

IV-206 – ESTUDO AVALIATIVO EM RESERVATÓRIO PARA FIM DE ABASTECIMENTO PÚBLICO: IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MUCILAGEM

Patrícia Pereira Ribeiro Keller⁽¹⁾

Farmacêutica Bioquímica pela Universidade Federal de Goiás. Mestra em Engenharia do Meio Ambiente (PPGEMA/UFG). Técnica em Saneamento na SANEAGO.

Carlos Roberto A. dos Santos

Biólogo pela PUC-GO. Mestre em Biologia/Ecologia (UFG). Gerente de Proteção Ambiental e Qualidade do Produto na SANEAGO.

Endereço⁽¹⁾: Avenida Fued José Sebba, 1245, Jardim Goiás – Goiânia – GO - CEP: 74805-100 - Brasil - Tel.: (62) 3243-3589 - e-mail: patriciakeller@saneago.com.br

RESUMO

Reservatórios de acumulação em mananciais superficiais, destinados ao abastecimento público, possuem em seu metabolismo aquático possíveis fatores estressores bióticos e abióticos, sejam de origem endógena ou exógena. Variações bióticas e abióticas, relacionadas à sazonalidade, atividades antrópicas e diversidades ambientais, são precursoras da dinâmica e estrutura morfológica fitoplanctônica em sistemas aquáticos. Quando há o deslocamento do equilíbrio hídrico nos reservatórios, causas devem ser investigadas em prol da otimização de processos operacionais no tratamento; além de possíveis diagnósticos e prognósticos, pois a resiliência hídrica demanda tempo e a segurança da água tratada e distribuída ao consumidor deve ser garantida. Considerando a dinâmica do fluxo vertical de matéria orgânica dissolvida em reservatório, evidencia-se que substâncias excretadas por cianobactérias formam agregados mucilaginosos que se aderem a detritos e compostos orgânicos (bactérias, fungos, etc.) e inorgânicos (ferro, manganês, cálcio, etc.) formando uma estrutura filamentosa de baixa densidade (CASTRO, 2010). Assim, a pesquisa visa identificar e quantificar os compostos presentes em solução mucilaginosa fitoplanctônica em reservatório de abastecimento público, além de evidenciar sua estrutura morfológica por microscopia. Para tanto, utilizou-se procedimentos de liofilização, diálise, espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de energia dispersiva, espectrometria de massa, cromatografia aniônica de alto desempenho com detecção por pulso amperométrico, espectrofotometria UV/VIS/NIR, oxidação catalítica e Infravermelho não dispersivo. Verificou-se que a amostra tinha em sua composição 40% de açúcar total; 15% de proteínas; presença de lipídeos e surfactantes na fração orgânica; presença de íons moleculares compatíveis com glicose e seus isômeros na amostra hidrolisada, que também foram identificados por cromatografia aniônica, além da mistura glicose e galactose. Já na microscopia eletrônica de varredura evidenciaram-se linhas espectrais de carbono, oxigênio, silício e cálcio. A estrutura coloidal apresentada em forma de biofilme identificou substância mucilaginosa compatível com estrutura polissacarídea extracelular de cianobactérias; além da presença de bastonetes que reabsorvem parte da matéria orgânica dissolvida no biofilme, como fonte de carbono e nitrogênio.

PALAVRAS-CHAVE: Mucilagem, cianobactérias, resiliência hídrica, polissacarídeos, Reservatório do Ribeirão João Leite.

INTRODUÇÃO

Através de processos ativos e/ou passivos espécies fitoplanctônicas liberam grandes quantidades de matéria orgânica dissolvida (MOD) que podem interagir com outros ciclos biológicos em reservatórios. Fatores estressantes interferem na produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) por organismos fitoplanctônicos, sendo: estado fisiológico decorrente da idade celular, resposta a interações alelopáticas com outros organismos competidores, fatores que inibem o crescimento, como concentrações limitantes de nitrogênio e fósforo, ou intensidades de luz não compatíveis com sua pré-adaptação a este fator. É possível estímulos na produção de EPS, enquanto substrato, causados pela presença de bactérias que podem estar envolvidas em etapas de degradação (MECCHERI, 2010), assim como outros organismos eucarióticos.

