

UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

INSTITUTO DE QUÍMICA - IQ



**EFLUENTE DE INDÚSTRIA PAPELEIRA: PROCESSOS
ALTERNATIVOS DE REMEDIAÇÃO E EMPREGO DE NOVAS
METODOLOGIAS ELETROANALÍTICAS PARA
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS**

TESE DE DOUTORADO

Renato Sanches Freire

Orientador: Prof. Dr. Nelson Durán

Co-Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

CAMPINAS

março/2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

*À minha amada Juliana,
companheira carinhosa e paciente,
que sempre apoiou meus sonhos e projetos...*

*Aos meus pais José e Conceição,
que sempre acreditaram que a educação era primordial, e
que nunca mediram esforços e amor
para ajudar-me a conquistar meus objetivos...*

*Aos irmãos Bill e Simone,
que sempre estiveram em meu coração...*

...dedico esta Tese.

Obrigado pelo amor de vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Nelson Durán, pela confiança, profissionalismo, estímulo e orientação competente, que com seu estilo moderno ensinou-me a focalizar e a diversificar na busca do entendimento e desenvolvimento deste trabalho;

Ao professor Dr. Lauro Kubota, pela co-orientação desta tese, amizade e exemplo de dedicação e motivação para desenvolver a ciência;

Aos colegas (presentes e passados) do Laboratório de Química Biológica pela agradável convivência e amizade durante todos estes anos;

Aos colegas do Laboratório de Eletroquímica e Eletroanalítica pelo apoio, solidariedade e paciência;

A todo o pessoal do Electrochemical Sensor Laboratory Researcher (New Mexico/USA) pela acolhida e pelas "lições especiais";

À Sandra, Rosana, Ronaldo, Patrício, Rosângela, Simone e Pilar pela amizade e grande colaboração nas discussões deste trabalho;

À Natália, Livia, Chico, Edgar, Silvana, Buba, Juan, Daniel, Antenor, Rosseto e a todos com quem convivi nestes últimos dez anos e não cito seus nomes, mas estão presentes neste momento;

Ao Seu César, Dona Cristina, Marcelo, Mariana e Eduardo que me acolheram em sua família, com muito apoio e carinho;

A todos os funcionários do Instituto de Química que fazem um excelente trabalho e colaboraram em muito para a realização deste trabalho;

Ao CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro,

Muito obrigado.

RESUMO

“EFLUENTE DE INDÚSTRIA PAPELEIRA: PROCESSOS ALTERNATIVOS DE REMEDIAÇÃO E EMPREGO DE NOVAS METODOLOGIAS ELETROANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS”

Autor: Renato Sanches Freire

Orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

Co-orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Palavras chave: efluente industrial, remediação ambiental, biossensores, determinação de compostos fenólicos.

O presente trabalho de doutorado descreve o estudo comparativo entre diferentes processos físico-químicos de remediação do efluente papelero Kraft E1 e o desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para a determinação de fenóis totais e/ou diferentes classes de compostos fenólicos, visando o monitoramento deste tipo de efluente.

A remediação do efluente papelero foi realizada empregando-se os processos oxidativos: $O_3/pH11$; $O_3/pH3$; $O_3/H_2O_2/pH11$; $O_3/UV/pH11$; $O_2/UV/TiO_2$; $O_2/UV/ZnO$; UV/H_2O_2 ; $ZnO/UV/H_2O_2$; $O_3/UV/ZnO$; eletroquímico e fotoeletroquímico. A eficiência destes processos foi avaliada em função da capacidade de redução de: coloração, fenóis totais, carbono orgânico total e toxicidade do efluente. Os processos fotoquímicos, eletroquímicos e de ozonização empregados no tratamento do efluente papelero Kraft E1 apresentaram uma cinética de pseudo-primeira ordem para a degradação de fenóis, grupos cromóforos e mineralização da matéria orgânica. Os processos fotocatalíticos foram os mais eficientes na descoloração do efluente papelero Kraft E1, enquanto que os processos eletroquímicos e fotoquímicos com presença de peróxido de hidrogênio foram os que apresentaram uma melhor cinética de degradação de fenóis totais. Os tratamentos fotoquímicos com presença de peróxido de hidrogênio também se destacaram na redução da concentração de carbono orgânico total presente no efluente papelero.

Em relação à determinação de compostos fenólicos por técnicas eletroanalíticas, foram desenvolvidos biossensores amperométricos a base de tirosinase e lacase. Estes biossensores apresentaram uma excelente sensibilidade para diferentes classes de compostos fenólicos. A grande versatilidade apresentada por estes biossensores permitiu o desenvolvimento de diferentes dispositivos, tais como, eletrodos bi-enzimáticos, eletrodos impressos, sensores remotos e sistema de análise em fluxo com célula de diálise. Estes sistemas foram empregados no monitoramento de espécies fenólicas no efluente papelero, assim como em outras amostras de interesse ambiental, permitindo a detecção e quantificação de diferentes compostos fenólicos e clorofenólicos em níveis de concentração inferiores a 10^{-6} mol L⁻¹. Os sistemas desenvolvidos podem ser empregados para fornecer, continuamente, informações analíticas rápidas e confiáveis, contribuindo para aumentar a qualidade dos processos de monitoramento e remediação ambiental.

ABSTRACT

“PAPER MILL EFFLUENT: ALTERNATIVE REMEDIATION PROCESSES AND DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS BY NEW ELECTROANALYTICAL METHODS”

Author: Renato Sanches Freire

Supervisor: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

Co-supervisor: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Keywords: industrial effluent, environmental remediation, biosensors, phenolic compounds determination.

This work describes a comparative study between different physical-chemical processes for the remediation of Kraft E1 paper mill effluent; and the development of electroanalytical methodologies for the determination of total phenols and/or of different phenolic compounds in this kind of effluent.

The paper mill effluent remediation was accomplished by different oxidative processes: $O_3/pH11$; $O_3/pH3$; $O_3/H_2O_2/pH11$; $O_3/UV/pH11$; $O_2/UV/TiO_2$; $O_2/UV/ZnO$; UV/H_2O_2 ; $ZnO/UV/H_2O_2$; $O_3/UV/ZnO$; electrochemical and photoelectrochemical. The efficiency of these processes was evaluated in function of the capacity of reduction of color, total phenols, total organic carbon and toxicity. The remediation of paper effluent by photochemical, electrochemical and ozonization processes showed kinetics of pseudo-first order for the degradation of phenols, chromophore groups and mineralization of organic matter. The photocatalytic processes were the most efficient in the decoloration of Kraft E1 paper mill effluent, while the electrochemical process and photochemical/ H_2O_2 process presented the best phenol degradation. The photochemical processes coupled with hydrogen peroxide also showed the best reduction of total organic carbon concentration presented in the effluent.

Tyrosinase- and laccase-based amperometric biosensors for the determination of phenolic compounds by electroanalytical techniques were developed. These biosensors presented excellent sensitivity for different phenolic species. The great versatility, presented by these biosensors, allowed the development of different devices, such as: bi-enzymatic electrodes, screen-printed electrodes, remote sensors and a flow-system with microdialysis cell. These systems were used for determination of phenolic compounds related to paper mill effluents and other environmental matrices. These biosensors allowed a convenient detection and quantification of phenolic and chlorophenolic compounds down to 10^{-6} mol L⁻¹ levels. The systems developed may give, continuously, fast and reliable chemical information and, thus, increase the quality of monitoring activities and remediation processes.

CURRICULUM VITAE

RENATO SANCHES FREIRE

Data de Nascimento: 12/01/1974

Naturalidade: Osasco/SP

I - FORMAÇÃO

Bacharelado em Química (1992-1995)

Instituto de Química – IQ; Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Mestrado em Química (1996-1998) – INSTITUTO DE QUÍMICA / UNICAMP

Título da Dissertação : “Desenvolvimento de um Sistema Voltamétrico Multicanal para Estudo de Voltametria Multiplexada”.

Área: Química Analítica - Orientador: Prof. Dr. Jarbas J. R. Rohwedder

Estágio no Centro de Pesquisa “*Electrochemical Sensor Laboratory Researcher, New Mexico State University, New Mexico/USA*”, sob responsabilidade do Prof. Dr. Joseph Wang. Início: 15/03/2001 - Conclusão: 15/09/2001 (Auxílio FAPESP).

II - ATIVIDADES ACADÊMICAS

II.1 – ARTIGOS CIENTÍFICOS

II.1.1 – Nacionais

- 1) Kunz, A.; Freire, R.S.; Rohwedder, J.J.R.; Durán, N.; Mansilla, H.; Rodriguez, J.; “Construção e otimização de um sistema para produção e aplicação de ozônio em escala de laboratório”, *Quim. Nova*, **22**(3), 425-428 (1999).
- 2) Freire, R.S.; Rohwedder, J.J.R.; “Características e aplicações de ultramicroeletrodos em medidas voltamétricas”, *Tecnia*, **1**(1) 77-83 (2000).
- 3) Freire, R.S.; Pelegrini, R.; Kubota, L.T.; Durán, N.; Peralta-Zamora, P.; “Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas”, *Quim. Nova*, **23**(4) 504-511 (2000).
- 4) Rossato, S.S.; Freire, R.S.; Durán, N.; Kubota, L.T.; “Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental”, *Quim. Nova*, **24**(1) 77-86 (2001).
- 5) Freire, R.S.; Durán, N.; Kubota, L.T.; “Electrochemical biosensor-based devices for continuous phenols monitoring in environmental matrices”, *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo (2002).

II.1.1 – Internacionais

- 1) Freire, R.S.; Rohwedder, J.J.R.; Pasquini, C.; “Multi-electrode detection in voltammetry Part 3 - Effects of array-configuration on the Hadamard multiplexed voltammetric technique”, *Analyst*, **124**(11), 1657-1660 (1999).
- 2) Freire, R.S.; Kunz, A.; Durán, N.; “Some chemical and toxicological aspects about paper mill effluent treatment with ozone”, *Environ. Technol.*, **21**(6), 717-721 (2000).
- 3) Moraes, S.G.; Freire, R.S.; Durán, N.; “Degradation and toxicity reduction of textile effluent by combined photocatalytic and ozonation processes”, *Chemosphere*, **40**(4), 369-373 (2000).
- 4) Freire, R.S.; Durán, N.; Kubota, L.T.; “Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol”, *Talanta*, **54**(4), 681-686 (2001).
- 5) Pelegrini, R.T.; Freire, R.S.; Durán, N.; Bertazzoli, R.; “Photoassisted electrochemical degradation of organic pollutants on a DAS type oxide electrode process test for a phenol synthetic solution and its application for the e1 bleach Kraft mill effluent”, *Environ. Sci. Technol.*, **35**(13), 2849-2853 (2001).
- 6) Freire, R.S.; Kubota, L.T.; Durán, N.; “Evaluation of some ozonation processes on the remediation and toxicity of Kraft E1 paper mill effluent”, *Environ. Technol.*, **22**(8), 897-904 (2001).
- 7) Freire, R.S.; Thongngamdee S.; Durán, N.; Wang, J.; Kubota, L.T.; “Mixed enzyme (laccase/tyrosinase)-based remote electrochemical biosensor for monitoring phenolic compounds”, *Analyst*, **127**(2), 258-261 (2002).
- 8) Freire, R.S.; Durán, N.; Wang, J.; Kubota, L.T.; “Laccase-based screen printed electrode for amperometric detection of phenolic compounds”, *Anal. Lett.*, **35**(1), 28-38 (2002).

- 9) **Freire, R.S.**; Durán, N.; Kubota, L.T.; "Development of a laccase-based flow injection electrochemical biosensor for phenolic compounds determination and its application for monitoring remediation of Kraft E1 paper mill effluent", *Anal. Chim. Acta*, submetido (2002).

II.1.3 - Trabalhos Completos Publicados em Anais/Proceedings de Congressos Nacionais/Internacionais

- 1) **Moraes, S.G.**; **Freire, R.S.**; Durán, N.; "Combined process photocatalysis-ozone: degradation and toxicity reduction of textile effluent"; International Conference on Diffuse Pollution, Perth-Australia, Vol. 1, 541-545 (1999).
- 2) **Pelegri, R.**; **Freire, R.S.**; Durán, N.; Bertazzoli, R.; "Eletroxidação de fenol empregando-se processos fotoeletroquímicos" XIV Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica (SIBAE), Oaxaca-México, ING-028-34 (2000).
- 3) **Freire, R.S.**; **Moraes, S.G.**; Kubota, L.T.; Durán, N.; "Treatment of Kraft E1 and black liquor paper effluents by biological and chemical processes"; Sixth Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and other Wood Components, Guaratingueta-Brazil, Vol. VII, 427-431 (2001).
- 4) **Freire, R.S.**; Durán, N.; Kubota, L.T.; "Biossensor amperométrico para determinação de compostos fenólicos - Eletrodos de fibra de carbono com lacase imobilizada"; XII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Porto Alegre-Brasil, Vol. 1, 773-775 (2001).

II.2 - PATENTES REQUERIDAS

- 1) **Freire, R.S.**; Rohwedder, J.J.R.; Pasquini, C.; "Sistema voltamétrico multicanal: leitura multiplexada de arranjos de ultramicroeletrodos empregando-se transformada de Hadamard", Patente Brasileira, PI 9804317 (1998).
- 2) **Kunz, A.**; **Freire, R.S.**; Rohwedder, J.J.R.; Durán, N.; Rodriguez, J.; "Desenho e montagem de um sistema para produção e utilização de ozônio em escala laboratorial", Patente Brasileira, PI 9802076 (1998).
- 3) **Freire, R.S.**; Durán, N.; Kubota L.T.; "Biossensor amperométrico para determinação de compostos fenólicos - eletrodos de materiais carbonáceos com lacase imobilizada", Patente Brasileira, PI 0004323 (2000).
- 4) **Freire, R.S.**; Ferreira, M.M.C.; Durán, N.; Kubota L.T.; "Biossensores amperométricos multicomponentes para determinação simultânea de compostos fenólicos", Patente Brasileira, PI 0100576-6 (2001).
- 5) **Freire, R.S.**; Durán, N.; Kubota L.T.; "Novo dispositivo para monitoramento contínuo de compostos fenólicos em efluentes industriais", Patente Brasileira, PI 106474-6 (2001).

II.3 - RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS NACIONAIS: 19

II.4 - RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS INTERNACIONAIS: 3

III - ATIVIDADES DIDÁTICAS

- 1) Monitor no programa: "Seu Colégio na UNICAMP" (1997) (Mestrado).
- 2) Auxiliar Didático da Graduação na Disciplina: QA-313 Química Analítica I, Instituto de Química/UNICAMP (1997) (Mestrado).
- 3) Ministrante do Mini-Curso "Segurança, Manipulação, Armazenamento de Produtos Químicos e Tratamento de Resíduos", 8 horas, Centro Federal de Educação Tecnológica de Goiás – CEFET/GO, Goiânia/GO, 03 e 04/11/1999.

IV - ATIVIDADES ADMINISTRATIVAS

Representante Discente da Pós-Graduação:

- 1) Conselho do Departamento de Química Analítica - IQ/UNICAMP (mandatos de 1996 e 1997) (Mestrado).
- 2) Congregação do Instituto de Química - UNICAMP (mandatos de 1998 e 1999).
- 3) Conselho da Comissão Central de Pós-Graduação da UNICAMP (mandato de 1999).
- 4) Coordenadoria Pós-Graduação do Instituto de Química da UNICAMP (mandato de 2001).

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	xix
ÍNDICE DE TABELAS	xxv
ABREVIATURAS	xxvii
GLOSSÁRIO	xxix
<u>CAPÍTULO I</u> – INTRODUÇÃO GERAL	1
I.1 – APRESENTAÇÃO	3
I.2 – OBJETIVOS	7
<u>CAPÍTULO II</u> – PROCESSOS ALTERNATIVOS PARA A REMEDIAÇÃO DO EFLUENTE PAPELEIRO	9
II.1 – INTRODUÇÃO	11
II.1.1 – INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE	11
II.1.2 – PROCESSOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES	13
II.1.2.1 - Processos físicos	14
II.1.2.2 - Processos biológicos	15
II.1.2.2.1 - Processos aeróbios	16
II.1.2.2.2 - Processos anaeróbios	19
II.1.2.2.3 - Processos enzimáticos	20
II.1.2.3 - Tratamento químico - Processos Oxidativos Avançados (POA)	21
II.1.2.4 - Tratamento eletroquímico	27
II.1.2.5 - Outros métodos de tratamento	28
II.1.3 – JUSTIFICATIVA	29
II.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
II.3 – METODOLOGIA	33
II.3.1 - EFLUENTE PAPELEIRO	33
II.3.2 - CONTROLE ANALÍTICO	33
II.3.2.1 – Determinação de carbono orgânico total (COT)	33
II.3.2.2 – Determinação de cor	34
II.3.2.3 – Determinação de fenóis totais	34
II.3.2.4 – Determinação do pH	34
II.3.3 – TESTE DE TOXICIDADE FRENTE À BACTÉRIA <i>Escherichia coli</i>	34
II.3.3.1 - Cultura da bactéria	34
II.3.3.2 - Preparação do meio de cultura	35
II.3.3.3 - Monitoramento do CO ₂ pelo sistema de análise em fluxo com detecção condutométrica	36

II.3.3.4 - Realização do ensaio	36
II.3.4 – TESTE DE TOXICIDADE FRENTE A ALGA <i>Selenastrum capricornutum</i>	37
II.3.4.1 - Cultura da alga	37
II.3.4.2 - Condições do ensaio	39
II.3.4.4 - Medida de concentração da alga	40
II.3.5 – REATORES	41
II.3.5.1 – Sistema de ozonização	41
II.3.5.2 – Sistema de fotólise e fotocatalise	43
II.3.5.3 – Sistema empregado no tratamento eletroquímico e fotoeletroquímico	43
II.3.6 – ESTUDO CINÉTICO	44
II.3.6.1 – Ozonização	44
II.3.6.2 – O ₃ /H ₂ O ₂ /pH11	45
II.3.6.3 – O ₃ /UV/pH11	45
II.3.6.4 – Fotocatálise (UV/TiO ₂ /O ₂) e (UV/ZnO/O ₂)	45
II.3.6.5 – UV/H ₂ O ₂	45
II.3.6.6 – UV/ZnO/H ₂ O ₂	45
II.3.6.7 – UV/ZnO/O ₃	45
II.3.6.8 – Eletroquímica e Fotoeletroquímica	46
II.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
II.4.1 – PROCESSOS DE REMEDIAÇÃO DO EFLUENTE PAPELEIRO	47
II.4.1.1 – Ozonização	47
II.4.1.1.1 – Ozonização em meio alcalino (O ₃ /pH11)	47
II.4.1.1.2 – Ozonização em meio ácido (O ₃ /pH3)	50
II.4.1.1.3 – O ₃ /H ₂ O ₂ /pH11	52
II.4.1.1.4 – O ₃ /UV/pH11	54
II.4.1.1.5 – Resumo comparativo dos resultados obtidos com os diferentes processos de ozonização	56
II.4.1.2 – Processos fotoquímicos	58
II.4.1.2.1 – Fotocatálise heterogênea	58
II.4.1.2.2 – Cinética de degradação do processo fotocatalítico	62
II.4.1.2.3 – Fotodegradação do efluente papaleiro por UV/H ₂ O ₂	64
II.4.1.2.4 – Processo fotocatalítico combinado com peróxido de hidrogênio – UV/ZnO/H ₂ O ₂	66
II.4.1.2.5 – UV/ZnO/O ₃	68
II.4.1.2.6 – Resumo comparativo dos resultados obtidos pelos processos fotoquímicos	69
II.4.1.3 – Processos eletroquímicos e fotoeletroquímico	70
II.4.1.3.1 – Degradação de fenol pelos processos eletroquímicos e fotoeletroquímico	70
II.4.1.3.2 – Emprego dos processos eletroquímico e fotoeletroquímico no tratamento do efluente papaleiro	75
II.4.2 – TESTE DE TOXICIDADE FRENTE A ALGA <i>Selenastrum capricornutum</i>	76

II.4.3 – AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DOS PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS	78
II.4.4 – AVALIAÇÃO DO CUSTO DE TRATAMENTO DO EFLUENTE PAPELEIRO	83
II.5 – CONCLUSÕES PARCIAIS	87
II.6 – REFERÊNCIAS	91
<u>CAPÍTULO III</u> – BIOCENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	99
III.1 – INTRODUÇÃO	101
III.1.1 – CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR COMPOSTOS FENÓLICOS	101
III.1.2 – BIOCENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA FENÓIS	105
III.1.2.1 – Biossensores a base de tirosinase	108
III.1.2.2 – Biossensores a base de lacase	112
III.1.2.3 – Biossensores bienzimáticos	114
III.1.3 – CONSTRUÇÃO DOS BIOCENSORES	115
III.1.3.1 – Imobilização das enzimas	115
III.1.3.2 – Eletrodos impressos	116
III.1.3.3 – Sistema de análise em fluxo empregando-se biossensores amperométricos para o monitoramento contínuo de poluentes	119
III.1.4 – JUSTIFICATIVA	120
III.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	123
III.3 – METODOLOGIA	125
III.3.1 – REAGENTES E MATERIAIS	125
III.3.1.1 – Compostos fenólicos	125
III.3.1.2 – Reagentes de imobilização	125
III.3.1.3 – Enzimas	125
III.3.1.3.1 - Atividade enzimática	125
III.3.1.4 – Amostras	126
III.3.2 – ELETRODOS	126
III.3.2.1 – Eletrodos de fibra de carbono	126
III.3.2.2 – Eletrodos Impressos (“screen printed electrodes”)	127
III.3.2.3 – Eletrodos de carbono vítreo	128
III.3.3 – MEDIDAS ELETROQUÍMICAS	128
III.3.4 – DISPOSITIVO PARA MONITORAMENTO REMOTO	128
III.3.5 – IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS NA SUPERFÍCIE DOS ELETRODOS	129
III.3.6 – TRATAMENTO QUIMIOMÉTRICO PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA DE DIFERENTES COMPOSTOS FENÓLICOS	130

III.3.6.1 – Conjunto de dados	130
III.3.6.2 – Método de tratamento dos dados	131
III.3.7 – SISTEMA DE INJEÇÃO EM FLUXO	132
III.4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	135
III.4.1 – IMOBILIZAÇÃO DE LACASE SOBRE ELETRODOS DE FIBRA DE CARBONO	135
III.4.2 – BIOSSENSOR A BASE DE LACASE/SPE PARA A DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS	139
III.4.3 – DISPOSITIVO PARA MONITORAMENTO REMOTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	146
III.4.4 – BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS MULTICOMPONENTE PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS FENÓLICOS	157
III.4.5 – SISTEMA DE ANÁLISE EM FLUXO EMPREGANDO-SE BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA O MONITORAMENTO CONTÍNUO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NO EFLUENTE PAPELEIRO	164
III.4.5.1 – Influência do potencial de trabalho	165
III.4.5.2 – Influência da velocidade do fluxo	166
III.4.5.3 – Influência do pH e da força iônica da amostra	167
III.4.5.4 – Estabilidade do sistema analítico	169
III.4.5.5 – Calibração	170
III.4.5.6 – Análise do efluente papaleiro	172
III.4.5.7 – Monitoramento contínuo de espécies fenólicas durante a remediação do efluente papaleiro	175
III.5 – CONCLUSÕES PARCIAIS	177
III.6 – REFERÊNCIAS	181
<u>CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES</u>	187
IV.1 – CONCLUSÕES GERAIS	189
IV.2 – PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	193

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Exemplos de compostos organoclorados presentes nos efluentes das indústrias papeleiras.	13
Figura 2.2 – Organograma das classes de tratamento de efluentes. (POA = Processos Oxidativos Avançados).	14
Figura 2.3 – Esquema convencional de tratamento por lodos ativados (Bitton, 1994).	17
Figura 2.4 – Exemplos de dois processos pelos quais ocorre a descoloração. (A) hidrogenólise, (B) redução vicinal.	19
Figura 2.5 – Princípios eletrônicos de um processo fotoquímico. BV: Banda de valência ; BC: banda de condução; e ⁻ : elétron; h ⁺ : lacuna; hv: radiação (UV); D: substrato orgânico; D ⁻ : espécie reduzida, D ⁺ : espécie oxidada.	25
Figura 2.6 – Sistema utilizado no teste de toxicidade com a alga <i>S. capricornutum</i> .	41
Figura 2.7 – Sistema empregado na ozonização do efluente papeleiro.	42
Figura 2.8 – Representação esquemática do sistema empregado nos tratamentos eletroquímico e fotoeletroquímico. (A) Lâmpada de mercúrio 125 W; (B) Cátodo de titânio (tela); (C) Ânodo de Ti/Ru _{0,3} Ti _{0,7} O ₂ ; (D) amostra a ser tratada.	44
Figura 2.9 – Descoloração e variação do pH do efluente papeleiro Kraft E ₁ em função do tempo de tratamento pelo processo O ₃ /pH11. (Abs ₀ = 0,670).	48
Figura 2.10 – Redução de COT e fenóis totais em função do tempo de tratamento pelo processo O ₃ /pH11. (C _{0(COT)} = 1.400 mg L ⁻¹ ; C _{0(fenóis)} = 30 mg L ⁻¹).	48
Figura 2.11 – Ozônio consumido durante o processo de ozonização O ₃ /pH11.	49
Figura 2.12 – Redução da toxicidade aguda frente a <i>E. coli</i> em função do tempo de tratamento pelo processo O ₃ /pH11. (t ₀ = 63% de inibição no crescimento da bactéria).	50
Figura 2.13 – Redução de COT, cor e fenóis totais em função do tempo de tratamento pelo processo O ₃ /pH3. C _{0(COT)} = 950 mg L ⁻¹ ; Abs ₀ = 0,660; C _{0(fenóis)} = 30 mg L ⁻¹ .	51
Figura 2.14 – Redução da toxicidade aguda frente a <i>E. coli</i> em função do tempo de tratamento pelo processo O ₃ /pH3. (t ₀ = 58% de inibição no crescimento da bactéria).	52
Figura 2.15 – Redução de fenóis totais e cor em função do tempo de tratamento com o processo O ₃ /H ₂ O ₂ /pH11. (Abs ₀ = 0,665; C _{0(fenol)} = 30 mg L ⁻¹).	53
Figura 2.16 – Redução de COT, cor e fenóis totais em função do tempo de tratamento pelo processo O ₃ /UV/pH11. C _{0(COT)} = 910 mg L ⁻¹ ; C _{0(fenóis)} = 26 mg L ⁻¹ ; Abs ₀ = 0,680.	55
Figura 2.17 - Toxicidade aguda frente a <i>E. coli</i> em função do tempo de tratamento pelo processo O ₃ /UV/pH11. (t ₀ = 60% de inibição no crescimento da bactéria).	55
Figura 2.18 – Comparação entre os tratamentos O ₃ /H ₂ O ₂ /pH11, O ₃ /pH3, O ₃ /UV/pH11 e O ₃ /pH11 em relação à redução de (A) cor; (B) fenóis totais, (C) carbono orgânico total e (D) toxicidade frente à bactéria <i>E. coli</i> .	56
Figura 2.19 – Descoloração do efluente papeleiro em função do tempo de tratamento, empregando-se o processo fotocatalítico (ZnO e TiO ₂ 1mg mL ⁻¹). (Abs ₀ = 0,671).	62
Figura 2.20 – Redução das espécies fenólicas do efluente papeleiro usando o processo fotocatalítico (ZnO e TiO ₂ 1mg mL ⁻¹) em função do tempo de tratamento. (C ₀ = 35 mg L ⁻¹).	62
Figura 2.21 – Degradação da matéria orgânica do efluente papeleiro empregando-se o processo fotocatalítico (ZnO e TiO ₂ 1mg mL ⁻¹) em função do tempo de tratamento. (C ₀ = 1.100 mg L ⁻¹).	63
Figura 2.22 – Toxicidade frente à bactéria <i>E.coli</i> em função do tempo de tratamento e do tipo de catalisador empregado no processo fotocatalítico. (t ₀ = 65% de inibição no crescimento da bactéria).	63
Figura 2.23 – Estudo da influência da concentração de H ₂ O ₂ na degradação do efluente papeleiro. Condições: H ₂ O ₂ 0,05; 0,1 e 0,2 mol L ⁻¹ , lâmpada de mercúrio de 125 W. Respostas: (A) descoloração, (B) redução das espécies fenólicas e (C) redução de carbono orgânico total.	64

- Figura 2.24** – Estudo cinético do processo de degradação UV/H₂O₂. Condições: 0,1 mol L⁻¹ de H₂O₂, lâmpada de 125 W. Respostas: (A) descoloração, (B) redução das espécies fenólicas e (C) redução de carbono orgânico total. C_{0(COT)} = 990 mg L⁻¹; C_{0(fenóis)} = 32 mg L⁻¹; Abs₀ = 0,720. 65
- Figura 2.25** – Estudo da influência da concentração de H₂O₂ na degradação fotocatalítica do efluente papelero. Condições: H₂O₂ 0,05; 0,1 e 0,2 mol L⁻¹, lâmpada de mercúrio de 125 W, concentração do catalisador ZnO: 1 mg mL⁻¹ efluente. Respostas: (A) descoloração, (B) redução das espécies fenólicas e (C) redução de carbono orgânico total. 66
- Figura 2.26** – Estudo cinético do processo de degradação UV/H₂O₂. Condições: 0,1 mol L⁻¹ de H₂O₂, lâmpada de 125 W, concentração de ZnO: 1 mg mL⁻¹. Respostas: (A) descoloração, (B) redução das espécies fenólicas e (C) redução de carbono orgânico total. C_{0(COT)} = 1.035 mg L⁻¹; C_{0(fenóis)} = 33 mg L⁻¹; Abs₀ = 0,730. 67
- Figura 2.27** – Estudo cinético da degradação do efluente papelero empregando-se o processo combinado fotocatalítico/ozonização. Condições: ZnO (1mg mL⁻¹), fonte de irradiação: lâmpada de mercúrio de 125 W, concentração de O₃: 14 mg L⁻¹. Respostas: (A) descoloração; (B) variação do pH; (C) redução de fenóis totais e de carbono orgânico total e (D) redução da toxicidade aguda frente à bactéria *E. coli*. C_{0(COT)} = 1.230 mg L⁻¹; C_{0(fenóis)} = 38 mg L⁻¹; Abs₀ = 0,720; t₀ = 69% de inibição no crescimento da bactéria. 68
- Figura 2.28** – Comparação entre os tratamentos ZnO/UV, TiO₂/UV, H₂O₂/UV, ZnO/UV/H₂O₂ e ZnO/UV/O₃ em relação à redução de (A) cor; (B) fenóis totais, (C) carbono orgânico total e (D) toxicidade frente à bactéria *E. coli*. 69
- Figura 2.29** – Degradação de fenol (C₀ = 50 mg L⁻¹), eletrólito suporte Na₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹. Eletrodo Ti/Ru_{0,3}Ti_{0,7}O₂, área de 100 cm², densidade de corrente 20 mA cm⁻², lâmpada de mercúrio de 125 W. 71
- Figura 2.30** – Redução carbono orgânico total (C₀ = 50 mg L⁻¹ de fenol), eletrólito suporte Na₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹. Eletrodo Ti/Ru_{0,3}Ti_{0,7}O₂, área de 100 cm², densidade de corrente 20 mA cm⁻², lâmpada de mercúrio de 125 W. 72
- Figura 2.31** – Voltamograma cíclico da solução de fenol 50 mg L⁻¹, eletrólito suporte Na₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹, com e sem irradiação (lâmpada de 125 W). Eletrodo Ti/Ru_{0,3}Ti_{0,7}O₂, área de 100 cm². Velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹. 73
- Figura 2.32** – Degradação fotoeletroquímica de fenol (C₀ = 50 mg L⁻¹), eletrólito suporte Na₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹. Eletrodo Ti/Ru_{0,3}Ti_{0,7}O₂, área de 100 cm². 74
- Figura 2.33** – Redução fotoeletroquímica de fenol (C₀ = 50 mg L⁻¹), eletrólito suporte Na₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹. Eletrodo Ti/Ru_{0,3}Ti_{0,7}O₂, área de 100 cm². 74
- Figura 2.34** – Degradação do efluente papelero empregando-se os processos fotocatalítico, eletroquímico e fotoeletroquímico. Eletrodo Ti/Ru_{0,3}Ti_{0,7}O₂, área de 100 cm², lâmpada de 125 W. (A) descoloração, (B) redução de fenóis totais, (C) redução de carbono orgânico total e (D) redução de toxicidade aguda frente à bactéria *E. coli*. C_{0(COT)} = 970 mg L⁻¹; C_{0(fenóis)} = 34 mg L⁻¹; Abs₀ = 0,676; t₀ = 57% de inibição no crescimento da bactéria. 76
- Figura 2.35** – Porcentagem de inibição do crescimento da alga *S. capricornutum*. Efluente bruto (1), O₃/pH11 (2), O₃/pH3 (3), O₃/pH11/H₂O₂ (4), O₃/pH11/UV (5), ZnO/UV/O₂ (6), TiO₂/UV/O₂ (7), ZnO/UV/O₃ (8), ZnO/UV/H₂O₂ (9), UV/H₂O₂ (10), eletroquímico (11) e fotoeletroquímico (12). 77
- Figura 2.36** – Descoloração (A), redução de fenóis totais (B) e de carbono orgânico total (C) em função do tempo de tratamento com os diferentes processos de ozonização. 79
- Figura 2.37** – Determinação da constante de pseudo-primeira ordem para a redução de fenóis totais promovida pelos processos de ozonização. 80
- Figura 2.38** – Determinação da constante de pseudo-primeira ordem para a redução de fenóis totais promovida pelos processos fotoquímicos e fotocatalíticos. 80
- Figura 2.39** – Determinação da constante de pseudo-primeira ordem para a redução de fenóis totais promovida pelos processos eletroquímico e fotoeletroquímico. 81

Figura 2.40 – Índice de eficiência para os processos: O ₃ /pH11 (1), O ₃ /pH3 (2), O ₃ /pH11/H ₂ O ₂ (3), O ₃ /pH11/UV (4), ZnO/UV/O ₂ (5), TiO ₂ /UV/O ₂ (6), ZnO/UV/H ₂ O ₂ (7), UV/H ₂ O ₂ (8), ZnO/UV/O ₃ (9), eletroquímico (10) e fotoeletroquímico (11).	86
Figura 3.1 – Intervalo de potencial ótimo para a operação de biossensores amperométricos. E ⁰ hidroquinona, E ⁰ fenol e E ⁰ 4-clorofenol são os potenciais formais dos pares redox hidroquinona/quinona, fenol/radical fenóxi e 4-clorofenol/4-clorofenóxi, respectivamente.	106
Figura 3.2 – Mecanismo das reações nos eletrodos modificados pelas enzimas para a determinação de compostos fenólicos. E _{red} e E _{ox} são as formas reduzida e oxidada, respectivamente das enzimas; CF = composto fenólico.	107
Figura 3.3 – Modelo esquemático do sítio ativo da tirosinase.	108
Figura 3.4 – Mecanismo de transferência de elétrons de um eletrodo modificado com tirosinase para a determinação de monofenóis e/ou o-difenóis.	109
Figura 3.5 – Esquema do ciclo catalítico da tirosinase.	110
Figura 3.6 – Representação esquemática do sítio ativo da lacase.	112
Figura 3.7 – Esquema do ciclo catalítico da lacase.	113
Figura 3.8 – Diagrama esquemático da preparação do microeletrodo: 1- fibras de carbono; 2- junção da fibra de carbono com o fio condutor; 3- tubo de polietileno, preenchido com pasta de carbono condutora; 4- resina epóxi; 5- contato elétrico.	126
Figura 3.9 – Desenho esquemático do eletrodo impresso: contato elétrico (A), suporte de cerâmica de alumina (B), isolante elétrico (C) e eletrodo de trabalho (D).	127
Figura 3.10 – Diagrama esquemático do dispositivo para monitoramento remoto. Potenciostato (A), cabo blindado de 20 metros (B), tubo de PVC com resina epóxi (C), conector de três pinos hermeticamente selado (D), eletrodo de trabalho (E), contra eletrodo (F) e eletrodo de referência (G).	129
Figura 3.11 – Diagrama esquemático do sistema analítico. Configuração para análise por injeção em fluxo (i); configuração para análise em fluxo contínuo (ii), onde A = amostra, B = bomba peristáltica, C = célula de permeação, D = célula eletroquímica de detecção, E = potenciostato, F = registrador, G = injetor, c = carregador, d = descarte e t = solução tampão. Célula amostradora (sistema de diálise com membrana) (iii), onde EA = entrada da amostra, SA = saída da amostra, M = membrana, ET = entrada da solução tampão, ST = saída da solução tampão. Célula eletroquímica (iv), onde ET = eletrodo de trabalho (biossensor), CE = contra-eletrodo, ER = eletrodo de referência, e = entrada da célula eletroquímica e s = saída da célula eletroquímica.	133
Figura 3.12 – Esquema da reação via carbodiimida usada para a formação de ligação covalente entre a enzima e o suporte (Chibata, 1978).	136
Figura 3.13 – Ligação cruzada envolvendo a reação entre glutaraldeído e os grupos amina residuais livres da enzima (Woodward, 1985).	136
Figura 3.14 – Sensibilidade do biossensor a base de lacase em função da porcentagem de glutaraldeído utilizada no processo de imobilização.	137
Figura 3.15 – Efeito do pH na resposta do biossensor a base de lacase. Solução de catecol 100 μmol L ⁻¹ , potencial aplicado: -100 mV vs. ECS.	138
Figura 3.16 – Efeito do potencial aplicado na resposta do biossensor a base de lacase. Solução de catecol 100 μmol L ⁻¹ em tampão fosfato pH 5,0.	138
Figura 3.17 – Resposta do biossensor de lacase em função da concentração de catecol, (potencial aplicado: -0,1V vs. ECS, eletrólito suporte: tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 5,0).	139
Figura 3.18 – Efeito do tipo da tinta de carbono sobre a resposta do biossensor de lacase. Respostas obtidas com as tintas Ercon (A), DuPont (B) e Acherson (C), empregando-se uma solução de guaiacol 5,0 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ (corrente residual, representada pela linha pontilhada). Potencial de trabalho: -0,10 V vs Ag/AgCl; em tampão fosfato 10 mmol L ⁻¹ (pH 5,0).	140

- Figura 3.19** – Efeito da concentração de albumina bovina (A), glutaraldeído (B), carbodiimida (C) e de lacase (D) na resposta do biossensor frente a uma solução de guaiacol $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Potencial de trabalho: -0,10 V vs Ag/AgCl; em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 5,0). 142
- Figura 3.20** – Resposta do biossensor/SPE para aumentos sucessivos de $10,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ na concentração de fenol (A), *p*-clorofenol (B); *p*-cresol (C); guaiacol (D) e *p*-cloroguaiacol (E). Potencial de trabalho: -0,10 V vs Ag/AgCl; em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 5,0). 143
- Figura 3.21** – Resposta amperométrica (a) do biossensor/SPE para aumentos sucessivos de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ na concentração de *p*-cloroguaiacol (A) e guaiacol (B). O gráfico de calibração para esta faixa de concentração (b), assim como para incrementos de $1,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (c) também são apresentados. Potencial de trabalho: -0,10 V vs Ag/AgCl; em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 5,0). 144
- Figura 3.22** – Teste de estabilidade, realizado com solução de guaiacol $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Potencial de trabalho: -0,10 V vs Ag/AgCl; em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 5,0). 145
- Figura 3.23** – Resposta cronoamperométrica para soluções de tampão fosfato pH 5,0 (A); água potável (B); água do Rio Grande (C) e água de chuva (D), após sucessivos incrementos de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ na concentração de guaiacol (a partir de a até f). Potencial de trabalho: 0,10 V vs Ag/AgCl, usando o pH e força iônica original de cada solução. 146
- Figura 3.24** – Resposta cronoamperométrica do biossensor remoto a base de lacase para sucessivos aumentos na concentração de *p*-cloroguaiacol (A) e guaiacol (B). Incrementos de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (a-j), com a corrente residual representada por linhas pontilhadas. Gráfico de calibração resultante, mostrado à direita. Potencial de trabalho: -0,10 V vs Ag/AgCl; em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 5,0). 147
- Figura 3.25** – Resposta amperométrica do sensor remoto a base de lacase para aumentos sucessivos de $25,0 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ na concentração de *p*-cloroguaiacol. Potencial de trabalho: -0,10 V vs Ag/AgCl; em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 5,0). 148
- Figura 3.26** – Resposta amperométrica do sensor remoto a base de tirosinase para aumentos sucessivos de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ na concentração de *p*-cresol (A) e fenol (B). Potencial de trabalho: -0,10 V vs Ag/AgCl; em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 5,0). 149
- Figura 3.27** – Voltamograma hidrodinâmico (A) e efeito do pH, em potencial -0,10 V vs Ag/AgCl (B) para os biossensores remotos a base de lacase (a, cloroguaiacol $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) e tirosinase (b, *p*-cresol $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹); tampão fosfato (10 mmol L⁻¹, pH 5,0). 150
- Figura 3.28** – Efeito da concentração do tampão sobre a resposta do biossensor remoto a base de lacase. Solução de *p*-cloroguaiacol $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Potencial de trabalho: -0,10 V vs Ag/AgCl; em tampão fosfato pH 5,0. 151
- Figura 3.29** – Estabilidade (A) e experimentos para avaliar o efeito memória (B), solução de *p*-cloroguaiacol $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (A, B nível alto) e $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (B nível baixo). Potencial de trabalho: -0,10 V vs Ag/AgCl; em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 5,0). 153
- Figura 3.30** – Resposta cronoamperométrica para soluções de tampão fosfato pH 5,0 (A) e água do Rio Grande/USA (B, usando pH e força iônica naturais) contendo aumentos sucessivos ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, a até j) na concentração de *p*-cloroguaiacol, os cronoamperogramas correspondentes às correntes residuais estão representados por linhas pontilhadas. Potencial de trabalho: -0,10 V vs Ag/AgCl; em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 5,0). 155
- Figura 3.31** – Resposta dos biossensores remotos a base de lacase (A), tirosinase (B) e bienzimático (C) para aumentos sucessivos ($1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) na concentração de *p*-cloroguaiacol (a); guaiacol (b); *p*-cresol (c) e fenol (d). Potencial de trabalho: -0,10 V vs Ag/AgCl; em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 5,0). 156
- Figura 3.32** – Correlação entre os valores previstos e adicionados na determinação de fenol em uma mistura de fenol e clorofenol. 160
- Figura 3.33** – Correlação entre os valores previstos e adicionados na determinação de clorofenol em uma mistura de fenol e clorofenol. 160

- Figura 3.34** – Correlação entre os valores previstos e adicionados na determinação de catecol em uma mistura de catecol e fenol. 161
- Figura 3.35** – Correlação entre os valores previstos e adicionados na determinação de fenol em uma mistura de catecol e fenol. 161
- Figura 3.36** – Correlação entre os valores previstos e adicionados na determinação de cresol em uma mistura de cresol e clorocresol. 162
- Figura 3.37** – Correlação entre os valores previstos e adicionados na determinação de clorocresol em uma mistura de cresol e clorocresol. 162
- Figura 3.38** – Correlação entre os valores previstos e adicionados na determinação de fenol em uma mistura de fenol e cresol. 163
- Figura 3.39** – Correlação entre os valores previstos e adicionados na determinação de cresol em uma mistura de fenol e cresol. 163
- Figura 3.40** – Voltamograma hidrodinâmico para os biossensores a base de lacase (a) e tirosinase (b) inseridos no sistema de análise por injeção em fluxo (velocidade do fluxo: $1,6 \text{ mL min}^{-1}$). Volume de injeção: $220 \mu\text{L}$ de guaiacol $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ (para o biossensor de lacase) e $220 \mu\text{L}$ de fenol $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ fenol (para o biossensor de tirosinase); solução carregadora: tampão fosfato (10 mmol L^{-1} , pH 5,0); solução interna: tampão fosfato (10 mmol L^{-1} , pH 5,0 e 5,5; para os biossensores de lacase e tirosinase, respectivamente). 165
- Figura 3.41** – Efeito da velocidade do fluxo na resposta do biossensor a base de lacase (A), para $25 \mu\text{L}$ (a), $55 \mu\text{L}$ (b), $110 \mu\text{L}$ (c) e $220 \mu\text{L}$ (d) da guaiacol $50 \mu\text{mol L}^{-1}$. Variação da intensidade da corrente em função do volume de amostra injetado (B). Potencial aplicado $0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}$; Volume de injeção: $220 \mu\text{L}$ de guaiacol $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; solução carregadora e solução interna: tampão fosfato (10 mmol L^{-1} , pH 5,0). 167
- Figura 3.42** – Variação da intensidade da corrente do biossensor de lacase em função do pH (A) e da concentração de tampão fosfato (B), utilizando-se o sistema de análise em fluxo. Potencial aplicado $0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}$; Volume de injeção: $220 \mu\text{L}$ de guaiacol $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; solução carregadora e solução interna: tampão fosfato (10 mmol L^{-1} , pH 5,0). 168
- Figura 3.43** – Experimentos para avaliar a estabilidade (A) dos biossensores a base de lacase (a) e tirosinase (b) e o efeito memória do biossensor a base de lacase (B) ([guaiacol] nível alto: $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, nível baixo: $10 \mu\text{mol L}^{-1}$). Volume de injeção: $220 \mu\text{L}$ de guaiacol $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ (para o biossensor de lacase) e $220 \mu\text{L}$ de fenol $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ fenol (para o biossensor de tirosinase); demais condições como na Figura 3.40. 169
- Figura 3.44** – Resposta do biossensor a base de lacase em função da variação da concentração de guaiacol (a), cloroguaiacol (b), p-clorofenol (c) e fenol (d). Condições de fluxo e potencial conforme descrito na Figura 3.40. 171
- Figura 3.45** – Resposta do biossensor a base de lacase para soluções de tampão fosfato pH 5,0 (A) e de efluente papelheiro Kraft E1 não tratado (B) sob condições naturais de pH e força iônica, após sucessivos incrementos de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ na concentração de guaiacol (a partir de a até f). Condições de fluxo e potencial conforme descrito na Figura 3.40. 172
- Figura 3.46** – Resposta do biossensor a base de tirosinase para soluções de tampão fosfato pH 5,5 (A) e de efluente papelheiro Kraft E1 não tratado (B) sob condições naturais de pH e força iônica, após sucessivos incrementos de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ na concentração de fenol (a partir de a até d). Condições de fluxo e potencial conforme descrito na Figura 3.40. 173
- Figura 3.47** – Decréscimo na concentração de espécies fenólicas em função do tempo de tratamento pelo processo de ozonização/pH11. A seta indica o início do processo de remediação. Perfil obtido empregando-se fluxo contínuo. Biossensor a base de lacase. Velocidade do fluxo: $1,6 \text{ mL min}^{-1}$; solução interna tampão fosfato (10 mmol L^{-1} , pH 5,0). Potencial aplicado: $0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}$. Concentração inicial de fenóis: $0,21 \text{ mg L}^{-1}$; concentração final de fenóis: $0,02 \text{ mg L}^{-1}$. 175

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Faixa de valores observados para os parâmetros de avaliação do efluente papelero Kraft E1 bruto. Valores médios para diferentes amostras coletadas.	33
Tabela 2.2 – Composição do meio de cultura para crescimento da bactéria <i>E. coli</i> .	35
Tabela 2.3 – Composição da solução de nutrientes utilizada para o cultivo da alga <i>S. capricornutum</i> .	38
Tabela 2.4 – Soluções estoque dos nutrientes utilizados para o cultivo da alga <i>S. capricornutum</i> .	38
Tabela 2.5 – Esquema para a realização do ensaio de toxicidade com a alga <i>S. capricornutum</i> .	39
Tabela 2.6 – Consumo de O ₃ em função do tempo de tratamento pelo processo O ₃ /pH11.	47
Tabela 2.7 – Consumo de O ₃ em função do tempo de tratamento pelo processo O ₃ /pH3.	51
Tabela 2.8 – Consumo de O ₃ em função do tempo de tratamento pelo processo (O ₃ /UV/pH11).	54
Tabela 2.9 – Valores das variáveis empregadas no planejamento fatorial 2 ³ .	58
Tabela 2.10 – Fotocatálise do efluente papelero. Catalisador ZnO, tempo de tratamento: 30 minutos; volume de efluente: 250 mL; fonte de radiação: lâmpada de 125 W.	59
Tabela 2.11 – Fotocatálise do efluente papelero. Catalisador TiO ₂ , tempo de tratamento: 30 minutos; volume de efluente: 250 mL; fonte de radiação: lâmpada de 125 W.	59
Tabela 2.12 – Representação geométrica dos efeitos do pH, O ₂ , tipo e massa do catalisador, na redução de cor, fenóis e COT.	61
Tabela 2.13 – Constante de pseudo-primeira ordem, coeficiente de correlação e tempo de meia vida para a redução de fenóis totais presentes no efluente papelero Kraft E1 obtidos pelos diferentes processos oxidativos estudados.	81
Tabela 2.14 – Constante de pseudo-primeira ordem, coeficiente de correlação e tempo de meia vida para a descoloração do efluente papelero Kraft E1 obtidos pelos diferentes processos oxidativos estudados.	82
Tabela 2.15 – Constante de pseudo-primeira ordem, coeficiente de correlação e tempo de meia vida para a redução de carbono orgânico total presente no efluente papelero Kraft E1 obtidos pelos diferentes processos oxidativos estudados.	82
Tabela 2.16 – Custo dos diferentes processos de remediação para a remoção de 90% de fenóis totais e de carbono orgânico total.	84
Tabela 3.1 – Planejamento das misturas binárias. C = composto fenólico 1; F = composto fenólico 2. Os sub-índices indicam a concentração, 1 = 1,0 x 10 ⁻⁶ ; 2 = 2,0 x 10 ⁻⁶ ; sucessivamente até 10 = 10,0 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ .	131
Tabela 3.2 – Respostas dos biossensores a base de lacase na determinação de catecol (potencial aplicado:-100 mV vs. ECS, tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 5,0; CV: coeficiente de variação).	135
Tabela 3.3 – Comparação das respostas relativas para diferentes compostos fenólicos obtidas com os biossensores a base de lacase e tirosinase.	158
Tabela 3.4 – Erro padrão de previsão e desvio padrão médio relativo entre os valores previstos e adicionados.	159
Tabela 3.5 – Sensibilidade dos biossensores a base de lacase e tirosinase para diferentes compostos fenólicos. Demais condições conforme descrito na Figura 3.40.	171
Tabela 3.6 – Resultados obtidos pelo método de adição de padrão na determinação da concentração de fenóis presentes no efluente papelero Kraft E1, empregando-se diferentes biossensores (lacase e tirosinase) e o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu.	174

ABREVIATURAS

APHA	American public health association
ATCC	American type culture collections
BC	Banda de condução
BV	Banda de valência
CF	Composto fenólico
COT	Carbono orgânico total
CV	Coefficiente de variância
D	Substrato orgânico
D'	Substrato orgânico foto-reduzido
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
E	Potencial (V)
E ⁰	Potencial formal (V)
E1	Efluente da fase de extração alcalina
e ⁻	Elétron
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECS	Eletrodo de calomelano saturado
EPA	Agência de Proteção Ambiental Norte-americana – Environmental Protection Agency
E _{ox}	Enzima na forma oxidada
E _{red}	Enzima na forma reduzida
FIA	Análise por injeção em fluxo – flow injection analysis
h ⁺	Lacuna fotogerada
HRP	Peroxidase de raiz forte - Horseradish peroxidase
i	Corrente (A)
ISO	International Organization for Standardization
OPE	Ésteres organofosfóricos
PCA	Análise de componentes principais – principal component analysis
PCE	Percloroetileno

PLS	Mínimos quadrados parciais – partial least-squares
POA	Processo oxidativo avançado
PPO	Polifenol oxidase
rpm	Rotações por minuto
RSD	Desvio padrão relativo – relative standard deviation
<i>S. capricornutum</i>	<i>Selenastrum capricornutum</i>
SEP	Erro padrão de previsão – standard errors of predictions
U	Unidade de atividade enzimática
UV	Ultravioleta
TCE	tricloroetileno

GLOSSÁRIO

Biossensor: Dispositivo analítico que emprega um componente biológico ativo (enzima, anticorpo, microrganismo, oligonucleotídeo, entre outros) intimamente acoplado a um transdutor, que pode ser eletroquímico, óptico, calorimétrico, etc.

DBO: É a quantidade de oxigênio necessária para que microrganismos aeróbios mineralizem, sob determinadas condições, a matéria orgânica de uma amostra. É o parâmetro mais usual de medição de poluição orgânica aplicado às águas residuárias. Unidade (mg L^{-1}).

DQO: É a quantidade de oxigênio necessário para oxidar quimicamente a matéria orgânica. O método consiste em se oxidar a matéria orgânica da amostra com um forte agente oxidante (ex.: dicromato de potássio) em meio ácido a quente. Este teste é muito importante em despejos que contenham substâncias tóxicas à vida. Unidade (mg L^{-1}).

