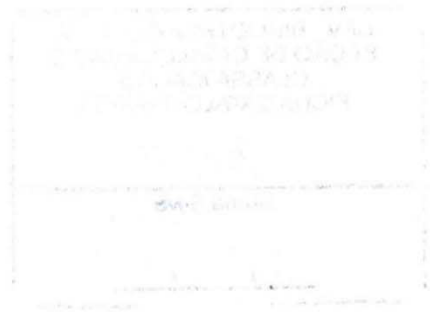


**HIASMYNE SILVA DE MEDEIROS**

**VESÍCULA DE POLIDIACETILENO PARA DETECÇÃO DE  
TRICLOROMETANO EM ÁGUA POTABILIZADA**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-graduação em Ciência e  
tecnologia de Alimentos, para a  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011**



**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M488v  
2011

Medeiros, Hiasmyne Silva de, 1985-  
Vesícula de poliacetileno para detecção de triclorometano  
em água potabilizada / Hiasmyne Silva de Medeiros.  
– Viçosa, MG, 2011.  
x, 53f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Nélcio José de Andrade.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 46-53.

1. Água - Qualidade. 2. Biossensores. 3. Termodinâmica.  
4. Composto halogenado. I. Universidade Federal de Viçosa.  
II. Título.


CDD 22. ed. 664.07

HIASMYNE SILVA DE MEDEIROS

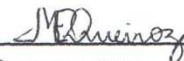
VESÍCULA DE POLIDIACETILENO PARA DETECÇÃO DE  
TRICLOROMETANO EM ÁGUA POTABILIZADA

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos,  
para obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

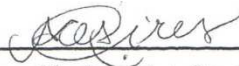
APROVADA: 27 de julho de 2011.



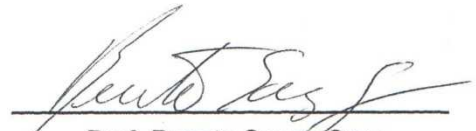
Prof<sup>a</sup>. Nilza de Fátima Ferreira  
Soares  
(Coorientadora)



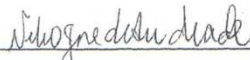
Prof<sup>a</sup>. Maria Eliana Lopes Rebeiro  
de Queiroz  
(Coorientadora)



Prof<sup>a</sup>. Ana Clarissa dos Santos Pires



Prof. Renato Souza Cruz



Prof. Nélcio José de Andrade  
(Orientador)

*As pessoas que mais amo nesse mundo, especialmente ao meu pai Heron Medeiros, a minha mãe Maria Aparecida da Silva Medeiros e minha irmã Hedwirges Silva de Medeiros.*

*Dedico esse trabalho*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pois sem Ele minha vida não teria sentido. Agradeço por está sempre comigo em todos os momentos de minha, por ter guiado os meus passos, pelo teu amor eterno.

Á Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de participar do Programa de Pós-graduação, em nível de Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Á minha família, especialmente, ao meu pai Heron Medeiros, a minha mãe Maria Aparecida da Silva Medeiros e minha irmã Hedwirges Silva de Medeiros, pelo apoio, amor e por estarem sempre comigo!

Aos meus parentes, aos meus tios e tias, primos e primas pelo amor e por sempre torcerem por mim, especialmente a minha avó Maria Verônica e aos que já se foram Raimundo, Rubens e Margarida Maria (Ângela).

Ao meu orientador, Nélio Jose de Andrade, pela orientação, por sua presença constante em todas as etapas de realização da tese, pela amizade e pela confiança em mim conferida.

Á professora Nilda de Fátima Ferreira Soares, por ter sido minha co-orientadora durante meu mestrado, pela amizade e por tudo que fez por mim durante minha graduação.

Á professora Maria Eliana Lopes R. de Queiroz, por ter sido minha co-orientadora, pela ajuda e contribuição na tese.

Á professora Ana Clarissa dos Santos Pires, que também considero como minha co-orientadora, pela contribuição e apoio na tese.

Ao professor Renato Souza Cruz, pela participação na banca e pelo apoio e amizade no laboratório.

A toda equipe do laboratório de Microbiologia e Higiene Industrial, pela amizade e apoio, especialmente a Laís pelos dias que passou comigo trabalhando no laboratório.

A toda equipe de Embalagens, pela amizade e apoio, especialmente o Allan, a Flávia e o Fabiano pela ajuda direta em meu experimento.

Ao laboratório de Operações e Processos e a professora Jane pelo uso do espectrofotômetro.

A todos os funcionários do departamento de Tecnologia de Alimentos, pela ajuda e amizade.

Ao José Antônio, por todo amor, carinho e presença em minha vida.

Ao meu cunhado Pablo, pela amizade e apoio.

A cada um dos meus amigos e amigas pela amizade incondicional e por torcerem sempre por mim.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para que eu chegasse aonde cheguei, o meu muito obrigado!!

## **BIOGRAFIA**

HIASMYNE SILVA DE MEDEIROS, filha de Heron Medeiros e Maria Aparecida da Silva Medeiros, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, em 04 de abril de 1985.

Em fevereiro de 2005, iniciou o curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios, na Universidade federal de Viçosa, graduando-se em julho de 2009.

Em agosto de 2009, iniciou o mestrado no Programa de Pós- graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade federal de Viçosa.

## ÍNDICE

|   |     |
|---|-----|
| RESUMO.....   | vii |
| ABSTRAT.....  | ix  |
| 1. Introdução.....  | 1   |
| 2. Objetivos.....   | 1   |
| 2.1. Objetivo geral.....  | 1   |
| 2.2. Objetivos específicos.....   | 2   |
| 3. Revisão de Literatura.....   | 2   |
| 3.1. Considerações gerais.....  | 2   |
| 3.2. Trihalometanos.....  | 3   |
| 3.3. Toxicidade dos THM.....  | 7   |
| 3.4. Legislação.....  | 9   |
| 3.5. Metodologia para quantificação de THM.....   | 10  |
| 3.6. Sensores de PDA.....   | 11  |
| 4. Delineamento experimental.....   | 16  |
| 5. Material e Métodos.....  | 17  |
| 5.1. Coleta das amostras de água.....   | 17  |
| 5.2. Análises físico-químicas e microbiológicas de amostras de água.....  | 17  |
| 5.3. Técnica da bioluminescência para análise de água.....  | 18  |
| 5.4. Identificação e quantificação de Triclorometano por GC-MS.....   | 18  |
| 5.5. Preparo das vesículas.....   | 19  |
| 5.6. Tratamento das vesículas com ultrassom de ponta.....   | 20  |
| 5.7. Resposta Colorimétrica (RC).....   | 20  |
| 5.8. Quantificação da mudança de cor.....   | 20  |
| 5.9. Medida do raio hidrodinâmico das vesículas.....  | 21  |
| 5.10. Avaliação da transição colorimétrica das vesículas na presença de TCM.....  | 21  |
| 6. Resultados e Discussão.....  | 22  |
| 6.1. Ocorrência de TCM e a qualidade de água das ETAs e dos pontos de coleta de amostras nas redes de distribuição..... | 22  |
| 6.2. Seleção da suspensão de vesículas.....   | 33  |
| 6.2.1. Resposta Colorimétrica (RC).....   | 33  |
| 6.2.2. Diâmetro das vesículas em suspensão.....   | 36  |
| 6.2.3. Influência das ondas ultrassônicas no diâmetro das vesículas.....  | 37  |
| 6.2.4. Avaliação da transição colorimétrica das vesículas em razão do pH, temperatura e concentração de TCM.....        | 40  |
| 7. Conclusões.....  | 45  |
| 8. Referências bibliográficas.....  | 46  |

## RESUMO

MEDEIROS, Hiasmyne Silva de, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011. **Vesícula de polidiacetileno para detecção de triclorometano em água potabilizada.** Orientador: Nélio José de Andrade Coorientadores: Nilda de Fátima Ferreira Soares e Maria Eliana Lopes R. de Queiróz

Subprodutos do processo de desinfecção da água os trihalometanos são considerados nocivos à saúde. Dentre os THM, encontra-se o triclorometano (TCM) causado pela reação do cloro com ácidos originários da decomposição de matéria orgânica, como os ácidos húmicos e fúlvicos. A detecção desses compostos na água normalmente é realizada por métodos cromatográficos que além do alto custo da análise exigindo pessoal bem treinado. Essa pesquisa pretendeu desenvolver uma alternativa para avaliar a presença de TCM na água por meio de um procedimento simples e rápido por meio de um sensor colorimétrico, usando vesícula de polidiacetileno. Inicialmente, procurou-se conhecer a qualidade físico-química, incluindo a concentração de TCM por cromatografia gasosa com espectrofotômetro de massa (GC/MS), e a qualidade microbiológica de amostras de águas coletadas em quatro estações de tratamento, 15 pontos de rede de distribuição e cinco poços artesianos. De 28 amostras avaliadas, apenas duas, cerca de 2,5 % apresentaram valores acima de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , valor máximo permitido pela Portaria 518 do Ministério da Saúde de 25 de março de 2004. Os resultados das análises físico-químicas e microbiológica das amostras analisadas estiveram dentro dos limites exigidos pela portaria 518/MS para água de consumo humano. As baixas concentrações de turbidez e da cor, demonstrando um bom controle de qualidade nas ETAs, provavelmente contribuíram para as baixas concentrações de TCM encontradas nas amostras de águas. Verificou-se uma tendência de aumento da concentração de valor de TCM a partir das ETAs, devido às quantidades de cloro residual livre na rede, matéria orgânica oriunda do manancial de abastecimento não retido nas ETAs mas presentes nas redes de distribuição e devido à reação de formação TCM ser lenta. Para o desenvolvimento do sensor colorimétrico, foram avaliadas diferentes vesículas contendo 10,12- ácido pentacosadiinócio (PCDA) preparadas com e sem a adição de diferentes fosfolipídios como o colesterol (CO), esfingomielina (ES) e o dimiristoifosfatidilcolina (DMPC), variando-

se também a potência ultrassônica na produção da suspensão vesicular. A vesícula que obteve a maior resposta colorimétrica (RC) com a adição de TCM e o menor diâmetro, foi o tratamento 1 mM de PCDA+1mM de CO.ES submetida a 400 w de potência. Ele foi escolhido e tratado com diferentes valores de pH, temperatura e concentração vesicular e avaliado em relação à resposta colorimétrica (RC) e ao tamanho, antes e após a adição de diferentes soluções contendo,  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $10000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de TCM em água deionizada. Observando os valores da RC para os tratamentos testados, notou-se que o tratamento: pH de 5,0, temperatura de  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , com concentração de 100% da vesícula, foi o que obteve a maior diferença entre os valores da RC em relação aos tratamentos controle e com  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Os resultados mostram que a suspensão de vesícula avaliada apresenta potencial para indicar a presença de TCM em água com concentrações próximas àquelas exigidas pela legislação brasileira.

## ABSTRACT

MEDEIROS, Hiasmyne Silva de, MSc. Universidade Federal de Viçosa, July, 2011. **Vesicles polidiacetileno detection of trichloromethane in water.**

Adviser: Nélio José de Andrade Co-Advisers: Nilda de Fátima Ferreira Soares and Maria Eliane Lopes R. de Queiróz

By-products of the water disinfection with chlorine compounds are considered harmful to human health. Among them is trichloromethane (TCM) caused by the reaction of chlorine with humic and fulvic acid present in the water. The detection of TCM in water is made by the using chromatographic methods, generally expensive and need well-trained staff. This research aimed to develop an alternative to evaluate the presence of TCM in the water using a simple and rapid procedure using poly diacetileno vesicle. Initially, we tried to know the physical and chemical quality, including the concentration of TCM, and microbiological of the samples collected in four water treatment plants, 15 distribution network points and five wells. Of 28 samples tested, only two samples, about 2.5% had values above  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , maximum allowed value by Brazilian standard legislation according to the Ordinance 518/MS 2004. The results of physical-chemical, microbiological samples were analyzed within the limits required by Brazilian legislation for drinking water. Low concentrations of turbidity and color, showing a good quality control in water treatment plants, probably contributed to the low concentrations found in TCM water samples. There was a trend of increasing concentration value of TCM from the treatments plants, due to the amount of free residual chlorine in the network, organic matter from the supply source and because of the THM formation reaction is slow. For the development of colorimetric sensor was evaluated different vesicles containing acid pentacosadiinócio 10.12, with and without the addition of different phospholipids and cholesterol (CO), esfingomielina (ES) and dimiristoifosfatidilcolina (DMPC) and also was varied the ultrasonic power for production of vesicular suspension. The vesicle suspension that had the biggest colorimetric response (CR) and the smaller diameter, with the addition of TCM, was the PCDA + 1mM 1mM CO.ES subjected to 400W of power. This vesicle suspension was chosen to be conditioned with different values of pH,

temperature and concentration and evaluated in relation to RC and size before and after the addition of solutions containing  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $10000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of TCM diluted in deionized water. Observing the values of RC for the treatments, it was noted that the treatment - pH 5.00, temperature  $35^\circ \text{C}$  without dilution of the vesicle- was what got the biggest difference between the values of RC in relation to the control treatment and the  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

## **1. Introdução**

A cloração é o processo de desinfecção de água para consumo humano, mais usado em todo o mundo, devido sua eficácia e seu preço relativamente baixo. A reação do cloro com alguns compostos da matéria orgânica em decomposição, particularmente os ácidos fúlvicos e húmicos, leva à formação dos trihalometanos (THM). Dentre os THM formados, encontram-se o clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ), diclorobromometano ( $\text{CHBrCl}_2$ ), clorodibromometano ( $\text{CHBr}_2\text{Cl}$ ) e bromofórmio ( $\text{CHBr}_3$ ) que, mesmo em baixas concentrações, podem ser tóxicos, carcinogênicos, teratogênicos e possivelmente mutagênicos. O limite máximo permitido no Brasil para soma das concentrações THM de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , de acordo com a Portaria 518 do Ministério da Saúde, de 23 de abril de 2004 (BRASIL, 2004).

A análise dos THM é feita por cromatografia gasosa (CG) empregando o detector, por captura de elétrons, que é seletivo para compostos que apresentam halogênios em sua estrutura. Como técnica analítica, a CG depende da qualidade do preparo da amostra, solventes e equipamentos de alto custo como o cromatógrafo. Esses fatores têm levado ao desenvolvimento de novos métodos, em que as principais vantagens são: rapidez nos resultados, praticidade e baixo custo possibilitando a realização de um número maior de análise.

Dessa forma, o uso de sensores colorimétricos, como as vesículas, torna-se uma alternativa às técnicas cromatográficas. Pesquisas têm demonstrado a diversidade de moléculas que podem ser incorporadas em nanoestruturas auto-organizadas de polidiacetilenos (PDA) para atuarem como moléculas receptoras de outras moléculas, detectando-as permitindo uma identificação simples e rápida de compostos de interesse.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Foi desenvolver vesículas de PDA para identificação de Triclorometano em água potabilizada.

## **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliou as propriedades físico-químicas e microbiológicas de amostras de água potabilizada da região de Viçosa;
- Identificou e quantificou Triclorometano por GC-MS das amostras de água;
- Desenvolveu vesícula de PDA com adição fosfolipídeos;
- Avaliou a influência das ondas ultrassônicas e do tempo de exposição na estrutura da vesícula;
- Caracterizou a suspensão de vesículas por espalhamento dinâmico de luz e quantificou a mudança de cor;
- Avaliou a vesícula de PDA na detecção de Triclorometano em água potabilizada;
- Avaliou o efeito da temperatura, pH da vesícula para detecção de Triclorometano.

## **3. Revisão de Literatura**

### **3.1. Considerações gerais**

A água é ingerida pelo homem em maior quantidade que todos os outros alimentos reunidos e é, também, a sua principal excreção. Um adulto ingere por dia mais de 2 L de água, cerca de 3 % do seu peso corpóreo que, por sua vez, é constituído por mais de 80 % de água (RIEDEL, 1992). Este contato/ingestão com a água justifica e explica a facilidade com que parasitas macro ou microscópicos atingem o homem e nele se desenvolvem, quando outros fatores adicionais são favoráveis à sua sobrevivência, desenvolvimento ou multiplicação.

