido fórmico (AcF) como aditivos.....	70
Figura 5.4. Cromatogramas de análise de MC-LR utilizando-se como componentes da fase móvel acetonitrila (A) e metanol (B) juntamente com água, ambos com 2mM de acetato de amônio e 0,1% de ácido fórmico.....	71
Figura 5.5. Cromatogramas de análise de soluções de MC-LR na concentração de 0,1 mg L <sup>-1</sup> utilizando coluna de 50 mm x 2mm (A) e coluna de 150 mm x 4,6 mm (B).....	73
Figura 5.6. Cromatogramas de análise de soluções de MC-LR na concentração de 0,5 mg L <sup>-1</sup> utilizando coluna de 50 mm x 2 mm (A) e coluna de 150 mm x 4,6 mm (B).....	74

Figura 5.7. Cromatograma de análise do branco de matriz, água potável indicando as duas fragmentações monitoradas (135,3 e 70,1).....	76
Figura 5.8. Cromatograma de análise do branco de matriz, água superficial indicando as duas fragmentações monitoradas (135,3 e 70,1)..	77
Figura 5.9. Cromatograma de padrão de MC-LR, equivalente ao primeiro nível de calibração (0,05 mg L <sup>-1</sup> ), onde é verificada a fragmentação de quantificação (m/z 135,3).....	78
Figura 5.10. Cromatograma de análise do primeiro nível de fortificação com MC-LR (0,1 µg L <sup>-1</sup> ) (A) e do último nível de fortificação (0,1 µg L <sup>-1</sup> ) (B)..	81
Figura 5.11. Decréscimo da concentração de MC-LR através da reação com ozônio (0,3 mg L <sup>-1</sup> ), durante 15 e 60 min.....	85
Figura 5.12. Cinética para determinação da constante de pseudo primeira-ordem (coeficiente angular) para reação de MC-LR com ozônio.....	86
Figura 5.13. Percentual de remoção de MC-LR em diferentes concentrações para mesma dose de ozônio.....	87
Figura 5.14. Percentual de remoção de MC-LR nas concentrações de 0,1 e 0,25 mg L <sup>-1</sup> ) para diferentes doses de ozônio.....	88
Figura 5.15. Percentual de remoção de MC-LR (0,25 mg L <sup>-1</sup> ) utilizando-se soluções ozonizadas em pH natural (pH 5) e pH 2 para diferentes doses de ozônio.....	89
Figura 5.16. Percentual de remoção de MC-LR em amostra real (0,1 mg L <sup>-1</sup> ) e amostra sintética (0,03 mg L <sup>-1</sup> ).....	92
Figura 5.17. Resultados do tratamento da amostra de água superficial com ozônio com destaque para o valor de referência (1 µg L <sup>-1</sup> ) estabelecido pela legislação.....	93
Figura 5.18. Cromatogramas de análises da amostra de água superficial, sem ozonização (A), ozonizada com 1,66 mg L <sup>-1</sup> de O <sup>3</sup> (B) e 4,16 mg L <sup>-1</sup> de O <sup>3</sup> (C).....	94

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Condições para o gradiente de eluição.....	48
Tabela 5.1. Parâmetros otimizados do DP (Potencial de Orifício), CE (Energia de Colisão) e CXP (potencial de Saída da Cella de Colisão), para as transições monitoradas em modo MRM.....	68
Tabela 5.2. Valores da equação da reta obtidos através da regressão linear para os quatro experimentos de validação. ....	75
Tabela 5.3. Resultados da relação/ruído (s/r) para MC-LR, 0,07 µg L <sup>-1</sup> , em LC-MS/MS.....	79
Tabela 5.4. Resultados para os limites detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para MC-LR.....	79
Tabela 5.5. Dados de recuperação e repetitividade (C.V. %) para os experimentos 1 a 3. ....	82
Tabela 5.6. Dados obtidos para experimento 4, com recuperação (%), C.V. % e avaliação do efeito matriz (brancos). ....	83
Tabela 5.7. Resultados para a incerteza da medição (U). ....	83
Tabela 5.8. Resumo dos resultados da validação. ....	84
Tabela 5.9. Resumo dos resultados do tratamento das soluções de MC-LR com ozônio gasoso na concentração constante de 0,3 mg L <sup>-1</sup> .....	90
Tabela 5.10. Resumo dos resultados do tratamento das soluções de MC-LR com solução estoque ozônio (diferentes doses) em água ultrapura.....	90
Tabela 5.11. Resumo dos resultados do tratamento de amostra de água superficial contendo MC-LR. ....	91

## LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1. Principais métodos analíticos para determinação de microcistinas. ....	27
Quadro 3.2. Fontes de íons para espectrometria de massas e seus respectivos agentes ionizantes. ....	29
Quadro 3.3. métodos de remoção de microcistinas da água já investigados. ....	39

## LISTA DE SÍMBOLOS

APCI	Ionização química a pressão atmosférica, do inglês <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
C	Concentração
C <sub>18</sub>	Octadecilsilano
CE	Energia de colisão
CI	Ionização Química, do inglês <i>Chemical Ionization</i>
CID	Dissociação induzida por colisão, do inglês <i>Collision-induced dissociation</i>
CXP	Potencial da cela de colisão
dc	Corrente contínua
DP	Potencial do orifício
EI	Impacto de elétrons, do inglês <i>Electron Impact</i>
ELISA	Ensaio Imunoenzimático, do inglês <i>Enzimed-linked immunosorbent assay</i>
Eo	Potencial padrão de redução
ESI	Ionização por eletronebulização, do inglês <i>Electrospray Ionization</i>
FAB	Bombardeio com átomos rápidos, do inglês <i>Fast atom bombardment</i>
FD	Dessorção por campo, do inglês <i>Field Desorption</i>
FI	Ionização por campo, do inglês <i>Field Ionization</i>
FTMS	Espectrometria de massas com transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier Transform Mass Spectrometry</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas Seqüencial, do inglês <i>Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry</i>
MALDI	Dessorção/ionização com laser auxiliada por matriz, do inglês <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>
MC-LR	Microcistina-Leucina-Arginina
MRM	Monitoramento de reações múltiplas, do inglês <i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	Espectrometria de massas, do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
PD	Dessorção por plasma, do inglês <i>Plasma Desorption</i>
Q	Quadrupolo

rf	Potencial de radiofrequência
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida
TDI	Ingestão diária aceitável, do inglês <i>Tolerable Daily Intake</i>
TOF	Medida de tempo de voo, do inglês <i>Time of Flight</i>

## RESUMO

MACHADO, Andrea Ferreira. **Ozonização no tratamento da água para remoção de microcistina-LR e validação do método de análise por LC-MS/MS**. Porto Alegre. 2008. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

As microcistinas (MCs) são toxinas de cianobactérias caracterizadas como hepatotóxicas, que apresentam uma ação de intoxicação que pode causar a morte num intervalo de poucas horas a poucos dias. Dentre as MCs cabe destacar a microcistina-LR (MC-LR) por ser a mais tóxica e mais comum. Este trabalho teve como objetivos avaliar o decréscimo da quantidade da MC-LR em amostras aquosas sintéticas e reais utilizando tratamento por ozonização, bem como otimizar e validar o método de determinação dessa microcistina por LC-MS/MS. A linearidade foi obtida através da curva de calibração ( $0,05 - 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), obtendo-se bons resultados,  $r^2 > 0,99$ . A repetitividade e a reprodutibilidade foram obtidas através de fortificação de amostras de branco em dias diferentes e tiveram resultados satisfatórios ( $\text{CV } \% < 20$ ). Os Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) atenderam o padrão estabelecido na legislação ( $< 1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ). A análise utilizando LC-MS/MS no modo MRM (monitorando duas fragmentações), comprova a especificidade e seletividade do método. Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que a ozonização foi efetiva para remoção de MC-LR em níveis mais altos do que os comumente encontrados em águas de abastecimento público, sendo capaz de remover totalmente a toxina da água até níveis abaixo do padrão de potabilidade estabelecido pela legislação. O tratamento com concentração constante de ozônio foi capaz de remover 87,7 % da toxina em 60 min de reação. O ensaio com dosagem de solução estoque de ozônio, necessitou de uma dose de  $0,09 \text{ mg L}^{-1}$  do oxidante para remoção total  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de MC-LR, já a amostra de água superficial contendo  $0,03 \text{ mg L}^{-1}$  de MC-LR requereu uma dose de ozônio de  $6,00 \text{ mg L}^{-1}$ . Nesse ensaio foi possível concluir que componentes presentes na matriz, como a matéria orgânica, também reagiram com ozônio sendo necessário doses maiores para remoção da MC-LR.

Palavras-Chaves: LC-MS/MS, microcistina-LR, ozonização, tratamento da água.

## ABSTRACT

MACHADO, Andrea Ferreira. **Ozonation in the water treatment for removal of microcystin-LR and method analysis validation by LC-MS/MS.** Porto Alegre. 2008. Master Thesis. Pos-Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

The microcystins (MCs) are toxins from cyanobacteria characterized as hepatotoxins, which present an action of poisoning that can cause death in few hours and few days. Among MCs the microcystin-LR (MC-LR) is known the most toxic and common. The aim this study was to evaluate the decrease of the concentration of MC-LR in samples of water by using ozonation and to optimize and to validate the method for MC-LR determination in water by LC-MS/MS. The linearity was obtained through the calibration curve ( $0.05 - 0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) with good results,  $r^2 > 0.99$ . The repeatability and reproducibility were obtained by spike of blank samples in different days and had satisfactory results ( $\text{CV}\% < 20$ ). The detection limit (LOD) and the quantification limit (LOQ) attended the established by legislation ( $< 1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ). The analysis using LC-MS/MS in MRM mode (monitoring two fragments), demonstrates the specificity and selectivity of the method, together with the absence of the effect matrix for drinking water and surface water. The results of this work showed ozonation was effective for removing MC-LR at levels greater than those likely to be found in drinking water, and it is able to remove the toxin from water until levels below established by legislation. The treatment with steady concentration of ozone was able to remove 87.7% of the toxin in 60 minutes of reaction. A solution of MC-LR of  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  needed a dose of  $0.09 \text{ mg L}^{-1}$  of stock solution of ozone for total removal of the toxin, the sample of surface water containing  $0.03 \text{ mg L}^{-1}$  of MC-LR requested a dose of ozone of  $6.00 \text{ mg L}^{-1}$ . It was possible to conclude that components present in the matrix, such as organic matter, also reacted with ozone being required higher doses for removal of MC-LR.

Key words: LC-MS/MS, microcystin-LR, ozonation, water treatment.

## 1. INTRODUÇÃO

As atividades humanas levam a usos múltiplos dos recursos hídricos tais como: abastecimento público, irrigação, uso industrial, navegação, recreação e aqüicultura. Embora essas atividades variem de acordo com a população na bacia de drenagem e com a organização econômica e social da região, essas atividades geram impactos e deterioração da qualidade da água, assim como interferem na quantidade de água disponível (Brasil,2003).

Uma das conseqüências dos impactos antrópicos nos ecossistemas aquáticos, é a ocorrência de acelerados processos de eutrofização, causando um enriquecimento artificial desses ecossistemas pelo aumento das concentrações de nutrientes na água, principalmente compostos nitrogenados e fosfatados, que resulta num aumento dos processos naturais da produção biológica em rios, lagos e reservatórios. As cianobactérias representam um dos grupos fitoplantônicos que assimilam estes nutrientes do meio aquático.

A principal preocupação com o aumento da ocorrência de florações de cianobactérias em mananciais de abastecimento de água é a capacidade desses microorganismos produzirem e liberarem para o meio líquido toxinas (cianotoxinas) que podem afetar a saúde humana, tanto pela ingestão de água como por contato em atividades de recreação no ambiente, ou ainda pelo consumo de pescado contaminado. Entretanto, a principal via de intoxicação é pelo consumo oral da água sem tratamento adequado para remoção dessas toxinas.

O tipo mais comum de intoxicação envolvendo cianobactérias é ocasionado por hepatotoxinas, que apresentam uma ação de intoxicação que pode causar a morte num intervalo de poucas horas e poucos dias (Carmichael, 1994).

As microcistinas são potentes hepatotoxinas produzidas pela espécie *Microcystis Anabaena*, a qual ocorre largamente em águas doces e salinas causando intermitente envenenamento de animais silvestres e domésticos e de peixes (Yuan *et al.*, 2006).

Em função do seu potencial risco à saúde humana, os tratamentos aplicados na água para abastecimento público devem ser capazes de remover as cianotoxinas de forma eficiente, sem gerar subprodutos indesejáveis, ou seja, substâncias tão nocivas quanto às próprias toxinas (Brasil,2003).

O ozônio representa o mais potente agente oxidante para remoção de microcistinas da água, onde doses relativamente baixas podem resultar na remoção total dessas toxinas (Hall *et al.*, 2000). Um dos ataques do ozônio na molécula de microcistina ocorre em um dos aminoácidos Adda (ácido 3-amino-9-metóxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienóico) da molécula, sugerindo que após o tratamento com ozônio a toxicidade das microcistinas diminui (Onstad *et al.*, 2007), já que esta é a parte da cadeia que contribui para este efeito tóxico. O ozônio também parece não contribuir para que a oxidação da molécula gere subprodutos de reação tão tóxicos quanto as próprias microcistinas (Brooke *et al.*, 2006).

Técnicas analíticas altamente sensíveis e seletivas são necessárias na determinação de microcistinas em águas. A técnica de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas seqüencial (LC/MS/MS, do inglês *Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*) mostra-se altamente confiável e capaz de atingir níveis de detecção baixos suficientes para atender o valor máximo aceitável para microcistinas ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ), adotado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e incorporado no adendo das Normas para Qualidade da Água tratada revisado em 2004 (Portaria N° 518, 2004).

Assumindo-se que a qualidade da água é um dos fatores limitantes para desenvolvimento social e econômico do país, garantir de forma segura e confiável, a qualidade da água em mananciais e nos sistemas de abastecimento público, é de grande importância.

## 2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Avaliar o decréscimo da concentração de microcistina-LR (MC-LR) em amostras reais (água superficial) e sintéticas de águas, utilizando o tratamento por ozonização. Verificando os percentuais de remoção da MC-LR no tratamento com ozônio gasoso diretamente nas amostras e com dosagem utilizando solução estoque de ozônio. Serão também avaliados os parâmetros: tempo de reação, dose do ozônio, influência do pH da solução ozonizada e de parâmetros de qualidade da água;

Objetivos específicos:

- Otimizar o método de determinação da MC-LR por LC-MS/MS para os parâmetros: coluna cromatográfica, composição da fase móvel e aditivo da fase móvel, com o propósito de obter-se a melhor sensibilidade na análise da microcistina;
- Validar o método de determinação da MC-LR segundo a DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2007) e 2002/657/EC (European Communities, 2002), avaliando os parâmetros: especificidade e seletividade, linearidade, repetitividade, reprodutibilidade, limite de detecção, limite de quantificação e incerteza da medição.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Toxinas de cianobactérias**

Vários gêneros de cianobactérias que formam florações produzem toxinas. As toxinas de cianobactérias, que são conhecidas como cianotoxinas, constituem uma grande fonte de produtos naturais tóxicos produzidos por esses microorganismos (Brasil, 2003).

Algumas dessas toxinas, que são caracterizadas por sua ação rápida, causando a morte de mamíferos por parada respiratória após poucos minutos de exposição, têm sido identificadas como alcalóides ou organofosforados neurotóxicos. Outras atuam menos rapidamente e são identificadas como peptídeos ou alcalóides hepatotóxicos.

De acordo com suas estruturas químicas, as cianotoxinas podem ser incluídas em três grandes grupos: os peptídeos cíclicos, os alcalóides e os lipossacarídeos. Entretanto, por sua ação farmacológica, as duas principais classes de cianotoxinas até agora caracterizadas são: neurotoxinas e hepatotoxinas. São conhecidos três diferentes tipos de neurotoxinas: Anatoxina-a, Anatoxina-a(s) e Saxitoxinas e três tipos de hepatotoxinas: Nodularinas, Cilindrospermopsina e Microcistinas.

Será descrito com maior detalhamento as hepatotoxinas, microcistinas, já que estas são as cianotoxinas estudadas neste trabalho.

### 3.1.1. Hepatotoxinas

O tipo mais comum de intoxicação envolvendo cianobactérias é ocasionado por hepatotoxinas, que apresentam uma ação mais lenta, podendo causar a morte num intervalo de poucas horas a poucos dias (Carmichael, 1994).

As microcistinas são potentes hepatotoxinas produzidas pela espécie *Microcystis Anabaena*, a qual ocorre largamente em águas doces e salinas, causando intermitente envenenamento de animais silvestres e domésticos e de peixes (Yuan *et al.*, 2006), incluindo casos de exposição humana (Soares *et al.*, 2006), como ocorrido na cidade de Caruaru, Brasil em 1996. Nessa ocasião ocorreu a morte de 76 pacientes de dois centros de hemodiálises, onde 52 dessas mortes tiveram como causa comprovada as hepatotoxinas cíclicas, microcistinas.

A estrutura das microcistinas consiste em sete aminoácidos que formam um peptídeo cíclico (Dahlmann *et al.*, 2003). A nomenclatura das microcistinas foi proposta por Carmichael *et al.* (1998). Inicialmente apenas as variações qualitativas observadas em seus dois L aminoácidos foram usadas para designar as diferentes microcistinas, por exemplo: microcistina-LR (leucina-arginina), microcistina-RR (arginina-arginina), microcistina-YA (tirosina-alanina), microcistina-YR (tirosina-arginina) e microcistina-LA (leucina-alanina).

A Figura 3.1. apresenta a estrutura geral das microcistinas, onde X e Y são dois L aminoácidos variáveis. As variações estruturais destas toxinas são indicadas por abreviações do tipo: MC-LR contendo Leucina (L) na posição 2 e Arginina (A) na posição 4. Adda, é o ácido 3-amino-9-metóxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienóico, que está também presente nas nodularinas e foi determinado como um dos responsáveis pela atividade biológica dessas hepatotoxinas. Já se tem conhecimento de mais de 80 microcistinas (Dahlmann e Luckas, 2005), mas diferenças no grau de metilação dos aminoácidos, bem como variáveis isoméricas no aminoácido Adda, passaram também a serem usados na classificação destas hepatotoxinas.

Baseado em estudos de toxicidade oral em níveis subcrônicos, realizados com camundongos e com porcos, foi estabelecida como ingestão diária aceitável (“tolerable daily intake” – TDI), para microcistina-LR, o valor de  $0,04 \mu\text{g Kg}^{-1}$  de peso corpóreo (Chorus *et al.*, 1999).

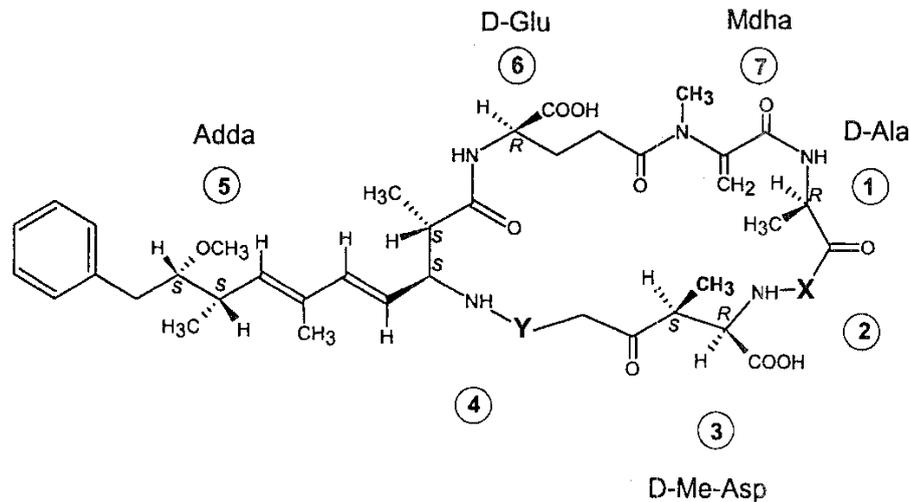


Figura 3.1. Estrutura geral de microcistinas. (Dahlmann *et al.*, 2003).

A partir desse valor um limite máximo aceitável de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de microcistinas em água de consumo humano foi adotado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (“Guideline for Drinking Water Quality”, WHO – 1998) e incorporado no adendo das Normas para Qualidade da Água Tratada revisado em 2004 (Portaria N° 518, 2004).

### 3.1.2. Métodos para determinação de microcistinas

Várias técnicas têm sido desenvolvidas para análise de microcistinas em cianobactérias e na água. Esses métodos incluem: Ensaio Imunoenzimático (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*), inibição de proteína fosfatase, cromatografia líquida e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (Yuan *et al.*, 2006).

O Quadro 3.1. apresenta os principais métodos utilizados para análise de microcistinas. A técnica de espectrometria de massas mostra-se capaz de atingir

limites de detecção bastante baixos para microcistinas atendendo o limite estabelecido na Portaria 518 (2004), essa foi uma das razões para escolha dessa técnica para o desenvolvimento deste trabalho.

## 3.2. Espectrometria de massas

### 3.2.1. Princípios da técnica

A espectrometria de massas (MS), dentre todas as ferramentas analíticas disponíveis, é talvez a de mais ampla aplicabilidade (Skoog *et al.*, 2002), no sentido que a técnica é capaz de fornecer informação sobre:

- A composição elementar de amostras;
- As estruturas de moléculas inorgânicas, orgânicas e biológicas;
- A composição qualitativa e quantitativa de misturas complexas;
- A estrutura e a composição de superfícies sólidas;
- As razões isotópicas de átomos nas amostras.

A Figura abaixo apresenta um desenho esquemático de um espectrômetro de massas.

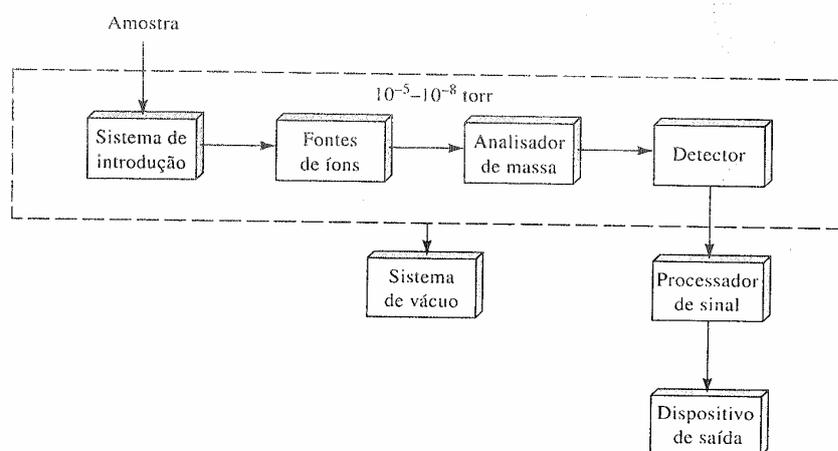


Figura 3.2. Componentes de um espectrômetro de massas (Skoog *et al.*, 2002).