Oxigênio dissolvido: Oxigênio necessário para a respiração de microrganismos aeróbios. É fundamental para se verificar e manter condições aeróbias em um curso de água que recebe material poluidor. Também é utilizado para controlar processos de aeração, para indicar atividade fotossintetizadora e corrosividade. Unidade (mg L^{-1}).

Processo Kraft: Denominação do processo de polpação comercial mais utilizado pela indústria de papel e celulose, este processo emprega um licor de cozimento, que contém NaOH e Na_2S , para promover a degradação química da lignina.

Toxicidade aguda: Efeitos adversos que ocorrem em um curto período de tempo, geralmente até 14 dias, após a exposição de um organismo a única dose da substância (poluente) ou depois de múltiplas doses em até 24 horas.

Toxicidade crônica: Efeitos adversos que ocorrem em um organismo durante a maior parte do seu ciclo de vida.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

I.1 – APRESENTAÇÃO

A atividade industrial adquiriu um caráter essencial na sociedade contemporânea, devido à evolução dos processos industriais e ao surgimento de inúmeros produtos, que rapidamente tornaram-se de primeira necessidade. Embora a sua importância seja indiscutível, a atividade industrial costuma ser responsabilizada, e muitas vezes com justa razão, pelo fenômeno de contaminação ambiental, principalmente graças a dois fatores de extrema importância: a) o acúmulo de matérias primas e insumos, que envolve sérios riscos de contaminação por transporte e disposição inadequada; e b) ineficiência inerente dos processos de conversão, o que necessariamente implica a geração de resíduos.

Embora exista uma preocupação universal em se evitar episódios de contaminação ambiental, estes eventos prejudiciais continuam acontecendo, principalmente porque, em função dos fatores acima comentados, grande parte dos processos produtivos é intrinsecamente poluente. Ao longo das décadas, a atividade industrial tem produzido rejeitos gasosos, líquidos e sólidos nocivos ao meio ambiente. Processos industriais que utilizam grandes volumes de água contribuem significativamente com a contaminação dos corpos d'água, principalmente pela ausência de sistemas de tratamento para os grandes volumes de efluentes líquidos produzidos. Dentro deste contexto, uma importante parcela do processo de contaminação pode ser atribuída às atividades das refinarias de petróleo e das indústrias químicas, têxteis e papeleiras. No entanto, não menos importante é a contribuição das atividades agrícolas, dos esgotos sanitários e dos resíduos domésticos.

Em função deste panorama, muitos estudos têm sido realizados buscando desenvolver tecnologias capazes de minimizar o volume e a toxicidade dos efluentes industriais. Infelizmente, a aplicabilidade destes tipos de sistemas está subordinada ao desenvolvimento de processos modificados e ao estabelecimento de sistemas de reciclagem de efluentes, atividades que implicam em tecnologias evolutivas e ainda indisponíveis universalmente. Assim, o estudo de novas

alternativas para o tratamento dos inúmeros efluentes industriais atualmente produzidos continua sendo uma das principais armas de combate ao fenômeno de contaminação antropogênica.

A busca de processos menos poluentes tem impulsionado novas tecnologias, assim como a combinação das já existentes para a remediação e até mesmo a reutilização de seus efluentes. Dentro deste contexto, é importante contar com novas metodologias de determinação e quantificação dos diversos tipos de poluentes, sendo a rapidez e a seletividade, características desejadas para os sensores.

Atualmente existe um consenso universal a respeito da necessidade de monitorar continuamente o teor de contaminantes químicos nos cursos de águas naturais e nos inúmeros efluentes industriais descarregados nestes recursos hídricos. Devido aos riscos para a saúde e para a meio ambiente, causados pela exposição a poluentes inorgânicos e orgânicos, existe um grande interesse na determinação destes compostos em matrizes ambientais. Vários métodos têm sido empregados para esta finalidade, incluindo análises cromatográficas e espectrofotométricas. Entretanto, estes métodos possuem uma série de desvantagens, tais como um extensivo pré-tratamento das amostras, um alto custo e problemas a respeito da integridade das amostras. Isto têm feito com que estes métodos mostrem-se pouco atraentes para serem empregados no monitoramento contínuo de poluentes fenólicos. Este último tipo de monitoramento, realizado diretamente no ambiente contaminado ou de interesse, tem sido preferido, pois pode fornecer uma resposta rápida e confiável durante os processos de caracterização e remediação de locais contaminados. Uma informação analítica imediata sobre o grau de sucesso de uma operação de remediação de um determinado efluente pode eliminar o risco de ocorrer uma descarga deste efluente para o meio ambiente com níveis inaceitáveis de poluentes. Além disso, a análise contínua minimiza o tempo para a aquisição dos dados, o que previne atrasos na tomada de decisões para melhorar o processo de tratamento. Algumas decisões, como as que tratam de proteção ambiental, e conseqüentemente da saúde humana, são desejadas em tempo real para prevenir

riscos desnecessários. Assim, o desenvolvimento de novas metodologias analíticas para o monitoramento de compostos poluentes em matrizes de interesse ambiental é tema de extrema relevância e atualidade.

Embora a primeira vista o desenvolvimento de processos de tratamento e de técnicas analíticas de monitoramento estejam distanciados, eles são os dois lados de uma mesma moeda, quando se busca fornecer novas ferramentas e elementos para melhorar a qualidade dos processos de preservação do meio ambiente.

A indústria de papel e celulose é atualmente uma das mais importantes no mundo, tanto do ponto de vista econômico como em relação ao potencial poluidor. Os efluentes gerados durante o processo de branqueamento da polpa celulósica são muito deletérios para o meio ambiente. Mais de trezentos diferentes compostos orgânicos foram detectados neste tipo de efluente; alguns destes compostos, tais como fenóis e organoclorados, apresentam-se recalcitrantes e com elevado grau de toxicidade.

Com base neste panorama, este trabalho descreve o emprego de processos alternativos de tratamento do efluente papeleiro Kraft E1 e o desenvolvimento de novas metodologias eletroanalíticas para a determinação de compostos fenólicos neste tipo de matriz ambiental. Para facilitar o entendimento do leitor esse trabalho foi dividido em capítulos, de forma que o capítulo II, apresenta uma pequena revisão dos métodos tradicionais de remediação de efluentes industriais, e também dos processos oxidativos avançados (POA), tais como os processos químicos, eletroquímicos, fotoquímicos, que se fundamentam na geração de espécies radicalares com características fortemente oxidantes. Neste capítulo também são apresentados os resultados obtidos com a aplicação de alguns processos oxidativos avançados na remediação do efluente papeleiro. A eficiência dos tratamentos foi avaliada como base na redução da coloração, de fenóis totais, carbono orgânico total e da toxicidade do efluente. Parâmetros cinéticos e de custo também foram considerados na avaliação global dos processos estudados. O capítulo III apresenta os biossensores amperométricos como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de dispositivos

analíticos para a determinação de espécies fenólicas em amostras de efluentes industriais e/ou de interesse ambiental. Este capítulo apresenta também os princípios de operação de biossensores amperométricos a base de lacase e tirosinase, os processos de imobilização empregados para promover o acoplamento das enzimas com a superfície dos eletrodos, os diferentes materiais e métodos de construção dos eletrodos. Em seguida, o capítulo III descreve a otimização e aplicação dos biossensores na análise de espécies fenólicas em matrizes ambientais e também para monitorar a degradação destas espécies durante o processo de remediação do efluente papaleiro Kraft E1. Finalmente no capítulo IV apresentam-se as conclusões gerais e as propostas para trabalhos futuros.

I. 2 - OBJETIVOS

O presente trabalho teve dois objetivos principais: o estudo comparativo entre diferentes processos de remediação do efluente papaleiro e o desenvolvimento de biossensores para a determinação de fenóis totais e/ou diferentes classes de compostos fenólicos, visando sua aplicação no monitoramento deste efluente.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Avaliação de alguns processos oxidativos avançados quanto a sua capacidade de redução da concentração de carbono orgânico total, fenóis totais, cor e toxicidade do efluente papaleiro;
- Estudo da cinética de degradação apresentada por estes processos na remediação do efluente papaleiro;
- Desenvolvimento de biossensores amperométricos baseados em enzimas fenol-oxidases (tais como: lacase e tirosinase) para a determinação de diferentes compostos fenólicos em matrizes ambientais complexas;
- Empregar os biossensores e as metodologias desenvolvidas para avaliar continuamente a concentração das espécies fenólicas presentes no efluente papaleiro durante a remediação do mesmo pelos processos de tratamento estudados.

CAPÍTULO II

***PROCESSOS ALTERNATIVOS PARA A
REMEDIAÇÃO DO EFLUENTE PAPELEIRO***

II.1 - INTRODUÇÃO

II.1.1 – INDÚSTRIA DE PAPEL E CELULOSE

Desde os tempos mais remotos e com a finalidade de representar objetos inanimados ou em movimento, o homem vem desenhando nas superfícies dos mais diferentes materiais. Nesta atividade, tão intimamente ligada ao raciocínio, utilizou, inicialmente, as superfícies daqueles materiais que a natureza oferecia praticamente prontos para seu uso, tais como paredes rochosas, pedras, ossos, folhas de certas plantas, etc.

Acompanhando o desenvolvimento da inteligência humana, as representações gráficas foram se tornando cada vez mais complexas, passando desse modo a significar idéias. Este desenvolvimento, ao permitir, também, um crescente domínio da circunstância através de utensílios por ele criados, levou o homem a desenvolver suportes mais adequados para as representações gráficas. Com esta finalidade, a História registra o uso de tabletes de barro cozido, tecidos de fibras diversas, papiros, pergaminhos e, finalmente, papel (Lima e col., 1988).

Os espécimes mais antigos de papiro, preparados à base de tiras extraídas dos caules de uma planta da família das ciperáceas, muito abundante nas margens do Nilo, foram achados em túmulos egípcios, cuja origem remonta ao ano 3.000 AC. A maioria dos historiadores concorda em atribuir a Ts'ai Lum (105 DC) a primazia de ter feito papel por meio da polpação de redes de pesca e de trapos, e mais tarde usando fibras vegetais (Lima e col., 1988).

Assim, o processo de obtenção da polpa de celulose a partir de matéria prima vegetal é milenar. Ao longo dos tempos foi adaptando-se às necessidades crescentes impostas pelo progresso da sociedade, ganhando grande impulso após a revolução industrial no século XVIII, que teve como conseqüências o aumento da demanda por difusão e alteração de normas de contabilidade e controle escrito, incremento dos meios de comunicação e da educação via jornais, livros escolares e obras literárias entre outros (Angelo, 1999).

A indústria de papel e celulose é atualmente uma das mais importantes no mundo. Em 1999 a produção mundial de papel foi estimada em 300 milhões de

toneladas (James e col., 1999; Thompson e col., 2001), com uma geração diária de mais de 83 milhões de metros cúbicos de efluentes, que equivalem ao consumo doméstico de água de aproximadamente 275 milhões de pessoas (Sant'Anna, 1992; Ribó, 1992; Durán e Espósito, 1993; Odenhal, 1994).

O processo de polpação (separação das fibras vegetais mediante utilização de energia mecânica e/ou química) como é conhecido atualmente começou a ser desenvolvido a partir da segunda metade do século XIX, quando se iniciaram os estudos e desenvolvimento dos processos químicos de polpação pelos processos com soda cáustica e bissulfito (ácido) (Angelo, 1999). Atualmente, o processo de polpação predominante no mundo é o processo Kraft ou sulfato, que consiste no cozimento das fibras em temperaturas elevadas na presença de uma solução aquosa de hidróxido de sódio e sulfeto de sódio, chamada de licor de cozimento. A denominação sulfato é derivada da aplicação de sulfeto de sódio para cobrir as perdas do ciclo de recuperação dos reagentes do cozimento. Este processo é responsável pela geração de efluentes com alta demanda bioquímica de oxigênio, turbidez, cor e sólidos em suspensão, além de baixas concentrações de oxigênio dissolvido (Hodgson e col., 1997).

Contudo, é na etapa de branqueamento da polpa que são gerados os compostos mais deletérios ao meio ambiente e com maior resistência à biodegradação. No processo de branqueamento, normalmente realizado com cloro, é produzido um grande número de compostos organoclorados, conforme exemplifica a Figura 2.1, muitos dos quais são considerados altamente tóxicos, como dioxinas, clorofenóis, cloroguaiacóis e vários tipos de fragmentos de cloroligninas (Xie e col., 1986; Harris e Elliott, 2000; Guerra, 2001). Embora muitos esforços tenham sido dedicados à substituição do cloro como insumo de branqueamento, com o objetivo de minimizar o teor de compostos organoclorados nos efluentes, o seu impacto ambiental continua sendo bastante preocupante (Sundquist, 1994; Durán e Espósito, 1997; Durán, 1997; Vidal e col., 2000). A detecção de compostos organoclorados em sedimentos marinhos de regiões próximas a indústrias papeleiras é um fato bastante freqüente (Palm e Lammi, 1995; Kähkönen e col., 1998; Jones e col., 2001; Huovinen e col., 2001).

O fenômeno de contaminação por organoclorados tem-se difundido de uma maneira tão generalizada, que pode ser observado até em regiões bastante isoladas do planeta. Na última década, por exemplo, tem-se registrado a presença de compostos organoclorados na região ártica (Buser, 1995; Halsall e col., 1998; Kleivane e Skaare, 1998; Baker e Hites, 1999). Dentre outros, destaca-se a presença de compostos semi-voláteis (por exemplo, hexaclorobenzeno), bifenilos policlorados e outras espécies persistentes em amostras de ar, água e sedimentos.

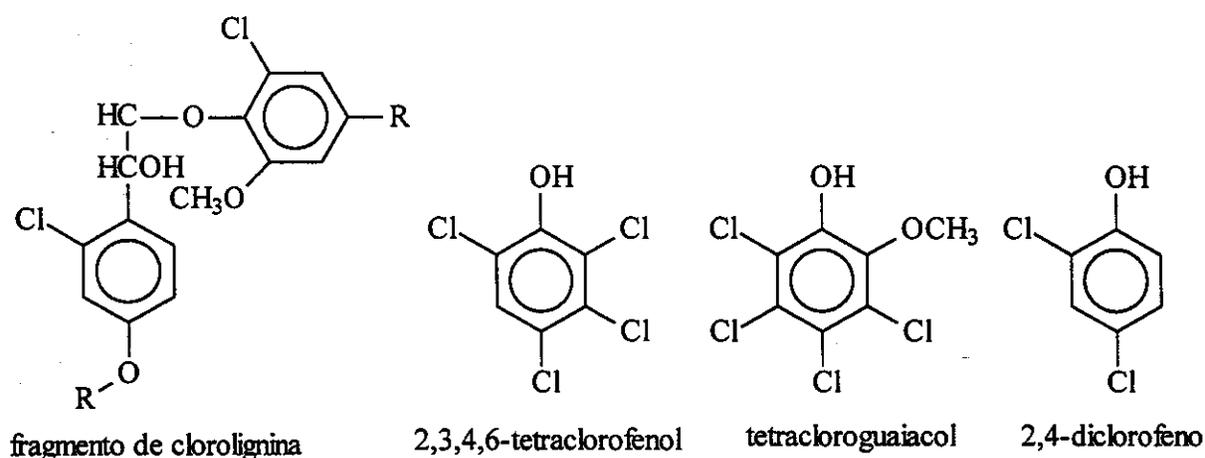


Figura 2.1 - Exemplos de compostos organoclorados presentes nos efluentes das indústrias papeleiras.

II.1.2 - PROCESSOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DE EFLUENTES

Devido à extrema complexidade dos efluentes industriais e a diversidade de compostos que podem ser encontrados nos mesmos, cada estudo de viabilidade de tratamento deve ser realizado de maneira isolada. Isto é, os processos desenvolvidos devem ser direcionados a um tipo particular de efluente, já que não existem procedimentos padronizados que possam ser aplicados no tratamento de um grande número de efluentes (Freire e col., 2000a). Em função deste fato, muitas alternativas têm sido estudadas. De maneira geral, procura-se uma alternativa que permita não somente a remoção das substâncias contaminantes,

mas sim a sua completa mineralização. A Figura 2.2 esquematiza, de uma maneira geral, os principais métodos de tratamento de efluentes industriais.

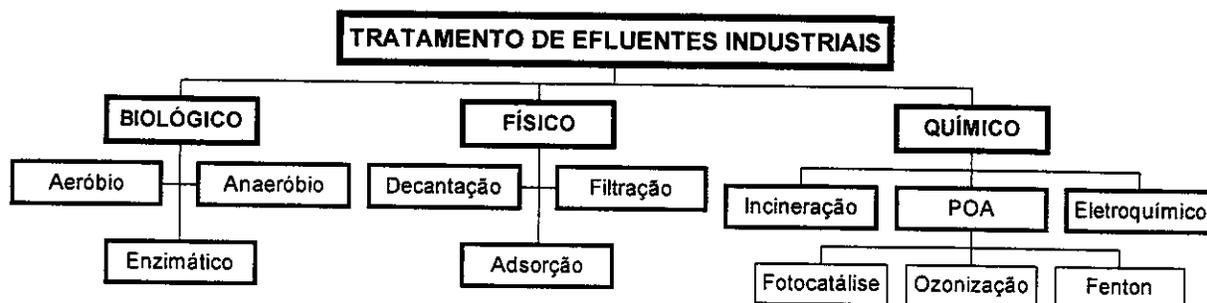


Figura 2.2 - Organograma das classes de tratamento de efluentes.
(POA = Processos Oxidativos Avançados).

II.1.2.1 - Processos Físicos

Os tratamentos físicos são caracterizados por processos de:

- separação de fases: sedimentação, decantação, filtração, centrifugação e flotação;
- transição de fases: destilação, evaporação, cristalização;
- transferência de fases: adsorção, "air-stripping", extração por solventes;
- separação molecular: hiperfiltração, ultrafiltração, osmose reversa, diálise.

De maneira geral, os procedimentos citados permitem uma depuração dos efluentes, entretanto, as substâncias contaminantes não são degradadas ou eliminadas, mas apenas transferidas para uma nova fase. Nestas novas fases, embora o volume seja significativamente reduzido, continua persistindo o problema, pois os poluentes encontram-se concentrados, sem serem efetivamente degradados.

Estudos sobre eliminação de clorofenóis em carbono ativado (Streat e col., 1995), de clorodioxinas em suporte Sephadex® (Takehita e col, 1995) e de cloroetanos em surfactantes (Boving e col., 1999), têm sido registrados. A eficiência destes sistemas mostra-se elevada, entretanto, problemas associados à

perda de atividade dos adsorventes, tornam os procedimentos pouco viáveis economicamente.

Apesar disto, a utilização dos métodos físicos como etapas de pré-tratamento ou polimento do processo final possui extrema importância em um tratamento efetivo. Neste sentido, a tecnologia de filtração com membranas vem demonstrando um grande potencial, principalmente no tratamento e reaproveitamento de águas residuais de processos industriais (Madaeni, 1999; Teodosiu e col., 1999; Silva e col., 1999; Alonso e col., 2001; Parameshwaran e col., 2001).

II.1.2.2 - Processos Biológicos

Os tratamentos baseados em processos biológicos são os mais freqüentemente utilizados, uma vez que permitem o tratamento de grandes volumes de efluente, transformando compostos orgânicos tóxicos em CO_2 e H_2O (ou CO_2 e CH_4), com custos relativamente baixos.

A capacidade de certos microrganismos para degradar substâncias orgânicas tóxicas é um fato bem documentado (Buitrón e Gonzáles, 1996). Em essência, o tratamento biológico fundamenta-se na utilização dos compostos tóxicos de interesse como substrato para o crescimento e a manutenção de microrganismos. Dependendo da natureza do acceptor de elétrons, os processos biológicos podem ser divididos em aeróbios ou anaeróbios. Nos aeróbios, que levam à formação de CO_2 e H_2O , o acceptor de elétrons é o oxigênio molecular. Nos anaeróbios, que degradam a CO_2 e CH_4 , o oxigênio molecular está ausente, sendo que algumas formas de carbono, enxofre e nitrogênio participam como aceptores de elétrons (ex. NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2).

A principal aplicação deste tipo de processo está orientada na remoção da matéria orgânica presente nos rejeitos industriais, usualmente medida na forma de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO) ou carbono orgânico total (COT) (Subramani e col., 1995). Nos últimos anos, o grande desenvolvimento da microbiologia tem propiciado muitas alternativas que viabilizam o tratamento biológico de efluentes industriais. Trabalhos recentes têm

reportado que uma gama de efluentes são tratáveis por meio destes processos (Orhon e col., 1999; Garg e Modi, 1999; Kaller e col., 1999; Gebara, 1999; Freire e col., 2001a; Bajpai e col., 2001; Barroca e col., 2001; Tezel e col., 2001; Hirata e col., 2001; Suvilampi e col., 2001; Thompson e col., 2001).

II.1.2.2.1 - Processos aeróbios

Este tipo de processo fundamenta-se na utilização de bactérias e fungos que requerem oxigênio molecular. As suas formas mais comuns de aplicação industrial estão representadas pelas lagoas aeradas e pelos sistemas de lodos ativados.

Nas lagoas aeradas, os efluentes são submetidos à ação de consórcios de organismos, muitas vezes de composição desconhecida, durante vários dias. Neste tipo de tratamento, a toxicidade aguda é removida com relativa facilidade. No entanto, outros parâmetros importantes, como cor e toxicidade crônica, não são eficientemente reduzidos. Além disto, alguns problemas associados com perdas de substratos tóxicos por volatilização e contaminação de lençóis freáticos por percolação (infiltração), são também bastante críticos.

O tratamento por lodos ativados talvez seja o sistema de bio-remediação mais versátil e eficiente. Este sistema opera com pouco substrato auxiliar e é capaz de remover a toxicidade crônica e aguda, com um menor tempo de tratamento. No lodo existe um grande número de espécies bacterianas, além de fungos, protozoários e outros microrganismos, que podem favorecer a redução de um grande número de compostos. Este tipo de processo, desenvolvido na Inglaterra no início do século XX, vem sendo utilizado nos mais diversos tipos de efluentes, inclusive no tratamento de esgotos sanitários (Bitton, 1994; Bajpai, 2001; Gapes e Keller, 2001; Hardy e col., 2001).

Na Figura 2.3 é mostrado um esquema simplificado de uma estação de tratamento por lodos ativados, que consiste basicamente de: 1) Tanque de aeração (I), onde ocorre a oxidação da matéria orgânica. Neste compartimento, o efluente é introduzido e misturado com o lodo ativado; 2) Tanque de sedimentação (II), este tanque é utilizado para sedimentação dos flocos microbiais, produzidos

durante a fase de oxidação no tanque de aeração.

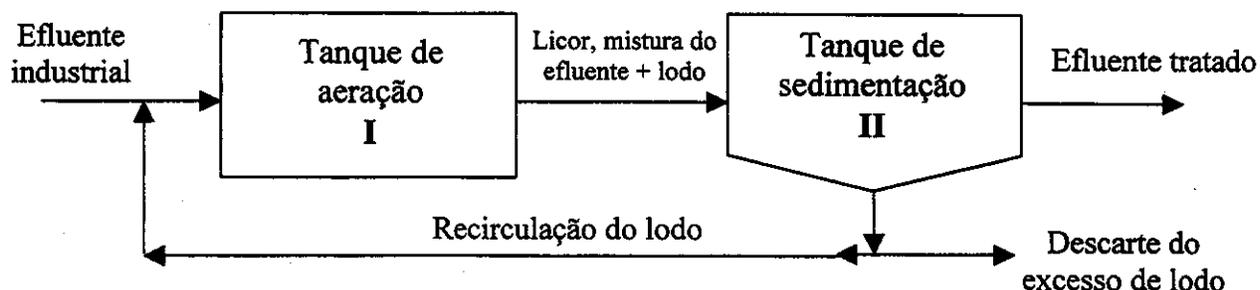


Figura 2.3 – Esquema convencional de tratamento por lodos ativados (Bitton, 1994).

Os flocos dos lodos ativados são constituídos, principalmente, de bactérias. Estima-se que existam mais de 300 espécies de bactérias no lodo que são responsáveis pela oxidação da matéria orgânica. Com a diminuição do nível de oxigênio no floco, que ocorre na fase de sedimentação, a atividade das bactérias aeróbias decresce. Como a região interna do floco é relativamente grande, a difusão do oxigênio é pequena, o que favorece o desenvolvimento de bactérias anaeróbias, como as metanogênicas. Assim, o processo por lodos ativados pode promover um tratamento mais apurado, combinando reações aeróbias e anaeróbias (Bitton, 1994).

Uma importante característica do sistema por lodos ativados é a recirculação de uma grande proporção de biomassa. Isto faz com que um grande número de microrganismos permaneça por um longo tempo de residência no meio, o que facilita o processo de oxidação dos compostos orgânicos, diminuindo o tempo de retenção do efluente.

Os principais inconvenientes associados ao tratamento biológico com lodos ativados são o alto custo de implementação e a formação de grandes quantidades de lodo (biomassa). Existe uma forte tendência pela reutilização desta biomassa como adubo. No entanto, alguns estudos mostraram uma grande capacidade

deste material para a adsorção de compostos orgânicos diversos, o que poderia inviabilizar esta utilização (Ning e col., 1998; Aksu e Yener, 2001). Jacobsen e colaboradores (1996), por exemplo, demonstraram que aproximadamente 50% do pentaclorofenol pode ser retido por adsorção nos lodos ativados, quando o período de tratamento é menor que 3 dias. Com maiores tempos de tratamento, a biodegradação acontece diminuindo à quantidade de material adsorvido.

Empregando o processo aeróbio, Commandeur e colaboradores (1995) estudaram a degradação de vários bifenilos policlorados utilizando o microrganismo *Alcaligenes sp.* Os resultados indicaram uma degradação da ordem de 95% para bifenílicos tetra, penta e hexa clorados, compostos que têm sido considerados como resistentes à degradação aeróbia. Contudo, a eliminação completa do cloro é considerada um evento fortuito, que depende das etapas metabólicas. Nagarathnamma e Bajdai (1999) utilizando o fungo *Rhizopus oryzae* conseguiram uma redução de 72% dos compostos organoclorados presentes no efluente papeleiro. Neste trabalho, também foi observada uma grande diminuição na toxicidade aguda. Ainda utilizando o efluente papeleiro, Kindaria e colaboradores (1995) obtiveram bons resultados na degradação de macromoléculas de clorolignina, empregando o fungo *Phanerochaete chrysosporium*. Com o fungo *Trametes villosa* foi observada uma degradação de cloroligninas, do efluente papeleiro da etapa de extração alcalina (E₁), na ordem de 70%, em 24 horas de tratamento (Soares e Durán, 1998). Alguns trabalhos clássicos nesta área foram publicados por Espósito e colaboradores (1991/1993).

Um dos graves problemas, associados ao tratamento aeróbio de efluentes, corresponde a perdas de substratos tóxicos por volatilização. Para contornar este inconveniente, pesquisadores têm desenvolvido sistemas de bio-reatores que operam com membranas (Dos Santos e Livingston, 1995; Rodgers, 1999; Edwards e col., 1999; Pressman e col., 2000; Burton, 2001). Sistemas deste tipo têm sido utilizados com sucesso no tratamento de efluentes contendo dicloroetano (Dos Santos e Livingston, 1995), clorofenóis (Wobus e col., 1995), tricloroetileno (Fitch e col., 1996), pentaclorofenol (Alleman e col., 1995), cloroguaicóis (Céspedes e col., 1996), tetracloreto de carbono (Van Eekert e col., 1998),

diclorofenol e clorobenzeno (Steinle e col., 1998; Edwards e col., 1999).

II.1.2.2.2 - Processos anaeróbios

A biodegradação sob condições anaeróbias tem sido objeto de muito interesse nos últimos anos, em função da capacidade de certas bactérias para transformar um grande número de compostos clorados em espécies menos tóxicas e mais susceptíveis à degradação posterior por microrganismos aeróbios (Susarla e col., 1996; Wilson e col., 1998; Distefano, 1999; Moody e Raman, 2001; Ramsay e Pullammanappallil, 2001; Annachatre e Amornkaew, 2001; Angenent e col., 2001). Nestes procedimentos, o processo de descloração de compostos orgânicos tem sido documentado, sendo o cloro removido e liberado na forma de cloreto, conforme esquematiza a Figura 2.4.

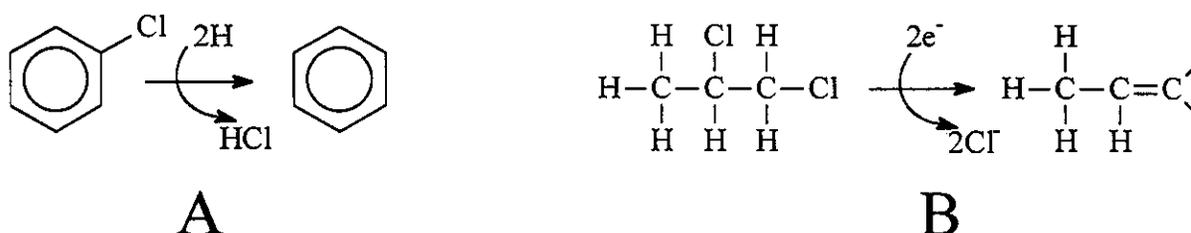


Figura 2.4 - Exemplos de dois processos pelos quais ocorre a descloração.
(A) hidrogenólise, (B) redução vicinal.

Susarla e colaboradores (1996) registraram a degradação de pentacloroanilina, hexaclorobenzeno e pentaclorofenol, por meio de um processo anaeróbio que utilizava um consórcio de bactérias presentes em sedimentos de rio. Processos similares têm sido aplicados na remediação de clorofórmio (Gupta e col., 1996), tetracloreto de carbono e tricloroetano (Doong e Wu, 1996), bifenilos policlorados (Pagano e col., 1995), clorofenóis (Duff e col., 1995) e compostos alifáticos clorados (Adamson e Parkin, 1999). Em todos os casos observou-se uma descloração seqüencial, o que permitiu uma significativa redução da toxicidade do efluente.

Tshantz e colaboradores (1995) propuseram a utilização de um reator anaeróbio, contendo uma espécie mutante da bactéria *Methylosinus trichosporium*, para a degradação de tricloroetileno (TCE). Os autores registraram uma degradação superior a 90% de um efluente contendo aproximadamente 3 mg L⁻¹ de TCE, em 4,5 horas de tratamento. Cabirol e colaboradores (1998) utilizando um consórcio metanogênico, também obtiveram sucesso no tratamento de tetracloroetileno.

A mais moderna tendência relacionada com o tratamento biológico de efluentes está representada pela utilização de processos anaeróbios-aeróbios alternados (Aggelis e col., 2001; Mulder e col., 2001; Gijzen, 2001; Tezel e col., 2001). Este sistema aumenta significativamente a eficiência do processo de tratamento, o que permite a redução do tamanho das estações e dos tempos de residência (Armenante e col., 1999; Panswad e Anan, 1999). Na Finlândia, por exemplo, vem sendo aplicado, com grande sucesso, um tratamento combinado deste tipo. Este procedimento, denominado Enso-Fenox, permite em 7 horas de operação a mesma redução de halogênios adsorvíveis alcançada em 7 dias de tratamento em lagoas aeróbias. No entanto, é importante salientar que o sistema não permite uma eficiente degradação de compostos de alta massa molar (Ek e Eriksson, 1989).

II.1.2.2.3 - Processos enzimáticos

Os processos enzimáticos correspondem a uma das mais recentes tecnologias para o tratamento biológico de efluentes (Durán e Espósito, 2000; Spiridon e Popa, 2000; Ibrahim e col., 2001). Dentro deste contexto, cabe às enzimas ligninolíticas (lignina peroxidase e manganês peroxidase) um papel de destaque, em função da sua capacidade para degradar um grande número de substâncias tóxicas e persistentes.

Obviamente, o emprego de processos enzimáticos somente será viável economicamente, se as enzimas forem immobilizadas em um suporte adequado. Estudos recentes têm mostrado uma grande potencialidade dos processos enzimáticos para a degradação de compostos presentes nos efluentes

provenientes da indústria papeleira. Dentre outros resultados, destaca-se a degradação de espécies derivadas do processo de branqueamento de polpa, utilizando-se lignina peroxidase (de *Phanerochaete chrysosporium*) imobilizada em resinas de troca iônica (Peralta-Zamora e col., 1998).

Bons resultados têm sido obtidos na imobilização de peroxidase de raiz forte e lignina peroxidase (de *Chrysonilia sitophila*) em Sepharose (Ferrer e col., 1991/1992; Dezotti e col., 1995) e lacase em alginato (Davis e Burns, 1994). Este último estudo reporta uma eficiência significativamente maior dos sistemas enzimáticos imobilizados. Polifenoloxidasas e peroxidases imobilizadas também têm-se mostradas eficientes no tratamento de clorofenóis (Aitken e col., 1994; Edwards e col., 1999; Guerra e col., 2000).

II.1.2.3 - Tratamento Químico - Processos Oxidativos Avançados (POA)

Os tratamentos químicos vêm apresentando uma enorme aplicabilidade em sistemas de depuração ambiental, como purificação de ar, desinfecção e purificação de água e efluentes industriais (Hoffmann e col., 1995; Alnaizy e Akgerman, 2000; Gunukula e Tittlebaum, 2001; Acero e col., 2001; Chen e col., 2001).

Dentre os processos químicos de eliminação de compostos poluentes há métodos bastante discutíveis como, por exemplo, a precipitação e a incineração. A precipitação, assim como os métodos físicos, promove somente uma mudança de fase dos compostos, não eliminando completamente o problema ambiental.

A incineração constitui-se como um dos procedimentos mais clássicos para a degradação de resíduos e espécies contaminantes, principalmente de organoclorados. No entanto, a sua utilidade é muito duvidosa porque, além de ser muito cara, pode levar à formação de compostos mais tóxicos que o próprio efluente, tipicamente dioxinas e furanos. A formação de dibenzo-p-dioxinas e dibenzofuranos policlorados em processos de incineração de resíduos domésticos é um fato bastante documentado (Harnly e col., 1995; Cains e col., 1997; Addink e col., 1998 a/b).

Em função da crescente necessidade de procedimentos que apresentem

uma maior eficiência no tratamento de efluentes, várias técnicas têm sido testadas nas últimas décadas. Os processos mais eficazes, denominados por Processos Oxidativos Avançados (POA), têm servido de alternativa para tratamento de compostos orgânicos recalcitrantes. Os POA são baseados na geração do radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) que tem alto poder oxidante e pode promover a degradação de vários compostos poluentes em poucos minutos (Hirvonen e col., 1996; Vinodgopal e col., 1998).

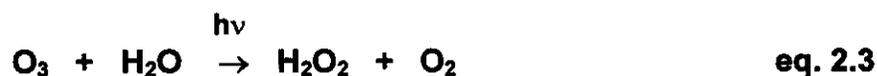
Vários processos de produção do radical hidroxila têm sido estudados, geralmente utilizando ozônio, peróxido de hidrogênio, fotocatalise e o Reagente de Fenton.

O ozônio, por ser um forte agente oxidante, é muito utilizado em processos de degradação de compostos orgânicos. O ozônio pode reagir via dois mecanismos: reação direta (eletrofílica ou por cicloadição) e reação indireta, por meio do radical livre hidroxila ($\cdot\text{OH}$) formado pela decomposição do ozônio (Masten e Davis, 1994, Freire e col., 2000a), conforme mostram as equações 2.1 e 2.2:



A reação indireta é muito mais eficiente porque o potencial de oxidação do radical hidroxila ($E^\circ \cong +3,06 \text{ V}$) é mais elevado que o do ozônio molecular ($E^\circ \cong +2,07 \text{ V}$), podendo assim promover uma oxidação mais enérgica. Além do mais, as reações com ozônio molecular tendem a ser seletivas (ataque a centros nucleofílicos), enquanto que os radicais hidroxila, como a maioria das reações radicalares, não reagem seletivamente (Stockinger e col., 1995). Desta forma, o emprego do ozônio por via indireta é muito mais versátil, sendo a tendência apresentada na literatura recente (Beltran-Heredia e col., 2001a; Freire e col., 2001b); Trapido e col., 2001).

Na presença de radiação ultravioleta (UV), o ozônio também pode formar o radical hidroxila, equações 2.3 e 2.4:



Utilizando este processo, Freshour e colaboradores (1996) estudaram a degradação de uma mistura de compostos organoclorados, observando, por exemplo, uma completa degradação de pentaclorofenol em tempos de reação da ordem de 30 minutos. Hautaniemi e colaboradores (1998) também obtiveram resultados com o mesmo grau de eficiência empregando esta técnica no tratamento de uma série de clorofenóis.

O radical hidroxila também pode ser obtido a partir de uma mistura de ozônio e peróxido de hidrogênio, na ausência ($\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$) ou presença de radiação ultravioleta ($\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$), ou simplesmente utilizando-se um meio fortemente alcalino (O_3/pH elevado). Masten e Davis (1994) sugeriram que o método $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ era o processo mais promissor, por ser o que melhor se adaptaria ao uso em tratamento de efluentes industriais. Sunder e Hempel (1997) utilizando $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, obtiveram a completa mineralização de tricloroeteno e percloroeteno.

Utilizando-se peróxido de hidrogênio e radiação UV, também têm sido verificada a geração de radicais hidroxila e a decomposição de vários poluentes orgânicos (Liao e Gurol, 1995; Ince e col., 1997; Dewulf e col., 2001; Muller e Jekel, 2001). A equação geral 2.4 exemplifica a formação do radical hidroxila.

Por meio deste método, Shen e colaboradores (1995) estudaram a eficiência da decomposição de vários clorofenóis e verificaram que a substância 2-clorofenol, por exemplo, foi degradada em quase 100%, com 1 hora de tratamento.

Uma outra maneira de produzir radicais hidroxilas é a partir de uma mistura de peróxido de hidrogênio e sais ferrosos (Engwall e col., 1999; Huston e Pignatello, 1999; Kwon e col., 1999; Nogueira e Guimarães, 2000; Bin e col., 2001; Barbusinki e Filipek, 2001; Chamarro e col., 2001). Esta mistura é conhecida por "Reagente de Fenton", por ter sido Fenton quem observou esta reação, equação

2.5, pela primeira vez.



Lin e Gurol (1996) estudando a degradação de compostos organoclorados, concluíram que este processo tem vantagens significativas sobre outros métodos de oxidação como $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ e O_3/UV , principalmente quando empregado em valores baixos de pH. No entanto, a necessidade de um processo adicional para separar precipitados coloidais de hidróxido férrico e a necessidade de operar em baixos valores de pH limitam bastante a sua aplicabilidade.

Um outro POA de extrema importância dentro do contexto das novas alternativas para a degradação de poluentes é a fotocatalise heterogênea. Trata-se de um processo fotoquímico em que uma espécie semicondutora é irradiada para a promoção de um elétron da banda de valência (BV) para a banda de condução (BC). A região entre as duas bandas é denominada "bandgap", conforme mostra esquematicamente a Figura 2.5. Com o elétron promovido para a BC e com a lacuna (h^+) gerada na BV, criam-se sítios redutores e oxidantes capazes de catalisar reações químicas, que podem ser utilizadas no tratamento de efluentes industriais. A degradação dá-se por meio da oxidação da matéria orgânica que pode ser conduzida até CO_2 e H_2O .

O dióxido de titânio é o semicondutor mais utilizado em processos fotocatalíticos, principalmente devido a várias características favoráveis, dentre os quais se destacam: possibilidade de ativação por luz solar, insolubilidade em água, estabilidade química numa ampla faixa de pH, possibilidade de imobilização em sólidos, baixo custo e ausência de toxicidade. Por estas razões, o TiO_2 tornou-se um dos semicondutores mais utilizados na fotodegradação de compostos orgânicos (D'Oliveira e col., 1991; Hoffmann e col., 1995; Linsebigler e col., 1995; Ziolli e Jardim, 1998; Chen e col., 1999a; Wang e Hong, 1999; Babay e col., 2001; Vione e col., 2001; Cavicchioli e Gutz, 2001; Vohra e Tanaka, 2002). Entretanto, muitos outros semicondutores, como CdS , ZnO , WO_3 , ZnS e Fe_2O_3 , podem agir como sensibilizadores de processos de oxidação e redução mediados pela luz (Reutergardh e langphasuk, 1997; Wang e col., 1998; Yeber e col., 1999; Wilcoxon e col., 1999; Poullos e Tsachpinis, 1999; Kang e col., 1999; Sakthivel e col., 2001;

Santato e col., 2001; Domenech e col., 2001).

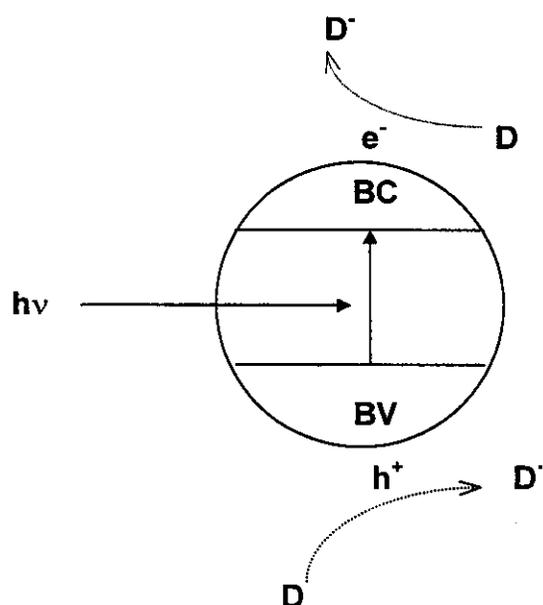


Figura 2.5 - Princípios eletrônicos de um processo fotoquímico. BV: Banda de valência ; BC: banda de condução; e^- : elétron; h^+ : lacuna; $h\nu$: radiação (UV); D: substrato orgânico; D^- : espécie reduzida, D^+ : espécie oxidada.

Muitos estudos práticos com o TiO_2 têm sido desenvolvidos, mas seu mecanismo de reação ainda não é totalmente compreendido. Contudo, há passos do mecanismo em que a maioria dos pesquisadores concorda, tais como: a excitação da espécie semicondutora e a conseqüente formação dos pares h^+_{BV} e e^-_{BC} ; o processo de recombinação entre estas espécies; a adsorção de O_2 , H_2O e espécies orgânicas na superfície do semicondutor; “trapping” em que espécies químicas doam ou recebem elétrons do par e^-/h^+ . Acredita-se também, que o O_2 é a principal espécie responsável em dar continuidade às reações iniciadas no processo de foto-oxidação, reagindo com o radical orgânico formado e levando-o à completa mineralização (Choi e Hoffmann, 1997; Chen e col., 1999b).

O processo fotocatalítico de oxidação por via direta dá-se quando a lacuna fotogerada na banda de valência do semicondutor reage diretamente com o composto orgânico (Hoffmann e col., 1995), equação 2.6.



Já o processo de oxidação indireto ocorre quando a lacuna fotoegerada na banda de valência reage com a molécula de H₂O adsorvida na superfície do semiconductor, produzindo o radical hidroxila, que vai oxidar a matéria orgânica (Hoffmann e col., 1995; Linsebigler e col., 1995; Choi e Hoffmann, 1997), equação 2.7.



O processo fotocatalítico quando utilizado no tratamento de compostos orgânicos, tem demonstrado eficiência para degradar inúmeras substâncias recalcitrantes ao tratamento biológico. Em função disto, nas últimas duas décadas foi publicado uma infinidade de artigos demonstrando a aplicação desta técnica, assim como de várias combinações dos diferentes processos oxidativos avançados.

Tanaka e colaboradores (1996) fizeram uma comparação entre os POA: UV/TiO₂/O₃; UV/O₃; UV/TiO₂, na degradação do inseticida dimetil-2,2,2-tricloro-1-hidroxietilfosfato, e das substâncias ácido monocloroacético e fenol. Concluíram que o processo UV/TiO₂/O₃ foi o mais rápido para degradar e para eliminar o carbono orgânico total das respectivas soluções. Trillas e colaboradores (1996) também demonstraram a eficiência destes métodos na remoção de clorofenóis. Resultados similares foram obtidos por Wenzel e colaboradores (1999).

Echigo e colaboradores (1996) fizeram uma comparação entre os processos oxidativos avançados O₃/UV, O₃/H₂O₂, UV e O₃ no tratamento de alguns triésteres organofosfóricos (OPE), para verificar qual dos métodos apresentaria maior eficiência na decomposição de algumas substâncias consideradas tóxicas. Para esta experiência escolheram os seguintes OPE: tris(1,3-dicloro-2-propil)fosfato (TDCPP, (C₃H₄Cl₂O)₃PO); tris(2-cloroetil)fosfato (TCEP, (ClCH₂CH₂O)₃PO) e tris(butoxietil)fosfato (TBXP, (C₄H₉OC₂H₄O)₃PO). Estas substâncias foram selecionadas porque são recalcitrantes aos tratamentos

biológicas e mutagênicas. Os autores concluíram que os processos combinados apresentaram-se mais apropriados para a degradação destes tipos de compostos.

Hirvonen e colaboradores (1996) também fizeram uma comparação entre dois métodos oxidativos avançados (UV/H_2O_2 ; O_3/H_2O_2) para a redução de tricloroetileno (TCE) e tetracloroetileno (PCE), compostos contaminantes que têm sido detectados em água potável. Os pesquisadores comprovaram que, utilizando-se os POA, ocorre um alto nível de redução dos compostos TCE (96%) e PCE (92%) pelo método O_3/H_2O_2 e TCE (98%) e PCE (93%) pelo método UV/H_2O_2 em condições similares. Ito e colaboradores (1998) compararam a eficiência dos processos $O_3/H_2O_2/UV$; O_3/H_2O_2 ; O_3/UV ; O_3 e UV na degradação de triclorometanos e concluíram que o ozônio sozinho não foi efetivo na mineralização destes compostos. Contudo, todos os métodos estudados aumentaram a biodegradabilidade deste composto. Isto também foi observado combinando processos fotoquímicos e biológicos (Durán e col., 1994; Reyes e col., 1998).

Pesquisas recentes têm apontado para o emprego de processos combinados, fazendo uso das vantagens de diferentes métodos (Levine e col., 2000; Lee e col., 2001; Rodrigues e col., 2001; Turan-Ertas, 2001). Os tratamentos químicos podem ser utilizados para aumentar a biodegradabilidade de compostos recalcitrantes, diminuindo o tempo de tratamento dos tradicionais processos biológicos. Stockinger e colaboradores (1995), por exemplo, observaram que um pré-tratamento com ozônio em um efluente de indústria química incrementou a biodegradabilidade e possibilitou a total mineralização de compostos cloro e nitro aromáticos. Resultados similares foram obtidos por Skadberg e colaboradores (1999), utilizando um sistema de degradação bioeletroquímico.

II.1.2.4 - Tratamento Eletroquímico

A eletroquímica pode oferecer opções viáveis para remediar problemas ambientais, particularmente de efluentes aquosos. A tecnologia eletrolítica é capaz de oxidar ou reduzir íons metálicos, cianetos, compostos organoclorados, hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos (Eric, 1998). Neste processo o elétron é o

principal reagente, evitando o uso de outros compostos químicos que podem ser tóxicos (Boudenne e Cerclier, 1999).

O processo eletroquímico baseia-se na aplicação de um potencial capaz de oxidar ou reduzir substratos de interesse. A eletro-oxidação direta de compostos orgânicos ocorre, muitas vezes, em potenciais altos (Eric, 1998) e, em meio aquoso, a reação de evolução de oxigênio é um caminho competitivo com a degradação. Semicondutores imobilizados em eletrodos têm sido empregados para diminuir esta competição. Vários semicondutores, entre eles SnO_2 , têm apresentado excelente eficácia eletroquímica quando empregados como elemento modificador de eletrodos, por apresentarem alta condutividade e estabilidade em soluções aquosas ácida, neutra ou básica (Lipp e Pletcher, 1997).

No caso de oxidação indireta, a reação ocorre com espécies que são geradas eletroquimicamente e que são capazes de oxidar os poluentes orgânicos na solução. Algumas espécies com forte poder oxidante, como O_3 e H_2O_2 , têm sido detectadas nos processos eletroquímicos (Vlyssides e Israilides, 1997), ou deliberadamente produzidas (Pletcher e De Leon, 1995). Pesquisas recentes têm verificado que ânodos de Ti modificado com PbO_2 favorecem a produção de altas concentrações de ozônio (Amadelli e col., 1998); e que cátodos de carbono e de platina são muito eficientes para produzir peróxido de hidrogênio (Vlyssides e Israilides, 1997; Hall e Khundaish, 1998a/b, Pelegrini e col., 2000; Pelegrini e col., 2001).

Utilizando o tratamento eletroquímico, Zhang e Rusling (1995) demonstraram a eficiência do método para remoção de cloro em compostos bifenílicos policlorados e também para diminuir a toxicidade destas espécies. Polcaro e colaboradores (1999) também obtiveram uma boa eficiência na remoção de 2-clorofenol de efluentes industriais.

II.1.2.5 - Outros Métodos de Tratamento

Uma outra técnica que também vem sendo estudada para a degradação de várias espécies orgânicas poluentes em efluentes é o processo de oxidação por meio de ultra-som, que provoca a clivagem da molécula de água com formação de

radicais hidroxila (Vinodgopal e col., 1998; Petrier e col., 1998; David e col., 1998; Drijvers e col., 1999; Adewuyi, 2001).

Chang e colaboradores (1996) estudaram a eficiência do método para a decomposição de 2-clorofenol. Os autores observaram que 99% do composto havia sido degradado, mas a remoção de carbono orgânico total foi apenas de 63% em 360 minutos de tratamento, e os compostos intermediários formados a partir do 2-clorofenol também não foram completamente mineralizados pelo processo. A dificuldade técnica de implementação, a baixa eficiência na remoção de carga orgânica e os longos tempos de tratamento tornam este processo pouco atraente.

O tratamento com raios gama, emitidos por cobalto radioativo, tem sido testado para a destruição de compostos organoclorados presentes em sólidos e em efluentes (Schmelling e col., 1998). O processo de degradação dos poluentes pode ocorrer por dois caminhos: por degradação direta (efeito provocado pela radiação gama) ou por degradação indireta por meio de radicais hidroxilas criados pela decomposição da água (Hilarides e col., 1996). Taghipour e Evans (1996), tratando efluentes do processo Kraft, conseguiram uma redução dos compostos clorados adsorvíveis em 96% com uma dosagem de 10 kGy de irradiação. Hilarides e colaboradores (1996), estudando a degradação do composto 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina em amostras sólidas, observaram uma redução em 99% com uma dosagem de 800 kGy de irradiação. Estes dois trabalhos parecem apresentar uma alta eficiência de degradação de compostos organoclorados, apesar de não esclarecerem se o processo é capaz de levar a mineralização dos compostos.

II.1.3 – JUSTIFICATIVA

Os métodos biológicos são os mais utilizados no tratamento de efluentes industriais, dentre os quais o da indústria de papel e celulose. Entretanto, estes métodos apresentam alguns inconvenientes, tais como: (1) necessidade de uma

grande área territorial para sua implementação, principalmente para os métodos aeróbios; (2) dificuldade no controle da população de microrganismos, que requer um rigoroso acompanhamento das condições ótimas de pH, temperatura e nutrientes. Variações no meio podem provocar alterações no metabolismo dos microrganismos ou, ainda, a aclimação de um consórcio microbiano a determinados compostos pode promover diferentes possibilidades de transformação; (3) necessidade de um tempo relativamente longo para que os efluentes atinjam os padrões exigidos; (4) além de que discretas diferenças na estrutura dos compostos, ou na composição dos efluentes, são bastante significativas para o bom funcionamento de um determinado sistema biológico. Devido a isto, um consórcio de microrganismos pode não reconhecer uma certa substância e não degradá-la, ou ainda, pode levá-la a produtos mais tóxicos.

Por outro lado, os métodos químicos, principalmente os processos oxidativos avançados, apresentam-se como uma das tecnologias de degradação de poluentes mais promissoras. Contudo, a utilização destes processos para a remediação de efluentes da indústria papeleira ainda é pouco estudada (Balcioglu e Arslan, 1998; Weber e LeBoeuf, 1999; Thompson e col., 2001). Geralmente os trabalhos que empregam este tipo de processo estudam a degradação de compostos poluentes de forma isolada, ou seja, compostos modelos sintéticos. Assim, estudar a aplicabilidade dos processos oxidativos avançados no tratamento de matrizes reais complexas (tal como, o efluente papeleiro Kraft E1) é tema de extrema relevância e atualidade.

II.2 –OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O presente trabalho teve como um dos principais objetivos o emprego de diferentes processos oxidativos avançados na remediação do efluente papeleiro. Tal estudo foi efetuado empregando-se os processos: 1) $O_3/pH11$; 2) $O_3/pH3$; 3) $O_3/H_2O_2/pH11$; 4) $O_3/UV/pH11$; 5) $UV/TiO_2/O_2$; 6) $UV/ZnO/O_2$; 7) UV/H_2O_2 ; 8) $UV/ZnO/H_2O_2$; 9) $UV/ZnO/O_3$; 10) Eletroquímico e 11) Fotoeletroquímico.