Por outro lado, o homem está exposto à contaminação de origem química que podem ocorrer na água natural, considerada o solvente universal. Estima-se que cerca de 4 bilhões de metros cúbicos de contaminantes, provenientes principalmente de efluentes industriais, compostos químicos de uso agrícola, efluentes domésticos e outros, atinjam o solo a cada ano (VALENTE, 2000) e, conseqüentemente, a água. Esses, uma vez no ambiente, podem receber transformações físicas e químicas, inclusive combinar com outros

compostos químicos podendo intensificar ou diminuir sua toxicidade aos seres humanos e organismos vivos.

O controle da exposição a todos esses fatores de risco exige o uso de água potável, ou seja, água tratada para remover contaminantes e evitar que ocorram novas contaminações.

A determinação de contaminantes orgânicos em diferentes tipos de águas como a água do mar, água potável tratada, água de nascente, dentre outras, é fundamental para a solução e proteção de problemas ambientais (BIZLU et al., 1996; BLOEMEN, 1993).

O crescimento populacional das últimas décadas e o relevante aumento de conhecimentos científicos originou um rápido desenvolvimento dos setores industrial e agrícola. A produção intensiva inerente a este desenvolvimento originou um aumento do volume de águas residuais, quer de origem industrial, quer doméstico e também agrícola. Foi assim introduzido um vasto número de micropoluentes nas águas residuais com efeitos reconhecidamente indesejáveis para a saúde pública.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 1993), mais de 2000 substâncias químicas de diferentes categorias foram detectadas em águas, das quais mais de 750 em águas destinadas ao consumo humano. Destas, mais de 600 são poluentes orgânicos e muitos deles farmacologicamente ativos, com efeitos carcinogênicos, promotores de carcinogênese ou com ação mutagênica (CHO et al., 2003).

### **3.2. Trihalometanos**

A importância da matéria orgânica em sistemas aquáticos tem sido claramente reconhecida durante os últimos anos. A matéria orgânica é, freqüentemente, responsável pelo controle de processos geoquímicos por agir como um receptor de prótons e controlador de pH, por influenciar o transporte e degradação de poluentes e por participar em reações de dissolução/precipitação mineral. O material orgânico dissolvido ou particulado também pode agir como substrato para reações microbiológicas.

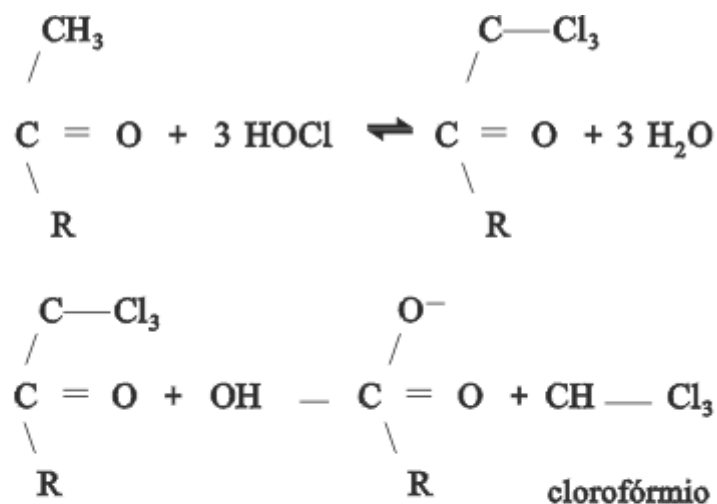
Compostos orgânicos voláteis (VOC) são os contaminantes mais comumente encontrados em águas. Eles são usados extensivamente em áreas

urbanas e estão presentes em inúmeros produtos, entre eles, os combustíveis, solventes, adesivos, desodorantes e refrigerantes. A contaminação do ambiente devido a esses produtos pode ocorrer por substâncias usadas em manufaturas ou como resultado de processos de desinfecção, por frascos usados para estocar solventes, práticas de agricultura, entre outras possibilidades (KOSTOPOULOU et al., 2000).

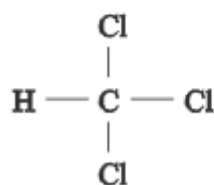
Dentre os VOC, os compostos orgânicos voláteis halogenados (VHOC) é uma importante classe de poluentes da água, frequentemente usados como gases refrigerantes em refrigeradores, como propelente e como solventes de limpeza em indústrias. Além disto, a água para consumo humano é frequentemente desinfetada com cloro, que pode reagir com materiais orgânicos presentes, principalmente ácidos húmicos e fúlvicos ou produto de um colapso metabólico de plantas aquáticas, e produzir subprodutos voláteis. Além disto, concentrações elevadas de bromo presentes em reservatórios usados como fontes para a água tratada podem contribuir para a formação de compostos bromados ou subprodutos de desinfecção com a mistura de cloro/bromo (CAMPILLO et al., 2004).

A cloração da água é o método mais importante na desinfecção da água para consumo humano, e é usada em todo o mundo (FANTUZZI et al., 2001) devido sua eficácia e seu preço relativamente baixo. Esse procedimento é a forma de proteger a água da contaminação microbiana externa e desenvolvimento de bactérias durante a distribuição para a população. A principal função do cloro é eliminar bactérias patogênicas, que podem causar sérias doenças e morte (LEE et al., 2004; ZANG et al., 2002), reduzindo a incidência de doenças promovidas pela água.

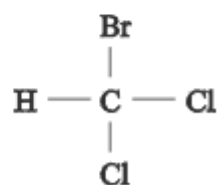
A reação do cloro com alguns compostos orgânicos leva à formação de THM (Figura 1). A água bruta pode conter ácidos fúlvicos e húmicos, cujas estruturas químicas ainda não são completamente conhecidas, resultantes da decomposição de folhas da vegetação. A maioria desses ácidos contém radicais cetonas, que podem causar a formação de halofórmios após a reação com o cloro (VAN BREMEM, 1984).



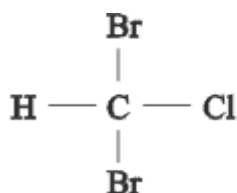
Os trihalometanos são, basicamente:



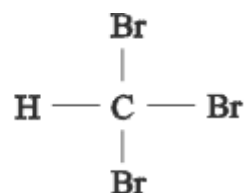
triclorometano  
(clorofórmio)  $\text{CHCl}_3$



bromodiclorometano  
 $\text{CHBrCl}_2$



dibromodiclorometano  
 $\text{CHBr}_2\text{Cl}$



tribromometano  
 $\text{CHBr}_3$

Figura 1 – Estruturas químicas dos THM formados pela reação do cloro com os compostos orgânicos (VAN BREMEM, 1984).

Entre os compostos relacionados, os que possuem concentração mais relevante em água potável são: triclorometano, bromodiclorometano, dibromoclorometano e tribromometano. Portanto, quando se faz referência aos THM, na realidade estão sendo mencionados os quatro compostos citados.

A relação entre o uso de cloro nas estações de tratamento de água, suas reações com os compostos orgânicos presentes e a formação de compostos que poderiam ter efeitos negativos sobre a saúde humana foram estudados pela primeira vez por Harris, na década de 70 (SANTOS, 1987). A partir de suas indicações pioneiras sobre a possibilidade de existir uma correlação entre águas de abastecimento e câncer, outros pesquisadores passaram a estudar o assunto, como Rook, na Holanda, e Bellar, Litchtemberg e Kronen, nos Estados Unidos.

Os estudos efetuados com THM têm confirmado o potencial cancerígeno destas substâncias, revelando efeitos mutagênicos em diferentes espécies animais. Em relação ao homem, o efeito destas substâncias apresenta diferenças de atuação mais quantitativas que qualitativas, devido aos fenômenos biológicos de absorção, assimilação, excreção, desintoxicação e expressão genéticas (GOUVEIA, 1989).

As variáveis que influenciam a reação de formação dos THM são (KOSTOPOULOU et al., 2000; TOMINAGA, 1999; SANTOS, 1987).

a) *Tempo*: Em relação ao tempo, a formação de THM em condições naturais não é instantânea e a princípio, quanto maior o tempo de contato entre o cloro e os precursores, maior será a probabilidade de formação dos THM;

b) *Temperatura*: O aumento da temperatura reflete no aumento na probabilidade de formação dos THM;

c) *pH*: A formação dos THM aumenta com a elevação do pH, pela sua ação catalítica sobre o halofórmio;

d) *Concentração de brometo e iodeto*: Os brometos e iodetos, na presença de cloro aquoso, são oxidados a espécies capazes de participar da reação de substituição orgânica, resultando na formação de THM puro ou misturado (um ou mais de um dos compostos). O bromo tem vantagens sobre o cloro nas reações de substituição com os compostos orgânicos, mesmo que o cloro esteja presente em excesso quando comparado com o bromo inicial.

e) *Características e concentrações dos precursores*: Quanto maior a concentração de ácidos húmicos e fúlvicos e outros precursores, maior será a formação de THM. As características da água e dos precursores presentes também irão influenciar a formação de THM.

f) *Concentração de cloro*: Quanto maior a dosagem de cloro, maior será a probabilidade de formação de THM. A forma sob a qual o cloro se apresenta também é importante; o cloro nas formas de HClO e ClO<sup>-</sup> tem maior poder de formação de THM do que o cloro combinado, ou seja as cloraminas.

### **3.3. Toxicidade dos THM**

Os THM mesmo em baixas concentrações podem ser tóxicos, carcinogênicos, teratogênicos e possíveis mutagênicos (LEE et al., 2004; BATTERMAN et al., 2002). Numerosos estudos epidemiológicos vêm sendo conduzidos na investigação da correlação entre a cloração da água e a mortalidade por câncer. Muitos estudos analíticos sugerem uma clara ligação entre a exposição á água clorada e o desenvolvimento de câncer de bexiga e sugerem também uma possível ligação com câncer retal. Outros estudos têm demonstrado que a exposição aos subprodutos da cloração está relacionada a abortos espontâneos e outras adversas conseqüências reprodutivas (LEE et al., 2004).

Água tratada não é usada somente para beber, mas também para higiene pessoal, cozinhar, lavar louças e roupas, e limpezas em geral. Como resultado, para muitos contaminantes da água, os meios fundamentais de exposição e seu aumento, não se dá só por ingestão, mas também por meio da absorção dérmica ou por inalação.

Isso ocorre, pois os THM apresentam alta volatilidade e são predominantemente lipossolúveis. Estudos experimentais realizados pelo OMS apontam que durante um banho de 8 min, a exposição aos THM é seis vezes maior do que pela ingestão da mesma água durante um período de 24 horas,

devido a inalação de clorofórmio que pode se apresentar na forma gasosa no ambiente em virtude de sua volatilização. A detecção dos THM já foi comprovada em alimentos e bebidas que utilizam água clorada, como sorvetes, sucos e refrigerantes. Os THM são absorvidos rapidamente pelo trato gastrointestinal, o clorofórmio depois de ingerido com a água é rapidamente e quase totalmente absorvido na corrente sanguínea tanto em humanos quanto em animais, sendo rapidamente transportado para os tecidos.

Para as crianças, o caminho de exposição pode se dá também através da lactação, ou seja, a transferência de mãe para filho. Compostos orgânicos halogenados, como os THM, tende a ser hidrofóbicos e solúveis em gorduras, assim se acumulam em materiais gordurosos. Um exemplo é a fração lipídica do sangue ou leite. O leite humano pode oferecer um excelente indicador biológico da exposição da criança a substâncias lipofílicas (BATTERMAN, 2002). O clorofórmio parece ser capaz de atravessar a barreira placentária, uma vez que já foi detectado no cordão umbilical em concentrações maiores que no sangue materno (TOMINAGA, 1999).

A presença de THM em águas de piscinas de natação e de recreação tem sido reportada na literatura (GONZÁLES et al., 1989). Nesse caso, a matéria orgânica necessária para a reação com cloro também pode ser proveniente de fonte humana, tais como saliva, urina e transpiração. A contaminação por THM pode se dá também por meio da inalação, devido sua alta volatilidade. Como alvo de risco não está somente os nadadores, mas também todas as pessoas envolvidas no ambiente, como os professores, atendentes e pessoas que trabalham na limpeza ou na área de recepção.

A concentração de THM na atmosfera ambiente varia, dependendo de vários fatores como ventilação, temperatura da água e a quantidade de precursores orgânicos presentes nesta água (FANTUZZI et al., 2001).

A formação de THM também é a principal fonte de contaminação para a vida aquática podendo ter propriedades ecotoxicológicas irreversíveis. Como a água do mar contém um alto índice de brometo (aproximadamente  $65 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), com a aplicação de doses de cloro, o bromo é formado pela oxidação do brometo, levando a formação de compostos organobromados. Como consequência, na cloração da água do mar, os THM são normalmente

compostos por bromofórmio e bromoclorometanos (ALLONIER et al., 2003; JENNER et al., 1997).

### 3.4. Legislação

Devido à alta toxicidade destes compostos, a *Environmental Protection Agency* (EPA) estabelece um limite de concentração máxima de  $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para THM totais (TTHM), existindo a intenção de reduzir este valor para  $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (CAMPILLO et al., 2004; MACÊDO, 1997). Muitos países europeus, como a Alemanha, têm restringido o limite de TTHM para  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (CAMPILLO et al., 2004).

No Brasil, a Portaria do Ministério da Saúde de número 518/GM de 25 de março de 2004, estabelece normas para a qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (BRASIL, 2004). De acordo com esta portaria, a concentração máxima permitida de TTHM é de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e para cada THM tem um limite como mostra na Tabela 1.

Tabela 1: Valores de THM para águas de consumo humano

| THM                | Valor guia (OMS)<br>( $\mu\cdot\text{L}$ ) | DECRETO-LEI<br>243/2001 ( $\mu\cdot\text{L}$ ) |
|--------------------|--|--|
| Triclorometano     | 200  | -  |
| Bromodiclorometano | 60   | -  |
| Dibromoclorometano | 100  | -  |
| Tribromometano     | 100  | -  |
| TTHM               | -  | 100  |

No Brasil, os limites de contaminantes no ambiente são determinados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Na resolução 357/2005, não há limite máximo para a concentração de THM no ambiente. Entretanto, no Artigo 21 desta resolução, que trata das condições de emissão de efluentes, é estabelecido um limite de  $1,0 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para Triclorometano (TCM).

A Resolução do CONAMA n° 357/2005, considera que a saúde e o bem-estar humano podem ser afetados pela condição de balneabilidade. Assim, no Artigo 1° desta resolução é definida recreação de contato primário, quando existir

o contato direto do usuário com os corpos de água como, por exemplo, as atividades de natação, esqui aquático e mergulho.

Nesta resolução também não há qualquer citação sobre os limites permitidos para THM, apenas no parágrafo 4º do Artigo 2º considera como impróprias as águas onde for verificada a ocorrência, dentre outros, de resíduos ou despejos, sólidos ou líquidos, capazes de oferecer riscos à saúde ou tornar desagradável a recreação.

### **3.5. Metodologia para quantificação de THM**

A metodologia para quantificação de THM em amostras de água proposta pela Associação Brasileira de Normas Técnicas ABNT (1995), descrita na norma 13407, emprega extração líquido-líquido e cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons.

A Portaria nº 518 de março de 2004, que estabeleceu normas e padrão de potabilidade da água destinada ao consumo humano, sugere a adoção das técnicas de análise de água constantes na última edição do “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*”, até que sejam publicadas normas nacionais. Esta portaria dita ainda que metodologias alternativas deverão receber aprovação do Ministério da Saúde para terem validade (BRASIL, 2004).

A metodologia proposta no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* para análise de THM em amostras de água utiliza a cromatografia gasosa como técnica de quantificação (com detector de captura de elétrons - DCE) e a extração líquido-líquido como técnica de extração, empregando o pentano como solvente extrator, sendo sugeridos também o hexano, o metilciclohexano e o 2,2,4-trimetilpentano (EATON et al., 1998).

Várias técnicas de extração vêm sendo empregadas e estudadas para análise de THM em águas. Macedo (1997) determinou a concentração de THM em amostras de águas potáveis de Juiz de Fora - MG. Para extração dos THM das amostras foi utilizado o procedimento de micro-extração em fase sólida (MEFS) com fase estacionária polidimetilsiloxano (100 µm). Para a quantificação foi utilizado um cromatógrafo a gás equipado com um detector de ionização de chama (MS).