Bagatini e colaboradores (2014) estudaram espécies fitoplanctônicas em reservatórios eutróficos com potencial para afetar o fluxo de nutrientes e gerar depleção de oxigênio, influenciando o ciclo biogeoquímico e até mesmo favorecer interação entre fitoplâncton e bactérias heterotróficas. Verificaram que essa associação é espécie-específica pela disposição de metabólitos orgânicos na biomassa. Essa variação está relacionada com a proporção de matéria orgânica liberada pelo fitoplâncton (EPS), principalmente polissacarídeos.

De Philippis e Vincenzini (1998) realizaram um levantamento de cianobactérias produtoras de EPS, considerando-as fonte produtoras de polissacarídeos. Polissacarídeos com altas concentrações de ácidos urônicos, grupos sulfato ou fosfato e piruvatos geralmente formam géis estáveis na presença de íons metálicos, característica mucilaginosa.

Vieira (2010) enfatizou que a matéria orgânica dissolvida pode causar eventos indesejáveis como o assoreamento, agravando as condições ambientais de reservatórios; todavia, também seriam capazes de promover eventos ecológicos de interesse científico, quando associados à sua produção por cianobactérias. Na MOD produzida por cianobactérias há grandes quantidades de EPS que podem ser utilizados como fonte de carbono e nitrogênio (relacionado à presença de proteínas associadas ao EPS) pelo zooplâncton; além de atividades enzimáticas bacterianas.

No Reservatório do Ribeirão João Leite, em 2015, final de período de chuva (abril), clima predominante tropical semi-úmido, ocorreu o surgimento de substância mucilaginosa com aspecto filamentososo, cor marrom, acompanhado da presença de espuma. Neste período, ao longo da coluna vertical do reservatório, observou-se maior concentração de nitrogênio na superfície e de fósforo em profundidades superiores a 22m; fenômeno coincidente à competição entre *Planktolybia limnetica* e *Alphanocapsa holsatica* evidenciada em monitoramento semanal coincidindo com um pool de *Radiocystis geminata*, que até então não era vislumbrada neste reservatório. Associando todas as ocorrências coincidentes, o estudo teve como objetivo determinar a composição físico-química da substância mucilaginosa e sua compatibilidade como produto de degradação e/ou proteção (EPS).

MATERIAIS E MÉTODOS

A área de estudo é o Ribeirão João Leite, situado no município de Terezópolis de Goiás, Goiás, Brasil. Este sistema lântico encontra-se em estado de maturação para fins futuros de abastecimento público de Goiânia e região metropolitana. O material, em estado coloidal com aspecto filamentososo foi coletado no período de seca (mês de julho) em 2015 (Figura 1), com pH 7,47, sendo armazenado à 10°C em frasco de vidro âmbar até o momento de preparação da amostra.



Figura 1: Imagem da amostra em estado coloidal e filamentososa no reservatório do Ribeirão João Leite
Fonte: foto própria da autora

Para a retirada do material particulado com gramatura superior a 2 mm utilizou-se peneira de polietileno, seguido por procedimento de subamostragem (segregação de 4 alíquotas de 500 mL) para realização das análises e armazenamento de contraprovas, conforme fluxograma apresentado na Figura 2.