Como meta específica avaliou-se diferentes processos de tratamento, buscando-se métodos que apresentassem a maior redução dos parâmetros de avaliação, no menor tempo de tratamento e com o menor custo.

Os parâmetros de avaliação empregados foram a redução da:

- a) coloração: os efluentes resultantes do processo de branqueamento são fortemente coloridos, podendo causar interferência no processo de fotossíntese do ecossistema do corpo d'água receptor;
- b) concentração de fenóis totais: fenóis e especialmente clorofenóis são poluentes altamente perigosos, devido sua alta toxicidade e persistência no meio ambiente. De acordo com a Cetesb e a EPA (Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana) fenóis e seus derivados clorados, nitrados e alquilados, são classificados como poluentes prioritários;
- c) concentração de carbono orgânico total: tal como discutido anteriormente, de um modo geral, procura-se uma alternativa que permita, não somente a remoção das substâncias contaminantes, mas sim a sua completa mineralização;
- d) toxicidade: o desaparecimento de espécies químicas consideradas poluentes nem sempre é um critério seguro, outras espécies também muito tóxicas podem ser geradas durante o tratamento. Várias pesquisas têm observado uma rápida transformação de compostos tóxicos, mas com o aparecimento de substâncias com poder de mutagenicidade muito maior que os compostos originais (Archibald e col., 1998).

Ainda como objetivos específicos, buscou-se:

- Estudar a degradação do efluente papeleiro Kraft E₁ por meio do processo de ozonização, avaliando a eficiência deste processo em: meio alcalino, meio ácido; presença de radiação ultravioleta e de peróxido de hidrogênio.
- Estudar a degradação do efluente papeleiro Kraft E₁ empregando-se processos fotoquímicos, avaliando a cinética de degradação dos parâmetros de avaliação utilizando ZnO e TiO₂ como fotocatalisadores, os processos UV/H₂O₂, UV/ZnO/H₂O₂ e fotocatalítico-ozonização combinados.
- Avaliar o emprego dos processos eletroquímico e fotoeletroquímico na degradação de fenol e dos compostos orgânicos presentes no efluente papeleiro;
- Avaliar a toxicidade do efluente papeleiro frente à bactéria *Escherichia coli* e frente à alga *Selenastrum capricornutum*;
- Avaliar a eficiência dos diferentes processos de remediação estudados, empregando-se parâmetros cinéticos, tais como as constantes de velocidade;
- Avaliar os custos de tratamento para cada processo;

II.3 - METODOLOGIA

II.3.1 - EFLUENTE PAPELEIRO

O efluente papeleiro Kraft E1 foi coletado junto a uma indústria localizada na região de Campinas e estocado a 4 °C. As características iniciais dos efluentes, coletados ao longo deste estudo, são mostradas na Tabela 2.1. O efluente foi empregado em todos os processos de remediação sem nenhuma etapa prévia de filtração ou outro tipo de tratamento.

Tabela 2.1 – Faixa de valores observados para os parâmetros de avaliação do efluente papeleiro Kraft E1 bruto. Valores médios para diferentes amostras coletadas.

Cor (absorbância, $\lambda=465$ nm)	pH	COT (mg L ⁻¹)	Fenóis Totais (mg L ⁻¹)	Toxicidade <i>E.coli</i> (% inibição)
0,640 - 0,780	10,0 - 12,0	800 - 1400	20 - 45	40 - 70

II.3.2 - CONTROLE ANALÍTICO

II.3.2.1 – Determinação de carbono orgânico total (COT)

As medidas da concentração de carbono orgânico total foram realizadas seguindo-se a metodologia padrão (ISO 8245, 1987), que se baseia na oxidação da matéria orgânica catalisada a alta temperatura, empregando-se um analisador de carbono orgânico total marca Shimadzu TOC-5000. Neste método uma microporção homogeneizada da amostra é injetada em uma câmara de reação aquecida, contendo platina adsorvida sobre óxido de alumínio. A água é vaporizada e o carbono da amostra é oxidado a CO₂, sendo quantificado por meio de um analisador de infravermelho não dispersivo. O carbono inorgânico é medido injetando-se a amostra em uma câmara de reação que contém ácido fosfórico, sob estas condições o carbono inorgânico é convertido a CO₂ e quantificado de maneira semelhante à descrita anteriormente. O carbono orgânico total é então obtido pela diferença entre o carbono total e o carbono inorgânico.

II.3.2.2 – Determinação de cor

A remoção de cor do efluente papeleiro foi avaliada pela diminuição da absorção de acordo com o procedimento descrito no método CCPA (CCPA, 1975), empregando um espectrofotômetro Hitachi modelo U-2000. O comprimento de onda foi determinado pela absorção máxima do efluente na região do visível (465 nm) em pH 7,6. Neste procedimento foram utilizados 1 mL de amostra (efluente bruto ou tratado) e 1 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,6.

II.3.2.3 – Determinação de fenóis totais

A concentração de fenóis totais no efluente foi determinada colorimetricamente, conforme procedimento padrão de Folin-Ciocalteu (APHA 1989). O método baseia-se na reação entre o reagente Folin-Ciocalteu (uma mistura de heteropoliácidos fosfomolibdico e fosfotungstico) e fenóis. Os produtos da oxidação resultantes formam um complexo azul com molibdênio e tungstênio.

Neste teste foram utilizados 1 mL de amostra (efluente bruto ou tratado), 250 µL do tampão carbonato-tartarato e 25 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (Aldrich, EUA), esta mistura foi deixada em repouso por 30 minutos a 20 °C. Após este tempo, as absorbâncias das amostras foram monitoradas empregando-se um espectrofotômetro Hitachi modelo U-2000, em comprimento de onda de 700 nm.

II.3.2.4 – Determinação do pH

As medidas de pH foram feitas no aparelho Controller Model 5997-60, e também no pHmetro portátil WTW pH 320/Set – 1, utilizando-se um eletrodo de vidro combinado modelo SEM TIX 97T.

II.3.3 – TESTE DE TOXICIDADE FRENTE À BACTÉRIA *Escherichia coli*

II.3.3.1 - Cultura da bactéria

Como organismo indicador foi utilizada a bactéria *E. coli* (ATCC 25922), adquirida junto à coleção de culturas da Fundação Tropical André Tosello,

localizada em Campinas/SP. A cultura liofilizada da bactéria foi transferida, sob condições estéreis, para um tubo de ensaio contendo o meio de cultura, conforme descrito na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Composição do meio de cultura para crescimento da bactéria *E. coli*.

Reagentes	Concentração (g L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	7,0
KH ₂ PO ₄	3,0
Citrato de sódio	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄ .H ₂ O	0,2
Glicose	20,0

A cultura foi mantida a 37 °C por 24 horas. Após este período repicou-se a bactéria em placas com meio sólido (ágar-sangue), e as placas foram colocadas em estufa por 48 horas. Estas placas foram armazenadas em refrigerador (tempo de meia-vida de 15 dias). Para a realização de cada experimento, após cultivo em meio sólido, a *E. coli* foi inoculada em meio líquido e incubada a 37 °C por 24 horas. Após este período, o meio de cultura apresentou-se turvo, denotando o crescimento bacteriano, o qual foi então utilizado como inóculo para o teste de toxicidade.

II.3.3.2 - Preparação do meio de cultura

Todos os reagentes da Tabela 2.2 (com exceção da glicose) foram diluídos em aproximadamente 800 mL de água deionizada, o pH foi ajustado para 7,2 com KOH (2 lentilhas) e o meio de cultura foi esterilizado. A glicose foi diluída em 200 mL de água deionizada e esta solução também foi esterilizada. Após resfriamento, as soluções foram misturadas em condições estéreis e armazenadas sob refrigeração até sua utilização.

II.3.3.3 - Monitoramento do CO₂ pelo sistema de análise em fluxo com detecção condutométrica

Primeiramente, foram preparados 100 mL de uma solução estoque (100 mmol L⁻¹) de Na₂CO₃ (previamente seco em estufa a 120 °C por 1 hora). Em seguida, preparou-se, a partir da solução estoque, soluções com concentrações de 0,25; 0,5 ; 1,0 ; 2,0 e 3,0 mmol L⁻¹ de Na₂CO₃. Estas soluções foram injetadas no sistema FIA/conduítmétrico para obtenção da curva de calibração.

Um volume determinado de amostra (135 µL), contendo as espécies carbônicas (CO₂, HCO₃⁻ e CO₃⁻²), foi injetado num fluxo carregador (água deionizada), o qual confluía com um fluxo de ácido sulfúrico diluído (0,5 % v/v). O meio ácido desloca o equilíbrio no sentido da formação do CO₂, de acordo com a equação 2.8:



O CO₂ formado no meio ácido foi conduzido a uma cela de difusão, onde atingiu um fluxo de água deionizada, após permear através de uma membrana de Teflon[®], deslocando o equilíbrio para a formação dos íons bicarbonato e carbonato. A condutividade do fluido foi monitorada constantemente sofrendo alteração em função do CO₂ presente na amostra. A mudança na condutância foi proporcional à concentração total de CO₂ presente na amostra.

II.3.3.4 - Realização do ensaio

Bactérias têm um ciclo de vida relativamente curto e respondem rapidamente à mudanças no ambiente. O CO₂ que participa ativamente do metabolismo microbiano, principalmente como produto de respiração, pode ser utilizado como parâmetro no monitoramento da atividade metabólica de microrganismos (Guimarães, 1990; Moraes, 1995).

O meio de cultura foi inoculado com a bactéria *E. coli* (organismo teste) e a concentração de CO₂ produzido pela respiração microbiana foi monitorada até atingir 0,5 mmolL⁻¹, que correspondem a aproximadamente 9 x 10⁸ células de *E. coli* por mL. O meio foi mantido em banho termostático a 37 °C. Alíquotas de

45 mL deste meio foram transferidas para Erlenmeyers de 125 mL e contaminadas com 5 mL da amostra (alíquotas retiradas dos diferentes tratamentos e do efluente bruto). O pH das alíquotas foi previamente ajustado para 7,0. Paralelamente, foi monitorado um controle do crescimento bacteriano, onde adicionou-se 5 mL de água destilada ao invés da amostra. A concentração de CO₂ nos diversos frascos foi obtida pela interpolação dos dados na curva de calibração. As determinações foram feitas a cada 20 minutos, finalizando o experimento após 2 horas (Jardim e col., 1990; Guimarães, 1990; Moraes, 1995).

Uma solução de tetraciclina (5µg mL⁻¹) foi utilizada como padrão positivo do teste, esta solução apresentou uma inibição de aproximadamente 40% na respiração da bactéria em relação ao controle (Durán e col., 1998).

II.3.4 – TESTE DE TOXICIDADE FRENTE A ALGA *Selenastrum capricornutum*

II.3.4.1 - Cultura da alga

Como organismo indicador foi utilizada a alga verde de água doce *Selenastrum capricornutum* (Reginatto, 1998; ISO 8692), adquirida da coleção de culturas de algas da EMBRAPA, localizada em Jaguariúna/SP.

A cultura da alga, recebida em meio sólido (Agar 2%), foi transferida, com auxílio de alça de platina, sob condições estéreis, para um Erlenmeyer de 125 mL contendo meio de cultura. A composição final do meio de cultura foi preparada misturando-se as soluções estoque conforme mostra a Tabela 2.3. A constituição das soluções estoque dos nutrientes é apresentada na Tabela 2.4. As soluções estoque foram autoclavadas a 120 °C por 20 minutos e estocadas no escuro a 4 °C. A pré-cultura foi mantida, durante 14 dias, sob agitação e temperatura constantes (110 rpm; 23 °C), e sob intensidade luminosa entre 4000 e 6000 Lux. Após este período, transferiu-se 1 mL da pré-cultura, em condições estéreis, para um Erlenmeyer de 125 ml contendo 30 mL do meio de cultura, para servir de inóculo para uma nova cultura. O período de crescimento foi de 2 a 4 dias, sob as mesmas condições da pré-cultura e esta nova cultura foi utilizada como inóculo para a realização do ensaio de toxicidade. A suspensão de algas foi diluída,

quando necessário, para obter a concentração de alga desejada para o inóculo das amostras (absorbância de 0,160 em 680 nm).

Tabela 2.3 - Composição da solução de nutrientes utilizada para o cultivo da alga *S. capricornutum*.

Volumes de soluções-estoque (mL)									2O destilada (mL)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	
10,0	10,0	0,0	10,0	10,0	10,0	0,0	10,0	1,0	919,0

Tabela 2.4 - Soluções estoque dos nutrientes utilizados para o cultivo da alga *S. capricornutum*.

Solução	Nutriente	Concentração (g L ⁻¹)
1	MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5
2	NaNO ₃	50,0
3	NH ₄ NO ₃	33,0
4	K ₂ H PO ₄ .3H ₂ O	5,2
5	CaCl ₂ .2H ₂ O	3,5
6	Na ₂ CO ₃ .10H ₂ O	5,4
7	Citrato férrico	0,6
8	Ácido cítrico monohidratado	0,6
9	Solução de elementos traço:	
	H ₃ BO ₃	2,90
	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
	Cloreto de zinco	0,11
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08
	(NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,018

II.3.4.2 - Condições do ensaio

As vidrarias utilizadas durante os ensaios foram previamente lavadas com HCl 10 % e enxaguadas com água deionizada, para a remoção total de traços de nutrientes.

Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyers de 125 mL, aos quais foram adicionados: 1) a amostra em diferentes diluições, conforme mostra a tabela 2.5; 2) o meio de cultura e 3) e algas numa concentração de 10^6 células mL⁻¹, determinadas pela absorbância em 680 nm (máximo de absorção da clorofila) correspondente a 0,160. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada diluição da amostra, sendo que o volume final em todos os frascos foi de 30,0 mL. Para cada diluição, amostras controle também foram incubadas com a mesma constituição, no entanto, sem adição da alga. Um controle para comparação do crescimento da alga nas diluições também foi incubado em triplicata, sendo este constituído de 26 mL de água destilada, 3 ml do meio de cultura e 1 mL de inóculo da alga.

As concentrações iniciais de alga em cada frasco Erlenmeyer foram determinadas logo após a preparação do inóculo. Os frascos foram posteriormente incubados à temperatura de 23°C e sob agitação constante (100 rpm).

Tabela 2.5 - Esquema para a realização do ensaio de toxicidade com a alga *S. capricornutum*.

Diluição	Amostra problema (mL)	Água destilada (mL)	Meio de cultura (mL)	Inóculo 10^6 células/mL(mL)	Volume final (mL)
1:1,33	26,0	0	3,0	1,0	30,0
1:2	15,0	11,0	3,0	1,0	30,0
1:3	10,0	16,0	3,0	1,0	30,0
1:4	7,5	18,5	3,0	1,0	30,0
1:6	5,0	21,0	3,0	1,0	30,0
1:8	3,75	22,25	3,0	1,0	30,0
1:12	2,5	23,5	3,0	1,0	30,0

A fonte luminosa (luz tipo branca universal) necessária ao crescimento da alga foi mantida cerca de 50 cm acima do banho termostaticado, conforme mostra a Figura 2.6. A intensidade luminosa de cada ponto do banho termostaticado foi medida com auxílio de um luxímetro, na altura da lâmina d'água onde os Erlenmeyers permaneceram pelo período de realização do teste. Após 72 horas foi realizada novamente uma medida da concentração da alga na amostra controle e nas diferentes diluições da amostra.

II.3.4.4 - Medida de concentração da alga

As concentrações da alga em solução foram determinadas por meio da medida da fluorescência da clorofila presente nas culturas de alga, tanto na amostra controle quanto nas amostras diluídas. O comprimento de onda de excitação foi de 465 nm e a emissão determinada a 685 nm, utilizando-se um fluorímetro Aminco modelo SPF-500 CTM.

A taxa de crescimento diário das algas (μ) foi determinada conforme a equação 2.9:

$$\mu / dia = \frac{[(\ln E_{72}) - (\ln E_0)] \times 24}{72} \quad \text{eq. 2.9}$$

onde:

μ / dia = taxa de crescimento diário da alga;

E_0 = medida da concentração da alga no tempo zero;

E_{72} = medida da concentração da alga após 72 horas.

No caso de amostras tóxicas, a taxa de crescimento diário (μ / dia) da amostra deve ser menor que o μ diário do controle. A toxicidade das amostras foi representada em termos de porcentagem de inibição do crescimento das algas em relação ao controle, calculada conforme descrita na equação 2.10:

$$\%_{\text{inibição}} = \left(\frac{\mu_c - \mu_a}{\mu_c} \right) \times 100 \quad \text{eq. 2.10}$$

onde:

μ_a = taxa de crescimento diário da alga na amostra;

μ_c = taxa de crescimento diário da alga no controle.

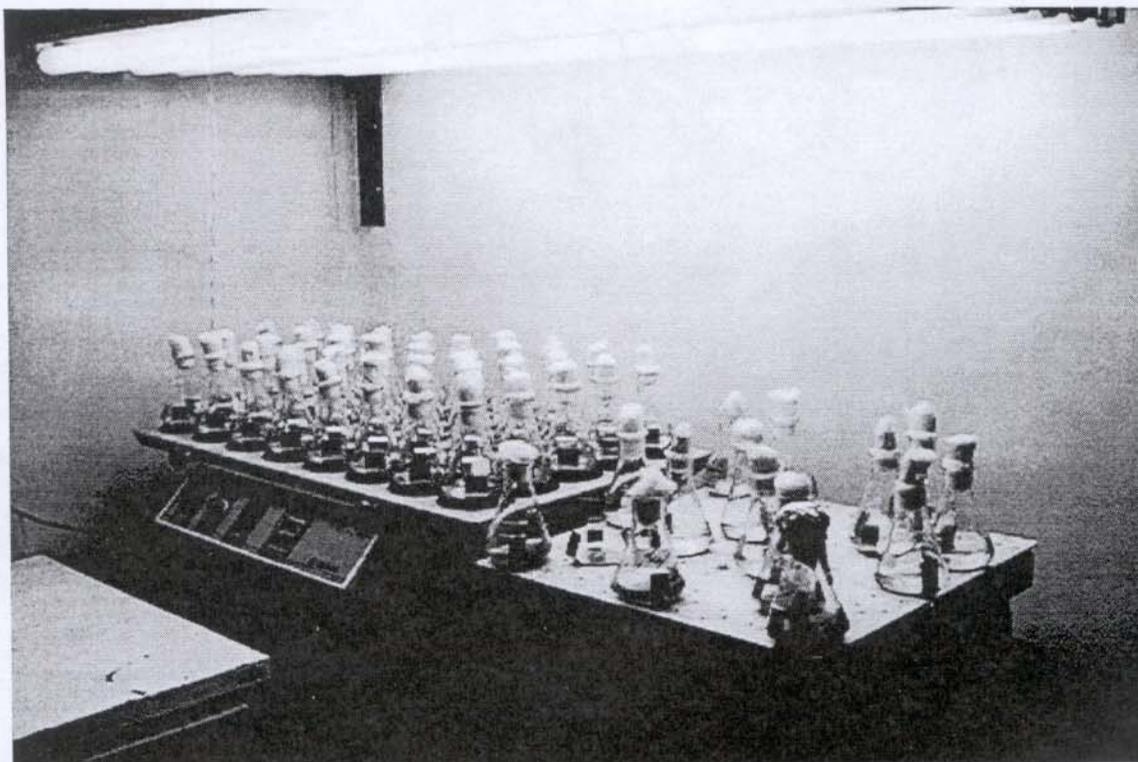


Figura 2.6 - Sistema utilizado no teste de toxicidade com a alga *S. capricornutum*.

II.3.5 – REATORES

II.3.5.1 – Sistema de Ozonização

A Figura 2.7 mostra o sistema empregado no processo de ozonização. Este sistema era dotado de um ozonizador marca Ozocav ZT-2 (Inter Ozone Ingenieria Ecologica, Chile), que permitia a produção de ozônio em 3 diferentes níveis, com capacidade para gerar até $0,70 \text{ g h}^{-1}$ de ozônio. O princípio de geração de O_3

baseia-se no método de descarga por efeito corona, sendo oxigênio puro o gás de alimentação do sistema.

O reator empregado neste estudo possuía formato tubular, com diâmetro interno de 4,6 cm, altura de 30,0 cm e com capacidade para 500 mL de amostra. A entrada do gás era feita pela parte inferior do reator, passando por uma placa porosa de vidro sinterizado para melhorar a transferência de massa da fase gasosa para a fase líquida (Kunz e col., 1999).

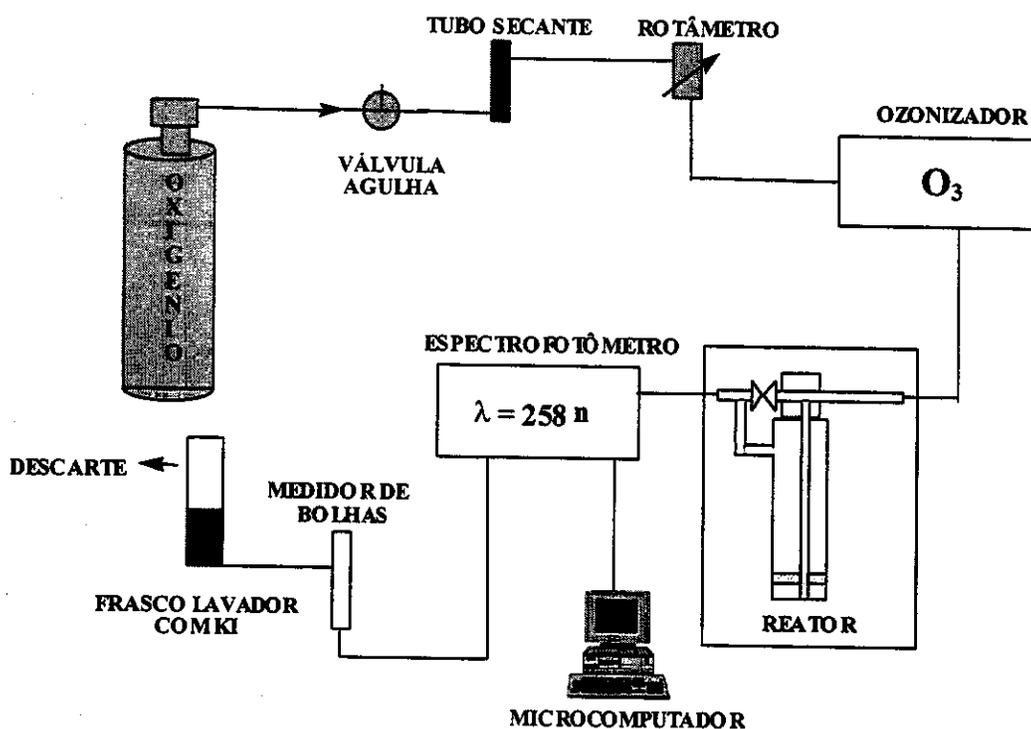


Figura 2.7 – Sistema empregado na ozonização do efluente papeleiro.

O ozônio foi determinado espectrofotometricamente a 258 nm ($\epsilon = 3000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), utilizando-se um espectrofotômetro da marca Micronal modelo B 382. A mistura gasosa contendo oxigênio e ozônio, após sair do reator, passa através de uma célula de fluxo de 1 cm localizada no interior do espectrofotômetro.

Os tubos utilizados no sistema eram de polietileno ou silicone, pois estes materiais são inertes ao ataque químico do ozônio. O ozônio residual do sistema

foi destruído pela passagem do gás por um frasco lavador contendo iodeto de potássio.

O espectrofotômetro foi interfaceado a um microcomputador Pentium 200 MHz, compatível com a linha PC-IBM. Um programa de gerenciamento controla a leitura de absorbância em função do tempo. Além de fazer a aquisição e armazenamento dos dados, o programa permite o tratamento das curvas que indicam a variação da concentração de ozônio proveniente do reator por unidade de tempo, permitindo o cálculo da concentração inicial do gás e a quantidade de ozônio consumido (carga de ozônio) durante o tratamento (Kunz e col., 1999).

II.3.5.2 – Sistema de fotólise e fotocatalise

Nos processos de fotólise e fotocatalise foi empregado um reator de vidro com capacidade para 250 mL de efluente. Este reator estava equipado com: camisa interna de quartzo, refrigeração, agitação magnética e sistema dispersor de O₂.

Como fonte de irradiação foi utilizada uma lâmpada de vapor de mercúrio (com bulbo removido) de 125 W, com uma fluência de 31,1 J m⁻² s⁻¹.

II.3.5.3– Sistema empregado no tratamento eletroquímico e fotoeletroquímico

Os tratamentos eletroquímico e fotoeletroquímico foram realizados empregando-se um reator de vidro, com capacidade para processar 300 mL de solução, que possuía uma camisa interna de quartzo (em formato de tubo de ensaio), onde foram induzidas lâmpadas de vapor de mercúrio de 125 W como fonte de radiação UV, conforme mostra esquematicamente a Figura 2.8. Como ânodo foi usado um eletrodo modificado Ti/Ru_{0,3}Ti_{0,7}O₂ em forma cilíndrica e com dimensões próxima a 100 cm², este eletrodo foi acoplado na lateral interna do reator. Uma malha expandida de titânio, na forma de cilindro, foi empregada como cátodo, à distância entre o cátodo e o ânodo foi fixada em 1,0 milímetro (Pelegrini, 1999).

A agitação da solução foi promovida por um agitador magnético e a temperatura mantida em 25°C.

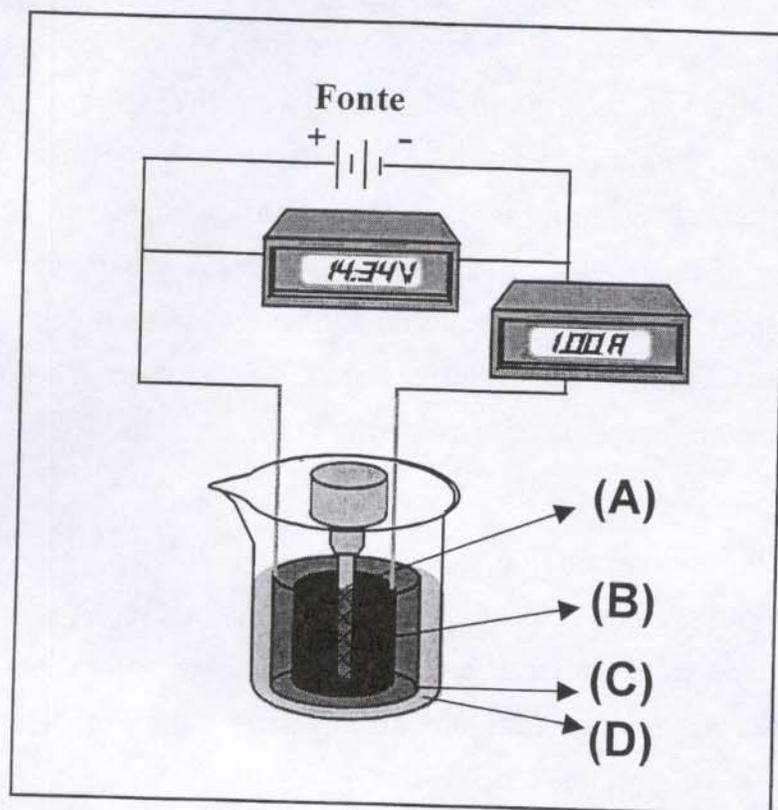


Figura 2.8 – Representação esquemática do sistema empregado nos tratamentos eletroquímico e fotoeletroquímico. (A) Lâmpada de mercúrio 125 W; (B) Cátodo de titânio (tela); (C) Ânodo de $Ti/Ru_{0,3}Ti_{0,7}O_2$; (D) amostra a ser tratada.

II.3.6 – ESTUDO CINÉTICO

A degradação do efluente foi realizada utilizando-se os seguintes processos:

II.3.6.1 - Ozonização

Alíquotas de 400 mL do efluente foram ozonizadas a temperatura ambiente, utilizando-se o reator descrito no item II.3.5.1. A vazão de entrada de gás no sistema foi ajustada a 15 L h^{-1} , obtendo-se concentrações de ozônio na fase gasosa de $14 (\pm 1) \text{ mg L}^{-1}$. A cinética de degradação do efluente foi acompanhada durante 120 minutos em intervalos de 10 minutos.

II.3.6.2 – O₃/H₂O₂/pH11

Procedeu-se da mesma maneira que no processo de ozonização, acrescentando-se ao efluente 5,1 mL de peróxido de hidrogênio 30% v/v, obtendo-se uma concentração de 0,1 mol L⁻¹ de H₂O₂.

II.3.6.3 – O₃/UV/pH11

No processo de ozonização na presença de radiação ultravioleta foi utilizado o sistema de geração de O₃ descrito no item II.3.5.1, um reator de quartzo com capacidade para 250 mL de efluente e uma lâmpada de vapor de mercúrio de 125 W.

II.3.6.4 - Fotocatálise (UV/TiO₂/O₂) e (UV/ZnO/O₂)

Parâmetros experimentais de importância como pH (3, 7 e 11), massa de fotocatalisador (100, 200 e 300 mg), O₂ (0,5 L h⁻¹ e ar comprimido) e tipo do catalisador (TiO₂ e ZnO) foram otimizados por meio de planejamento fatorial 2³ com ponto central. Estudos cinéticos empregando-se TiO₂ (Degussa P25, 80% anatase/20% rutila, área superficial de 30 m² g⁻¹) e ZnO (Merck, área superficial de 1 m² g⁻¹) também foram realizados. Após o tratamento, o catalisador foi retirado do efluente filtrando-se as amostras com filtro Millipore 0,45 µm.

II.3.6.5 – UV/H₂O₂

A eficiência do processo de fotólise na presença de peróxido de hidrogênio (nas concentrações: 0,05; 0,1 e 0,2 mol L⁻¹) foi avaliada empregando-se o reator e a lâmpada de UV descritos no item II.3.5.2.

II.3.6.6 – UV/H₂O₂/ZnO

Neste estudo procedeu-se de maneira similar ao item anterior, avaliando-se a influência do fotocatalisador ZnO (concentração: 1mg mL⁻¹ efluente).

II.3.6.7 – UV/ZnO/O₃

Procedeu-se da mesma maneira que no processo fotocatalítico,

empregando-se ozônio em substituição ao oxigênio

II.3.6.8 – Eletroquímica e Fotoeletroquímica

Utilizando-se o reator e a célula eletroquímica descritos no item II.3.5.3, foi estudado a eficiência do processo eletroquímico com e sem a presença de radiação ultravioleta. Densidades de correntes de 20 mA cm^{-2} foram aplicadas empregando-se uma fonte externa.

II.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.4.1 – PROCESSOS DE REMEDIAÇÃO DO EFLUENTE PAPELEIRO

II.4.1.1 – Ozonização

II.4.1.1.1 – Ozonização em meio alcalino ($O_3/pH11$)

Inicialmente buscou-se empregar o processo de ozonização em meio básico (pH original do efluente); nesta condição a geração de radicais hidroxila a partir do ozônio é favorecida (Masten e Davis, 1994; Freire e col., 2000b), conforme as equações 2.1 e 2.2 (página 22) .

A ozonização do efluente, em solução aquosa básica, foi monitorada por 100 minutos, na Tabela 2.6 é mostrada a quantidade de ozônio consumida durante o processo de tratamento.

Tabela 2.6 – Consumo de O_3 em função do tempo de tratamento pelo processo $O_3/pH11$.

Tempo (minutos)	Consumo de O_3 ($mg L^{-1}$)
0	0
20	89
40	169
60	212
80	231
100	242

Este processo mostrou uma rápida cinética de descoloração do efluente papeleiro Kraft E_1 . Em 100 minutos de tratamento (que correspondem a uma carga de $\cong 240 mg L^{-1}$ de ozônio consumido) houve uma descoloração superior a 30%, conforme é apresentado na Figura 2.9. Na Figura 2.9 também é mostrada a variação do pH do efluente durante o processo de ozonização; a mudança neste parâmetro apresentou um perfil similar ao observado para a descoloração mas foi

menos significativa ($\approx 8\%$). Este pequeno decréscimo no valor do pH pode ser atribuído à formação de espécies ácidas durante o tratamento com O_3 , conforme descrito por Kuczkowski (1992).

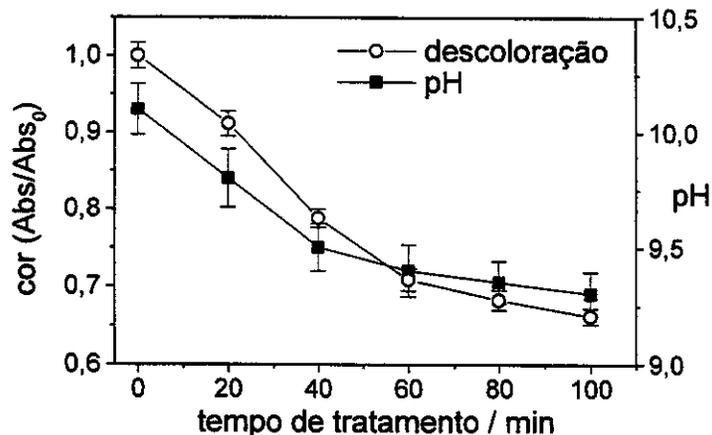


Figura 2.9 - Descoloração e variação do pH do efluente papeleiro Kraft E₁ em função do tempo de tratamento pelo processo O_3 /pH11. ($Abs_0 = 0,670$).

Na Figura 2.10 são apresentadas as reduções de fenóis totais e de carbono orgânico total em função do tempo de tratamento. O processo de ozonização em meio alcalino apresentou uma redução significativa da concentração de fenóis totais. Em 100 minutos de tratamento, observou-se um decréscimo de cerca de 85%. Este resultado confirma a eficiência do ozônio na degradação de compostos fenólicos (Rice, 1980; Boncz e col., 1997).

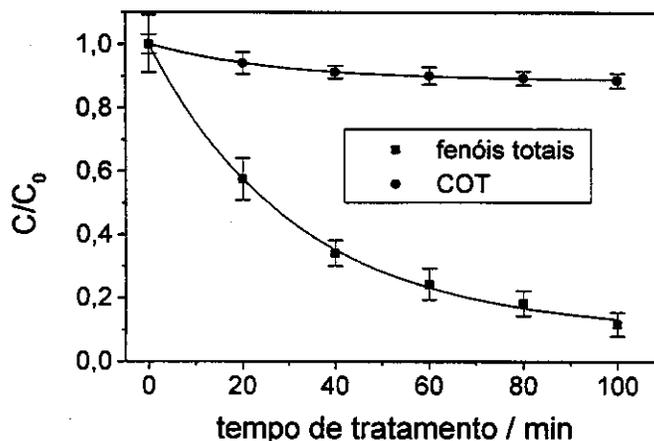


Figura 2.10 - Redução de COT e fenóis totais em função do tempo de tratamento pelo processo O_3 /pH11. ($C_{0(COT)} = 1.400 \text{ mg L}^{-1}$; $C_{0(\text{fenóis})} = 30 \text{ mg L}^{-1}$).

O processo $O_3/pH11$ não apresentou uma redução significativa de carbono orgânico total (COT). Após 100 minutos de tratamento, somente cerca de 10% do COT inicial foi reduzido. Assim, apesar deste processo promover uma transformação dos compostos presentes no efluente, ele não é eficiente na mineralização dos compostos orgânicos presentes no efluente papeleiro Kraft E1.

O consumo de ozônio, conforme é mostrado na Figura 2.11, foi mais significativo nos primeiros 60 minutos de tratamento. Até este período, também foi observada a maior redução de fenóis totais, cor e redução de carbono orgânico total. Estes resultados indicam que o tratamento pode ser interrompido neste momento, pois após 60 minutos a maior parte do ozônio passa através do reator sem reagir significativamente com os compostos recalcitrantes presentes no efluente.

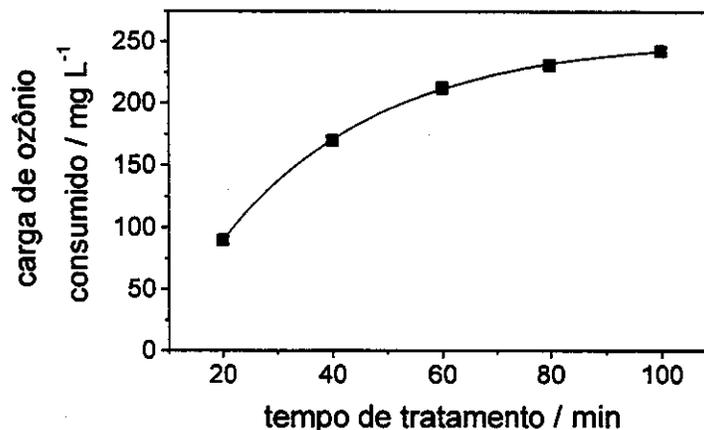


Figura 2.11 - Ozônio consumido durante o processo de ozonização $O_3/pH11$.

A maioria dos trabalhos sobre a aplicação do ozônio em processos de tratamento tem dado pouca atenção à toxicidade do efluente tratado por este método (Hostachy e col., 1997). Os testes de toxicidade são muito importantes quando processos de ozonização são empregados, principalmente porque compostos tóxicos podem ser gerados durante o tratamento com ozônio (Langlais e col., 1992). Na Figura 2.12 é apresentada a redução de toxicidade do efluente em função do tempo de tratamento.

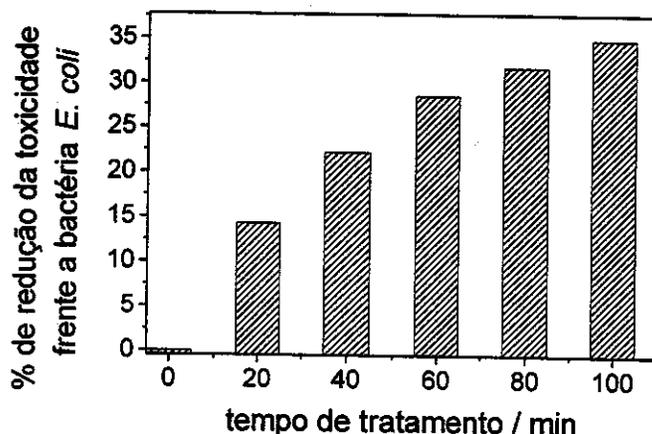


Figura 2.12 - Redução da toxicidade aguda frente a *E. coli* em função do tempo de tratamento pelo processo $O_3/pH11$. ($t_0 = 63\%$ de inibição no crescimento da bactéria).

O processo de ozonização, em meio básico, apresentou resultados eficientes na descoloração e na redução de fenóis totais. Uma dosagem de ozônio pequena e econômica foi efetiva na redução da toxicidade aguda frente a *E. coli*. Supõe-se que a redução na concentração de fenóis totais seja a principal responsável por este decréscimo na toxicidade.

II.4.1.1.2 – Ozonização em meio ácido ($O_3/pH3$)

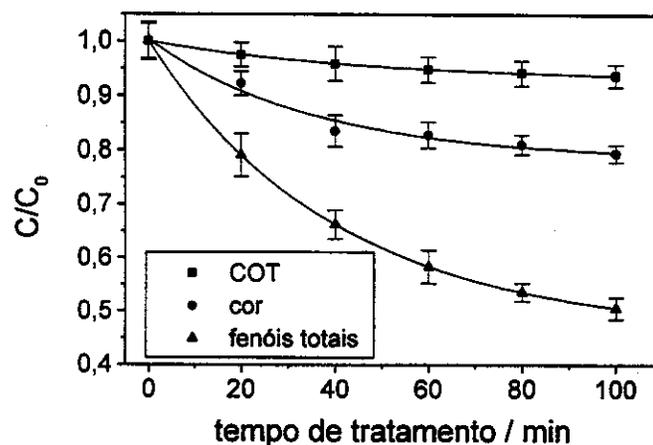
A geração de radicais a partir da decomposição do ozônio, em meio aquoso, é limitada em meio ácido (Sullivan e Roth, 1979). A fim de se avaliar a reação direta do ozônio com os compostos poluentes do efluente papeleiro, realizou-se um estudo onde o pH do efluente foi ajustado para pH 3.

Na Tabela 2.7 é mostrada a quantidade de O_3 consumido durante este processo de tratamento. Este processo apresentou um menor consumo de ozônio quando comparado com a ozonização em meio alcalino. Na Figura 2.13 são mostrados os valores de redução de COT, cor e fenóis totais obtidos empregando-se o processo de $O_3/pH3$.

Tabela 2.7 – Consumo de O_3 em função do tempo de tratamento pelo processo $O_3/pH3$.

Tempo (minutos)	Consumo de O_3 ($mg L^{-1}$)
0	0
20	78
40	136
60	170
80	192
100	201

A redução de cor apresentada pelo processo $O_3/pH3$ foi menor que aquela obtida pelo processo $O_3/pH11$, para 100 minutos de tratamento ($\cong 200$ mg de ozônio consumido) obteve-se cerca de 15% de descoloração. Ao contrário do processo $O_3/pH11$, no decorrer deste experimento não foi observada nenhuma variação no pH da amostra. O processo $O_3/pH3$ apresentou uma redução máxima na concentração de fenóis totais de 50% em 100 minutos de tratamento. Este decréscimo foi de cerca de 40% inferior ao observado para o processo de ozonização em meio alcalino. Após este mesmo tempo de tratamento somente cerca de 7% do carbono orgânico total foi reduzido.

**Figura 2.13** - Redução de COT, cor e fenóis totais em função do tempo de tratamento pelo processo $O_3/pH3$. $C_{0(COT)} = 950$ $mg L^{-1}$; $Abs_0 = 0,660$; $C_{0(fenóis)} = 30$ $mg L^{-1}$.

Na Figura 2.14 é apresentada a redução de toxicidade do efluente em função do tempo de tratamento. O processo de ozonização em meio ácido mostrou pouca eficiência na redução da toxicidade do efluente papeleiro, com uma redução máxima de cerca de 13% em 100 minutos de tratamento.

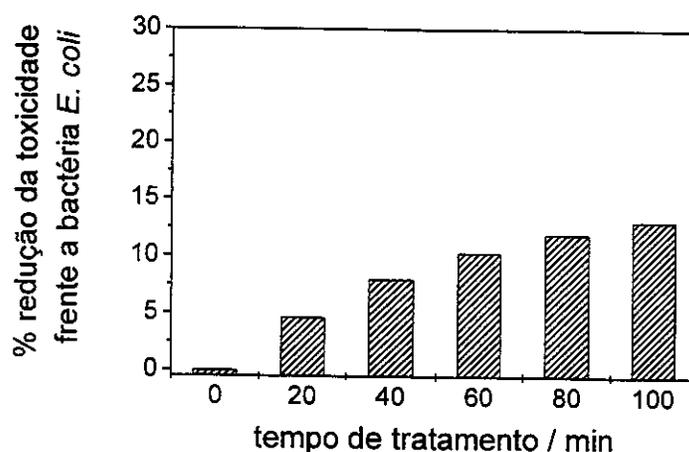


Figura 2.14 - Redução da toxicidade aguda frente a *E. coli* em função do tempo de tratamento pelo processo $O_3/pH3$. ($t_0 = 58\%$ de inibição no crescimento da bactéria).

O processo de ozonização, em meio ácido, apresentou-se menos eficiente para a redução de fenóis totais, carbono orgânico total, toxicidade e descoloração, quando comparado com o realizado em meio alcalino. Baseado nestes resultados e, considerando-se que o efluente papeleiro Kraft E1 estudado é básico, optou-se por empregar os demais processos de ozonização em meio alcalino.

II.4.1.1.3 – $O_3/H_2O_2/pH11$

Em solução aquosa, o ozônio pode reagir com ânions hidroxila gerando ânions radicalares superóxido e $\cdot HO_2$. Em uma etapa subsequente, uma molécula de O_3 pode reagir com o superóxido gerando $\cdot O_3^-$. O $\cdot O_3^-$ sequestra um próton gerando o radical $\cdot HO_3$, que é um dos precursores de radicais hidroxilas. Se H_2O_2 é adicionado na solução, o precursor $\cdot O_3^-$ é produzido pela reação do O_3 com o peróxido de hidrogênio. Esta reação pode apresentar uma cinética cerca de

40.000 vezes mais rápida do que a observada pela reação do O_3 com OH^- (Gulyas e col., 1995).

A reação geral deste processo pode ser esquematizada pela equação 2.11:



Durante o emprego do processo $O_3/H_2O_2/pH11$ não foi possível medir a quantidade de ozônio consumida pela degradação do efluente papeleiro, pois o peróxido de hidrogênio também atuou no consumo deste gás.

Na Figura 2.15 são mostradas as reduções de cor e de fenóis totais obtidas durante o processo de $O_3/H_2O_2/pH11$. Em 100 minutos de tratamento, pode-se verificar que este processo foi pouco efetivo na remoção de cor (menos de 15%), mas promoveu uma significativa redução na concentração de fenóis totais (cerca de 70%). Em relação à carga orgânica, este processo apresentou uma redução de COT de somente 3% e nenhuma redução na toxicidade do efluente frente à bactéria *E. coli* foi observada. Mokrini e colaboradores (1997) também observaram uma baixa eficiência do processo de O_3/H_2O_2 no tratamento de efluentes industriais, e atribuíram um possível efeito “seqüestrante” de O_3 ao peróxido de hidrogênio.

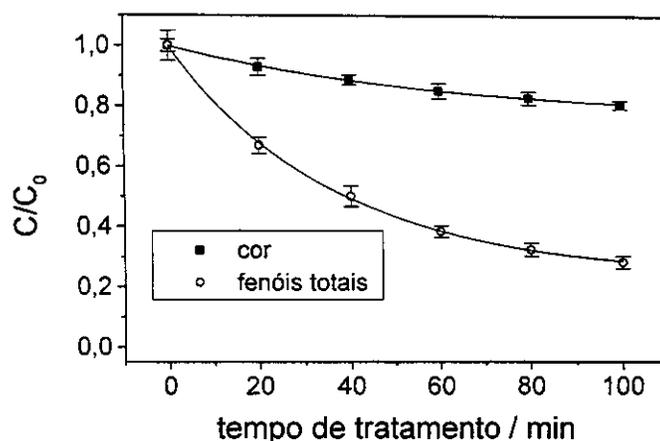


Figura 2.15 – Redução de fenóis totais e cor em função do tempo de tratamento com o processo $O_3/H_2O_2/pH11$. ($Abs_0 = 0,665$; $C_{0fenol} = 30 \text{ mg L}^{-1}$).

II.4.1.1.4 – O₃/UV/pH11

A ozonização fotolítica tem sido usada na oxidação de compostos fenólicos, álcoois e ácidos alifáticos com relativo sucesso. A presença de radiação ultravioleta no processo de ozonização tem incrementado os parâmetros de degradação destes compostos em 10 a 10⁴ vezes (Mokrini e col., 1997). O ozônio em meio aquoso na presença de radiação UV pode formar dois importantes radicais intermediários, $\cdot\text{O}$ e $\cdot\text{OH}$ (Freshour e col., 1996). Peyton e Glaze (1988), propuseram um formalismo para a análise da cinética do processo de ozonização fotolítico, onde a remoção do substrato é representada como uma combinação linear dos fenômenos de ozonização, fotólise e ozonização fotolítica.

Na Tabela 2.8 é mostrado o consumo de ozônio durante o tratamento do efluente papeleiro na presença de radiação UV.

Tabela 2.8 – Consumo de O₃ em função do tempo de tratamento pelo processo (O₃/UV/pH11).

Tempo	Consumo de O ₃ (mg L ⁻¹)
0	0
20	87
40	168
60	211
80	229
100	241

Na Figura 2.16 são mostrados os valores de redução de COT, cor e fenóis totais obtidos no processo de O₃/UV/pH11. Em 100 minutos de tratamento, pode-se observar uma significativa descoloração do efluente, cerca de 47%. Uma redução efetiva na concentração de fenóis, 88%, também foi obtida por este processo. Contudo, mais uma vez, a redução de COT foi pouco significativa, somente cerca de 12%.

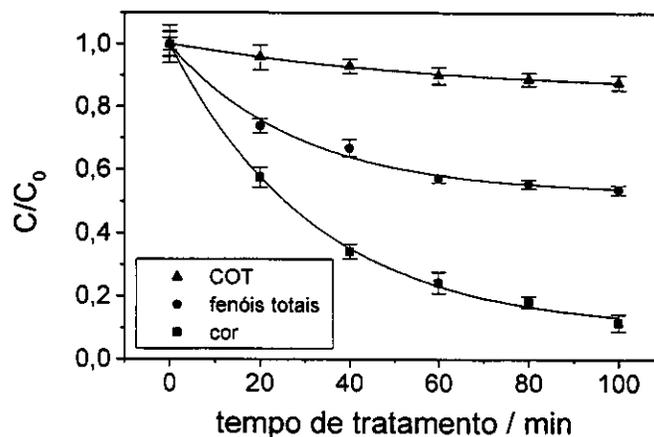


Figura 2.16 – Redução de COT, cor e fenóis totais em função do tempo de tratamento pelo processo O₃/UV/pH11. $C_{0(\text{COT})} = 910 \text{ mg L}^{-1}$; $C_{0(\text{fenóis})} = 26 \text{ mg L}^{-1}$; $Abs_0 = 0,680$.

Na Figura 2.17 são apresentados os valores de redução da toxicidade do efluente, frente à bactéria *E. coli*, obtidas para os diferentes intervalos de tempo de tratamento. Em 100 minutos de tratamento obteve-se uma redução de 23% na toxicidade.

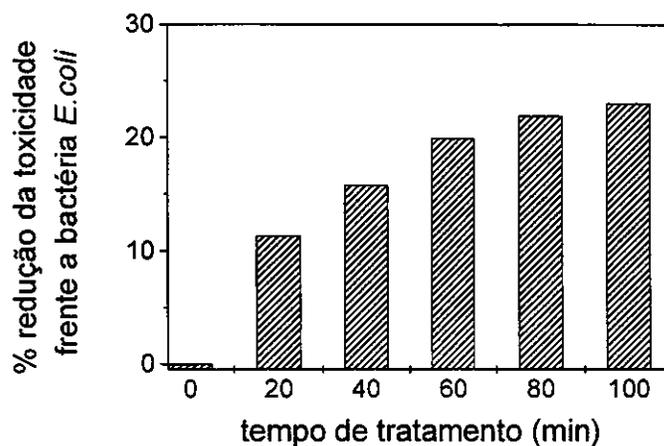


Figura 2.17 - Toxicidade aguda frente a *E. coli* em função do tempo de tratamento pelo processo O₃/UV/pH11. ($t_0 = 60\%$ de inibição no crescimento da bactéria).

II.4.1.1.5 – Resumo comparativo dos resultados obtidos com os diferentes processos de ozonização

Na Figura 2.18 é mostrado o desempenho dos processos de ozonização em: meio alcalino ($O_3/pH11$); meio ácido ($O_3/pH3$); presença de H_2O_2 ($O_3/H_2O_2/pH11$) e presença de radiação ultravioleta ($O_3/UV/pH11$). O processo mais efetivo na remoção de cor do efluente papeleiro foi o $O_3/UV/pH11$, seguido pelo processo $O_3/pH11$. Quanto à degradação de espécies fenólicas os processos de $O_3/H_2O_2/pH11$, $O_3/UV/pH11$ e $O_3/pH11$ apresentaram uma boa porcentagem de redução, sendo este último o mais eficiente. A carga de matéria orgânica não foi removida significativamente por nenhum dos tratamentos, contudo os processos de $O_3/UV/pH11$ e $O_3/pH11$ foram os que apresentaram melhores resultados. Estes dois processos também foram os mais eficientes na redução da toxicidade do efluente papeleiro.