### 3.6. Sensores de PDA

O Polidiacetileno (PDA) é uma classe de polímeros conjugados derivados da polimerização, sob radiação ultravioleta e via adição 1,4 de monômeros de diacetileno (Figura 2). Após esta etapa, o polímero apresenta coloração azul, absorvendo a luz no comprimento de onda de  $\lambda = 640$  nm (PIRES et al., 2010a).

O desenvolvimento de sensores utilizando polímeros conjugados eficientes como matrizes de sensoriamento, tem recebido atenção considerável nas últimas décadas. Especialmente, os sensores de PDA para a detecção de espécies biologicamente importante, têm sido intensamente investigadas devido à sua resposta quanto a mudança das propriedades colorimétricas.

O resultado dos agregados de PDA aparece após a polimerização, com uma cor azul intensa perceptível visualmente. A vantagem de usar agregados PDA como sensores e biossensores vem do fato de que uma visível mudança de cor de azul para vermelho ocorre em resposta a uma variedade de perturbações ambientais, como temperatura, alterações de pH, e ligante-receptor (PIRES et al., 2010a).

Em estudo recente, Shuterman e colaboradores (2009) demonstraram que monômeros de diacetileno também podem ser polimerizados a partir da luz visível em um processo de absorção simultânea de dois fótons. De acordo com os autores, o processo gera um polímero com coloração azul mais intensa e macromoléculas mais estáveis comparadas às obtidas pela polimerização via radiação UV (Figura 2).

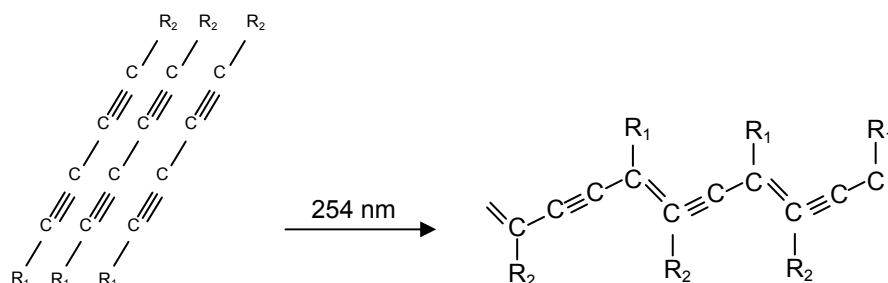


Figura 2 – Desenho esquemático da polimerização de monômeros de diacetileno a partir da radiação ultravioleta (PIRES, et al., 2010a).

Os polidiacetilenos exibem uma notável variedade de transições de cores (Figura 3) decorrentes da temperatura (WU et al., 2009; POTISATITYUENYONG et al., 2008; KIM et al., 2008; SHIBATA et al., 1989), estresse mecânico (LEE et al., 2007) diferentes solventes (POTISATITYUENYONG et al., 2008) interação com surfactantes (SU et al., 2005; 2004), alterações no pH (POTISATITYUENYONG, et al., 2008) e interações específicas com moléculas biológicas (KIM et al., 2008; SU et al., 2005).

Os PDAs já são usados para fabricar sensores para a detecção de várias substâncias, como vírus, enzimas, peptídeos, íons, anticorpos e proteínas. A maioria dos estudos sobre a utilidade de vesículas de PDA concentraram-se na variação da posição do grupo diacetilenico localizado na meio das moléculas.



Figura 3 – Transição colorimétrica do polidiacetileno da forma azul para a forma vermelha. (PIRES et al., 2010a).

A grande maioria dos sensores de PDA são basicamente, preparados em forma de vesículas em solução aquosa ou filmes finos em suportes sólidos (Figura 4). Entretanto, outras estruturas podem ser encontradas, como cristais e nanocompósitos integrados em matrizes inorgânicas (CARPICK et al., 2004).

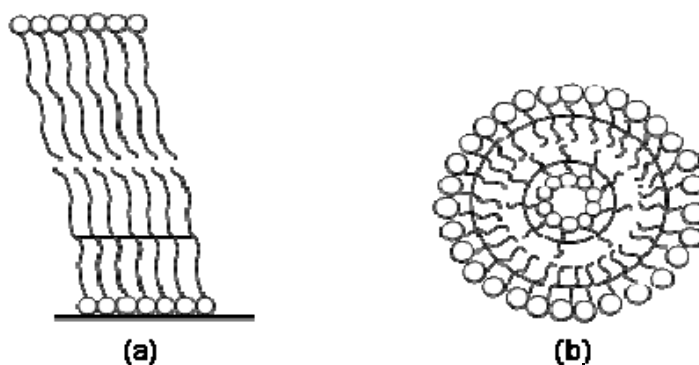


Figura 4 - Formas de organização do polímero polidiacetileno: (a) Filme ultrafino em suporte sólido, (b) Vesícula em solução. (PIRES et al., 2010a).

Vesículas são estruturas em bicamadas, formadas por moléculas anfifílicas (Figura 4b) (FEITOSA et al., 2009). Se estas estruturas são formadas por moléculas de fosfolipídios são, então, chamadas de lipossomas.

Moléculas anfifílicas que não se organizam em estruturas compactas, como as micelas, geralmente se associam para formar vesículas ou bicamadas planas. Essas moléculas, em geral, possuem pequenos grupos hidrofílicos e, ou grupos hidrofóbicos grandes e volumosos, que impedem a formação de micelas. Já a formação das vesículas ao invés das bicamadas planas é dirigida por dois fatores: (1) as bicamadas podem permitir a entrada de água na região hidrofóbica, o que é energeticamente desfavorável e (2) a estrutura muito extensa formada pela bicamada é entropicamente desfavorável (WACKLIN, 2007).

Uma quantidade considerável de pesquisas tem demonstrado a diversidade de moléculas que podem ser incorporadas em nanoestruturas auto-organizadas de polidiacetenos para atuarem como moléculas receptoras de outras biomoléculas, detectando-as (KIM et al., 2008; SCINDIA et al., 2007; SUN, 2005).

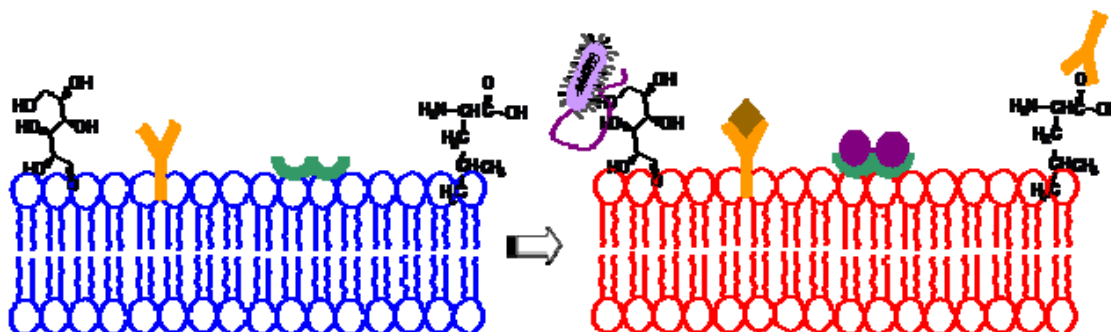


Figura 5 - Representação esquemática da transição colorimétrica de polidiacetileno em função da interação entre moléculas biológicas. (PIRES, et al., 2010a)

Vesículas de PDA, incorporadas com o fosfolipídio DMPC, em lâminas de vidro, foram preparadas para detecção de *Escherichia coli*. Quando a *E. coli*, foi vinculada aos seus anticorpos quimicamente ligado ao PDA, aumentou-se a fluorescência das vesículas. A inserção de DMPC nas vesículas, reduziu muito o tempo de resposta das alterações nas fluorescência, devido a flexibilidade da estrutura (KIM et al., 2008).

Em outro trabalho, o vírus Influenza foi identificado utilizando vesícula de PDA e quando o vírus se ligou ao receptor imerso no polímero, o pico de

absorção da cor azul reduziu com o concomitante aumento do pico referente à cor vermelha e a solução tornou-se rosa-alaranjado (REICHERT et al., 1995).

Filme de Langmuir contendo  $\alpha$ -D-manosídeo hexadecil (MC16) e PDA para identificação de *Escherichia* jm109 (WORLD HEARTH ORGANIZATION, 1994). Os autores imergiram o filme em suspensão de  $9 \times 10^8$  UFC·mL<sup>-1</sup> da bactéria e observaram que houve redução do pico referente a cor azul e aumento do pico referente a cor vermelha, indicando mudança de cor do sensor. O MC16 funcionou como agente recptor para o micro-organismo.

O PDA absorve a luz na região de maior energia e, portanto, pode apresentar diferentes cores, como vermelho, laranja ou roxo, dependendo dos diferentes estímulos externos. Muitos grupos de pesquisa têm demonstrado que a modificação estrutural do grupo de cabeça e cadeia lateral é uma abordagem muito eficaz para ajustar a resposta colorimétrica das vesículas de PDA (GOU et al., 2010). Segundo Kim e colaboradores, mostraram que a força de interação na superfície da vesícula PDA é fortemente determinada pela transição colorimétrica causada pela temperatura (KIM et al., 2008). Nos casos extremos em que as interações entre os grupos da cabeça são muito fortes, a transição da cor do PDA, geralmente é um processo irreversível. O termocromismo reversível, está relacionado com a modificação estrutural das produzida pelos conjuntos de ligações das cabeças de PDA (AHN et al., 2009).

O termocromismo, isto é a transição colorimétrica induzida pelo aumento da temperatura, é uma das áreas mais estudadas para filmes e vesículas de PDA. Em estudo recente, a transição termocrômica de vesículas de PDA foi avaliada no intervalo entre 20 °C e 90 °C. Observou-se que com o aumento da temperatura houve deslocamento hipsocrômico, do pico de máxima absorção referente à cor azul, que foi associado à movimentação das cadeias do polímero. Além disso, em temperaturas intermediárias, a solução vesicular adquiriu também coloração roxa que demonstrou ser reversível quando foram realizados ciclos de aquecimento/resfriamento das vesículas (POTISATITYUENYONG et al., 2008).

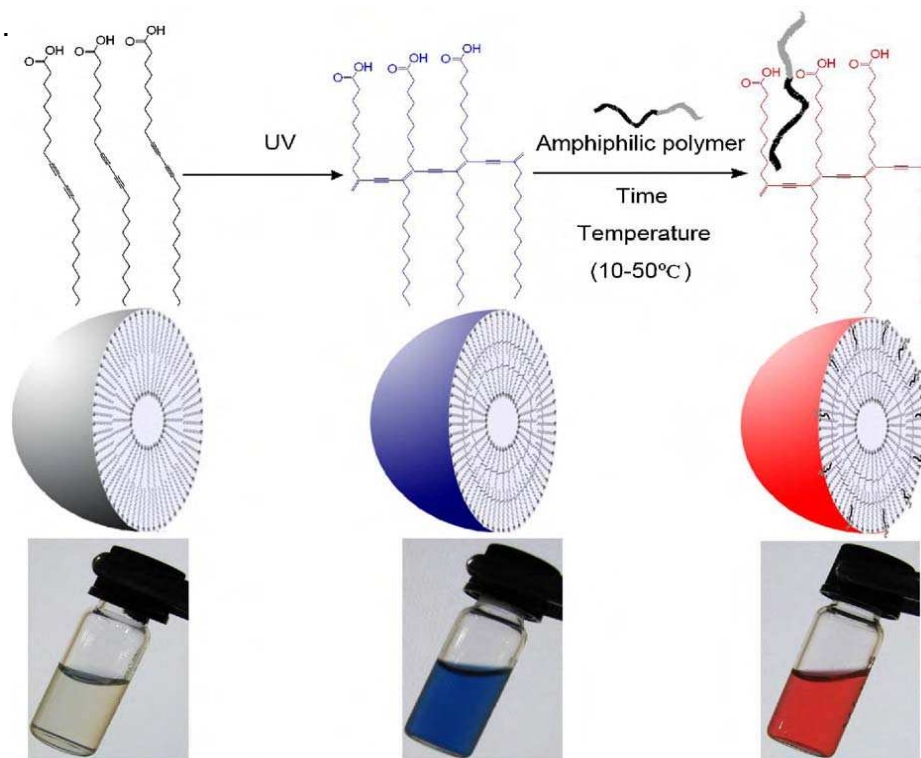


Figura 6: Representação esquemática do sensor de tempo e temperatura cromática com base na vesícula PDA e polímeros anfifílicos (GOU et al., 2010).

Entretanto, a maioria dessas pesquisas, concentra-se principalmente na resposta colorimétrica à temperatura. A investigação envolvendo o efeito das modificações estruturais na resposta colorimétrica a outros estímulos, como pH, íons, solventes e outros produtos químicos recebe pouca atenção.

O pH afeta a formação das ligações de H presentes na parte hidrofílica do PDA e as estruturas auto-organizadas das moléculas anfifílicas de PDA são estabilizadas por ligações de H. Desta forma, as condições de pH do sistema são fundamentais (WU et al., 2009). A influência do pH no cromismo de filmes e vesículas de PDA é importante para a aplicação dos mesmos como sensores para diversos sistemas.

A estabilidade de vesículas de PDA funcionalizadas com aminoácidos foi avaliada por Cheng (2008). Observou-se que à medida que o pH foi aumentado em razão da adição de NaOH, ocorreu transição colorimétrica imediata de azul para vermelho.

O estudo da influência de solventes sobre o cromismo de soluções de PDA permite entender como diferentes moléculas interagem com este polímero. O comportamento solvatocrômico de polímeros conjugados tem sido

intensamente estudado. Em determinados solventes, a planarização das cadeias e as concomitantes interações entre cadeias  $\pi-\pi$  geram um aumento do comprimento de conjugação (Hoeben et al., 2005).

Vários estudos com diferentes solventes vêm sendo realizados como o de Potisatityuenyong e colaboradores, que estudou o efeito de etanol na transição de cor de vesículas de PDA. Em uma solução 45 - 50 % de etanol, as vesículas aparentaram coloração roxa, sendo que com mais de 55 % do álcool houve transição completa e irreversível para vermelho.

Em outro trabalho, feito por Dei e colegas (2008), estudou também o solvatocromismo em suspensão de agregados de PDA. PDAs contendo monômeros com diferentes comprimentos de cadeias foram utilizados. Em clorofórmio, o PDA apresentou coloração amarela, entretanto, quando o clorofórmio foi misturado com hexano houve transição colorimétrica. Pires e colaboradores (2010a), também estudaram efeito de diferentes solventes orgânicos como o  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}$  e  $\text{CCl}_4$ . Segundo a autora, não existe um mecanismo único para a interação entre solventes orgânicos e moléculas de PCDA. O processo de transição colorimétrica das vesículas de PCDA e de PCDA incorporadas com colesterol e esfingomiéline com a adição de  $\text{CHCl}_3$  foi predominantemente entálpico, enquanto as transições espectrofotométricas provocadas por  $\text{CH}_2\text{Cl}$ ,  $\text{CCl}_4$  foram processos entropicamente dirigidos.

È com base no solvatocromismo do polidiacetileno e na interferência do pH e da temperatura no mesmo, o objetivo desse trabalho foi desenvolver vesículas de PDA para identificação de THM em água potabilizada. È com base no solvatocromismo do polidiacetileno e na interferência do pH e da temperatura no mesmo, que foi realizado neste trabalho.

#### **4. Delineamento experimental**

As análises do experimento foram conduzidas em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições.

Os resultados de RC (resposta colorimétrica) foram submetidos à análise de variância, em nível de 10 % de probabilidade ( $p < 0,1$ ).

## 5. Material e Métodos

A pesquisa foi desenvolvida nos Laboratórios de Higiene e Microbiologia de Alimentos e de Embalagem do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

### 5.1. Coleta das amostras de água

Foram coletadas no período da manhã e por três dias diferentes do mês de junho, amostras de água de quatro estações de tratamento (ETA/UFV, ETA1 SAAE/Viçosa, ETA 2/SAAE/Viçosa e ETA/COPASA), de 15 pontos de controle nas redes de distribuição, e, ainda de amostras de cinco poços artesianos. No momento da coleta, era medida a temperatura e cloro residual das amostras de água. Depois as amostras eram mantidas sobre refrigeração até o momento das análises.

