

# ANÁLISE DE FLUORESCÊNCIA E BIOENSAIOS COMO MÉTODO DE CARACTERIZAÇÃO DA REMOÇÃO DE MICROCISTINA POR ADSORÇÃO PELO BAGAÇO DE CANA

A.R. Almeida<sup>1</sup>, T. S. Copelli<sup>2</sup> e T.A.Pagioro<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental- PPGCTA, Mestranda

<sup>2</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental- PPGCTA, Mestranda

<sup>3</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental- PPGCTA, Professor

E-mail: [alinealmeida@utfpr.edu.br](mailto:alinealmeida@utfpr.edu.br)

**RESUMO** – O processo de tratamento de água para consumo humano, quando apresenta cianobactérias na água a ser tratada, pode promover lise dessas células e algumas espécies liberam toxinas, que, dependendo das concentrações dessas na água tratada ocasiona a possibilidade de óbito ao ser humano, pois o tratamento convencional não consegue retê-las facilmente. Diante disso, o presente trabalho avaliou o efeito da adsorção do bagaço de cana com filtro de areia sobre a capacidade de remoção de microcistina do cultivo da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*. O uso do bagaço junto ao filtro de areia sugeriu uma possível alternativa, somado a alta disponibilidade e baixo custo desse subproduto, para retenção da microcistina. O monitoramento da toxina foi através da análise de fluorescência e bioensaios ecotoxicológicos com *Daphnia magna* que apresentaram uma possível viabilidade sem a demanda de recursos sofisticados ou técnicas muito apuradas para identificar a eficiência da remoção da microcistina.

## 1. INTRODUÇÃO

O crescimento das florações de cianobactéria ocorre principalmente devido a excesso de compostos fosfatados e nitrogenados, o Brasil por possuir alta produção agrícola faz o uso constante de fertilizantes, esses são ricos naqueles componentes que no solo podem atingir o lençol freático e favorecem a eutrofização da água (BRASIL, 2003). Assim como a descarga de esgoto doméstico e industrial sem tratamento também contribuem para esse crescimento.

O maior problema das florações de cianobactéria é que algumas espécies eliminam substâncias tóxicas para o meio ambiente; e dependendo da concentração e do tempo de contato com essas, podem levar tanto o animal como o homem a óbito; por exemplo, a morte de 70 pessoas em Caruaru, Pernambuco, durante tratamento de hemodiálise utilizando a água contaminada com toxina de cianobactéria (SANCHES *et al.*, 2012; e CARVALHO *et al.*, 2013).

Quando a água a ser tratada para o abastecimento humano apresenta cianobactérias demanda tanto um maior custo operacional como um maior tempo para melhor eficiência no processo do tratamento, principalmente, nas etapas de coagulação, filtração e sedimentação. Tendo ainda, nas duas primeiras etapas citadas, o perigo de haver rompimento das células de cianobactéria e liberação de toxina para a água (GIJSBERTSEN-ABRAHAMSE *et al.*, 2006). Mesmo assim, acontece dessas etapas não serem eficientes o suficiente; e ser necessário a adsorção com carvão ativado, o que gera um custo ainda maior para as estações de tratamento de água, já que a maior parte desse é importado (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008).

Os processos convencionais de tratamento da água não sendo eficientes para remover toxinas de cianobactérias da água, estimulam o desenvolvimento de pesquisas com o uso de coagulantes alternativos, filtros de membrana, processos oxidativos avançados; e uso de bioadsorventes para isso, visando a minimização de recursos não renováveis, de subprodutos e a sustentabilidade (MOLICA *et al.*, 2002; GIJSBERTSEN-ABRAHAMSE *et al.*, 2006; e BRASIL, 2003).

Verificando essa necessidade e aproveitando o bagaço de cana-de-açúcar, que constitui um subproduto de 291,3 kg por tonelada de cana processada (CONAB, 2013), para o Brasil cuja safra 2013/2014 foi de 658,8 milhões de toneladas (CONAB, 2014), permite a utilização desse recurso renovável, que já apresenta viabilidade de adsorção, como um potencial adsorvente sustentável para retenção de cianotoxina (MONACO *et al.*, 2002; MOLICA *et al.*, 2013).