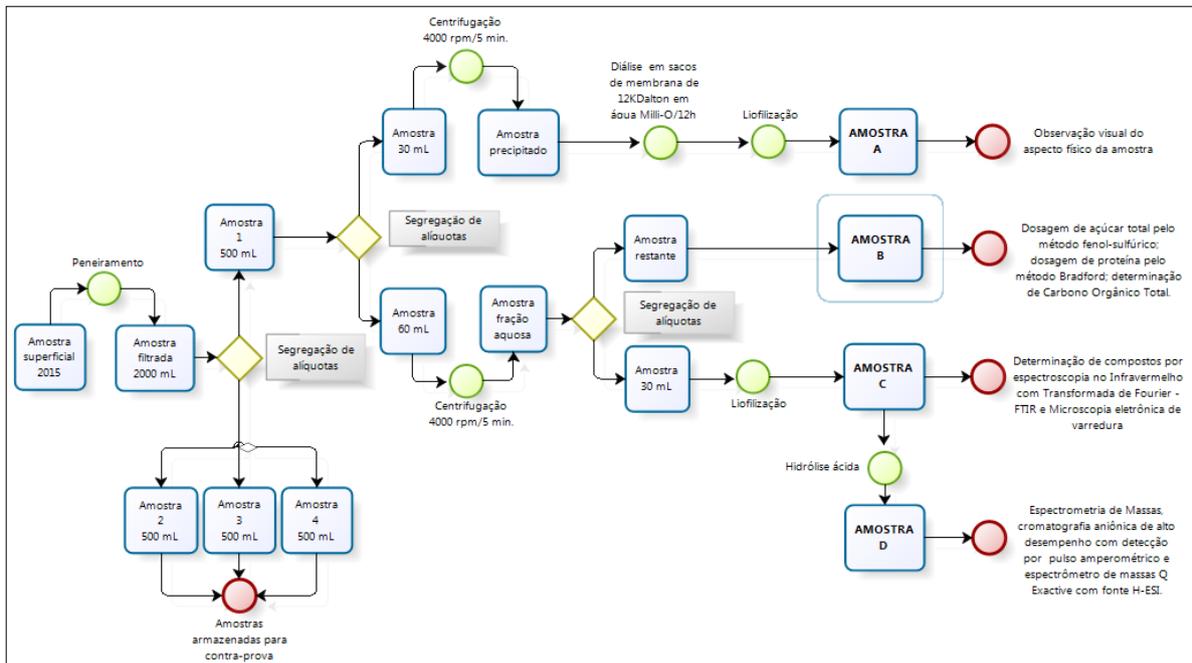


Figura 2: Fluxograma do procedimento de preparação das amostras para caracterização físico-química

Da amostra 1, uma alíquota de 30 mL foi centrifugada (4000rpm/5min.), sendo que o material precipitado sofreu diálise em saco de membrana de 12KDalton por 12 horas em água ultrapura Milli-Q e, posteriormente, foi liofilizado. Deste procedimento obteve-se a **AMOSTRA A**, que foi utilizada como material de observação visual do aspecto físico da amostra.

Desta mesma amostra 1, uma alíquota de 60 mL foi centrifugada (4000rpm/5min.), sendo que 30 mL da fração aquosa bipartida originaram a **AMOSTRA B**, que foi utilizada na determinação de açúcar total, proteínas e carbono orgânico total; e 30 mL, após liofilização, originaram a **AMOSTRA C**, que foi utilizada na determinação de compostos por espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier e também como material de observação na microscopia eletrônica de varredura. Quando parte da **AMOSTRA C** foi submetida à hidrólise ácida obteve-se a **AMOSTRA D**, que foi utilizada na determinação de produtos através da espectrofotometria de massas, por cromatografia aniônica de alto desempenho com detecção por pulso amperométrico e por espectrômetro de massas Q Exactive com fonte H-ESI.

A **AMOSTRA B** foi utilizada para determinação de açúcar total (análise do açúcar total pelo método fenol-sulfúrico) cujas absorbâncias das soluções forma determinadas por espectrofotômetro UV/VIS/NIR Lambda 1050, Perkin Elmer em comprimento de onda de 490nm; proteínas (análise de proteínas pelo método Bradford) cujas absorbâncias foram determinadas por Espectroscopia UV/VIS em comprimento de onda de 595nm; e do teor de carbono orgânico (oxidação por combustão catalítica e método de detecção por infravermelho não dispersivo) utilizando padrão biftalato de potássio.

A análise dos açúcares totais realizada pelo método fenol-sulfúrico utilizou como padrão a glicose em concentrações variando de 10 - 80 µg/mL. Em 0,5 ml de cada uma das soluções foram adicionados 2,5 mL de ácido sulfúrico e 0,5 mL de uma solução de fenol 5%. Em seguida, os tubos foram agitados em vortex e deixados em repouso por 30 minutos. As absorbâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro UV-VIS-NIR Lambda 1050, Perkin Elmer em comprimento de onda de 490 nm ($R^2=0,9895$). A amostra foi preparada a partir da diluição de 40 µL da **AMOSTRA B** em 0,5 mL de água e a esta solução foram adicionados 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 0,5 mL da solução de fenol 5%. Em seguida o tubo foi agitado em vortex e deixado em repouso por 30 minutos, sendo analisados no mesmo comprimento de onda dos padrões.

A análise de proteínas realizada pelo método de Bradford utilizou como padrão a albumina bovina nas concentrações variando-se de 0 – 50 µg/ml. Para cada 50 µL das soluções e da **AMOSTRA B** foram adicionados 150 µL de água e 900 µL do reagente de Bradford e as soluções foram deixadas em repouso por 10 min. As absorbâncias foram determinadas por Espectroscopia UV-VIS em comprimento de onda de 595 nm ($R^2=0,9906$).