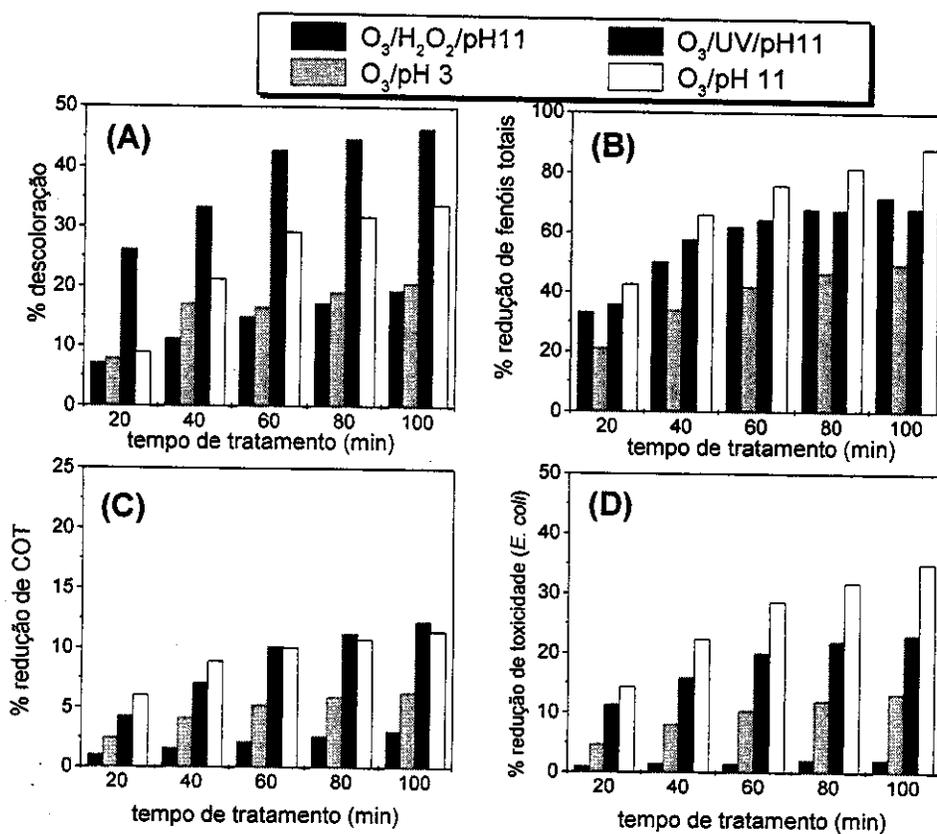


Figura 2.18 – Comparação entre os tratamentos $O_3/H_2O_2/pH11$, $O_3/pH3$, $O_3/UV/pH11$ e $O_3/pH11$ em relação à redução de (A) cor; (B) fenóis totais, (C) carbono orgânico total e (D) toxicidade frente à bactéria *E. coli*.

Mao e Smith (1995), estudando a remediação do efluente papeleiro por diferentes métodos de ozonização, também obtiveram melhores resultados com o processo de ozonização em pH alcalino. Estes autores avaliaram a redução de DQO, DBO e cor e concluíram que o processo de ozonização é efetivo principalmente para a redução de grupos cromóforos. Resultados semelhantes foram obtidos por Rodriguez e colaboradores (1996) e por Zhou e Smith (1997).

Hostachy e colaboradores (1997), empregando o processo de O_3/pH_{alcalino} obtiveram uma boa redução da toxicidade (teste MicrotoxTM) do efluente papeleiro, cerca de 75% para uma carga de ozônio de 3 kg L^{-1} . Por outro lado, Roy-Arcand e Archibald (1996) empregaram uma carga de ozônio máxima de 400 mg L^{-1} e não obtiveram nenhuma redução da toxicidade do efluente papeleiro (utilizando o mesmo teste de toxicidade). Mas, estes autores observaram um aumento na biodegradabilidade deste efluente após o tratamento e atribuíram esta característica a mineralização de compostos orgânicos halogenados adsorvíveis.

Gulyas e colaboradores (1995) estudaram a degradação de diferentes efluentes industriais pelo processo de O_3/H_2O_2 . No caso do efluente papeleiro, os autores concluíram que a concentração de peróxido não possuía nenhum efeito sobre a redução de DQO, que foi cerca de 35% para 100 minutos de tratamento. Oeller e colaboradores (1997) compararam a eficiência dos processos O_3 e O_3/UV na remediação do efluente papeleiro, e concluíram que o processo combinado foi o mais eficiente na redução de DQO, porém foi o menos efetivo para degradar os compostos orgânicos halogenados adsorvíveis. Yeber e colaboradores (1999), também concluíram que o processo O_3/UV era o mais eficiente para transformar a matéria orgânica presente no efluente papeleiro em formas mais biodegradáveis. Após somente 1 minuto de tratamento, os autores observaram uma redução de 75% na concentração de carbono orgânico total e de 50% na toxicidade (teste MicrotoxTM).

A variação no tipo, origem e composição da matéria-prima conferem um fator de extrema complexidade aos efluentes papeleiros, que se reflete em uma diversidade de características, reatividades e compostos neles encontrados. Em função deste panorama, fica justificada a disparidade nos resultados e conclusões

de trabalhos correlatos.

II.4.1.2 – Processos Fotoquímicos

II.4.1.2.1 – Fotocatálise Heterogênea

A degradação do efluente papeleiro também foi estudada empregando-se o processo de fotocatálise heterogênea. As influências do tipo de catalisador, oxigenação, pH e massa de catalisador foram avaliadas por meio de um planejamento fatorial 2^3 com ponto central. Na Tabela 2.9 são apresentados os valores empregados para as três variáveis estudadas.

Tabela 2.9 – Valores das variáveis empregadas no planejamento fatorial 2^3 .

Variável	Nível (-)	Ponto central (0)	Nível (+)
pH	3	7	11
massa catalisador	100 mg	200 mg	300 mg
atmosfera	Sem O ₂	Ar comprimido (5 L h ⁻¹)	O ₂ puro (5 L h ⁻¹)

Nas Tabelas 2.10 e 2.11 são apresentados os resultados obtidos empregando-se as condições acima estabelecidas e os catalisadores ZnO e TiO₂.

Os resultados apresentados na Tabela 2.10 mostram que, empregando-se ZnO como fotocatalisador, o pH e o oxigênio são os fatores principais na remoção de cor. Em meio ácido e na ausência de O₂, não foi verificada nenhuma descoloração. Empregando-se meio alcalino e um fluxo de oxigênio obteve-se cerca de 80% de remoção dos grupos cromóforos. No ponto central, onde a amostra de efluente foi tratada em pH 7 e com um fluxo de ar comprimido, esta redução foi 50% inferior. Realizando-se os cálculos da influência de cada variável empregando-se a metodologia proposta por Neto e colaboradores (1995), verificou-se que a massa do catalisador não possui nenhum efeito sobre a descoloração; já o aumento do pH de 3 para 11 acarretou em uma descoloração 41% mais eficiente. O mesmo ganho de eficiência foi observado quando o oxigênio foi empregado durante o tratamento. Também há uma interação

significativa entre o pH e O₂, sendo que os melhores resultados foram obtidos quando estes dois fatores se encontravam em nível alto.

Tabela 2.10 – Fotocatálise do efluente papeleiro. Catalisador ZnO, tempo de tratamento: 30 minutos; volume de efluente: 250 mL; fonte de radiação: lâmpada de 125 W.

Teste	pH	massa	atmosfera	Cor % redução	Fenóis % redução	COT % redução
1	-	-	-	0	0	3
2	+	-	-	0	0	4
3	-	+	-	0	0	3
4	+	+	-	0	0	5
5	-	-	+	0	0	13
6	+	-	+	80	62	18
7	-	+	+	0	8	18
8	+	+	+	84	63	28
9	0	0	0	43	12	14
10	0	0	0	41	10	14

Tabela 2.11 – Fotocatálise do efluente papeleiro. Catalisador TiO₂, tempo de tratamento: 30 minutos; volume de efluente: 250 mL; fonte de radiação: lâmpada de 125 W.

Teste	pH	massa	atmosfera	Cor % redução	Fenóis % redução	COT % redução
1	-	-	-	64	0	6
2	+	-	-	23	0	9
3	-	+	-	75	0	16
4	+	+	-	20	0	11
5	-	-	+	84	0	24
6	+	-	+	82	47	21
7	-	+	+	86	0	35
8	+	+	+	80	44	25
9	0	0	0	58	27	26
10	0	0	0	58	25	26

Em relação à remoção de espécies fenólicas, a influência dos parâmetros foi semelhante à observada para a descoloração, com o pH e O_2 apresentando-se como as variáveis mais significativas. Para a remoção de carbono orgânico, os aumentos de 15% na remoção de COT com a presença de oxigênio e de 8% em meio alcalino, confirmaram que estas duas variáveis são as mais importantes na degradação do efluente papeleiro pelo processo fotocatalítico empregando ZnO como catalisador.

Também os resultados obtidos utilizando TiO_2 como fotocatalisador, mostraram que o pH e o oxigênio são os fatores principais na remoção de cor. Contudo, neste caso o meio ácido é cerca de 26% mais eficiente que o meio alcalino na descoloração do efluente, quando o oxigênio não é utilizado. Na presença de um fluxo de oxigênio, a influência do pH foi reduzida; nesta condição obteve-se descoloração média de 84%. No ponto central, onde a amostra de efluente foi tratada em pH 7 e com um fluxo de ar comprimido, a redução de cor ficou em torno de 60%. Mais uma vez, realizando-se os cálculos da influência de cada variável, verificou-se que a massa do catalisador não possui nenhum efeito sobre a descoloração; já a presença de O_2 proporciona uma descoloração 38% superior.

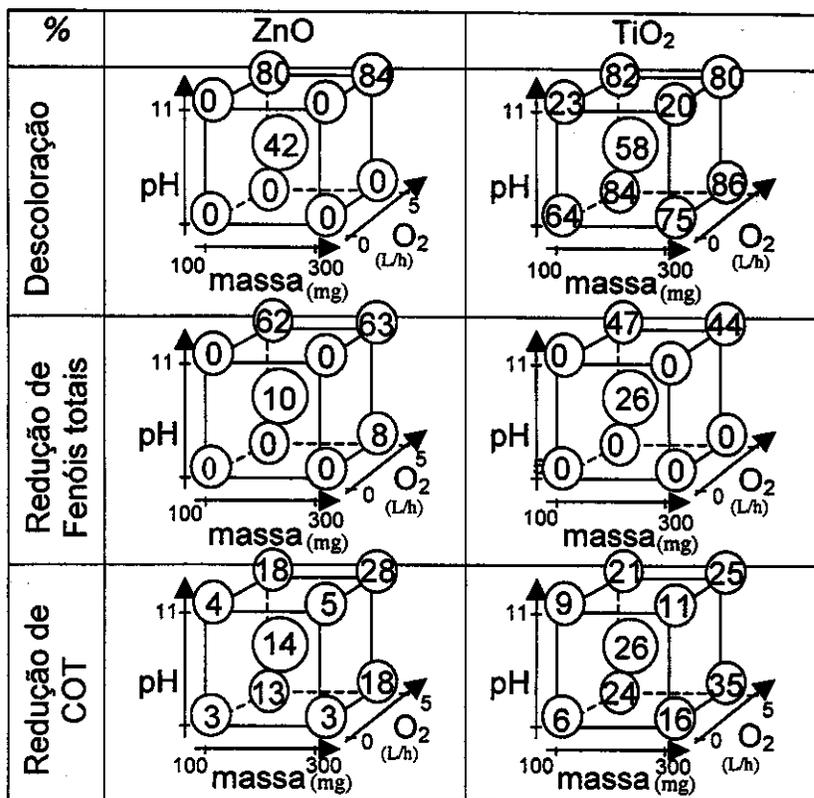
Quanto à remoção de espécies fenólicas, o pH e O_2 mostraram-se mais uma vez como os parâmetros de maior influência, em pH alcalino e na presença de oxigênio obteve-se 45% de redução de fenóis totais, contra 25% em pH 7/fluxo de ar comprimido e nenhuma redução em pH 3 (com ou sem presença de oxigênio). Para a remoção de carbono orgânico total, o fator de maior importância foi mais uma vez à presença de oxigênio (que causa um aumento de 15% na remoção de COT), sendo que a variação massa de catalisador apresentou uma influência de 6% na redução de COT.

Na Tabela 2.12 é mostrado um diagrama da interpretação geométrica os efeitos na fotocatalise do efluente papeleiro empregando-se ZnO e TiO_2 . Nesta tabela, pode-se observar que a melhor descoloração (86%) foi obtida, empregando-se TiO_2 , pH 3 e um fluxo de $5 L h^{-1}$ de O_2 . Contudo, os resultados mostram que valores semelhantes podem ser obtidos empregando-se pH 11,

assim como, ZnO e pH 11. Nesta última condição, com um fluxo de 5 L h⁻¹ de O₂, a redução de fenóis totais foi a mais elevada (63%). Já a remoção de matéria orgânica apresentou seu máximo (35%) empregando-se TiO₂ e meio ácido.

A descoloração do efluente papeleiro sofre um forte efeito do tipo de catalisador (+69% com TiO₂), quantidade de O₂ (+49% com 5 L h⁻¹) e pH (+31% em meio básico), enquanto que o aumento na massa de catalisador não influi positivamente. Na remoção de fenóis, a quantidade de catalisador não possui um efeito significativo, sendo o pH (+ 56% em pH 11), O₂ (+ 49% com 5 L h⁻¹) e o tipo de catalisador (+18% ZnO) os fatores principais. Os efeitos mais significativos na redução de COT são o O₂ (+15% com 5 L h⁻¹), o tipo e a quantidade de catalisador (+ 7% com TiO₂ e + 5% com 300mg).

Tabela 2.12 – Representação geométrica dos efeitos do pH, O₂, tipo e massa do catalisador, na redução de cor, fenóis e COT.



II.4.1.2.2 – Cinética de degradação do processo fotocatalítico

Com base nos resultados apresentados no item anterior, foi realizado um estudo cinético da degradação do efluente papeleiro utilizando-se ZnO e TiO₂ como fotocatalisadores. Neste estudo, utilizou o pH original do efluente (pH 11,2), uma massa de 200 mg dos catalisadores (1mg mL⁻¹_{efluente}), um fluxo de oxigênio puro de 5 L h⁻¹ e uma lâmpada de 125 W como fonte de radiação UV.

As Figuras 2.19, 2.20 e 2.21 mostram, respectivamente, a redução de cor, fenóis totais e carbono orgânico total em função do tempo de tratamento.

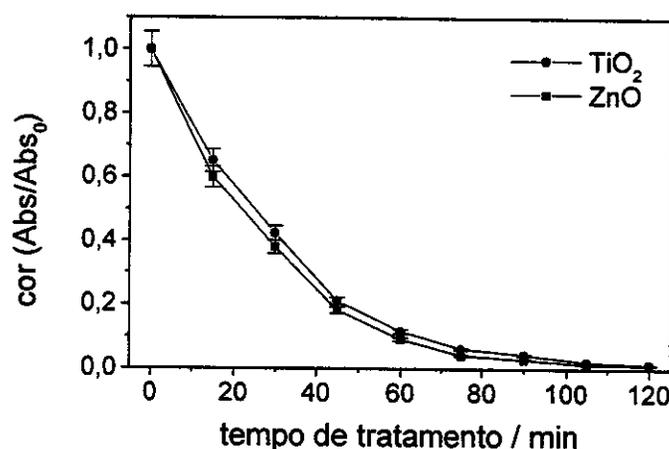


Figura 2.19 – Descoloração do efluente papeleiro em função do tempo de tratamento, empregando-se o processo fotocatalítico (ZnO e TiO₂ 1mg mL⁻¹). (Abs₀ = 0,671).

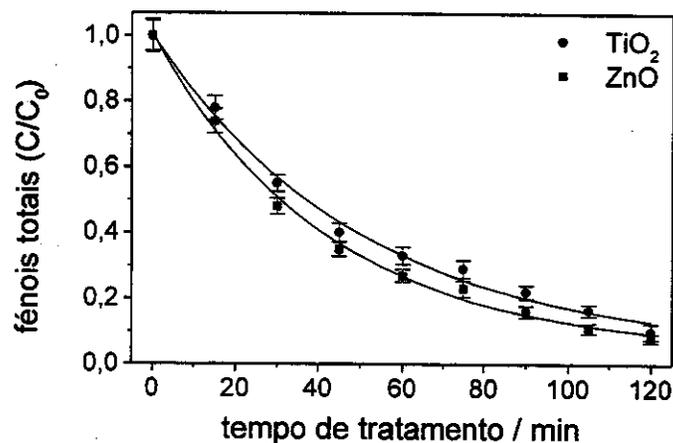


Figura 2.20 – Redução das espécies fenólicas do efluente papeleiro usando o processo fotocatalítico (ZnO e TiO₂ 1mg mL⁻¹) em função do tempo de tratamento. (C₀ = 35 mg L⁻¹).

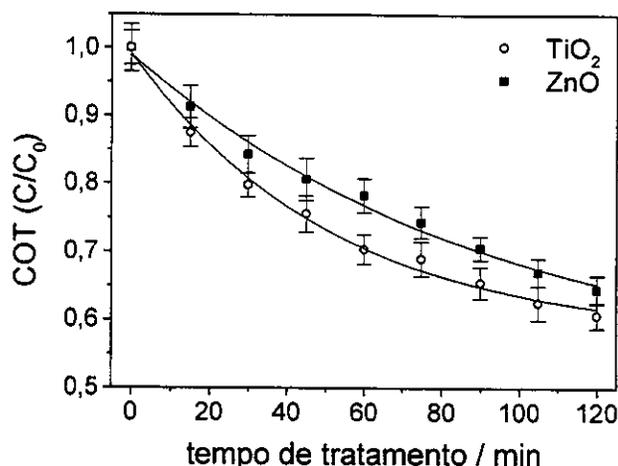


Figura 2.21 – Degradação da matéria orgânica do efluente papeleiro empregando-se o processo fotocatalítico (ZnO e TiO₂ 1mg mL⁻¹) em função do tempo de tratamento. (C₀ = 1.100 mg L⁻¹).

Os resultados apresentados nas Figuras 2.19, 2.20 e 2.21 mostram que a cinética de degradação dos componentes orgânicos do efluente papeleiro são semelhantes quando se utiliza os fotocatalisadores ZnO e TiO₂, estes resultados estão de acordo com o trabalho realizado por Yeber e colaboradores (2000). Sendo que o ZnO apresenta uma eficiência um pouco melhor na redução de cor e fenóis totais, enquanto que o TiO₂ é mais efetivo na redução de carbono orgânico total. Este último comportamento também pode ser verificado na redução da toxicidade aguda frente à bactéria *E. coli*, conforme é mostrado na Figura 2.22.

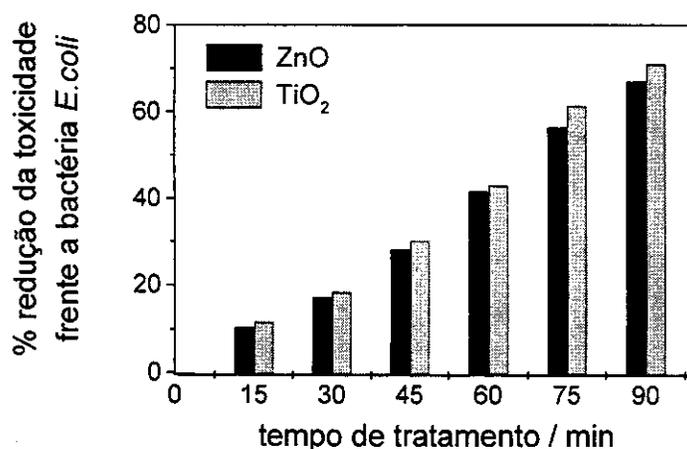


Figura 2.22 – Toxicidade frente à bactéria *E. coli* em função do tempo de tratamento e do tipo de catalisador empregado no processo fotocatalítico. (t_0 = 65% de inibição no crescimento da bactéria).

II.4.1.2.3 – Fotodegradação do efluente papeleiro por UV/H₂O₂

A decomposição de vários poluentes orgânicos presentes em rejeitos industriais tem sido efetivamente verificada por meio da geração de radicais hidroxila utilizando peróxido de hidrogênio e radiação ultravioleta (Ince e col., 1997). A equação geral 2.4 (página 23) exemplifica a formação do radical hidroxila.

Na Figura 2.23 são apresentados os resultados de um estudo sobre a influência da concentração de peróxido de hidrogênio na descoloração, redução de fenóis totais e de COT. Foram empregadas três concentrações distintas de H₂O₂ (0,05; 0,1 e 0,2 mol L⁻¹), a concentração de 0,1 mol L⁻¹ foi a que apresentou uma melhor razão custo/benefício.

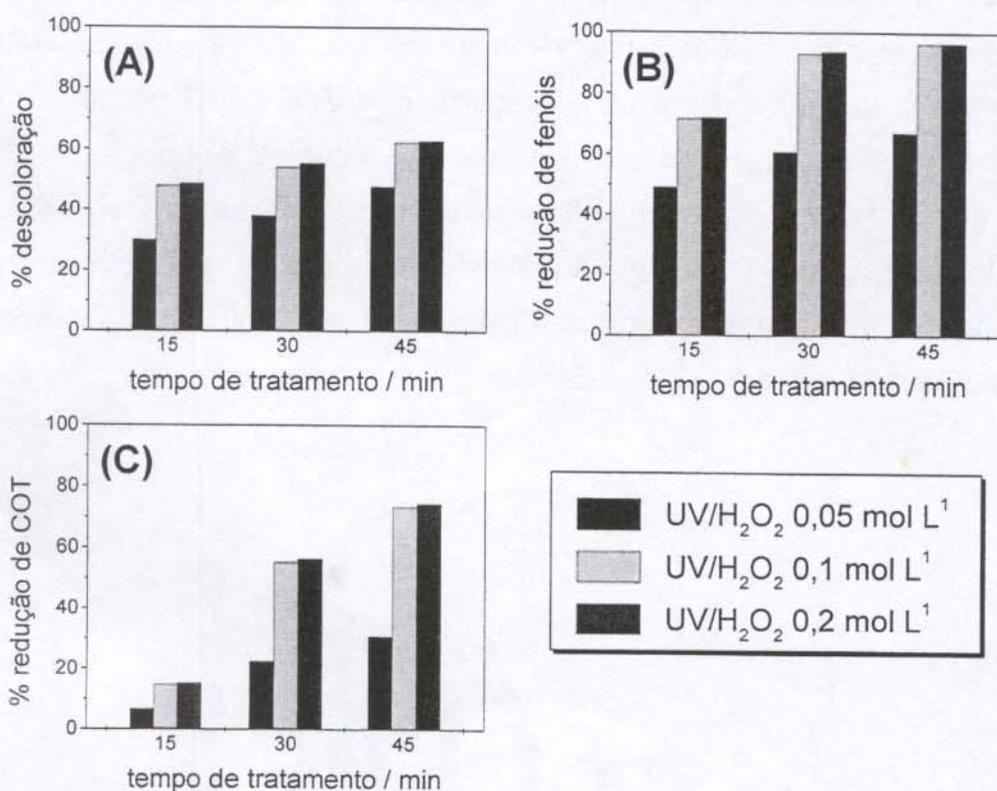


Figura 2.23 – Estudo da influência da concentração de H₂O₂ na degradação do efluente papeleiro. Condições: H₂O₂ 0,05; 0,1 e 0,2 mol L⁻¹, lâmpada de mercúrio de 125 W. Respostas: (A) descoloração, (B) redução das espécies fenólicas e (C) redução de carbono orgânico total.

A partir deste resultado foi realizado um estudo cinético do processo UV/H₂O₂, empregando-se 0,1 mol L⁻¹ de H₂O₂. Na Figura 2.24 são mostrados os resultados deste estudo. Este processo apresentou uma excelente eficiência na degradação das espécies orgânicas presentes no efluente papeleiro, em 60 minutos de tratamento obteve-se uma remoção de cor de 65%, redução de aproximadamente 100% das espécies fenólicas e quase 80% de redução da matéria orgânica. Contudo, como no processo de O₃/H₂O₂, não houve redução da toxicidade e, para determinados tempos de tratamento, houve um pequeno aumento na toxicidade (dados não mostrados).

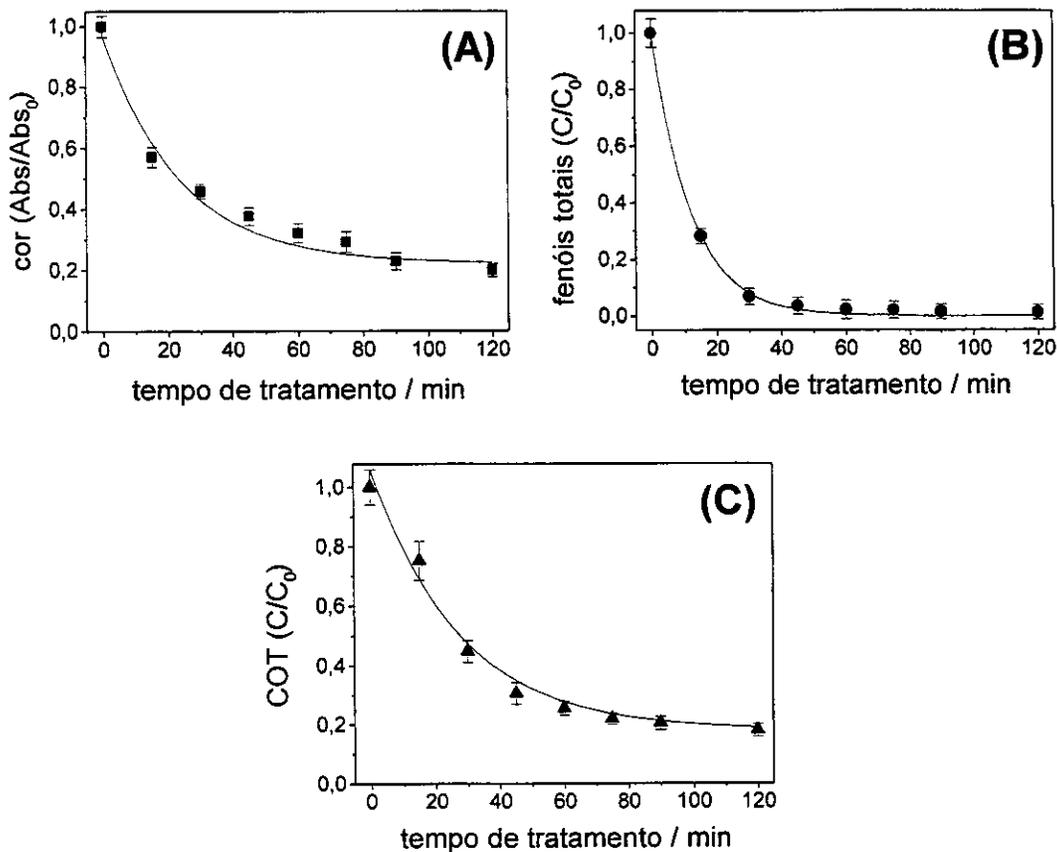


Figura 2.24 – Estudo cinético do processo de degradação UV/H₂O₂. Condições: 0,1 mol L⁻¹ de H₂O₂, lâmpada de 125 W. Respostas: (A) descoloração, (B) redução das espécies fenólicas e (C) redução de carbono orgânico total. C₀(COT) = 990 mg L⁻¹; C₀(fenóis) = 32 mg L⁻¹; Abs₀ = 0,720.

II.4.1.2.4 – Processo fotocatalítico combinado com peróxido de hidrogênio – UV/ZnO/H₂O₂

A presença de peróxido de hidrogênio no processo fotocatalítico pode aumentar a produção de radicais hidroxilas. Tal como no item anterior, avaliou-se a influência da concentração de peróxido de hidrogênio na degradação das espécies poluentes presentes no efluente papeleiro empregando-se o processo fotocatalítico com ZnO e H₂O₂. Optou-se por este tipo de fotocatalisador já que o mesmo apresentou uma eficiência no tratamento do efluente papeleiro semelhante ao tradicional TiO₂, mas possui um custo menor.

Na Figura 2.25 são mostrados os resultados obtidos com a variação da concentração de peróxido de hidrogênio. Pode-se observar pelos gráficos que a concentração ótima de H₂O₂ foi de 0,1 mol L⁻¹.

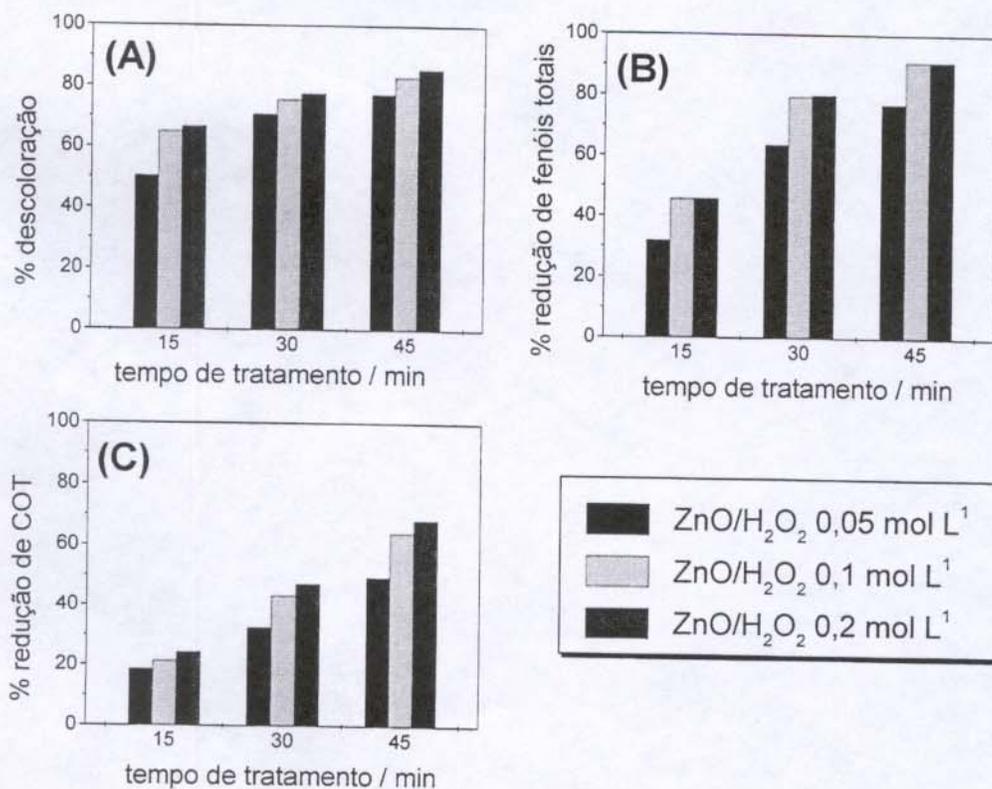


Figura 2.25 – Estudo da influência da concentração de H₂O₂ na degradação fotocatalítica do efluente papeleiro. Condições: H₂O₂ 0,05; 0,1 e 0,2 mol L⁻¹, lâmpada de mercúrio de 125 W, concentração do catalisador ZnO: 1 mg mL⁻¹_{efluente}. Respostas: (A) descoloração, (B) redução das espécies fenólicas e (C) redução de carbono orgânico total.

Também neste caso, foi realizado um estudo cinético do processo UV/ZnO/H₂O₂, empregando-se 0,1 mol L⁻¹ de H₂O₂ e 1 mg mL⁻¹ do catalisador ZnO. Na Figura 2.26 são mostrados os resultados deste estudo. Este processo apresentou uma excelente eficiência na degradação dos compostos presentes no efluente papeleiro. Em 60 minutos de tratamento obtiveram-se uma remoção de cor de 90%, redução de aproximadamente 100% das espécies fenólicas e mais de 80% de degradação da matéria orgânica. Apesar dos excelentes resultados obtidos por este processo no tratamento do efluente papeleiro, tal como nos processos de O₃/H₂O₂/pH11 e UV/H₂O₂, não houve redução da toxicidade, estes resultados indicam que o peróxido de hidrogênio ou algum subproduto remanescente possui uma toxicidade aguda inerente frente à bactéria *E. coli*.

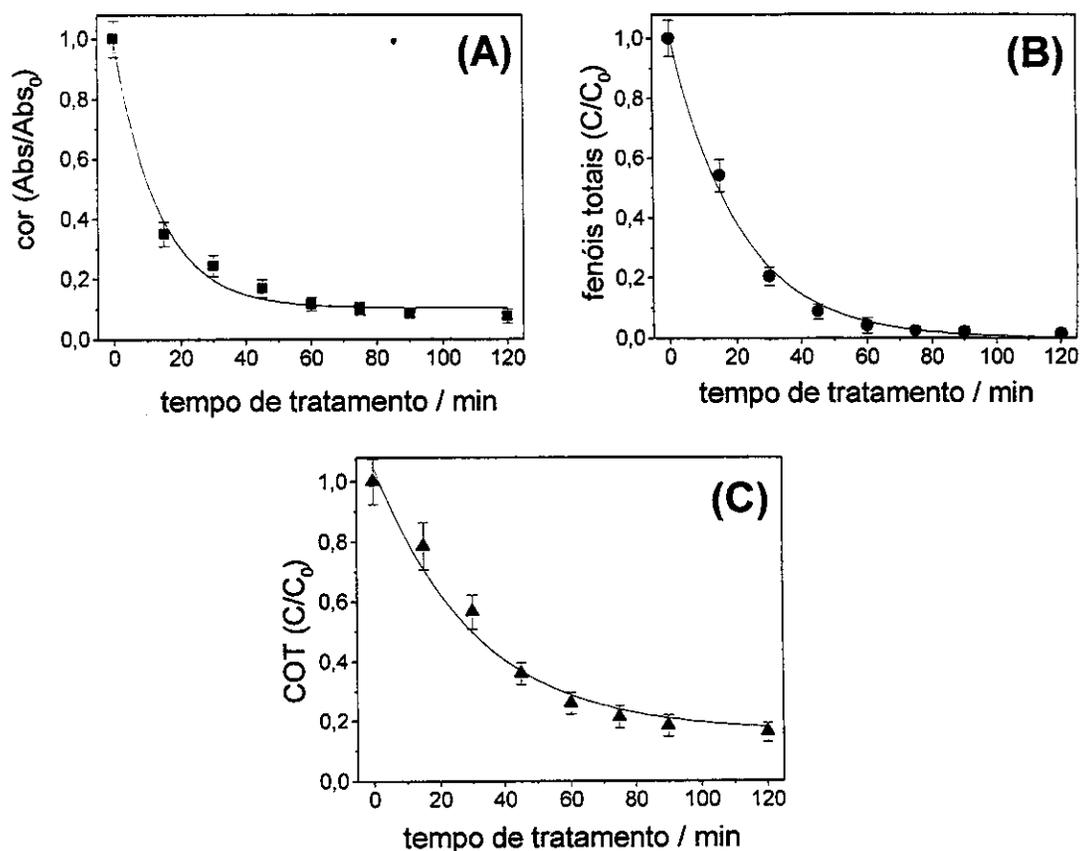


Figura 2.26 – Estudo cinético do processo de degradação UV/H₂O₂. Condições: 0,1 mol L⁻¹ de H₂O₂, lâmpada de 125 W, concentração de ZnO: 1 mg mL⁻¹. Respostas: (A) descoloração, (B) redução das espécies fenólicas e (C) redução de carbono orgânico total. C_{0(COT)} = 1.035 mg L⁻¹; C_{0(fenóis)} = 33 mg L⁻¹; Abs₀ = 0,730.

II.4.1.2.5 –UV/ZnO/O₃

A potencialidade da aplicação de métodos físico-químicos combinados no tratamento do efluente papeleiro Kraft E₁, foi avaliada empregando-se o processo de fotocatalise-ozonização.

A cinética de tratamento do efluente foi monitorada durante 120 minutos. Conforme é mostrado na Figura 2.27, após uma hora de tratamento do efluente, obteve-se uma descoloração acima de 80% e redução de fenóis totais de 65%. A diminuição de carbono orgânico total não foi muito significativa, cerca de 25%. Este último resultado indica que este processo não é efetivo na mineralização das espécies orgânicas contidas neste efluente. O processo simultâneo fotocatalise-ozonização, também apresentou uma boa eficiência na redução de toxicidade frente à bactéria *E. coli*, com uma diminuição de 90% da toxicidade em 60 minutos de tratamento.

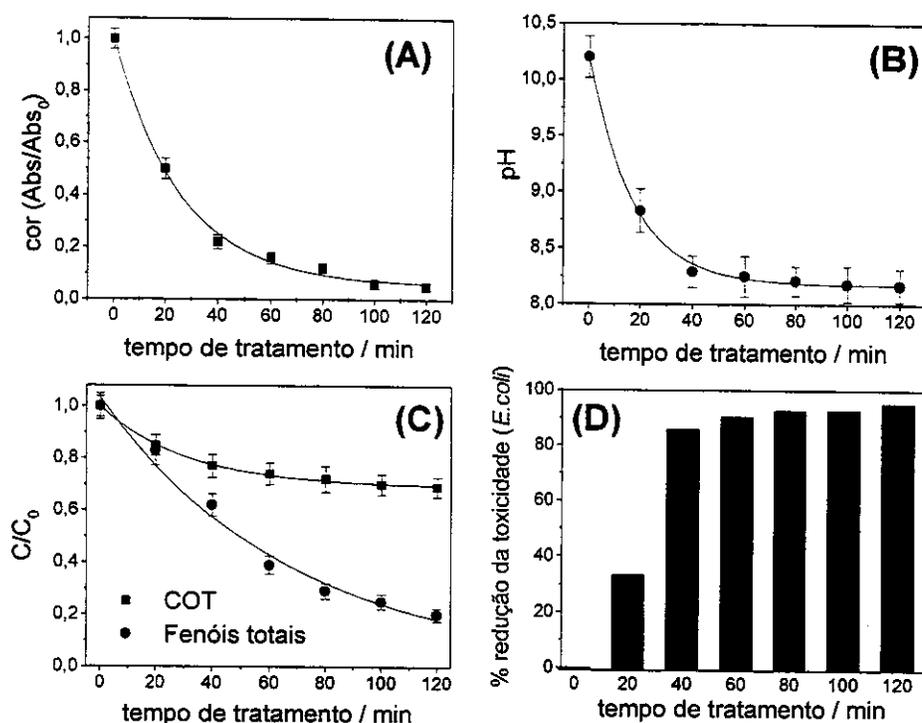


Figura 2.27 – Estudo cinético da degradação do efluente papeleiro empregando-se o processo combinado fotocatalítico/ozonização. Condições: ZnO (1mg mL⁻¹), fonte de irradiação: lâmpada de mercúrio de 125 W, concentração de O₃:14 mg L⁻¹. Respostas: (A) descoloração; (B) variação do pH; (C) redução de fenóis totais e de carbono orgânico total e (D) redução da toxicidade aguda frente à bactéria *E.coli*. C_{0(COT)} = 1.230 mg L⁻¹; C_{0(fenóis)} = 38 mg L⁻¹; Abs₀ = 0,720; t₀ = 69% de inibição no crescimento da bactéria.

II.4.1.2.6 – Resumo comparativo dos resultados obtidos pelos processos fotoquímicos

Na Figura 2.28 é mostrado o desempenho dos processos dos fotoquímicos: UV/ZnO/O₂, UV/TiO₂/O₂, UV/H₂O₂, UV/ZnO/H₂O₂ e UV/ZnO/O₃. O processo UV/H₂O₂ foi o que apresentou a menor remoção de cor do efluente papeleiro, todos os demais processos apresentaram resultados semelhantes e com uma boa eficiência (\cong 90% de descoloração). Quanto à degradação de espécies fenólicas, os processos de UV/ZnO/H₂O₂ e UV/H₂O₂ apresentaram a melhor porcentagem de redução. Estes dois processos também promoveram uma excelente redução na carga de matéria orgânica do efluente papeleiro. Entretanto, eles não apresentaram redução da toxicidade aguda. O processo de UV/ZnO/O₃ foi o mais efetivo na redução deste parâmetro, com até 90% de redução da toxicidade frente à bactéria *E. coli*.

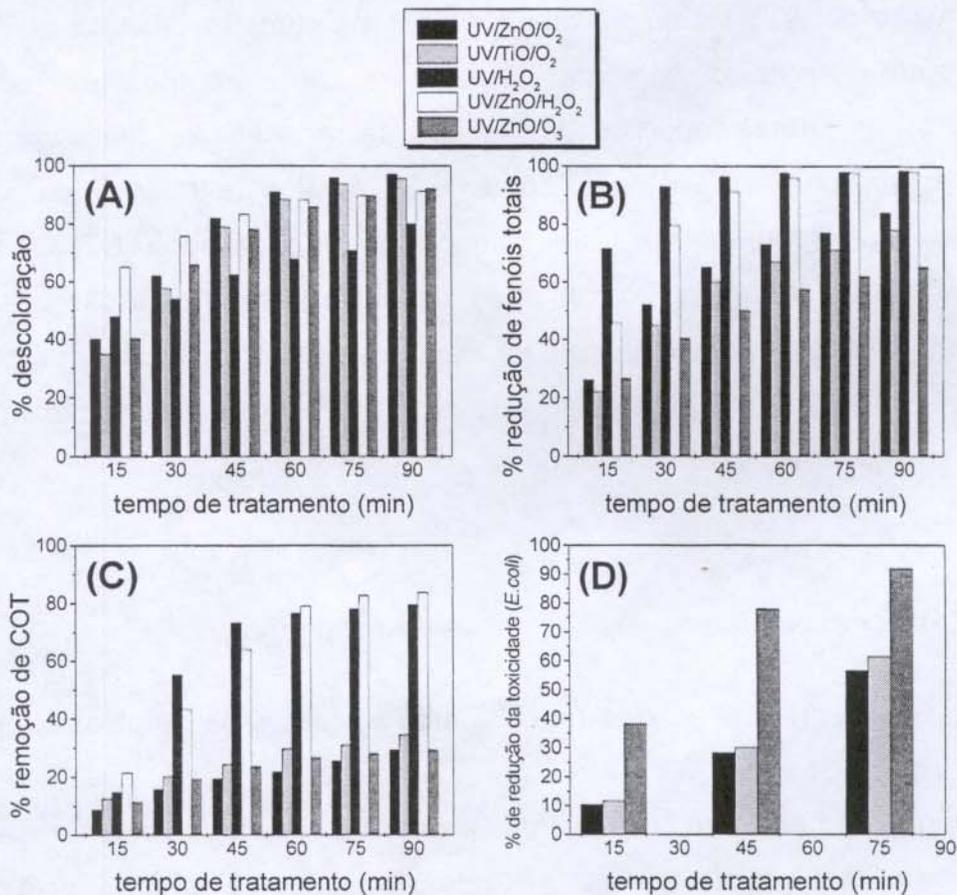


Figura 2.28 – Comparação entre os tratamentos UV/ZnO/O₂, UV/TiO₂/O₂, UV/H₂O₂, UV/ZnO/H₂O₂ e UV/ZnO/O₃ em relação à redução de (A) cor; (B) fenóis totais, (C) carbono orgânico total e (D) toxicidade frente à bactéria *E. coli*.

Yeber e colaboradores (2000) estudaram o emprego de processos fotocatalíticos na remediação do efluente papeleiro. Os autores também concluíram que os catalisadores TiO_2 e ZnO possuem eficiência semelhante na degradação deste tipo de efluente. Ambos os catalisadores promoveram uma descoloração e uma redução de fenóis totais de cerca de 60% em 60 minutos de tratamento. Contudo, a redução de matéria orgânica foi menos eficiente que a observada no presente trabalho, em 60 minutos de tratamento os autores observaram 20% e 40% para os catalisadores ZnO e TiO_2 , respectivamente. Apesar do menor grau de mineralização os autores obtiveram uma maior redução da toxicidade aguda (teste MicrotoxTM), cerca de 60% para ambos os catalisadores.

Gouveia e colaboradores (2000) também empregaram o processo UV/ ZnO na degradação do efluente papeleiro Kraft E1, apesar de observarem uma descoloração de 100% em 100 minutos de tratamento, a redução de COT foi praticamente desprezível, somente 7% para o mesmo tempo de tratamento. Por outro lado, os autores reportam uma excelente redução da toxicidade frente à bactéria *E. coli*, cerca de 90% após somente 30 minutos de tratamento.

Yeber e colaboradores (1999) compararam os processos UV/ TiO_2 , UV/ ZnO e UV/ ZnO/O_3 no tratamento do efluente papeleiro. Os autores observaram um desempenho bastante semelhante para todos os processos, ao contrário de Kuo (1999) que observou um forte efeito sinérgico entre os processos fotocatalítico e de ozonização na degradação de fenóis.

II.4.1.3 – Processos eletroquímicos e fotoeletroquímico

II.4.1.3.1 – Degradação de fenol pelos processos eletroquímicos e fotoeletroquímico

A fim de se avaliar o emprego dos processos eletroquímico e fotocatalítico-eletroquímico no tratamento de efluentes, estudou-se a eficiência destes processos na degradação de fenol.

Na Figura 2.29 são apresentados os resultados relativos à degradação do fenol, em solução aquosa, comparando os tratamentos fotoquímico (lâmpada UV de 125W), eletroquímico (20 mA cm^2) e a combinação simultânea de ambos.

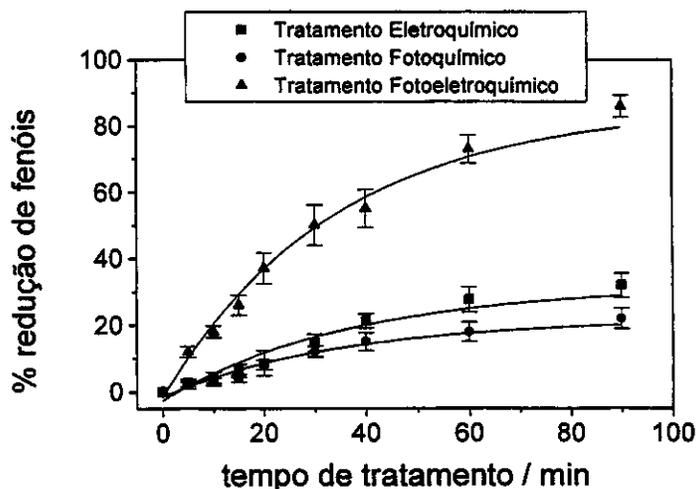


Figura 2.29 - Degradação de fenol ($C_0 = 50 \text{ mg L}^{-1}$), eletrólito suporte Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo $\text{Ti/Ru}_{0,3}\text{Ti}_{0,7}\text{O}_2$, área de 100 cm^2 , densidade de corrente 20 mA cm^{-2} , lâmpada de mercúrio de 125 W .

Aplicando-se o processo eletroquímico isoladamente observou-se redução de fenol na ordem de 20% durante 90 minutos de tratamento. Com aplicação da radiação UV isoladamente (processo fotoquímico, com catalisador imobilizado sobre a superfície do eletrodo) observou-se, no mesmo período, uma redução de 30%. Um aumento significativo na redução de fenóis pôde ser observado com a aplicação dos dois processos simultaneamente (processo fotoeletroquímico), onde obteve-se uma redução na ordem de 85%. Comparando a soma dos valores conseguidos quando os processos eletroquímico e fotoquímico são aplicados isoladamente com os alcançados pelo processo fotoeletroquímico, verifica-se a existência de um importante efeito sinérgico. Tal efeito também pode ser percebido acompanhando a redução do fenol por meio da diminuição de COT, conforme é mostrado na Figura 2.30. Nesta figura, observa-se uma redução da matéria orgânica na ordem de 40%, quando somados os resultados dos processos

isolados. Empregando-se simultaneamente as duas metodologias, a redução de COT obtida foi de 75%. Estes resultados mostram claramente uma interação entre a radiação UV e o processo eletroquímico promovendo um forte efeito sinérgico.

O efeito da interação da radiação UV e o processo eletroquímico pode ser justificado por um acréscimo de corrente, deslocando o potencial de evolução de oxigênio para valores menos positivos. Na Figura 2.31 é mostrada a corrente obtida para os processos de eletrólise e foto-eletrólise. A diferença entre os valores de corrente, obtidos num mesmo potencial, indica a densidade de fotocorrente gerada pelo processo de irradiação UV. A corrente do processo simultâneo foi cerca de 20% superior à obtida pelo processo eletrolítico.

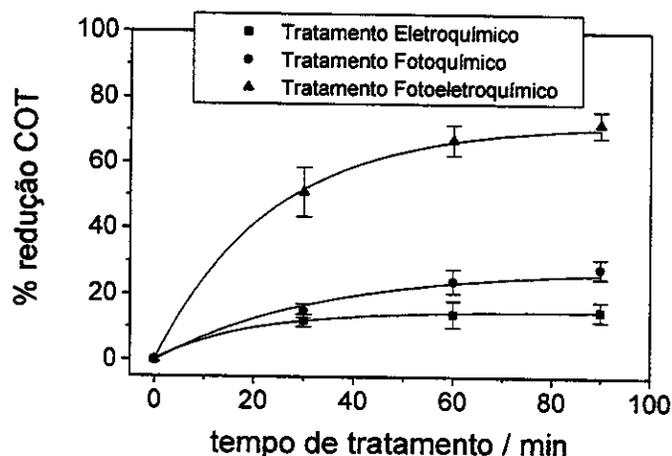


Figura 2.30 – Redução carbono orgânico total ($C_0 = 50 \text{ mg L}^{-1}$ de fenol), eletrólito suporte Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo $\text{Ti/Ru}_{0,3}\text{Ti}_{0,7}\text{O}_2$, área de 100 cm^2 , densidade de corrente 20 mA cm^{-2} , lâmpada de mercúrio de 125 W .

A maior magnitude da corrente no processo fotoeletroquímico pode ser devido à migração dos elétrons da banda de condução do semicondutor imobilizado no eletrodo. A aplicação de um potencial pode provocar o impedimento da recombinação do par elétron/lacuna do semicondutor, formando sítios oxidantes, que favorecem a reação de oxidação da água, produzindo o radical hidroxila. Um dos principais fatores limitantes do processo fotocatalítico está representado pela reação de recombinação com a eliminação da energia de

bandgap que para o TiO_2 , é de aproximadamente 3,2 eV. Esta reação compete, com muita vantagem, com a oxidação dos substratos, podendo tornar inativa a fotocatalise. Apesar do TiO_2 estar imobilizado no eletrodo na forma rufílica (considerada fotocataliticamente inativa) trabalhos recentes têm demonstrado que esta estrutura também pode promover o processo fotocatalítico (Wong e col., 1995; Pelegrini e col., 2000).

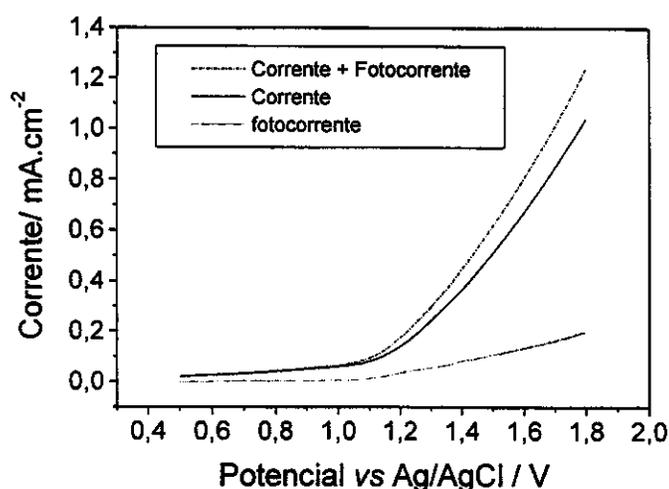


Figura 2.31 – Voltamograma cíclico da solução de fenol 50 mg L^{-1} , eletrólito suporte Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com e sem irradiação (lâmpada de 125 W). Eletrodo $\text{Ti/Ru}_{0,3}\text{Ti}_{0,7}\text{O}_2$, área de 100 cm^2 . Velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} .

A densidade de corrente e a potência da lâmpada de UV são fatores que podem favorecer o processo de oxidação fotoeletroquímico.

Variando-se as potências das lâmpadas de 80 para 125 W e a densidade de corrente de 5 para 20 mA cm^{-2} observou-se degradações de fenol similares, no decorrer de 90 minutos de tratamento (Figura 2.32). Todavia reduções da matéria orgânica, atestadas pela diminuição de COT, mostraram que, no processo em que se empregou uma lâmpada com maior potência, assim como uma densidade de corrente maior, houve uma melhor mineralização do substrato (Figura 2.33). Pode-se observar que, em um período de até 30 minutos de tratamento, no processo

que emprega lâmpadas de 125 W e densidade de corrente de 20 mA cm^{-2} obteve-se um rendimento de aproximadamente 20% superior aos outros processos.

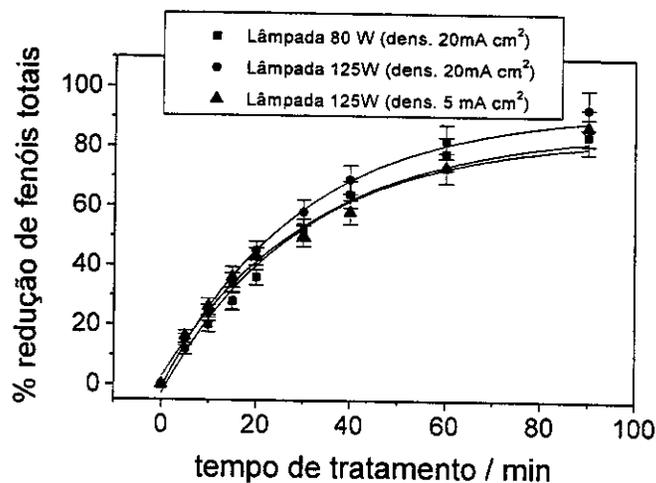


Figura 2.32 – Degradação fotoeletroquímica de fenol ($C_0 = 50 \text{ mg L}^{-1}$), eletrólito suporte Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo $\text{Ti/Ru}_{0,3}\text{Ti}_{0,7}\text{O}_2$, área de 100 cm^2 .