A microcistina é uma toxina hepatotóxica produzida pela cianobactéria *Microcystis* e outras; e é uma das mais encontradas em mananciais de abastecimento, o limite máximo permitido dela na água potável é de  $1,0 \mu\text{g. L}^{-1}$ , conforme a Portaria 2914/2011 (BRASIL, 2011). Uma forma de analisá-la é através de testes de ecotoxicidade, que podem ser eficientes instrumentos de avaliação da qualidade da água e/ou sedimento (MENDONÇA, 2006). Esses bioensaios ecotoxicológicos ou testes de ecotoxicidade podem apresentar uma análise quantitativa e qualitativa dos efeitos tóxicos de diversos contaminantes sobre os organismos aquáticos (MONTEIRO, 2000).

Os bioensaios utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna* são realizados através de ensaios normatizados pela NBR 12713:2009 (ABNT, 2009); e dividem-se em testes de toxicidade agudo e crônico, tendo como maior objetivo verificar os efeitos adversos causados por um algum composto tóxico (DAHMS *et al.*, 2011).

Os testes agudos avaliam a dose ou a concentração de um agente tóxico que tenha capacidade de produzir efeitos aos organismos expostos a um período relativamente curto e

possibilitam determinar a imobilidade ou a mortalidade a 50% da população por métodos estatísticos (RESTANI, 2011).

Como a quantificação das toxinas das cianobactérias depende de um aparato técnico especializado e equipamentos sofisticados, de modo a facilitar o monitoramento de toxicidade, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da análise por fluorescência e por bioensaios agudos com *Daphnia magna* para verificar a retenção de microcistina em filtro de areia com bagaço de cana.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O cultivo de cianobactéria da espécie *Microcystis aeruginosa* foi realizado com a cepa B005 cedida pelo Laboratório de Botânica da UFSCAR, que possui capacidade de produção de toxinas do tipo MC-LR em 98% do total. Manteve-se o cultivo sob aeração constante em meio ASM-01, temperatura entre 25 e 28°C, até a fase exponencial de crescimento, quando o número de células atingiu o  $10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>, a contagem foi realizada em microscópio eletrônico utilizando câmara de Neubauer.

No décimo quarto dia, armazenou-se 4,5 L do cultivo em garrafa de polietileno, submetendo-o a três ciclos de congelamento e descongelamento, para que todas as células de cianobactéria sofressem lise de sua parede celular e liberassem toda microcistina ao meio de cultivo.

O bagaço de cana foi lavado com água destilada com três enxágues; em seguida foi mantido em estufa a 60°C por 4 horas. Triturou-se em liquidificador industrial na faixa de 2,80 a 4,00 mm de granulometria (MONACO *et al.*, 2002).

Foram desenvolvidos seis suportes de filtro com altura de 14 cm em batelada, cada um filtrando 500 mL de cultivo; sendo três de filtro denominado AREIA que conteve apenas leito de areia média com faixa granulométrica entre 0,250 mm a 0,125 mm na altura de 80 mm e, numa área equivalente a 50 cm<sup>2</sup> de filtração; e os três filtros denominados CA com proporção 1:1 de areia média com a mesma faixa granulométrica citada e bagaço, mantendo altura e área do anterior.

Os filtrados foram armazenados em volume de 50 mL para a análise no fluorescência e no HPLC (TECPAR); e 450 mL para teste de toxicidade com *Daphnia magna*. A análise no fluorescência foi realizada no equipamento modelo Cary Eclipse (marca Varian), tendo como

controle o meio de cultivo puro e sequencialmente as amostras denominadas AREIA e CA. Os parâmetros utilizados para comprimento de onda no fluorescência foram os citados no trabalho de ZIEGMANN *et al.* (2010), compreendendo o sinal de emissão entre 200 nm a 750 nm; e passo de 5 nm.

Os testes de toxicidade com *Daphnia magna* foram realizados, de acordo com a norma NBR 12713:2009 (ABNT, 2009), triplicatas em recipientes de 50 mL com 40 mL de amostra em cada um. Em cada recipiente foram colocados 20 organismos neonatos entre 6 h e 24 h, nas diluições de 100%, 75%, 50%, 25% e 10%. Da mesma forma foi utilizado um controle sem a presença de microcistinas apenas com água de diluição.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, apresentam-se os resultados obtidos pelo HPLC, laudo técnico fornecido pelo TECPAR (Centro de Análises e Ensaio Toxicológicos, Laboratório de Tecnologias Ambientais e Agronômicas do Estado do Paraná) para quantificação de toxina na amostra antes e após o tratamento de retenção de microcistina pela filtração:

Tabela 1- Dados quantitativos de microcistinas por HPLC (TECPAR, 2014)

Amostra	Média da Concentração de Microcistina MC-LR ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Desvio Padrão
Cultivo Puro	89,0	0,50
Areia	2,42	0,36
CA	3,23	0,06

Esses resultados foram utilizados como parâmetro para as análises de fluorescência e bioensaios com *Daphnia magna*, já que o método de quantificação de microcistina por HPLC é o mais eficiente atualmente. Verificando-se que houve retenção de microcistina em 97,3% de eficiência com filtro composto só com areia média (h=80 mm); e 96,4% para o filtro composto com areia média (h=40 mm) e bagaço de cana (h=40 mm).