### 5.2. Análises físico-químicas e microbiológicas de amostras de água

As seguintes análises físico-químicas e microbiológicas foram efetuadas, conforme metodologias propostas pela APHA (*American Public Health Association*) (GREENBERG et al., 1992):

- a) alcalinidade total, expressa em  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ .
- b) acidez, expressa em  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$ .
- c) cloretos, expressos em  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NaCl}$ .
- d) cloro residual livre, expresso em  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{Cl}_2$ .
- e) turbidez, expressa em UNT.
- f) pH.
- g) cor, expressa em uH.
- h) mesófilos aeróbios, expressa em  $\text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ .
- i) coliformes totais, expressos em NMP/100 mL.
- j) *Escherichia coli*, em NMP/100 mL.

### 5.3. Técnica da bioluminescência para análise de água

Medida de ATP- bioluminescência está diretamente associada com a presença de adenosina trifosfato (ATP), oriunda de micro-organismos ou de matérias orgânicas.

As amostras de água coletadas nas ETAs e nos pontos de rede foram analisadas também pela técnica de ATP- bioluminescência, usando-se kit Aquest Total (BIOTRACE, 2000), para determinação do ATP total. Esta técnica consiste em coletar aproximadamente 50 mL de uma amostra de água em béquer esterilizado de onde será retirada uma alíquota com cerca de 0,1 mL com o auxílio dos kits. O kit é introduzido na cubeta que contém o complexo enzimático luciferina/luciferase, e por meio de agitação manual por aproximadamente 5 s, promove-se a reação de formação de luz. Após agitação, a cubeta é inserida em local apropriado no luminômetro, obtendo-se a leitura em 10 s, devidamente impressa. O resultado é expresso em unidades relativas de luz (URL).

#### **5.4. Identificação e quantificação de Triclorometano por GC-MS**

O método de quantificação dos TCM se realizou por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC/MS), marca Shimadzu com detector quadrupolo em coluna DB-5 ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), utilizando a técnica de microextração em fase sólida (SPME). Uma fibra 100 µm DVB/PDMS foi exposta ao espaço livre do vial contendo 10 mL de amostra em forno a 80 °C por 20 min e em seguida dessorvida a 250 °C por 10 min no injetor. As condições empregadas no GC foram: injetor a 250 °C; *splitless* com *splitter* abrindo após 3 min; temperatura do forno de 40 °C a 290 °C a 4 °C/min; fluxo de gás Hélio a 1 mL/min (16 psi); fonte de íons a 170 °C, 29 a 400 m/z, modo SIM (CARLOS, 2011).

Para a determinação da curva de calibração do TCM, foi seguido o procedimento: Padrões de TCM em diferentes concentrações, em 5 pontos na faixa de 20 a 100 µg·L<sup>-1</sup> foram preparados com água deionizada e o headspace injetado no GC-MS para identificação do tempo de retenção;

#### **5.5. Preparo das vesículas**

As vesículas de 10,12-ácido pentacoisadiinócio (PCDA) foram preparadas puras e também com adição de diferentes fosfolipídios: esfingomiéline (ES), colesterol (CO) e 1,2-Dimiristoifosfatidilcolina (DMPC).

Vesículas de PCDA foram preparadas nas concentrações de 1 mM, 2 mM e 3 mM de PCDA em 10 mL de TCM. O solvente foi removido por meio de fluxo de nitrogênio e 10 mL de água deionizada foram adicionados. O volume foi completado para 10 mL com água deionizada. As suspensões foram então, levadas ao banho ultrassônico por 60 min, e, em seguida, filtradas em filtro PVDF (Millipore®). Depois foram estocadas a 4 °C por, no mínimo, 10 h, antes da irradiação em luz ultravioleta (Prodicil 110 v, 254 nm) por 5 min (PIRES et al., 2010b).

Para o preparo das vesículas de PCDA/CO.ES, a solução de 1 mM de ES e de CO foi solubilizada em 10 mL de TCM, sendo o solvente removido por fluxo de nitrogênio. Soluções de PCDA (1 mM, 2 mM e 3 mM) foram preparadas em 2 mL de DMSO. As soluções foram aquecidas a 80 °C durante 15 min e então adicionadas ao filme lipídico formado por ES e CO. O volume foi completado para 10 mL com água deionizada. As suspensões foram então, levadas ao banho ultrassônico por 60 min, e, em seguida, filtradas em filtro de 0,45 µm PVDF (Millipore®). Depois foram estocadas a 4 °C por, no mínimo, 10 h, antes da irradiação em luz ultravioleta (Prodicil 110 v, 254 nm) por 5 min (PIRES et al., 2010b).

Já para o preparo das vesículas de PCDA/DMPC, soluções de 1 mM, 2 mM e 3 mM de PCDA e 1 mM de DMPC foram separadamente solubilizadas em 10 mL de TCM, sendo o solvente removido por fluxo de nitrogênio. O volume foi completado para 10 mL com água deionizada. As suspensões foram, em seguida, filtradas em filtro PVDF (Millipore®). Depois foram estocadas a 4 °C por, no mínimo, 10 h, antes da irradiação em luz ultravioleta (Prodicil 110 v, 254 nm) por 5 min (SU et al., 2005).

## **5.6. Tratamento das vesículas com ultrasson de ponta**

A suspensão da vesícula preparada conforme item anterior, que obteve a resposta colorimétrica e o tamanho menor, foi submetida ao disruptor de células R2D091109, ao em vez do banho ultrassônico durante seu preparo. Para avaliar

também a influencia da potencia, foram usadas 5 diferentes potências: 100 w, 200 w, 300 w, 400 w e 500 w, por 18 min. Para avaliar esses efeitos na estrutura da vesícula, foram feitas as medidas do diâmetro hidrodinâmico e a resposta colorimétrica antes e após a adição de TCM até que ocorra a transição colorimétrica.

### **5.7. Resposta Colorimétrica (RC)**

Nos casos de mudança de cor, de azul para vermelho, calcula-se a RC, como parâmetro semi-quantitativo da alteração das propriedades crônicas segundo a equação 1:

$$RC = ((B_o - B_i) / B_o) * 100 \quad (1)$$

$$B = (A_{azul} / (A_{azul} + A_{vermelho}))$$

Em que:  $A_{azul}$  = absorvância a 640 nm e  $A_{vermelho}$  = absorvância 540 nm;  $B_o$  e  $B_i$  valores calculados antes e depois da mudança de cor, respectivamente (PIRES et al., 2010b).

### **5.8. Quantificação da mudança de cor**

Para avaliar a variação de cor da suspensão de vesículas, antes e após a imersão em solução de TCM, foi utilizado o parâmetro (RC) conforme Okada et al. (1998). A adição de TCM, foi realizada em 500  $\mu$ L da suspensão vesicular, de 1 em 1  $\mu$ L, até que ocorra a mudança de cor do azul para o vermelho. O cromismo da suspensão foi avaliado pela resposta colorimétrica, por meio de espectro de absorção UV-visível (Shimadzu UV-2550).

### **5.9. Medida do raio hidrodinâmico das vesículas**

O diâmetro das vesículas em suspensão foi medido por espalhamento de luz dinâmico (Nanophox, Sympatec). O tamanho da vesícula foi determinado

em uma intensidade de laser de 50%. Foram pipetados 400  $\mu\text{L}$  da vesícula e diluídas água deionizada, completando o volume para 1000  $\mu\text{L}$ . Cada tamanho médio de partícula da suspensão foi determinado por experimentos que consistiram de três medidas simples com um tempo de medição de 300 s.

#### **5.10. Avaliação da transição colorimétrica das vesículas na presença de TCM**

A partir de solução estoque, foram preparadas soluções com 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e 10000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de TCM em água deionizada.

Para a avaliação da transição colorimétrica das vesículas na presença de TCM, foram feitas algumas modificações nas condições da vesícula para verificar a influência de alguns fatores na RC. Os fatores escolhidos foram pH, temperatura e concentração da suspensão vesicular. Foi feito então um delineamento estatístico fatorial, para determinar quais tratamentos seriam avaliados, conforme a Tabela 2 abaixo.

Para cada tratamento, 500  $\mu\text{L}$  das soluções contendo TCM foram adicionados a 2 mL de suspensão de vesículas. Depois foram submetidos as temperatura de 20 °C, 30 °C e 40 °C durante 10 min.

Tabela 2 – Tratamentos aplicados às vesículas de PCDA mais colesterol e esfingomielina.

| Tratamento | pH   | T (°C) | Concentração (%) |
|------------|------|--------|------------------|
| 1          | 5,00 | 20     | 20               |
| 2          | 7,00 | 20     | 20               |
| 3          | 5,00 | 40     | 20               |
| 4          | 7,00 | 40     | 20               |

|    |      |    |     |
|----|------|----|-----|
| 5  | 5,00 | 20 | 100 |
| 6  | 7,00 | 20 | 100 |
| 7  | 5,00 | 40 | 100 |
| 8  | 7,00 | 40 | 100 |
| 9  | 6,00 | 30 | 40  |
| 10 | 6,00 | 30 | 40  |
| 11 | 6,00 | 30 | 40  |
| 12 | 6,00 | 30 | 40  |

Após, foi realizado pelo parâmetro de resposta colorimétrica (RC) conforme Okada et al. (1998).

Para todos os tratamentos testados acima, foram feitas soluções de vesículas de controle com adição de 500 µL de água deionizada, para avaliar se houve influência desses parâmetros na vesícula na identificação do TCM.

## 6. Resultados e Discussão

### 6.1. Ocorrência de TCM e a qualidade de água das ETAs e dos pontos de coleta de amostras nas redes de distribuição

Nessa pesquisa, optou-se pela determinação apenas do TCM considerando que de acordo com a literatura é o THM que se apresenta em maiores concentrações, constituindo-se cerca de 80 % dos trihalometanos totais (TTHM).

Para determinação das concentrações de TCM, foi aplicada a equação 2, obtida por meio da realização da curva analítica.

$$y = 843,5x + 1435 \quad (2)$$

Em que  $y$  é a área do pico de TCM no cromatograma e  $x$  a concentração de TCM.

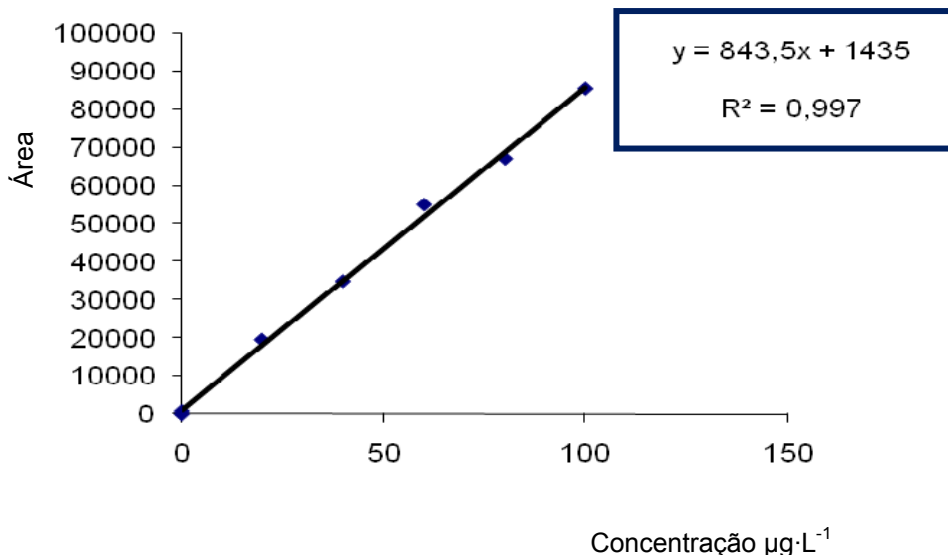


Figura 7 - Equação área versus concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) para a determinação de TCM na água.

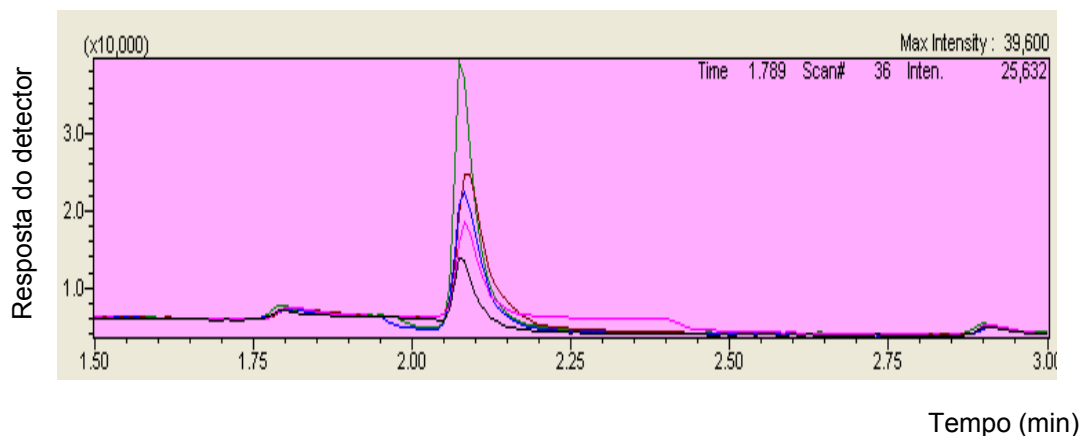


Figura 8 – Cromatograma da resposta do detector versus tempo de retenção (min) para obtenção da curva analítica do TCM. - Concentração de  $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  - Concentração de  $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  - Concentração de  $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  - Concentração de  $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  - Concentração de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

As concentrações de TCM variaram de 0 (zero)  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $133,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  dependendo do ponto de coleta na rede de distribuição (Tabela 3). A Portaria 518, do Ministério da Saúde, de 25 de março de 2004, que legisla sobre os padrões de potabilidade de água no Brasil, indica um valor máximo permitido (VMP) de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de TTHM. A OMS propõe um máximo de  $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TCM nas águas potáveis. No entanto, deve-se ressaltar que diversos países adotam limites diferentes para máximos de TTHM. No Canadá, a legislação propõe  $350 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , na Holanda adota-se o valor de  $75 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , na Alemanha  $25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e na França,  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (BRAGA, et al., 2004).

Tabela 3 - Concentrações de TCM em amostras de água potabilizada coletadas em ETAs, poços e pontos de controle de rede de distribuição.

| AMOSTRA    | MÉDIA ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | DP ( $\pm$ ) | AMOSTRA | MÉDIA ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | DP ( $\pm$ ) |
|------------|---|--------------|---------|---|--------------|
| ETA1/ SAAE | 0,5                                       | 0,4          | P 11    | 11,7                                      | 15,7         |
| ETA2/SAAE  | 1,0                                       | 0,4          | P12     | 29,4                                      | 23,0         |
| ETA/UFV    | 5,1                                       | 4,1          | P 13    | 16,6                                      | 13,4         |
| ETA/COPASA | 3,9                                       | 2,1          | P14     | 27,4                                      | 43,5         |
| P1         | 3,3                                       | 1,1          | P15     | 52,9                                      | 70,6         |
| P2         | 3,3                                       | 1,2          | P16     | --  | --           |
| P3         | 2,1                                       | 2,5          | P17     | 10,1                                      | 9,7          |
| P4         | 07  | 1,3          | P18     | 25,3                                      | 22,0         |
| P5         | 0,3                                       | 0,5          | P19     | 31,3                                      | 14,5         |
| P6         | 1,3                                       | 1,1          | PA1     | 5,2                                       | 5,1          |
| P7         | 1,2                                       | 1,1          | PA2     | 8,2                                       | 4,9          |
| P8         | 2,4                                       | 1,5          | PA3     | 4,7                                       | 1,6          |
| P9         | 22,2                                      | 32,1         | PA4     | 1,8                                       | 0,2          |
| P10        | 45,8                                      | 49,1         | PA5     | 2,2                                       | 0,1          |

P1 a P8 - Amostras coletadas em pontos de rede de distribuição da ETA/SAAE/Viçosa.

P9 a P15 - Amostras coletadas em pontos de rede de distribuição da ETA/UFV.

P16 a P19 - Amostras coletadas em pontos de rede de distribuição de ETA/ COPASA.

PA1 a PA5 - Poços artesianos profundos.

-- não identificado.

Verifica-se, portanto, pela Tabela 3, que das 28 amostras avaliadas em três repetições, duas delas, correspondendo a pouco mais de 2 %, encontram-se acima do VMP indicado pela Portaria 518/MS e nenhuma atingiu à recomendação do valor máximo aceito pela OMS.