A análise de carbono orgânico total (COT) foi realizada em equipamento TOC-L modelo CSN/CPN, utilizando-se como padrão o biftalato de potássio em concentrações variando de 10-100 ppm ($R^2=0,9503$).

A **AMOSTRA C**, diluídas em KBr, evidenciou espectros adquiridos utilizando-se a técnica de transmissão no Infravermelho com transformada de Fourier em equipamento *Bruker Vertex 70*. O espectro foi adquirido na faixa espectral de 400 – 4000 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} , sendo cada espectro o resultado da média de 64 medidas. O espectro no infravermelho da amostra foi comparado com dados da literatura para amostras de polissacarídeos (RAYA *et. al*, 2011).

A **AMOSTRA C** foi montada em fita adesiva de carbono sobre porta amostras de latão, e recoberta com ouro como material condutor. A inspeção composicional foi realizada pela técnica de espectroscopia de energia dispersiva (EDS). Utilizou-se um detector de raios X Oxford Instruments XmaxN, acoplado em um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) marca Jeol, modelo JSM-IT300 no modo SE (*Secondary Electrons*). As informações de composição obtidas dos espectros EDS foram qualitativas, já que a topografia irregular da amostra impede uma análise quantitativa precisa.

A **AMOSTRA C** foi hidrolisada com 30 mL de ácido clorídrico 4 M, à temperatura de 120°C, por 5 hs em digestor de micro-ondas Mars 6, marca CEM; identificada como **AMOSTRA D**. A solução foi resfriada e neutralizada com NaOH 6 M e uma alíquota de 50 µL da solução foi diluída em 1 mL de água e eluída através de colunas de troca iônica Amberlite (IRA 120, catiônica e IRA 410, aniônica). A solução resultante foi diluída em metanol/ácido fórmico 0,1% para uma concentração de 400 ppb e o espectro de massas de alta resolução da solução foi adquirido por infusão direta, em um espectrômetro de massas Q Exactive (ThermoScientific), com fonte H-ESI, operando em modo positivo em faixas de m/z 100-300 em/z 300-2000, nas seguintes condições: full scan, resolução 35.000, velocidade de injeção de 5 µL/min, gás de bainha 10,0 psi, gás auxiliar 3, spray de voltagem 4500 V, temperatura do capilar 300°C. A amostra foi analisada em modo positivo e negativo na faixa de massas m/z 300-2000, sendo comparada com padrões de oligossacarídeos maltose, maltotriose, maltotetraose e maltopentose (Sigma Aldrich). A amostra hidrolisada e o padrão de glicose (Sigma-Aldrich) foram analisados também em espectrômetro de massas TSQ Quantum, Thermo Scientific, com fonte H-ESI, operando em modo positivo, utilizando-se voltagem do spray 3500 V, sheath gas 10 unid. arbitrárias, auxiliar gás 5 unid. arbitrárias, temperatura do capilar 270°C, tube lens 75. Para as duas amostras, foi selecionado o íon m/z 203,60 o qual foi submetido à fragmentação em Q2 utilizando-se o gás argônio e energia de colisão de 25 eV.

A **AMOSTRA D** hidrolisada (500 µL) e os padrões foram aplicados em resinas de troca iônica Amberlite (IRA 120, catiônica e IRA 410, aniônica), seguido pela eluição de 10 vezes o volume da amostra com água deionizada. A amostra foi filtrada em membrana (0,45 µm) e analisadas por cromatografia aniônica de alto desempenho com detecção por pulso amperométrico (HPAEC/PAD), utilizando-se cromatógrafo Dionex ICS 5000, com detector eletroquímico ED50 e colunas CarboPac PA100 acopladas às respectivas pré-colunas. Para a análise foram utilizados os gradientes acetato de sódio em hidróxido de sódio (1 mL min⁻¹): 5 mM (0-2 min); 5 – 50 mM (2,1 a 8 min); 50 – 150 mM (8.1 a 11 min); 250 mM (11.1 a 15 min), 5 mM (15,1 a 20 min). Todos os reagentes utilizados na análise foram de alta pureza, dissolvidos em água ultrapura (18 M) e filtrados em membranas de 0,45 µm.