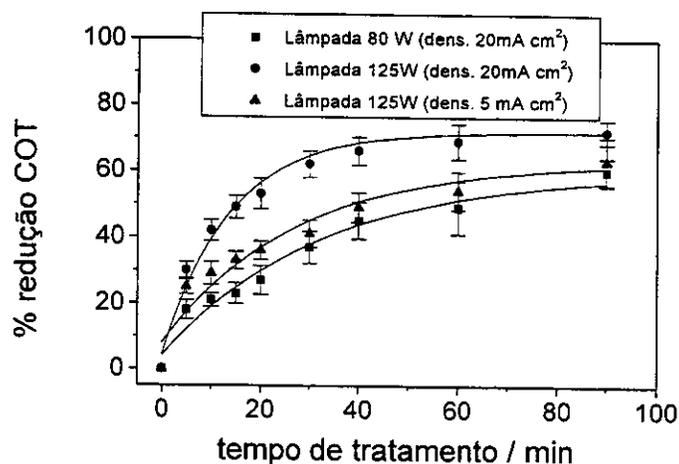


Figura 2.33 – Redução fotoeletroquímica de fenol ($C_0 = 50 \text{ mg L}^{-1}$), eletrólito suporte Na_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Eletrodo $\text{Ti/Ru}_{0,3}\text{Ti}_{0,7}\text{O}_2$, área de 100 cm^2 .

A oxidação anódica de um composto orgânico em fase aquosa envolve a transferência de um átomo de oxigênio da molécula de água para o substrato. A

primeira etapa da descarga da água fornece radicais hidroxila (ou um átomo de oxigênio) absorvido no eletrodo. Em aplicações de despoluição escolhem-se ânodos de alto sobrepotencial de oxigênio, estendendo, desta maneira, a faixa do potencial de oxidação antes da evolução do gás oxigênio, favorecendo a degradação de uma grande quantidade de espécie de moléculas orgânicas.

II.4.1.3.2 – Emprego dos processos eletroquímico e fotoeletroquímico no tratamento do efluente papeleiro

Com base nos resultados promissores verificados durante a degradação fotoeletroquímica de fenol, avaliou-se o emprego dos processos eletroquímico, fotoquímico e fotoeletroquímico na degradação das espécies orgânicas presentes no efluente papeleiro Kraft E₁.

Na Figura 2.34 são mostrados os resultados obtidos empregando estes três processos. Aplicando o processo eletroquímico isoladamente observou-se uma descoloração na ordem de 53% durante 90 minutos de tratamento. Com aplicação da radiação UV isoladamente (processo fotoquímico, com o catalisador imobilizado sobre a superfície do eletrodo) observou-se, no mesmo período, uma redução de somente 24%. Um aumento significativo na descoloração do efluente pôde ser observado com a aplicação dos dois processos simultaneamente (processo fotoeletroquímico), onde obteve-se uma descoloração na ordem de 90%. Estes resultados mostram mais uma vez uma interação entre a radiação UV e o processo eletroquímico promovendo um forte efeito sinérgico. Tal efeito também pode ser percebido acompanhando a redução de carbono orgânico total, onde o processo fotoeletroquímico mineralizou cerca de 30% da matéria orgânica do efluente. Os processos eletroquímico e fotoeletroquímico demonstram uma excelente redução das espécies fenólicas, com 100% de degradação destes compostos para 60 minutos de tratamento. Este resultado indica que o processo eletroquímico governa a redução de fenóis durante o processo fotoeletroquímico.

O processo fotoeletroquímico também apresentou uma boa redução da toxicidade aguda frente à bactéria *E.coli*, em 60 minutos de tratamento a

toxicidade do efluente foi reduzida em cerca de 40%.

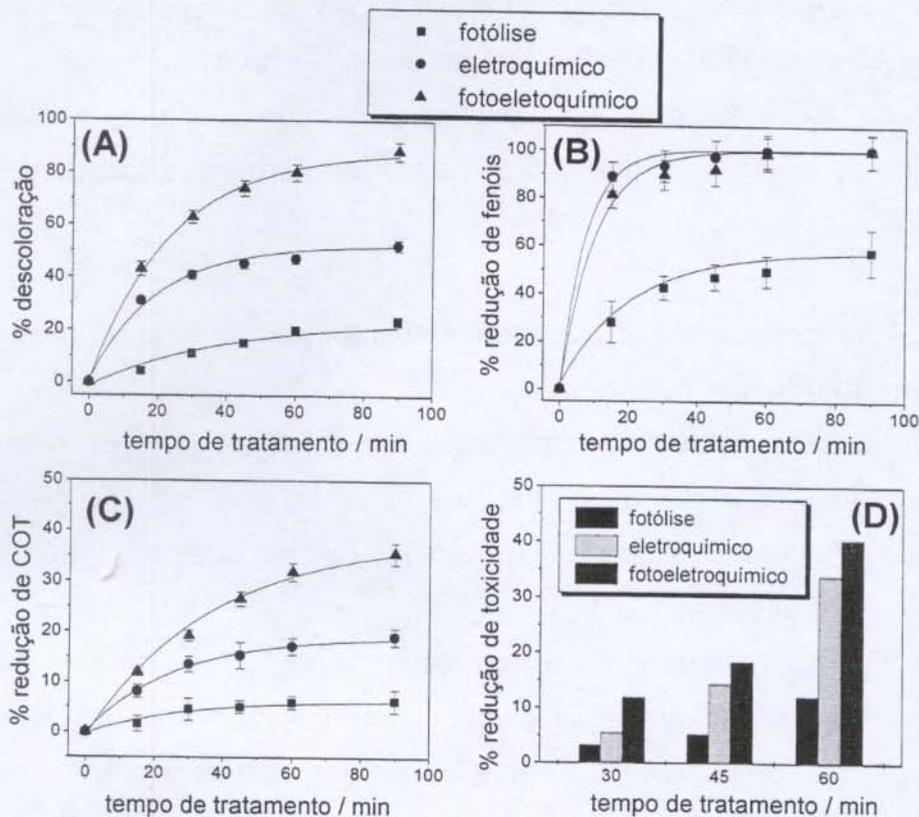


Figura 2.34 - Degradção do efluente papeleiro empregando-se os processos fotolítico, eletroquímico e fotoeletroquímico. Eletrodo $Ti/Ru_{0,3}Ti_{0,7}O_2$, área de 100 cm^2 , lâmpada de 125 W . (A) descoloração, (B) redução de fenóis totais, (C) redução de carbono orgânico total e (D) redução de toxicidade aguda frente à bactéria *E. coli*. $C_{0(COT)} = 970\text{ mg L}^{-1}$; $C_{0(\text{fenóis})} = 34\text{ mg L}^{-1}$; $Abs_0 = 0,676$; $t_0 = 57\%$ de inibição no crescimento da bactéria.

II.4.2 – TESTE DE TOXICIDADE FRENTE A ALGA *Selenastrum capricornutum*

Os resultados negativos na redução de toxicidade frente à bactéria *E. coli*, obtidos pelos processos oxidativos que empregaram peróxido de hidrogênio, levaram a necessidade da realização de um novo método de avaliação da toxicidade do efluente papeleiro.

As algas são os principais representantes dos produtores primários em ambientes aquáticos, tanto marinhos como em águas doces (Saenz e col., 1997). Assim, a importância do uso de algas como indicadores biológicos deve-se, principalmente, à sua posição na cadeia alimentar do ecossistema. Como

produtores primários, elas situam-se na base da cadeia alimentar e as alterações ocorridas na dinâmica de sua comunidade podem afetar os níveis superiores do ecossistema (Lewis, 1995).

Deste modo, realizou-se um estudo empregando-se a alga *Selenastrum capricornutum* com o intuito de se caracterizar melhor a toxicidade do efluente papeleiro Kraft E1 em seu estado bruto e após os diferentes processos de tratamento.

Na Figura 2.35 é apresentada a porcentagem de inibição no crescimento da alga *S. capricornutum* provocada pelo efluente bruto e após 60 minutos de diferentes tratamentos.

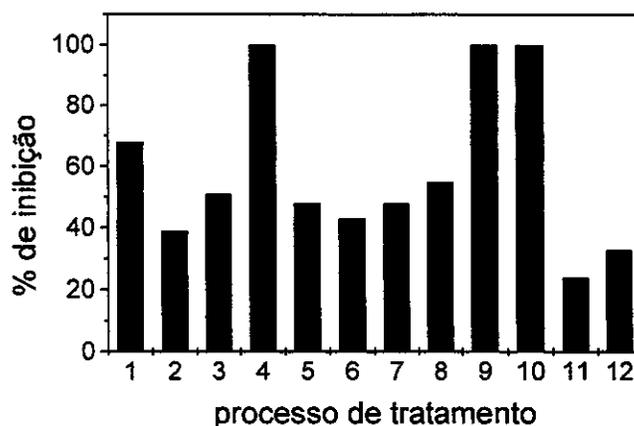


Figura 2.35 – Porcentagem de inibição do crescimento da alga *S. capricornutum*. Efluente bruto (1), $O_3/pH11$ (2), $O_3/pH3$ (3), $O_3/H_2O_2/pH11$ (4), $O_3/UV/pH11$ (5), $UV/ZnO/O_2$ (6), $UV/TiO_2/O_2$ (7), $UV/ZnO/O_3$ (8), $UV/ZnO/H_2O_2$ (9), UV/H_2O_2 (10), eletroquímico (11) e fotoeletroquímico (12).

Tal como no teste de toxicidade empregando-se a bactéria *E. coli*, os processos $O_3/H_2O_2/pH11$, $UV/ZnO/H_2O_2$ e UV/H_2O_2 não promoveram uma redução da toxicidade, sendo verificado um aumento na toxicidade do efluente após estes tratamentos. Estes resultados indicam que os processos oxidativos via peróxido de hidrogênio levam a produtos mais tóxicos que o efluente original. Em relação aos demais processos, os dois testes de toxicidade empregados mostraram uma boa intercorrelação.

II.4.3 – AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DOS PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS

Nesta etapa do projeto buscou-se avaliar a eficiência dos processos de tratamento por meio de parâmetros cinéticos. Entretanto, as reações envolvidas na degradação da matéria orgânica presente no efluente apresentam mecanismos extremamente complexos, que inviabilizam um estudo cinético rigoroso. Apesar disto, as reduções de cor, fenóis totais e carbono orgânico total em função do tempo de tratamento apresentaram um perfil típico de reações de primeira ordem, conforme é mostrado na Figura 2.36, onde mais uma vez pode-se observar os resultados obtidos na degradação do efluente empregando-se os processos de ozonização.

Desta forma, pode-se fazer uma abordagem assumindo-se que os processos de tratamento propostos conduzem a reações de degradação que seguem uma cinética de pseudo-primeira ordem. Assim, estas reações podem ser representadas pela expressão:



onde:

P simboliza o parâmetro de avaliação (por exemplo, fenóis);

P_{oxid} simboliza os intermediários e/ou produtos finais;

k é a constante de velocidade;

R pode ser hv, OH[•], O₃ ou e⁻, dependendo do processo empregado.

Como a concentração de R geralmente está estacionária com relação à de P, pode-se assumir que a cinética da reação, só depende da taxa de remoção de P. Estas aproximações são bastante freqüentes e muito utilizadas em estudos cinéticos similares (Beltran-Heredia e col., 2001b; Benitez e col., 2000).

Assim a cinética de degradação promovida pelos processos oxidativos estudados pode ser expressa de acordo com a equação 2.13:

$$dP/dt = k_{\text{exp}} P \quad \text{eq. 2.13}$$

onde k_{exp} é a constante de pseudo-primeira ordem.

Esta constante pode ainda, ser avaliada por meio da seguinte expressão:

$$-\ln(P/P_0) = k_{exp} t \quad \text{eq. 2.14}$$

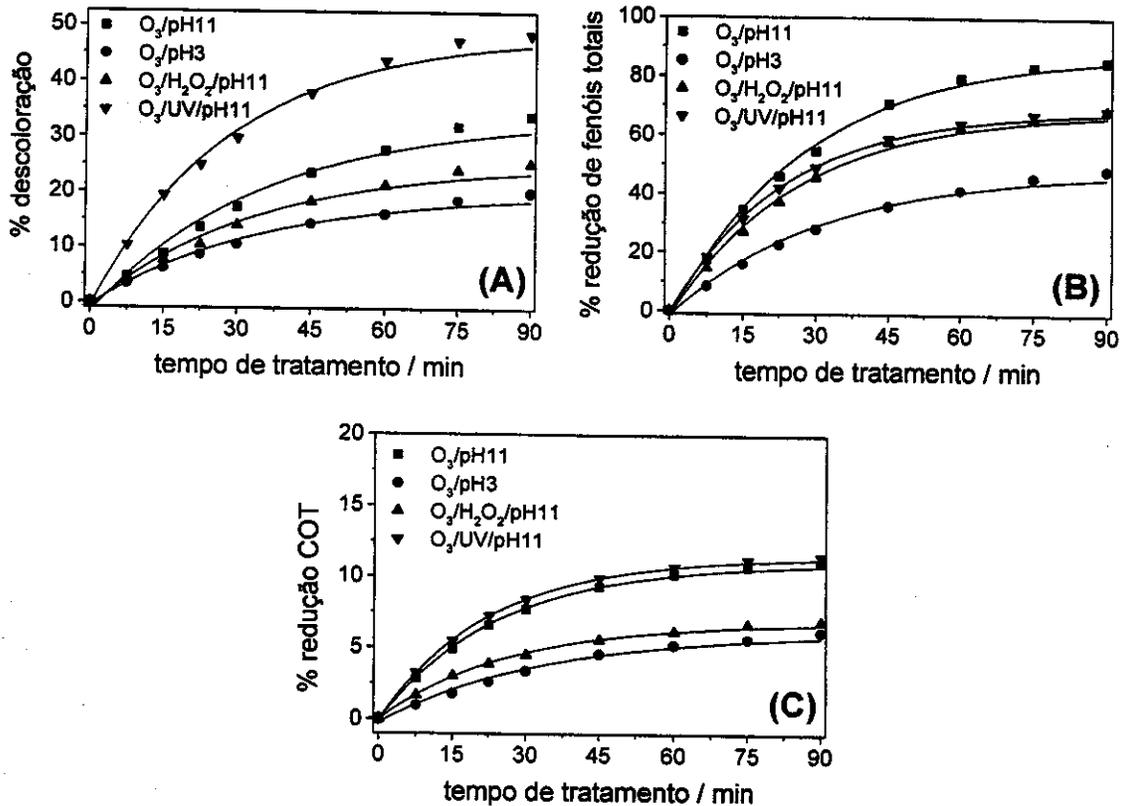


Figura 2.36 – Descoloração (A), redução de fenóis totais (B) e de carbono orgânico total (C) em função do tempo de tratamento com os diferentes processos de ozonização.

Nas Figuras 2.37, 2.38 e 2.39 são mostrados os gráficos utilizados para calcular a constante de pseudo-primeira ordem em relação à degradação de fenóis totais obtida com os diferentes processos oxidativos avançados estudados.

A partir da regressão linear destas curvas foi possível obter a constante cinética de pseudo-primeira ordem para a redução da quantidade de fenóis totais presente no efluente promovida por cada processo de tratamento. Cálculos similares também foram executados para determinar a constante cinética em relação aos parâmetros de descoloração e redução de carbono orgânico total,

conforme são apresentadas nas Tabelas 2.13, 2.14 e 2.15.

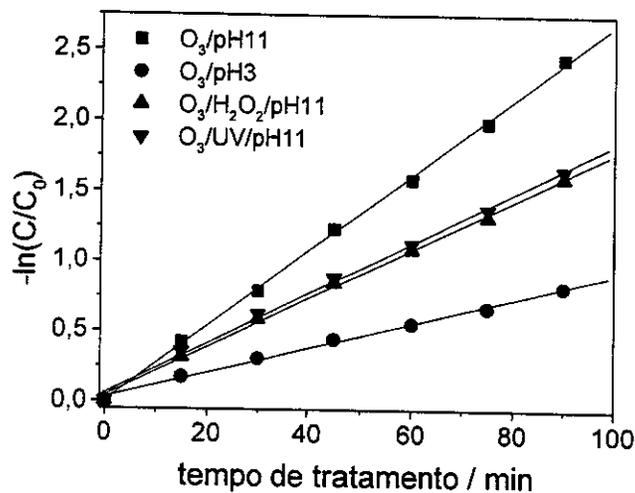


Figura 2.37 – Determinação da constante de pseudo-primeira ordem para a redução de fenóis totais promovida pelos processos de ozonização.

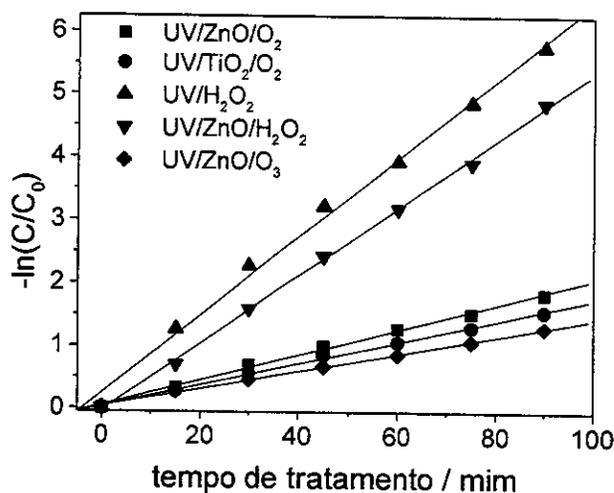


Figura 2.38 – Determinação da constante de pseudo-primeira ordem para a redução de fenóis totais promovida pelos processos fotoquímicos e fotocatalíticos.

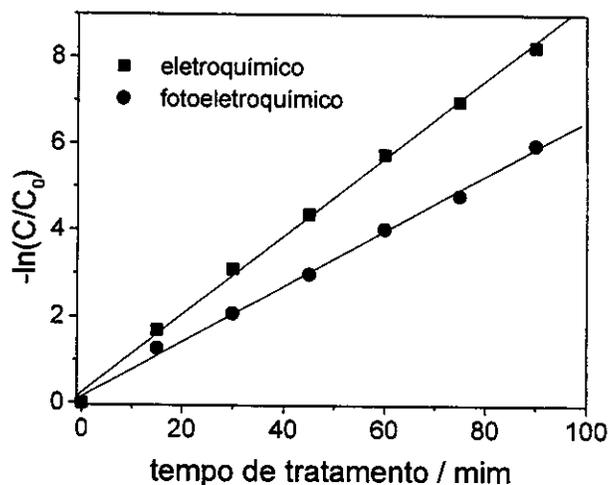


Figura 2.39 – Determinação da constante de pseudo-primeira ordem para a redução de fenóis totais promovida pelos processos eletroquímico e fotoeletroquímico.

Tabela 2.13 – Constante de pseudo-primeira ordem, coeficiente de correlação e tempo de meia vida para a redução de fenóis totais presentes no efluente papeleiro Kraft E1 obtidos pelos diferentes processos oxidativos estudados.

processo	$k_{exp} \times 10^3$ (min^{-1})	(r^2)	$t_{1/2}$ (min)
O ₃ /pH11	26,82 ± 0,33	0,9996	25,9
O ₃ /pH3	8,81 ± 0,25	0,9982	78,7
O ₃ /H ₂ O ₂ /pH11	17,44 ± 0,34	0,9991	39,8
O ₃ /UV /pH11	17,80 ± 0,44	0,9985	38,9
UV/ZnO/O ₂	20,15 ± 0,56	0,9981	34,5
UV/TiO ₂ /O ₂	17,12 ± 0,37	0,9988	40,5
UV/H ₂ O ₂	62,23 ± 2,10	0,9973	11,1
UV/ZnO/H ₂ O ₂	53,80 ± 0,78	0,9995	12,9
UV/ZnO/O ₃	14,04 ± 0,27	0,9991	49,5
Eletroquímico	90,40 ± 1,90	0,9989	7,7
Fotoeletroquímico	64,11 ± 1,60	0,9985	10,8

Tabela 2.14 – Constante de pseudo-primeira ordem, coeficiente de correlação e tempo de meia vida para a descoloração do efluente papeleiro Kraft E1 obtidos pelos diferentes processos oxidativos estudados.

processo	$k_{exp} \times 10^3$ (min^{-1})	(r^2)	$t_{1/2}$ (min)
O ₃ /pH11	5,43 ± 0,15	0,9981	128,3
O ₃ /pH3	3,01 ± 0,07	0,9987	231,0
O ₃ /H ₂ O ₂ /pH11	4,10 ± 0,05	0,9997	169,0
O ₃ /UV/pH11	9,72 ± 0,22	0,9987	71,4
UV/ZnO/O ₂	41,12 ± 0,98	0,9986	16,9
UV/TiO ₂ /O ₂	36,93 ± 0,66	0,9992	18,8
UV/H ₂ O ₂	15,55 ± 0,22	0,9995	44,7
UV/ZnO/H ₂ O ₂	26,61 ± 0,47	0,9992	26,1
UV/ZnO/O ₃	30,20 ± 0,47	0,9994	22,9
Eletroquímico	17,90 ± 0,33	0,9991	38,7
Fotoeletroquímico	25,72 ± 0,53	0,9989	27,0

Tabela 2.15 – Constante de pseudo-primeira ordem, coeficiente de correlação e tempo de meia vida para a redução de carbono orgânico total presente no efluente papeleiro Kraft E1 obtidos pelos diferentes processos oxidativos estudados.

processo	$k_{exp} \times 10^3$ (min^{-1})	(r^2)	$t_{1/2}$ (min)
O ₃ /pH11	2,14 ± 0,04	0,9991	330,2
O ₃ /pH3	0,93 ± 0,03	0,9982	772,7
O ₃ /H ₂ O ₂ /pH11	1,21 ± 0,04	0,9976	577,5
O ₃ /UV/pH11	2,52 ± 0,06	0,9986	277,2
UV/ZnO/O ₂	3,80 ± 0,11	0,9981	182,4
UV/TiO ₂ /O ₂	5,72 ± 0,14	0,9986	121,6
UV/H ₂ O ₂	33,21 ± 0,78	0,9986	20,9
UV/ZnO/H ₂ O ₂	25,15 ± 0,65	0,9983	27,6
UV/ZnO/O ₃	6,26 ± 0,10	0,9993	111,8
Eletroquímico	4,12 ± 0,04	0,9997	169,1
Fotoeletroquímico	6,76 ± 0,10	0,9994	103,4

A análise destas constantes cinéticas mostra claramente que os processos fotocatalíticos foram os mais eficientes na descoloração do efluente papeleiro Kraft E1, possuindo a seguinte ordem de eficiência: $UV/ZnO/O_2 > UV/TiO_2/O_2 > UV/ZnO/O_3 > UV/ZnO/H_2O_2 >>>$ demais processos.

Com relação à redução de fenóis totais, os processos eletroquímicos e fotoquímicos com presença de peróxido de hidrogênio foram significativamente mais eficientes que os outros processos empregados. Ordem de eficiência na redução de fenóis totais: eletroquímico $>>$ fotoeletroquímico $> UV/H_2O_2 > UV/ZnO/H_2O_2 >>>$ demais processos.

Os tratamentos fotoquímicos com presença de peróxido de hidrogênio também se destacaram na mineralização da matéria orgânica presente no efluente papeleiro, apresentando-se como os únicos processos que promoveram uma redução significativa de carbono orgânico total.

II.4.4 – AVALIAÇÃO DO CUSTO DE TRATAMENTO DO EFLUENTE PAPELEIRO

A eficiência na remediação do efluente papeleiro Kraft E1 promovida pelos diferentes processos de tratamento estudados também foi avaliada sob o ponto de vista econômico. Partindo-se das constantes cinéticas de pseudo-primeira ordem pode-se calcular por meio da equação 2.14 (página 79), o tempo de tratamento requerido por cada processo para uma redução de 90% na quantidade de fenóis totais e carbono orgânico total presentes no efluente papeleiro.

Estes tempos foram utilizados para se determinar o consumo de energia, em $kW h^{-1}$, e de gás oxigênio/ozônio, em $m^3 h^{-1}$. Na Tabela 2.16 são apresentados os tempos e os custos de tratamento para se promover a redução de 90% de fenóis totais e carbono orgânico total. Os gastos com reagentes (por exemplo: H_2O_2) também foram considerados no cálculo destes custos. Entretanto, os gastos com o desenvolvimento, construção e montagem dos reatores não foram incluídos nesta estimativa. Como ponto de referência, cita-se que a indústria de papel e celulose, fornecedora do efluente estudado, gasta cerca de US\$ 0,05 por metro

cúbico de efluente tratado pelo processo biológico de lagoa aerada. Cabe ressaltar que os parâmetros de tratabilidade são menos rigorosos.

Assim, relativamente o processo eletroquímico apresentou o melhor custo tanto para a redução de fenóis totais como para a redução de carbono orgânico total. Em relação à redução de fenóis o processo de O₃/pH11 também se mostrou economicamente competitivo; para a redução de carbono orgânico os processos UV/H₂O₂ e UV/ZnO/H₂O₂ também merecem destaque.

Tabela 2.16 – Custo dos diferentes processos de remediação para a remoção de 90% de fenóis totais e de carbono orgânico total.

processo	Fenóis totais Redução de 90%		Carbono orgânico total Redução de 90%	
	tempo (min)	Custo (US\$ m ⁻³)	tempo (min)	Custo (US\$ m ⁻³)
O ₃ /pH11	85,9	2,25	1096,7	28,79
O ₃ /pH3	261,7	6,87	2567,7	67,40
O ₃ /H ₂ O ₂ /pH11	132,4	28,48	1919,2	75,38
O ₃ /UV/pH11	129,4	13,51	921,2	96,15
UV/ZnO/O ₂	114,6	14,37	606,1	76,01
UV/TiO ₂ /O ₂	134,7	16,89	404,0	50,67
UV/H ₂ O ₂	37,0	29,64	69,7	33,70
UV/ZnO/H ₂ O ₂	42,8	30,37	91,8	36,51
UV/ZnO/O ₃	164,5	27,21	371,5	61,44
Eletroquímico	25,5	0,31	561,7	6,74
Fotoeletroquímico	35,9	4,92	343,7	47,09

Contudo, a análise dos dados apresentados na Tabela 2.16 deve levar em consideração um compromisso entre o custo e o tempo de tratamento. Assim, embora o processo eletroquímico tenha apresentado um custo aceitável para, por exemplo, promover a mineralização da matéria orgânica presente no efluente papeleiro, o tempo de tratamento requerido para esta mineralização (cerca de 9

horas) torna-o praticamente inviável; já que o processo de produção de polpa e celulose gera uma grande quantidade de efluentes, uma indústria de médio/grande porte produz mais de $250 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ de efluente Kraft E1 (Pelegri, 1999).

Deste modo, a avaliação global da razão custo/benefício de cada processo de tratamento foi implementada por meio de um índice de eficiência, que consiste na média geométrica das respostas normalizadas de todos os parâmetros de interesse (tempo de tratamento, custo, eficiência da remoção de cor, fenóis totais, carbono orgânico total e toxicidade), conforme mostra a equação 2.15. Índices de eficiência com valores próximos a 1, indicam uma maior razão custo/benefício. A Figura 2.40 mostra o valor deste índice para os todos processos oxidativos estudados.

$$IE = (t_1 \times t_2 \times t_3 \times C_m \times r_{tx})^{1/5} \quad \text{eq. 2.15}$$

onde:

IE = índice de eficiência;

t_1 = tempo de tratamento para promover a descoloração do efluente em 90%;

t_2 = tempo de tratamento para promover a remoção de 90% de fenóis totais;

t_3 = tempo de tratamento para promover a remoção de 90% da matéria orgânica;

C_m = custo médio para a redução de 90% da quantidade de fenóis totais e carbono orgânico total;

r_{tx} = redução da toxicidade do efluente em 90 minutos de tratamento.

todos estes parâmetros foram normalizados para valores entre 0 e 1.

Este índice confirma que os processos UV/ZnO/H₂O₂, UV/H₂O₂, eletroquímico e fotoeletroquímico foram os mais efetivos na remediação do efluente papeleiro Kraft E1, com destaque para os dois últimos processos, pois estes proporcionaram uma redução efetiva na toxicidade do efluente.

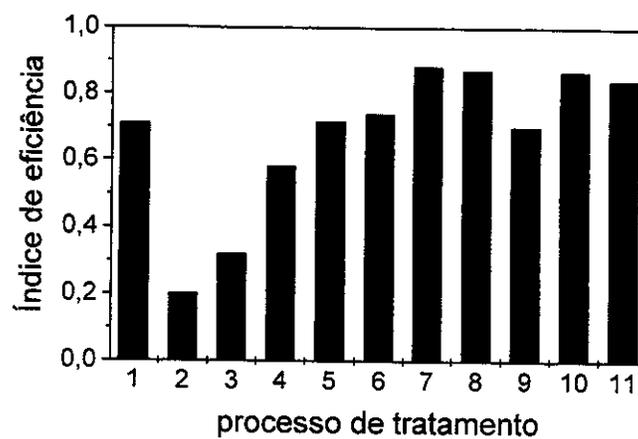


Figura 2.40 – Índice de eficiência para os processos: $O_3/pH11$ (1), $O_3/pH3$ (2), $O_3/H_2O_2/pH11$ (3), $O_3/UV/pH11$ (4), $UV/ZnO/O_2$ (5), $UV/TiO_2/O_2$ (6), $UV/ZnO/H_2O_2$ (7), UV/H_2O_2 (8), $UV/ZnO/O_3$ (9), eletroquímico (10) e fotoeletroquímico (11).

II.5 – CONCLUSÕES PARCIAIS

O processo de ozonização indireta, via espécies radicalares, apresentou-se mais eficiente do que o ataque direto das moléculas de ozônio aos compostos poluentes do efluente papeleiro. Dentre os processos de ozonização estudados, os melhores resultados foram obtidos empregando-se a ozonização em meio alcalino, com ou sem a presença de radiação ultravioleta. Estes processos foram especialmente eficientes na redução de fenóis totais e da toxicidade do efluente papeleiro.

A otimização do processo fotocatalítico demonstrou que, de uma maneira global, o catalisador ZnO pode ser empregado na fotodegradação do efluente papeleiro com resultados similares aos obtidos com TiO₂, estes resultados são importantes, principalmente do ponto de vista econômico, uma vez que o custo do ZnO é menor do que TiO₂. De fato, o óxido de zinco apresentou uma degradação de grupos cromóforos e de espécies fenólicas ligeiramente superiores à obtida com TiO₂. Contudo, este último catalisador mostrou-se mais eficiente na mineralização da matéria orgânica presente no efluente.

A utilização de processos fotoquímicos com peróxido de hidrogênio conduziu a excelentes resultados quanto à redução no teor de fenóis totais e carbono orgânico presentes no efluente papeleiro. Entretanto, esta redução não foi refletida na toxicidade do efluente. O processo fotocatalítico combinado com ozônio apresentou a melhor redução de toxicidade aguda, com uma diminuição de quase 90% em 60 minutos de tratamento.

Em todos os processos de remediação que utilizaram peróxido de hidrogênio, não foi verificado nenhuma diminuição da toxicidade frente à bactéria *E. coli* ou frente à alga fluvial *S. capricornutum*, sendo que para alguns destes processos houve um pequeno aumento na toxicidade do efluente após o tratamento. Estes resultados indicam que o peróxido de hidrogênio remanescente, ou algum sub-produto do tratamento, possui uma toxicidade intrínseca frente a estes organismos.

Os processos eletroquímico e fotoeletroquímico apresentaram excelentes

resultados quanto à redução de fenóis totais e descoloração do efluente papeleiro. No tratamento fotoeletroquímico, foi observado um forte efeito sinérgico entre os processos eletroquímico e fotoquímico.

A avaliação do custo de cada processo de remediação estudado mostra que, de um modo geral, estas metodologias apresentam um elevado custo de tratamento, sendo, ainda, necessários muitos estudos de otimização e de aperfeiçoamento destas técnicas, para as mesmas mostrarem-se competitivas frente aos métodos biológicos atualmente utilizados.

Avaliando-se globalmente os processos estudados, concluiu-se que os processos UV/ZnO/H₂O₂, UV/H₂O₂, eletroquímico e fotoeletroquímico foram os mais efetivos na remediação do efluente papeleiro Kraft E1, com destaque para os dois últimos processos que proporcionaram uma redução efetiva na toxicidade do efluente.

Apesar dos bons resultados alcançados, a implementação destes processos em escala industrial apresenta alguns problemas. Desenvolver e otimizar reatores em escala industrial, para utilizar os processos de ozonização e fotocatalítico, constituem em grandes problemas para a implementação destes processos. O uso da luz ultravioleta encarece muito o tratamento. Construir estações de tratamento que utilizem luz solar continua sendo um desafio (Nogueira e Jardim, 1998; Prevot e Pramauro, 1999), assim como a busca de novos catalisadores que absorvam maior porcentagem da luz solar. A imobilização do semicondutor sem perdas na atividade fotocatalítica ainda é muito estudada, pois em suspensões ocorrem importantes perdas de penetração de luz (Peralta-Zamora e col., 1997) e há necessidade de uma etapa de separação das finas partículas do catalisador (Kagaya e col., 1999).

O processo de tratamento de rejeitos industriais demanda um grande conhecimento das técnicas existentes e do próprio efluente que se pretende tratar, devido à extrema complexidade dos efluentes industriais e à diversidade de compostos encontrados neles. Este estudo sobre alguns processos de tratamento de efluentes mostra inúmeras opções que podem ser utilizadas na eliminação de substâncias contaminantes. Entretanto, nenhuma destas técnicas é capaz de

apresentar-se como a única alternativa para o processo de remediação do efluente papeleiro. O ideal seria combinar os processos de tratamento de maneira que possibilitassem o estado de descarga zero de material orgânico. Contudo, isto ainda é uma meta que demandará muita investigação.

II.6 – REFERÊNCIAS

- Acero, J.L.; Haderlein, S.B.; Schmidt, T.C.; Suter, M.J.F.; Von Gunten, U.; *Environ. Sci. Technol.*, 35 (2001) 4252.
- Adamson, D.T.; Parkin, G.F.; *Water Res.*, 33 (1999) 1482.
- Addink, R.; Espourteille, F.; Altwicker, M.; *Environ. Sci. Technol.*, 32 (1998a) 3356.
- Addink, R.; Govers, H.A.J.; Olie, K.; *Environ. Sci. Technol.*, 32 (1998b) 1888.
- Adewuyi, Y.G.; *Ind. Eng. Chem. Res.*, 40 (2001) 4681.
- Aggelis, G.G.; Gavala, H.N.; Lyberatos, G.; *J. Agric. Eng. Res.*, 80 (2001) 283.
- Aitken, M.D.; Massey, I.J.; Chen, T.; Heck, P.E.; *Water Res.*, 28 (1994) 1879.
- Aksu, Z.; Yener, J.; *Waste Manag.*, 21 (2001) 695.
- Alleman, B.C.; Logan, B.E.; Gilbertson, R.L.; *Water Res.*, 29 (1995) 61.
- Alnaizy, R.; Akgerman, A.; *Adv. Environ. Res.*, 4 (2000) 233.
- Alonso, E.; Santos, A.; Solis, G.J.; Riesco, P.; *Desalination*, 141 (2001) 39.
- Amadelli, R.; Bonato, T.; De Batista, A.; Velichenko, A.; *Proc. - Electrochem. Soc.*, 1 (1998) 27.
- Angelo, R.S.; *Tese de Doutorado*, Instituto de Química/UNICAMP (1999).
- Angenent, L.T.; Banik, G.C.; Sung, S.W.; *Water Environ. Res.*, 73 (2001) 567.
- Annachhatre, A.P.; Amornkaew, A.; *Water Environ. Res.*, 73 (2001) 622.
- APHA - Standard Methods for examination of water and wastewater, 17 ed. New York, American Publication Health Association N°5250B (1989) 5.68-5.69.
- Archibald, F.S.; Valeanu L.; Leichtle, G.; Guilbault, B.; *Water Qual. Res. J.*, 33 (1998) 347.
- Armenante, P.M.; Kafkewitz, D.; Lewandowski, G.A.; Jou, C.; *Water Res.*, 33 (1999) 681.
- Babay, P.A.; Emilio, C.A.; Ferreyra, R.E.; Gautier, E.A.; Getter, R.T.; Litter, M.I.; *Water Sci. Technol.*, 44 (2001) 179.
- Bajpai, P.; *Adv. Appl. Microbiol.*, 48 (2001) 79.
- Baker, J.I.; Hites, R.A.; *Environ. Sci. Technol.*, 33 (1999) 14.
- Balcioğlu, I.A.; Arslan, I.; *Environ. Pollut.*, 103 (1998) 261.
- Barbusinski, K.; Filipek, K.; *Pol. J. Environ. Studies*, 10 (2001) 207.
- Barroca, M.J.M.C.; Seco, I.M.; Fernandes, P.M.M.; Ferreira, L.M.G.A.; Castro, J.A.A.M.; *Environ. Sci. Technol.*, 35 (2001) 4390.
- Beltran-Heredia, J.; Torregrosa, J.; Dominguez, J.R.; Peres, J.A.; *Chemosphere*, 42 (2001a) 351.
- Beltran, J.H.; Torregrosa, J.; Dominguez, J.R.; Peres, J.A.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 76 (2001b) 1235.
- Benitez, F.J.; Beltran-Heredia, J.; Acero, J.L.; Rubio, F.J.; *Chemosphere*, 41 (2000) 1271.
- Bitton, G.; *Wastewater Microbiology*; Wiley-Liss, New York (1994) 143.

- Bin, A.K.; Machniewski, P.; Sakowicz, R.; Ostrowska, J.; Zielinski, Z.; *Ozone Sci. Eng.*, 23 (2001) 343.
- Boncz, M. A.; Bruning, H.; Rulkens, W. H.; Sydhöfiter, E. J. R.; Harmsen, G. H.; Bijsterbosch, J. W.; *Water Sci. Technol.*, 35 (1997) 65.
- Boudenne, J.L.; Cerclier, O.; *Water Res.*, 33 (1999) 494.
- Boving, T.B.; Wareg, X.J.; Brusseau, M.L.; *Environ. Sci. Technol.*, 33 (1999) 764.
- Buitrón, G.; Gonzáles, A.; *Water Sci. Technol.*, 34 (1996) 289.
- Burton, S.G.; *Pure Appl. Chem.*, 73 (2001) 77.
- Buser, H. R.; *Environ. Sci. Technol.*, 29 (1995) 2133.
- Cabirol, N.; Jacob, F.; Perrier, J.; Fouillet, B.; Chambon, P.; *J. Biotechnol.*, 62 (1998) 133.
- Cains, P.W.; Mecaustland, L.J.; Fernandes, A.R.; Patrick, D.; *Environ. Sci. Technol.*, 31 (1997) 776.
- Cavicchioli, A.; Gutz, I.G.R.; *Anal. Chim. Acta*, 445 (2001) 127.
- CCPA, Technical Section Standard Method (1975) H5P.
- Céspedes, R.; Maturana, A.; Bumann, U.; Bronfman, M.; González, B.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46 (1996) 631.
- Chamarro, E.; Marco, A.; Esplugas, S.; *Water Res.*, 35 (2001) 1047.
- Chang, C.N.; Lin, J.G.; Wu, J.R.; Ma, Y.S.; *Water Sci. Technol.*, 34 (1996) 41.
- Chen, J.; Ollis, D.F.; Rulkens, W.H.; Bruning, H.; *Water Res.*, 33 (1999a) 661.
- Chen, J.; Ollis, D.F.; Rulkens, W.H.; Bruning, H.; *Water Res.*, 33 (1999b) 669.
- Chen, Y.X.; Sun, Z.S.; Yang, Y.; Ke, Q.; *J. Photochem. Photobiol. A*, 142 (2001) 85.
- Choi, W.; Hoffmann, M.R.; *Environ. Sci. Technol.*, 31 (1997) 89.
- Commandeur, L.C.M.; Eyseren, H.E.V.; Opmeer, M.R.; Govers, H.A.J.; Parsons, J. R.; *Environ. Sci. Technol.*, 29 (1995) 3038.
- Cox, C. D.; *Methods Enzymol.*, 235 (1994) 315.
- David, B.; Lhote, M.; Faure, V.; Boule, P.; *Water Res.*, 32 (1998) 2451.
- Davis, S.; Burns, R.G.; *Biodegradation*, 5 (1994) 13.
- Dewulf, J.; Van Langenhove, H.; De Smedt, E.; Geuens, S.; *Water Sci. Technol.*, 44 (2001) 173.
- Dezotti, M.; Innocentini-Mei, L.H.; Durán, N.; *J. Biotechnol.*, 43 (1995) 161.
- Distefano, T.D.; *Water Res.*, 44 (1999) 1688.
- D'Oliveira, J.; Al-Sayyed, G.; Pichat, P.; *J. Photochem. Photobiol. A*, 58 (1991) 99.
- Domenech, X.; Ayllon, J.A.; Peral, J.; *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 8 (2001) 285.
- Doong, R.; Wu, S.C.; *Water Res.*, 30 (1996) 577.
- Dos Santos, L.M.F.; Livingston, A.G.; *Water Res.*, 29 (1995) 179.
- Drijvers, D.; Van Langenhove, H.; Beckers, M.; *Water Res.*, 33 (1999) 1187.
- Duff, S.B.; Kennedy, K.J.; Brady, A.J.; *Water Res.*, 29 (1995) 645.
- Durán, N.; Espósito, E.; *Quim. Ind.*; 2 (1993) 17.

- Durán, N.; Espósito, E.; Innocentini-Mei, L.H.; Canhos, V.; *Biodegradation*, 5 (1994) 13.
- Durán, N.; Espósito, E.; Em *Microbiologia e Ambiental*, De Melo, I.S., Azevedo, J.L., Ed, Embrapa, Jaguariuna SP (1997) 169.
- Durán, N.; Espósito, E.; *Appl. Catal. B*, 28 (2000) 83.
- Durán, N.; In *Progress in Microbiol Ecology*, Martins, M.T., Ed.; Sociedade Brasileira de Microbiologia, São Paulo (1997) 543.
- Durán, N.; Sato, L. M.; Jardim, L. A.; Moraes, S. G.; De Conti, R.; *Bull. Soc. Chile. Quim.*, 43 (1998) 91.
- Durán, N., Santiago, M. F., Rodriguez, J., Parra, C., Oses, R. Freer, J.; Baeza, J.; *10th International Symposium of Wood and Pulping Chemistry*. Tokohama, Japão (1999), 57.
- Echigo, S.; Yamada, H.; Matsui, S.; Kawanishi, S.; Shishida, K.; *Water Sci. Technol.*, 34 (1996) 81.
- Edwards, W.; Leukes, W.D.; Rose, P.D.; Burton, S.G.; *Enzyme Microbiol. Technol.*, 25 (1999) 769.
- Ek, M.; Eriksson, K.E.; Proc. VVT Symp. 102, *Non Water Technol.*, 1 (1989) 435.
- Engwall, M.A.; Pignatello, J.J.; Grasso, D.; *Water Res.*, 33 (1999) 1151.
- Eric, J.R.; *Eletech. Res.*, (1998) 625.
- Espósito, E.; Innocentini-Mei, L.H.; Ferraz, A.; Canhos, V.; Durán, N.; *J. Biotechnol.*, 29 (1993) 219.
- Espósito, E.; Canhos, V.; Durán, N.; *Biotechnol. Lett.*, 13 (1991) 571.
- Ferrer, I.; Dezotti, M.; Durán, N.; *Biotechnol. Lett.*, 13 (1991) 577.
- Ferrer, I.; Esposito, E.; Durán, N.; *Enzyme Microbiol. Technol.*, 14 (1992) 402.
- Fitch, M.W.; Weissman, D.; Phelps, P.; Georgiou, G.; Speitel Jr, G.E.; *Water Res.*, 30 (1996) 2655.
- Freire, D.D.C.; Cammarota, M.C.; Sant'anna, G.L.; *Environ. Technol.*, 22 (2001a) 1125.
- Freire, R.S.; Pelegrini, R.; Kubota, L.T.; Durán, N.; Peralta-Zamora, P.; *Quim. Nova*, 23 (2000a) 504.
- Freire, R.S.; Kunz, A.; Durán, N.; *Environ. Technol.*, 21 (2000b) 717.
- Freire, R.S., Kubota, L.T., Durán, N.; *Environ. Technol.*, 22 (2001b) 897.
- Freshour, R.; Mawhinney, S.; Bhattacharyya, D.; *Water Res.*, 30 (1996) 1949.
- Gapes, D.; Keller, J.; *Biotechnol. Bioeng.*, 76 (2001) 361.
- Garg, S.K.; Modi, D.R.; *Crit. Rev. Biotechnol.*, 19 (1999) 85.
- Gebara, F.; *Water Res.*, 33 (1999) 230.
- Gijzen, H.J.; *Water Sci. Technol.*, 44 (2001) 123.
- Gouvea, C.A.K.; Wypych, F.; Moraes, S.G.; Durán, N.; Peralta-Zamora, P.; *Chemosphere*, 40 (2000) 427.
- Guerra, R.; *Chemosphere*, 44 (2001) 1737.
- Guerra, A.; Ferraz, A.; Cotrim, A.R.; da Silva, F.T.; *Enzyme Microbiol. Technol.*, 26 (2000) 315.
- Gulyas, H.; von Bismarck, R.; Hemmerling, L.; *Water Sci. Technol.*, 32 (1995) 127.
- Guimarães, J. R.; *Tese de Mestrado*, Instituto de Química, UNICAMP (1990).

- Gunukula, R.V.B.; Tittlebaum, M.E.; *J. Environ. Sci. Health A: Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.*, **36** (2001) 307.
- Gupta, M.; Gupta, A.; Suidan, M.T.; Sayles, G.D.; *Water Res.*, **30** (1996) 1387.
- Hall, S.B.; Khundaish, E.A.; Hart, A.L.; *Electrochim. Acta.*, **43** (1998a) 579.
- Hall, S.B.; Khundaish, E.A.; Hart, A.L.; *Electrochim. Acta.*, **43** (1998b) 2015.
- Halsall, C.J.; Bailey, R.; Stern, G.A.; Barrie, L.A.; Fellin, P.; Muir, D.C.G.; Rosenberg, B.; *Environ. Poll.*, **102** (1998) 51.
- Hardy, P.; Burgess, J.E.; Morton, S.; Stuetz, R.M.; *Water Sci. Technol.*, **44** (2001) 189.
- Harnly, M.; Stephens, R.; McLaughlin, C.; Marcotte, J.; Petreas, M.; Goldman, L.; *Environ. Sci. Technol.*, **29** (1995) 677.
- Harris, M.L.; Elliott, J.E.; *Environ. Poll.*, **110** (2000) 307.
- Hautaniemi, M.; Kallias, J.; Munter, R.; Trapido, M.; *Ozone Sci. Eng.*, **20** (1998) 259.
- Hilarides, R.J.; Gray, K. A.; Guzzetta, J.; Cortellucci, N.; Sommer, C.; *Water Environ. Res.*, **68** (1996) 178.
- Hirvonen, A.; Tuhkanen, T.; Kalliokoski, P.; *Water Sci. Technol.*, **33** (1996) 67.
- Hirata, A.; Nakamura, Y.; Tsuneda, S.; *Water Sci. Technol.*, **44** (2001) 171.
- Hodgson, A. T.; Sheldon, J. B.; Alan, J. H.; Stevenson, B.; *Environ. Conf.*, **1** (1997) 207.
- Hoffmann, M.R.; Martin, S.T.; Choi, W.; Bahnemann, D.W.; *Chem. Rev.*, **95** (1995) 69.
- Hostachy, J. C.; Lenon, G.; Pisciocchio, J. L.; Coste, C.; Legay, C.; *Water Sci. Technol.*, **35** (1997) 261.
- Huovinen, P.S.; Soimasuo, M.R.; Oikari, A.O.J.; *Chemosphere*, **45** (2001) 683.
- Huston, P.L.; Pignatello, J.J.; *Water Res.*, **33** (1999) 1238.
- Ibrahim, M.S.; Ali, H.I.; Taylor, K.E.; Biswas, N.; Bewtra, J.K.; *Water Environ. Res.*, **73** (2001) 165.
- Ince, N.H.; Stefan, M.I.; Bolton, J.R.; *J. Adv. Oxid. Technol.*, **2** (1997) 442.
- ISO 8245 - International Organization for Standardization. *Water Quality. Guidelines for determination of total organic carbon* (1987).
- ISO 8692 - International Organization for Standardization. *Water Quality. Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum** (1989).
- Ito, K.; Jian, W.; Nishijima, W.; Baes, A.V.; Shoto, E.; Okada, M.; *Water Sci. Technol.*, **38** (1998) 79.
- Jacobsen, B.N.; Arvin, E.; Reinders, M.; *Water Res.*, **30** (1996) 13.
- James, R.; Matussek, H.; Janssen, I.; Kenny, J.; *Pulp Paper Internat.*, **41** (1999) 10.
- Jardim, W. F.; Pasquini, C.; Guimarães, J.R., deFaria, L.C.; *Water Res.*, **24** (1990) 351.
- Jones, J.M.; Anderson, J.W.; Wiegel, J.V.; Tukey, R.H.; *Biomarkers*, **6** (2001) 406.
- Kagaya, S.; Shimizu, K.; Arai, R.; Hasegawa, K.; *Water Res.*, **33** (1999) 1753.
- Kähkönen, M.A.; Kimmo, P.S.; Manninen, P.K.G.; Salkinoja-Salonen, M.S.; *Environ. Sci. Technol.*, **32** (1998) 1741.

- Kaller, T.J.J.; van Goor, C.P.; Roeleveld, P.J.; Ruland, M.F.; Babuska, R.; *Water Sci. Technol.*, **39** (1999) 71.
- Kang, M.G.; Han, H.E.; Kim, K.J.; *J. Photochem. Photobio. A*, **125** (1999) 119.
- Kindaria, A.; Grover, T.A.; Aust, S.D.; *Environ. Sci. Technol.*, **29** (1995) 719.
- Kleivane, L.; Skaare, J.V.; *Environ. Poll.*, **101** (1998) 231.
- Kuczkowski, R.L.; *Chem. Soc. Rev.*, **92** (1992) 79.
- Kuo, W.S.; *Chemosphere*, **39** (1999) 1853.
- Kunz, A.; Freire, R.S.; Rohwedder, J.J.R.; Durán, N.; Mansilla, H.; Rodriguez, J.; *Quim. Nova*, **22** (1999) 425.
- Kuwahara, M.; Glenn, J.K.; Morgn, M.A.; Gold, M.H.; *FEBS Let.*, **169** (1984) 247.
- Kwon, B.G.; Lee, D.S.; Kang, N.; Yoon, J.; *Water Res.*, **33** (1999) 2110.
- Langlais, B.; Legube, B.; Beuffe, M.; Doré, M.; *Water Sci. Technol.*, **25** (1992) 135.
- Lee, H.H.W.; Chen, G.; Yue, P.L.; *Water Sci. Technol.*, **44** (2001) 75.
- Levine, B.B.; Madireddi, K.; Lazarova, V.; Stenstrom, M.K.; Suffet, I.H.; *Water Environ. Res.*, **72** (2000) 388.
- Lewis, M.; *Environ. Pollut.*, **87** (1995) 319.
- Liao, C.; Gurol, M. D.; *Environ. Sci. Technol.*, **29** (1995) 3007.
- Lima, A.F.; Rodes, L.; Philipp, P.; *Papel e Celulose – Tecnologia de fabricação da pasta celulósica*, vol. 1, 2^a ed., Senai, São Paulo (1988).
- Lin, S.; Gurol, M.D.; *Water Sci. Technol.*, **34** (1996) 57.
- Linsebigler, A.L.; Lu, G.; Yates Jr, J.T.; *Chem. Rev.*, **95** (1995) 735.
- Lipp, L.; Pletcher, D.; *Electrochim. Acta.*, **42** (1997) 1091.
- Madaeni, S.S.; *Water Res.*, **33** (1999) 301.
- Mao H.; Smith, D.W.; *Ozone Sci. Eng.*, **17** (1995) 205.
- Masten, S.J.; Davis, S.H.R.; *Environ. Sci. Technol.*, **28** (1994) 180A.
- Muller, L.P.; Jekel, M.; *Water Sci. Technol.*, **44** (2001) 303.
- Moody, L.B.; Raman, D.R.; *J. Agric. Eng. Res.*, **80** (2001) 293.
- Mokrini, A.; Ousse, D.; Esplugas, S.; *Water Sci. Technol.*, **35** (1997) 95.
- Moraes, S. G.; *Tese de Mestrado*, Instituto de Química, UNICAMP (1995).
- Moraes, S. G.; *Tese de Doutorado*, Instituto de Química, UNICAMP (1999).
- Mulder, R.; Vereijken, T.L.F.M.; Frijters, C.T.M.J.; Vellinga, S.H.J.; *Water Sci. Technol.*, **44** (2001) 27.
- Nagathamma, R.; Bajdai P.; *Appl. Environ. Microbiol.*, **65** (1999) 1078.
- Neto, B.B.; Scarmínio, I.S.; Bruns, R.E.; *Planejamento e Otimização de Experimentos*, Editora da UNICAMP, Campinas (1995).
- Ning, Z; Fernandes, L.; Kennedy, K.J.; *Water Res.*, **33** (1998) 180.