Quadro 3.1. Principais métodos analíticos para determinação de microcistinas.

Princípio da técnica	HPLC			CE	Método MMPB	ELISA	Inibição Fosfatase
	Detecção UV	Detecção DAD	Detecção MS				
	Separção por HPLC com detecção UV em 240 nm.	Separção por HPLC com DAD com espectro UV dos analitos.	Separção por HPLC com MS ou MS/MS.	Separção por CE com DAD ou UV.	Oxidação de microcistinas onde, Adda é convertida a MMPB, sendo a determinação por GC ou GC/MS.	Determinação através do grau de interação das toxinas com anticorpos.	Determinação através do grau de inibição enzimática (desfosforilação do substrato).
O que é medido	Determinação individual das toxinas através de padrões analíticos.	Determinação individual das toxinas através de padrões analíticos.	Determinação individual das toxinas através de padrões analíticos.	Determinação individual das toxinas através de padrões analíticos.	Dá a soma total de microcistinas, como equivalente em microcistina-LR, se o padrão analítico da mesma é utilizado.	Dá a soma total de microcistinas, como equivalente em microcistina-LR, se o padrão analítico da mesma é utilizado.	Soma total de microcistinas.
Limite de detecção (LD)	O LOD depende do fator de concentração; É estimado em 1 µg/L para cada toxina se 1 L de amostra é utilizado.	O LOD depende do fator de concentração; É estimado em 1 µg/L para cada toxina se 1 L de amostra é utilizado.	O LOD depende do fator de concentração podendo chegar a 0,1 µg/L para cada toxina com injeção cromatográfica direta da amostra, em um sistema MS/MS.	Não determinado.	0,43 ng de microcistina. Para amostras de água o LOD depende do fator de concentração.	LOD de 0,05 µg/L (sem pré-concentração da amostra).	LOD no ensaios colorimétrico é de aproximadamente 0,3 µg/L (sem pré-concentração da amostra).

Legenda: HPLC = Cromatografia líquida de alta eficiência; UV = Ultravioleta; DAD = Arranjo de Diodos; MS = Espectrometria de massas; CE = Eletroforese capilar; MMPB = Ácido 3-metoxi-2-metil-4-fenil butírico; Adda = ácido 3-amino-9-metóxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienóico; ELISA = *Enzyme linked immunosorbent assay*; GC = cromatografia gasosa. [Fonte: Adaptado de Dahlmann *et al.*, 2005 e Nicholson *et al.*, 2001].

### 3.2.2. Fontes de íons

O ponto de partida para uma análise por espectrometria de massas é a formação de íons gasosos do analito e a finalidade e a utilidade de um método de MS são ditadas pelo processo de ionização. O aparecimento de espectros de massa de uma certa espécie molecular é altamente dependente do método usado para formação de íons. O Quadro 3.2. lista fontes de íons que têm sido usadas em espectrometria de massa molecular. Será descrito detalhadamente o tipo de ionização por eletronebulização (ESI), já que este foi o modo de ionização utilizado no desenvolvimento deste trabalho.

#### 3.2.2.1. Ionização por eletronebulização (ESI, do inglês *Electrospray*)

A ionização por eletronebulização acontece à pressão e temperatura atmosféricas em um dispositivo como é mostrado na Figura 3.3. Uma solução de amostra é bombeada através de uma agulha capilar de aço inoxidável com vazão de alguns microlitros por minuto. A agulha é mantida em vários quilovolts com relação a um eletrodo cilíndrico que circunda a mesma. A nuvem resultante, carregada de finas gotículas, passa então por um capilar de dessolvatação, no qual ocorre a evaporação do solvente e a ligação da carga às moléculas do analito. À medida que as gotículas ficam menores em consequência da evaporação do solvente, suas densidades de carga se tornam maiores e ocorre a dessorção dos íons no gás ambiente.

ESI é bastante sensível e aplica-se a moléculas e macromoléculas ácidas ou básicas de ampla faixa de massas. Uma característica importante da ESI é que ela é facilmente adaptável para introdução direta de amostras de colunas de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e eletroforese capilar.

Quadro 3.2. Fontes de íons para espectrometria de massas e seus respectivos agentes ionizantes.

Fonte de íons	Agente ionizante
Impacto de elétrons (IE)	Elétrons energéticos
Ionização química (CI)	Íons gasosos reativos
Ionização por campo (FI)	Eletrodo com alto potencial
Dessorção por campo (FD)	Eletrodo com alto potencial
Ionização por eletronebulização (ESI)	Campo elétrico elevado
Ionização química a pressão atmosférica (APCI)	Íons gasosos reativos
Dessorção/ionização com <i>laser</i> auxiliada por matriz (MALDI)	Feixe de <i>laser</i>
Dessorção por plasma (PD)	Fragmentos de fissão de $^{252}\text{Cf}$
Bombardeio com átomos rápidos (FAB)	Feixe atômico energético

Fonte: Adaptado de Skoog *et al.*, 2002.

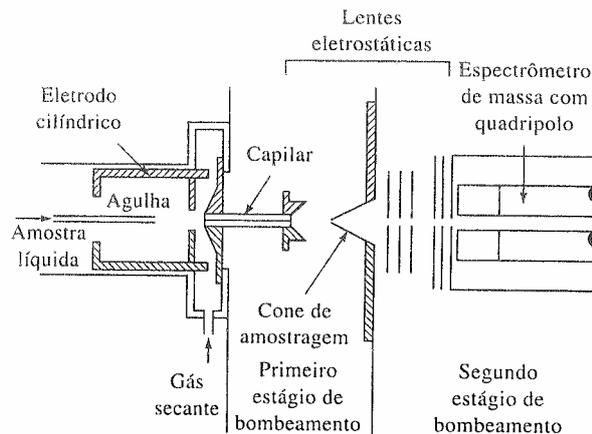


Figura 3.3. Dispositivo para ionização por eletronebulização (Skoog *et al.*, 2002).

### 3.2.3. Tipos de espectrômetro de massas

Vários dispositivos estão disponíveis para separar íons com razões massa/carga ( $m/z$ ), são os analisadores de massas. A seguir são apresentados os analisadores de massa existentes, será descrito detalhadamente o espectrômetro de massas com quadropolos, pois foi o analisador utilizado no desenvolvimento deste trabalho:

- Analisadores com Setor Magnético;

- Instrumentos de dupla focalização;
- Analisadores de massa quadripolares;
- Analisadores de Massa através de Medidas de Tempo de Vôo (TOF, do inglês *Time of Flight*);
- Sistema de aprisionamento de íons;
- Espectrômetros com Transformada de Fourier (FTMS, do inglês *Fourier Transform Mass Spectrometry*).

#### 3.2.3.1. Analisadores de massa Quadripolar

É um espectrômetro mais compacto e mais robusto que outros tipos de espectrômetros de massas, tendo a vantagem de possuir altas velocidades de varredura.

O coração de um instrumento quadripolar (Figura 3.4.) é constituído de quatro hastes cilíndricas paralelas que servem de eletrodos. As hastes opostas estão conectadas eletricamente, um par sendo ligado ao lado positivo de uma fonte de corrente contínua (dc) e o outro par ligado ao terminal negativo. Além disso, são aplicados a cada par de hastes potenciais de radiofrequência (rf) variáveis, que estão 180 graus fora de fase. Para obter o espectro de massa com esse dispositivo, os íons são acelerados, no espaço entre as hastes, por um potencial de 5 a 10 V. Enquanto isso, as voltagens rf e dc nas hastes são aumentadas simultaneamente enquanto sua razão é mantida constante. Em um dado momento, todos os íons, exceto aqueles tendo um valor determinado de massa/carga ( $m/z$ ), atingem as hastes e são convertidos em moléculas neutras. Assim, somente os íons que têm valores de  $m/z$  dentro do intervalo limitado atingem o detector.

#### 3.2.4. Espectrometria de massas seqüencial (MS/MS)

A técnica de MS/MS vem se destacando devido a sua alta especificidade analítica quando utilizada em modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês *Multiple Reaction Monitoring*), no qual os analisadores de massas

quadripolares, Q1 e Q3, selecionam os íons precursores e produto, respectivamente, definindo uma transição de  $m/z$  específica. Neste modo, o segundo quadrupolo (Q2) funciona como uma cela de colisão, onde os íons precursores selecionados de acordo com razões  $m/z$  em Q1, são fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID), após colisão com um gás inerte sob energia específica. Otimizando o detector para tal experimento (MRM), contendo mais de uma transição para o mesmo precursor, gera-se um método confirmatório (Júnior *et al.*, 2006).

Assim sendo, o emprego desta técnica fornece informações referentes à retenção do composto na coluna cromatográfica, às transições monitoradas e ao sinal proporcional à concentração do analito que permitem atingir altos níveis de confiabilidade e sensibilidade.

A espectrometria de massas seqüencial acoplada à cromatografia líquida é representada da seguinte forma: LC-MS/MS (do inglês, *Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*). A Figura 3.5. mostra um esquema do sistema de espectrometria de massas MS/MS utilizando ESI.

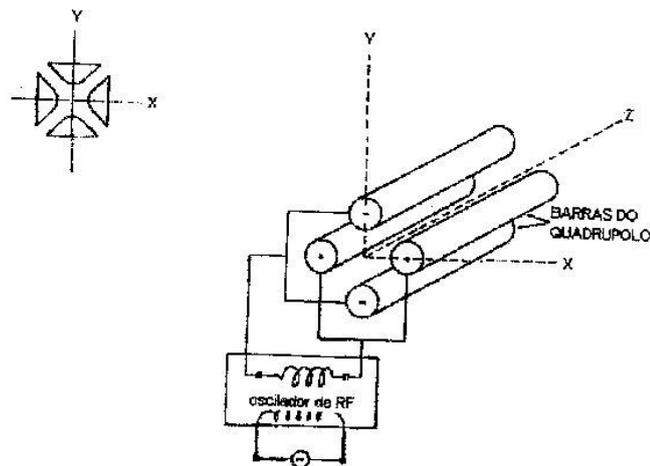


Figura 3.4. Analisador de massas quadrupolar (Adriano, 2002).

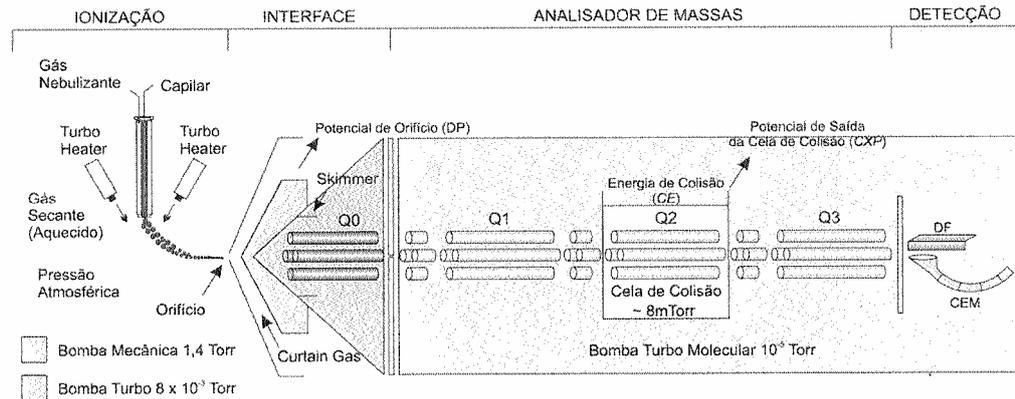


Figura 3.5. Esquema do sistema de ESI-MS/MS (Júnior, 2006).

### 3.3. Validação de métodos analíticos

O desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de método conhecido envolve um processo de avaliação que estime sua eficiência na rotina de laboratório. Esse processo costuma ser denominado de validação (Brito,2003).

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios para demonstrar, por meio de validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida (DOQ-CGCRE-008 - INMETRO, 2007).

A validação do método analítico envolve um procedimento o qual prova que o método fornece resultados esperados com credibilidade, precisão e exatidão adequadas (Lanças, 2004).

Em agosto de 2002, a Comunidade Européia desenvolveu um guia para validação (EC/657/2002) da desempenho de métodos e interpretação de resultados (Allis *et al.*, 2007). Esse guia foi originalmente estabelecido para a identificação e quantificação de resíduos orgânicos e contaminantes em carnes, porém tem sido bastante útil na validação de outros analitos em diferentes matrizes.

Embora não haja consenso sobre quais parâmetros devem ser incluídos em um processo de validação de um método analítico, neste trabalho foram utilizados parâmetros que constam no “Documento de orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos – DOQ-CGCRE-008” (INMETRO, 2007) e na EC/657/2002 (European Commission, 2002), são eles:

### **3.3.1. Especificidade e seletividade**

O termo especificidade, muitas vezes utilizado como sinônimo seletividade, define a capacidade do método em detectar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz. Já a seletividade refere-se à capacidade de detecção de substâncias.

O processo para demonstrar a especificidade e seletividade do método depende do seu objetivo. Em diversas técnicas analíticas (como nas análises cromatográficas, por exemplo) esses parâmetros podem ser estabelecidos pela comparação do resultado obtido com a combinação de vários fatores. Uma das maneiras de se determinar esses parâmetros é fazendo-se uma análise do efeito da matriz através do branco (matriz isenta do analito de interesse), observando-se a presença de picos na região do tempo de retenção do analito de interesse (Lanças, 2004). A seletividade é muitas vezes comprovada pela análise utilizando técnicas auto-cofirmatórias, como por exemplo a espectrometria de massas seqüencial.

### **3.3.2. Linearidade**

A linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real.

A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = ax + b \quad (3.1)$$

Onde:

y = Concentração;

a = Coeficiente angular da curva de calibração;

x = Resposta medida (absorbância, altura, área cromatográfica, etc.);

b = Coeficiente linear da curva de calibração.

A linearidade pode ser calculada a partir da equação de regressão linear, determinada pelos mínimos quadrados. O coeficiente de regressão linear ( $r^2$ ) é freqüentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático. Valores de  $r^2$  iguais ou superiores a 0,99 são recomendados pelo INMETRO (2003).

### 3.3.3. Exatidão

É a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor real. Pode ser determinado através de comparação entre laboratórios, através de materiais de referência, por comparação de resultados de métodos diferentes, analisando a recuperação ou através de ensaios de proficiência.

#### 3.3.3.1. Recuperação

A recuperação é uma medida de eficiência do processo de isolamento do analito de interesse da matriz na qual se encontra presente.

O estudo de recuperação consiste na “fortificação” da matriz, ou seja, na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado. Calcula-se a quantidade percentual recuperada pelo processo usando a seguinte Equação 3.2. (INMETRO, 2007):

$$R\% = \left( \frac{C_2 - C_3}{C_1} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

Onde:

R% = Recuperação percentual;

C<sub>1</sub> = Concentração esperada;

C<sub>2</sub> = Concentração obtida através da análise da amostra fortificada;

C<sub>3</sub> = Concentração obtida através da análise da amostra não fortificada.

Existem muitos critérios para a escolha dos níveis de fortificação e número de réplicas para cada nível. O critério adotado neste trabalho baseia-se na EC/657/2002 (European Communities, 2002) e consiste na análise de um branco de matriz e seis alíquotas fortificadas na faixa de 0,5; 1 e 1,5 vezes o limite máximo permitido para o analito ou um valor abaixo do mesmo (nível de validação). Mais duas alíquotas devem ser fortificadas na faixa de 2 e 5 vezes o limite máximo, cada uma, totalizando 21 amostras. Este procedimento é repetido em três dias diferentes (Experimentos 1, 2 e 3).

Na maioria dos procedimentos analíticos de validação, recuperações dentro da faixa 70 – 120 % são aceitas (ICH,1996), a menos que a faixa desejada seja especificada com outros valores.

#### 3.3.3.2. Repetitividade

É o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurado, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade: mesmo procedimento de medição, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo.

A repetitividade pode ser expressa através do coeficiente de variância (Equação 3.3) obtido através das análises das amostras fortificadas para o ensaio de recuperação.

$$C.V. \% = \frac{R\% \text{ média}}{\text{Desvio padrão}} \times 100 \quad (3.3)$$

Onde:

C.V.% = Coeficiente de variância percentual;

R% = Recuperação percentual.

Para métodos empregados em determinação ao nível de ppb (parte por bilhão), valores de C.V. de até 23 % são aceitáveis (Brito, 2003).

#### 3.3.3.3. Reprodutibilidade

É o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurado, efetuadas sob condições variadas de medição, como por exemplo, a variação do dia de preparação e análise de amostras fortificadas.

A reprodutibilidade pode ser expressa através do coeficiente de variância obtido através das análises das amostras fortificadas para o ensaio de recuperação para cada dia experimental. O critério para o C.V. % é o mesmo da repetitividade.

#### 3.3.4. Limite de detecção do equipamento (LODE)

LODE é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão sinal/ruído do equipamento.

#### 3.3.5. Limite de detecção do método (LOD)

LOD é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. O LOD é determinado por meio de análise completa de uma dada matriz contendo o analito na concentração próximo ou abaixo do mínimo estabelecido em legislações. O LOD para um procedimento analítico pode variar em função do tipo da amostra. É fundamental assegurar-se de que todas as etapas de processamento do método analítico sejam incluídas na determinação desse limite de detecção.

Segundo a EC/657/2007 (European Communities, 2002), para obtenção do LOD plota-se o sinal obtido contra a concentração adicionada (amostras fortificadas). A concentração correspondente ao coeficiente linear da reta mais 2,33 vezes o desvio padrão é igual ao LOD, onde 2,33 é o valor-z (teste de estatística z) com um nível de confiança de 99 %.

### **3.3.6. Limite de quantificação (LOQ)**

LOQ é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. O LOQ é determinado por meio de análise completa de uma dada matriz contendo o analito de interesse (amostras fortificadas).

Segundo a EC/657/2007 (European Communities, 2002), para obtenção do LOQ plota-se o sinal obtido contra a concentração adicionada (amostras fortificadas). A concentração correspondente ao LOD mais 1,64 vezes o desvio padrão do coeficiente linear da reta é igual ao LOQ, onde 1,64 é o valor-z (teste de estatística z) com um nível de confiança de 95 %.

### **3.3.7. Incerteza da medição (U)**

É a incerteza associada a todo procedimento analítico, desde a preparação da amostra até sua análise e quantificação. Para estimativa da incerteza podem ser consideradas as variações associadas à reprodutibilidade e ao efeito da matriz sobre a análise do analito de interesse.

## **3.4. Remoção de cianotoxinas nas estações de tratamento de água**

As cianotoxinas encontram-se predominantemente no interior das células viáveis (sadias) das cianobactérias tóxicas (toxinas intracelulares). Sob condições normais, apenas uma pequena proporção dessas toxinas é liberada pelas células viáveis para a água (toxinas extracelulares). Contudo, quando ocorre o rompimento da célula (*lise*), seja pelo decaimento natural ou pela ação de ruptura das células

exercidas por agentes químicos, como o sulfato de cobre e oxidantes, a toxina intracelular é significativamente liberada para coluna d'água (Yoo *et al.*, 1995).

Um importante aspecto na avaliação do processo de tratamento da água é a remoção eficiente das toxinas intracelulares e as dissolvidas (Jurczak *et al.*, 2005). Esse processo deve garantir que não haja o rompimento das células em função de fatores químicos e mecânicos (Schmidt *et al.*, 2002), fazendo com que as toxinas sejam liberadas para água.

A remoção de cianotoxinas da água também pode ocorrer de forma natural através da ação de bactéria ou luz solar (Shephard *et al.*, 1998), dependendo da concentração presente na água.

A Quadro 3.3. apresenta os principais processos de tratamentos, já investigados, para remoção de microcistinas da água.

Combinações de métodos de remoção, como  $O_3/H_2O_2$  e  $O_3/Fenton$ , também mostram-se eficientes para remoção de cianotoxinas da água (Momani *et al.*, 2008).

O ozônio representa o mais potente agente oxidante para remoção de microcistinas da água, onde doses relativamente baixas podem resultar na remoção de microcistinas abaixo dos limites de detecção (Hall *et al.*, 2000). Por este motivo, o ozônio foi escolhido para o desenvolvimento deste trabalho.

Quadro 3.3. Principais métodos de remoção de microcistinas da água já investigados.

Método de remoção	Tipo de processo	Princípio do método	Concentração de microcistina		Dosagem do agente de remoção	Referência
			Inicial	Final		
Floculação, Coagulação e Filtração	Mecânico	Remoção de biomassa algal	3 mg L <sup>-1</sup>	0,2 mg L <sup>-1</sup>	7 mg L <sup>-1</sup> de coagulante (Al)	Hall <i>et al.</i> (2000)
Carvão ativado	Adsorção	As toxinas são adsorvidas ao material	0,008 mg L <sup>-1</sup>	0,002 mg L <sup>-1</sup>	Não informado	Huang <i>et al.</i> , (2007)
Argila			4,8 mg L <sup>-1</sup>	0,9 mg L <sup>-1</sup>	35 mg de sedimento argiloso (particular < 2 µm)	Holmes <i>et al.</i> (2000)
Dióxido de cloro (ClO <sub>2</sub> )	Oxidação	Reação com ClO <sub>2</sub>	0,01 mg L <sup>-1</sup>	0,003 mg L <sup>-1</sup>	1 mg L <sup>-1</sup>	Kull <i>et al.</i> (2000)
Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )		Reação com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,004 mg L <sup>-1</sup>	0,001 mg L <sup>-1</sup>	10 mg L <sup>-1</sup>	Hall <i>et al.</i> (2000)
Permanganato de potássio (KMnO <sub>4</sub> )		Reação com o KMnO <sub>4</sub>	0,004 mg L <sup>-1</sup>	0,0006 mg L <sup>-1</sup>	10 mg L <sup>-1</sup>	Rodríguez <i>et al.</i> (2007)
Fenton		Reação com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e Fe <sup>2+</sup>	300 µM	Não detectado	15 mM e 1,5 mM Fe <sup>2+</sup>	Gajdek <i>et al.</i> (2001)
Ozonização		Reação com o ozônio	1 mg L <sup>-1</sup>	Não detectado	0,6 mg L <sup>-1</sup>	Momani <i>et al.</i> (2008)

Fe<sup>2+</sup> = Ferro II; Al = Alumínio

### 3.4.1. Ozonização

O ozônio (O<sub>3</sub>) é um agente oxidante poderoso (E<sub>0</sub> = 2,08 V) quando comparado a outros agentes oxidantes conhecidos como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (E<sub>0</sub> = 1,78 V) permitindo que reaja com uma numerosa classe de compostos orgânicos e inorgânicos.