Da **AMOSTRA D**, 20 mL foi submetida à partição com acetato de etila (2x10 mL). Em seguida o solvente foi seco em MgSO₄, filtrado e o evaporado em evaporador rotativo. O resíduo sólido (3 mg) foi dissolvido em metanol/água/acetato de amônio e submetido à análise por infusão direta utilizando-se um espectrômetro de massas Q Exactive (ThermoScientific), com fonte H-ESI, operando em modo negativo, nas seguintes condições: full scan, resolução 35.000, velocidade de injeção de 5 µL/min, gás de bainha 10.0 psi, gás auxiliar 0, spray de voltagem 2500 V, temperatura do capilar 300°C.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A amostra apresentou-se após centrifugação, diálise e liofilização como material de coloração marrom claro, compatível com a cor da mucilagem *in loco*, esponjoso com aspecto fibroso, conforme Figura 3.



Figura 3: AMOSTRA A seca após centrifugação, diálise e liofilização

Foram quantificadas na amostra 40% de açúcar total e 15% de proteínas por espectroscopia UV/Vis; além de 19% de Carbono Orgânico Total, considerando a amostra seca e liofilizada de 700 µg/mL. Através da espectroscopia de infravermelho (FTIR), foram identificadas bandas de absorção característica de polissacarídeos, lipídeos e proteínas (Figura 4).

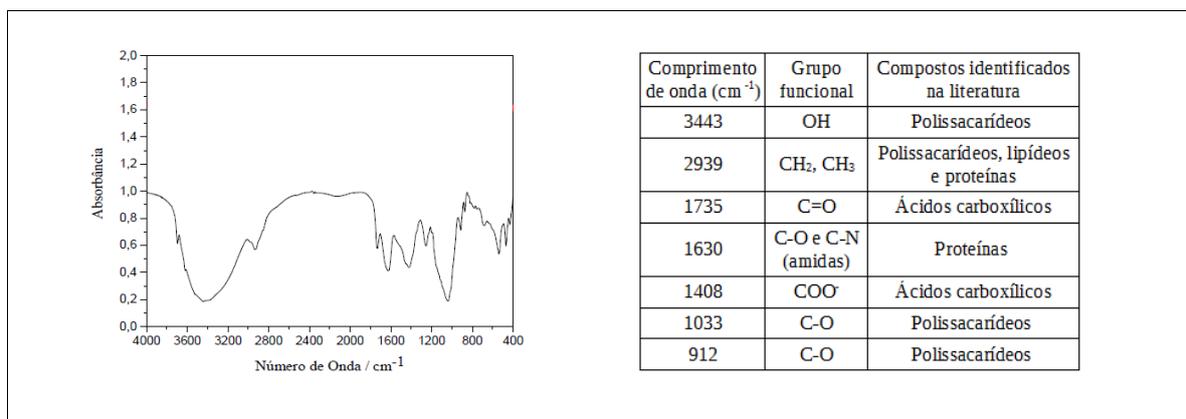


Figura 4: Espectro de infravermelho da AMOSTRA C comparado com dados da literatura

A análise do espectro adquirido mostrou a formação do aduto [M+Na] em m/z 203,05162 (calculado 203,0526) em concordância com a fórmula molecular C₆H₁₂O₆Na, com erro de aproximadamente 4ppm (Figura 5), sendo M = 180,0634. A fórmula molecular e a massa encontrada podem ser atribuídas à glicose e seus isômeros, tais como galactose, manose, mioinositol. Além do aduto acima, outros dois adutos foram identificados no espectro de massas, sendo:

1) [M+Na] em m/z 201,07234 (calculado 201,0733) apresentou-se em concordância com a fórmula molecular C₇H₁₄O₅Na, com erro de aproximadamente 4ppm, sendo M = 178,0841. A fórmula molecular e a massa encontrada pode ser atribuída a O-metil fucose ou a um dos seus isômeros.

2) [M+Na] em m/z 187,05690 (calculado 187,0577) apresentou-se em concordância com a fórmula molecular C₆H₁₂O₅Na, com erro de aproximadamente 4ppm, sendo M = 164,0685. A fórmula molecular e a massa encontrada estão de acordo com a fucose ou de um dos seus isômeros.