As análises de fluorescência foram realizadas utilizando-se as médias das triplicadas dos dados de emissão das amostras para os comprimentos de onda; e os resultados foram apresentados na Figura 1, demonstrando que o sinal de incidência vai diminuindo conforme o comprimento de onda vai aumentando, com destaque ao intervalo entre 500 e 680 nm que equivale ao sinal de pigmentos da cianobactéria, conforme relata ZIEGMANN *et al.* (2010). No caso do tratamento de remoção de microcistina tanto para o filtro de areia como para o bagaço de cana ocorreu a diminuição do sinal comparado ao do cultivo puro.

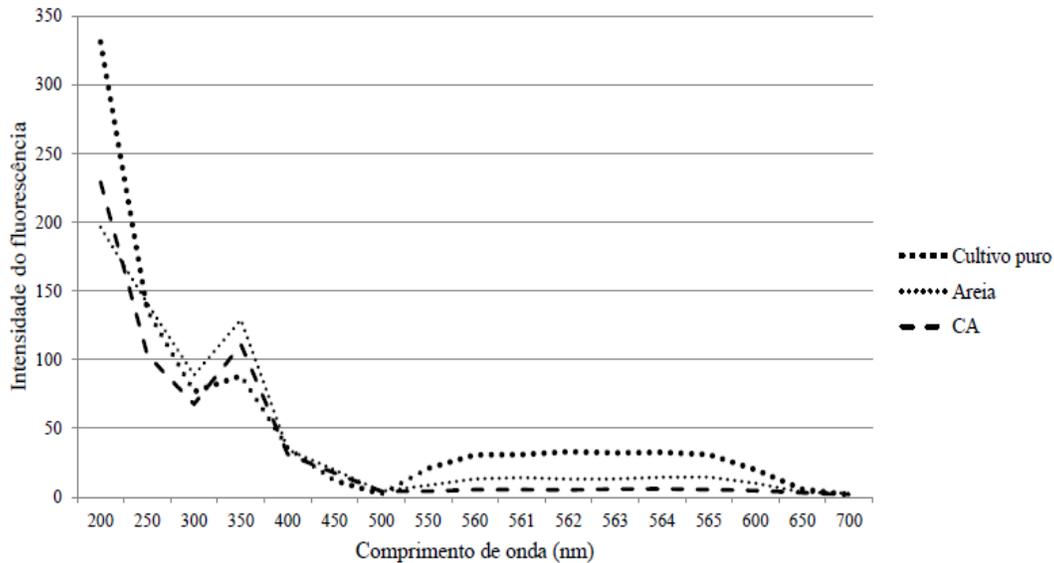


Figura 1- Decaimento de intensidade nas amostras no intervalo de 200 a 700 nm de comprimento de onda.

A  $CE_{50}$  para as amostras foi calculada através do programa Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON *et al.*, 1977) sendo de  $34,87 \mu\text{g.L}^{-1}$ ,  $1,51 \mu\text{g.L}^{-1}$  e  $1,46 \mu\text{g.L}^{-1}$  para as amostras cultivo puro, areia e CA respectivamente, conforme apresentado na Figura 2 abaixo.