- Nogueira, R.P.; Jardim, W.F.; *Quim. Nova*, 21 (1998) 69.
- Nogueira, R.F.P.; Guimarães, J.R.; *Water Res.*, 34 (2000) 895.
- Odendhal S.; *Pulp Paper Canada*; 95 (1994) 30.
- Oeller, H.J.; Demel, I.; Weinberger, G.; *Water Sci. Technol.*, 35 (1997) 269.
- Orhon, D.; Tasli, R.; Sozen, S.; *Water Sci. Technol.*, 40, (1999) 1.
- Pagano, J.J.; Scudato, R.J.; Roberts, R.N.; Bemis, J.C.; *Environ. Sci. Technol.*, 29 (1995) 2584.
- Palm, H.; Lammi, R.; *Environ. Sci. Technol.*, 29 (1995) 1722.
- Panswad, T.; Anan, C.; *Water Res.*, 33 (1999) 1165.
- Parameshwaran, K.; Fane, A.G.; Cho, B.D.; Kim, K.J.; *Water Res.*, 35 (2001) 4349.
- Parra, C.; Santiago, M.F.; Rodriguez, J.; Durán, N.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249 (1998) 719.
- Pelegri, R. T.; *Tese de Doutorado*, Instituto de Química, UNICAMP (1999).
- Pelegri, R.; Reyes, J.; Durán, N.; Zamora, P.P.; de Andrade, A.R.; *J. Appl. Electrochem.*, 30 (2000) 953.
- Pelegri, R.T.; Freire, R.S.; Duran, N.; Bertazzoli, R.; *Environ. Sci. Technol.*, 35 (2001) 2849.
- Peralta-Zamora, P.; Esposito, E.; Pelegri, R.; Groto, R.; Reyes, J.; Durán, N.; *Environ. Technol.*, 19 (1998) 55.
- Peralta-Zamora, P.; Esposito, E.; Reyes, J.; Durán, N.; *Quim. Nova*, 20 (1997) 186.
- Petrier, C.; Jiang, Y.; Lamy, M.F.; *Environ. Sci. Technol.*, 32 (1998) 1316.
- Peyton, G.R.; Glaze, W.H.; *Environ. Sci. Technol.*, 22 (1988) 761.
- Pletcher, D.; De Leon, P.; *J. Appl. Electrochem.*, 25 (1995) 307.
- Prevot, A.B.; Pramauro, E.; *Talanta*, 48 (1999) 847.
- Polcaro, A.M.; Palmas, S.; Renoldi, F.; Mascia, M.; *J. Appl. Electrochem.*, 29 (1999) 147.
- Poulios, J.; Tsachpinis, I.; *J. Chem. Technol. Biotech.*, 74 (1999) 349.
- Pressman, J.G.; Georgiou, G.; Speitel, G.E.; *Biotechnol. Bioengin.*, 68: (2000) 548.
- Ramsay, I.R.; Pullammanappallil, P.C.; *Biodegradation*, 12 (2001) 247.
- Reginato, V.; *Tese de Doutorado*, Instituto de Química, UNICAMP (1998).
- Reutergardh, L.B.; Langphasuk, M.; *Chemosphere*, 35 (1997) 585.
- Reyes, J.; Dezotti, M.; Mansilha, H.; Villaseñor, J.; Espósito, E.; Durán, N.; *J. Appl. Catal B. Environm.*, 15 (1998) 211.
- Ribó, J.M.; *Afinidad*, 43 (1992) 7.
- Rice R.G.; *Aiche Symp. Series*, 209 (1980) 79.
- Rodgers, M.; *Water Res.*, 33 (1999) 1495.
- Rodriguez, J., Osés, R. Parra, C., Freer, J.; Baeza, J.; *Proc. 5th Braz. Symp. Chem. Lignins Wood Compon*, 5 (1997) 147.

- Rodriguez, J.; Fuentes, S.; Freer, J.; Mansilla, H.D.; Ferraz, A.; Baeza, J.; *Environ. Technol.*, 19 (1998) 75.
- Rodrigues, A.C.; Brito, A.G.; Melo, L.F.; *Water Environ. Res.*, 73 (2001) 45.
- Roy-Arcand, L.; Archibald, F.S.; *Ozone Sci. Eng.*, 18 (1996) 363.
- Saenz, M.E.; Alberdi, J.L.; Di Mazio, W.D.; Tortorelli, M.C.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 58 (1997) 922.
- Sakthivel, S.; Neppolian, B.; Palanichamy, M.; Arabindoo, B.; Murugesan, V.; *Water Sci. Technol.*, 44 (2001) 211.
- Sant'Anna, G.L.; *Proc 2nd Braz. Symp. Chem. Lignins Wood Comp.*, 3 (1992) 297.
- Santato, C.; Odziemkowski, M.; Ulmann, M.; Augustynski, J.; *J. Am. Chem. Soc.*, 123 (2001) 10639.
- Santiago, M.F.; Moraes, S.G.; Durán, N., 2ª Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente. Florianópolis/SC; (1999) 121.
- Schmelling, D.C.; Poster, D.L.; Chaychian, M.; Neta, P.; Silverman, J.; Al-Sheikhly, M.; *Environ. Sci. Technol.*, 32 (1998) 270.
- Schwyn, B.; Neilands, J. B.; *Anal. Biochem.*, 160 (1987) 47.
- Shen, Y.; Ku, Y.; Lee, K.; *Water Res.*, 29 (1995) 907.
- Skadberg, B.; Geoly-Horn, S.L.; Sangamalli, V.; Flora, J.R.V.; *Water Res.*, 33 (1999) 1997.
- Silva, C.M.; Reeve, D.W.; Woodhouse, K.A.; Husain, H.; Behmann, H.; *Pulp Paper Canada*, 100 (1999) 38.
- Soares, C.H.L.; Durán, N.; *Environ. Technol.*, 19 (1998) 883.
- Spiridon, I.; Popa, V.I.; *Cellul. Chem. Technol.*, 34 (2000) 275.
- Sullivan, B.E.; Roth, J.A.; *Aiche Symp. Series*, 76 (1979) 142.
- Steinle, P.; Stucki, G.; Stettler, R.; Hanselmann, K.W.; *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (1998) 2566.
- Streat, M.; Patrick, J.W.; Perez, M. J. C.; *Water Res.*, 29 (1995) 467.
- Stockinger, H.; Heinzle, E.; Kut, O.; *Environ. Sci. Technol.*, 29 (1995) 2016.
- Subramani, P.; Shanmugas, K.P.; Ravikumar, X.J.; *Waste Treat. Plants*, 1 (1995) 382.
- Sunder, M.; Hempel, D.C.; *Water Res.*, 31 (1997) 33.
- Sundquist, J.; *Paperi Ja Puu-Paper Timber*, 76 (1994) 22.
- Susarla, S.; Masunaga, S.; Yonezawa, Y.; *Water Sci. Technol.*, 34 (1996) 489.
- Suvilampi, J.; Lepisto, R.; Rintala, J.; *Paperi Ja Puu-Paper Timber*, 83 (2001) 320.
- Szklarz, G.D.; Antibus, R.K.; Sinsabaugh, R.L.; Linkins, A.; *Micology*, 81 (1989) 234.
- Taghipour, F.; Evans, G.J.; *Environ. Sci. Technol.*, 30 (1996) 1558.
- Tanaka, K.; Abe, K.; Hisanaga, T.; *J. Photochem. Photobiol. A*, 101 (1996) 85.
- Takehita, R.; Akimoto, Y.; Nito, S.; *Environ. Sci. Technol.*, 29 (1995) 1186.
- Teodosiu, C.C.; Kennedy, M.D.; Van Straten, H.A.; Schippees, J.C.; *Water Res.*, 33 (1999) 2172.

- Tezel, U.; Guven, E.; Erguder, T.H.; Demirer, G.N.; *Waste Manag.*, 21 (2001) 717.
- Thompson, G.; Swain, J.; Kay, M.; Forster, C.F.; *Biores. Technol.*, 77 (2001) 275.
- Tien, M.; Kirk, T.K.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 (1984) 2280.
- Trapido, M.; Veressinina, Y.; Kallas, J.; *Ozone: Sci. Eng.*, 23 (2001) 333.
- Trillas, M.; Peral, J.; Domenech, X.; *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 67 (1996) 237.
- Tshantz, M.F.; Bowman, J.P.; Donaldson, T.L.; Bienkowski, P.R.; Gunderson, J.M.; Palumbo, A.V.; Herbes, S.E.; Sayler, G.S.; *Environ. Sci. Technol.*, 29 (1995) 2073.
- Turan-Ertas, T.; *Ozone Sci. Eng.*, 23 (2001) 199.
- Van Eekert, M.H.A.; Schröder, T.J.; Stams, A.J.M.; Scharaa, G.; Field, J.A.; *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (1998) 2350.
- Vidal, G.; Fernandez, A.J.; Diez, M.C.; *Afinidad*, 57 (2000) 318.
- Vione, D.; Maurino, V.; Minero, C.; Pelizzetti, E.; *Chemosphere*, 45 (2001) 903.
- Vinodgopal, K.; Peller, J.; Makogon, O.; Kamat, P.V.; *Water Res.*, 32 (1998) 3646.
- Vlyssides, A.G.; Israilides, C.J.; *Environ. Poll.*, 97 (1997) 147.
- Vohra, M.S.; Tanaka, K.; *Water Res.*, 36 (2002) 59.
- Wang, Y.; Hong, C.S.; *Water Res.*, 33 (1999) 2031.
- Wang, T.M.; Wang, H.Y.; Xu, P.; Zhao, X.C.; Liu, Y. L.; Chao, S.; *Thin Solid Films*, 334 (1998) 103.
- Weber, W.J.; LeBoeuf, E.J.; *Water Sci. Technol.*, 40 (1999) 11.
- Wenzel, A.; Gohr, A.; Niessrer, R.; *Water Res.*, 33 (1999) 937.
- Wilcoxon, J.P.; Thurston, T.R.; Martin, J.E.; *Nanostruc. Mater.*, 12 (1999) 993.
- Wilson, G.J.; Khodadoust, A.P.; Suidan, M.T.; Brenner, R.C.; Acheson, C.M.; *Water Sci. Technol.*, 38 (1998) 9.
- Wobus, A.; Ulrich, S.; Röske, I.; *Water Sci. Technol.*, 32 (1995) 205.
- Wong, J.C.S.; Linsebiler A.L.; Lu, G.; Fan, J.; Yates Jr., J.T.; *J. Phys. Chem.*, 99 (1995) 335.
- Xie, T.; Abrahamsson, K.; Fogelqvist, E.; Josefsson B.; *Environ. Sci. Technol.*, 20 (1986) 457.
- Yeber, M.C.; Rodriguez, J.; Freer, J.; Baeza, J.; Durán, N.; Mansilla, H.D.; *Chemosphere*, 39 (1999) 1679.
- Yeber, M.C.; Rodriguez, J.; Freer, J.; Durán, N.; Mansilla, H.D.; *Chemosphere*, 41 (2000) 1193.
- Zhang, S.; Rusling, J. F.; *Environ. Sci. Technol.*, 29 (1995) 1195.
- Zhou, H.; Smith, D.W.; *Water Sci. Technol.*, 35 (1997) 251.
- Ziolfi, R.L.; Jardim, W.F.; *Quim. Nova*, 21 (1998) 319.

CAPÍTULO III

***BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA A
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS***

III.1 – INTRODUÇÃO

III.1.1 – CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR COMPOSTOS FENÓLICOS

O aumento inadvertido na produção e utilização de produtos químicos, verificado nas últimas décadas, tem causado problemas de poluição ambiental de maneira generalizada em praticamente todas as partes do mundo. A proteção ambiental vem adquirindo grande importância na sociedade contemporânea, que tem cobrado mecanismos, rápidos e eficientes, de controle dos processos de contaminação do meio ambiente.

Um número considerável de poluentes orgânicos, que se encontram largamente distribuídos no meio ambiente, possuem estruturas fenólicas (Nistor e col., 1999). Os compostos fenólicos constituem-se numa das classes de compostos orgânicos de maior relevância, pois estes compostos despertam interesse sob vários pontos de vista, tais como: 1) clínico e farmacológico - vários neurotransmissores e medicamentos possuem estrutura fenólica; 2) alimentício - alguns derivados fenólicos são responsáveis pelas propriedades organolépticas de muitas frutas e flores, e influem na qualidade de, por exemplo, azeites e bebidas (principalmente sucos e vinhos); 3) industrial - esta classe de composto é empregada nos processos de produção de plásticos, corantes, desinfetantes, resinas, polímeros sintéticos, pesticidas, papel, etc.; 4) ambiental - os produtos de degradação de muitos pesticidas e as atividades industriais acima descritas são responsáveis por um elevado grau de contaminação ambiental de solos e corpos d'água pelos compostos fenólicos (Svitel, e Miertus, 1998; Rossato e col., 2001).

Uma grande variedade de compostos orgânicos é gerada durante os processos industriais, muitos dos quais são recalcitrantes aos processos de tratamento de efluentes normalmente utilizados pelas indústrias (Prahacs e col., 1996; Reyes e col., 1998; Freire e col., 2000; Rossato e col., 2001). O tipo e a abundância dos compostos fenólicos gerados variam em função do processo industrial em particular; no efluente da indústria de papel e celulose, por exemplo, são encontrados guaiacóis (o-metoxifenóis), catecóis (o-dihidroxibenzenos), veratróis (dimetoxibenzenos), siringóis (dimetoxifenóis) e seus derivados clorados

(Gundersen e col., 1997; Harris e Elliot, 2000).

A contaminação ambiental por fenóis merece destaque, uma vez que fenóis substituídos, como cloro, alquil e nitrofenóis, são altamente tóxicos para o homem e organismos aquáticos (Zimmermann e Taylor-Mayer, 1983; Campanella e col., 1993; Ortega e col., 1994; Russell e Burton, 1999). Mesmo em pequenas concentrações ($< 1 \text{ mg L}^{-1}$), os compostos fenólicos afetam o gosto e odor de águas potáveis e peixes. Muitos destes compostos possuem efeitos tóxicos em animais e plantas, pois facilmente penetram pela pele e membranas celulares, determinando um amplo espectro de toxicidade e mutagenicidade (Russell e Burton, 1999), além de afetarem as velocidades das reações biocatalisadas nos processos de respiração e fotossíntese (Campanella e col., 1993), e apresentarem propensão para bioacumulação (Parker e col., 1993). Metabólitos de cloroguaiacóis têm sido detectados na bile de peixes que vivem em regiões próximas a indústrias de papel e celulose (Schnell e col., 2000). Vários trabalhos científicos atestam que também as águas e os sedimentos próximos a estas indústrias apresentam-se com alto teor de contaminação por estes compostos (Oikari, 1986; Smeds e col., 1994; VanLeewen e col., 1996; Gundersen e MacIntyre, 1996).

Deste modo, os fenóis e, especialmente, seus derivados clorados têm sido definidos como poluentes perigosos devido a sua alta toxicidade e persistência no ambiente, e estão presentes na lista de substâncias perigosas e poluentes prioritários da Comissão Européia (Vincent, 1991) e da EPA (Agência de Proteção Ambiental Norte Americana) (EPA, 1980/1984). A diretiva 80/778 da Comunidade Econômica Européia, por exemplo, determinou como concentração máxima permitida, para todos os tipos de fenóis em meio aquoso, o valor de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ para fenóis individuais (Puig e col., 1996). O Instituto Nacional Norte-Americano para Saúde e Segurança Ocupacional estabeleceu como limite de exposição à concentração de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ para fenol e, por exemplo, $2,3 \mu\text{g L}^{-1}$ para isômeros de cresol (Vilchez e col., 1996). Assim, o desenvolvimento de procedimentos para a detecção e determinação simultânea destas espécies químicas em diferentes matrizes é de grande interesse.

Devido aos riscos para a saúde e para a meio ambiente causados pela exposição aos compostos fenólicos, existe um consenso universal a respeito da necessidade de monitorar continuamente o teor de contaminantes químicos nos cursos de águas naturais e nos inúmeros efluentes industriais descarregados nestes recursos hídricos (Rogers e Willians, 1995; Marko-Varga e col., 1995; Wang, 2000; Wang e col., 2000). O tempo e o custo envolvidos com a detecção de poluentes ambientais (por exemplo, aquisição da amostra, preparação da amostra, análise de laboratório) tem imposto limitações no número de amostras que podem ser analisadas para um determinado projeto de monitoramento ambiental (Karube e col., 1995; Wang, 2000). O aumento na quantidade de dados analíticos tende a aumentar a confiabilidade nas decisões de gerenciamento ambiental, por aumentar a eficiência na caracterização dos compostos poluentes *in situ* e caracterizar melhor os riscos ou ainda a eficiência dos procedimentos de descontaminação (Marko-Varga e col., 1995; Vilchez e col., 1996; Brainina e col., 2001; Buerck e col., 2001). A limitação no número das análises tem criado uma demanda por tecnologias analíticas que possam permitir um aumento no número destas análises em um menor tempo e com custos mais acessíveis (Denninson, e Turner, 1995; Nistor e col., 1999).

Até o presente momento, análises tanto de fenol como de espécies fenólicas têm sido realizadas, principalmente, por meio de métodos espectrofotométricos e cromatográficos (cromatografia gasosa com ionização em chama ou acoplada com espectrometria de massas; ou ainda, utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência) (Puig e Barcelo, 1996; Norberg e col., 1997; Parellada e col., 1998; Gatti e col., 2001; Korenman e col., 2001; Czaplicka, 2001; Nagaraja e col., 2001). Entretanto, estas técnicas não permitem, facilmente, um monitoramento contínuo *on site*, pois são caras, lentas, necessitam de operadores bem treinados, e em alguns casos, requerem etapas de extração ou pré-concentração, que aumentam o risco de perda de amostra (EPA, 1983; Marko-Varga e col., 1995; Svitel e Miertus, 1998; Wang, 2000).

A necessidade de métodos analíticos mais versáteis para o monitoramento ambiental tem estimulado o desenvolvimento de uma grande variedade de

metodologias analíticas. Os biossensores revelam grandes perspectivas quanto a sua utilização no monitoramento contínuo de efluentes (e outras matrizes de interesse ambiental), possibilitando uma rápida adaptação nos processos de tratamento. A incorporação de moléculas com atividade biológica em metodologias analíticas tem aumentado sensivelmente nos últimos anos, obtendo sucesso nos mais variados procedimentos analíticos, principalmente nos que visam à área de controle ambiental (Ortega e col., 1994; Wang e Chen, 1995a/b; Yaropolov e col., 1995; Ruzgas e col., 1995; Bogdanovskaya e Tarasevich, 1996; Burestedt e col., 1996; Hedenmo e col., 1997; Nistor e Emnéus, 1999; May, 1999; Sigrist e Gao, 1999; Young e col., 2001; Baird e Myszka, 2001; Sole e Alegret, 2001; Chiti e col., 2001; Farre e col., 2001).

Biossensores representam uma ferramenta promissora para suplementar as técnicas existentes, devido as suas características únicas, tais como: seletividade; relativo baixo custo de construção e estocagem; potencial para miniaturização; facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis para uma rápida análise de monitoramento "on site".

Devido ao recente avanço nas áreas de microeletrônica, biotecnologia, fibras óticas, etc., a definição de um biossensor evoluiu do conceito clássico de um eletrodo associado a uma enzima para uma variedade de métodos analíticos e dispositivos baseados em biocatálise ou bioafinidade (Rogers e Willians, 1995; Mascini e col., 2001; Gauger e col., 2001). Entretanto, para os propósitos deste trabalho, um biossensor será definido como um dispositivo analítico composto de um elemento biológico de reconhecimento intimamente em contato com um transdutor. Assim, um biossensor é um dispositivo que combina a alta seletividade de um elemento biológico ativo para o analito de interesse com a sensibilidade de um transdutor para converter o sinal proporcional a concentração deste analito (Mulchandani e Bassi, 1995).

Há uma grande diversidade de configurações de biossensores para aplicações ambientais, e esta diversidade abrange os elementos de reconhecimento biológico (enzimas, anticorpos, microorganismos, etc.), os transdutores físicos (eletroquímicos, óticos, acústicos, etc.) e a metodologia

analítica. Esta gama de configurações confere uma grande versatilidade aos biossensores, que podem ser genéricos, dando uma indicação da presença de um contaminante que tenha algum bioefeito (por exemplo, sensores de toxicidade) ou de um grupo de contaminantes (ex.: pesticidas como inibidores de enzimas); ou ainda específicos, fazendo vantagem da especificidade de uma biomolécula para uma determinada classe ou composto (Parellada e col., 1998).

III.1.2 -BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA FENÓIS

Fenóis podem ser determinados amperometricamente por meio de uma oxidação eletroquímica direta (King e col., 1980; Burestedt e col., 1996; Tarasevich e col., 1999). Entretanto, este procedimento possui uma série de desvantagens, principalmente devido a uma alta sobrevoltagem. O alto potencial aplicado provoca uma grande corrente de fundo e, conseqüentemente, um alto nível de ruído. Além disto, nas oxidações diretas de fenóis, um grande número de reações paralelas podem ocorrer levando, principalmente, a formação de produtos poliméricos que passivam a superfície do eletrodo. Biossensores amperométricos podem minimizar estes obstáculos na determinação de fenóis, uma vez que operam com um baixo potencial aplicado em relação a um eletrodo de referência, a corrente gerada pela reação biocatalisada de oxidação ou redução das espécies eletroativas na superfície do eletrodo, de um modo geral, processa-se em potenciais ao redor de 0 mV. Neste potencial, a contribuição de espécies interferentes (facilmente oxidadas ou reduzidas) é minimizada (Gorton e col., 1992; Csöregi e col., 1993; Marko-Varga e col., 1995; Burestedt e col., 1996; Freire e col., 2002), conforme é mostrado esquematicamente na Figura 3.1.

Dentre os materiais de eletrodo que podem ser usados para a construção de biossensores amperométricos, tais como ouro e platina, os materiais carbonáceos têm sido os mais utilizados (Kinoshita, 1988; de Carvalho e col., 1999; Pena e col., 2001; Ruan e Li, 2001), principalmente devido as suas características vantajosas como, por exemplo, baixo custo, correntes residuais e resistência elétrica baixas, ampla faixa de potencial anódico e facilidade de modificação da superfície dos eletrodos. Carbono vítreo, grafite pirolítico, pasta de

carbono e grafite compósito são exemplos deste tipo de material.

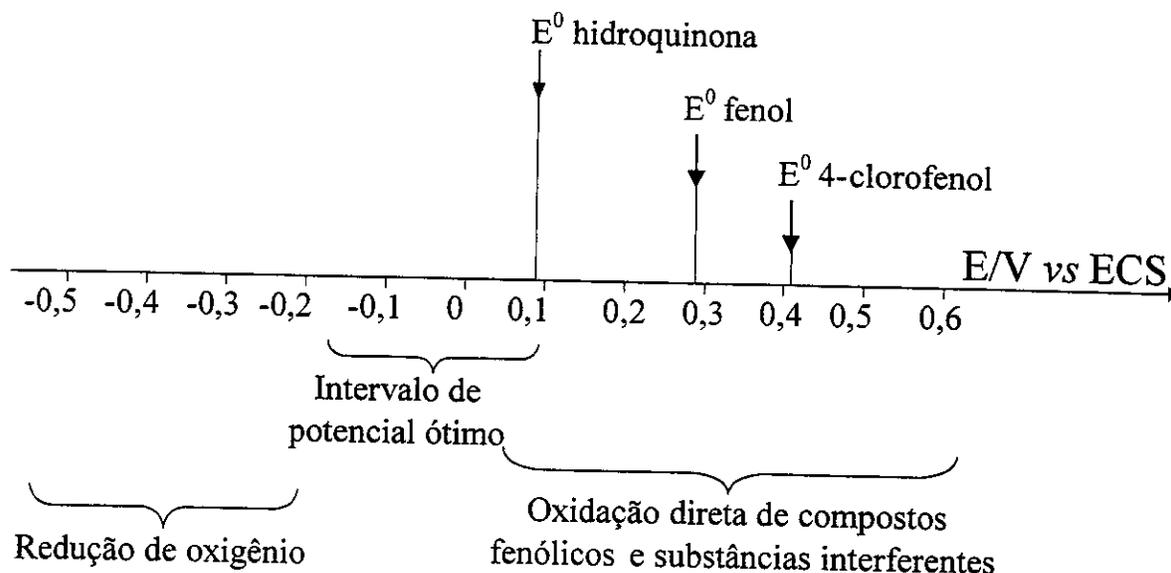


Figura 3.1 - Intervalo de potencial ótimo para a operação de biossensores amperométricos. E^0 hidroquinona, E^0 fenol e E^0 4-clorofenol são os potenciais formais dos pares redox hidroquinona/quinona, fenol/radical fenóxi e 4-clorofenol/4-clorofenóxi, respectivamente.

As enzimas redox tirosinase, lacase e peroxidase são as mais utilizadas para a construção de biossensores amperométricos para fenóis. Apesar destas enzimas possuírem diferentes mecanismos de ação, suas atuações em biossensores amperométricos para a detecção de compostos fenólicos têm sido esquematizadas como uma seqüência de reações similares, conforme é mostrado na Figura 3.2.

As moléculas de enzima na superfície do eletrodo são oxidadas pelo oxigênio (no caso da tirosinase e lacase) ou peróxido de hidrogênio (no caso da peroxidase), sendo em seguida reduzidas por compostos fenólicos. Durante esta última reação, os fenóis são basicamente convertidos em quinonas e/ou radicais livres, e esses produtos, usualmente eletroativos, podem ser reduzidos na superfície do eletrodo em potenciais próximos de 0 V vs ECS (Eletrodo de

Calomelano Saturado). A corrente de redução medida é proporcional à concentração do composto fenólico na solução. A detecção do consumo de O_2 ou H_2O_2 é uma outra possibilidade de se monitorar a concentração dos compostos fenólicos. Entretanto, o método de detecção dos fenóis baseado na redução dos produtos gerados pelas reações enzimáticas apresenta vantagens tais como: simplicidade de construção e manuseio; proteção do eletrodo contra o acúmulo de produtos poliméricos secundários sobre sua superfície (passivação), que usualmente são observados durante oxidação eletroquímica direta de fenóis; amplificação da resposta como uma consequência da redução de quinonas e/ou radicais fenóxi ao composto fenólico inicial, além da faixa de potencial de trabalho dos eletrodos se enquadrar no intervalo de potenciais ótimo para medidas eletroquímicas (Marko-Varga, 1995) (Figura 3.1).

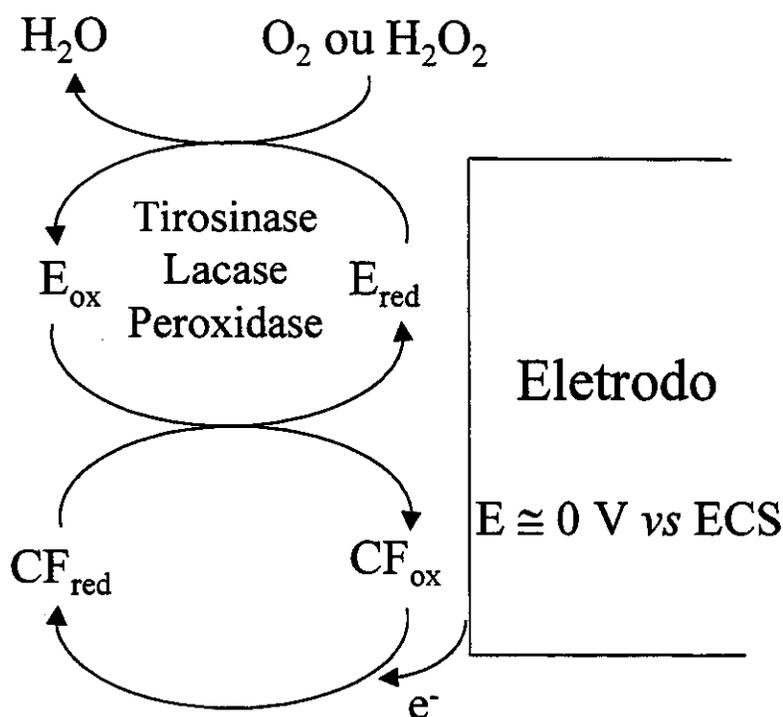


Figura 3.2 - Mecanismo das reações nos eletrodos modificados pelas enzimas para a determinação de compostos fenólicos. E_{red} e E_{ox} são as formas reduzida e oxidada, respectivamente das enzimas; CF = composto fenólico.

Os biossensores amperométricos para a determinação de compostos fenólicos são construídos sobre a base de duas diferentes configurações principais (Rossato e col., 2001): 1) eletrodos de material carbonáceo sólido com a superfície modificada, onde a enzima é fisicamente adsorvida, covalentemente imobilizada ou retida com o auxílio de uma membrana, e 2) eletrodos compósitos com o material do eletrodo modificado, onde as partículas de grafite são modificadas com enzimas, por procedimentos semelhantes ao do eletrodo de grafite sólido e, em seguida, misturada com óleos, resinas epóxi ou partículas de Teflon®.

III.1.2.1 - Biossensores a base de tirosinase

Tirosinases (polifenoloxidase, EC 1.14.18.1.) são enzimas tetraméricas, com uma massa molar na ordem de 120.000 uma. O sítio ativo desta enzima consiste em dois átomos de cobre coordenados com histidinas, conforme é mostrado esquematicamente na Figura 3.3. As enzimas tirosinases estão amplamente distribuídas na natureza (Bendall e Gregory, 1963; Sanchez-Ferrer e col., 1995). A tirosinase obtida a partir de cogumelo é a utilizada na maioria dos estudos com biossensores amperométricos (Rodriguez e Flurkey, 1992).

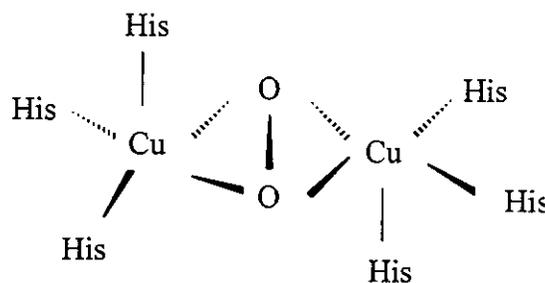


Figura 3.3 – Modelo esquemático do sítio ativo da tirosinase.

A tirosinase exibe atividade hidroxilase (monofenolase) para monofenóis e atividade oxidase (difenolase) para o-benzenodióis que são convertidos a o-quinonas (Yaropolov e col., 1995; Sánchez-Ferrer e col., 1995). A tirosinase

promove a conversão dos monofenóis em duas etapas consecutivas, que envolvem o oxigênio molecular, conforme é mostrado na Figura 3.4. Na primeira etapa o monofenol é hidroxilado ao seu correspondente o-benzenodiol (a atividade hidroxilase da enzima). Na segunda etapa, o o-benzenodiol é oxidado à sua correspondente o-quinona (a atividade difenolase da enzima), enquanto que a enzima é oxidada de volta à sua forma nativa pelo oxigênio molecular. O forte poder oxidante do oxigênio torna a reação global irreversível (Ortega e col., 1993).

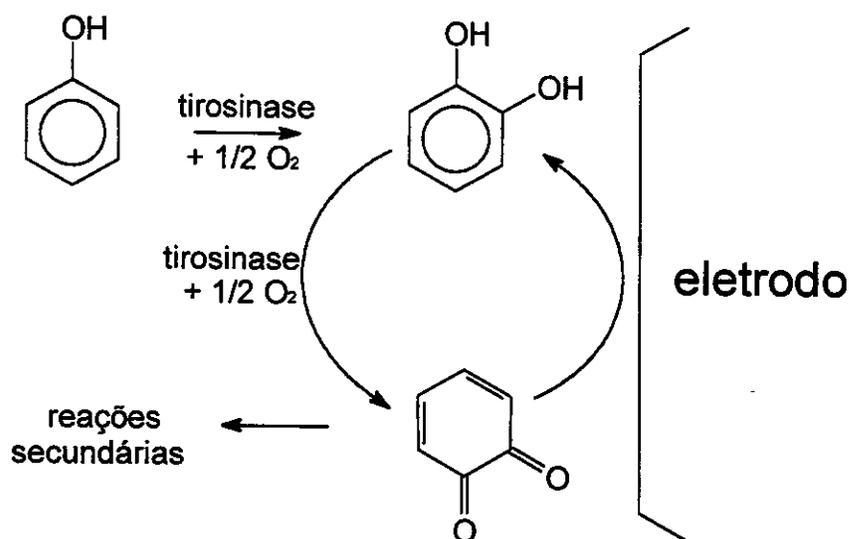


Figura 3.4 - Mecanismo de transferência de elétrons de um eletrodo modificado com tirosinase para a determinação de monofenóis e/ou o-benzenodióis.

O ciclo catalítico da tirosinase para o-benzenodióis, pode ser representado conforme esquematizado na Figura 3.5 (Durán, 2002).

Os esforços para usar tirosinase como uma ferramenta analítica para a determinação de fenóis e catecóis com transdução eletroquímica iniciaram em 1977 com o trabalho de Macholan e Schanel (1977). Desde então, muitos biossensores baseados em tirosinase têm sido elaborados para a determinação de fenol envolvendo várias formas de detecção eletroquímica: detecção do consumo de oxigênio (Campanella e col., 1992; Canofeni e col., 1994), redução direta da o-quinona gerada (Cosnier e Innocent, 1992; Wang e col., 1992a/b;

Cosnier e Innocent, 1993; Wang e col., 1994a/b; Lutz e col., 1995; Önerfjord e col., 1995) e redução mediada da o-quinona (Kulys e Schmid, 1990).

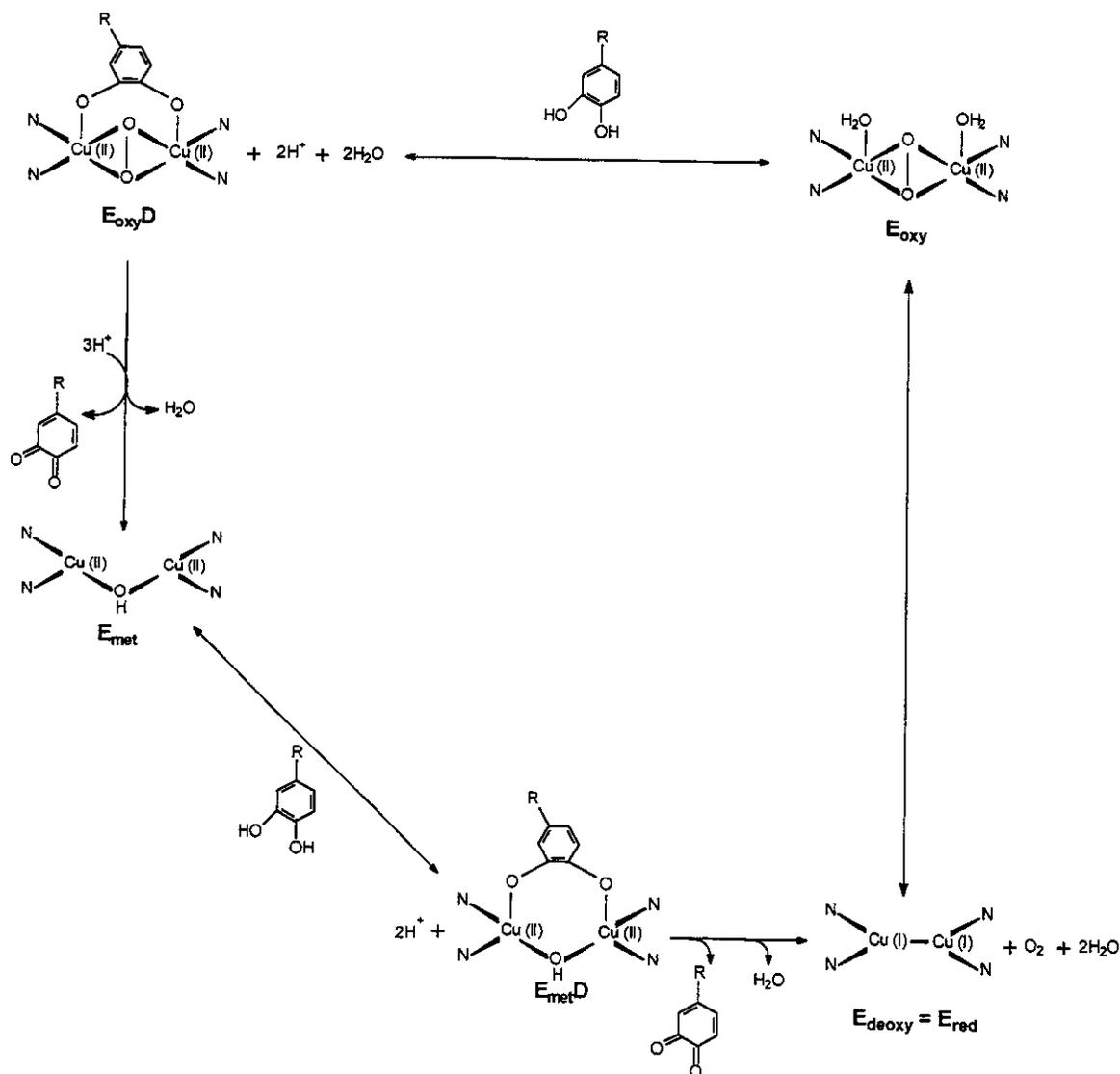


Figura 3.5 – Esquema do ciclo catalítico da tirosinase (Durán, 2002).

A redução eletroquímica dos intermediários quinonas da reação enzimática proporciona vantagens de ativação da enzima e da reciclagem eletroenzimática de catecol (um segundo substrato enzimático e ativador da enzima), dando origem a

uma amplificação do sinal, conforme mostra a Figura 3.4. Devido a estas vantagens, este princípio é o mais empregado nas análises com os biossensores amperométricos para fenóis, tanto em solventes aquosos como orgânicos. Além disso, a etapa de eletro-redução pode tornar-se mais eficiente sobre superfícies cataliticamente ativas, um fato que pode ser possível se um mediador adequado for incorporado sobre a superfície do eletrodo.

Wang e Chen (1995c) descreveram um biossensor microfabricado pela tecnologia "screen-printed" a base de tirosinase. Este biossensor apresentou um excelente desempenho na detecção de compostos fenólicos, com limite de detecção inferior a $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Os autores reportam a aplicação direta deste sensor na análise de água potável e águas superficiais. Svitel e Miertus (1998) desenvolveram um biossensor de pasta de carbono modificada com tirosinase, a sensibilidade (limite de detecção de $2,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para fenol) e a repetibilidade (desvio padrão relativo de 4% para 12 replicatas), permitiram que este sensor fosse empregado satisfatoriamente no monitoramento da bio-remediação (em escala de laboratório) de fenol em solos e águas superficiais. Russell e Burton (1999) desenvolveram um dispositivo portátil baseado em um biossensor de tirosinase, os autores descrevem que a bioatividade do sensor se manteve inalterada em uma ampla faixa de pH (de 4 a 10) e temperatura (5 a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$), e também na presença de diferentes espécies iônicas. O limite de detecção apresentado por este biossensor foi de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para fenol. Estas propriedades permitiram que este dispositivo fosse empregado na análise de vários efluentes com boa exatidão e reprodutibilidade. Por meio da eletropolimerização de tirosinase e pirrol, Cosnier e colaboradores (1999) desenvolveram um biossensor a base de tirosinase, caracterizado por uma excelente estabilidade (1 ano sem perda significativa na atividade eletroenzimática) e sensibilidade (limite de detecção de $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para fenol). Apesar de não aplicar este biossensor em amostras de interesse ambiental, os autores estudaram a influência de uma série de interferentes e parâmetros operacionais, concluindo que o biossensor a base de tirosinase desenvolvido possuía boas características para a análise de efluentes.

III.1.2.2 - Biossensores a base de lacase

As lacases são cuproproteínas do pequeno grupo de enzimas chamadas cuproproteínas azuis, cupro-oxidases azuis ou ainda apenas oxidases azuis. Os outros membros deste grupo são a ascorbato oxidase, a ceruloplasmina e a fenoxazinona sintetase (Karhunen e col., 1990; Yaropolov e col., 1994; Thurston, 1994; Gianfreda e col., 1999). A molécula de lacase é uma glicoproteína dimérica ou tetramérica, que usualmente contém quatro átomos de cobre por monômero, ligados a três sítios redox, os quatro átomos de cobre diferem entre si por seus estados de oxidação (tipo 1, 2 e 3) (Gianfreda e col., 1999), conforme mostra esquematicamente a Figura 3.6. Este tipo de enzima encontra-se amplamente distribuída na natureza, mais de 60 tipos de lacases foram isoladas a partir de plantas, insetos, bactérias e fungos (Gianfreda e col., 1999). Embora os centros de cobre sejam similares para todas as lacases de fungos, diferenças significantes nas propriedades termodinâmicas e cinéticas são observadas em função do microrganismo de origem (Gianfreda e col., 1999).

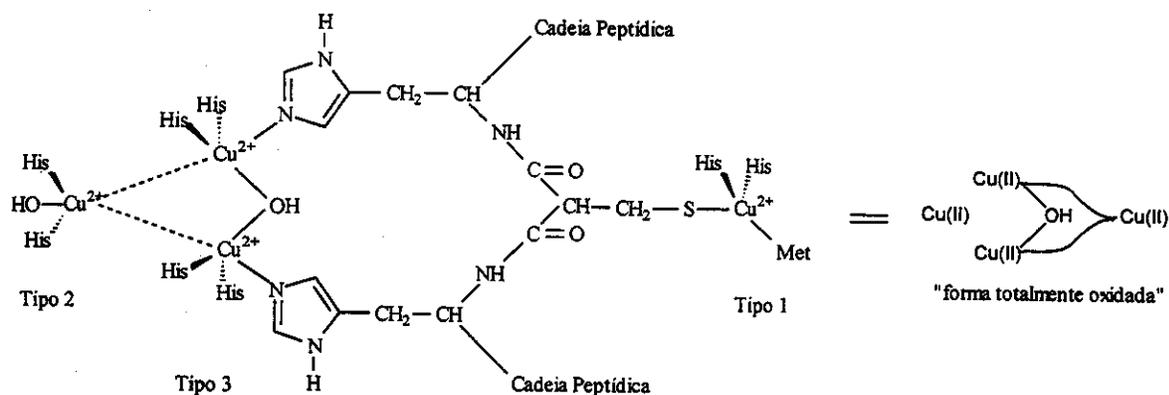


Figura 3.6 – Representação esquemática do sítio ativo da lacase (Durán, 2002).

As lacases são fenol-oxidases, que catalisam a oxidação de várias substâncias aromáticas (particularmente mono, di e polifenóis) e inorgânicas com a concomitante redução de oxigênio para água. O ciclo catalítico das lacases compreende três principais passos: 1) redução do cobre tipo 1 pelo substrato (analito); 2) transferência eletrônica interna do cobre tipo 1 para os cobres tipos 2

e 3; 3) redução de oxigênio molecular para água por meio de sua interação com os cobres de tipo 2 e 3 (Gianfreda e col., 1999), conforme mostra esquematicamente a Figura 3.7.

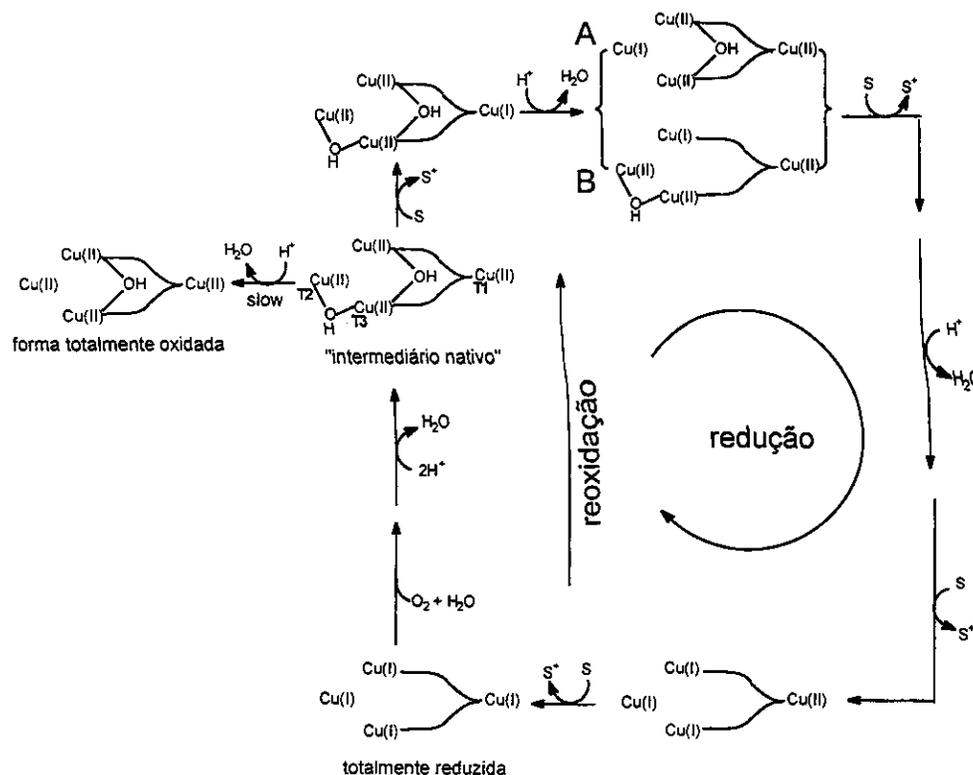


Figura 3.7 - Esquema do ciclo catalítico da lacase (Gianfreda e col., 1999; Durán, 2002).

Apesar da lacase e da tirosinase serem cupro-proteínas que catalisam a oxidação de compostos fenólicos, a suas especificidades e mecanismos são distintos. A tirosinase catalisa a hidroxilação de monofenóis para catecóis, os quais são oxidados a o-quinonas. Esta enzima não apresenta atividade para a oxidação de *para* e *meta*-benzenodióis e seus derivados substituídos. A lacase, por outro lado, pode catalisar a oxidação destes compostos, assim como, de orto-benzenodióis e fenol. Entretanto, os produtos de reação formados durante a atuação da lacase ainda não são completamente conhecidos em detalhes (Yaropolov e col., 1994; Thurston, 1994; Monteanu e col., 1998; Nistor e Emméus,

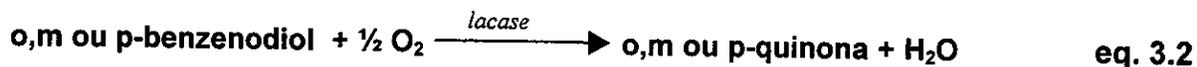
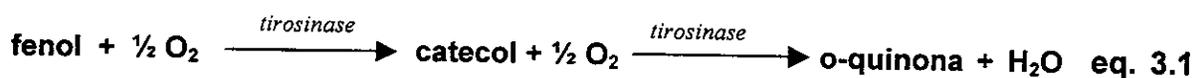
1999).

Yaropolov e colaboradores (1995) demonstraram que a resposta amperométrica para compostos fenólicos, utilizando biossensores a base de lacase, é muito estável, permitindo a utilização de análises em fluxo, com uma frequência superior a 40 amostras/hora, sem nenhuma queda na atividade da lacase.

Bier e colaboradores (1996) utilizaram a capacidade da lacase de oxidar vários substratos fenólicos, para determinar uma série de aminofenóis e catecolaminas. Wang e Lin (1997) demonstraram a utilidade de biossensores com lacase na determinação de compostos fenólicos em meios orgânicos, utilizando análises em fluxo. Rella e colaboradores (1996), fazendo uso da alta termo-estabilidade da lacase, desenvolveram um biossensor capaz de operar na faixa de 35-55 °C. Este sensor também pôde ser operado em uma ampla faixa de pH (4-8) e apresentou reprodutibilidade durante mais de 4 meses.

III.1.2.3- Biossensores bienzimáticos

Como descrito anteriormente, lacase e tirosinase são oxidases que contém cobre e catalisam a redução de oxigênio molecular por diferentes doadores de elétrons, como por exemplo, compostos fenólicos. A oxidação de fenóis por essas duas enzimas pode ser representada pelas equações 3.1 e 3.2:



A especificidade de substrato e o mecanismo das duas enzimas são diferentes, mas suas ações em biossensores para a detecção de compostos fenólicos são baseadas na detecção amperométrica do produto formado na reação enzimática. Assim, a co-imobilização de lacase e tirosinase sobre o material de eletrodo pode permitir a detecção de um número maior de compostos fenólicos. Yaropolov e colaboradores (1995) desenvolveram um sistema de

análise em fluxo para determinar compostos fenólicos empregando-se biossensores a base de lacase, tirosinase ou bienzimático. Apesar da co-immobilização da lacase e tirosinase aumentar a gama de compostos fenólicos detectáveis, o sensor bienzimático apresentou uma menor sensibilidade para estes compostos do que a esperada com base nas respostas das enzimas independentes.

Cosnier e Popescu (1996), buscando aumentar a sensibilidade, para a determinação de fenol, dos biossensores a base de polifenoloxidase (PPO), co-immobilizaram HRP e PPO sobre a superfície de um eletrodo e usaram o sensor bienzimático resultante na presença de H_2O_2 . A associação do sistema HRP- H_2O_2 ao PPO induz uma amplificação da sensibilidade e uma extensão do intervalo linear da curva de calibração. Os dois fenômenos produzindo este efeito foram a maior eficiência do sistema HRP- H_2O_2 em gerar o-quinona a partir de catecol, devido a maior atividade específica e menor massa molar da HRP comparado com a PPO, e o aumento do conteúdo de oxi-tirosinase, com a presença de peróxido (Eickman e col., 1978), que é a única forma de PPO ativa na orto-hidroxilação de fenol e sua subsequente oxidação a o-quinona (Winkler e Solomon, 1985).

III.1.3 - CONSTRUÇÃO DOS BIOSSENSORES

III.1.3.1 – IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS

Uma etapa crítica na construção de um biossensor é a imobilização do componente biológico. O objetivo é conseguir um contato íntimo entre a enzima e o eletrodo, mantendo a bioatividade e a livre difusão de substratos para a superfície biocatalítica.

O tipo de ligação, o material de suporte, e o método de imobilização possuem efeitos pronunciados sobre a constante de ligação do substrato, velocidade máxima da reação, pH ótimo, sensibilidade frente à variação da força iônica e outros parâmetros operacionais do biossensor.

Nos últimos anos, as fibras de carbono têm sido largamente estudadas em processos eletroquímicos e eletroanalíticos, principalmente na construção de microeletrodos (De Carvalho e col., 1998). Uma importante vantagem apresentada pelos eletrodos de fibras de carbono é presença de grupos carboxílicos e hidroxilícos em sua superfície, que permitem sua modificação e imobilização de muitas espécies químicas e biológicas (Ju e col., 1996). Esta última característica pode ser empregada na construção de biossensores eletroquímicos, já que a imobilização de biomoléculas na superfície dos eletrodos possui um papel fundamental no desenvolvimento deste tipo de sensor (Kröger e col., 1999).

O emprego de microbiossensores apresenta grandes vantagens na determinação de, por exemplo, metabólitos e poluentes *in vivo* e *in situ* (Nistor e Emnéus, 1999; Rossato e col., 2001). Entretanto, a imobilização de macromoléculas, na sua forma estável e com a manutenção de suas propriedades biológicas de reconhecimento sobre micro-superfícies condutoras apresenta-se como um dos grandes desafios para a construção de biossensores miniaturizados. Uma variedade de métodos para a imobilização sobre diferentes tipos de eletrodos tem sido usada no desenvolvimento de biossensores para compostos fenólicos, que incluem modificação da superfície de eletrodos sólidos ou da composição do material do eletrodo (exemplo, da pasta de carbono) (Rossato e col., 2001). Apesar dos bons resultados obtidos com estas abordagens, pouca atenção tem sido dada aos métodos tradicionais de imobilização enzimática. Os procedimentos de ligação cruzada, ligação covalente e encapsulamento em géis ou membranas são os métodos de imobilização de biomoléculas mais convencionais (Cosnier, 1999).

III.1.3.2 – ELETRODOS IMPRESSOS

A tecnologia de “screen-printing”, também conhecida como “silk-screening”, tem sido empregada com grande sucesso na fabricação de eletrodos nesta última década. Esta tecnologia possibilita a produção em massa de eletrodos a um custo extremamente baixo, sendo simples e muito apropriada para a produção de eletrodos descartáveis (Nascimento e Angnes, 1998).