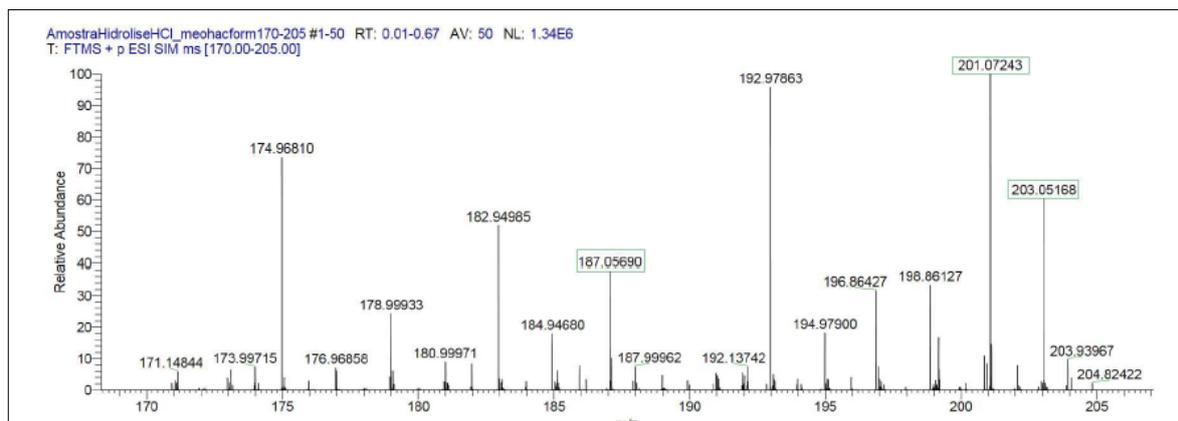


Figura 5: Espectro de alta resolução ESI(+)-MS do produto da hidrólise em HCl (4M) da AMOSTRA D

A amostra foi analisada em modo positivo e negativo na faixa de massas m/z 300-2000, sendo comparada com os padrões de oligossacarídeos maltose, maltotriose, maltotetraose e maltopentose (Sigma Aldrich); sendo que nenhum destes oligossacarídeos foi identificado na amostra.

A amostra hidrolisada e o padrão de glicose (Sigma-Aldrich) foram analisados também em espectrômetro de massas TSQ Quantum, Thermo Scientific, com fonte H-ESI, operando em modo positivo, utilizando-se voltagem do spray 3500 V, sheath gas 10 unid. arbitrárias, auxiliar gás 5 unid. arbitrárias, temperatura do capilar 270°C, tube lens 75. Para as duas amostras, foi selecionado o íon m/z 203,60 o qual foi submetido à fragmentação em Q2 utilizando-se o gás argônio e energia de colisão de 25 eV. Os dois espectros (amostra e padrão glicose) apresentaram o mesmo padrão de fragmentação. A proposta estrutural de cada um dos íons produto foi apresentada na Figura 6.

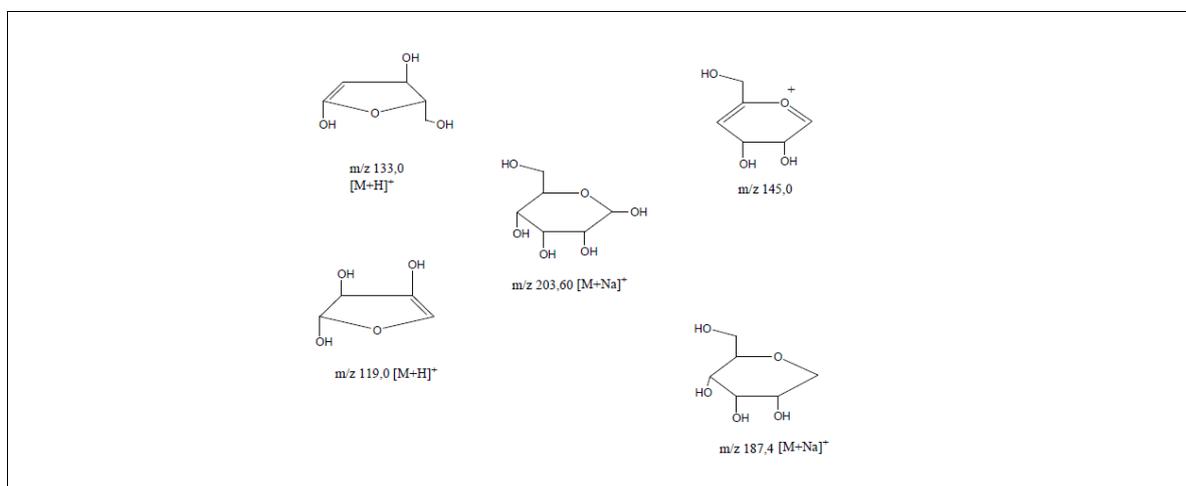


Figura 6: Proposta de padrão de fragmentação do íon precursor m/z 203,60

Na técnica de HPAEC/PAD a análise do cromatograma referente à solução hidrolisada apresentou composto com mesmo tempo de retenção do padrão glicose e da mistura glicose e galactose. Já na hidrólise com acetato de etila, o espectro adquirido evidenciou, principalmente, surfactantes, ácidos graxos e lipídios.