A oxidação de poluentes ou efluentes pode ocorrer de maneira direta ou indireta, conforme mostra a Figura 3.6.

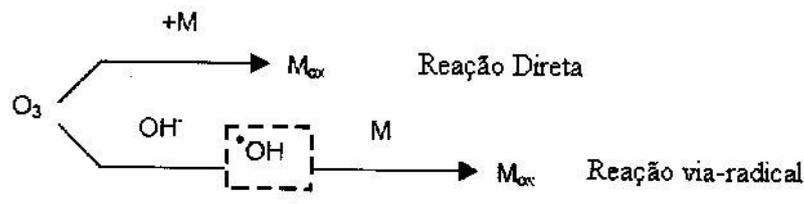


Figura 3.6. Reatividade do ozônio em solução aquosa (Langlais *et al.*, 1991). Onde M é o material a ser oxidado e  $M_{ox}$  é o material oxidado.

A aplicação do ozônio no tratamento da água de abastecimento público é largamente empregada em diversos países (Guten, 2003). Similarmente a outros desinfetantes para o tratamento da água (exemplo: cloro), o ozônio é instável em água e pode reagir com alguns componentes da matriz, dependendo do tipo e do teor de matéria orgânica existente na mesma e da sua alcalinidade (Hoigné, 1994). Em pH alcalino, o processo de ozonização sempre envolve duas reação do ozônio com íons hidroxilas ( $OH^-$ ) com a formação de radicais hidroxila ( $\cdot OH$ ), que são mais poderosos oxidantes que o próprio ozônio.

A ozonização e o carvão ativado são relatados como as melhores opções para remoção de MC-LR (Rodriguez *et al.*, 2007), ao contrário dos tratamentos convencionais de floculação, filtração e cloração.

A maior parte da biomassa algal é removida na coagulação e filtração (Chow *et al.*, 1999), entretanto estudos recentes mediram o transporte de ciotoxinas através do processo de tratamento da água (Jurczak *et al.*, 2005) e verificou-se a presença de traços de microcistinas após a coagulação.

Uma combinação das etapas de tratamento convencional, floculação, sedimentação e filtração seguidos de oxidação com ozônio, mostram-se eficientes para completa remoção de MC-LR (Brooke *et al.*, 2006) em águas naturais fortificadas com  $20 \mu g L^{-1}$  da toxina. O tempo de contato com ozônio foi de 5 min e a dose de  $O_3$  foi de aproximadamente  $1,5 mg L^{-1}$ .

Momani *et al.* (2008) verificaram que concentrações mais baixas de MC-LR requerem doses menores de ozônio em relação a concentrações mais altas da

toxina, para se alcançar sua total remoção. A concentração de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de MC-LR necessitou de  $2,4 \text{ mg L}^{-1}$  de ozônio para sua remoção total, enquanto  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de MC-LR necessitou de  $0,6 \text{ mg L}^{-1}$  do oxidante.

#### 3.4.1.1. Ação do ozônio na oxidação de microcistinas

Em função das várias duplas ligações e dos grupos amino, a MC-LR é facilmente oxidada pelo ozônio (Guten, 2003). Onstad *et al.* (2007) propuseram os sítios de ataque do ozônio para molécula de MC-LR (Figura 3.7.).

Através da Figura 3.7. é possível verificar que um dos ataques do ozônio ocorre na parte Adda da molécula, sugerindo que após o tratamento com ozônio a toxicidade da MC-LR diminui, já que esta parte da cadeia contribui para toxicidade (Onstad *et al.*, 2007).

As estruturas e as propriedades das demais variantes de microcistinas sugerem que o tratamento com  $\text{O}_3$  pode também ser eficiente para remoção dessas toxinas (Hall *et al.*, 2000), como também sugere-se o mesmo para nodularinas, anatoxina, anatoxina(s) e saxitoxinas (Guten, 2003).

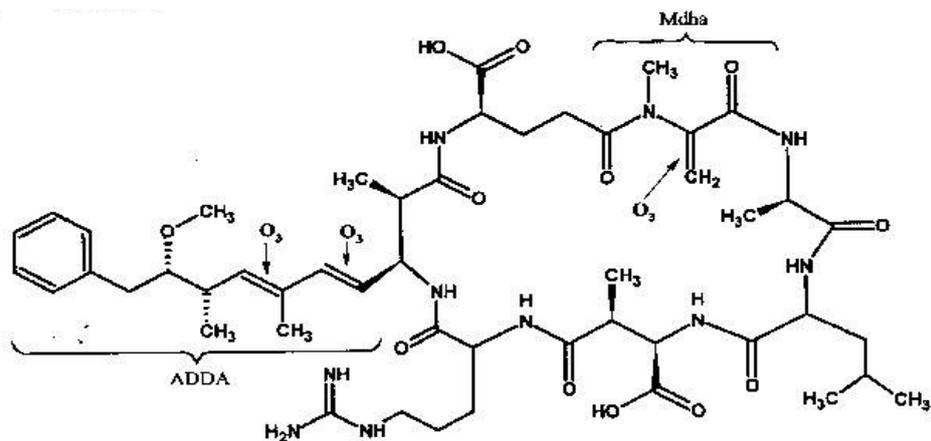


Figura 3.7. Proposta de sítios de ataque do ozônio( $\text{O}_3$ ) para a molécula de MC-LR (Onstad *et al.*, 2007).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento experimental consistiu na otimização e validação do método para análise de microcistina-LR por LC-MS/MS e avaliação do decréscimo da microcistina pelo processo de ozonização.

Os testes com ozônio foram realizados no Laboratório de Química Analítica e Ambiental (LQAMB) da PUCRS. As análises em LC-MS/MS foram realizadas no laboratório Bioensaios Análises e Consultoria Ambiental Ltda.

### 4.1. Reagentes e materiais

- Tiosulfato de sódio p.a.(Quimex);
- Acetato de amônio p.a. (Quimex);
- Formiato de amônio p.a. (Vetec);
- Ácido trifluoroacético (TFA) (J.T Backer);
- Ácido fórmico p.a.(Synth);
- Ácido fosfórico (Quimex);
- Acetonitrila grau HPLC (J.T Backer);
- Metanol grau HPLC (J.T Backer);
- Balões volumétricos de diversos volumes (Brand);
- Pipetadores automáticos (Brand);
- Filtro de fibra de vidro (Millipore);
- Cartuchos de extração em fase sólida – C18 (500 mg / 3mL) (Macherey-Nagel);
- Coluna Luna C18 150 x 4,6 mm; 5 µm (Phenomenex);
- Coluna Luna C18 50 x 2 mm; 3 µm (Phenomenex);
- Nitrogênio 5.0 (Air Liquid);
- Oxigênio 5.0 (Air Liquid).

## 4.2. Instrumentação

- Sistema de purificação de água Milli-Q<sup>®</sup> - resistividade 18,2 M $\Omega$  cm MilliPore<sup>®</sup>;
- Sistema de extração em fase sólida – *Manifold* (Varian);
- Bomba de vácuo (Marconi – MA 057/3);
- Bomba de vácuo (Prismatec – 131 B);
- Espectrofotômetro Micronal, modelo B382;
- Espectrofotômetro Pró-análise, modelo UV-1600;
- Potenciômetro, Denver;
- Condutivímetro, Digimed;
- Protótipo de ozonizador (OZ-Engenharia);
- Bombas de fluxo LC 10Advp (Shimadzu);
- Auto-amostrador Sil-HTC (Shimadzu);
- Desgaseificador de fase móvel DGU-14A (Shimadzu);
- LC-MS/MS 3200 Qtrap (Applied Biosystems).

## 4.3. Substância de referência

O padrão de referência de MC-LR (Lote 017002550001) foi adquirido da Unidade de Pesquisas em Cianobactérias da Fundação Universidade de Rio Grande (FURG). Foram obtidos 500  $\mu\text{g}$  da substância de referência com pureza declarada de 100 %.

### 4.3.1. Preparação das soluções

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se balões volumétricos calibrados.

#### 4.3.1.1. Soluções estoque de MC-LR

- Solução estoque 1 (50,0 mg L<sup>-1</sup>): 500  $\mu\text{g}$  da substância de referência foi dissolvida e avolumada com água ultrapura em balão volumétrico de 10 mL;

- Solução estoque 2 ( $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ ): em balão volumétrico de 5 mL, 500  $\mu\text{L}$  da solução estoque 1 foram diluídos e avolumados com água ultrapura;
- Solução estoque 3 ( $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ): em balão volumétrico de 10 mL, 1 mL da solução estoque 1 foram diluídos e avolumados com água ultrapura.

#### 4.3.1.2. Soluções de calibração de MC-LR

- Solução 1 ( $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ ): em balão volumétrico de 1 mL, 10  $\mu\text{L}$  da solução estoque 2 foram diluídos e avolumados com água ultrapura;
- Solução 2 ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ): em balão volumétrico de 1 mL, 20  $\mu\text{L}$  da solução estoque 2 foram diluídos e avolumados com água ultrapura;
- Solução 3 ( $0,15 \text{ mg L}^{-1}$ ): em balão volumétrico de 1 mL, 30  $\mu\text{L}$  da solução estoque 2 foram diluídos e avolumados com água ultrapura;
- Solução 4 ( $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ): em balão volumétrico de 1 mL, 40  $\mu\text{L}$  da solução estoque 2 foram diluídos e avolumados com água ultrapura;
- Solução 5 ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ): em balão volumétrico de 1 mL, 100  $\mu\text{L}$  da solução estoque 2 foram diluídos e avolumados com água ultrapura.

#### 4.3.1.3. Soluções de MC-LR preparadas para ozonização

##### **Soluções utilizadas nos testes preliminares**

- Solução 1 ( $0,0002 \text{ mg L}^{-1}$ ): em proveta de 500 mL, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da solução estoque 3 foram diluídos e avolumados com água ultrapura;
- Solução 2 ( $0,002 \text{ mg L}^{-1}$ ): em proveta de 500 mL, uma alíquota de 1 mL da solução estoque 3 foram diluídos e avolumados com água ultrapura;

- Solução 3 ( $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ ): em proveta de 500 mL, uma alíquota de 5 mL da solução estoque 3 foram diluídos e avolumados com água ultrapura.

#### **Soluções utilizadas nos ensaios de ozonização**

- Solução de  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ : em balão volumétrico de 5 mL, 500  $\mu\text{L}$  da solução estoque 1 foram diluídos e avolumados com água ultrapura;
- Solução de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ : em balão volumétrico de 1 mL, 20  $\mu\text{L}$  da solução estoque 2 foram diluídos e avolumados com água ultrapura;
- Solução de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ : em balão volumétrico de 1 mL, 100  $\mu\text{L}$  da solução estoque 2 foram diluídos e avolumados com água ultrapura.

#### **4.4. Preparação da amostra**

A técnica de preparação da amostra baseou-se na técnica desenvolvida por Chorus, *et al* (1999), que consiste em extração com solvente orgânico com pré-concentração do extrato em cartuchos de extração em fase sólida. A Figura 4.1 apresenta um fluxograma completo de todo procedimento de preparação das amostras para análise de MC-LR.

Algumas amostras não necessitaram de preparação, sendo analisadas diretamente sem pré-concentração.

#### **4.5. Análise de MC-LR**

As condições analíticas utilizadas foram estabelecidas de acordo com estudos desenvolvidos por Dahlmann e Luckas, 2005. Primeiramente otimizações para os parâmetros cromatográficos e do espectrômetro de massas foram realizadas até a definição do método de análise de MC-LR.

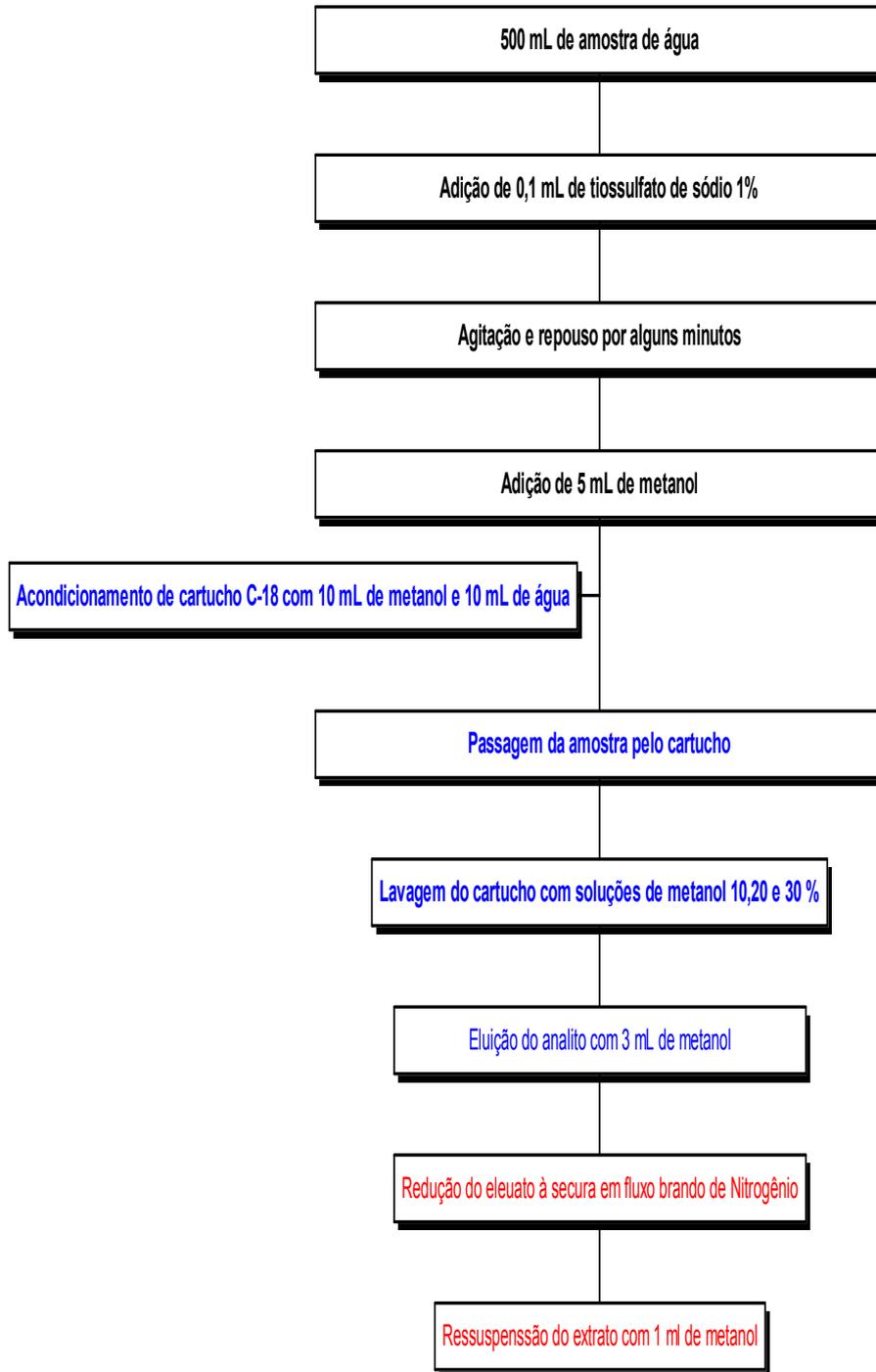


Figura 4.1. Fluxograma do procedimento de preparação de amostras de águas para análise de MC-LR.

#### 4.5.1. Otimização do analito

Uma solução de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  em MC-LR foi preparada em uma mistura de metanol:água (1:1) contendo formiato de amônio 5 mM, esta solução foi utilizada para infusão no espectrômetro de massas a uma vazão de  $10 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$ .

Primeiramente a análise foi realizada no modo *scan* (Q1 MS) para avaliação do modo de ionização de maior sensibilidade (positivo ou negativo). Após, a análise foi feita no modo MS/MS onde foram geradas fragmentações da molécula de MC-LR e as duas transições a serem monitoradas foram selecionadas. Os parâmetros Potencial de Orifício (DP), Energia de Colisão (CE) e Potencial de Saída da Cella de Colisão (CXP) foram otimizados para as transições monitoradas. Um método de MRM foi então criado para quantificação e confirmação de MC-LR.

#### **4.5.2. Parâmetros da fonte de íons**

O espectrômetro foi operado no modo MRM com ionização por eletronebulização, no modo de íons positivos a 450 °C. A voltagem do capilar foi otimizada a 4500 V. Nitrogênio foi utilizado como gás de colisão e gás (“CAD Gas”) de dessolvatação (“Curtain Gas<sup>TM</sup>”) às pressões respectivas de 4,0 e 12,0 psi. Ar sintético foi utilizado como gás nebulizante (“GS 1”) e como gás secante aquecido (“GS 2”), ambos a pressão de 45,0 psi.

#### **4.5.3. Otimização das condições cromatográficas**

##### **4.5.3.1. Estudo da fase móvel**

O estudo da fase móvel envolveu a comparação entre metanol e acetonitrila como componente orgânico da fase e a comparação do uso de ácido fórmico como aditivo da fase juntamente com acetato de amônio. Esse aditivo é adicionado à fase móvel para auxiliar na ionização do analito. Foram comparadas a resposta do instrumento, a resolução cromatográfica e a eficiência na ionização. Os estudos cromatográficos foram realizados utilizando soluções padrão de MC-LR na concentração de 0,05 mg L<sup>-1</sup> (em água ultrapura). O gradiente utilizado nas análises está apresentado na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Condições para o gradiente de eluição.

Tempo (min)	Eluente A: água (%)	Eluente B: acetonitrila ou metanol (%)
0	70	30
3	15	85
5	70	30
7	70	30

Os seguintes testes foram aplicados para verificação da influência do componente orgânico e do aditivo na fase móvel:

- Teste 1: análise em coluna Luna C<sub>18</sub> 150 x 4,6 mm - 5 µm, fluxo 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Componentes da fase móvel: água e acetonitrila (ambos com 2 mM de acetato de amônio);
- Teste 2: análise em coluna Luna C<sub>18</sub> 150 x 4,6 mm - 5 µm, fluxo 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Componentes da fase móvel: água e acetonitrila (ambos com 2 mM de acetato de amônio e 0,1% de ácido fórmico);
- Teste 3: análise em coluna Luna C<sub>18</sub> 150 x 4,6 mm - 5 µm, fluxo 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Componentes da fase móvel: água e metanol (ambos com 2 mM de acetato de amônio e 0,1% de ácido fórmico).

#### 4.5.3.2. Coluna cromatográfica

Visando a redução do tempo de análise, bem como uma melhor resolução cromatográfica, novos testes foram realizados onde duas colunas cromatográficas da marca Phenomenex de diferentes especificações foram testadas:

- Luna C<sub>18</sub> 150 x 4,6 mm; 5 µm;
- Luna C<sub>18</sub> 50 x 2 mm; 3 µm.

Soluções padrão de MC-LR nas concentrações de 0,1 e 0,5 mg L<sup>-1</sup> foram

analisadas nas diferentes colunas cromatográficas. Foram comparadas a resposta do instrumento, e a resolução cromatográfica para as análises de MC-LR de mesma concentração nas duas colunas. A fase móvel utilizada teve em sua composição acetonitrila e água (ambos com 2mM de acetato de amônio e 0,1 % de ácido fórmico), o gradiente de eluição esta descrito na Tabela 4.1. (item 4.5.3.1.) e o fluxo da fase móvel foi de 0,2 mL min<sup>-1</sup> para coluna de 50 mm e 0,5 mL min<sup>-1</sup> para coluna de 150 mm.

#### **4.6. Validação do método de determinação de MC-LR**

Depois da otimização de alguns parâmetros de análise, foi realizada a validação do método determinação de MC-LR em água. A validação incluiu a etapa de preparação da amostra e análise por LC-MS/MS.

O procedimento de validação esta baseado em: DOQ-CGCRE-008 - INMETRO (2007) e Official Journal of the European Communities - Commission Decision 2002/657/EC (2002). Os parâmetros contemplados na validação do método serão descritos a seguir:

##### **4.6.1. Procedimento geral**

Primeiramente foi escolhido um nível de validação (NV), o qual estivesse abaixo do limite máximo estabelecido pela Portaria N° 518 (2004), 1 µg L<sup>-1</sup>. O nível escolhido foi de 0,2 µg L<sup>-1</sup>, a partir desse valor foram estabelecidos mais quatro níveis para fortificação de amostras de água potável adotando-se o seguinte critério:

- Nível 1: 0,5 x NV;
- Nível 2: NV;
- Nível 3: 1,5 x NV;
- Nível 4: 2 x NV;
- Nível 5: 5 x NV.

Definidos os níveis procedeu-se a fortificação das amostras de água, os

testes realizados foram divididos em 4 experimentos.

Experimentos 1 a 3: 21 alíquotas de amostra de água potável foram preparadas e analisadas em 3 diferentes dias, onde uma das alíquotas foi utilizada como branco de amostra e as demais foram fortificadas com padrão analítico de MC-LR da seguinte maneira:

- Nível 1 ( $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ): 50  $\mu\text{L}$  de solução padrão de MC-LR ,  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , foram adicionados em 500 mL de amostra;
- Nível de validação ( $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ): 100  $\mu\text{L}$  de solução padrão de MC-LR,  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , foram adicionados em 500 mL de amostra;
- Nível 3 ( $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ): 150  $\mu\text{L}$  de solução padrão de MC-LR ,  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , foram adicionados em 500 mL de amostra;
- Nível 4 ( $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ ): 200  $\mu\text{L}$  de solução padrão de MC-LR ,  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , foram adicionados em 500 mL de amostra;
- Nível 5 ( $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ): 500  $\mu\text{L}$  de solução padrão de MC-LR ,  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , foram adicionados em 500 mL de amostra.