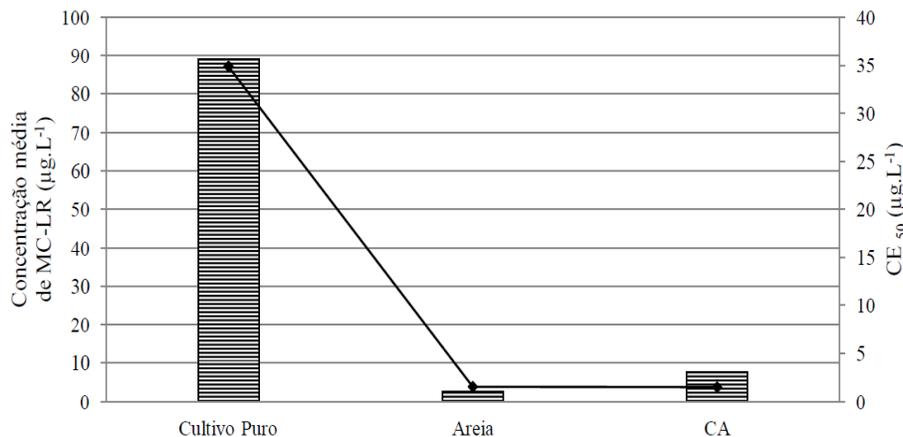


Figura 2- Concentração média de microcistina MC-LR e de Concentração efetiva ( $CE_{50}$ ), 48h para *Daphnia magna* em cada amostra.

A amostra tratada com o conjunto de filtro de areia e bagaço de cana continha uma menor quantidade de microcistina, porém, houve um percentual de imobilidade maior para essas amostras (95% e 96,67%) quando comparada com a amostra de cultivo puro (91,67% e 90%) para as diluições de 100% e 75%, como apresentado abaixo pela Figura 3.

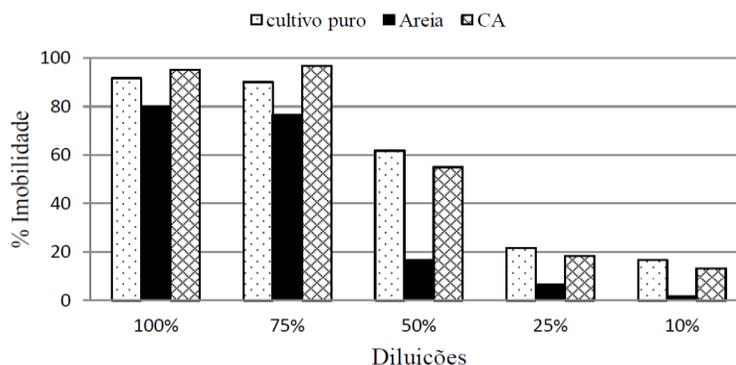


Figura 3- Percentagem de imobilidade de *Daphnia magna* após 48h de exposição às amostras de cultivo puro, cultivo após filtro de areia (Areia); e cultivo após conjunto de filtro de areia e bagaço de cana (CA).

As cianobactérias são responsáveis pela produção de polissacarídeos extracelulares (LOMBARDI; VIEIRA, 1998), que podem ser absorvidos pelos cladóceros (NOGUEIRA *et al.*, 2005). A esses compostos bioativos também pode ser atribuído um efeito adverso, conforme Trabeau *et al.*, (2004) que relacionou os efeitos adversos observados em *Daphnia* a polissacarídeos da cápsula de *Microcystis*.

Este trabalho não verificou os compostos acima mencionados, entretanto podemos indicar de acordo com Takenaka, (2007) que a presença desses metabólitos poderia aumentar a toxicidade dos extratos que os daphnídeos foram submetidos, com concentrações relativamente mais baixas de microcistinas. Sendo assim, pode-se afirmar que diversos fatores interferem na toxicidade e outras variantes também podem contribuir para que amostras com menor concentração de toxinas possam ser mais tóxicas que outras com concentrações mais elevadas (TAKENAKA, 2007).

## 4. CONCLUSÃO

As amostras contendo microcistinas, mesmo após o processo de adsorção ainda apresentou toxicidade, mesmo com concentrações mais baixas de microcistina. Esse fato pode ser atribuído a outros metabólitos secundários produzidos pela cianobactéria em questão que não foram analisadas neste trabalho.

Os resultados obtidos pela análise de fluorescência corresponderam à retenção de microcistina tanto pelo bagaço de cana como pelo filtro composto apenas com areia, trazendo a viabilidade dessa análise para monitoramento de microcistina, assim como a necessidade de se verificar tempo limite de adsorção e tamanho de leito diferente para uma ótima taxa de retenção da toxina.

## 5. REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NBR12713: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia ssp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2009.

ALBUQUERQUE, E. C.J.; MÉNDEZ, M. O. COUTINHO, A.R.; FRANCO, T. T. A. Removal of cyanobacteria toxins from drinking water by adsorption on activated carbon fibers. *Materials Research*, v. 11, n.3, p. 371-380, 2008.

BRASIL. *Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano*. Brasília: Ministério da Saúde- Fundação Nacional da Saúde, p. 56, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral da Vigilância em Saúde Ambiental. *Portaria n.2914*, 2011.