Na microscopia eletrônica de varredura observou-se a presença de um sinal de EDS para as linhas espectrais de carbono, oxigênio, silício e cálcio, indicando esses elementos como constituintes principais. Na Figura 7 observa-se imagem fotográfica da mucilagem presente no reservatório e a imagem da mucilagem por MEV, modo de elétrons secundários em alto vácuo e em baixo vácuo, além da presença de bastonetes.

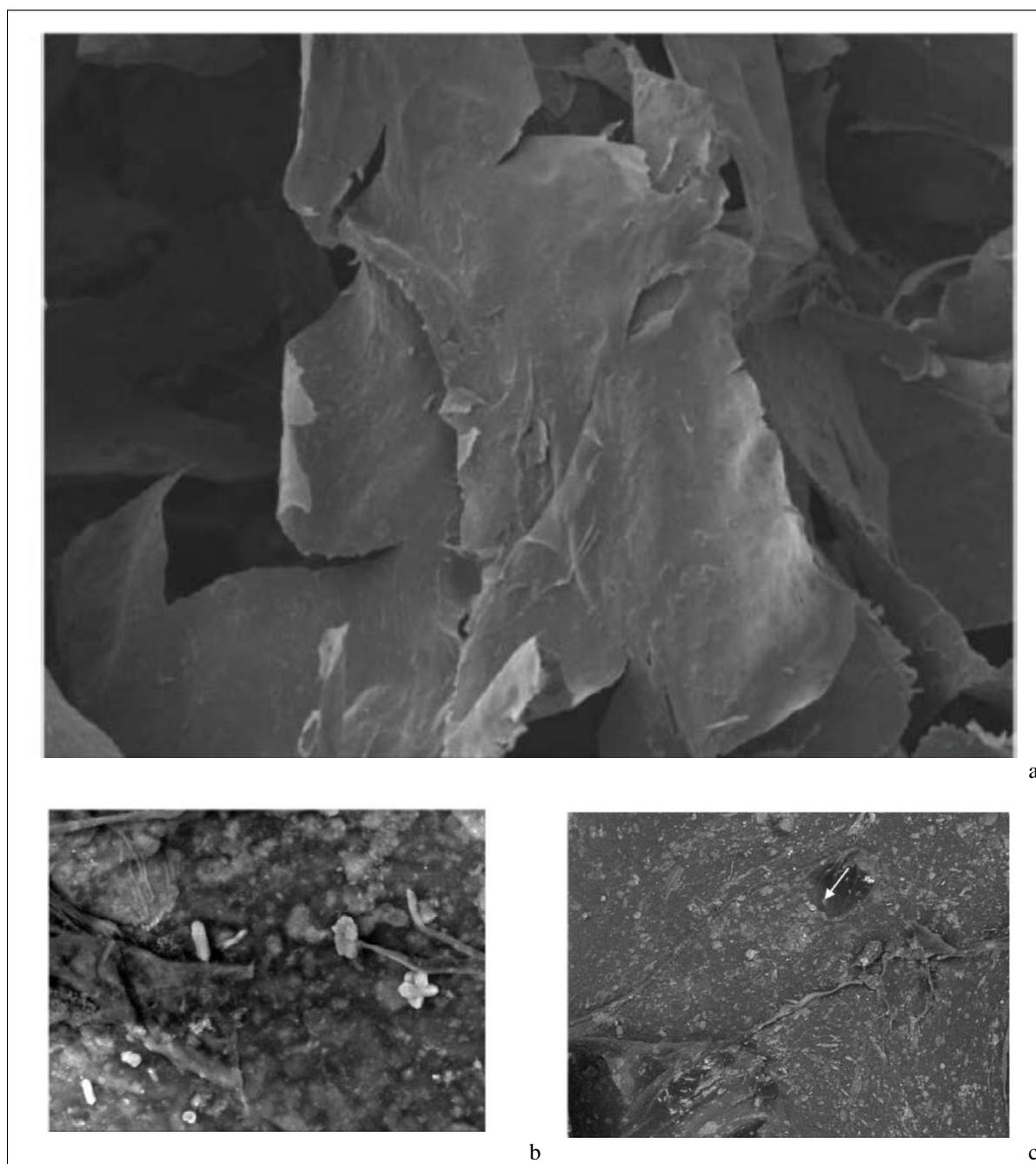


Figura 7: Micrografias – Imagem por MEV, modo de elétrons secundários em alto vácuo (a) e modo de elétrons retroespalhados em baixo vácuo (b, c). Presença de bastonetes distribuídos na superfície, conforme indicação da seta (c)