Experimento 4: 15 alíquotas de amostra de água potável foram preparadas e analisadas, onde 10 foram fortificadas na faixa de  $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$  (nível de validação) e as demais foram utilizadas como branco de amostra. Mais cinco brancos de água superficial foram também analisados.

Todas as amostras fortificadas e brancos de amostra foram homogeneizados e submetidos ao procedimento de extração conforme já descrito na Figura 4.1. do item 4.5.

#### **4.6.2. Especificidade e seletividade**

A seletividade do método foi avaliada através da análise de brancos de matriz (Experimento 4). Amostras de água superficial e de água potável foram preparadas e seus extratos foram analisados para verificação de picos interferentes no mesmo tempo de retenção da MC-LR.

#### **4.6.3. Linearidade**

Cinco soluções de diferentes concentrações foram preparadas com a substância de referência MC-LR para verificação da linearidade. Para cada dia de análise foi construída uma curva de calibração preparando-se soluções de calibração de 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 e 0,50 mg L<sup>-1</sup> (conforme descrito no item 4.3.1.2.). A análise das soluções foi realizada com triplicata de injeção.

#### **4.6.4. Limite detecção do equipamento (LODE)**

Foram analisadas soluções padrão de MC-LR até a obtenção de uma relação sinal/ruído (s/r) de 3 a 5. Após a obtenção da relação desejada, a solução foi analisada em sete injeções cromatográficas e a relação s/r foi determinada para cada injeção.

#### **4.6.5. Limite de detecção do método (LOD)**

O limite detecção do método (LOD) foi obtido através da análise de amostras fortificadas em diferentes níveis, descritos no item 4.6.1., plotando-se o sinal obtido contra a concentração adicionada (amostras fortificadas). A obtenção do valor para o LOD foi dada através da seguinte equação:

$$\text{LOD} = b + 2,33 * s \quad (4.1)$$

Onde:

b = Coeficiente linear das curvas de fortificações obtidas nos Experimentos 1 a 3;

s = Desvio padrão dos coeficientes lineares obtidos nos Experimentos 1 a 3;

“2,33” = valor crítico de *t* de *Student* para um intervalo de confiança de 99%.

#### 4.6.6. Limite de quantificação (LOQ)

O limite quantificação (LOQ) foi obtido através da análise de amostras fortificadas em diferentes níveis, descritos no item 4.6.1., plotando-se o sinal obtido contra a concentração adicionada (amostras fortificadas). A obtenção do valor para o LOQ foi dada através da seguinte equação:

$$\text{LOQ} = b + 2,33 * s + 1,64 * s \quad (4.2)$$

Onde:

b = Coeficiente linear das curvas de fortificações obtidas nos Experimentos 1 a 3;

s = Desvio padrão dos coeficientes lineares obtidos nos Experimentos 1 a 3;

“2,33 e 164” = valores críticos de *t* de *Student* para intervalos de confiança de 99 e 95%, respectivamente.

#### 4.6.7. Exatidão

##### 4.6.7.1. Recuperação, repetitividade e reprodutibilidade

A recuperação percentual (R %) nos Experimentos 1 a 3 foi obtida para cada amostra fortificada através da seguinte equação:

$$R \% = \frac{C_1 \cdot 100}{C_2} \quad (4.3)$$

Onde:

C<sub>1</sub> = Concentração encontrada;

C<sub>2</sub> = Concentração esperada.

A recuperação percentual (R %) no experimento 4 foi obtida para cada amostra fortificada através da seguinte equação:

$$R \% = \left( \frac{C_2 - C_3}{C_1} \right) \times 100 \quad (4.4)$$

Onde:

$C_1$  = Concentração esperada;

$C_2$  = Concentração obtida através da análise da amostra fortificada (branco);

$C_3$  = Concentração obtida através da análise da amostra não fortificada.

A repetitividade e reprodutibilidade foram avaliadas através do coeficiente de variância percentual (C.V. %) obtido para os resultados de cada experimento e entre os experimentos, respectivamente. O C.V. % foi obtido através da seguinte equação:

$$C.V. \% = \frac{R\% \text{ média}}{\text{Desvio padrão}} \times 100 \quad (4.5)$$

#### 4.6.8. Incerteza da medição (U)

Para determinação da incerteza da medição as seguintes variâncias foram somadas: reprodutibilidade (Experimentos 1 a 3) e o efeito matriz (Experimento 4). A equação utilizada para determinação da incerteza da medição é apresentada a seguir:

$$U = 2 \sqrt{s_R^2 + s_{matriz}^2} \quad (4.6)$$

Onde:

$s_R$  = Desvio padrão relativo das recuperações (reprodutibilidade);

$s_{matriz}$  = Desvio padrão relativo dos brancos de amostra (experimento 4).

#### 4.7. Tratamento das amostras por ozonização

Testes preliminares consistiram na ozonização de cerca de 500 mL de solução de MC-LR em água ultrapura, conforme esquema da Figura 4.2. Após 15 min de reação com o ozônio as amostras foram submetidas ao processo de extração de MC-LR conforme já descrito no item 4.4.(Figura 4.1.), sendo as concentrações de MC-LR esperadas nos extratos finais de 0,1; 1,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>.

Na Figura 4.2. o ozonizador foi alimentado com ar ambiente previamente desumificado por passagem em um frasco contendo sílica gel. O  $O_3$  é formado através do método da descarga por efeito corona (Lin *et al.*, 1993).

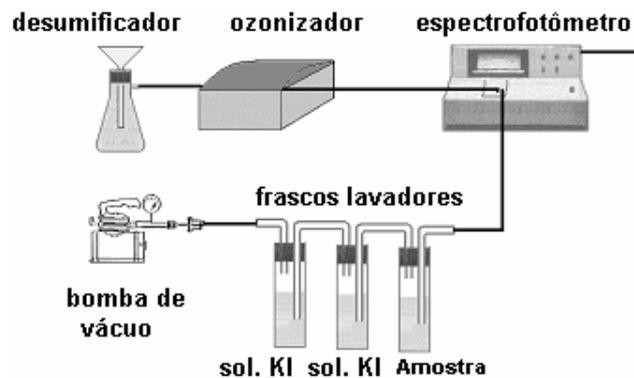


Figura 4.2. Sistema de tratamento das amostras (soluções de MC-LR em água ultrapura) por ozonização utilizando ar/ $O_3$ .

O ozônio gerado foi monitorado espectrofotometricamente (Kunz *et al.*, 1999). Uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico foi adaptada para o sistema em fluxo, fixando-se os tubos de entrada e saída do gás em uma tampa de teflon recoberta com silicone. O tubo de entrada, mais longo, foi posicionado de forma a inserir o fluxo gasoso na parte inferior da cubeta, garantindo seu completo preenchimento. Todas as conexões utilizadas foram de silicone ou polietileno, materiais quimicamente inertes à ação do ozônio.

Dois frascos lavadores, contendo solução de iodeto de potássio 2 %, foram posicionados em série após o frasco com amostra. O segundo frasco atua como um dispositivo de segurança, impedindo que o ozônio eventualmente liberado no primeiro seja emitido diretamente no ambiente. O ozônio foi conduzido pela canalização até o interior dos frascos onde entra em contato com a solução por borbulhamento. O fluxo de ar/ $O_3$  ( $\sim 1 \text{ L min}^{-1}$ ) foi mantido por ação de uma bomba de vácuo conectada no último frasco lavador.

Dois novos métodos foram testados posteriormente, ambos foram realizados utilizando concentrações de MC-LR que não requereram extração e pré-

concentração da amostra. Fluxo de  $O_3/O_2$  foi utilizado nesses ensaios em função da pureza do oxigênio e pelo fato de que a concentração de  $O_3$  é maior em presença desse gás.

O primeiro método consistiu na ozonização direta das soluções de MC-LR com fluxo contínuo de  $O_3/O_2$  e com uma produção de  $29 \text{ mg } O_3 \text{ h}^{-1}$ , utilizando-se um protótipo ozonizador (OZ Engenharia). Este método compreende os Ensaio de 1 a 4 e a concentração de ozônio nas soluções, em pH natural, foi constante durante todo tempo de reação ( $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ ). Diferentes tempos de reação foram testados para comparação com a degradação da MC-LR.

No segundo método a reação de ozônio com a MC-LR foi dada através da dosagem de uma solução estoque de ozônio em soluções de MC-LR. A solução estoque de ozônio foi preparada por dissolução do ozônio gasoso em água ultrapura, sob resfriamento de aproximadamente  $4^\circ\text{C}$  (Figura 4.3.), para maximizar a dissolução do ozônio, com uma produção de  $1 \text{ g } O_3 \text{ h}^{-1}$  e com fluxo contínuo de  $O_3/O_2$ . Esse método compreende os Ensaio de 5 a 10. O ozônio gasoso foi gerado utilizando um protótipo de ozonizador (Trata OZ GHW3). A concentração da solução estoque ozonizada foi determinada por espectrofotometria, conforme será descrito no item 4.7.11. e variou conforme a vazão utilizada na ozonização da água ultrapura.



Figura 4.3. Sistema de ozonização de água ultrapura utilizando  $O_2/O_3$ , sob resfriamento (em banho de gelo) a aproximadamente  $4^\circ\text{C}$ .

#### 4.7.1. Ensaio 1

O primeiro ensaio consistiu no tratamento de 2 mL de soluções de MC-LR de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  com um fluxo contínuo de  $\text{O}_3/\text{O}_2$  durante 15 e 60 min. O excesso de  $\text{O}_3$  foi removido por fluxo brando de nitrogênio durante 5 min. O ensaio foi realizado a uma temperatura de  $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Uma solução de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de água ultrapura, não ozonizada, foi utilizada como controle.

#### 4.7.2. Ensaio 2

No segundo ensaio o tratamento com ozônio foi aplicado em 2 mL de soluções de MC-LR. Três soluções foram preparadas contendo  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de MC-LR em água ultrapura. Cada solução foi ozonizada com um fluxo contínuo de  $\text{O}_3/\text{O}_2$  durante um período de tempo de: 10, 15 e 30 min. O excesso de  $\text{O}_3$  foi removido por fluxo brando de nitrogênio durante 5 min. O ensaio foi realizado a uma temperatura de  $27,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Uma solução de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de água ultrapura, não ozonizada, foi utilizada como controle.

#### 4.7.3. Ensaio 3

O terceiro ensaio também consistiu na ozonização em fluxo contínuo de  $\text{O}_3/\text{O}_2$  de três soluções de MC-LR (2 mL) na concentração de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ , porém estas foram ozonizadas por períodos menores de tempo: 3, 6 e 10 min. O excesso de  $\text{O}_3$  também foi removido por fluxo brando de nitrogênio durante 5 min e uma solução controle foi preparada conforme descrito no Ensaio 2. O ensaio foi realizado a uma temperatura de  $22,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.7.4. Ensaio 4

No quarto ensaio o tratamento com ozônio foi aplicado em 2 mL de soluções contendo  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de MC-LR. Cada solução foi ozonizada com um fluxo de  $\text{O}_3/\text{O}_2$  durante 5 min. O excesso de  $\text{O}_3$  foi removido por fluxo brando de nitrogênio por 5 min. O ensaio foi realizado a uma temperatura de  $21,9 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Soluções de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de MC-LR, não ozonizadas, foram preparadas em água ultrapura, estas foram utilizadas como controle.

#### 4.7.5. Ensaio 5

Cerca de 200 mL de água ultrapura foram ozonizadas durante 20 min utilizando fluxo contínuo de  $\text{O}_3/\text{O}_2$  sendo produzida uma solução de concentração de  $0,17 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$ . Primeiramente soluções de MC-LR na concentração de  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  foram dosadas com a solução ozonizada da seguinte maneira:

- Solução 1: 500  $\mu\text{L}$  de MC-LR, 50  $\mu\text{L}$  de solução ozonizada volume completado com água ultrapura em balão volumétrico de 1 mL ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  MC-LR e  $0,01 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$ );
- Solução 2: 500  $\mu\text{L}$  de MC-LR, 100  $\mu\text{L}$  de solução ozonizada, volume completado com água ultrapura em balão volumétrico de 1 mL ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  MC-LR e  $0,02 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$ );
- Solução 3: 500  $\mu\text{L}$  de MC-LR, 500  $\mu\text{L}$  de solução ozonizada, volume completado com água ultrapura em balão volumétrico de 1 mL ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  MC-LR e  $0,09 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$ );

Soluções de MC-LR na concentração de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  também foram dosadas com a solução ozonizada da seguinte maneira:

- Solução 1: 500  $\mu\text{L}$  de MC-LR, 50  $\mu\text{L}$  de solução ozonizada volume completado com água ultrapura em balão volumétrico de 1 mL ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  MC-LR e  $0,01 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$ );

- Solução 2: 500  $\mu\text{L}$  de MC-LR, 100  $\mu\text{L}$  de solução ozonizada, volume completado com água ultrapura em balão volumétrico de 1 mL ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  MC-LR e  $0,02 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$ );
- Solução 3: 500  $\mu\text{L}$  de MC-LR, 500  $\mu\text{L}$  de solução ozonizada, volume completado com água ultrapura em balão volumétrico de 1 mL ( $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  MC-LR e  $0,09 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$ )

Soluções de  $0,1$  e  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  em MC-LR foram preparadas em água ultrapura, não ozonizada, para ser utilizada como controle.

As soluções ozonizadas permaneceram em reação durante cerca de 3 horas até o momento da análise.

#### 4.7.6. Ensaio 6

Cerca de 200 mL de água ultrapura foram ozonizadas durante 20 min utilizando fluxo contínuo de  $\text{O}_3/\text{O}_2$  sendo produzida uma concentração de  $3,76 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$ . Soluções de MC-LR na concentração de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  foram dosadas com a solução ozonizada da seguinte maneira:

- Solução 1: 1 mL de MC-LR, 25  $\mu\text{L}$  de solução ozonizada, volume completado com água ultrapura em balão volumétrico 2 mL ( $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  MC-LR e  $0,05 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$ );
- Solução 2: 1 mL de MC-LR, 50  $\mu\text{L}$  de solução ozonizada, volume completado com água ultrapura em balão volumétrico 2 mL ( $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  MC-LR e  $0,09 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$ );
- Solução 3: 1 mL de MC-LR, 100  $\mu\text{L}$  de solução ozonizada, volume completado com água ultrapura em balão volumétrico 2 mL ( $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  MC-LR e  $0,19 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$ ).

Uma solução de concentração de  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  em MC-LR foi preparada em água ultrapura, não ozonizada, para ser utilizada como controle.

As soluções ozonizadas permaneceram em reação durante cerca de 3 horas até o momento da análise.

#### 4.7.7. Ensaio 7

Cerca de 200 mL de água ultrapura foram ozonizadas durante 20 min utilizando fluxo contínuo de  $\text{O}_3/\text{O}_2$  sendo produzida uma concentração de  $8,32 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$ . Soluções de MC-LR na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  foram dosadas com a solução ozonizada da seguinte maneira:

- Solução 1: 0,5 mL de MC-LR, 25  $\mu\text{L}$  de solução ozonizada, volume completado com água ultrapura em balão volumétrico 2 mL ( $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  MC-LR e  $0,10 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$ );
- Solução 2: 0,5 mL de MC-LR, 50  $\mu\text{L}$  de solução ozonizada, volume completado com água ultrapura em balão volumétrico 2 mL ( $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  MC-LR e  $0,21 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$ );
- Solução 3: 0,5 mL de MC-LR, 100  $\mu\text{L}$  de solução ozonizada, volume completado com água ultrapura em balão volumétrico 2 mL ( $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  MC-LR e  $0,42 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$ );
- Solução 4: 0,5 mL de MC-LR, 200  $\mu\text{L}$  de solução ozonizada, volume completado com água ultrapura em balão volumétrico 2 mL ( $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  MC-LR e  $0,83 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$ ).

Uma solução de concentração de  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  em MC-LR foi preparada em água ultrapura, não ozonizada, para ser utilizada como controle.

As soluções ozonizadas permaneceram em reação durante cerca de 3 horas até o momento da análise.

#### **4.7.8. Ensaio 8**

Cerca de 200 mL de água ultrapura foram ozonizadas durante 20 min utilizando fluxo contínuo de  $O_3/O_2$  sendo produzida uma concentração de  $8,32 \text{ mg L}^{-1} O_3$ . Uma amostra real (água superficial) cuja concentração de MC-LR foi previamente determinada ( $MC-LR 0,06 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi dosada com a solução ozonizada em duas concentrações:

- Ozonização 1: 4 mL de amostra e 1 mL de solução ozonizada ( $0,05 \text{ mg L}^{-1} MC-LR$  e  $1,66 \text{ mg L}^{-1} O_3$ );
- Ozonização 2: 2,5 mL de amostra e 2,5 mL de solução ozonizada ( $0,03 \text{ mg L}^{-1} MC-LR$  e  $4,16 \text{ mg L}^{-1} O_3$ ).

Foram preparadas soluções diluindo-se a amostra em água ultrapura, de maneira a obter-se as concentrações de  $0,05$  e  $0,03 \text{ mg L}^{-1}$  em MC-LR. Estas soluções foram utilizadas como controle.

As soluções ozonizadas permaneceram em reação durante cerca de 3 horas até o momento da análise.

#### **4.7.9. Ensaio 9**

Cerca de 200 mL de água ultrapura foram ozonizadas durante 20 min utilizando fluxo contínuo de  $O_3/O_2$  sendo produzida uma concentração de  $12 \text{ mg L}^{-1} O_3$ . A amostra real contendo MC-LR ( $MC-LR 0,06 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi novamente dosada com solução ozonizada nas seguintes concentrações:

- Ozonização 1: 5 mL de amostra e 5 mL de solução ozonizada ( $0,03 \text{ mg L}^{-1} MC-LR$  e  $6 \text{ mg L}^{-1} O_3$ );

- Ozonização 2: 1 mL de MC-LR, 7,5 mL de solução ozonizada, volume completado com água ultrapura a 10 mL ( $0,006 \text{ mg L}^{-1}$  MC-LR e  $9 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$ ).

Foram preparadas soluções diluindo-se a amostra em água ultrapura, de maneira a obter-se as concentrações de  $0,03$  e  $0,006 \text{ mg L}^{-1}$  em MC-LR. Estas soluções foram utilizadas como controle.

As soluções ozonizadas permaneceram em reação durante cerca de 3 horas até o momento da análise.

#### **4.7.10. Ensaio 10**

Cerca de 200 mL de solução tampão fosfato (pH 2) foram ozonizadas durante 20 min utilizando fluxo contínuo de  $\text{O}_3/\text{O}_2$  sendo produzida uma concentração de  $7,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$ . Soluções de MC-LR na concentração de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  foram dosadas com a solução de ozônio da seguinte maneira:

- Solução 1: 0,5 mL de MC-LR, 25  $\mu\text{L}$  de solução ozonizada, volume completado com a solução tampão em balão volumétrico de 1 mL ( $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  MC-LR e  $0,19 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$ );
- Solução 2: 0,5 mL de MC-LR, 500  $\mu\text{L}$  de solução ozonizada, volume completado com a solução tampão em balão volumétrico de 1 mL ( $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  MC-LR e  $0,38 \text{ mg L}^{-1} \mu\text{M O}_3$ );
- Solução 3: 0,5 mL de MC-LR, 1000  $\mu\text{L}$  de solução ozonizada, volume completado com a solução tampão em balão volumétrico de 1 mL ( $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  MC-LR e  $0,75 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$ ).

Uma solução de concentração de  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  em MC-LR foi preparada em uma solução tampão fosfato (pH 2) não ozonizada, sendo utilizada como controle.

As soluções ozonizadas permaneceram em reação durante cerca de 3 horas até o momento da análise.

#### 4.7.10.1. Preparo da solução tampão pH 2

Cerca de 0,85 g (pesado com precisão de  $\pm 0,01$  g) de hidrogenofosfato de potássio foram dissolvidos e avolumados em 1 L de água ultrapura. Após, o pH da solução foi ajustado a 2,0 com ácido fosfórico 85 %.

A escolha destes reagentes foi feita em função da escolha de substâncias que não interferisse na reação do ozônio com MC-LR.

#### 4.7.11. Determinação da concentração de ozônio nas soluções

A concentração de ozônio nas soluções de MC-LR ozonizadas e na água ultrapura ozonizada, foi determinada por medida espectrofotométrica, no comprimento de onda 258 nm, seguindo a seguinte equação:

$$C_{O_3} = \frac{ABS}{\epsilon * b'} \quad (4.6)$$

Onde:

$C_{O_3}$  = Concentração molar de ozônio;

ABS = Absorbância;

$\epsilon$  = Absorvidade molar;  $\epsilon = 3000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Hoigné e Bader, 1981);

$b'$  = Caminho óptico ( $b' = 1 \text{ cm}$ ).

Após, a concentração do ozônio foi convertida a unidade de  $\text{mg L}^{-1}$ , multiplicando-se o valor obtido para  $C_{O_3}$  pela massa molar do gás ( $48 \text{ g mol}^{-1}$ ).

#### 4.8. Determinação da cinética da reação entre MC-LR e o ozônio

A constante cinética ( $k'$ ) para reação de MC-LR com ozônio foi determinada como de pseudo primeira-ordem (Ensaio de 1 a 4). A escolha para utilização dessa cinética foi em função de dados da literatura seguindo as equações 4.7. e 4.8.

$$\frac{d[\text{LR}]}{dt} = -k [\text{LR}]^a \cdot [\text{O}_3]^b \quad (4.7)$$

Onde:

$k$  = Constante cinética geral;

$[\text{LR}]$  = Concentração de MC-LR;

$[\text{O}_3]$  = Concentração de  $\text{O}_3$ ;

$a$  = ordem da reação para MC-LR;

$b$  = ordem da reação para  $\text{O}_3$ ;

$t$  = tempo de reação.

Como a concentração de ozônio é constante durante o tempo de reação a equação acima pode ser reduzida para:

$$\frac{d[\text{LR}]}{dt} = k' [\text{LR}]^a \quad (4.8)$$

Onde:

$K'$  = Constante cinética de pseudo primeira-ordem;

Plotando-se o logaritmo natural da concentração de MC-LR no tempo "t" sobre a concentração da toxina no tempo zero,  $t = 0$ , (Equação 4.9) *versus* o tempo de reação, obteve-se uma reta, sendo o coeficiente angular igual a  $k'$ .

$$\ln ([\text{LR}]_t / [\text{LR}]_0) \quad (4.9)$$

O tempo de meia vida da MC-LR em contato com o ozônio (Ensaio 1) foi determinado através da Equação 4.10.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 0,5}{k'} \quad (4.10)$$

Onde:

$t_{1/2}$  = tempo de meia vida;

$k'$  = constante cinética de pseudo primeira-ordem.