CARVALHO, M. C.; AGUJARO, L.F.; PIRES, D.A.; PICOLI, C. *Manual de cianobactérias planctônicas: legislação, orientações para o monitoramento e aspectos ambientais*. São Paulo: CETESB, 56 p., 2013.

CONAB. *Perfil do Setor do Açúcar e do Alcool no Brasil Safra 2011/2012*- Diretoria de Política Agrícola e Informações, Superintendência de Informações do Agronegócio. Responsáveis Técnicos: Ângelo Bressan Filho e Roberto Alves de Andrade. Brasília: CONAB, v.5, p.1-88, 2013.

CONAB. *Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, Safra 2013/2014-Quarto Levantamento*. Brasília: CONAB, p. 1-14, abr., 2014.

DAHMS, H.U.; HAGIWARA, A.; LEE, J.S. Ecotoxicology, ecophysiology, and mechanistic studies with rotifers. *Aquatic toxicology*, v. 101, p. 1-12, 2011.

GILSBERTSEN-ABRAHAMSE, A.J., SCHMIDT, W. CHORUS, I.; HEIJMAN, S.G.J. Removal of cyanotoxins by ultrafiltration and nanofiltration. *Journal of Membrane Science*. v. 276, p. 252-259, 2006.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C & THURRTON, R. B. Trimmed Spearman-Kärber methods for estimating median lethal concentration in toxicity bioassay. *Environmental Science Technology*. v. 11, p. 714-719, 1977.

LOMBARDI, A. T.; VIEIRA, A. A.H. Copper and lead complexation by high molecular weight compounds produced by *Synura* sp. (Chrysophyceae) *Phycologia*. v. 37, p. 34-39, 1998.

MENDONÇA, J. M. S. Avaliação da toxicidade de florações naturais e de cultura de cianobactérias: efeito sobre *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, Crustacea). Natal, 2006. 97 p. Dissertação (Mestrado em Bioecologia aquática). Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

MOLICA, R. J. R.; DUARTE, M. M. B.; AVELAR, F. P.; LIMA, N. M. F.; NEVES, C. C. L.; BARAUNA, O. S.; SILVA, P. W. S.; LEONIDIO, T. O. Adsorção de cianotoxinas em diferentes matrizes. In: BRASIL. 5º. *Caderno de Pesquisa de Engenharia de Saúde Pública*. 2º. Edição. Brasília: FUNASA, 2013, 166 p.

MONACO, P.A.L.; MATOS, A.T.; MARTINEZ, M.A.; JORDÃO, C.P. Eficiência de materiais orgânicos filtrantes no tratamento de águas residuárias da lavagem e despolpa dos frutos do cafeeiro. *Engenharia na Agricultura*, Viçosa, v. 10, n. 1-4, jan./dez., 2002.

MONTEIRO, N. J. C. Estudos da toxicidade da cepa de *Microcystis aeruginosa* RST 9501 da lagoa dos patos sobre cladóceros. Porto Alegre, 2000. 197 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia). Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

NOGUEIRA, P.F. M.; MELÃO, M. G. G.; LOMBARDI, A. T.; VIEIRA, A. A. H. The effects of *Anabaena spiroides* (Cyanophyceae) exopolysaccharide on copper toxicity to *Simocephalus serratatus* (Cladocera, Daphnidae). *Freshwater Biology*. v. 50, p. 1560-1567, 2005.

RESTANI, G. C. Efeitos de cepas tóxicas e não tóxicas de *Cilindrospermopsis raciborskii* sobre aspectos do ciclo de vida de *Daphnia laevis* (Cladocera, Daphnidae). Itajuba, 2011. 67 p. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Universidade Federal de Itajubá.

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

TRABEAU, M.; BRUHN-KEUP, R.; MCDERMOTT, C.; KEOMANY, M.; MILLSAPS, A.; EMERY, A.; STASIO JR, B. Midsummer decline of a *Daphnia* population attributed in part to cyanobacterial capsule production. *Journal Plankton Research*. v. 26, p. 942-961, 2004.

ZIEGMANN, M.; ALBERT, M.; MÜLLER, M.; FRIMMEL, F.H. Use of fluorescence fingerprints for estimation of bloom formation and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Water Research*, v. 44, p. 195-204, 2010.

TAKENAKA, R. A.; DELLAMANO-OLIVEIRA, M.J.; ROCHA, O. Toxicidade de extratos de florações de cianobactérias de reservatórios do rio Tietê, SP, aos dafinídeos *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, Crustacea). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*. v. 2, p. 147-156, 2007.