O Eletrodo Impresso (EI ou SPE, do inglês “screen printed electrode”), é simplesmente um filme depositado sobre um suporte inerte, geralmente de PVC ou cerâmica de alumina. Em geral, este filme é parcialmente coberto por uma segunda camada de um material isolante para definir uma área de contato elétrico numa extremidade e na outra, uma área para ser a superfície do eletrodo.

Um dos principais aspectos dos SPE é a simplicidade de elaboração e a possibilidade de total automação na fabricação de um sistema completo contendo os eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, todos impressos no mesmo suporte. Além disso, a modificação da superfície destes eletrodos pode ser facilmente conduzida, uma vez que os inúmeros artifícios utilizados para a modificação dos eletrodos de pasta de carbono também se adequam aos SPE (Nascimento e Angnes, 1998).

Se, por um lado as infinitas possibilidades de modificação de eletrodos sólidos permitem visualizar o desenvolvimento dos mais variados sensores para atender a crescente demanda, principalmente nas áreas médicas, industriais e ambientais (Hart e Wring, 1994), por outro lado, a regeneração da superfície após o uso é o maior entrave para o desenvolvimento de eletrodos sólidos comerciais. Tratamentos físicos e químico-eletoquímicos, capazes de regenerar eficazmente a superfície, não são apropriados para sensores comerciais, uma vez que dependem fortemente da ‘mão do operador’. Uma solução para este problema é o desenvolvimento de eletrodos descartáveis, eliminando a necessidade de regeneração de superfície. Para este fim, o desenvolvimento de membranas descartáveis e eletrodos de pasta de carbono se apresentaram, nas últimas décadas, como as alternativas mais empregadas. No entanto, algumas limitações destas tecnologias, como a lixiviação de componentes da pasta de carbono modificada, baixa estabilidade e a forma artesanal de produção dos eletrodos de pasta de carbono e de membrana, desfavorecem o emprego destas tecnologias em eletrodos comerciais (Hart e Wring, 1997; Sprules e col., 1996).

O processo de “screen-printing”, seus equipamentos, materiais e métodos estão muito bem estabelecidos para a produção em massa de componentes eletrônicos como capacitores, resistores e condutores em circuitos impressos.

Aplicações desta natureza atestam por si só a repetibilidade em espessura e geometria, cuja resolução pode chegar a 10 μm . Equipamentos modernos automáticos e semi-automáticos são disponíveis no mercado, e estes equipamentos podem ser empregados, com pequenas adaptações, na preparação de eletrodos impressos (Nascimento e Angnes, 1998).

As etapas básicas da confecção de um SPE são a preparação ou seleção da tinta, seleção da tela, impressão, secagem e cura. O processo é repetido para camadas sucessivas. A secagem e cura são muitas vezes realizadas numa única etapa em temperaturas que variam desde a temperatura ambiente até 1000°C. Geralmente o material impresso requer aquecimento para a polimerização da tinta antes da camada estar pronta para a próxima etapa de impressão. Camadas metálicas são também freqüentemente utilizadas para imprimir eletrodos de referência e auxiliar conjuntamente com o eletrodo de trabalho para sistemas de três eletrodos (Nascimento e Angnes, 1998).

Para um material ser usado como substrato na confecção de eletrodos voltamétricos necessita geralmente apresentar elevada inércia química e inércia eletroquímica, esta última numa ampla faixa de potenciais; elevado sobrepotencial para a produção de hidrogênio e oxigênio; baixa corrente residual; alta condutividade elétrica e propiciar uma fácil regeneração da superfície. Estas características têm levado o carbono a ser amplamente empregado como matéria prima para a confecção de eletrodos (Brainina e Bond, 1995). Tintas condutoras e isolantes comerciais, originalmente desenvolvidas para aplicações na elaboração de circuitos impressos na área da eletrônica, também têm se mostradas apropriadas para serem utilizadas como material base na confecção dos SPE. A maioria dos trabalhos descritos na literatura usa essas tintas (Nascimento e Angnes, 1998). Seus principais componentes são vidros ligantes (aglutinante), como borossilicatos ou aluminossilicatos; solventes, tais como etilcelulose; e aditivos. Tintas com elevada condutividade, usadas para a produção de contatos elétricos, contêm pó de metais tais como Au, Pt, Ag e Pd. As tintas somente a base de carbono também estão disponíveis, pois são muito empregadas para produção de resistores. Após a impressão da tinta no suporte, o filme é secado e

usualmente curado a temperaturas que podem chegar a 1000°C. Por meio deste processo forma-se um filme duro e aderente, com espessura de 10-20 μm , com propriedades mecânicas e elétricas desejadas (Alvarez-Icaza e Bilitewski, 1993). O uso de suportes cerâmicos é bastante adequado quando são necessárias temperaturas altas de cura. Mais recentemente, tintas que requerem temperaturas de cura mais baixas têm sido desenvolvidas, usando-se polímeros ao invés de vidros como aglutinante. A composição exata e o processo de fabricação das tintas comerciais fazem parte de patentes e não são inteiramente reveladas. Um estudo comparativo entre quatro tintas comerciais a base de carbono, obtidas de diferentes fabricantes, amplamente utilizadas na confecção de SPE, revelou diferenças no comportamento eletroquímico dos eletrodos confeccionados com as mesmas (Wang e col., 1998).

A elaboração de eletrodos modificados descartáveis é, sem dúvida, o objetivo mais nobre do emprego da tecnologia de "screen-printing" na fabricação de eletrodos. E mais, o formato planar e a facilidade de miniaturização destes eletrodos são bastante apropriados para sua integração a pequenos equipamentos portáteis. O grande interesse na aplicação de microeletrodos em química analítica está relacionado às suas propriedades únicas, tais como: maior eficiência no transporte de massa, menor tempo de resposta, reduzida queda ôhmica e melhor relação sinal/ruído em comparação com eletrodos de tamanho convencional. Estas propriedades derivam de suas dimensões e da predominância de difusão radial em eletrodos de raio micrométrico ou submicrométrico (Rojendran e Ananthi, 2001; Amatore e col., 2000; Wang, 2000).

III.1.3.3 – SISTEMA DE ANÁLISE EM FLUXO EMPREGANDO-SE BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA O MONITORAMENTO CONTÍNUO DE POLUENTES

A técnica de análise de injeção em fluxo acoplada com a detecção por biossensores eletroquímicos pode ser utilizada como a base para um sistema ideal para monitorar os efeitos da poluição no meio ambiente, principalmente devido a algumas características intrínsecas dos biossensores, tais como sua

base biológica, habilidade para operar em matrizes complexas, curto tempo de resposta e facilidade de miniaturização (Dennison e col., 1995).

Biossensores a base de fenoloxidasas (tirosinase e lacase) e peroxidases têm demonstrado grande utilidade na determinação de fenóis e seus derivados. Entretanto, o uso deste tipo de sensor possui limitações quando empregado para monitorar, continuamente, este tipo de contaminante em matrizes ambientais. Uma destas limitações é a dependência que suas respostas analíticas possuem em função das condições da amostra, por exemplo, pH e força iônica. Em relação à influência do pH, usualmente os biossensores a base destas enzimas apresentam uma boa sensibilidade para valores de pH entre 3 e 7, com uma forte queda na intensidade do sinal analítico para valores de pH maiores que 7 (meios básicos) (Wang e Chen, 1995b; Freire e col., 2001). Esta faixa de pH é bastante útil para algumas amostras de águas naturais, mas não para uma série de efluentes industriais, que algumas vezes possuem valores de pH entre 10 e 12 (Pelegri e col., 2001).

A utilização de membranas em química analítica tem sido reportada com sucesso, esta técnica já foi usada para coletar poluentes no ar e também para determiná-los em plasma sanguíneo (Motomizy e Yodem, 1992; Norberg e col., 1997; Li e col., 1998; Zhang e col., 1999). O transporte de componentes através de uma membrana pode ser descrito pela difusão molecular de acordo com a lei de Fick, ou em casos mais complexos pelo formalismo de Maxwell-Stefan (Zhang e col., 1999). A lei de difusão de Fick estabelece que $J = D (c_1 - c_2/\Delta)$; onde J é o fluxo de soluto em $\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$; c_1 e c_2 são as concentrações do soluto dentro e fora da membrana; Δ é a espessura da membrana e D é o coeficiente de difusão.

III.1.4- JUSTIFICATIVA

A maioria das investigações com biossensores amperométricos foram realizadas utilizando-se compostos sintéticos puros. A análise de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental ainda é incipiente, e vem sendo favorecida à medida que o desenvolvimento dos biossensores oferece melhores resultados quanto à sensibilidade e estabilidade. Atualmente, a literatura mostra

alguns exemplos do emprego bem sucedido deste tipo de biossensor em análise de fenóis em águas de rio, análise de águas superficiais e efluentes industriais.

Até o presente momento, os biossensores a base de tirosinase foram os mais explorados como ferramenta analítica para a determinação de compostos fenólicos. Apesar da excelente estabilidade da lacase, poucos trabalhos empregaram esta enzima no desenvolvimento de biossensores amperométricos. Esta característica, aliada à atividade da lacase para uma ampla gama de compostos, faz desta enzima uma excelente alternativa para o desenvolvimento de sistemas analíticos para determinação de compostos fenólicos em matrizes complexas. Uma outra particularidade importante da lacase é a sua maior sensibilidade para compostos fenólicos clorados, que são extremamente importantes do ponto de vista ambiental devido as suas elevadas toxicidades.

III.2 –OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Visando fornecer novas ferramentas analíticas para avaliar a qualidade dos processos de tratamento empregados, outro objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de biossensores amperométricos a base de lacase e tirosinase para monitorar a concentração de compostos fenólicos presentes no efluente papelero.

A principal preocupação durante o desenvolvimento destes biossensores foi quanto a sua aplicabilidade em amostras de interesse ambiental. Assim, mais do que baixos limites de detecção, buscou-se sensores e/ou sistemas robustos que pudessem ser empregados diretamente na análise de matrizes complexas (com condições adversas de pH, força iônica, presença de interferentes, etc.).

A imobilização de biomoléculas na superfície dos eletrodos possui um papel fundamental no desenvolvimento deste tipo de sensor, assim um dos objetivos específicos deste trabalho foi estudar e otimizar o processo de imobilização das enzimas sobre diferentes eletrodos a base de materiais carbonáceos.

Outro objetivo foi explorar a versatilidade destes materiais para o desenvolvimento de diferentes dispositivos amperométricos, tais como, sensores remotos e/ou descartáveis a base de fibra de carbono, carbono vítreo e eletrodos impressos ("screen-printed").

O objetivo final foi empregar estes biossensores no monitoramento de compostos fenólicos, desenvolvendo metodologias para: 1) determinação da concentração de fenóis totais; 2) determinação e quantificação simultânea de diferentes compostos fenólicos e 3) monitoramento contínuo das espécies fenólicas presentes no efluente papelero durante o processo de remediação do mesmo.

III.3 – METODOLOGIA

III.3.1 – REAGENTES E MATERIAIS

III.3.1.1 - Compostos fenólicos

Catecol (Aldrich, EUA), fenol (Merck, Alemanha e Aldrich, EUA), *p*-clorofenol (Aldrich, EUA), guaiacol (Aldrich, EUA), *m*-cloroguaiacol (Research Chemical, EUA), *p*-cloroguaiacol (Aldrich, EUA), *m*-cresol (Merck, Alemanha), *p*-cresol (Aldrich, EUA) e *m*-clorocresol (Merck, Alemanha). Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água deionizada (Millipore, EUA).

III.3.1.2 – Reagentes de imobilização

1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida meta-*p*-toluenosulfonato (Aldrich, EUA); glutaraldeído (75% (m/v), solução aquosa) (Aldrich, EUA) e Albumina de soro bovino (BSA) (Sigma, EUA).

III.3.1.3 – Enzimas

Tirosinase (EC 1.14.18.1; 5200 U mg⁻¹, Sigma, EUA), Lacase (*Coriolus hirsutus*, EC.1.10.3.2, 416 U mg⁻¹, SynectiQ Corp., EUA) e lacase obtida a partir do fungo *Trametes versicolor* (Minussi e col., 2002)).

III.3.1.3.1 - Atividade enzimática

A atividade da tirosinase foi definida como a variação de 0,001 unidade de absorção por minuto, no comprimento de onda 280 nm em uma mistura reacional contendo catecol, com pH 6,5 e a temperatura de 25 °C (definição descrita pela empresa Sigma, comercializadora da enzima).

A atividade de lacase foi determinada utilizando siringaldazina como substrato enzimático. A oxidação de siringaldazina ($\epsilon_{460} = 65.000 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$) foi conduzida numa mistura de reação contendo 0,6 mL de extrato enzimático, 0,3 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 mol L⁻¹ (pH 5,0) e 0,1 mL de siringaldazina 1,0 mmol L⁻¹. A reação teve início pela adição da siringaldazina e a velocidade de oxidação

desta foi monitorada durante 5 minutos no comprimento de onda de 525 nm. Uma unidade de atividade de lacase foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de substrato por minuto e por litro (Szklarz e col., 1989).

III.3.1.4 – Amostras

Efluente papelheiro Kraft E1, coletado em uma indústria na região de Campinas. Amostras de águas superficiais foram coletadas no Rio Grande em Las Cruces/NM/EUA. Todas as amostras foram utilizadas sem nenhuma etapa prévia de filtração ou tratamento.

III.3.2 – ELETRODOS

III.3.2.1 – Eletrodos de fibra de carbono

Cerca de 20 fibras de carbono (PAN T-800, Toray Inc., Japão; Alfa Aesar, EUA) foram inseridas em um tubo de polietileno de aproximadamente 1 mm de diâmetro interno, deixando aproximadamente 5 mm de fibras expostas e selando a junção por aquecimento. O contato elétrico foi feito com fio de cobre e pasta de carbono condutora (Leit-C condutive carbon cement, Neubauer Chemikalien, Suécia), sendo que a outra extremidade do tubo de polietileno foi selada com resina epóxi (Araldite®, Brascola Ltda, Brasil), conforme é apresentado na Figura 3.8.



Figura 3.8 - Diagrama esquemático da preparação do microeletrodo: 1- fibras de carbono; 2- junção da fibra de carbono com o fio condutor; 3- tubo de polietileno, preenchido com pasta de carbono condutora; 4- resina epóxi; 5- contato elétrico.

III.3.2.2 – Eletrodos Impressos (“screen printed electrodes”)

Os eletrodos tipo “screen printed” foram impressos com uma impressora semi-automática, modelo TF100 (MPM, EUA). Três diferentes tintas comerciais (Acheson Electrodag 440B (49AB90), Acheson Colloids, Canada; Ercon Carbon (449[I]), Ercon, EUA e DuPont Carbon Polymer Conductor (3610), DuPont Electronics, EUA) foram usadas para imprimir os eletrodos. O processo de impressão consistiu em forçar a tinta a passar através de uma tela metálica (com orifícios no formato do eletrodo) para ser depositada sobre um suporte de cerâmica de alumina plano e eletroquimicamente inerte. Após este processo, a tinta de carbono sobre o suporte foi seca por 90 minutos a 160°C. Assim, o eletrodo constitui-se de uma superfície condutora feita de uma linha de tinta de carbono. Uma combinação do uso sucessivo de diferentes telas, tintas e isolantes permitiu a impressão do contato de prata e a definição da área do eletrodo (com dimensão de 0,30 x 2,50 mm), conforme procedimento descrito por Wang e colaboradores (1998). Na Figura 3.9 é mostrado um desenho esquemático do eletrodo impresso desenvolvido.

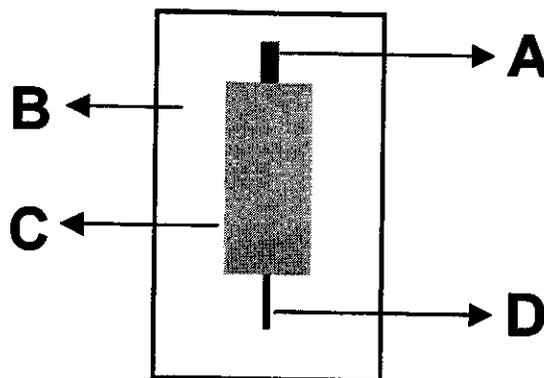


Figura 3.9 - Desenho esquemático do eletrodo impresso: contato elétrico (A), suporte de cerâmica de alumina (B), isolante elétrico (C) e eletrodo de trabalho (D).

III.3.2.3 – Eletrodos de carbono vítreo

No sistema de análise em fluxo para o monitoramento contínuo de compostos fenólicos utilizou-se um eletrodo de carbono vítreo comercial (referência 6.1204.110, Metrohm, Suíça).

III.3.3 – MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

O sistema utilizado nas medidas eletroquímicas era constituído de uma célula eletroquímica de três eletrodos: eletrodo de Ag/AgCl como eletrodo de referência; fio de platina como contra-eletrodo e os biossensores desenvolvidos como eletrodos de trabalho.

Os experimentos foram realizados utilizando-se: 1) um potenciostato PGSTAT 20 – AUTOLAB (Ecochemie, Holanda), acoplado a um microcomputador para a aquisição dos dados e gerenciamento do potenciostato; 2) um analisador voltamétrico Bioanalytical System (BAS, EUA), modelo CV-27, conectado com um registrador BAS X-Y-t (BAS, EUA); ou 3) um detector amperométrico Amperometric Biosensor Detector (Universal Sensors Inc., EUA), modelo 3001 ABD, conectado com um registrador X-Y-t ECB (ECB, Brasil), modelo RB 101

Os experimentos amperométricos e/ou cronoamperométricos foram conduzidos aplicando-se um potencial fixo e monitorando-se a corrente de difusão resultante. Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente e, salvo quando explicitamente mencionado, as medidas foram realizadas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 5,0.

III.3.4 – DISPOSITIVO PARA MONITORAMENTO REMOTO

O dispositivo para monitoramento remoto era constituído basicamente de três eletrodos fixados em um tubo de PVC (diâmetro interno de 25 mm) e conectados, através de um conector de três pinos hermeticamente selado (Newark Electronics, EUA) a um cabo blindado de 20 metros. Dois conectores (fixados com resina epóxi no tubo de PVC) servem para suportar o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência (Ag/AgCl, modelo RE-4 BAS), permitindo uma manutenção/troca rápida e fácil. O contra eletrodo (fio de platina) foi

permanentemente fixado no suporte empregando-se resina epóxi. Como eletrodo de trabalho utilizou-se biossensores a base de lacase e/ou tirosinase imobilizadas sobre eletrodos de fibra de carbono. Um diagrama esquemático do biossensor remoto é mostrado na Figura 3.10. O dispositivo para monitoramento remoto foi imerso completamente nas soluções das amostras, contidas em um bquer de 300 mL e localizadas a 20 metros do potenciostato.

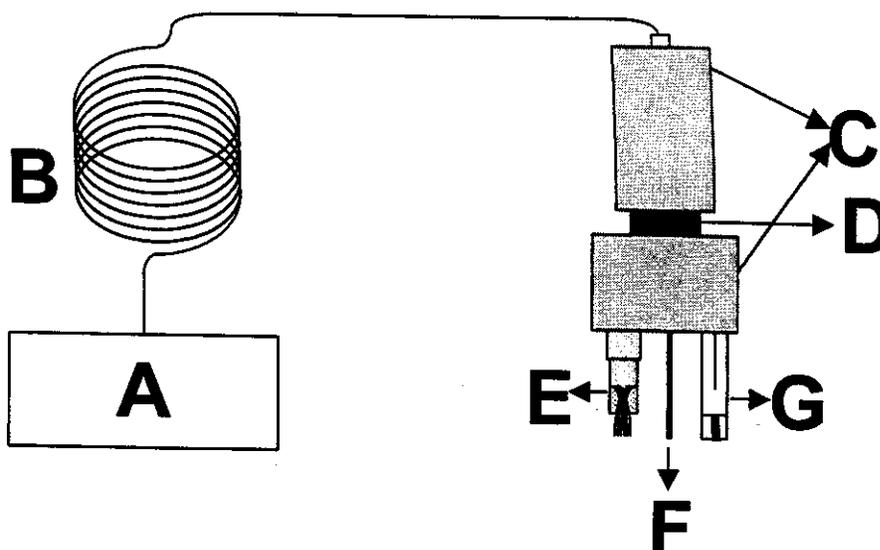


Figura 3.10 – Diagrama esquemático do dispositivo para monitoramento remoto. Potenciostato (A), cabo blindado de 20 metros (B), tubo de PVC com resina epóxi (C), conector de três pinos hermeticamente selado (D), eletrodo de trabalho (E), contra eletrodo (F) e eletrodo de referência (G).

III.3.5 – IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS NA SUPERFÍCIE DOS ELETRODOS

Antes da imobilização das enzimas, os eletrodos foram pré-tratados eletroquimicamente aplicando-se um potencial de +2,00 V durante 5 minutos, utilizando-se como solução eletrolítica o tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2.

Inicialmente, estudou-se a imobilização da lacase sobre a superfície dos eletrodos de fibra de carbono por meio dos métodos de:

- 1) Adsorção física – os eletrodos foram mergulhados em uma solução contendo a

enzima de interesse, a temperatura ambiente por 30 minutos.

- 2) Ligação cruzada – soluções aquosas de glutaraldeído (concentração final 10% v/v) foram adicionadas à solução de lacase. Sendo então, os eletrodos de fibra de carbono mergulhados nesta mistura por 30 minutos.
- 3) Ligação covalente – deixou-se os eletrodos reagirem, durante 2 horas em agitação contínua, com 15,0 mg de carbodiimida dissolvidas em 500 μL de tampão acetato 0,05 mol L^{-1} pH 4,8. Após esta etapa os eletrodos foram mergulhados em soluções de lacase por 30 minutos.
- 4) Carbodiimida/glutaraldeído – os eletrodos foram mergulhados em soluções aquosas de glutaraldeído + lacase, imediatamente após a modificação com carbodiimida. Diferentes concentrações de glutaraldeído foram avaliadas.

Conforme os resultados que serão apresentados no item III.4.1, o melhor processo de imobilização foi obtido por meio do método carbodiimida/glutaraldeído, passando a ser este, o único processo aplicado para a imobilização de lacase e tirosinase sobre as superfícies dos eletrodos tipo “screen printed”, fibra de carbono e carbono vítreo. Diferentes concentrações de carbodiimida, glutaraldeído, albumina bovina foram avaliadas para otimizar este método de imobilização. Os melhores resultados foram obtidos empregando-se uma solução com a seguinte constituição: 10 mg mL^{-1} de glutaraldeído, 6 mg mL^{-1} de albumina bovina, 300 U mL^{-1} de lacase e/ou 1.040 U mL^{-1} de tirosinase.

III.3.6 – TRATAMENTO QUIMIOMÉTRICO PARA ANÁLISE SIMULTÂNEA DE DIFERENTES COMPOSTOS FENÓLICOS

III.3.6.1 - CONJUNTO DE DADOS

As amostras utilizadas na determinação simultânea de misturas binárias de compostos fenólicos (catecol/fenol; fenol/clorofenol; cresol/clorocresol e fenol/cresol) eram sintéticas e resultante de um planejamento conforme é mostrado na Tabela 3.1. O conjunto das amostras foi preparado na faixa de

concentração de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a $10,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, em um total de 49 amostras para cada mistura binária.

O conjunto de dados foi dividido em 2 subconjuntos, um para calibração e outro para a validação do modelo, com 35 e 14 amostras, respectivamente. A seleção das amostras para os subconjuntos (calibração e validação) foi feita por meio da análise das componentes principais (PCA), de modo a garantir uma homogeneidade de ambos os subconjuntos.

Tabela 3.1 – Planejamento das misturas binárias. C = composto fenólico 1; F = composto fenólico 2. Os sub-índices indicam a concentração, 1 = $1,0 \times 10^{-6}$; 2 = $2,0 \times 10^{-6}$; sucessivamente até 10 = $10,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

C ₀ F ₀	C ₂ F ₀	C ₄ F ₀	C ₅ F ₀	C ₆ F ₀	C ₈ F ₀	C ₁₀ F ₀
C ₀ F ₂	C ₂ F ₂	C ₄ F ₂	C ₅ F ₂	C ₆ F ₂	C ₈ F ₂	C ₁₀ F ₂
C ₀ F ₄	C ₂ F ₄	C ₄ F ₄	C ₅ F ₄	C ₆ F ₄	C ₈ F ₄	C ₁₀ F ₄
C ₀ F ₅	C ₂ F ₅	C ₄ F ₅	C ₅ F ₅	C ₆ F ₅	C ₈ F ₅	C ₁₀ F ₅
C ₀ F ₆	C ₂ F ₆	C ₄ F ₆	C ₅ F ₆	C ₆ F ₆	C ₈ F ₆	C ₁₀ F ₆
C ₀ F ₈	C ₂ F ₈	C ₄ F ₈	C ₅ F ₈	C ₆ F ₈	C ₈ F ₈	C ₁₀ F ₈
C ₀ F ₁₀	C ₂ F ₁₀	C ₄ F ₁₀	C ₅ F ₁₀	C ₆ F ₁₀	C ₈ F ₁₀	C ₁₀ F ₁₀

III.3.6.2 – MÉTODO DE TRATAMENTO DOS DADOS

Os cálculos de PCA e PLS foram realizados empregando-se o programa computacional Piruette. Na análise pelo método dos mínimos quadrados parciais (PLS), um modelo de regressão é construído entre o conjunto de variáveis independentes (**X**, onde cada linha contém as variáveis medidas para cada amostra) e a resposta (**c**). Antes da regressão, o conjunto **X** é decomposto em "scores" e vetores de pesos (**w**, por exemplo, **Xw = t**), onde **w** é escolhido do modo que **t**, possua a máxima covariância com **c** (Geladi e Kowalski, 1986; Beebe e col., 1998).

No presente trabalho, foi construído somente um modelo para a previsão dos dois componentes (PLS1), utilizando-se 2 componentes principais (variáveis latentes) e centrando-se os dados na média. Os modelos foram construídos

baseados no conjunto de treinamento, sendo as previsões realizadas com o conjunto de validação.

A eficiência dos modelos na previsão das concentrações da amostra foi avaliada pelo procedimento validação cruzada, buscando-se o menor erro padrão de previsão (SEP), definido na equação 3.3 como:

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (c_i - \hat{c}_i)^2}{n}} \quad \text{eq.3.3}$$

onde c é o valor experimental, \hat{c} é o valor previsto e n é o número de amostras usadas no modelo.

III.3.7 – SISTEMA DE INJEÇÃO EM FLUXO

Na Figura 3.11 é mostrado um diagrama esquemático do sistema analítico para monitoramento contínuo de compostos fenólicos. Tal sistema pode ser disposto na configuração para análise por injeção em fluxo (i) ou para análise em fluxo contínuo (ii). Na Figura 3.11 também é apresentado um diagrama esquemático da célula amostradora (sistema de diálise com membrana) (iii) e da célula eletroquímica (iv).

O suporte para a membrana constituiu-se de dois blocos de acrílicos com sulcos idênticos (com dimensões de 100 X 3 X 0,25 mm), que formavam um canal com 150 μL de volume. A membrana de celulose (com corte de massa molar de 12.000 uma, Sigma) foi imersa em água deionizada durante 10 minutos, antes que fosse colocada entre os dois blocos de acrílico. A célula eletroquímica deste dispositivo era dotada de um biossensor a base de carbono vítreo e um sistema de fluxo do tipo “wall jet”.

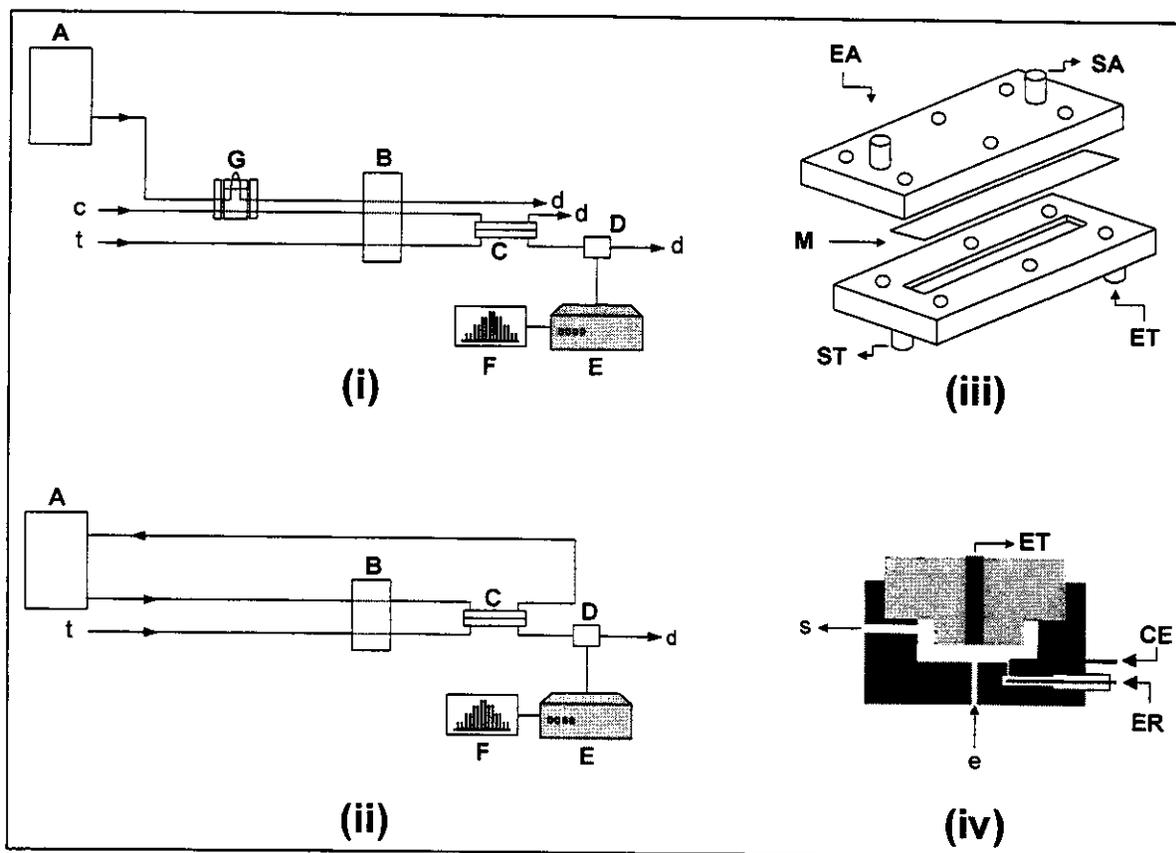


Figura 3.11 - Diagrama esquemático do sistema analítico. Configuração para análise por injeção em fluxo (i); configuração para análise em fluxo contínuo (ii), onde A = amostra, B = bomba peristáltica, C = célula de permeação, D = célula eletroquímica de detecção, E = potenciostato, F = registrador, G = injetor, c = carregador, d = descarte e t = solução tampão. Célula amostradora (sistema de diálise com membrana) (iii), onde EA = entrada da amostra, SA = saída da amostra, M = membrana, ET = entrada da solução tampão, ST = saída da solução tampão. Célula eletroquímica (iv), onde ET = eletrodo de trabalho (biossensor), CE = contra-eletrodo, ER = eletrodo de referência, e = entrada da célula eletroquímica e s = saída da célula eletroquímica.

III.4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.4.1 – IMOBILIZAÇÃO DE LACASE SOBRE ELETRODOS DE FIBRA DE CARBONO

O principal objetivo desta etapa do trabalho foi investigar o efeito de diferentes métodos de imobilização da lacase sobre a superfície de eletrodos a base de materiais carbonáceos, tais como eletrodos de fibra de carbono.

A imobilização da lacase, obtida a partir de um extrato do fungo *Trametes versicolor*, sobre as fibras de carbono foi realizada por quatro diferentes processos: adsorção física, ligação covalente com carbodiimida, ligação cruzada com glutaraldeído e ligação covalente com carbodiimida/glutaraldeído.

Na Tabela 3.2 é apresentada a sensibilidade dos biossensores na determinação de catecol, obtida para cada processo de imobilização da lacase.

Tabela 3.2 - Respostas dos biossensores a base de lacase na determinação de catecol (potencial aplicado: -100 mV vs. ECS, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0; CV: coeficiente de variação).

Método de imobilização	Sensibilidade (nA / μmol L ⁻¹)	Coefficiente de correlação (r ²)	CV (%)
Eletrodo não modificado	0,36 ± 0,07	0,927	18,9
Adsorção física	0,60 ± 0,05	0,989	10,2
Ligação cruzada com glutaraldeído 10%	2,05 ± 0,09	0,995	5,1
Ligação covalente com carbodiimida	3,69 ± 0,17	0,996	4,7
Carbodiimida + glutaraldeído 1,5%	6,49 ± 0,15	0,998	2,8
Carbodiimida + glutaraldeído 2,5%	9,12 ± 0,23	0,998	2,6
Carbodiimida + glutaraldeído 5%	14,32 ± 0,27	0,999	1,9
Carbodiimida + glutaraldeído 10%	16,07 ± 0,27	0,999	1,7
Carbodiimida + glutaraldeído 15%	1,13 ± 0,05	0,989	5,6

Estes resultados mostram que o método de imobilização enzimática via adsorção física resulta num biossensor com baixa sensibilidade, enquanto que os métodos com glutaraldeído e carbodiimida apresentam biossensores com melhores sensibilidades.

A carbodiimida é capaz de promover uma forte ligação entre a enzima e o eletrodo, conforme é mostrado esquematicamente a Figura 3.12, entretanto esta fixação é feita por meio de grupos carboxílicos, sendo que o centro ativo da lacase pode conter este tipo de grupo. Desta forma, a imobilização por meio da carbodiimida pode levar a uma redução na atividade enzimática.

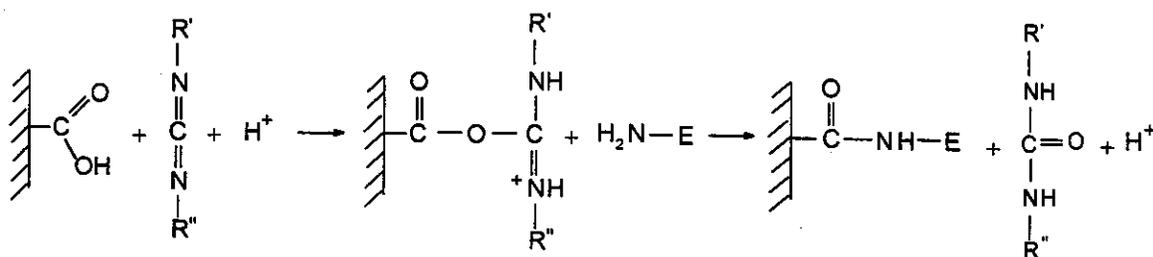


Figura 3.12 – Esquema da reação via carbodiimida usada para a formação de ligação covalente entre a enzima e o suporte (Chibata, 1978).

Por outro lado, o glutaraldeído promove uma boa reticulação enzimática aumentando a quantidade de enzima por área (Figura 3.13), mas não é muito efetivo na fixação das enzimas reticuladas sobre a superfície do eletrodo.

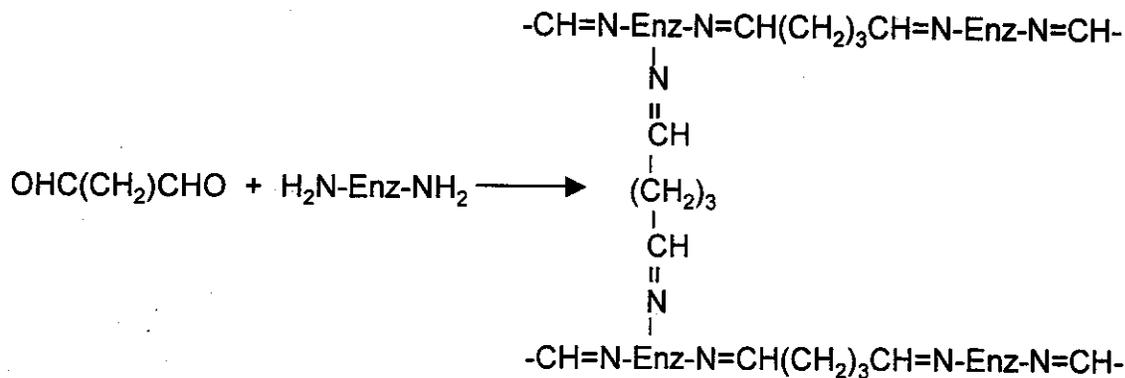


Figura 3.13 – Ligação cruzada envolvendo a reação entre glutaraldeído e os grupos amina residuais livres da enzima (Woodward, 1985).

O melhor procedimento para a imobilização de lacase sobre as fibras de carbono foi obtido utilizando-se carbodiimida e glutaraldeído simultaneamente, devido ao efeito sinérgico entre estas duas metodologias, aliou-se a boa fixação apresentada pelo método com carbodiimida com a boa reticulação obtida pelo método com glutaraldeído, resultando em um biossensor com alta sensibilidade e estabilidade.

Na Figura 3.14 é mostrada a sensibilidade do biossensor em função do aumento da porcentagem de glutaraldeído % (v/v). Para soluções com porcentagens de glutaraldeído acima de 10% foi observada uma diminuição na atividade enzimática, provavelmente devido a um alto grau de reticulação enzimática, promovida pelo glutaraldeído, o que dificultaria o acesso do substrato ao centro ativo da enzima.

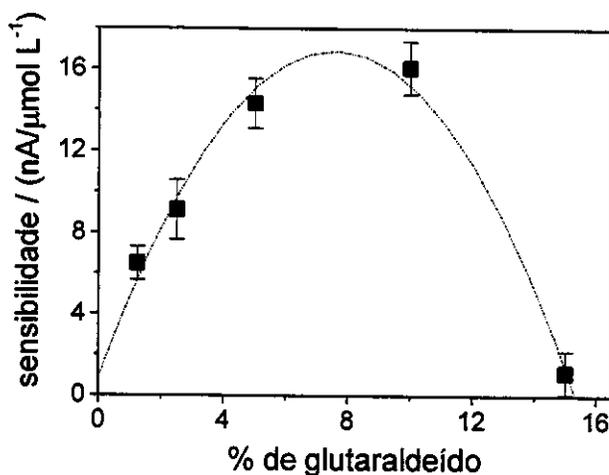


Figura 3.14 – Sensibilidade do biossensor a base de lacase em função da porcentagem de glutaraldeído utilizada no processo de imobilização.

Na Figura 3.15 é apresentado o efeito do pH na resposta deste biossensor. Para soluções com pH acima de 6,5 a sensibilidade do biossensor decresce rapidamente, sendo que um máximo de resposta é obtido em pH ao redor de 5,0. Esta faixa ótima de pH é similar à observada para lacases solúveis e purificadas, indicando que o processo de imobilização não afeta a carga da enzima.

O potencial aplicado durante a medida eletroquímica também exerce um forte efeito sobre a resposta do biossensor, conforme mostra a Figura 3.16. Apesar da resposta do biossensor aumentar em potenciais mais negativos, fixou-se o valor de -100 mV, devido a este potencial apresentar uma boa razão sinal/ruído e estar menos sujeito a interferências de compostos não fenólicos, principalmente em matrizes complexas.

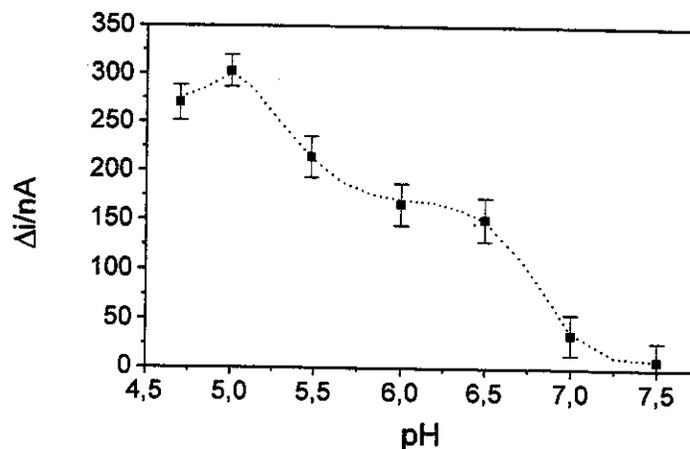


Figura 3.15 – Efeito do pH na resposta do biossensor a base de lacase. Solução de catecol $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, potencial aplicado: -100 mV vs. ECS.

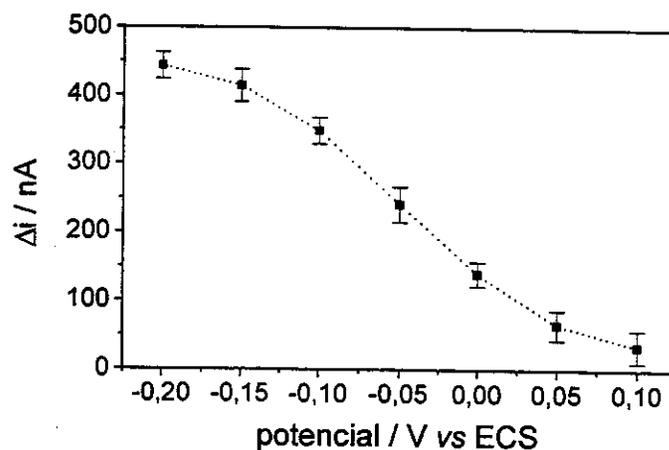


Figura 3.16 – Efeito do potencial aplicado na resposta do biossensor a base de lacase. Solução de catecol $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 5,0.

A curva analítica, obtida para catecol, usando o biossensor a base de lacase desenvolvido com o método carbodiimida/glutaraldeído, mostrou uma faixa

linear de resposta entre 1 e 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$, conforme é mostrado na Figura 3.17. A equação de ajuste desta curva é dada por $i(\text{nA}) = 0,3 (\pm 0,1) + 16,1 (\pm 0,2) (\text{nA}/\mu\text{mol L}^{-1}) [\text{catecol}]$, com um coeficiente de correlação de 0,9998 para $n = 25$. Deste modo, o biossensor desenvolvido apresentou uma excelente faixa operacional e ótima sensibilidade.

A constante aparente de Michaelis-Menten deste biossensor foi estimada em 0,61 mmol L^{-1} (catecol como substrato); para lacase livre em solução o valor encontrado foi de 3,9 mmol L^{-1} . Este resultado mostra que o procedimento de imobilização promoveu um aumento significativo na afinidade da lacase.

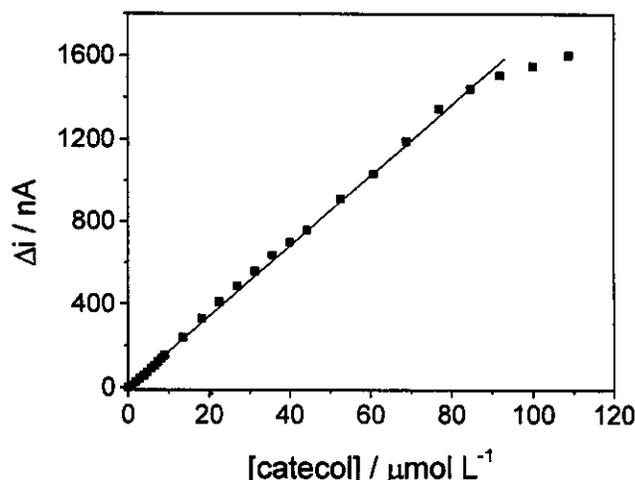


Figura 3.17 – Resposta do biossensor de lacase em função da concentração de catecol, (potencial aplicado: -0,1V vs. ECS, eletrólito suporte: tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 5,0).

III.4.2 – BIOSENSOR A BASE DE LACASE/SPE PARA A DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Os eletrodos do tipo “screen-printed” foram escolhidos como um dos eletrodos base para a confecção dos biossensores descartáveis para a determinação de compostos fenólicos, devido à facilidade de produção em massa, elevada reprodutibilidade, baixo custo e robustez apresentados pela técnica de “screen-printing”.

Eletrodos do tipo “screen-printed” com diferentes janelas de potencial, sensibilidade e correntes residuais podem ser obtidos a partir das diferentes tintas

comerciais a base de carbono, largamente empregadas na fabricação deste tipo de eletrodo (Wang e col., 1998). Essas diferenças no comportamento eletroquímico são atribuídas à composição das tintas que, por motivos comerciais (patentes), não são de todo conhecidas. Deste modo, a escolha da tinta influi diretamente na aplicação eletroanalítica que se objetiva, assim como no desempenho deste tipo de eletrodo. Neste trabalho, três diferentes tipos de tintas comerciais, a base de carbono, foram avaliados. Na Figura 3.18 é apresentada a resposta dos biossensores, a base de lacase, fabricados com as tintas comerciais Ercon (A), DuPont (B) e Acherson (C).

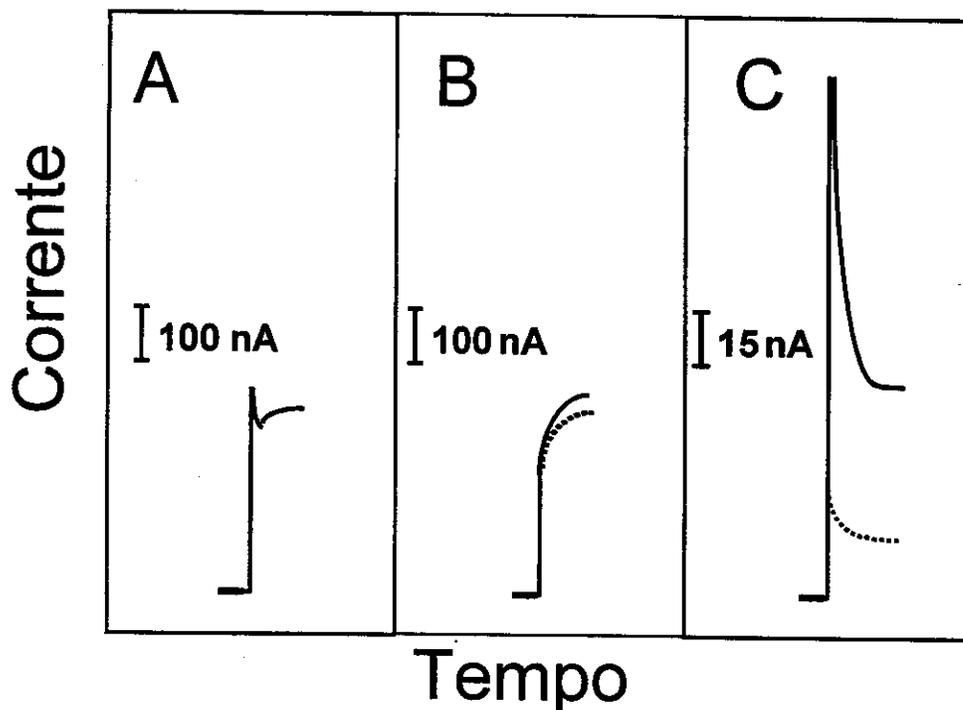


Figura 3.18 – Efeito do tipo da tinta de carbono sobre a resposta do biossensor de lacase. Respostas obtidas com as tintas Ercon (A), DuPont (B) e Acherson (C), empregando-se uma solução de guaiacol $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (corrente residual, representada pela linha pontilhada). Potencial de trabalho: $-0,10 \text{ V vs Ag/AgCl}$; em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 5,0).

Os sensores desenvolvidos com a tinta Ercon não apresentaram nenhum grau de imobilização da lacase sobre sua superfície, já que não se observou nenhum sinal eletroquímico, quando empregou-se estes sensores na

determinação de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de guaiacol. Em relação aos sensores fabricados com a tinta DuPont observou-se uma resposta significativa para a mesma solução teste. Contudo, estes eletrodos também apresentaram uma alta corrente residual, baixa reprodutibilidade e pouca estabilidade. O melhor substrato para a imobilização da lacase foi obtido utilizando-se a tinta Acherson, os eletrodos confeccionados com esta tinta apresentaram a melhor razão sinal/ruído, além de uma maior estabilidade. Assim, os resultados que serão apresentados neste trabalho foram obtidos utilizando-se eletrodos fabricados com a tinta Acherson.

A produção em massa de micro-sensores, com elevado grau de reprodutibilidade é apenas uma das vantagens apresentadas pela técnica de "screen-printing". Uma outra característica bastante favorável desta técnica é a possibilidade de modificação da superfície dos eletrodos pois, neste requisito, os eletrodos do tipo "screen-printed" se assemelham aos eletrodos confeccionados com pasta de carbono ou outros materiais carbonáceos. Assim, em princípio, todas as técnicas e artifícios utilizados para a modificação dos eletrodos a base de carbono se adequam aos SPE. Deste modo, a imobilização da lacase sobre a superfície dos eletrodos tipo "screen-printed" foi realizada por meio dos métodos clássicos de imobilização: ligação covalente e ligação cruzada. Conforme descrito anteriormente, um dos melhores procedimentos de imobilização da enzima lacase sobre materiais carbonáceos foi obtido utilizando-se carbodiimida e glutaraldeído simultaneamente. Assim, nesta etapa do trabalho buscou-se utilizar este mesmo procedimento de imobilização. Entretanto, diferentemente do trabalho anterior, onde se empregou um extrato bruto de lacase, no presente estudo foi utilizada uma solução comercial de lacase com alto grau de pureza, o que requereu o emprego de albumina bovina como aditivo para controlar o grau de reticulação durante o processo de imobilização. Durante a otimização da imobilização da lacase sobre a superfície dos SPE, foram avaliadas diferentes concentrações de albumina bovina, glutaraldeído, carbodiimida e de lacase. Na Figura 3.19 é mostrada a resposta para uma solução de guaiacol $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ variando-se estes parâmetros durante a confecção dos biossensores/SPE.

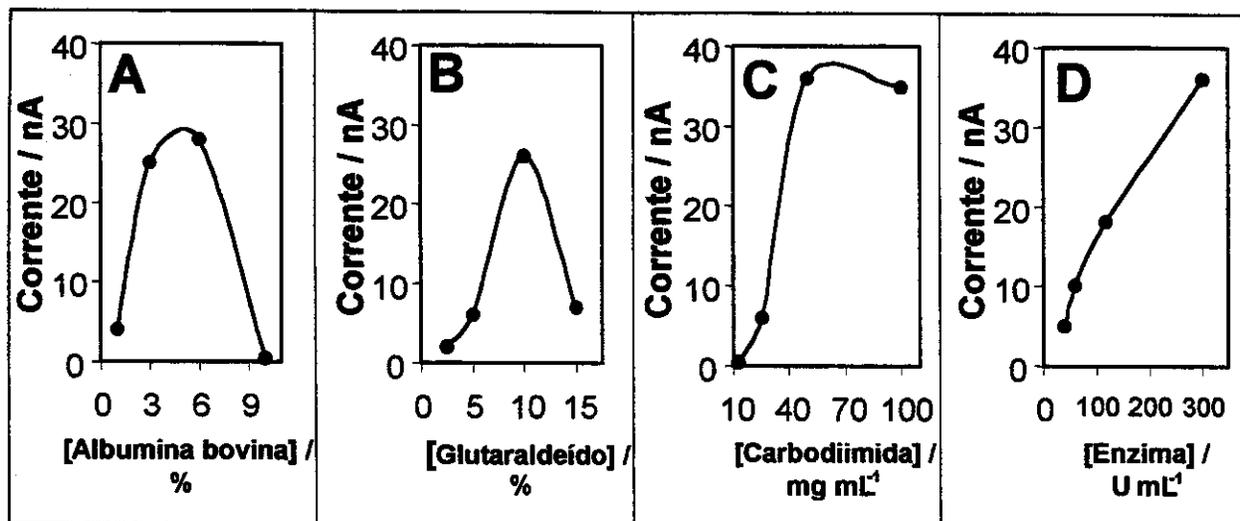


Figura 3.19 – Efeito da concentração de albumina bovina (A), glutaraldeído (B), carbodiimida (C) e de lacase (D) na resposta do biossensor frente a uma solução de guaiacol $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Potencial de trabalho: $-0,10 \text{ V vs Ag/AgCl}$; em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 5,0).

A melhor condição para a imobilização da lacase sobre a superfície dos eletrodos tipo “screen-printed” foi obtida utilizando as seguintes concentrações: albumina bovina 6 mg mL^{-1} , glutaraldeído 10 mg mL^{-1} , carbodiimida 50 mg mL^{-1} e lacase 300 U mL^{-1} .

Após a otimização da imobilização da lacase, o comportamento deste biossensor frente a diferentes compostos fenólicos foi avaliado. Na Figura 3.20 é apresentada a resposta para fenol (A), clorofenol (B), *p*-cresol (C), guaiacol (D) e *p*-cloroguaiacol (E).