#### **4.9. Determinação de parâmetros de qualidade da água**

Ensaio foram realizados com a amostra de água superficial para determinação de alguns parâmetros de qualidade da água, com o objetivo de comparar estes resultados com os obtidos na ozonização da amostra.

##### **4.9.1. pH**

O pH foi medido utilizando-se um potenciômetro equipado com eletrodo de vidro combinado. A leitura foi realizada mergulhando-se o eletrodo na amostra. O ensaio foi realizado em duplicata a uma temperatura de 20,1 °C.

##### **4.9.2. Condutividade**

A condutividade foi medida utilizando-se um condutivímetro equipado com eletrodo de platina. A leitura foi realizada mergulhando-se o eletrodo na amostra. O ensaio foi realizado em duplicata a uma temperatura de 20,1 °C.

##### **4.9.3. Absorbância de luz ultravioleta em 254 nm (UV 254 nm)**

Uma alíquota da amostra de água superficial foi filtrada e em seguida foi realizada uma medida espectrofotométrica no comprimento de onda de 254 nm, utilizando-se cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm. O ensaio foi realizado em duplicata.

#### 4.10. Cálculos de determinação da concentração de MC-LR

Para determinação da concentração de MC-LR nas amostras de água foram utilizadas as seguintes equações:

$$y = ax + b \quad (4.11)$$

Onde:

y = Concentração de MC-LR no extrato final de amostra ( $\mu\text{g L}^{-1}$ );

a = Coeficiente angular da curva de calibração;

x = Área cromatográfica de MC-LR;

b = Coeficiente linear da curva de calibração.

$$C = \frac{y \cdot V_f}{V} \quad (4.12)$$

Onde:

C = Concentração de MC-LR na amostra em  $\mu\text{g L}^{-1}$ ;

$V_f$  = Volume de extrato final (L);

V = Volume de amostra (L).

Para as amostras que não sofreram preparação, ou seja, foram analisadas diretamente sem pré-concentração, somente a Equação 4.11. foi utilizada.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A seguir serão apresentados os resultados obtidos na otimização do analito e de algumas das condições cromatográficas (fase móvel e coluna cromatográfica), bem como os resultados da validação do método de determinação de MC-LR por LC-MS/MS.

Também serão apresentados os resultados do tratamento das amostras por ozonização para os diferentes ensaios realizados, testes com amostra real e avaliação da toxicidade.

### 5.1. Condições do sistema LC- MS/MS

#### 5.1.1. Otimização do analito

A infusão da solução de MC-LR ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) no espectrômetro de massas permitiu a caracterização nos modos de varredura (“Q1 Scan”) e de fragmentação da molécula (MS/MS), em ionização por eletronebulização.

Através da análise em “Q1 Scan” foi possível definir o modo de ionização de maior sensibilidade (Figura 5.1.), sendo possível concluir que a melhor ionização ocorre no modo positivo, ou seja, com a protonação da molécula de MC-LR,  $[M + H]^+ = 995.6$ , já que esta possui grupos favoráveis a este tipo de ionização, como por exemplo amino grupos. A análise em MS/MS permitiu obter-se informações referentes ao padrão de fragmentação estrutural da molécula de MC-LR, sendo selecionadas as duas fragmentações de maior intensidade, m/z 135 e 70 (Figura 5.2.), a primeira foi utilizada para quantificação e a segunda para confirmação. A fragmentação m/z 135 é a fragmentação característica para

microcistinas e corresponde ao grupamento Adda da molécula.

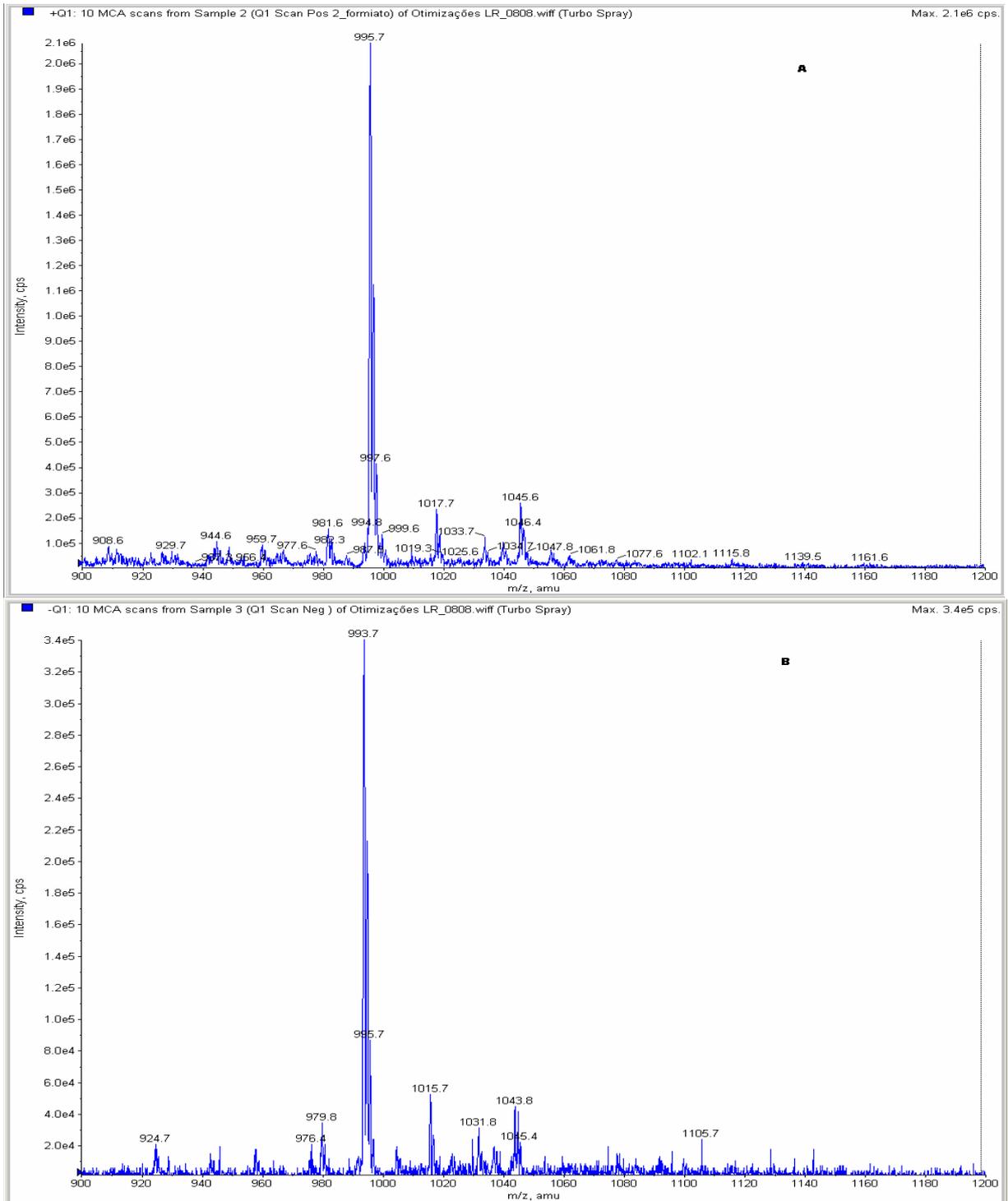


Figura 5.1. Espectro de massas de MC-LR (1 mg L<sup>-1</sup>) obtido em modo "Q1 Scan", com ionização positiva (A) e negativa (B).

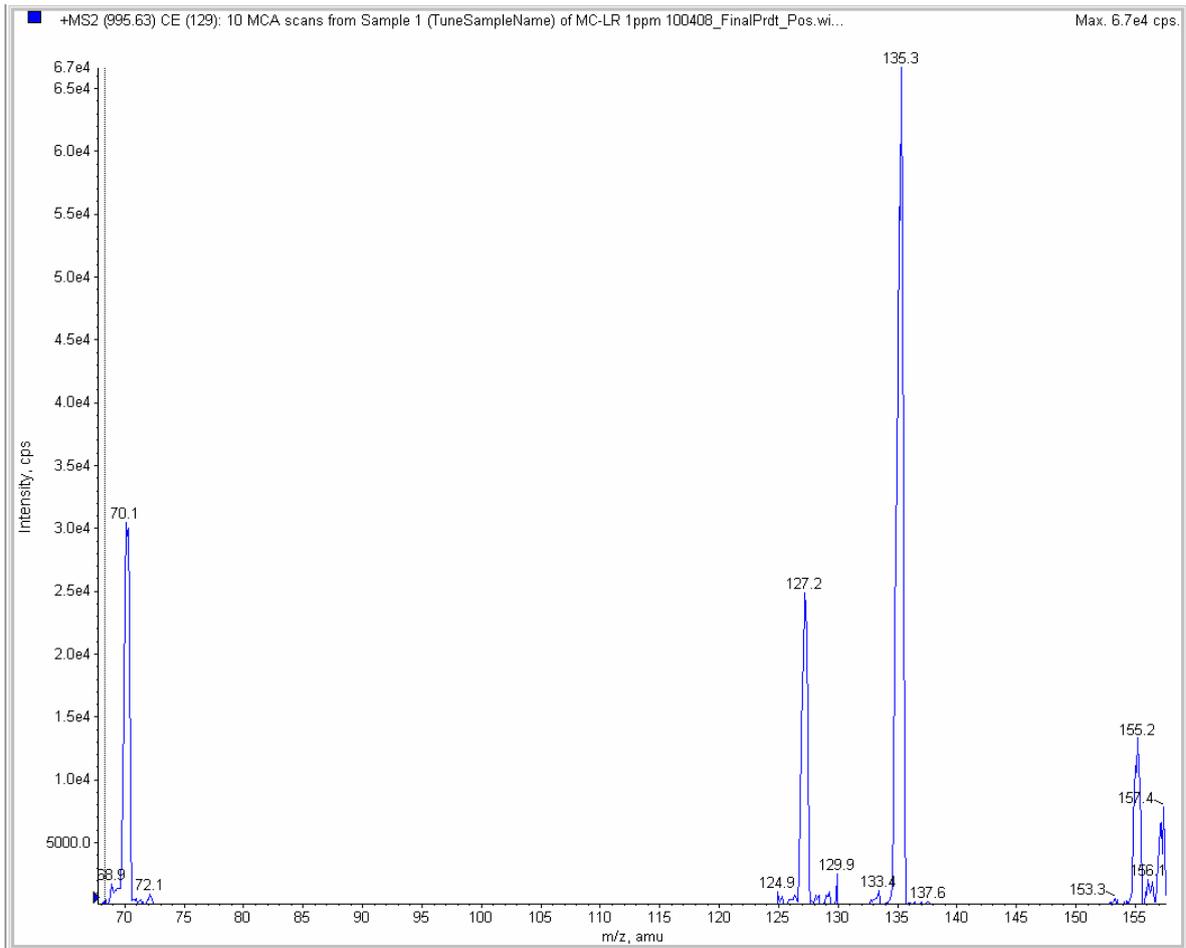


Figura 5.2. Espectro de massas de MC-LR ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) obtido em modo MS/MS, onde é possível verificar as fragmentações de maior intensidade ( $m/z$  135 e 70).

A Tabela 5.1. apresenta os parâmetros otimizados para o Potencial de Orifício (DP), Energia de Colisão (CE) e Potencial de Saída da Cella de Colisão (CXP), para as transições monitoradas em modo MRM.

Tabela 5.1. Parâmetros otimizados do DP (Potencial de Orifício), CE (Energia de Colisão) e CXP (potencial de Saída da Cella de Colisão), para as transições monitoradas em modo MRM.

Íon Precursor (m/z)	Íon Produto (m/z)	DP (V)	CE (eV)	CXP (V)
995,6	135,2	116	93	4
995,6	70,1	116	129	2

## 5.1.2. Otimização das condições cromatográficas

### 5.1.2.1. Estudo da fase móvel

Para escolher a fase móvel três combinações diferentes de componentes da fase foram testadas à medida que um aumento na sensibilidade da análise para MC-LR foi obtido. Inicialmente foram comparadas as análises com acetonitrila como componente orgânico variando-se o aditivo, o primeiro teste consistiu no uso de somente acetato de amônio 2mM, e o segundo na combinação do mesmo com ácido fórmico 0,1 %. Neste teste foi possível verificar que na adição de ácido fórmico a ionização da MC-LR torna-se melhor e com isso há um aumento de sensibilidade na análise o que é esperado quando a aquisição é feita no modo positivo.

Após a definição do aditivo, foi realizado um novo teste para comparação do uso de acetonitrila e metanol como componente orgânico da fase móvel, onde pode ser verificada uma melhor resolução cromatográfica, uma menor retenção na coluna cromatográfica, bem como uma maior sensibilidade quando o componente é acetonitrila. A Figura 5.3. ilustra o efeito das diferentes combinações na composição da fase móvel com relação à sensibilidade de MC-LR em LC-MS/MS. A Figura 5.4. apresenta os cromatogramas referentes aos testes utilizando acetonitrila e metanol, como componentes orgânicos da fase, ambos contendo ácido fórmico (0,1 %) e acetato de amônio (2mM) como aditivos. Na análise com metanol foram usados como aditivos somente a mistura de ácido fórmico (0,1 %) e acetato de amônio (2mM).

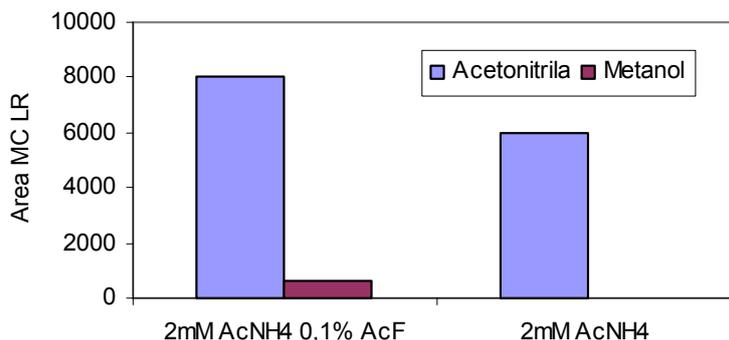


Figura 5.3. Representação gráfica da otimização da fase móvel utilizando acetonitrila e metanol como componente orgânico e acetato de amônio (AcNH4) e ácido fórmico (AcF) como aditivos.

#### 5.1.2.2. Coluna cromatográfica

Colunas cromatográficas de mesma composição ( $C_{18}$ ) e diferentes dimensões: 150 X 4,6 mm e 50 x 2mm foram testadas. Soluções de MC-LR de diferentes concentrações (0,1 e 0,5 mg L<sup>-1</sup>) foram analisadas nas duas colunas onde foram avaliados a resolução do pico cromatográfico, a sensibilidade da análise para MC-LR, bem como o tempo de análise. O fluxo da fase móvel também foi ajustado para cada coluna, sendo utilizado 0,2 mL min<sup>-1</sup> para coluna de menor diâmetro e um fluxo de 0,5 mL min<sup>-1</sup> para coluna de maior diâmetro. A resolução do pico cromatográfico foi satisfatório nas duas colunas, demonstrando que a composição das colunas e o gradiente de fluxo são adequados à análise de MC-LR.

Uma melhor sensibilidade foi alcançada para as duas soluções de MC-LR na coluna de menor diâmetro, isso se deve ao fato de que o uso de colunas menores possibilita o uso de fluxos menores. Moléculas de grande massa molecular, como a MC-LR, possuem uma melhor ionização em baixos fluxos, pois não existe competição entre a ionização dos componentes da fase móvel e o analito de interesse. Foi observado um aumento de cerca de 30 % na sensibilidade da análise de MC-LR utilizando fluxo baixo, sendo plenamente satisfatório, a redução do tempo de análise utilizando coluna de menor diâmetro também teve um impacto positivo para as análises.

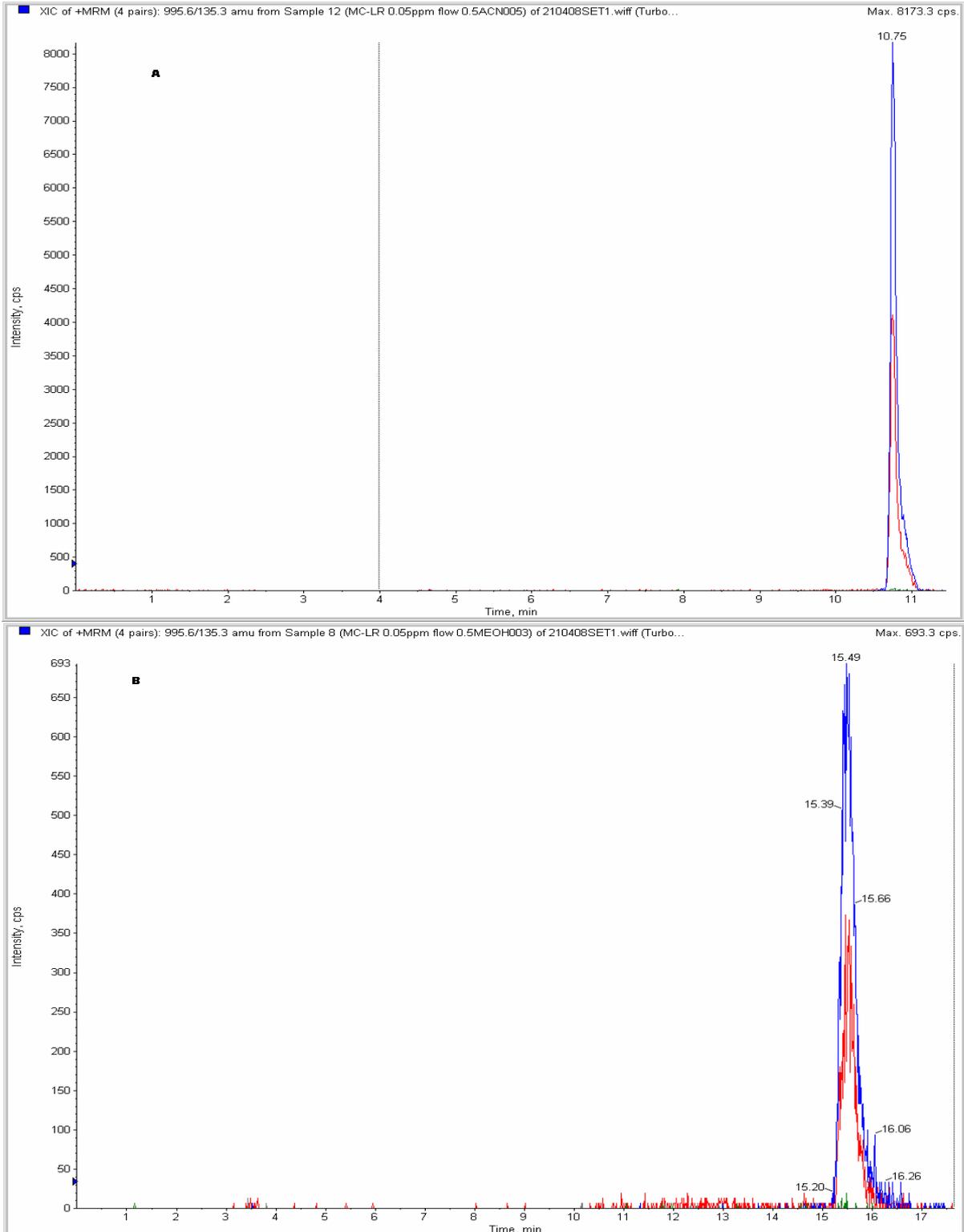


Figura 5.4. Cromatogramas de análise de MC-LR utilizando-se como componentes da fase móvel acetonitrila (A) e metanol (B) juntamente com água, ambos com 2mM de acetato de amônio e 0,1 % ácido fórmico.

As Figuras 5.5. e 5.6. apresentam, respectivamente, os cromatogramas de análise das soluções de MC-LR de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  nas duas colunas.