CONCLUSÕES

A amostra analisada é orgânica, constituída por frações polissacarídeas, com presença de lipídeos e proteínas. Com base nos resultados da diálise evidenciou-se que o polissacarídeo da amostra possui peso molecular superior à 12kdalton ($1,993 \cdot 10^{-20}$ g). A solução aquosa resultante da diálise foi liofilizada e a massa obtida foi inferior a 0,0001g. Os solventes metanol/ácido fórmico e acetonitrila/ácido fórmico não solubilizaram a fração seca da diálise, impossibilitando que essa amostra fosse analisada por espectrometria de massa.

A dissolução da amostra seca liofilizada foi possível quando realizada hidrólise com ácido clorídrico 4M, à 120°C e digestão em micro-ondas. A solução resultante da hidrólises foi analisada por espectrometria de

massas de alta resolução e verificaram-se íons moleculares compatíveis com glicose, ou isômeros; fucose, ou isômeros; e o-metil fucose, ou isômeros. O padrão de glicose analisado nas mesmas condições da amostra mostrou-se idêntico ao da substância identificado na amostra.

Para identificar os estereoisômeros a amostra hidrolisada foi analisada por cromatografia aniônica de alto desempenho com detecção por pulso amperométrico. O tempo de retenção da mistura glicose e galactose foi o mesmo; desta forma, nas condições analíticas utilizadas, não foi possível separar os dois padrões.

As imagens adquiridas por microscopia eletrônica de varredura mostram que a amostra possui característica de filme, com presença de bastonetes e filamentos sugestivos de presença de bactérias e fungos.

O material caracterizado é compatível com polissacarídea extracelulares que podem ter sido produzidos por fitoplâncton nas seguintes situações: (1) sequestrar o nutriente fósforo em zona afótica, produzindo EPS de densidade inferior à água para retorno à zona fótica; (2) proteção em competição entre espécies de cianobactérias; (3) proteção a fatores estressantes não detectados em análises realizadas.

AGRADECIMENTOS

À SANEAGO.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAGATINI, Inessa Lacativa; EILER, Alexander; BERTILSSON, Stefan; KLAVENESS, Dag; TESSAROLLI, Leticia Piton; VIEIRA, Armando Augusto Henriques. Host-Specificity and Dynamics in Bacterial Communities Associated with Bloom-Forming Freshwater Phytoplankton. **PLoS ONE**. San Francisco: California, US. 2014.
2. CASTRO, Fábio. **Dinâmica de cianobactérias**. FAPESP. 2010. Disponível em <<http://sbera.org.br/pt/2010/10/dinamica-de-cianobacterias>>
3. COSTA, E. R. H. **Estudo de Polímeros Naturais como Auxiliares de Floculação com Base no Diagrama de Coagulação do Sulfato de Alumínio**. São Carlos. 1992. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo, 1992.
4. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 1976, 248-254p.
5. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SHITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, 1956, 28, 350p.
6. JOHANSSON, L.; VIRKKI, L.; MAUNU, S.; LEHTO, M.; EKHOLM, P. Carbohydrate Polymers. **Food Chemistry**, 97, 2006, 9771p.
7. MECCHERI, Fabrício Sebastiani. **Produção e composição dos polissacarídeos extracelulares *Planktothrix agardhii* (Cyanobactéria) e suas relações com bactérias no reservatório de Barra Bonita**. São Carlos: UFSCar. Dissertação de Mestrado. 2010.
8. PENNA, N.; CAPELLACCI, S.; RICCI, F.; GIORGI, M.; PENNA, A.; FAMIGLINI, G.; PIERINI, E.; TRUFELLI, H.; CAPIELLO, A. Study on the maltooligosaccharide composition of mucilage samples collected along the northern Adriatic coast. **Carbohydrate Research**, 344, 2009, 120p.
9. VIEIRA, Armando Augusto Henriques. **The role of dissolved organic matter released by phytoplankton in the hypereutrophic reservoir of Barra Bonita (SP, Brazil)**. FAPESP: Botany. 2010.