Pela Tabela 3, constata-se que as amostras coletadas nas ETAs continham baixas concentrações de TCM, com valores entre  $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $6,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . A formação de THM é dependente da presença dos ácidos húmicos e fúlvicos, como precursores, e de compostos clorados, particularmente dos inorgânicos. Nas quatro estações avaliadas, o procedimento de desinfecção é

realizado com o cloro na forma gasosa, portanto um processo que favorece a formação de THM. Por isso, uma maneira eficiente de se evitar a formação desses compostos indesejáveis é aplicar um controle rígido nos padrões de turbidez. A turbidez é causada pela presença de material em suspensão, dentre eles plânctons e bactérias, que ao se decomporem formam os precursores mencionados. Esse parâmetro deve ser inferior 5 UNT, determinada no nefelômetro, de acordo com a Portaria 518/MS. No entanto, sabe-se que quanto menor for os valores de turbidez menores serão as concentrações de precursores.

Os valores de turbidez para todas as amostras avaliadas encontravam-se abaixo de 0,5 UNT, ou seja, 10 vezes menores do VMP (Tabela 4). Também, os valores para o parâmetro cor da água nas amostras estiveram sempre abaixo do VMP que é de 15 uH (Unidade Hazen - PtCo/L) (Tabela 4).

A cor é resultante da decomposição de matéria orgânica e, também, pela presença de íons metálicos, como ferro e manganês, e também plânctons e resíduos industriais. Portanto, podem originar a presença dos precursores mencionados.

Tabela 4 – Qualidade de água de ETAs e de pontos de rede de distribuição.

| Amostra   | Turbidez (UT) | Cor (uH) | pH          | Cloro Residual Livre (mg·L <sup>-1</sup> Cl <sub>2</sub> ) |
|-----------|---------------|----------|-------------|--|
| ETA/SAAE1 | 0,46 ± 0,20   | 3 ± 2    | 6,98 ± 0,03 | 0,48 ± 0,03  |
| ETA/SAAE2 | 0,85 ± 0,20   | 7 ± 1    | 7,76 ± 0,01 | 0,45 ± 0,01  |
| ETA/UFV   | 0,25 ± 0,08   | nd       | 6,37 ± 0,05 | 0,47 ± 0,05  |
| P1        | 0,37 ± 0,38   | 7 ± 2    | 7,64 ± 0,04 | 0,43 ± 0,04  |
| P2        | 0,31 ± 0,04   | 7 ± 2    | 7,61 ± 0,07 | 0,36 ± 0,07  |
| P3        | 0,38 ± 0,07   | 6 ± 1    | 7,49 ± 0,06 | 0,43 ± 0,06  |
| P4        | 0,52 ± 0,06   | 6 ± 1    | 7,48 ± 0,09 | 0,42 ± 0,09  |
| P5        | 0,24 ± 0,11   | 5 ± 1    | 7,43 ± 0,01 | 0,46 ± 0,01  |

|      |             |       |             |             |
|------|-------------|-------|-------------|-------------|
| P6   | 0,35 ± 0,01 | 7 ± 2 | 7,32 ± 0,07 | 0,40 ± 0,07 |
| P7   | 0,31 ± 0,08 | 7 ± 1 | 7,40 ± 0,09 | 0,41 ± 0,09 |
| P8   | 0,46 ± 0,05 | 8 ± 2 | 7,22 ± 0,01 | 0,43 ± 0,03 |
| P9   | 0,40 ± 0,09 | nd    | 6,14 ± 0,13 | 0,48 ± 0,01 |
| P10  | 0,17 ± 0,01 | nd    | 6,17 ± 0,03 | 0,38 ± 0,03 |
| P 11 | 0,57 ± 0,01 | nd    | 6,17 ± 0,01 | 0,37 ± 0,02 |
| P12  | 0,24 ± 0,02 | nd    | 6,10 ± 0,06 | 0,52 ± 0,01 |
| P 13 | 0,32 ± 0,05 | nd    | 6,10 ± 0,07 | 0,51 ± 0,02 |
| P14  | 0,27 ± 0,01 | nd    | 6,08 ± 0,10 | 0,48 ± 0,02 |
| P15  | 0,37 ± 0,01 | nd    | 6,06 ± 0,06 | 0,35 ± 0,01 |

nd- Não Determinado.

P1 a P8: Amostras coletadas em pontos de rede de distribuição da ETA/SAAE/Viçosa.

P9 a P16: Amostras coletadas em pontos de rede de distribuição da ETA/UFV.

Assim, o controle desses dois parâmetros na água das ETAs parece ter sido fundamental para que as concentrações de TCM fossem baixas, como as determinadas nessa pesquisa. Para isso, é necessário que as etapas do tratamento convencional da água, que incluem a sedimentação simples, a floculação com agentes coagulantes, a decantação, a filtração estejam atuando no sentido de produzir uma água com baixos valores de turbidez e de cor (ANDRADE, 2008). Essas etapas mencionadas se completam com o processo de desinfecção da água filtrada, normalmente usando-se compostos clorados.

Nessas estações, o tratamento convencional da água iniciou-se com a etapa de sedimentação simples nas fontes de captação, ou seja, na lagoa usada para obtenção da água para a ETA1/SAAE e a ETA/UFV, e no córrego onde foi captada a água para ETA2/SAAE, e no poço artesiano para ETA/COPASA. Nessa etapa, ocorreu uma diminuição da turbidez e da cor pela deposição das partículas maiores e ação da radiação UV sobre os micro-organismos.

Na sequência, a água recebeu tratamento com sulfato de alumínio  $[Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O]$  ou policloreto de alumínio  $[Al_n(OH)_m Cl_{3(n-m)}]$  que associado à alcalinidade ( $OH^-$ ) presente na água formou o hidróxido de alumínio  $[Al(OH)_3]$  que apresenta carga elétrica positiva e durante a etapa de floculação reagiu com a partículas menores responsáveis pela turbidez e cor que apresentam carga elétrica negativa. Assim, há uma atração eletrostática entre o hidróxido de alumínio e as partículas mencionadas, havendo um aumento do peso específico e do diâmetro das partículas. Portanto, de acordo com a Lei de Stokes (Equação 3) que trata da velocidade de sedimentação das partículas que demorariam dias ou meses para se decantarem em razão de vários fatores.

$$V = \frac{\theta_s - \theta_w}{9\mu} \times g \times r^2 \quad (3)$$

Sendo  $V$  a velocidade final de sedimentação,  $\theta_s$  o peso específico de partícula,  $\theta_w$  o peso específico da água,  $\mu$  a viscosidade do líquido,  $g$  a aceleração da gravidade,  $r$  o raio da partícula.

Deve-se ressaltar que as ETAs conseguiram manter a concentração de  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  cloro residual livre, sendo esse valor mínimo exigido pela legislação, o que é fundamental para garantir a qualidade microbiológica da água. Por outro lado esse cloro residual pode reagir com a matéria orgânica e formar o TCM. Para melhoria da eficiência da cloração, é recomendável que a turbidez da água após a filtração seja, no máximo, de  $0,5 \text{ UNT}$  e o pH, no máximo,  $8,00$  (BRASIL, 2004). Este fato deve-se ao conhecimento de que a forma não dissociada do cloro ( $\text{HClO}$ ) é a que tem ação antimicrobiana e sua concentração, por ser um ácido fraco ( $K_a = 3,18 \times 10^{-8}$ , a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), é regida pela equação de Henderson-Hasselbalch (Equação 4), usada para quantificar a concentração de ácido hipocloroso (Tabela 5).

$$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ de HClO} = \frac{\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ de cloro residual livre}}{1 + 10^{\text{pH} - 7,8}} \quad (4)$$

Tabela 5 - Concentrações de ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ) nas água das ETAs e nos pontos de coletas nas redes de distribuição.

| Amostra    | $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$<br>(Média) | Amostra | $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$<br>(Média) |
|------------|--|---------|--|
| ETA/ SAAE1 | 0,36                                       | P7      | 0,23                                       |
| ETA/SAAE 2 | 0,16                                       | P8      | 0,28                                       |
| ETA/UFV    | 0,44                                       | P9      | 0,46                                       |
| P1         | 0,18                                       | P10     | 0,36                                       |
| P2         | 0,16                                       | P 11    | 0,36                                       |
| P3         | 0,22                                       | P12     | 0,50                                       |
| P4         | 0,22                                       | P 13    | 0,50                                       |

|    |      |     |      |
|----|------|-----|------|
| P5 | 0,22 | P14 | 0,50 |
| P6 | 0,28 | P15 | 0,34 |

P1 a P8: Amostras coletadas em pontos de rede de distribuição da ETA/SAAE/Viçosa.

P9 a P15 - Amostras coletadas em pontos de rede de distribuição da ETA/UFV.

Os valores encontrados nessa pesquisa são compatíveis com outros trabalhos em que se determinaram as concentrações TCM ou TTHM em amostras de água de outras regiões (SOUZA, 2009; VIANA et al., 2009; MARMO, 2005, BRAGA et al., 2004; TROLI et al., 2002 ). Braga e colaboradores (2004) avaliando a concentração de TTHM em vários pontos de rede distribuição na cidade de Fortaleza/Ceará determinaram valores numa faixa de  $39 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $79 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de TCM, com médias de  $66$ ,  $79 \pm 29,22 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $59,31 \pm 10,99 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $63,46 \pm 8,69 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , para cada ponto de rede. Souza (2009) avaliou amostras de água de uma indústria em que a água bruta recebeu tratamento de pré-cloração com  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de CRL, encontrando concentrações de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de TTHM. Também encontrou, nas amostras de água após o tratamento convencional na ETA contendo  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de CRL apresentou  $120 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Já as amostras de águas coletadas no banheiro do setor administrativo e no refeitório da indústria, ambas contendo  $1,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de CRL apresentaram as concentrações de  $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $70 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de TTHM, respectivamente. A diminuição da concentração de cloro nos pontos avaliados reduziu muito as concentrações de TTHM. Quando a água bruta foi clorada com  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de CRL, a água tratada, a água do banheiro do setor administrativo e água refeitório continham  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , de CRL, as concentrações de TTHM foram reduzidas para  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $0,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $0,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente.

Troli e colaboradores (2004) avaliaram o efeito do tipo de composto clorado adicionado à água de uma ETA em Corumbá/Mato Grosso, que utilizava o Rio Paraguai como manancial. As amostras de água foram coletadas na Estação de Tratamento de Água cuja turbidez inicial era de  $11,0 \text{ UNT}$ . Foram aplicados à água  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de CRL, obtidos a partir de produtos comerciais com  $\text{Cl}_2$ , hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio e dicloroisocianurato de sódio. Os valores das concentrações de TCM independente do tipo de agente desinfetante variaram de  $13,93$  a  $43,46 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , atendendo, portanto à legislação. No entanto, as maiores concentrações de TCM foram encontradas quando a desinfecção da água foi realizada com os hipocloritos. Os autores concluem que apesar do

conteúdo de matéria orgânica nas amostras após tratamento convencional, os valores obtidos de THM estão dentro dos limites propostos pela Portaria 518/MS.

Andreola e colaboradores (2005) avaliaram a influência da época do ano - seca ou chuvosa - na formação de TTHM. Amostras coletadas em um reservatório do sistema de tratamento após 8h e 30 min do contato com o cloro continha  $5,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de TTHM na época de seca e  $57,7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , no período de chuva. No período seco, a amostra de água do manancial apresentou uma turbidez de 19,0 UNT e no período chuvoso atingiu 850 UNT.

A concentração de TCM na rede de distribuição de água da ETA/UFV foi avaliada em duas pesquisas. Numa delas, a média de TCM determinada foi de  $4,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (CARLOS et al., 2011) e na outra houve uma variação de  $10,2 \pm 2,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $21,22 \pm 2,81 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de TCM (LELES, 2005) .

Os valores da concentração TCM na rede de distribuição das ETAs (P1 a P8) encontravam-se entre 0 (zero) a  $4,8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , com uma média de  $1,6 \pm 1,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  mostrando um ligeiro aumento com relação às ETAs (Tabela 6). Por outro lado, a concentração de CRL nesses pontos de coleta (P1 a P8) mantiveram-se numa faixa de 0,32 a  $0,52 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de CRL. É provável que a presença de matéria orgânica nas tubulações, ou nos reservatórios dos pontos de coleta tenha contribuído para pequeno aumento na concentração de TCM.

Tabela 6 - Médias e desvios-padrão da concentração de TCM nas ETAs, redes de distribuição e dos poços artesianos.

| Amostra                        | TCM ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) |
|--------------------------------|---|
| ETA1/SAAE                      | $0,5 \pm 0,4$                           |
| Pontos de Rede de Distribuição | $1,6 \pm 1,5$                           |
| ETA2/SAAE                      | $0,7 \pm 0,7$                           |
| ETA/UFV                        | $5,1 \pm 4,1$                           |
| Pontos de Rede de Distribuição | $29,4 \pm 36,5$                         |
| ETA/COPASA                     | $3,9 \pm 2,1$                           |
| Pontos de Rede de Distribuição | $16,7 \pm 17,6$                         |
| Poços artesianos               | $3,9 \pm 4,1$                           |

Nos pontos de coleta de amostras das redes de distribuição da ETA/UFV e da ETA/COPASA, as concentrações de TCM foram consideravelmente mais elevadas, com médias de  $29,4 \pm 36,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $16,7 \pm 17,6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Observando-se os resultados das análises físico-químicas verifica-se que não há alterações que possam justificar o aumento nas concentrações de TCM. A provável explicação pode estar nas condições da rede de distribuição e nos reservatórios de água. À distância percorrida pela água a partir da ETA/UFV e da ETA/COPASA é menor do que da ETA/SAAE. No entanto, não parece ser à distância o principal fator na formação de TCM, sendo o mais provável é que as tubulações e os reservatórios nesses sistemas de distribuição tenham mais matéria orgânica para reagir com o cloro. Por outro lado, a concentração de CRL variou entre 0,31 e 0,51  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Como em todos os pontos de coletas das amostras ainda havia a presença de cloro, em concentrações acima do mínimo exigido pela legislação, que é de 0,2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , e a possível presença de precursores, a reação de formação de TCM poderia ocorrer aumentando sua concentração.

Resultados de análises complementares nas amostras de água usadas na avaliação de TCM encontram-se na Tabela 7. Os resultados das análises físico-químicas de acidez, alcalinidade e cloretos encontraram-se dentro dos padrões exigidos pela Portaria 518/MS. Para todas as amostras, as contagens de bactérias heterotróficas foram  $<1,0 \times 10^0 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$  e as de coliformes a 35 °C e *Escherichia coli* apresentaram ausência em 100 mL, portanto dentro dos padrões exigidos pela legislação. Esses resultados não apresentaram alterações e, ou valores que pudessem justificar os resultados encontrados para as concentrações de TCM, no entanto, auxiliaram na avaliação da qualidade da água e interpretação dos resultados.

Tabela 7 – Análises complementares da qualidade de água de ETAs e de pontos de rede de distribuição.

| Amostra  | Acidez<br>( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{CO}_2$ ) | Alcalinidade<br>( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{CaCO}_3$ ) | Cloretos<br>( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl) |
|----------|---|---|--|
| ETA/SAAE | $4,0 \pm 0,3$   | $32,0 \pm 1,0$  | $27,2 \pm 1,0$                                       |

|           |             |            |            |
|-----------|-------------|------------|------------|
| ETA/SAAE2 | 3,7 ± 0,1   | 29,9 ± 1,3 | 27,8 ± 2,3 |
| ETA/UFV   | 0,0 ± 0     | 26,2 ± 2,3 | 33,8 ± 1,5 |
| P1        | 4,2 ± 0,6   | 41,6 ± 1,8 | 38,0 ± 1,3 |
| P2        | 4,8 ± 1,0   | 22,3 ± 2,3 | 35,0 ± 2,0 |
| P3        | 4,0 ± 1,1   | 30,3 ± 5,2 | 36,5 ± 2,0 |
| P4        | 3,8 ± 0,7   | 22,4 ± 2,3 | 27,0 ± 1,3 |
| P5        | 3,7 ± 0,1   | 20,4 ± 1,7 | 28,6 ± 2,5 |
| P6        | 3,5 ± 1,5   | 20,0 ± 1,2 | 27,0 ± 2,7 |
| P7        | 4,0 ± 0,3   | 20,8 ± 0,9 | 29,4 ± 2,3 |
| P8        | 11,7 ± 1,6  | 18,8 ± 4,1 | 29,0 ± 5,1 |
| P9        | 6,9 ± 1,0   | 26,2 ± 1,5 | 38,4 ± 4,5 |
| P10       | 4,2 ± 2,1   | 24,2 ± 2,2 | 37,3 ± 1,5 |
| P 11      | 3,9 ± 0,1   | 25,9 ± 0,1 | 25,2 ± 1,7 |
| P12       | 6,6 ± 1,0   | 22,4 ± 3,0 | 25,6 ± 1,6 |
| P 13      | 10,30 ± 1,2 | 21,2 ± 4,1 | 31,3 ± 0,2 |
| P14       | 7,69 ± 0,1  | 24,1 ± 3,0 | 23,7 ± 1,4 |
| P15       | 8,80 ± 1,0  | 26,6 ± 0,7 | 22,5 ± 1,4 |

P1 a P8: Amostras coletadas em pontos de rede de distribuição da ETA/SAAE/Viçosa.