Abaixo estão apresentadas as condições utilizadas neste trabalho para o sistema de LC-MS/MS para análise de MC-LR:

Para o cromatógrafo líquido:

Coluna	: Luna C <sub>18</sub> 50 X 2 mm; 3 $\mu\text{m}$ (Phenomenex)										
Fase móvel	: Água (A) e Acetonitrila (B); ambos com 2mM de acetato de amônio e 0,1 % de ácido fórmico										
Gradiente	: <table border="1"> <tr> <td>Tempo</td> <td>0</td> <td>3</td> <td>5</td> <td>7</td> </tr> <tr> <td>% B</td> <td>30</td> <td>85</td> <td>30</td> <td>30</td> </tr> </table>	Tempo	0	3	5	7	% B	30	85	30	30
Tempo	0	3	5	7							
% B	30	85	30	30							
Fluxo	: $0,2 \text{ mL min}^{-1}$										
Volume de injeção	: $50 \mu\text{L}$										

Para o espectrômetro de massas:

Interface	: Eletronebulização
Temperatura	: $450 \text{ }^\circ\text{C}$
Gás de dessolvatação	: 12 psi
Gás de colisão	: 4,0 psi
Gás nebulizante	: 45 psi
Gás secante	: 45 psi
Voltagem do capilar	: 4500 V
Modo de aquisição	: Positivo, MRM

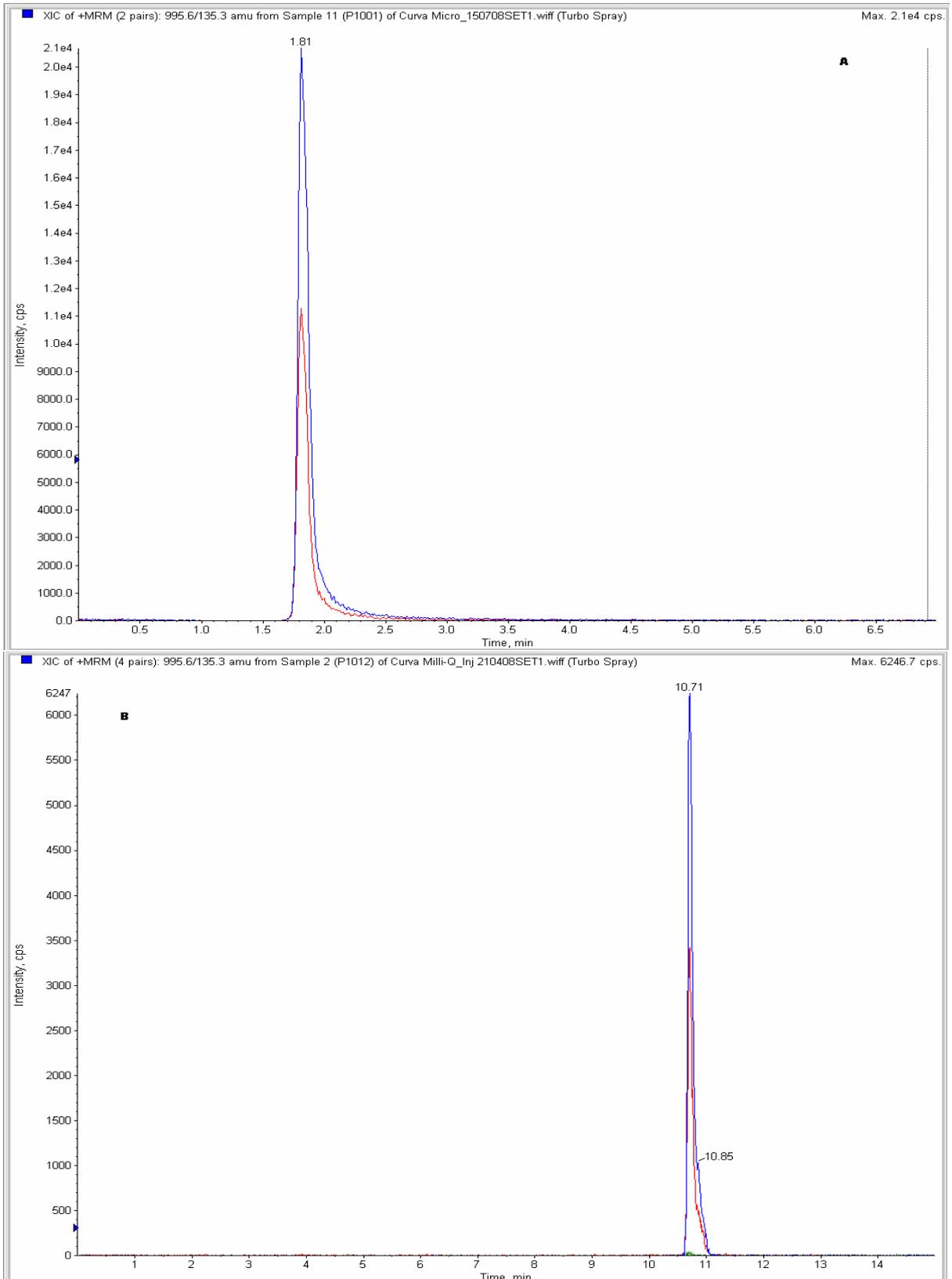


Figura 5.5. Cromatogramas de análise de soluções de MC-LR na concentração de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  utilizando coluna de  $50 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$  (A) e coluna de  $150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$  (B).

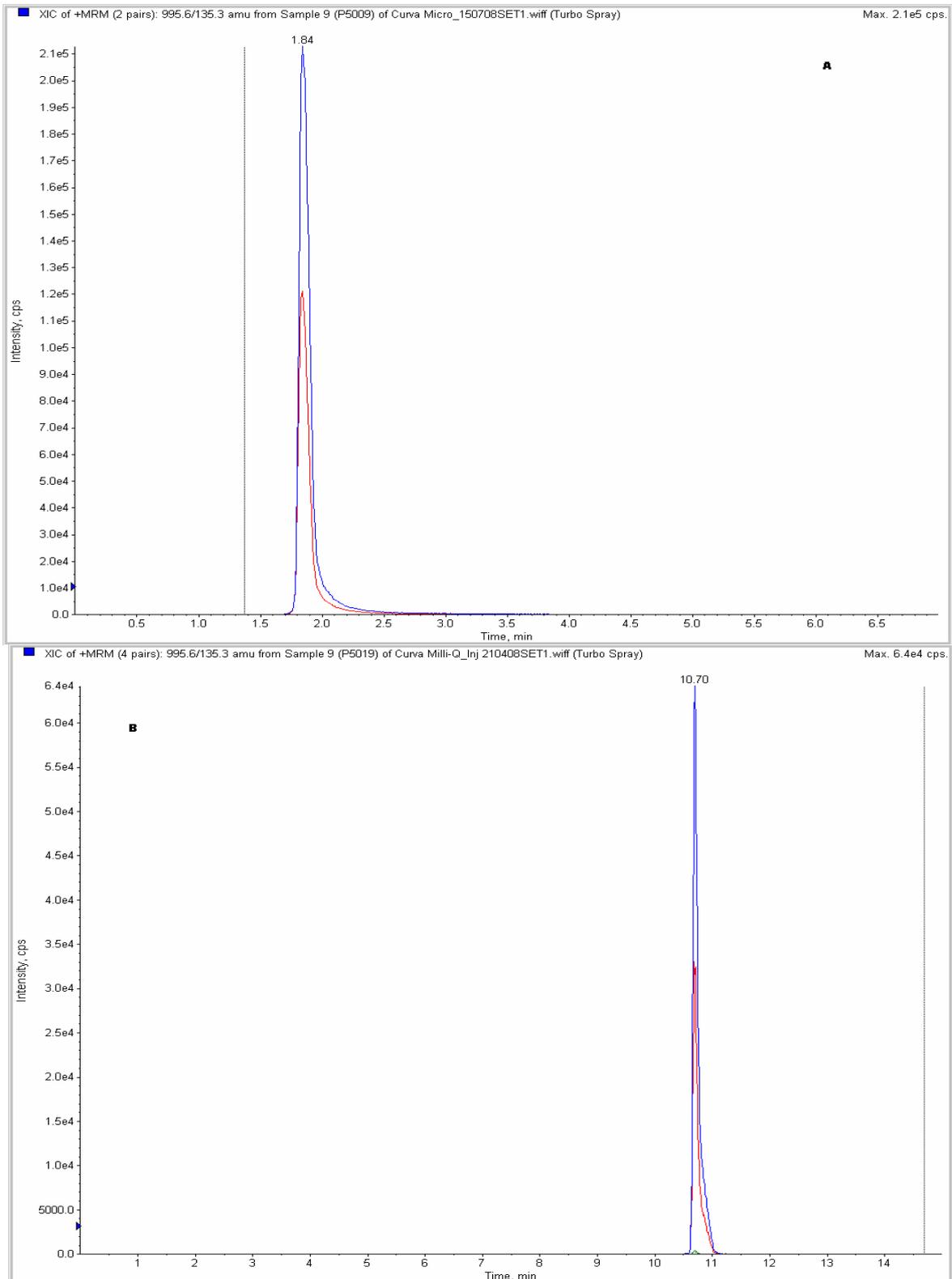


Figura 5.6. Cromatogramas de análise de soluções de MC-LR na concentração de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  utilizado coluna de  $50 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$  (A) e coluna de  $150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$  (B).

## 5.2. Validação do método de determinação de MC-LR

### 5.2.1. Especificidade e seletividade

Através da análise de brancos de matriz (Experimento 4) foi possível verificar que nenhum interferente está presente no tempo de retenção da MC-LR tanto para água potável (Figura 5.7.) como para água superficial (Figura 5.8.), para as fragmentações monitoradas ( $m/z$  135,3 e 70,1). Portanto, o método foi considerado específico e seletivo para análise de MC-LR para as fragmentações monitoradas na análise em LC-MS/MS.

### 5.2.2. Linearidade

A linearidade foi obtida através da construção de curvas analíticas com cinco níveis de concentração: 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 e 0,5 mg L<sup>-1</sup>, na qual cada ponto foi injetado em triplicata. A Figura 5.9. mostra o cromatograma de análise do primeiro nível de calibração, onde é indicada a fragmentação utilizada para quantificação ( $m/z$  135,3). A Tabela 5.2. apresenta os coeficientes de correlação ( $r^2$ ), angulares (a) e lineares (b), obtidos através da regressão linear das curvas analíticas para cada experimento de validação (Experimentos 1 a 4).

Analisando as equações das curvas analíticas, pode-se concluir que o método apresenta boa linearidade para MC-LR, ou seja, um  $r^2 > 0,99$ , o que demonstra que o método fornece resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro da faixa trabalhada.

Tabela 5.2. Valores da equação da reta obtidos através da regressão linear para os 4 experimentos de validação.

Equação da reta: $y = ax + b$			
	a	b	$r^2$
Experimento 1	37373	- 494,2	0,9985
Experimento 2	27937	- 402,8	0,9986
Experimento 3	31810	- 611,0	0,9980
Experimento 4	29767	- 1209,8	0,9965

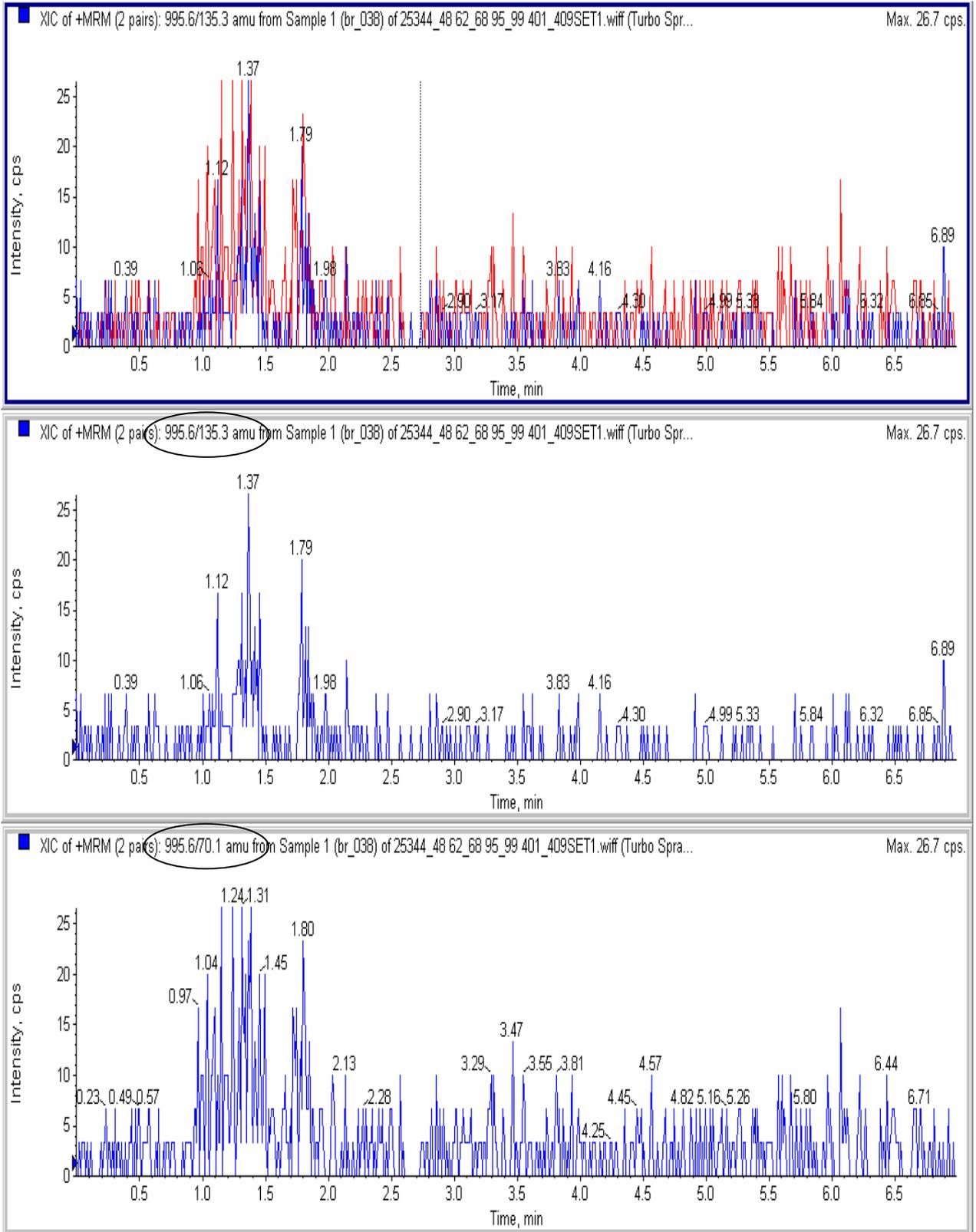


Figura 5.7. Cromatograma de análise do branco de matriz, água potável indicando as duas fragmentações monitoradas (135,3 e 70,1).

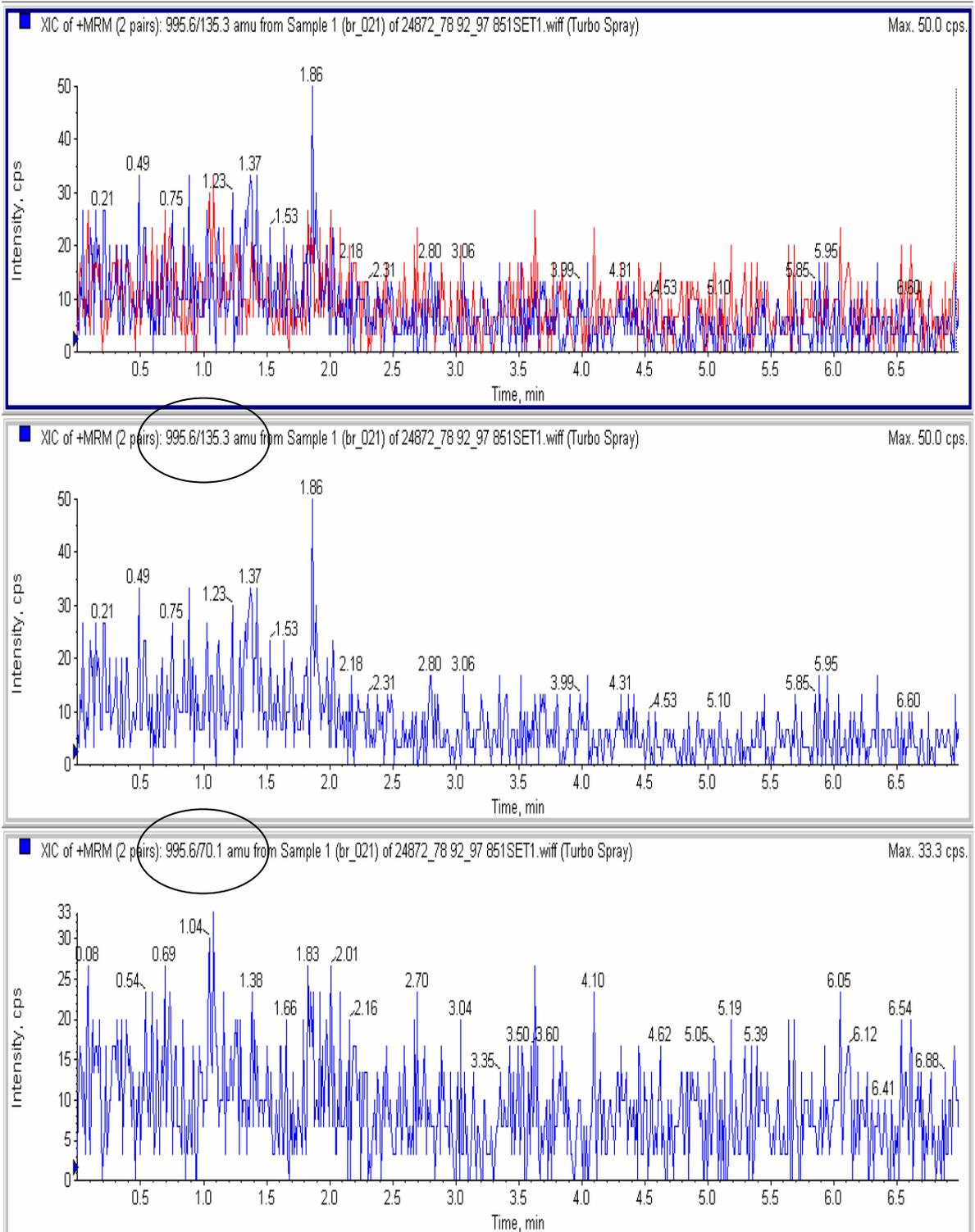


Figura 5.8. Cromatograma de análise do branco de matriz, água superficial indicando as duas fragmentações monitoradas (135,3 e 70,1).

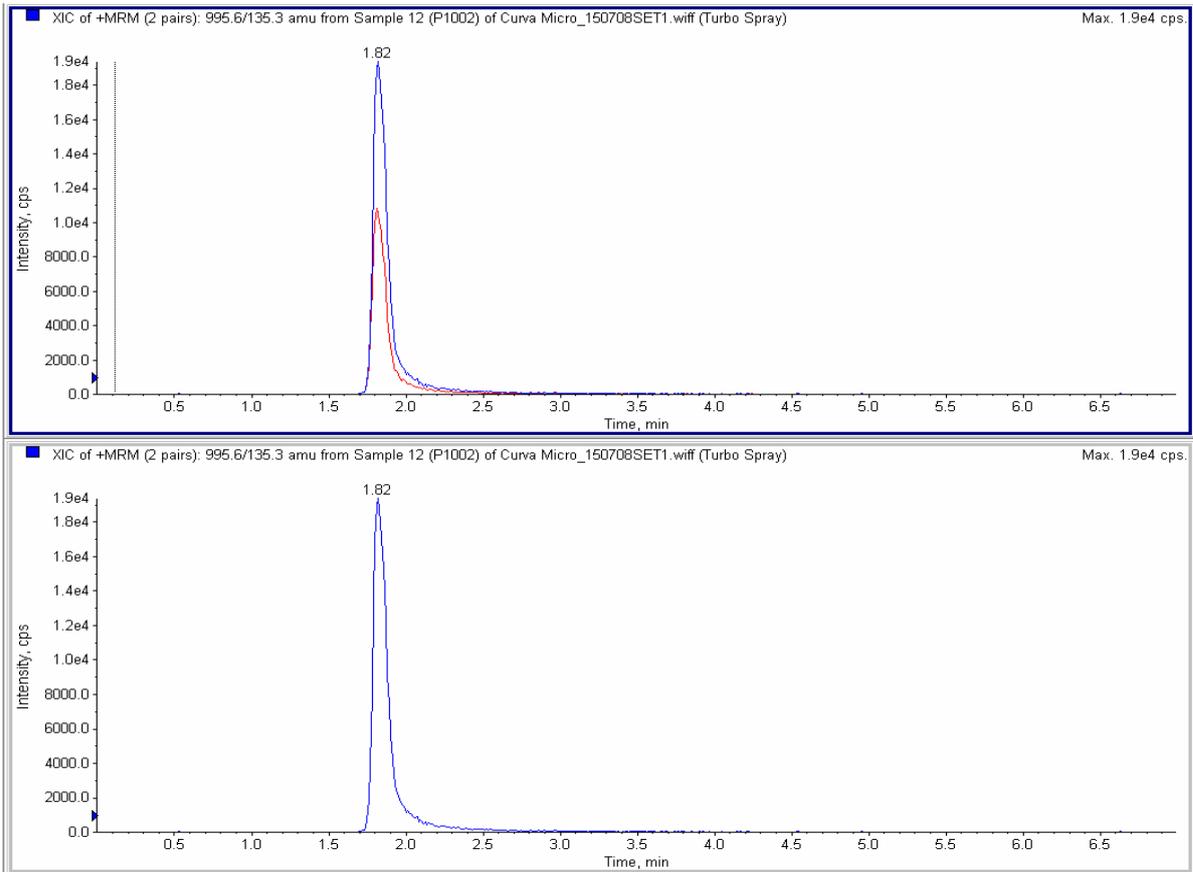


Figura 5.9: Cromatograma de padrão de MC-LR, equivalente ao primeiro nível de calibração ( $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ ), onde é verificada a fragmentação de quantificação ( $m/z$  135,3).

### 5.2.3. Limite de detecção do equipamento (LODE)

Uma solução de  $0,7 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  em MC-LR foi analisada, em sete injeções, e resultou em uma relação sinal/ruído (s/r) de 4,0 para (Tabela 5.3.), de acordo com este valor o LODE foi considerado  $0,7 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  para MC-LR em LC-MS/MS.

O valor obtido para LODE não considerou a etapa de preparação da amostra, portanto por não haver pré-concentração seu valor é superior ao LOD e LOQ, que envolvem a etapa de preparação da amostra.

Tabela 5.3: Resultados da relação sinal/ruído (s/r) para MC-LR,  $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$ , em LC-MS/MS.

Réplica	s/r
1	3,8
2	3,6
3	3,8
4	4,1
5	3,7
6	4,1
7	5,1
Média	4,0

#### 5.2.4. Limite de detecção do método (LOD) e de quantificação (LOQ)

A Tabela 5.4. apresenta os resultados para o LOD e LOQ de MC-LR nos Experimentos 1 a 3 e os valores médios.

A técnica analítica apresentou boa sensibilidade para a transição de quantificação  $m/z$  995.6>135 e o método apresentou limites de detecção e de quantificação muito abaixo do limite máximo estabelecido na Portaria de potabilidade da água (Portaria N° 518, 2004),  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Tabela 5.4: Resultados para os Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para MC-LR.

Experimentos	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Experimento 1	0,02	0,03
Experimento 2	0,02	0,03
Experimento 3	0,03	0,04
Média	0,02	0,04

#### 5.2.5. Exatidão

##### 5.2.5.1. Recuperação, repetitividade e reprodutibilidade

A recuperação do método foi estudada em cinco níveis de fortificação: 0,1; 0,2; 0,25; 0,4 e  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , obtendo-se valores entre 81,4 e 105,6 %, com C.V. % menor que 20 %. Comparando-se os resultados obtidos com os critérios estabelecidos pela Comunidade Européia (EC/657/2002) para análise de resíduos,  $R\% 70 - 120$  e  $C.V. \% \leq 20$ , os resultados obtidos para os Experimentos 1 a 3 são

satisfatórios. A Tabela 5.5. apresenta os resultados para recuperação, repetitividade e reprodutibilidade do método para amostras de água. A Figura 5.10. apresenta os cromatogramas de análise das amostras do primeiro e último nível de fortificação.

#### **5.2.6. Incerteza da medição (U)**

Para determinação da incerteza da medição foram consideradas como variâncias a reprodutibilidade e o efeito matriz (obtido através do Experimento 4), considerando-se 95 % de confiança. A Tabela 5.6. apresenta os dados obtidos para Experimento 4. A Tabela 5.7. apresenta os resultados para a incerteza de medição.

Não foi observado um efeito das matrizes (água potável e superficial) estudadas na análise de MC-LR em LC-MS/MS. O valor obtido para a incerteza da medição foi satisfatório, pois é um valor que não causa grandes impactos no resultado final, quando é levado em consideração o LOD e o LOQ, ou seja, mesmo levando-se em consideração a incerteza os valores permanecem dentro do máximo aceitável de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ , segundo a Portaria N° 518 (2004).

- LOD:  $0,02 \pm 0,04 \mu\text{g L}$ ;
- LOQ:  $0,04 \pm 0,04 \mu\text{g L}$ .

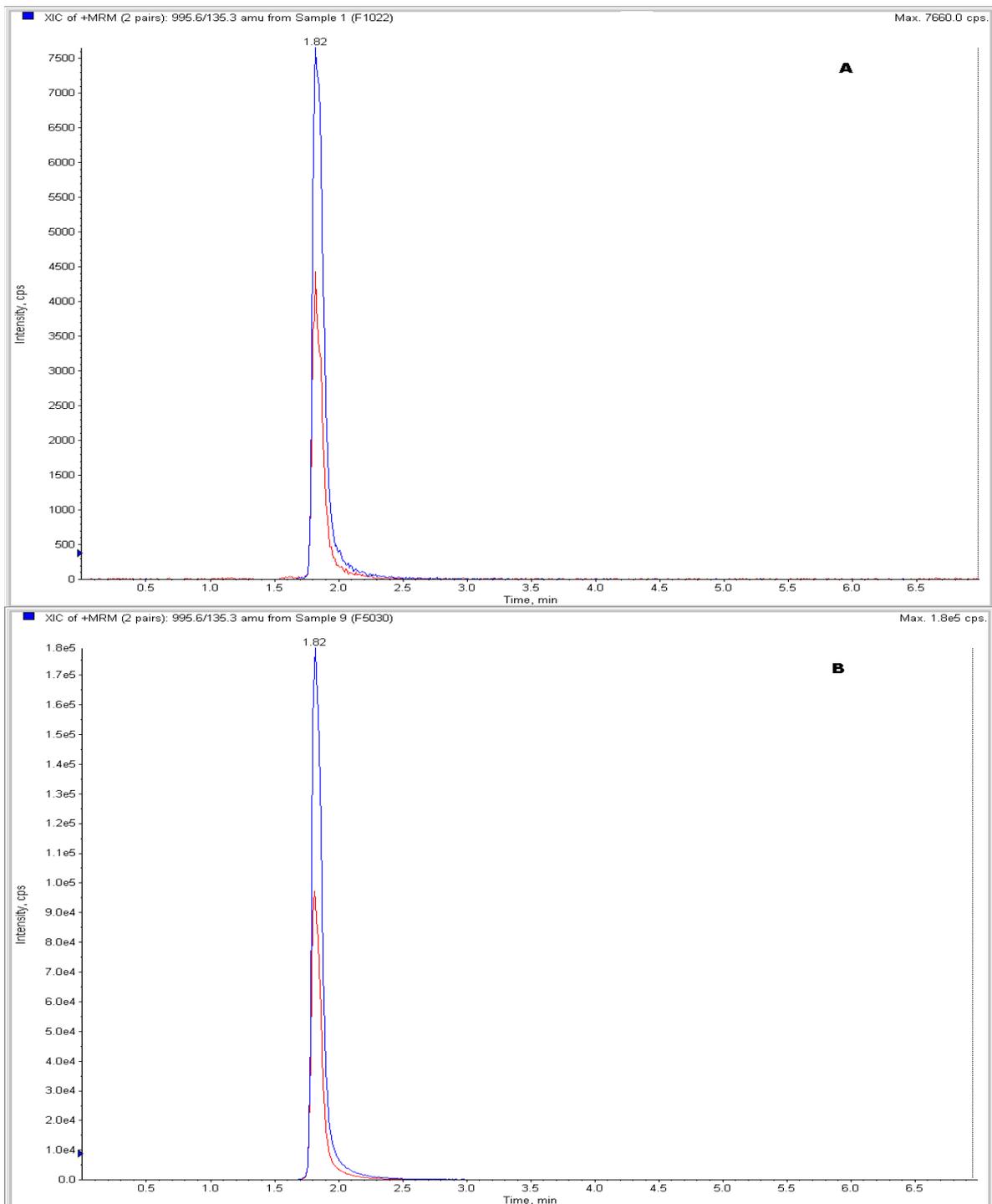


Figura 5.10. Cromatogramas de análise do primeiro nível de fortificação com MC-LR ( $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (A) e do último nível de fortificação ( $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (B).

Tabela 5.5. Dados de Recuperação (%) e Repetitividade (C.V.%) para os Experimentos 1 a 3.

Nível de validação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recuperação (%)		
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
0	-	-	-
0,1	86,8	105,3	91,4
0,1	106,1	102,4	83,0
0,1	91,6	98,3	99,8
0,1	132,6	100,0	84,9
0,1	105,8	83,1	98,1
0,1	110,9	93,6	97,2
<b>Média</b>	<b>100,6</b>	<b>104,9</b>	<b>105,4</b>
<b>DP (%)</b>	<b>16,1</b>	<b>8,4</b>	<b>10,9</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>15,3</b>	<b>8,0</b>	<b>10,4</b>
0,2	102,1	87,2	79,5
0,2	106,8	90,4	79,7
0,2	94,6	93,5	85,8
0,2	97,5	92,8	84,0
0,2	116,4	91,3	79,6
0,2	111,8	95,1	80,2
<b>Média</b>	<b>97,1</b>	<b>91,7</b>	<b>98,5</b>
<b>DP (%)</b>	<b>7,9</b>	<b>2,7</b>	<b>15,6</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>8,1</b>	<b>3,0</b>	<b>15,8</b>
0,3	91,4	79,5	92,2
0,3	83,0	79,7	73,2
0,3	99,8	85,8	84,0
0,3	84,9	84,0	88,7
0,3	98,1	79,6	74,5
0,3	97,2	80,2	75,7
<b>Média</b>	<b>92,4</b>	<b>81,5</b>	<b>81,4</b>
<b>DP (%)</b>	<b>7,2</b>	<b>2,7</b>	<b>8,0</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>7,8</b>	<b>3,4</b>	<b>9,9</b>
0,4	99,6	81,7	77,9
1,0	101,1	94,9	78,1

DP = Desvio Padrão; C.V. = Coeficiente de Variância.

Tabela 5.6. Dados obtidos para o Experimento 4, com Recuperação (%), C.V. % e avaliação do efeito matriz (brancos).

<b>Nível de validação</b> <b>(<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Recuperação (%)</b>
0	-
0	-
0	-
0	-
0	-
0	-
0	-
0	-
0	-
0	-
0	-
0,2	93,2
0,2	96,6
0,2	74,7
0,2	84,2
0,2	92,9
0,2	78,6
0,2	88,7
0,2	79,8
0,2	71,9
0,2	70,7
<b>Média</b>	<b>83,1</b>
<b>DP</b>	<b>9,4</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>11,3</b>

Tabela 5.7. Resultados para Incerteza da medição (U).

	<b>DP<sup>2</sup></b>
Reprodutibilidade	0
Efeito matriz	0
Total DP <sup>2</sup>	0
Incerteza da medição (U)	0,04

DP<sup>2</sup> = Desvio Padrão.

A Tabela abaixo apresenta o resumo dos resultados obtidos na validação do método de determinação de MC-LR.

Tabela 5.8: Resumo dos resultados de validação.

Parâmetro	Resultado
Especificidade e seletividade	O método específico e seletivo para análise de MC-LR em água.
Linearidade	$r^2 = 0,9965$ a $0,9986$
<ul style="list-style-type: none"> <li>Faixa linear de trabalho</li> </ul>	$0,05 - 0,5 \text{ mg L}^{-1}$
LODE*	$0,7 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$
LOD	$0,02 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$
LOQ	$0,04 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$
Exatidão	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Recuperação</li> <li>Repetitividade e Reprodutibilidade</li> </ul>	$R (\%) = 81,4 - 105,6$ $C.V. (\%) = 2,7 - 16,1$
Incerteza da medição (para 95 % de confiança)	$U = 0,04$

\* Não envolveu a etapa de preparação das amostras.

### 5.3. Tratamento das amostras por ozonização

Os testes preliminares de tratamento por ozonização (com fluxo de ar/O<sub>3</sub>) foram realizados utilizando-se grandes volumes de amostra (500 mL) requerendo posteriormente extração e pré-concentração para se chegar à concentrações detectáveis de MC-LR. O teste mostrou-se eficiente na remoção da microcistina da água, não sendo detectada MC-LR em nenhuma das amostras testadas, cujas concentrações esperadas no extrato final eram de: 0,1; 1,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> e o tempo de reação foi de 15 min para cada amostra. A concentração de ozônio de 3 mg L<sup>-1</sup> aplicada foi suficiente para a remoção total da microcistina visto que, a dose do oxidante foi constante durante todo tempo de reação.

Com base nos resultados dos testes preliminares a condução do estudo foi realizada utilizando-se doses menores de ozônio nas amostras e as quantidades de amostras testadas também foram modificadas. Os volumes de amostras foram reduzidos com o intuito de eliminar a etapa de pré-concentração, fazendo-se com que o manuseio das mesmas fosse o menor possível e o tempo de ensaio reduzido.

Os ensaios passaram a ser conduzidos com fluxo de  $O_2/O_3$ . O volume de soluções de MC-LR foi de 2 mL para os novos ensaios e as doses de ozônio foram de  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ . As concentrações de MC-LR testadas foram de 0,1; 0,5 e  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ . A seguir segue um detalhamento dos resultados obtidos para estes ensaios (Ensaio 1 a 4).

No primeiro ensaio foram utilizadas concentrações e de MC-LR de  $5 \text{ mg L}^{-1}$ , o ozônio gasoso foi borbulhado diretamente na solução. A dose constante de ozônio foi suficiente para reduzir a quantidade de toxina na água em 48,8 % em apenas 15 min e 87,7 % em 60 min. A Figura 5.11. ilustra o decréscimo da concentração de MC-LR para os dois tempos de reação.

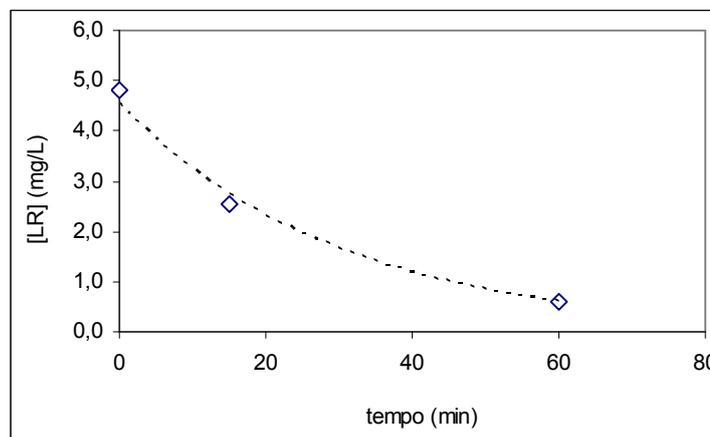


Figura 5.11. Decréscimo da concentração de MC-LR através da reação com ozônio ( $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ ), durante 15 e 60 min.

A partir dos resultados do Ensaio 4 uma cinética química foi proposta para a reação do ozônio com MC-LR, sob fluxo de  $O_2/O_3$ . Uma constante de pseudo

primeira-ordem ( $k'$ ) de  $0,0337 \text{ min}^{-1}$  foi encontrada para MC-LR, como é mostrado na Figura abaixo:

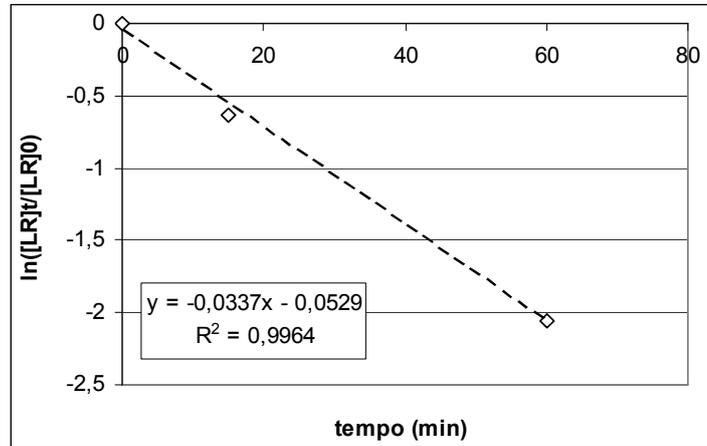


Figura 5.12. Cinética química para determinação da constante de primeira-ordem (coeficiente angular) para reação de MC-LR com ozônio.

Após a obtenção da equação de regressão linear além de  $k'$ , obtida do coeficiente angular da reta, o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) para MC-LR em contato com o ozônio foi também determinado obtendo-se:  $t_{1/2} = 20,66 \text{ min}$ . O valor encontrado indica um tempo de meia vida bastante curto para reações de MC-LR com ozônio, visto a alta concentração testada,  $5 \text{ mg L}^{-1}$ .

Depois de determinada a cinética química da reação novos testes foram realizados (Ensaio 2 a 4), onde as concentrações de MC-LR testadas estiveram mais próximas das concentrações estudadas em outros trabalhos de ozonização. Para estes ensaios trabalhou-se com soluções de MC-LR de  $0,1$  e  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , nestas soluções não foi detectado MC-LR após 3, 6, 10, 15 e 30 min de reação direta com o ozônio. Estes resultados podem ser comparados com os testes realizados por Harada *et al.* (1995), onde 5 min foi o tempo suficiente para remover 100 % MC-LR  $0,12 \text{ mg L}^{-1}$  em 2 mL de solução, a ozonização também foi realizada de forma direta sob fluxo de  $\text{O}_2/\text{O}_3$ .

Novos testes foram realizados utilizando o tratamento por ozonização através de dosagem de soluções de MC-LR com uma solução estoque de ozônio gasoso em água ultrapura. O objetivo dos novos ensaios (Ensaio 5, 6, 7 e 10) foi reduzir as

doses de ozônio nas soluções para que fosse possível uma melhor avaliação do decréscimo da concentração de MC-LR, em diferentes concentrações da toxina e em diferentes doses de ozônio, variando-se também o pH. O tempo de reação em todos ensaios foi de 3 horas.

Foi realizada uma comparação entre o comportamento da remoção de MC-LR em diferentes concentrações (0,1; 0,25 e 0,5 mg L<sup>-1</sup>) para uma mesma dose de ozônio (0,09 mg L<sup>-1</sup>). Foi verificada que o percentual de remoção de MC-LR aumenta com a diminuição da concentração, chegando a 100 % na concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup> (Figura 5.13.). Sendo necessárias doses maiores de ozônio para remoção total de MC-LR em concentrações de 0,25 mg L<sup>-1</sup>. A representação gráfica da Figura 5.14. mostra que um aumento de quase 50 % na dose de ozônio é necessário para remoção da MC-LR 0,25 mg L<sup>-1</sup> em relação à MC-LR 0,1 mg L<sup>-1</sup>.

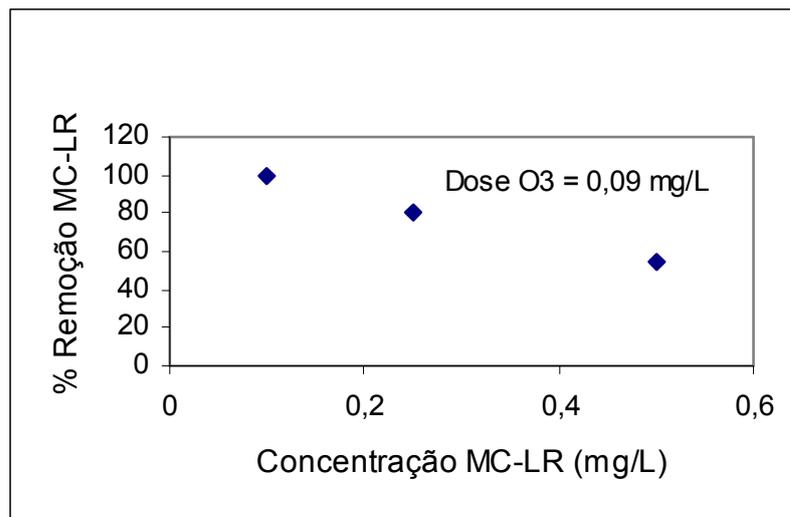


Figura 5.13. Percentual de remoção de MC-LR em diferentes concentrações para mesma dose de ozônio (0,09 mg L<sup>-1</sup>).

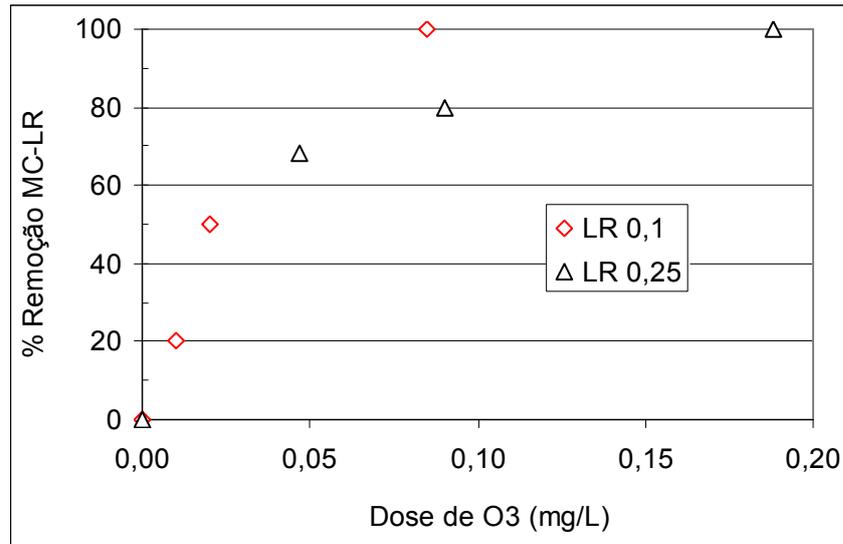


Figura 5.14. Percentual de remoção de MC-LR nas concentrações de 0,1 e 0,25 mg L<sup>-1</sup> para diferentes doses de ozônio.

Uma avaliação do efeito do pH na reação de MC-LR com ozônio foi avaliada através da dosagem de soluções de MC-LR 0,25 mg L<sup>-1</sup> com soluções estoque de ozônio em água ultrapura em pH natural (pH 5) e tampão fosfato (pH 2). Foi verificado que em pH 2 a dose de ozônio necessária para remoção de quase 100 % de MC-LR foi cerca de quatro vezes maior que em pH natural. Embora ambos os pH estejam na faixa considerada ácida, no pH 5 a quantidade de íons OH<sup>-</sup> é maior que em pH 2, portanto esse fato pode ter favorecido a remoção da MC-LR, através da formação de radicais OH<sup>•</sup>, que são mais reativos que o próprio ozônio. A Figura 5.15. ilustra a remoção de MC-LR nos dois pH.

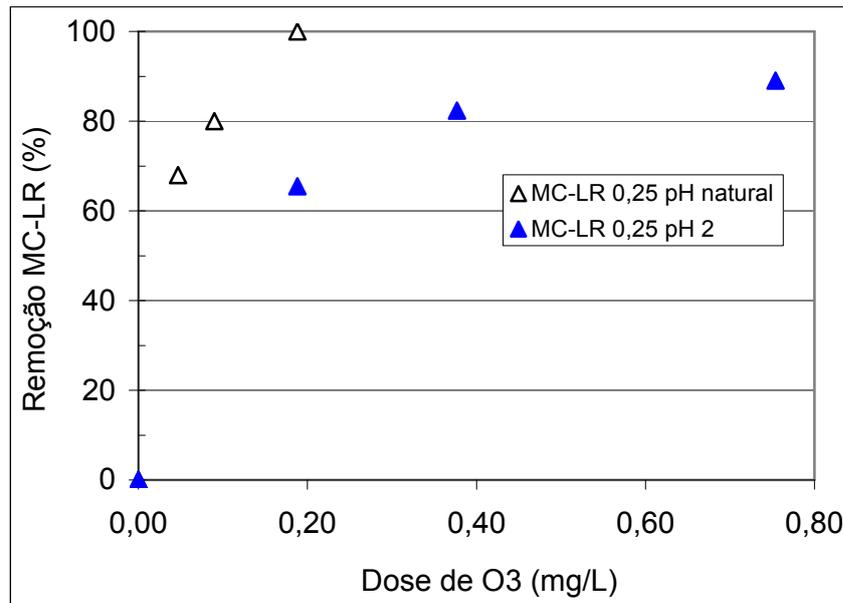


Figura 5.15. Percentual de remoção de MC-LR ( $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ ) utilizando-se soluções ozonizadas em pH natural (pH 5) e pH 2 para diferentes doses de ozônio.

As Tabelas 5.9. e 5.10. apresentam um resumo dos resultados obtidos para as soluções de MC-LR ozonizadas, por reação direta do ozônio gasoso (concentração de  $\text{O}_3$  constante) e dosagem de uma solução estoque ozonizada, respectivamente. Nesse último teste a concentração de ozônio decaiu no decorrer da reação com a MC-LR. Nos dois tipos de tratamento com ozônio foi verificado que a eficiência da remoção de MC-LR é maior nas concentrações mais baixas da toxina, requerendo tempo e dose de ozônio menores nestas concentrações. Os ensaios onde a reação foi direta do ozônio, 5 min de reação com ozônio gasoso ( $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram suficientes para remoção total da MC-LR  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ . Para os ensaios com a solução ozonizada uma dosagem de  $0,19 \text{ mg L}^{-1}$  foi suficiente para remoção total de MC-LR  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ .

É importante ressaltar que nos ensaios onde há reação com ozônio gasoso o contato da toxina com o oxidante ocorre de forma contínua e não diminui com o decréscimo da concentração da MC-LR, portanto para estes ensaios é esperado que tempos menores de reação com o ozônio seja suficiente para remoção da toxina, como foi comprovado através da comparação entre os Ensaios 4 e 6.

Tabela 5.9. Resumo dos resultados do tratamento das soluções de MC-LR com ozônio gasoso na concentração constante de 0,3 mg L<sup>-1</sup>.