P9 a P16: Amostras coletadas em pontos de rede de distribuição da ETA/UFV.

Também nas amostras de água, foram realizadas medidas de ATP-bioluminescência, que estão diretamente associados com a presença de adenosina trifosfato (ATP), oriundos de micro-organismos ou de matérias orgânicas específicas, como extrato celular de vegetais, células somáticas e sangue. Como a presença dessas substâncias é muito pouco provável nas águas das ETAs e também nas águas das redes de distribuição, a técnica foi usada para avaliar a presença de micro-organismos como as bactérias heterotróficas ou coliformes a 35 °C ou *Escherichia coli*.

Essa técnica tem sido usada para avaliar com sucesso a qualidade microbiológica de água (KRIEGEL AND RIGATA, 2010; CAPRITA et al., 2009; COSTA et al., 2004; DELAHAYE et al., 2004; LEE et al., 2004), leite e derivados (HUANG et al., 2008), produtos minimamente processados, como o melão (UKUKU, SAPERS and FETT, 2005) , superfícies de processamento de alimentos (COSTA et al., 2006 ) ar de ambientes ( LEE et al., 2008).

Pelas medidas de ATP-bioluminescência (Tabela 8), pode-se concluir que havia ausência ou a baixa concentração de ATP nas amostras de água. Foi determinado o valor médio de  $20,5 \pm 13,4$  URL considerando-se todas as amostras.

Esses valores estão abaixo dos valores de 150 URL recomendados pelo fabricante do equipamento, que indica condições higiênicas satisfatórias para superfícies de processamento de alimentos, em uma área de  $100 \text{ cm}^2$ , usando-se o swab para remoção do ATP das superfícies (BIOTRACE, 2000). No entanto, esses valores de recomendação devem ser definidos para cada situação específica. Por exemplo, para água não há um valor de referência. No entanto esses valores são compatíveis com os resultados obtidos para as avaliações microbiológicas:  $<1,0 \times 10^0$  UFC·mL<sup>-1</sup> de bactérias heterotróficas e ausência de coliformes a 35 °C /100 mL e consequentemente ausência de *E. coli* por 100 mL.

Tabela 8 – Medidas de ATP-bioluminescência para amostras de água das ETAs (UFV, SAAE1 e 2) e de pontos de coletas de amostras na rede de distribuição.

| Amostras  | Média (URL) ± DP |
|-----------|------------------|
| ETA/UFV   | 8,3 ± 1,5        |
| ETA1/SAAE | 27,3 ± 29,1      |
| ETA2/SAAE | 30,3 ± 29,1      |
| P1        | 51,6 ± 50,6      |
| P2        | 39,3 ± 30,0      |
| P3        | 24,6 ± 4,6       |
| P4        | 21,0 ± 5,1       |
| P5        | 16,6 ± 1,5       |

|       |             |
|-------|-------------|
| P6    | 13,6 ± 3,2  |
| P7    | 16,3 ± 2,0  |
| P8    | 15,3 ± 4,61 |
| P9    | 21,3 ± 8,5  |
| P10   | 11,3 ± 3,2  |
| P 11  | 11,6 ± 0,5  |
| P12   | 21,6 ± 5,0  |
| P 13  | 8,3 ± 3,2   |
| P14   | 16,3 ± 8,7  |
| P15   | 14,6 ± 4,2  |
| Total | 20,5 ± 13,4 |

P1 a P8: Amostras coletadas em pontos de rede de distribuição da ETA/SAAE/Viçosa.

P9 a P15 - Amostras coletadas em pontos de rede de distribuição da ETA/UFV.

## 6.2. Seleção da suspensão de vesículas

### 6.2.1. Resposta Colorimétrica (RC)

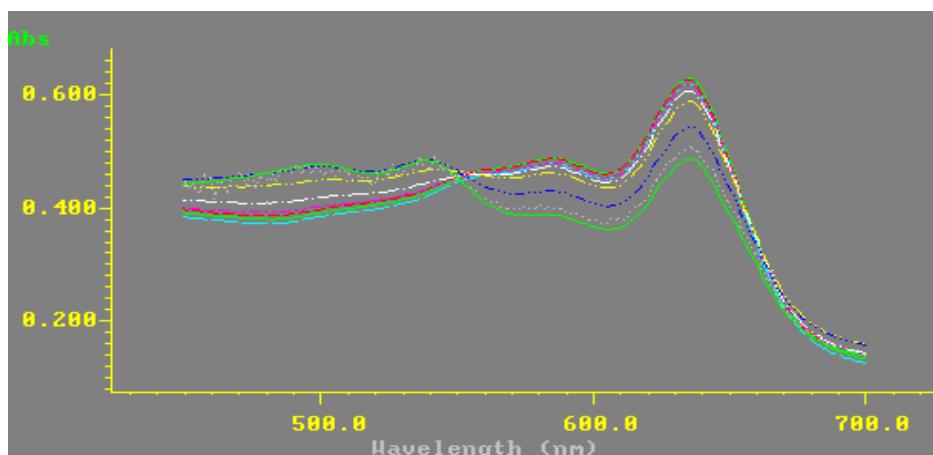
Observa-se pela Tabela 9, que a adição de TCM promoveu a transição colorimétrica para diferentes composições na produção das suspensões de vesículas, tanto das de PCDA quanto daquelas contendo CO.ES e DMPC. No entanto, a maior RC foi obtida pela suspensão preparada com 1 mM de PCDA + 1 mM de CO.ES com adição de 25 µL de TCM, que corresponde a menor quantidade adicionada do solvente, em relação a quantidade de TCM adicionada nas outras vesículas até a mudança de cor do azul para o vermelho (Figura 16).

Fica claro na tabela 9, que apesar de todas as vesículas possuírem PCDA e serem adicionadas de TCM, a presença de DMPC ou CO e ES na estrutura modifica a sensibilidade ao composto clorado e possivelmente o mecanismo de transição de cor.

TABELA 9 – Resposta Colorimétrica (RC) dos diferentes tipos de vesículas após a adição de TCM.

| Amostra<br>(concentração em mm) | TCM<br>( $\mu\text{l}$ ) | Média $\pm$ DP |
|---------------------------------|--------------------------|----------------|
| 1 PCDA                          | 30                       | 15 $\pm$ 1,5   |
| 2 PCDA                          | 28                       | 11 $\pm$ 1,5   |
| 3 PCDA                          | 30                       | 14 $\pm$ 2,0   |
| 1 PCDA +1 DMPC                  | 25                       | 11 $\pm$ 12    |
| 2 PCDA + 1 DMPC                 | 28                       | 11 $\pm$ 2,1   |
| 3 PCDA + 1 DMPC                 | 28                       | 9 $\pm$ 7,5    |
| 1 PCDA + 1 CO.ES                | 25                       | 21 $\pm$ 6,0   |
| 2 PCDA + 1 CO.ES                | 25                       | 15 $\pm$ 6,6   |
| 3 PCDA + 1 CO.ES                | 28                       | 18 $\pm$ 9,4   |

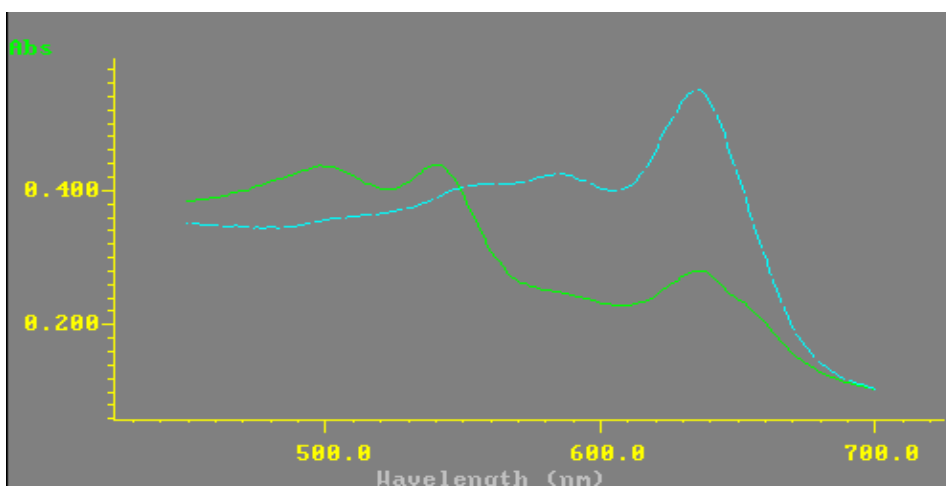
RC: resposta colorimétrica; PCDA - 10,12-ácido pentacoisadiinócio polidiacetileno;



DMPC - Dimiristoifosfatidilcolina; CO.ES - colesterol e esfingomielina.

Figura 16 - Absorbância da suspensão de vesículas de 1 mM de PCDA + 1 mM de CO.ES com aumento da adição de 5  $\mu\text{L}$  variando de 0  $\mu\text{L}$  a 25  $\mu\text{L}$ . A linha verde corresponde à adição de 25  $\mu\text{L}$ .

A RC expressa à quantidade de moléculas de PCDA, em porcentagem, em que ocorreu a transição da cor de azul para vermelha, neste caso, usando-se



o TCM como solvente indutor. À medida que o solvente foi adicionado, ocorreu à redução do pico referente à cor azul e o aumento do pico referente à cor vermelha (Figura 17).

Figura 17- Absorbância da suspensão de vesículas de 1 mM de PCDA + 1 mM de CO.ES antes (linha azul) e após adição de triclorometano (linha verde).

Em média as suspensões de vesículas de PCDA, PCDA/DMPC e PCDA/CO.ES possuem coloração azul com bandas de absorção máxima de  $640 \pm 2,0$  nm e na coloração vermelha apresentam bandas eletrônicas de  $540 \pm 2,0$  nm, em sua varredura. Isso mostra que a adição das moléculas de lipídios incorporadas no PCDA não impediu a etapa de polimerização. O PCDA é responsável pela coloração azul da suspensão de vesícula. Segundo Rozner e colaboradores (2008), os fosfolipídios formam microdomínios dentro da estrutura do PCDA e, por isso não afetam a polimerização e a formação da cor azul.

orgânicos, dentre eles o TCM, que foi o que provocou a maior conversão de moléculas PCDA na forma azul para forma vermelha.

Dessa forma, pode-se dizer que a presença do colesterol e da esfingomiéline promove interações com as moléculas do TCM, que alteram a transição colorimétrica do azul para o vermelho, com uma menor quantidade de moléculas de TCM.

### 6.2.2. Diâmetro das vesículas em suspensão

A adição dos fosfolipídios aumentou o diâmetro das vesículas (Tabela 10), o que indica, portanto, que a incorporação das moléculas na estrutura do PCDA influenciou no tamanho do raio hidrodinâmico. A suspensão de vesículas compostas de 1 mM de PCDA + 1 mM CO.ES foi a que apresentou menor diâmetro, em média  $312,82 \pm 1,88$  nm.

Observou-se também que as vesículas contendo DMPC obtiveram médias de diâmetro maiores que as contendo CO.ES. Provavelmente, as

interações ocorridas entre CO.ES e PCDA foram maiores que as ocorridas entre DMPC e PCDA, promovendo um tamanho menor das vesículas. E também as cadeias de PCDA contendo ES são mais saturadas do que as cadeias contendo DMPC, elas são capazes de formar mais facilmente ligações de Hidrogênio, promovendo uma interação maior entre suas cadeias, diminuindo o seu diâmetro.

Tabela 10 – Diâmetro, em nm, das vesículas de PCDA adicionadas de CO, ES e DMPC.

| Amostra<br>(mM)  | Média ± DP<br>(nm) |
|------------------|--------------------|
| 1 PCDA           | 123,32 ± 2,39      |
| 2 PCDA           | 162,08 ± 1,62      |
| 3 PCDA           | 144,19 ± 1,77      |
| 1 PCDA +1 DMPC   | 757,10 ± 8,46      |
| 2 PCDA + 1 DMPC  | 729,34 ± 10,74     |
| 2 PCDA + 1 DMPC  | 839,72 ± 12,62     |
| 1 PCDA + 1 CO.ES | 312,82 ± 1,88      |
| 2 PCDA + 1 CO.ES | 729,34 ± 5,44      |
| 3 PCDA + 1 CO.ES | 663,40 ± 2,94      |

PCDA - 10,12-ácido pentacoisadiinócio polidiacetileno;

DMPC Dimiristoifosfatidilcolina;

CO.ES - colesterol e esfingomiélinea.

As vesículas de PCDA apresentaram variação em seu tamanho de acordo com a quantidade de PCDA (1 mM, 2 mM e 3 mM), numa faixa de 123,32 nm a 162,08 nm. Okada e colaboradores (1998) encontraram pelo espalhamento de luz dinâmico, valores de diâmetros de 50 a 350 nm para vesículas de PCDA.

Em razão dos resultados da RC e do tamanho das suspensões de vesículas, aquelas preparadas com 1 mM de PCDA + 1 mM CO.ES foram as selecionadas para as análises posteriores, com o objetivo de definir condições para que essas vesículas sejam indicativas da presença de TCM em água tratada.

### 6.2.3. Influência das ondas ultrassônicas no diâmetro das vesículas

Nessa etapa da pesquisa, foi efetuada uma modificação na produção das suspensões das vesículas. Na fase anterior, elas eram preparadas em banho ultrassônico, onde a onda produzida na água vai atuar nas vesículas que se encontram dentro de um frasco. Agora, as ondas ultrassônicas foram aplicadas diretamente nas vesículas, buscando-se melhores RC.

Constata-se pela Tabela 11, que a suspensão de vesículas com 1 mM de PCDA/CO.ES aumentou seus valores de RC, para todas as potências aplicadas de 100 w a 500 w quando comparadas com a técnica do banho ultrassônico. As médias das porcentagens das RC variaram entre  $31,5 \pm 0,7 \%$  e  $39,5 \pm 10,8 \%$ , quando o ultra-som foi aplicado diretamente na vesícula, enquanto essa variação foi de  $21,0 \pm 6,0 \%$ , para o uso do banho ultrassônico.

Tabela 11 – Resposta Colorimétrica (RC) das vesículas preparadas com 1 mM de PCDA/CO.ES submetidas a diferentes potências no ultrassom de ponta.

| Amostra | TCM ( $\mu\text{L}$ ) | RC (%) Média $\pm$ DP |
|---------|-----------------------|-----------------------|
| 100 w   | 35                    | $33,0 \pm 1,4$        |
| 200 w   | 35                    | $39,5 \pm 10,8$       |
| 300 w   | 30                    | $31,5 \pm 2,1$        |
| 400 w   | 25                    | $34,0 \pm 4,2$        |
| 500 w   | 30                    | $31,5 \pm 0,7$        |

RC: resposta colorimétrica.

No entanto, a vesícula selecionada submetida a 400 w de potência mudou a transição colorimétrica de azul para vermelho, com a menor quantidade de TCM (25  $\mu\text{L}$ ) sendo sua RC média de  $34 \pm 4,2 \%$  (Figura 18).