Ensaio	[ ] MC-LR mg L <sup>-1</sup>		Tempo (min)
	Inicial	Final	
1	5	2,56	15
		0,61	60
2	0,1	<b>ND</b>	10
			15
			30
3	0,1	<b>ND</b>	3
			6
			10
4	0,5	<b>ND</b>	5

ND = Não Detectado.

Tabela 5.10. Resumo dos resultados do tratamento das soluções de MC-LR com solução estoque de ozônio (diferentes doses) em água ultrapura.

Ensaio	[ ] MC-LR mg L <sup>-1</sup>		Dose O <sub>3</sub> mg L <sup>-1</sup>
	Inicial	Final	
5	0,1	<b>ND</b>	0,08
			0,01
			0,07
			0,02
			0,09
			0,01
6	0,25	<b>ND</b>	0,24
			0,01
			0,23
			0,02
6	0,25	<b>ND</b>	0,30
			0,09
			0,08
			0,05
6	0,25	<b>ND</b>	0,05
			0,09
			0,19

ND = Não detectado.

#### 5.4. Testes com amostra real

Uma amostra de água superficial cuja concentração de MC-LR foi determinada na concentração de  $0,06 \text{ mg L}^{-1}$  foi dosada com soluções estoque de ozônio gasoso em água ultrapura (Ensaio 8 e 9). O tempo de reação empregado em todos os ensaios foi de 3 horas.

Diferentes doses de MC-LR na água superficial foram empregadas, através de diluição da amostra, na reação com ozônio utilizando-se diferentes doses do mesmo, conforme tabela abaixo:

Tabela 5.11. Resumo dos resultados do tratamento com ozônio de amostra de água superficial contendo MC-LR.

[ ] MC-LR $\text{mg L}^{-1}$		Dose $\text{O}_3$ $\text{mg L}^{-1}$
Inicial*	Final	
0,05	0,003	1,66
0,03	0,0004	4,16
0,03	ND	6,00

ND = Não Detectado. \*Concentração considerando a diluição da amostra na solução de ozônio.

A exemplo dos demais ensaios a remoção total de MC-LR foi verificada em concentrações mais baixas, sendo necessário uma  $6,00 \text{ mg L}^{-1}$  de ozônio para remoção de  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$  de MC-LR em 100 %.

Comparando-se os ensaios de ozonização da amostra de água superficial com as amostras sintéticas, mesmo as soluções de MC-LR de altas concentrações requerem doses mais baixas de ozônio quando comparado com a amostra de água superficial. O ensaio onde uma solução de MC-LR de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  necessitou de uma dose de  $0,09 \text{ mg L}^{-1}$  de ozônio pra remoção total da toxina, já a amostra de água superficial contendo  $0,03 \text{ mg L}^{-1}$  de MC-LR requereu uma dose de ozônio de  $6,00 \text{ mg L}^{-1}$ , sendo necessário quase 10 vezes mais de ozônio.

A explicação para esses resultados pode estar vinculado ao fato de que o ozônio, pode reagir com componentes da matriz (Hoigné, 1994). O teste de UV 254 nm é uma alternativa rápida do conteúdo de matéria orgânica de amostras de água

(Penitsky, 2003), para a amostra de água superficial UV 254 nm teve uma absorvância de 0,354, levando-se a concluir que a amostra possui uma carga relativamente grande de matéria orgânica e esta pode competir com MC-LR na reação com ozônio.

Outro fato importante é que a condutividade obtida para a amostra foi de  $11,6 \text{ ms cm}^{-1}$ , indicando um alto conteúdo de íons dissolvidos, sabe-se que em presença de íons dissolvidos, como cloretos, o ozônio é bastante consumido (Paprocki, 2008).

A Figura 5.16. mostra a comparação da ozonização na amostra sintética, solução de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  de MC-LR, e da amostra de água superficial ( $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ ).

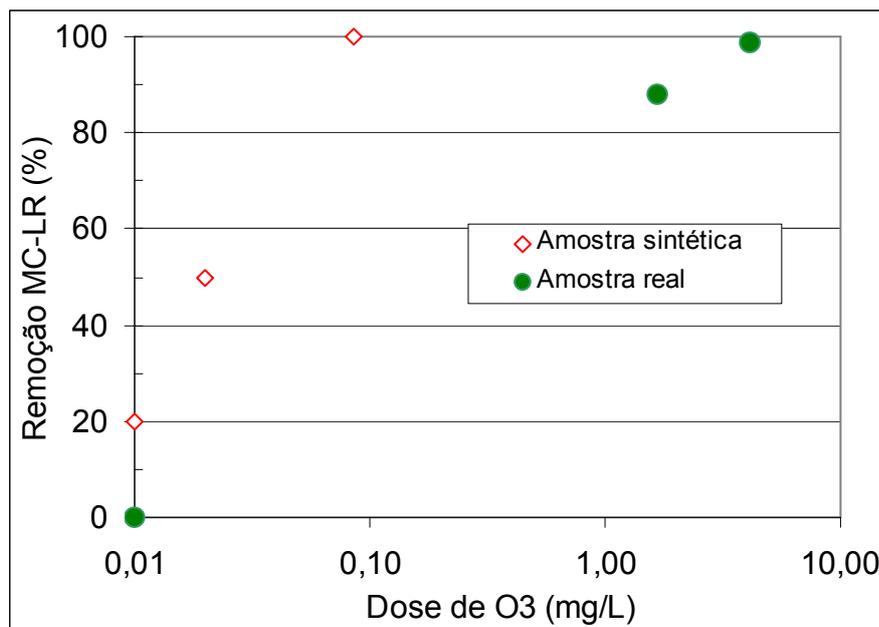


Figura 5.16. Percentual de remoção de MC-LR ( $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ ) em amostra real e amostra sintética ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) para diferentes doses de ozônio.

Como é mostrado na Figura 5.17. as doses de ozônio de  $4,16$  e  $6 \text{ mg L}^{-1}$  foram as doses suficientes para que a concentração de MC-LR ( $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ ) estivesse abaixo do limite máximo estabelecido para MC-LR,  $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , pela Portaria 518,2004 (Portaria de potabilidade da água).

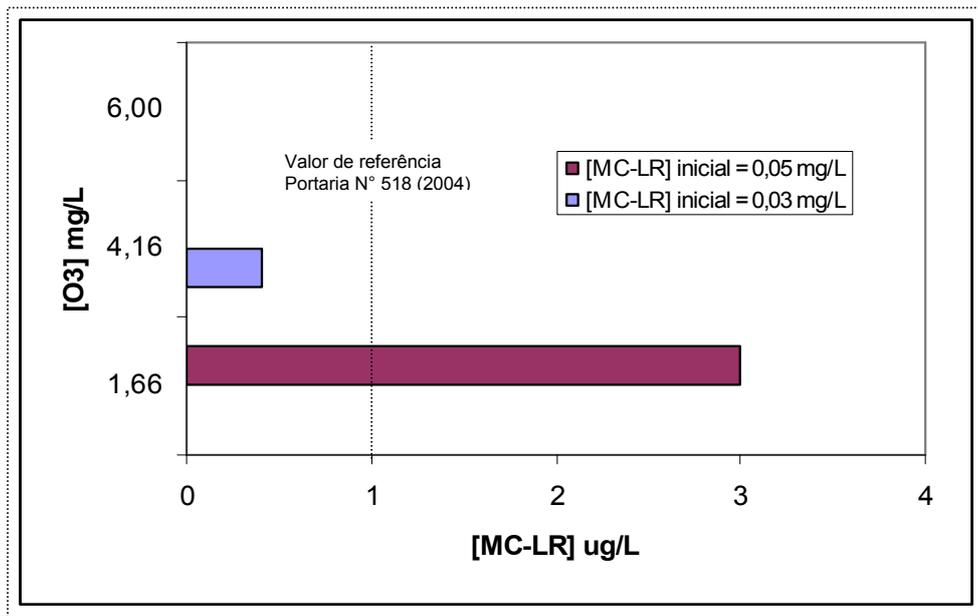


Figura 5.17. Resultados do tratamento da amostra de água superficial com ozônio com destaque para o valor de referência ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) estabelecido pela legislação.

A Figura 5.18 apresenta os cromatogramas de análise da amostra real antes e depois do tratamento por ozonização.

#### 5.4.1. Avaliação da toxicidade

Testes de toxicidade de bioensaio em camundongo foram realizados pelo Laboratório Bioensaios Análises e Consultoria Ambiental Ltda. Os testes foram aplicados na amostra de água superficial antes e depois de passar pelo tratamento com ozônio. A amostra ozonizada utilizada para o teste foi a amostra onde não foi detectada a presença de MC-LR após o tratamento com  $\text{O}_3$ .

O peso normal do fígado de camundongos não contaminados é de até 6% da massa corporal total. Se a relação peso do fígado/massa corporal dos camundongos contaminados for maior que 6%, a alga é considerada hepatotóxica. Para a amostra de água superficial antes da ozonização, a relação foi de 6,5 % e após a remoção total da MC-LR a relação foi de 6,0%. Além de comprovar a remoção total de MC-LR na amostra após ozonização o teste de toxicidade indicou que os subprodutos da toxina ozonizada não pareceram inibir a proteína fosfatase, não sendo tóxicos para camundongos, confirmando os ensaios realizados Brooke *et al.* (2006).

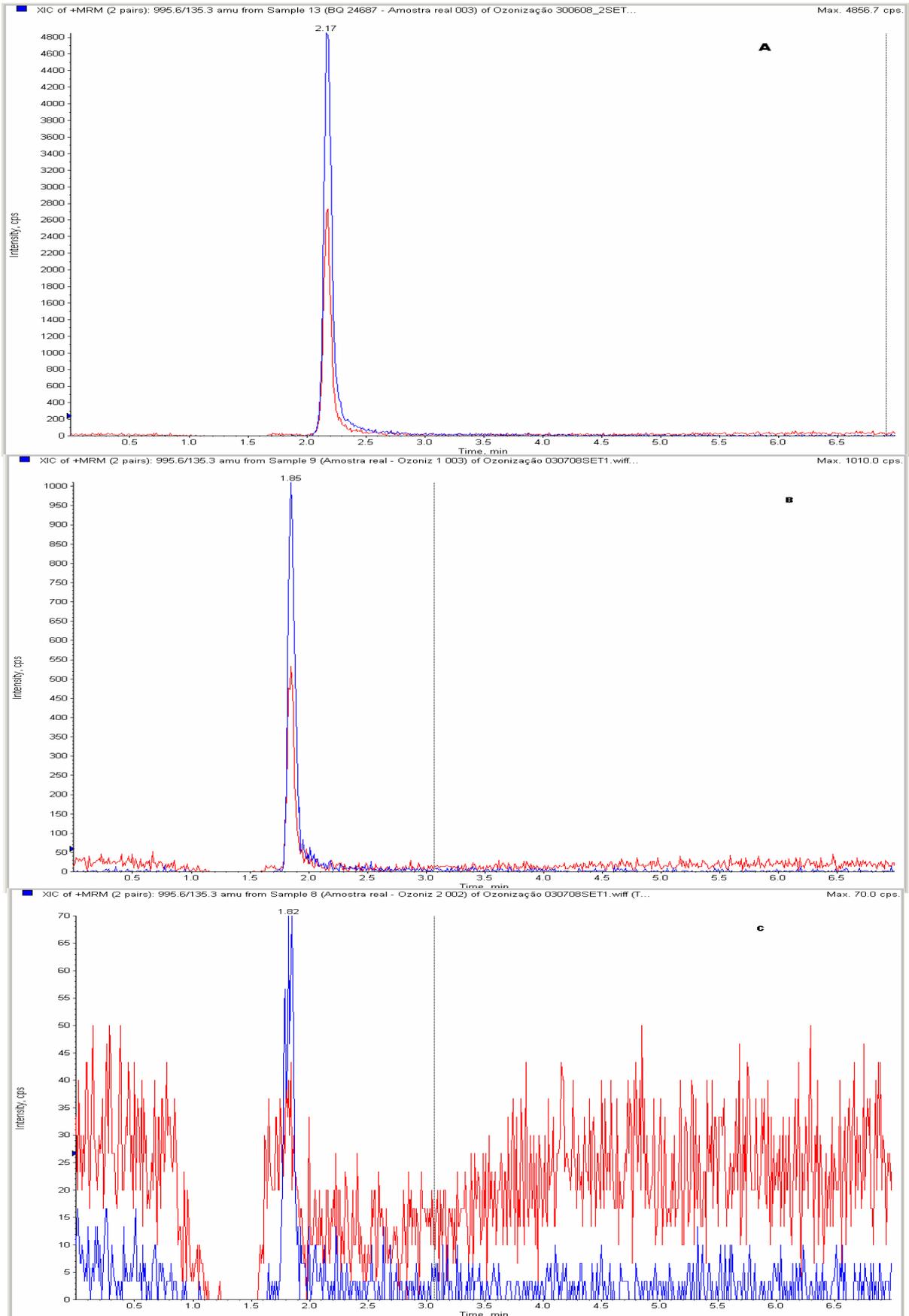


Figura 5.18. Cromatogramas de análises da amostra de água superficial contendo MC-LR ( $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ ), sem ozonização (A), ozonizada com  $1,66 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{O}_3$  (B) e  $4,16 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{O}_3$  (C).

## 6. CONCLUSÕES

- **Ozonização**

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que a ozonização foi efetiva para remoção de microcistina-LR mesmo em níveis mais altos do que os comumente encontrados em águas de abastecimento público.

O tratamento com ozônio gasoso, em concentração constante de  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ , das soluções de MC-LR foi capaz de remover 87,7 % da toxina em 60 min de reação. O tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ) determinado para MC-LR em contato com ozônio foi de 20,66 min e a constante cinética de pseudo primeira-ordem da reação foi  $K' = 0,0337 \text{ min}^{-1}$ .

O tratamento por dosagem com solução estoque de ozônio, permitiu concluir que concentrações mais altas de MC-LR requerem doses maiores do oxidante, quando comparadas à concentrações mais baixas da toxina. Em pH 5 uma dose menor de ozônio foi requerida para remoção de MC-LR, quando comparado ao pH 2, concluindo-se que no pH 5 os radicais hidroxilas ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) já formados auxiliaram na oxidação.

Nos ensaios com amostra real (água superficial) contendo MC-LR foi possível verificar que maiores doses de ozônio são requeridas para remoção total de microcistinas quando comparados à amostra sintética, isso se deve à componentes presentes na matriz, como a matéria orgânica que também reagem com ozônio, havendo uma competição. O alto valor medido para condutividade na amostra, também é um indicativo de que outras substâncias, íons dissolvidos, possam ter reagido com o ozônio além da MC-LR. A dose de ozônio aplicada foi suficiente para

que a remoção total de MC-LR ocorresse, atendo assim o valor máximo aceitável para microcistinas ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) adotado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e incorporado no adendo das Normas para Qualidade da Água tratada revisado em 2004 (Portaria N° 518, 2004).

Com a remoção total da MC-LR da amostra de água superficial houve também a remoção da sua toxicidade e os subprodutos da reação entre MC-LR e o ozônio não apresentaram efeitos tóxicos.

- **Otimização**

Na otimização do método de análise de MC-LR por LC-MS/MS, foi possível concluir que colunas de menores diâmetros (50 mm) permitem obter-se uma melhor sensibilidade na análise, visto que, essas colunas permitem o uso de fluxos mais baixos. Isso é observado principalmente para moléculas de grande tamanho, como é o caso da MC-LR. Uma melhor ionização é obtida quando o componente orgânico da fase móvel é acetonitrila e quando o aditivo da fase é uma combinação de acetato de amônio 2 mM e ácido fórmico 0,1 %.

- **Validação**

Os parâmetros avaliados durante a etapa de validação foram considerados satisfatórios, pois estiveram dentro dos valores sugeridos na literatura (INMETRO, 2007 e Comunidade Européia, 2002). Obteve-se linearidade para MC-LR na faixa de 0,05 a  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  ( $r^2 > 0,99$ ). Os ensaios de recuperação estiveram dentro dos critérios estabelecidos para faixa trabalhada ( $0,1$  a  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), pois apresentaram valores de recuperação entre 70 e 120%. O método também apresentou boa repetitividade e reprodutibilidade, com C.V. (%) < 20.

Não foi observado efeito das matrizes, água potável e água superficial, na análise de MC-LR em LC-MS/MS, mostrando que essa técnica é específica e seletiva para esta análise. A técnica de LC-MS/MS também se mostrou bastante sensível para detecção e quantificação de MC-LR, obtendo-se LOD e LOQ muito abaixo o limite máximo estabelecido na legislação ( $<1 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANO, C.L. **Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) no material particulado atmosférico na região de Candiota/RS.** Porto Alegre. 2002. 112p. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

ALLIS, Orla; Dauphard, J.; Hamilton, B. *et al.* Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry Application, for the Determination of Extracellular Hepatoxins in Irish Lake and Drinking Waters. **Analytical Chemistry**. v. 79, p 3436-3447. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria N° 518, de 25 de março de 2004.

BRASIL. Ministério do Trabalho. Fundação Nacional de Saúde. Cianobactérias na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano. Brasília, 2003. 90 p.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia **Orientação sobre validação de ensaios químicos – DOQ-CGCRE-008.** Brasília, 2007. 24 p.

BRITO, N. M.; Junior, O. P. A.; Polese L. *et al.* Validação de métodos analíticos: Estratégias e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

- BROOKE, Samuel; Newcombe, Gayle; Nicholson, Brenton *et al.* Decrease in toxicity of microcystins LA and LR in drinking water by ozonation. **Toxicon**. V.48, p.1054-1059. 2006.
- CARMICHAEL, Wayne W. Toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, v. 270, p. 78-86, 1994.
- CARMICHAEL, Wayne W.; Bunner, D.; Eloff, J.N. *et al.* Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**, v. 26, p. 971-973, 1998.
- CHORUS, I.; Bartram, J.; Harada, K. Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. **London: E&FN Spon**. 1999.
- DAHLMANN, Jens; Budakowski, Wes R.; Luckas Bernd. Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry based method for the simultaneous determination of algal and cyanobacterial toxins in phytoplankton from marine waters and lakes followed by tentative structural elucidation of microcystins. **Journal of Chromatography A**, v. 994, p. 45-57, 2003.
- DAHLMANN, Jens; Luckas, B. Microcystin analysis in drinking and surface water using a highly sensitive LC/MS/MS direct injection technique. **Application note, Applied Biosystems**. 2005.
- EUROPEAN COMUNITIES. Commission Decision 2002/657/EC of 12 august. Official Journal of the European Communities. 2002.
- GAJDEK, Piotr; Lechowski, Zbigniew; Bochnia, Tadeusz *et al.*; Decomposition of microcystins-LR by Fenton oxidation. **Toxicon**. v.39, p.1575-1578. 2001.
- GUNTEN, U. V. Ozonization of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. **Water Research**. v.37, p.1443-1467. 2003.

- GUNTEN, U. V. Ozonization of drinking water: Part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. **Water Research**. v.37, p.1469-1487. 2003.
- HALL, T.; Hart, J.; Croll, B. *et al.* Laboratory-Scale Investigations of Algal Toxin Removal by Water Treatment. **Water and Environment Journal**. v. 14, p. 143-149. 2007.
- HARADA, Ken-Ichi; Murata, Hideaki; Qiang, Zhang *et al.* Mass spectrometry screening method for microcystins in cyanobacteria. **Toxicon**. v.34, p.701-710. 1996.
- HOIGNÉ J.; Bader H. Determination of ozone in water by indigo method. **Water Research**. v.15, p.449-456. 1981.
- HOIGNÉ J.; Bader H. Characterization of water quality criteria for ozonation processes. Part II: Lifetime of added ozone. **Ozone Science Engeniring**. v.16, p.121-134. 1994.
- JÚNIOR, Helio A.; Bustillos, O.V.; Pires, M. A. F *et al.* Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em “tandem” (CLAE-EM/EM). **Química Nova**, v. 29, p. 586-592, 2006.
- JURCZAC, Tomasz; Tarczynska, M.; Izydorczyk K. *et al.* Elimination of microcystins by water treatment processes – exemples from Sulejow Reservoir, Poland. **Water Research**. v. 39, p. 2394-2406. 2005.
- KULL, Tomas. P.J.; Sjövall, Olli. T.; Tammenkoski *et al.* Oxidation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR by chlorine dioxide: Influence of natural organic matter. **Environmental Science Technology**. v.40, p.1504-1510. 2006.

KUNZ, A.; Freire, R. S.; Rohwedder, J. R.; Duran, N.; Mansilla, H; Rodriguez, J., **Química Nova**. v. 22, p. 425. 1999.

YUAN, Moucun; Carmichael, Wayne W.; Hilborn, Elizabeth D. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities em Caruaru, Brazil 1996. **Toxicon**, v. 48, p. 627-640, 2006.

LANÇAS, Fernando M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: Rima. 2004. 62p.

MOMANI, Fares A.; Simith, Daniel W.; El-Din, Mohamed G. Degradation of cyanobacteria toxin by advanced oxidation processes. **Journal Hazardous Materials**. V.150, p.238-249. 2008.

MORRIS, Robert J.; Williams, David E.; Luu, Hue A. *et al.* The adsorption of microcystins-LR by natural clay particles. **Toxicon**. V. 38, p.303-308. 2000.

NICHOLSON, B. C.; Burch, Michael D. Evaluation of analytical methods for detection, and quantification of cyanotoxins in relation to Australian drinking water. NHMRC-CRC. 2001.

PENITSKY, D. J. *Coagulation 101*. Em: Proceedings, Technology Transfer Conference, Universidade de Calgary, Alberta, Canadá, 2003.

ONSTAD, Gretchen D.; Strauch, Sabine; Meriluoto, Jussi *et al.* selective oxidation of key functional groups in cyanotoxins during drinking water ozonation. **Environmental Science Technology**. V.41, p.4397-4404. 2007.

PAPROCKI Alexandre; Pires, Marçal; Azevedo, Carla M. N. *et al.* Ozonation of azo dye acid black 1 under the suppression effect by chloride ion. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, in press 2008.

RODRÍGUEZ, Eva; Onstad, Gretchen D.; Kull, Tomas P.J. *et al.* Oxidative elimination of cyanotoxins: Comparison of ozone, chlorine, chlorine dioxide and permanganate. **Water Research**. V. 41, p.3381-3393. 2007.

SKOOG, A. **Princípios de análise instrumental**. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman. 2002. 936p.