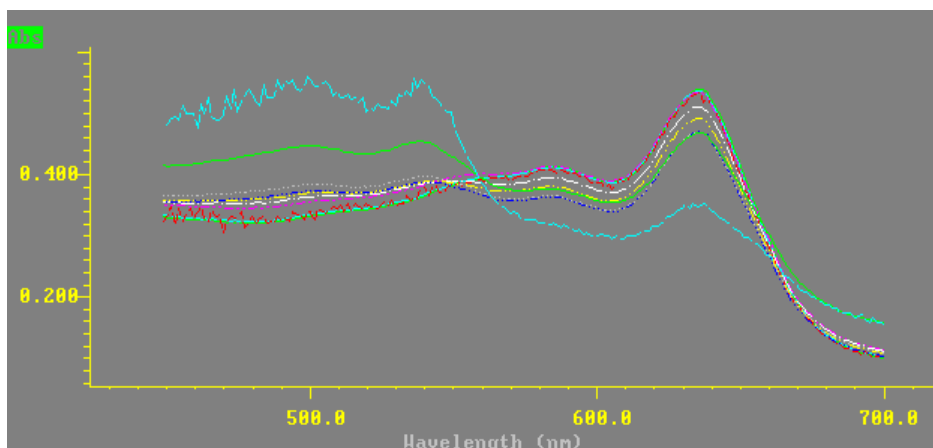


Figura 18 - Absorvância da suspensão de vesículas de 1 mM de PCDA + 1 mM de CO.ES antes (linha vermelha) e após (linha azul) adição de triclorometano submetida a 400 w de potência.

As suspensões de vesículas preparadas com a aplicação de diferentes potências foram armazenadas por um período de 30 dias à temperatura de refrigeração ( $\pm 7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e avaliadas quanto a alterações nos seus diâmetros (Tabela 12). Constatou-se um aumento do diâmetro das vesículas submetidas a todas as potências, com variações entre 398,99 nm (100 w, 1 dia) a 2209,95 nm (200 w, 30 dias). Novamente, a menor variação no tamanho da vesícula ocorreu para o tratamento com 200 w, só que ela já começou com um diâmetro muito grande. Então optamos pela a de 400 W, que teve o também uma pequena variação, sendo que ela foram de 350,08 nm, para 1 dia de armazenamento, para 465,02 nm com 15 dias e 525,88 nm para 30 dias. Essa baixa variação pode está relacionada com a estabilidade da vesícula durante o tempo de armazenamento.

Pires e colaboradores (2010a) e Potisatityuenyong e colaboradores (2008) afirmam que o controle do tamanho das vesículas é importante para assegurar a repetibilidade dos resultados, garantindo sua estabilidade por um determinado tempo. Neste caso o tempo estudado foi de 30 dias, armazenado a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e outro fator importante é o tamanho, quanto menor o tamanho menor é a RC, o que significa uma maior uma maior superfície de contato e um numero maior de moléculas disponível para interagir com TCM e mudar de cor.

Tabela 12 – Diâmetro (nm) das vesículas preparadas com 1 mM de PCDA/CO.ES e submetidas a diferentes potências no desruptor de células por 18 min.

| Amostra | 1 dia<br>(nm)   | 15 dias<br>(nm)  | 30 dias<br>(nm)  |
|---------|-----------------|------------------|------------------|
| 100 w   | 398,99 ± 12,32  | 574,93 ± 24,09   | 1056,85 ± 156,43 |
| 200 w   | 1708,45 ± 121,2 | 2036,49 ± 143,15 | 2209,95 ± 62,22  |
| 300 w   | 792,7 ± 34,08   | 1514,60 ± 235,78 | 2072,04 ± 337,11 |
| 400 w   | 350,08 ± 26,65  | 465,02 ± 57,01   | 525,88 ± 71,23   |
| 500 w   | 425,15 ± 43,22  | 530,98 ± 32,53   | 741,13 ± 21,50   |

Assim, fundamentado nos resultados anteriores, decidiu-se por usar as seguintes condições no preparo das vesículas a serem usadas para avaliarem a transição colorimétrica das vesículas em razão do pH, temperatura e concentração de TCM:

- a) Composição: 1 mM de PCDA + 1mM de CO.ES.
- b) Potência aplicada diretamente na vesícula: 400 w por 18 min.

#### **6.2.4. Avaliação da transição colorimétrica das vesículas em razão do pH, temperatura e concentração de TCM**

A análise de variância (Tabela 13) mostrou que a temperatura foi o fator, que apresentou diferença significativa ( $p < 0,1$ ) nos valores de RC para os diferentes tratamentos. No entanto, parece que a dificuldade em manter o pH dentro dos valores (5,00, 6,00 e 7,00) indicados pelo delineamento experimental pode ter afetado a análise dos dados. A perturbação de vesículas PDA por aumento da temperatura promove a dinâmica de todos os segmentos, incluindo a cauda alquila, cabeça polar e na cauda apolar. A transição de cores ocorre quando o movimento térmico de todos os segmentos supera as interações (inter e intra) em cadeia dentro do PDA das vesículas, resultando num rearranjo da estrutura (CHAROENTHAI et al., 2011).

As lipossomas multi-funcionais têm sido estudados porque demonstram alterações reversíveis na cor e na intensidade de fluorescência em resposta às mudanças no pH. O espectro de absorção do PCDA, com adição de NaOH, aumentou o pH na faixa de 4,00 a 8,80 provocando um aumento sistemático do pico em 540 nm, ou seja, ocorre a mudança de cor de azul para vermelho. Nesta

fase, a abstração de prótons pelos íons hidroxilas  $\text{OH}^-$  acrescentandos, provoca um aumento sistemático das cargas negativas, resultando em um rearranjo parcial da vesícula (CHAROENTHAI et al., 2011).

Tabela 13 – Resposta Colorimétrica (RC) das vesículas em razão do pH, temperatura e diluição após a adição de amostras de água, contendo diferentes concentrações de triclorometano.

| Tratamento | pH   | T(°C) | %   | 0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$<br>RC (%) | 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$<br>RC (%) | 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$<br>RC (%) | 10000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$<br>RC (%) |
|------------|------|-------|-----|---|---|--|---|
| 1          | 5,28 | 20    | 20  | 2,4   | 1,0   | 0,3  | 2,2   |
| 2          | 7,00 | 20    | 20  | 1,0   | 1,1   | 2,4  | 2,4   |
| 3          | 5,48 | 40    | 20  | 8,1   | 6,8   | 7,4  | 6,1   |
| 4          | 7,02 | 40    | 20  | 33,5  | 33,3  | 33,3   | 33,0  |
| 5          | 5,31 | 20    | 100 | 6,8   | 8,2   | 7,1  | 7,1   |
| 6          | 7,14 | 20    | 100 | 5,5   | 4,6   | 6,4  | 7,0   |
| 7          | 5,03 | 40    | 100 | 9,5   | 10,8  | 11,0   | 10,7  |
| 8          | 7,02 | 40    | 100 | 12,7  | 12,2  | 12,5   | 12,2  |
| 9          | 6,24 | 30    | 40  | 2,0   | 2,0   | 2,1  | 1,3   |
| 10         | 6,41 | 30    | 40  | 5,9   | 7,7   | 6,6  | 5,9   |
| 11         | 6,41 | 30    | 40  | 6,2   | 6,4   | 5,9  | 5,9   |
| 12         | 6,11 | 30    | 40  | 7,7   | 5,4   | 6,0  | 5,9   |

% - porcentagem de vesícula em água deionizada.

Dentre os tratamentos testados, os que obtiveram a RC das amostras com TCM maiores do que a amostra controle e que apresentou maior porcentagem de RC foi o tratamento 7 (Figura19) .

Quanto maior a resposta colorimétrica, mais perceptível ao olho humano é a mudança da cor azul para vermelha. Observa-se que ocorre no espectro gradualmente uma mudança da região azul para a região vermelha

com o aumento da temperatura, acompanhado da ligeira diminuição da absorvância. Isso sugere, que o aumento da temperatura nesta fase deve causar um rearranjo dos segmentos da vesícula.

Também foi avaliado o tamanho das vesículas (Tabela 14), e verificou-se que para o tratamento 7, houve uma diminuição no diâmetro com a adição de TCM. Uma possibilidade que poderia ter ocorrido uma interação da vesícula com o TCM adicionado, com isso diminuiu o diâmetro vesicular.

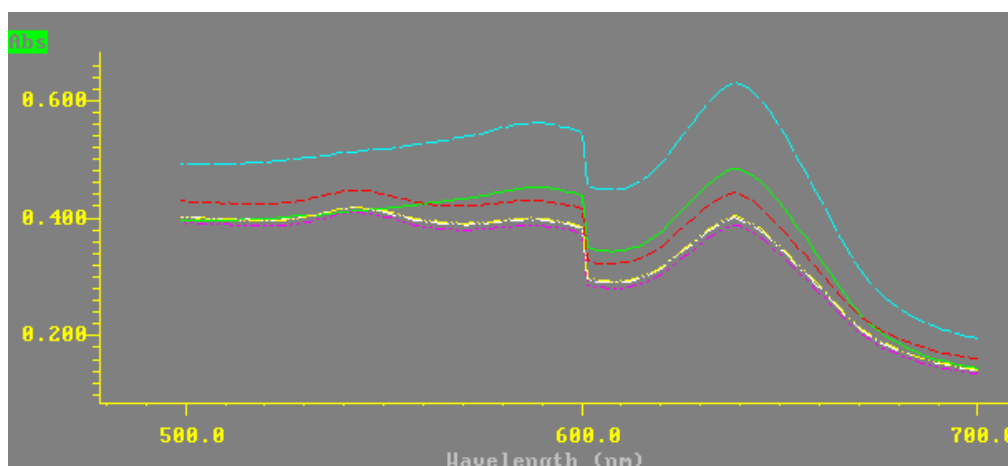


Figura 19 - Absorvância da suspensão da vesícula do tratamento 7. Tratamento 7 na temperatura ambiente pH 3,54; - Tratamento 7 na temperatura ambiente pH 5,03; - Tratamento 7 com adição de 0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de TCM; - Tratamento 7 com adição de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; - Tratamento 7 com adição de 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de TCM (branca); - Tratamento 7 com adição de 10000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de TCM (amarela).

Tabela 14 – Diâmetro (nm) das vesículas em razão do pH, temperatura e diluição após a adição de amostras de água, contendo diferentes concentrações de triclorometano.

| Tratamento | pH   | T(°C) | %   | 0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$<br>(nm) | 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$<br>(nm) | 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$<br>(nm) | 10000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$<br>(nm) |
|------------|------|-------|-----|---|---|--|---|
| 1          | 5,28 | 20    | 20  | 761,02                                    | 516,79                                      | 1582,72                                      | 653,61  |
| 2          | 7,00 | 20    | 20  | 716,46                                    | 719,73                                      | 718,02                                       | 580,94  |
| 3          | 5,48 | 40    | 20  | 570,95                                    | 497,56                                      | 602,96                                       | 546,70  |
| 4          | 7,02 | 40    | 20  | 399,05                                    | 414,25                                      | 417,78                                       | 435,47  |
| 5          | 5,31 | 20    | 100 | 1368,65                                   | 695,25                                      | 625,10                                       | 709,50  |
| 6          | 7,14 | 20    | 100 | 874,37                                    | 653,98                                      | 642,02                                       | 642,52  |
| 7          | 5,03 | 40    | 100 | 2435,20                                   | 1995,00                                     | 2350,38                                      | 2136,13                                       |
| 8          | 7,02 | 40    | 100 | 2435,20                                   | 1995,00                                     | 2350,38                                      | 2136,13                                       |
| 9          | 6,24 | 30    | 40  | 762,07                                    | 896,19                                      | 992,04                                       | 1934,14                                       |

|    |      |    |    |        |        |        |        |
|----|------|----|----|--------|--------|--------|--------|
| 10 | 6,41 | 30 | 40 | 722,21 | 756,98 | 786,23 | 801,34 |
| 11 | 6,41 | 30 | 40 | 737,21 | 771,46 | 751,46 | 748,67 |
| 12 | 6,11 | 30 | 40 | 843,87 | 856,22 | 844,80 | 798,33 |

% - porcentagem de vesícula em água deionizada.

Foram avaliadas então novas condições de temperatura (35, 37, 40), constituindo-se nos tratamentos 13, 14, 15, sendo o pH mantido em 5,00 e a concentração de vesículas na suspensão de 100%, para avaliação da RC (Tabela 16).

Observando os valores da RC, nota-se que o tratamento 13 (Figura 20), foi o que obteve a maior diferença entre os valores da RC do controle e a  $100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de 5,6 %. Isso mostra que a vesícula nas condições de pH 5,25, na temperatura de 35 °C é capaz de mudar de cor na presença de  $100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de TCM em  $500\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de suspensão de vesícula. Isso é importante, pois  $100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TCM é a quantidade máxima de TTHM permitida pela Portaria nº 518/MS e baixo do indicado pela OMS que é de  $200\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de TCM em água para consumo humano.

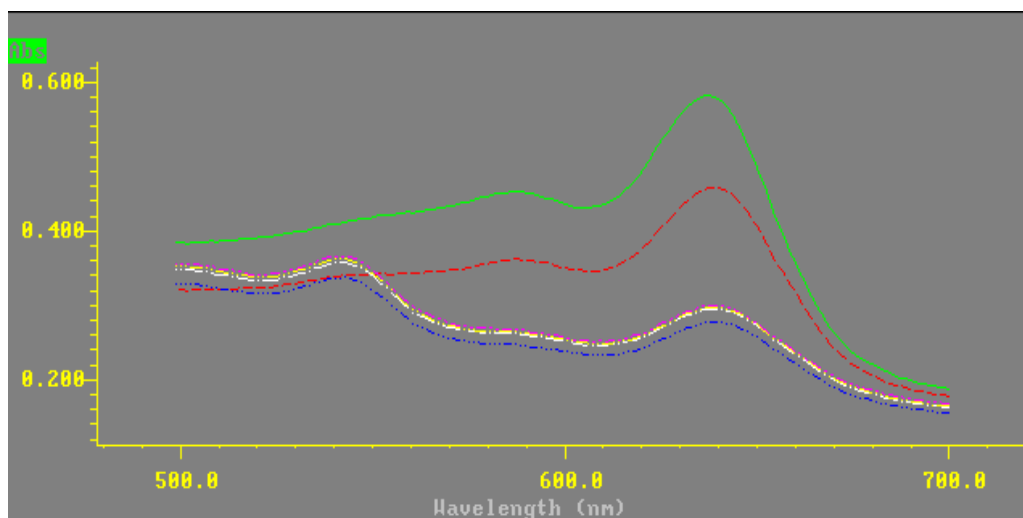


Figura 20: Absorbância da suspensão de vesículas do tratamento 13. - Tratamento 13 na temperatura ambiente pH 3,63; - Tratamento 13 na temperatura ambiente pH 5,25; - Tratamento 13 com adição de  $0\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de TCM; - Tratamento 13 com adição de  $100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (branca); - Tratamento 13 com adição de  $1000\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de TCM (amarela); - Tratamento 13 com adição de  $10000\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de TCM.

Houve um aumento do diâmetro das vesículas que passou de 645,32 nm para 798,35 nm, sendo um resultado conflitante com o obtido anteriormente para

o tratamento 7. No entanto, deve-se observar que mesmo com o aumento tamanho, as vesículas do tratamento 13 (687,98 nm) foram muito menores do que do tratamento 7 (1995,00 nm). Há um consenso de que vesículas menores são mais eficientes na transição colorimétrica, respondendo mais rápido a estímulos externos.

Tabela 15 – Resposta Colorimétrica (RC) das vesículas em razão do pH 5, temperatura variando de 35 °C, 37 °C e 40 °C após a adição de amostras de água, contendo diferentes concentrações de triclorometano.

| Tratamento | pH       | T (°C) | (%) | 0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (%) | 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (%) | 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (%) | 10000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (%) | Diferença da RC (%) entre 0 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
|------------|----------|--------|-----|---------------------------------------|---|--|---|---|
| 13         | 5,2<br>5 | 35     | 100 | 4,3                                   | 9,9                                     | 8,7                                      | 9,7                                       | 5,6   |
| 14         | 5,4<br>8 | 37     | 100 | 9,4                                   | 10,3                                    | 6,7                                      | 6,7                                       | 0,9   |
| 15         | 5,2<br>4 | 40     | 100 | 15,2                                  | 17,3                                    | 16,7                                     | 17,2                                      | 2,1   |

% - porcentagem de vesícula em água deionizada.

Tabela 16 – Diâmetro (nm) das vesículas em razão do pH 5, temperatura variando de 35, 37 e 40°C após a adição de amostras de água, contendo diferentes concentrações de triclorometano.

| Tratamento | pH   | T (°C) | %   | 0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (nm) | 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (nm) | 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (nm) | 10000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (nm) |
|------------|------|--------|-----|--|--|---|--|
| 13         | 5,25 | 35     | 20  | 645,32                                 | 687,98                                   | 749,96                                    | 798,35                                     |
| 14         | 5,48 | 37     | 20  | 1783,95                                | 993,47                                   | 923,56                                    | 908,36                                     |
| 15         | 5,24 | 40     | 100 | 789,36                                 | 743,34                                   | 743,85                                    | 733,96                                     |

## 7. Conclusões

De 28 amostras de água das ETAs, de redes de distribuição e ainda de poços artesianos, apenas duas repetições, pouco mais de 2 % não se enquadraram dentro da legislação brasileira, a Portaria 518 de 2004 do Ministério da Saúde. Verificou-se ainda uma tendência de aumento na concentração de TCM nos pontos de coleta na rede de distribuição, embora em valores abaixo do VMP ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Esse resultado se deve provavelmente ao bom controle nos sistemas de tratamento e distribuição de águas avaliadas, o que pôde ser constatado pelos bons resultados das análises físico-química, microbiológica das amostras analisadas, em particular da turbidez, cor e cloro residual livre.

Ocorreu transição colorimétrica em vesículas de PCDA contendo CO.ES estimulada pelo TCM, que obteve uma maior alteração da mudança de cor do azul para o vermelho. O diâmetro das vesículas aumentou na presença de fosfolípidios, entretanto, o colesterol e esfingomiéline foram os fosfolípidios que menos aumentaram o diâmetro da suspensão.

A Resposta Colorimétrica melhorou ao se modificar o processo de produção da suspensão de vesículas, quando se utilizou o ultrassom de ponta em substituição ao banho ultrassônico.

Os melhores resultados na indicação da presença de triclorometano foram obtidos quando se usou a vesícula composta de 1 mM de PCDA + 1mM de CO.ES, preparadas com uma potência de 400 w por 18 min, em pH 5,0 e temperatura de 35 °C. No entanto, mais estudos devem ser realizados afim de aumentar a especificidade e a sensibilidade da suspensão de vesículas.

## 9. Referências bibliográficas

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Água – Determinação de THM em água tratada para abastecimento por extração líquido-líquido: NBR 13407**. Brasil, 1995. 8p.

AHN D.J., LEE, S. KIM, J.M. Rational Design of Conjugated Polymer Supramolecules with Tunable Colorimetric Responses. *Advanced Functional Materials*, v. 19, p.1483, 2009.

ALLONIER A.; KHALANSKI M.; BERMOND A.; CAMEL V. Determination of trihalomethanes in chlorinated sea water samples using a purge-and-trap system coupled to gas chromatography. *Talanta*, v. 51, p. 468-473, 2000.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos**: Qualidade e tratamento da água no controle de adesão microbiana na industria de alimentos. São Paulo: Varela, 2008. 289 p.

ANDREOLA, R.et al. Formação de trialometanos em uma estação de tratamento de água. *Acta Scientiarum*, v. 27, p.133-141, 2005.

BATTERMAN S.; ZHANG L.; WANG S.; FRANZBLAU A. Partition coefficients for the trihalomethanes among blood, urine, water, milk and air. *The Science of the Total Environment*, v. 284, p.237-347, 2002.

BIOTRACE. BIOTRACE Xcel. [S. I.]. Manual técnico, 140p. 2000.

BIZIUK M.; NAMIESNIK J.; CZERWINSKI J.; GORLO D.; MAKUCH B.; JANICKI W.; POLKOWSKA Z.; WOLSKA L. Occurrence and determination of organic pollutants in tap and surface waters of the Gdansk district. **Journal of Chromatography A**, v.733, p.171-183, 1996.

BLOEMEN, H.J.; BURN J. **Chemistry and analysis of volatile organic compounds in the environment**. London: Chapman & Hall; 1993.

BRAGA, F. M. G.; ARAUJO, J. C.; Ronaldo F. N.; PÁDUA, V. L. Manoel do Vale Sales. Diagnóstico da ocorrência de Trihalometanos (THMs) na rede de abastecimento de água de Fortaleza - CE, Brasil. **Anais do XXIX Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitária y Ambiental AIDIS 2004**. San Juan, Puerto Rico., San Juan, Porto Rico, v. I, p. 1, 2004.

BRASIL - MS. **Controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**. Portaria n. 1469, de 29 de dezembro de 2004.

CAMPILLO, N. et al. Purge-and-trap capillary gas chromatography with atomic emission detection for volatile halogenated organic compounds determination in water and beverages. **Journal of Chromatography A**, v.1035, p. 1-7, 2004.

CAPRITA, R. et al. The ATP assay, a method for measuring biological activity in industrial water. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 51, p. 1031-1036, 2009.

DELAHAYE, E. et al. An ATP-based method for monitoring the microbiological drinking water quality in a distribution network. **Water Res** v.37, p. 3689–3696, 2004.

CARLOS, E. A. et al. Determinação Simultânea de trihalometanos e agrotóxicos em água por cromatografia Gasosa. **Química Nova**, v. 34, p. 272-278, 2011.

CARPICK, R.W.; SASAKI D.Y.; MARCUS M.S.; ERIKSSON M.A.; BURNS, A.R.; **Journal of Physics: Condensed Matter**, v.16, p.679-697, 2004.

CHAROENTHAI, N.; PATTANATORNCHAI, T.; WACHARASINDHU, S.; SUKWATTANASINITT, M.; TRAIIPHOL, R. Roles of head group architecture and side chain length on colorimetric response of polydiacetylene vesicles to temperature, ethanol and pH. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 360, p. 565 – 573, 2011.

CHENG, Q.; STEVENS, R.C; Charge-induced chromatic transition of amino acid-derivatized polydiacetylene liposomes. **Langmuir**, v. 14, p. 1 974-1976, 1998.

CHO D.; KONG S.; OH S. Analysis of trihalomethanes in drinking water using headspace-SPME technique with gas chromatography. **Water Research**, v. 37, p. 402 – 407, 2003.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 357/2005.

COSTA, P.D. et al. ATP - Bioluminescence as a technique to evaluate the microbiological quality of water in food industry. **Brazilian Archives of Biology and Technology** , v. 47, p. 399- 405, 2004.

COSTA, P.D. et al. ATP-bioluminescence assay as an alternative for hygiene-monitoring procedures of stainless steel milk contact surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology** , v. 37, p. 345-349, 2006.

DEI, S.; MATSUMOTO, A.; MATSUMOTO, A. Synthesis, Structure, Chromatic Properties, and Induced Circular Dichromism of Polydiacetylenes with an Extended Conjugated System in the Side Chain. **Macromolecules** , v.41,p. 2467, 2008.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20 ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 1998. 1224p.

FANTUZZI G.; RIGHI E.; PREDIERI G.; CEPPELLI G.; GOBBA F.; AGGAZZOTTI G. Occupational exposure to trihalomethanes in indoor swimming pools. **The Science of Total Environment**, v.264, p.257- 258, 2001.

FEITOSA, E.; ALVES, F.R.; CASTANHEIRA, E.M.S.; Oliveira, M.E.D.C.R.; **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v.287, p. 591-596, 2009.

GONZALEZ L.; LORENZO M.; VALDES L. The trace analysis of volatile chlorination by-products of aquatic humic substances: THM in treated water. **The Science of the Total Environment**, v. 257, p.81- 82, 1989.

GOU, M.L.; GUO, G.; ZHANG, J.; MEN, K.; SONG, J.; LUO, F.; ZHAO, X.; QIAN, Z.Y.; WEI, Y.Q. Time-temperature chromatic sensor based on polydiacetylene (PDA) vesicle and amphiphilic copolymer. **Sensors and Actuators B**, v.150, p. 406-411, 2010.

GOUVEIA, M. L.; GRANCHO M. A. Abordagem metodológica para a monitorização dos THM em águas de consumo e dos seus efeitos na saúde. **Simpósio Internacional sobre Soluções Integradas para Problemas de Poluição de Água**. Lisboa. Portugal. p. 45-56, 1989.

GREENBERG, A. E.; CLESCERI, L. S.; EATON, A. D. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA)**. 18 ed. 1992.

HOEBEN, F.J.M.; JONKHEIJM, P.; MEIJER, E.W.; SCHENNING, A.P.H.J. About supramolecular assemblies of pi-conjugated system. *Chemical Reviews*, v. 105, p. 1491, 2005.

HUANG, S. J. et al. A remote-query sensor for predictive indication of milk spoilage. **BIOSENSORS & BIOELECTRONICS** , v. 23, p.1745-1748, 2008.

JENNER H. A.; TAYLOR C. J. L.; VAN DONK M.; KHALANSKI M. Chlorination by-products in chlorinated cooling water of some European coastal power stations. **Marine Environmental Research**, v. 43 4, p. 280-281, 291, 1997.

KIM, K.W.; CHOI, H.; LEE, G.S.; AHN, D.J.; OH, M,K.; **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.66, p. 213-217, 2008.

KOSTOPOULOU ,M. N.; GOLFINOPOULOS,S. K.; NIKOLAOU A. D; XILOURGIDIS, N. K.; LEKKAS, T. D. Volatile organic compounds in the surface waters of Northern Greece. **Chemosphere**, v. 40, p. 527-532, 2000.

KREGIEL, D and RYGATA, A. Ocorrência de bactérias heterotróficas do Gênero *Aeromonas* em Sistema de Distribuição de Água: Um Estudo de Caso. **Ochrona Srodowiska** , v.32, p.47-50, 2010.

LEE, S. C. et al. A microfluidic ATP-bioluminescence sensor for the detection of airborne microbes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v, 132, p. 443-448, 2008.

LEE, S. C.; GUO, H.; LAM, S.M.J.; LAU, S. L. A. Multipathway risk assessment on disinfection by-products of drinking water in Hong Kong. **Environmental Research**, v. 94, p. 47, 48, 55, 2004.

LELES, T. C. **Otimização e validação da técnica microextração em fase sólida para determinação de Trihalometanos em Água**. 2005. 75p. Tese (Mestrado em Agroquímica) – Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa.

MACÊDO, J.A.B. **Determinação de THM em águas de abastecimento público e de indústria de alimentos**. 1997. 90f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa.

MARMO, C. R. **Formação e remoção de trihalometanos em águas de abastecimento tratadas, na pré-oxidação, com cloro livre**. 2005. 75p. Tese (Mestrado em Engenharia Civil) - Departamento de Engenharia Civil, UNICAMP.

Organização Mundial da Saúde (OMS) - WORLD HEALTH ORGANIZATION - "Guidelines for Drinking-water Quality". Geneva(Suíça), W.H.O. Publications, 1993.

OKADA, S.; PENG, S.; SPEVAK, W.; CHARYCH, D. Color and chromism of polydiacetylene vesicles. **Acc Chemistry Research**, v. 31, p. 229-239, 1998.

PIRES, A.C.S.; SOARES, N.F.F.; SILVA, L.H.M.; ANDRADE, N.J.; SILVEIRA, M.F.A.S.; CARVALHO, A.F. Polydiacetylene as a Biosensor: Fundamentals and Applications in the Food Industry. **Food Bioprocess Technol**, V. 3, P. 172–181, 2010a.

PIRES, A.C.S.; SOARES, N.F.F.; SILVA, L.H.M.; SILVA, TEIXEIRA, A.V.N.C.; ANDRADE, N.J. Thermodynamic Study of Colorimetric Transitions in Polydiacetylene Vesicles Induced by the Solvent Effect. **Journal of Physical Chemistry B**. v. 114, p. 13365–13371, 2010b.

POTISATITYUENYONG, A.; ROJANATHANES, R.; TUMCHARERN, G.; SUKWATTANASINITT, M. Electronic absorption spectroscopy probed side-chain movement in chromic transitions po polydiacetylene vesicles. **Langmuir**, v. 24, p. 4461-4463, 2008.

REICHERT, A.; NAGY, J.O.; SPEVAK, W.; CHARYCH, D. Polydiacetylene liposomes functionalized with sialic acid bind and colorimetrically detect Influenza virus. **Journal of American Chemistry Society**, v. 117, p. 829-830, 1995.

RIEDEL G. **Controle sanitário dos alimentos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1992.

ROZNER, S.; KOUSHEVA, S.; COHEN, Z.; DOWHAN, W.; EICHLER, J.; JELINEK, R. Detection and analysis of membrane interactions by a biomimetic colorimetric lipid/polydiacetylene assay. **Analytical Biochemistry**, v. 319, p. 96-104, 2003.

SANTOS, C. L. THM Resumo Atual. **Engenharia Sanitária**, v.26, p. 190-194, 1987.

SCINDIA, Y.; SILBERT, L.; VOLINSKY, R.; KOLUSHEVA, S.; JELINEK, R.; **Langmuir**, v.23, p. 4682-4685 2007.

SHIBATA, M.; KANEKO, F. ; AKETAGAWA, M.; KOBAYASHI, S. Reversible colour phase transitions and annealing properties of Langmuir–Blodgett polydiacetylene films, **Thin Solid Films**, v.179, p. 433, 1989.

SHUSTERMAN, O.; BERMAN, A.; GOLAN, Y.; HOROVITZ, B.; ZEIRIS, L.; J. Two-photon polymerization of polydiacetylene . **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, p. 1273-1276, 2009.

SOUZA, A. C. Trihalometanos em águas de consumo Humano. 2009. 16p. Monografia, Universidade Cruzeiro do Sul.

SU, Y.L.; J. Biosensor signal amplification of vesicles functionalized with glycolipid for colorimetric detection of *Escherichia coli* vesiclesn **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 284, p. 114-119, 2005.

SU, Y.L; LI, J.R.; JIANG, L. Chromatic immunoassay base dopolydiacetylene **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 38, p. 29-33, 2004.

TOMINAGA, M. Y.; MIDIO, A. F.; Exposição humana a THM presentes em água tratada. **Revista de Saúde Pública**, v.33 4, p. 418 -419, 1999.

TROLI, A. C. et al. Trihalometanos em água tratada, após colração com hipoclorito de sódio, hipoclorito de cálcio, cloro gasoso e dicloroisocianurato de sódio, utilizando cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometro de massa, sistema purge and trap. **2 Simpósio de Recursos Hídricos do Centro Oeste**, Campo Grande/MS.2002.

UKUKU, D. O. et al. ATP Bioluminescence Assay for Estimation of Microbial Populations of Fresh-Cut Melon. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 2427, 2432, 2005.

VALENTE A. L. P.; AUGUSTO F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23 4, p. 523-524, 2000.

VAN BREMEM, J. WATER QUALITY. International Course in Sanitary Engineering. Delft: IHE/International Institute for Infrastructural. **Hydraulic and Environmental Engineering**, Mimeo, 1984.

VIANA, R. B. et al. Avaliação do risco de trihalometanos em água de torneira em Fortaleza, Brasil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.151, p.317-325, 2009.

WACKLIN, H.P.; THOMAS, R.K.; Spontaneous formation of asymmetric lipid bilayers by adsorption of vesicles. **Langmuir**, v.23, p. 7644-7647, 2007.

WEI, C.; COOK, D.L.; KIRK, J.R. Use of chlorine compounds in the food industry. **Food Technol**, v.39, p.107-115, 1985.

World Health Organization. **Chloroform**. Geneva; 1994. (Environmental Health Criteria, 163).

WU, S.; NIU, L.; SHEN, J.; ZHANG, Q.; BUBECK, C. Aggregation-induced reversible thermochromism of novel azo chromophores-functionalized polydiacetylene cylindrical micelles. **Macromolecules**, v. 42, p.362-367, 2009.

ZHANG, L.G.; FAN, Y.; MA, B.L.; XU, X.Y.; KONG, X.G.; SHEN, D.Z.; LI, Y.J. Colorimetric transition process of polydiacetylene/mannoside derivative Langmuir-Schaefer film by binding Escherichia jm 109. **Thin Solid Films**, v. 419, p. 194-198, 2002.