A ordem de sensibilidade, para estes compostos fenólicos, apresentada pelo biossensor foi: *p*-cloroguaiacol > guaiacol > *p*-cresol > *p*-clorofenol > fenol, com destaque para a sensibilidade apresentada para os compostos *p*-cloroguaiacol e guaiacol, conforme é mostrado na Figura 3.21. As curvas analíticas obtidas para estes compostos mostraram uma boa resposta linear na faixa de concentração entre $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $10,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 3.21b) e $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $10,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 3.21c), ajustadas pelas equações: $i(\text{nA}) = 18,62 \pm 0,62$ ($\text{nA}/\mu\text{mol L}^{-1}$) [cloroguaiacol], $r^2 = 0,9998$ e $i(\text{nA}) = 12,75 \pm 0,41$ ($\text{nA}/\mu\text{mol L}^{-1}$)

[guaiacol], $r^2 = 0,9989$; $i(nA) = 6,58 \pm 0,24$ ($nA/\mu\text{mol L}^{-1}$) [cloroguaiacol], $r^2 = 0,9989$ e $i(nA) = 4,74 \pm 0,18$ ($nA/\mu\text{mol L}^{-1}$) [guaiacol], $r^2 = 0,9998$.

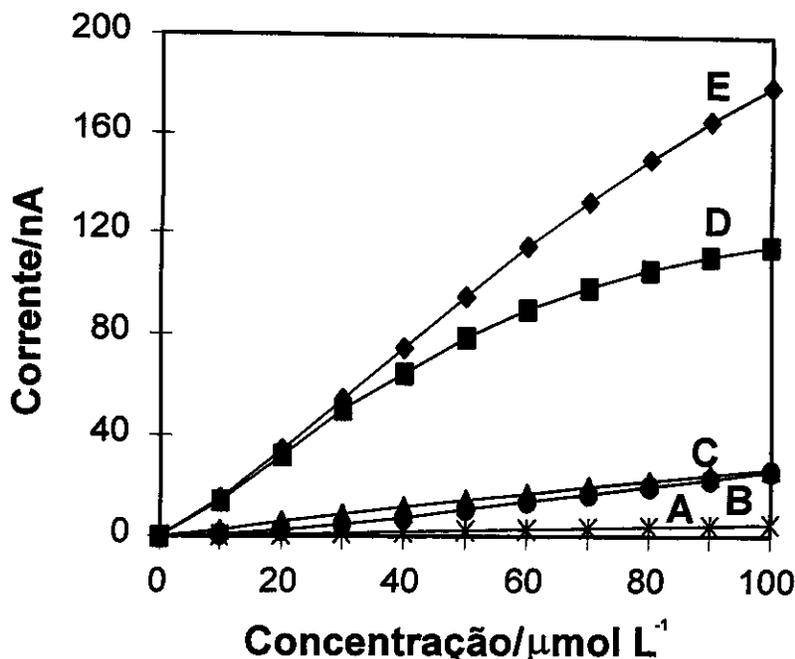


Figura 3.20 – Resposta do biossensor/SPE para aumentos sucessivos de $10,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ na concentração de fenol (A), *p*-clorofenol (B); *p*-cresol (C); guaiacol (D) e *p*-cloroguaiacol (E). Potencial de trabalho: $-0,10 \text{ V}$ vs Ag/AgCl; em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 5,0).

Limites de detecção ao redor de $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para guaiacol e $3,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para cloroguaiacol foram estimados baseados na boa razão sinal/ruído e na baixa corrente residual. Esta última é atribuída, dentre outros fatores, ao baixo potencial de trabalho ($-0,10 \text{ V}$) empregado.

Este novo tipo de biossensor a base de lacase apresentou uma excelente faixa operacional e sensibilidade, além de uma boa estabilidade, como mostrado na Figura 3.22. Esta boa estabilidade permitiu a realização de análises por mais de três meses (com uma média de 500 determinações). A repetibilidade também foi excelente, com um desvio padrão relativo de 3,4% para 12 replicatas (dados não mostrados).

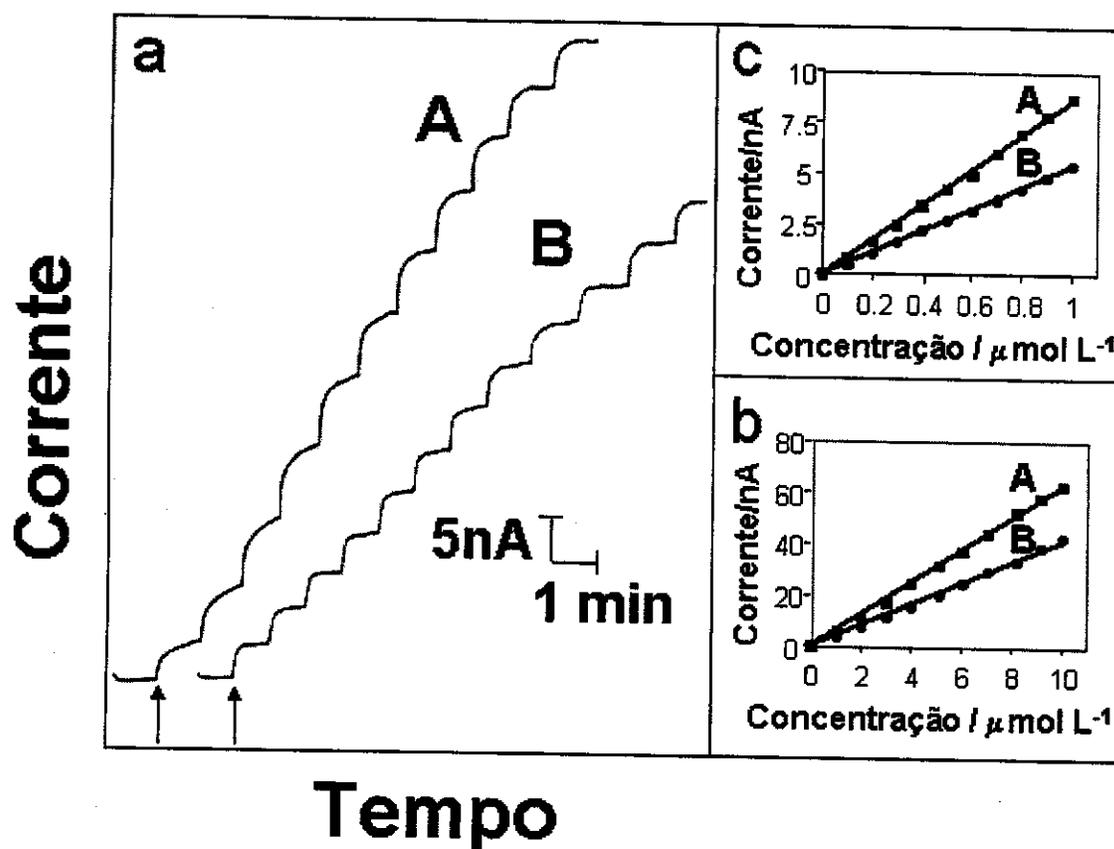


Figura 3.21 – Resposta amperométrica (a) do biossensor/SPE para aumentos sucessivos de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ na concentração de *p*-cloroguaiacol (A) e guaiacol (B). Os gráficos de calibração para esta faixa de concentração (b), assim como para incrementos de $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (c) também são apresentados. Potencial de trabalho: $-0,10 \text{ V vs Ag/AgCl}$; em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 5,0).

Na Figura 3.23 é mostrada a resposta do biossensor para diferentes tipos de amostras, tais como tampão fosfato (A), água potável (B), água não tratada do Rio Grande/EUA (C) e água de chuva (D) contendo aumentos sucessivos na concentração de guaiacol. Uma boa resposta, em todas as amostras, foi observada para mudanças de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ na concentração desta espécie (a-f). Os cronoamperogramas correspondentes à corrente residual (linhas pontilhadas) indicam uma pequena contribuição relativa às espécies eletroativas presentes na matriz, mostrando que este sensor pode ser empregado com sucesso na determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental.

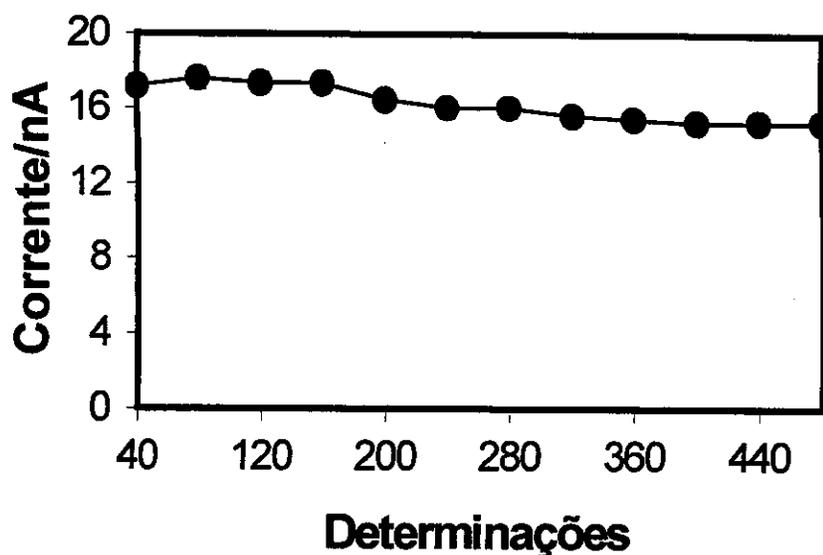


Figura 3.22 – Teste de estabilidade, realizado com solução de guaiacol $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Potencial de trabalho: $-0,10 \text{ V vs Ag/AgCl}$; em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 5,0).

Os resultados obtidos com o biossensor a base de lacase/SPE foram muito mais sensíveis que os obtidos por Wang e Chen (1995a) com um dispositivo semelhante a base de tirosinase. Comparando-se os resultados obtidos com um biossensor de grafite pirolítico com lacase imobilizada, desenvolvido por Marko-Varga e colaboradores (1995) para a análise de compostos fenólicos (tais como o guaiacol), constata-se, mais uma vez, uma grande superioridade na estabilidade e sensibilidade do biossensor a base de lacase/SPE.

A grande vantagem apresentada por este biossensor é a possibilidade da confecção de dispositivos descartáveis, para controle ambiental, em larga escala com boa reprodutibilidade e baixo custo, o que confere uma perspectiva mais plausível para o desenvolvimento de sistemas comerciais.

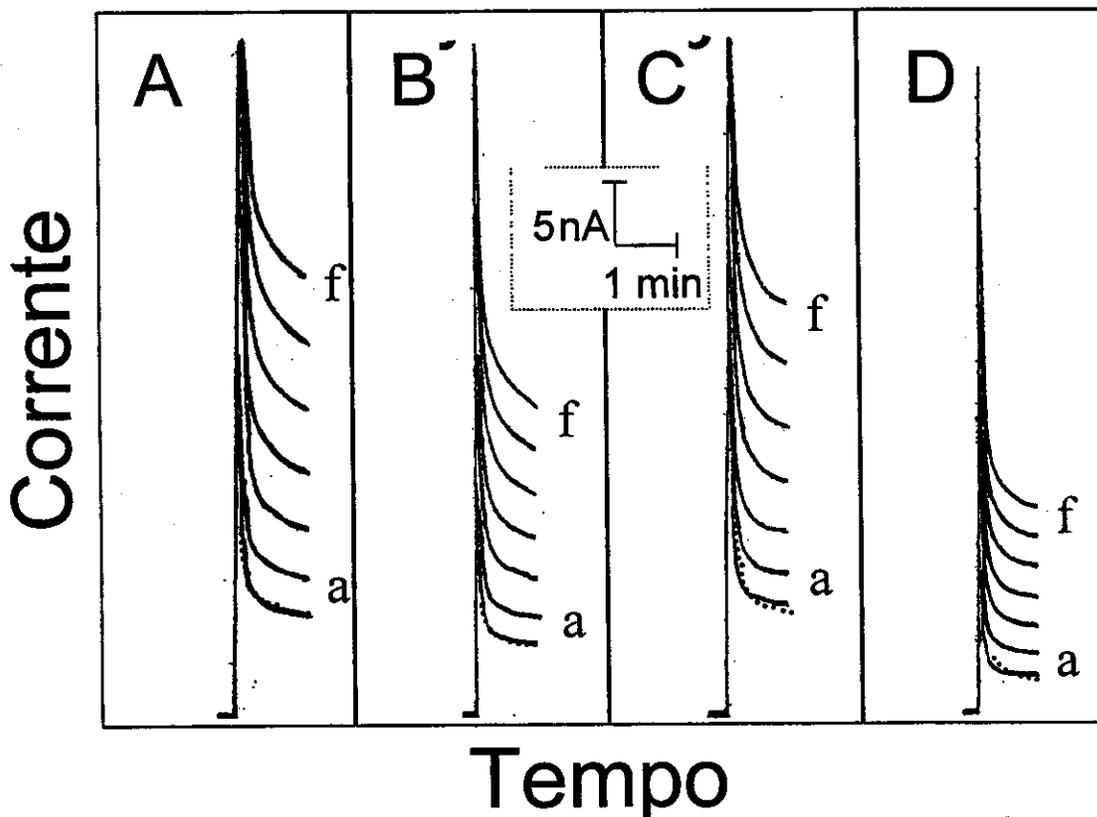


Figura 3.23 – Resposta cronoamperométrica para soluções de tampão fosfato pH 5,0 (A); água potável (B); água do Rio Grande (C) e água de chuva (D), após sucessivos incrementos de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ na concentração de guaiacol (a partir de a até f). Potencial de trabalho: 0,10 V vs Ag/AgCl, usando o pH e força iônica original de cada solução.

III.4.3 – DISPOSITIVO PARA MONITORAMENTO REMOTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Dispositivos portáteis capazes de quantificar compostos fenólicos podem ajudar a determinar o melhor processo de tratamento, levando a um aumento na qualidade das atividades de remediação. Descreve-se aqui, o desenvolvimento de um dispositivo remoto para a determinação de compostos fenólicos presentes no efluente papelero.

Eletrodos de fibra de carbono com lacase e/ou tirosinase imobilizadas foram utilizados como base para o dispositivo de monitoramento remoto. Tal como discutido anteriormente, estas enzimas podem catalisar a oxidação de compostos fenólicos, produzindo quinonas. A detecção das quinonas, produtos

eletroquimicamente ativos, em baixos potenciais, permite a medida de substratos fenólicos em níveis de concentração inferiores a 10^{-6} mol L⁻¹. Na Figura 3.24 é mostrada a resposta cronoamperométrica do biossensor remoto a base de lacase para os compostos *p*-cloroguaiacol (A) e guaiacol (B) frente a sucessivos incrementos ($1,0 \times 10^{-6}$ mol/L) na concentração destas espécies. Pode-se observar que este sensor responde satisfatoriamente a mudanças de micromoles na concentração destes compostos fenólicos, cuja determinação possui grande interesse do ponto de vista ambiental, principalmente em efluentes da indústria papeleira.

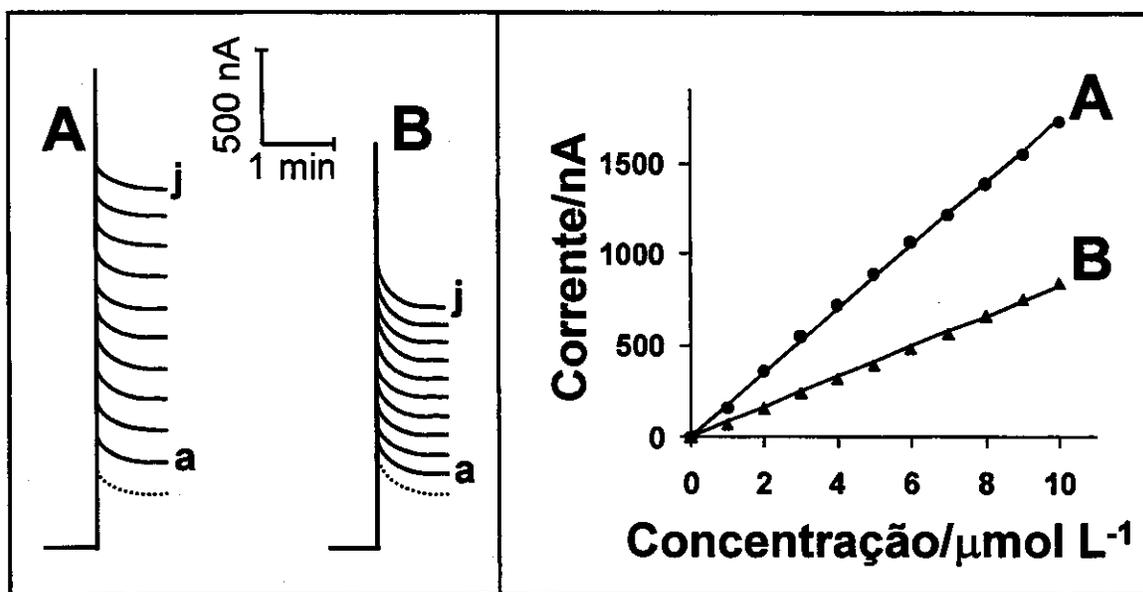


Figura 3.24 – Resposta cronoamperométrica do biossensor remoto a base de lacase para sucessivos aumentos na concentração de *p*-cloroguaiacol (A) e guaiacol (B). Incrementos de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (a-j), com a corrente residual representada por linhas pontilhadas. Gráfico de calibração resultante, mostrado à direita. Potencial de trabalho: $-0,10$ V vs Ag/AgCl; em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 5,0).

As curvas analíticas obtidas usando-se o biossensor remoto a base de lacase mostraram uma boa faixa linear entre 10 e 250 nmol L⁻¹ para *p*-cloroguaiacol, $-0,10$ V vs Ag/AgCl em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ (pH 5,0). Estas curvas puderam ser ajustadas pelas equações: $i(\text{nA}) = 27,12 \pm 0,97 \text{ nA } (\mu\text{mol L}^{-1})^{-1}$ [*p*-cloroguaiacol] com $r^2 = 0,9988$ para $n = 10$ e $i(\text{nA}) = 15,75 \pm 0,65 \text{ nA } (\mu\text{mol L}^{-1})^{-1}$

[guaiacol] com $r^2 = 0,9985$, para $n = 10$. Este biossensor mostrou uma resposta linear para ambos guaiacóis até a concentração de $85 \mu\text{mol L}^{-1}$. Assim, o biossensor remoto a base de lacase mostrou uma ampla faixa de trabalho (entre 10 nmol L^{-1} e $85 \mu\text{mol L}^{-1}$ para *p*-cloroguaiacol), sendo esta uma característica importante para este tipo de sensor.

Conforme é mostrado na Figura 3.25, limites de detecção ao redor de $8,5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ para *p*-cloroguaiacol (e de $21,5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ para guaiacol, dados não mostrados), podem ser estimados baseando-se na razão sinal/ruído e na baixa corrente residual apresentadas pelo biossensor a base de lacase imobilizada sobre fibras de carbono. Mais uma vez, a pequena corrente residual é atribuída ao baixo potencial de operação. Aparentemente nenhum ruído é adicionado ao sistema devido às conexões do cabo, apesar da longa distância solução/instrumento e da imersão total do sensor.

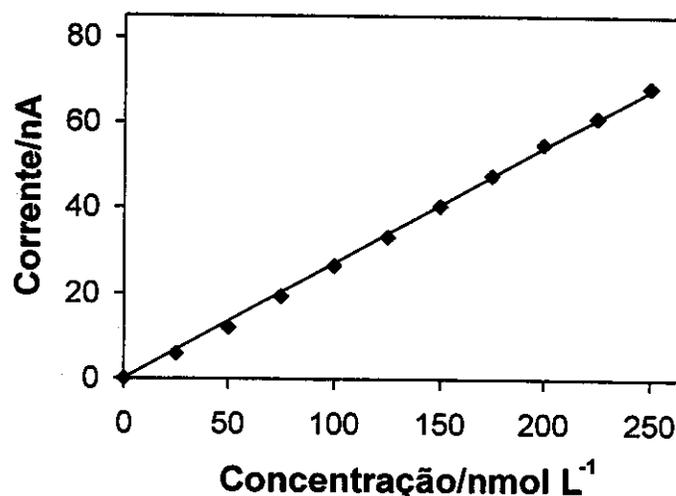


Figura 3.25 – Resposta amperométrica do sensor remoto a base de lacase para aumentos sucessivos de $25,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ na concentração de *p*-cloroguaiacol. Potencial de trabalho: $-0,10 \text{ V vs Ag/AgCl}$; em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 5,0).

A utilização de biossensores a base de tirosinase também foi avaliada no dispositivo remoto. Na Figura 3.26 é mostrada a resposta deste biossensor para os compostos fenólicos *p*-cresol e fenol.

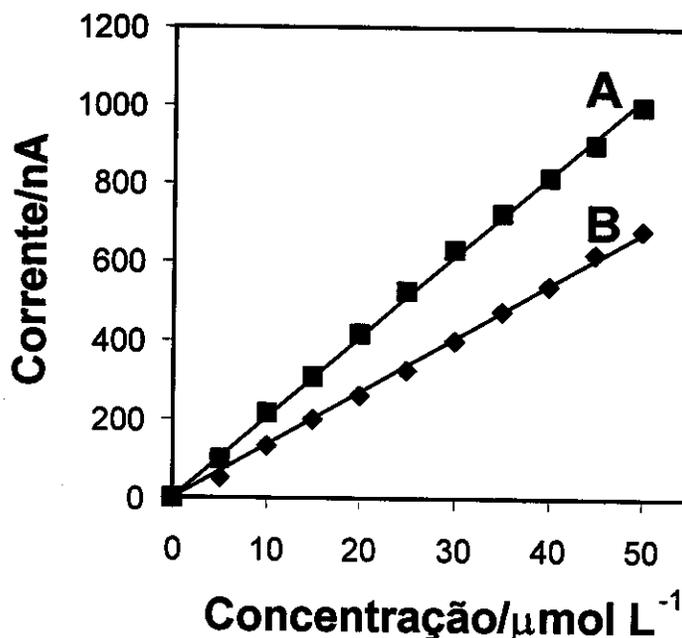


Figura 3.26 – Resposta amperométrica do sensor remoto a base de tirosinase para aumentos sucessivos de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ na concentração de p-cresol (A) e fenol (B). Potencial de trabalho: $-0,10 \text{ V vs Ag/AgCl}$; em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 5,0).

A curva analítica obtida usando-se o biossensor remoto a base de tirosinase mostrou uma boa faixa linear de resposta entre $0,1$ e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ para fenol e p-cresol, $-0,10 \text{ V vs Ag/AgCl}$ em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} pH 5,0 (dados não mostrados). Estas curvas foram ajustadas pelas equações: $i(\text{nA}) = 20,40 \pm 0,96 \text{ nA } (\mu\text{mol L}^{-1})^{-1} [\text{p-cresol}]$ com $r^2 = 0,9985$ para $n = 10$ e $i(\text{nA}) = 13,50 \pm 0,68 \text{ nA } (\mu\text{mol L}^{-1})^{-1} [\text{fenol}]$ com $r^2 = 0,9986$ para $n = 10$. Os biossensores remotos de tirosinase imobilizada sobre eletrodos de fibra de carbono mostraram limites de detecção muito melhores que os obtidos por Wang e Chen (1995b) com um dispositivo similar mas a base de eletrodos de pasta de carbono, mesmo operando-se o presente biossensor fora do potencial ótimo de trabalho ($-0,10 \text{ V}$ ao invés de $0,0 \text{ V}$).

Existe uma série de desafios técnicos associados com a adaptação dos eletrodos a base de lacase/tirosinase, ou biossensores eletroquímicos em geral, para a utilização como sensores remotos. Diferente das aplicações dos

biossensores em bancada, onde as condições das amostras podem ser facilmente ajustadas para proporcionar um desempenho ótimo, determinações remotas empregam o sensor em condições naturais (por exemplo: pH, força iônica e convecção). As análises contínuas *in situ* devem oferecer uma resposta rápida e estável, sem nenhum efeito memória. Assim, uma série de parâmetros operacionais do dispositivo de monitoramento remoto foi avaliada.

Na Figura 3.27 é mostrada a dependência da resposta para os biossensores remotos a base de lacase (a) e tirosinase (b) em função do potencial aplicado (A) e a influência do pH (B) na resposta destes biossensores.

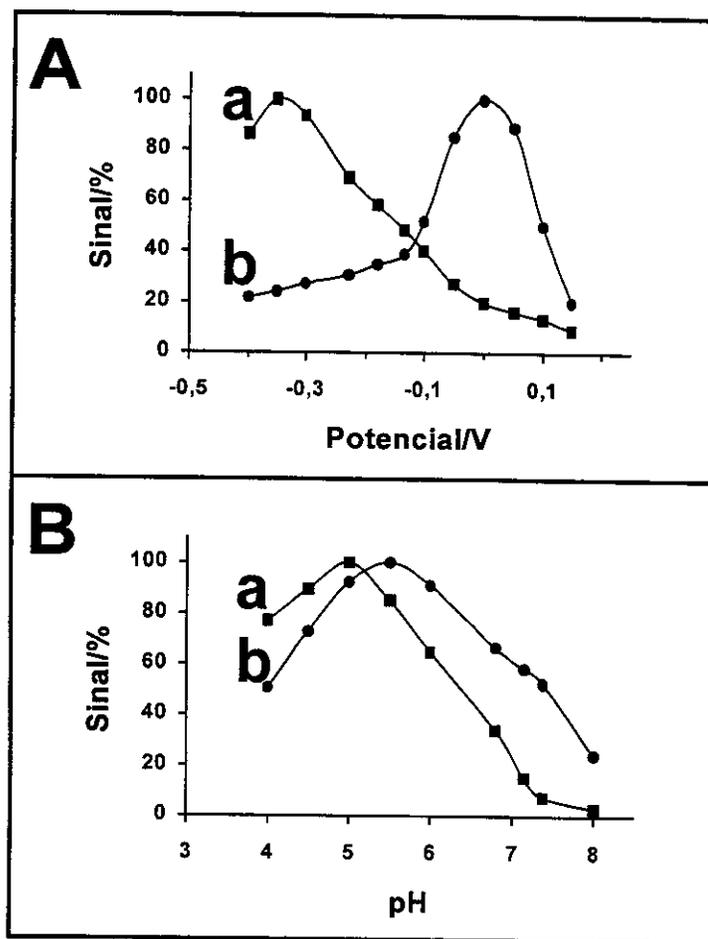


Figura 3.27 – Voltamograma hidrodinâmico (A) e efeito do pH, em potencial $-0,10$ V vs Ag/AgCl (B) para os biossensores remotos a base de lacase (a, cloroguaiacol $5,0 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$) e tirosinase (b, *p*-cresol $5,0 \times 10^{-6}$ mol L $^{-1}$); tampão fosfato (10 mmol L $^{-1}$, pH 5,0).

A detecção dos produtos de oxidação enzimática (quinonas) pelo biossensor a base de tirosinase começa em +0,1 V aumentando rapidamente até 0,0 V e diminuindo após -0,1 V. Já para o biossensor a base de lacase a detecção começa em potenciais próximos a 0,0 V, atingindo um máximo em potenciais ao redor de -0,3 V. Deste modo, um potencial de -0,1 V foi empregado em todos os experimentos subseqüentes, buscando o compromisso entre as respostas dos dois diferentes biossensores, sensibilidade e seletividade. Tal potencial de trabalho também minimiza possíveis contribuições de espécies eletroativas coexistentes na amostra.

Em relação à influência do pH na resposta dos biossensores, uma boa sensibilidade foi observada em uma ampla faixa de pH (entre 4,0 e 7,0), com decréscimo na resposta para valores de pH elevados. Esta faixa de pH é relevante para a maioria das amostras em água natural e reflete os valores de pH nos quais a tirosinase e a lacase livres em solução são normalmente ativas (Wang e Chen, 1995b; Freire e col., 2001). A tirosinase apresentou uma boa resposta em uma faixa de pH mais ampla que a lacase, cujo desempenho foi ligeiramente melhor em meios ácidos.

Na Figura 3.28 é mostrado o efeito da concentração do tampão na resposta do biossensor a base de lacase.

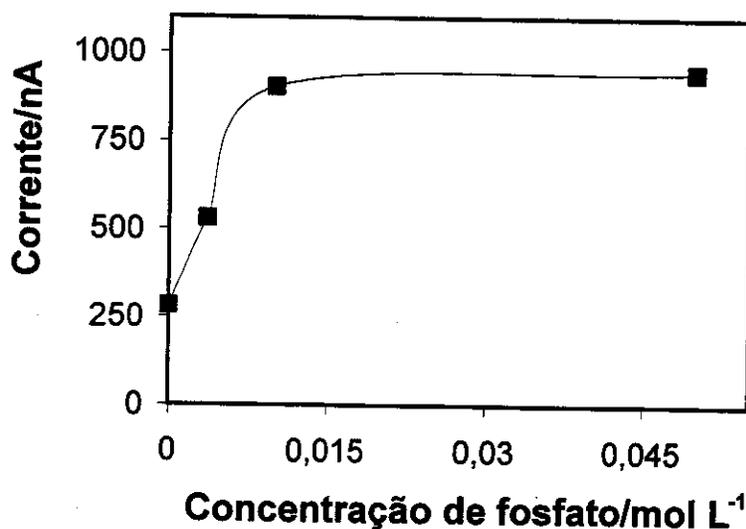


Figura 3.28 – Efeito da concentração do tampão sobre a resposta do biossensor remoto a base de lacase. Solução de p-cloroguaiacol $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Potencial de trabalho: -0,10 V vs Ag/AgCl; em tampão fosfato pH 5,0.

Uma sensibilidade da mesma ordem de grandeza foi observada para valores de concentração do tampão entre 5 e 50 mmol L⁻¹, assim como para valores maiores (dados não mostrados). Uma redução do sinal entre 70 e 55% é observada para concentrações de fosfato entre 1 mmol L⁻¹ e 0 mmol L⁻¹, respectivamente. Um comportamento bastante similar foi obtido com o biossensor remoto a base de tirosinase (dados não mostrados).

De um modo geral, os biossensores a base de tirosinase e lacase apresentaram uma boa atividade em uma ampla faixa de pH e força iônica. Ainda, quando necessário, estes e outros efeitos da matriz podem ser contornados por meio de uma calibração *in situ* dos biossensores, usando, para esta finalidade, a própria amostra de interesse. Compensações automáticas de pH e salinidade, comum em várias metodologias de análises de águas superficiais (Wang e col., 1995a/b) também podem ser úteis para este fim.

A influência da distância entre a célula eletroquímica (amostra) e o potenciostato foi avaliada utilizando-se cabos com diferentes comprimentos (10, 20 e 40 metros). Nenhum efeito sobre a resposta para *p*-cloroguaiacol (biossensor a base de lacase) ou no nível de ruído da corrente residual foi observado. De fato, o desempenho com tais distâncias foi similar ao observado quando o dispositivo remoto foi conectado de maneira convencional ao potenciostato (sem o uso de cabos de grande comprimento). Vale salientar que o desenho do dispositivo permite uma rápida troca de cabos, permitindo uma fácil adaptação às condições encontradas durante o monitoramento em campo.

Uma outra propriedade extremamente útil, apresentada pelos biossensores remotos, foi uma dependência mínima da resposta em função do transporte de massa. Por exemplo, comparando-se a resposta do biossensor a base de lacase para uma solução 5,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ de *p*-cloroguaiacol em repouso ou sobre agitação contínua (a 1.500 rpm), foi observado um aumento de somente 15% na corrente quando a solução foi agitada. Isto sugere que a reação biocatalítica promovida pelas enzimas exerce um controle cinético, sendo este um comportamento extremamente atrativo, uma vez que este fenômeno contribui para minimizar o efeito de flutuação da corrente causada pela convecção,

inevitavelmente observada em condições naturais.

Um sensor remoto para análises ambientais deve responder rapidamente a mudanças repentinas na concentração do analito e oferecer uma resposta extremamente estável. Como indicado na Figura 3.29 (B), o biossensor remoto a base de lacase responde rapidamente às mudanças dinâmicas na concentração de *p*-cloroguaiacol. Este biossensor também apresenta uma longa estabilidade conforme pode-se observar na Figura 3.29 (A), que representa dados obtidos a partir de repetidos cronoamperogramas, registrados em intervalos de 10 minutos durante um prolongado período (500 minutos).

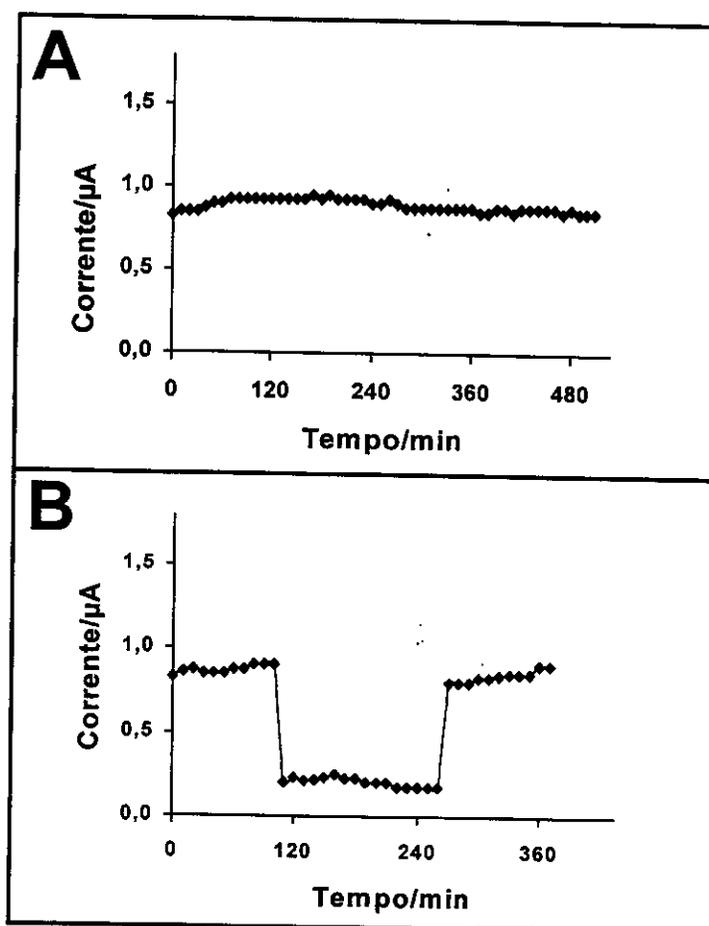


Figura 3.29 - Estabilidade (A) e experimentos para avaliar o efeito memória (B), solução de *p*-cloroguaiacol $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (A, B nível alto) e $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (B nível baixo). Potencial de trabalho: $-0,10 \text{ V vs Ag/AgCl}$; em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 5,0).

O biossensor remoto a base de lacase apresentou um desvio padrão relativo de 2,75% para uma série de 12 determinações de uma solução de *p*-cloroguaiacol $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Uma repetibilidade similar (desvio padrão relativo = 3,95 %) foi observada para o biossensor de tirosinase em análises de *p*-cresol (dados não mostrados). Apesar da ausência de uma membrana protetora, nenhuma passivação (tal como, bloqueio da superfície pelos constituintes da matriz) foi observada durante todo este estudo. Ainda, a atividade biocatalítica foi mantida durante um longo período (por exemplo, 80% após 250 determinações), de acordo com a excelente estabilidade da lacase (Durán e Espósito, 2000; Freire e col., 2001). Entretanto, mais uma vez, sempre que necessário, o desenho do dispositivo remoto permite uma troca rápida e fácil do eletrodo de trabalho.

A seletividade e sensibilidade dos biossensores desenvolvidos permitiram uma conveniente quantificação de substratos fenólicos em amostras de interesse ambiental. Na Figura 3.30 é mostrada a resposta, obtida com o biossensor remoto a base de lacase, para amostras de água do Rio Grande (B) e, para efeito de comparação, solução tampão fosfato (A); após sucessivos incrementos na concentração de *p*-cloroguaiacol. Uma resposta favorável foi observada, em ambos os meios, para mudanças de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ na concentração desta espécie fenólica (a-j).

Os cronoamperogramas correspondentes à corrente residual (linhas pontilhadas) indicam uma contribuição negligível das espécies eletroativas presentes na matriz. Aparentemente o reconhecimento biológico aliado com o baixo potencial de operação, permite uma análise seletiva dos analitos alvos (compostos fenólicos) a partir de uma matriz ambiental complexa. A alta sensibilidade também é um indicativo desta propriedade. Um desempenho similar também foi observado empregando-se o biossensor remoto a base de tirosinase na análise de *p*-cresol no mesmo tipo de amostra (dados não mostrados).

De um modo geral, observou-se uma sensibilidade relativamente menor para as análises realizadas na amostra real quando comparada com a obtida em meio tamponado (Figura 3.30 A e B). Tal diferença pode ser atribuída a efeitos de matriz (particularmente a presença de metais pesados inibidores). Procedimentos

de (pré ou pós) calibração *in situ* podem ser úteis para minimizar estes efeitos. Um procedimento de calibração muito rápido (envolvendo 2-3 adições padrão à amostra coletada) pode eliminar possíveis desvios ou efeitos de matriz. Procedimentos de calibração similares foram empregados com sucesso em monitoramento remoto de metais tóxicos por “stripping” (Wang e col., 1995a/b).

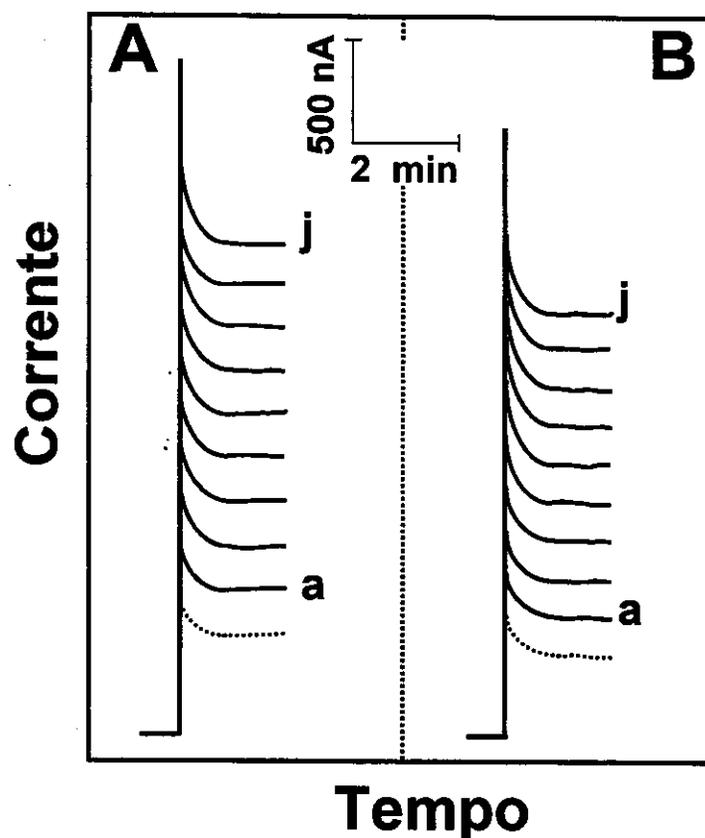


Figura 3.30 - Resposta cronoamperométrica para soluções de tampão fosfato pH 5,0 (A) e água do Rio Grande/USA (B, usando pH e força iônica naturais) contendo aumentos sucessivos ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, a até j) na concentração de *p*-cloroguaiacol, os cronoamperogramas correspondentes às correntes residuais estão representados por linhas pontilhadas. Potencial de trabalho: $-0,10 \text{ V vs Ag/AgCl}$; em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 5,0).

Os biossensores a base de lacase e tirosinase possuem seletividades distintas para diferentes compostos fenólicos. A oxidação de fenóis por essas duas enzimas pode ser representada pelas equações 3.1 e 3.2 (página 114).

Na Figura 3.31 (A e B) pode-se observar que as seletividades destas duas enzimas em relação aos substratos fenólicos são bastante diferentes. Por exemplo, o biossensor remoto a base de lacase apresentou uma excelente sensibilidade em relação aos compostos *p*-cloroguaiacol e guaiacol. Contudo, este biossensor mostrou uma resposta negligível para os compostos *p*-cresol e fenol.

Por outro lado, o biossensor remoto a base de tirosinase mostrou-se eficiente na detecção de *p*-cresol e fenol, sendo por sua vez, ineficaz para a determinação dos compostos *p*-cloroguaiacol e guaiacol. A fim de se aumentar a gama de compostos detectáveis pelo dispositivo remoto, buscou co-immobilizar as enzimas lacase e tirosinase sobre a superfície dos eletrodos de fibra de carbono.

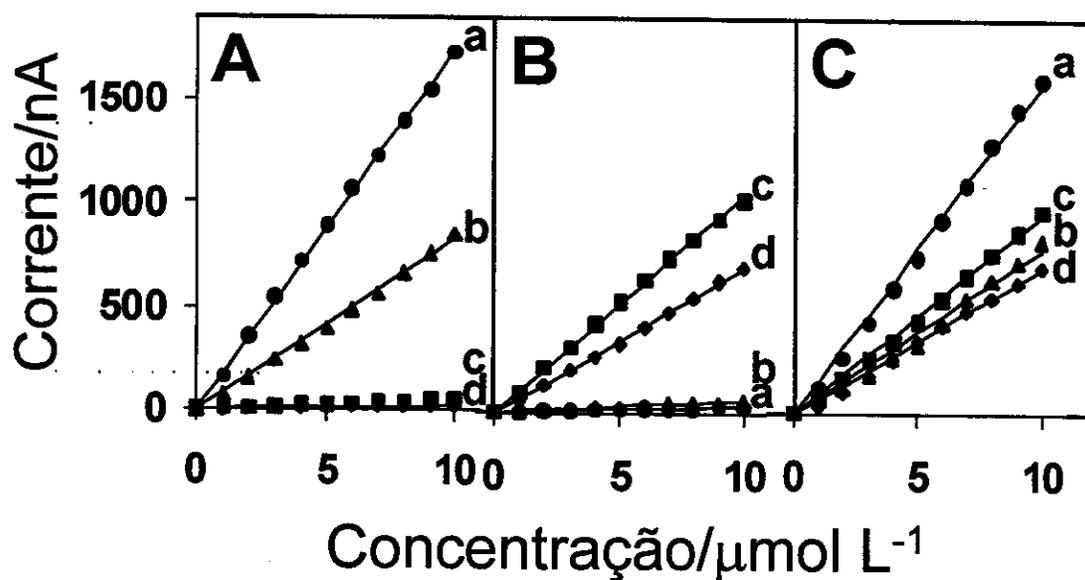


Figura 3.31 – Resposta dos biossensores remotos a base de lacase (A), tirosinase (B) e bienzimático (C) para aumentos sucessivos ($1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) na concentração de *p*-cloroguaiacol (a); guaiacol (b); *p*-cresol (c) e fenol (d). Potencial de trabalho: $-0,10 \text{ V vs Ag/AgCl}$; em tampão fosfato 10 mmol L^{-1} (pH 5,0).

Tal como é mostrado na Figura 3.31 C, o biossensor remoto bienzimático resultante pode ser empregado satisfatoriamente na detecção de um número maior de compostos fenólicos. Os resultados obtidos com este biossensor remoto bienzimático foram muito mais promissores que os obtidos com os biossensores a

base de lacase e tirosinase desenvolvidos por Yaropolov e colaboradores (1995) e Marko-Varga e colaboradores (1995). No primeiro caso, o dispositivo bienzimático apresentou uma sensibilidade menor do que a prevista pelos sensores construídos com as enzimas independentemente. Em relação ao segundo trabalho, o biossensor bienzimático não apresentou resposta para compostos fenólicos importantes do ponto de vista ambiental, como por exemplo, guaiacóis e espécies cloradas.

O biossensor remoto bienzimático desenvolvido pode ser usado para estimar a concentração de fenóis totais, já que ele não distingue a resposta de cada espécie individualmente. Em muitas etapas do processo de remediação ambiental é mais importante conhecer a quantidade de fenóis totais do que a concentração das espécies individualmente. Neste tipo de situação, este dispositivo pode facilitar a caracterização e remediação de regiões contaminadas.

De um modo geral, os experimentos descritos ilustram a habilidade deste dispositivo para monitorar compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental, especialmente para monitoramento em campo e a longa distância. Esta última capacidade aliada à sensibilidade e seletividade dos biossensores confere a este dispositivo características muito promissoras quanto a sua aplicabilidade em sistemas de monitoramento ambiental.

III.4.4 – BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS MULTICOMPONENTE PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A determinação simultânea de compostos fenólicos é de grande interesse em várias áreas, principalmente por que estes compostos apresentam uma grande variedade em suas propriedades físico-químicas e no grau de toxicidade.

Na maior parte dos trabalhos descritos na literatura, a determinação de espécies fenólicas é realizada após uma etapa de separação química e/ou física. Esta estratégia é bastante importante, mas o consumo de reagentes, tempo e geração de resíduos são geralmente altos. Além disso, os compostos fenólicos são, de um modo geral, instáveis e podem se decompor durante as etapas de pré-tratamento. Deste modo, o desenvolvimento de novos métodos que possibilitem a

determinação simultânea destas espécies sem separação prévia é um tema de extrema relevância (De Carvalho e col., 2000).

Com este objetivo, foi desenvolvido um método analítico empregando-se biossensores amperométricos a base de lacase e a base de tirosinase imobilizadas sobre fibras de carbono, para a determinação simultânea de diferentes compostos fenólicos.

No sistema amperométrico aqui descrito, utilizou-se a diferença de sensibilidade entre os biossensores a base de lacase e tirosinase frente a diferentes compostos fenólicos, aliada a técnicas de calibração multivariada (PCA e PLS), para a determinação quantitativa de misturas de espécies fenólicas. Na Tabela 3.3 é apresentada uma comparação da resposta relativa para diferentes compostos fenólicos, obtidas com os biossensores a base de lacase e tirosinase.

Tabela 3.3 – Comparação das respostas relativas para diferentes compostos fenólicos obtidas com os biossensores a base de lacase e tirosinase.

Composto	LACASE		TIROSINASE	
	Sensibilidade (nA/ μ mol L ⁻¹)	Resposta relativa (%)	Sensibilidade (nA/ μ mol L ⁻¹)	Resposta relativa (%)
catecol	80,3	100,0	45,7	100,0
hidroquinona	9,8	15,1	2,2	2,3
fenol	0,4	2,6	14,2	25,2
clorofenol	0,1	1,9	20,0	41,4
cresol	0,7	4,1	4,5	9,1
clorocresol	0,6	3,7	30,7	52,3
guaiacol	17,6	26,3	0,2	0,4
cloroguaiacol	4,8	10,8	0,2	0,3

Utilizando-se um potenciostato multicanal, os biossensores a base de lacase e a base de tirosinase foram monitorados simultaneamente. A aplicabilidade deste sistema, na determinação de espécies fenólicas, foi avaliada

em misturas binárias de fenol/clorofenol, catecol/fenol, cresol/clorocresol e fenol/cresol. Para cada mistura, foram obtidos conjuntos de calibração e validação dos modelos, que foram modelados empregando-se o algoritmo quimiométrico PLS com dois componentes principais e com dados de corrente monitoradas em três potenciais diferentes (-50, -75 e -100 mV). Nas Figuras 3.32 e 3.33 são mostrados os resultados obtidos para a mistura fenol/clorofenol. O desvio padrão médio relativo entre os valores adicionados e previstos obtidos pelo modelo de validação externa foi de 3,5 e 3,1% para fenol e clorofenol, respectivamente. Estes valores, juntamente com o coeficiente de correlação (r^2) de 0,9958 para fenol e de 0,9981 para clorofenol indicam que o modelo proposto apresenta uma excelente eficácia na determinação e quantificação simultânea destas espécies fenólicas. Uma eficiência da mesma ordem foi observada empregando-se as misturas de catecol/fenol (Figuras 3.34 e 3.35), cresol/clorocresol (Figuras 3.36 e 3.37) e fenol/cresol (Figuras 3.38 e 3.39), conforme é mostrado na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Erro padrão de previsão e desvio padrão médio relativo entre os valores previstos e adicionados.

Mistura Composto1/composto2	Composto 1		Composto 2	
	SEP	Desvio padrão (%)	SEP	Desvio padrão (%)
Catecol/fenol	0,0852	2,1	0,1603	3,5
Fenol/clorofenol	0,2344	3,5	0,1728	3,1
Cresol/clorocresol	0,5029	6,5	0,1553	2,6
Fenol/cresol	0,0931	1,8	0,2116	3,5

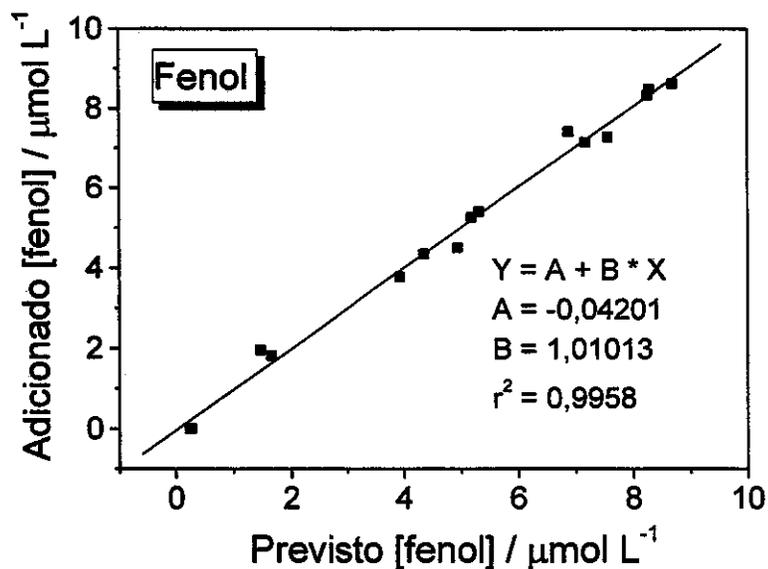


Figura 3.32 – Correlação entre os valores previstos e adicionados na determinação de fenol em uma mistura de fenol e clorofenol.

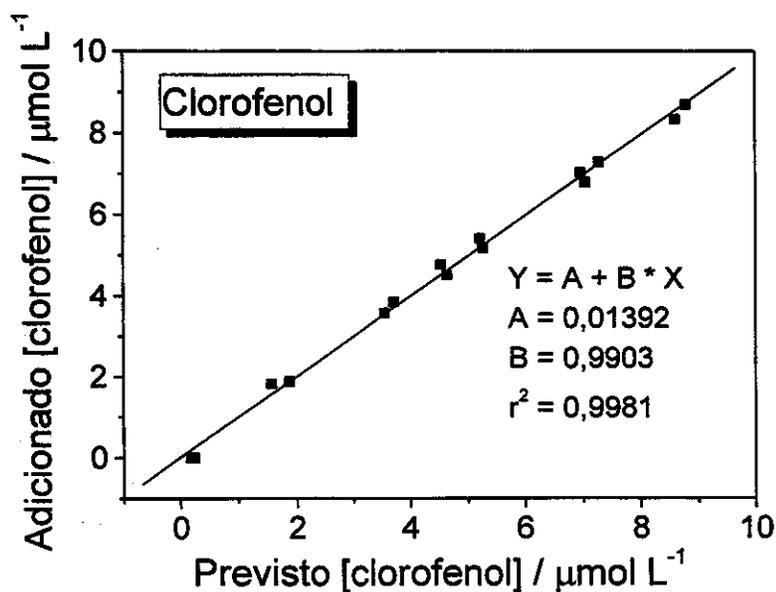


Figura 3.33– Correlação entre os valores previstos e adicionados na determinação de clorofenol em uma mistura de fenol e clorofenol.

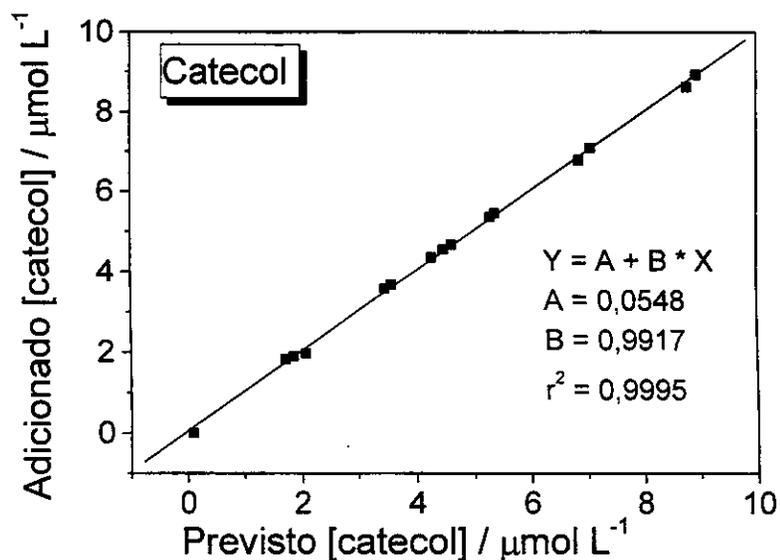


Figura 3.34 – Correlação entre os valores previstos e adicionados na determinação de catecol em uma mistura de catecol e fenol.

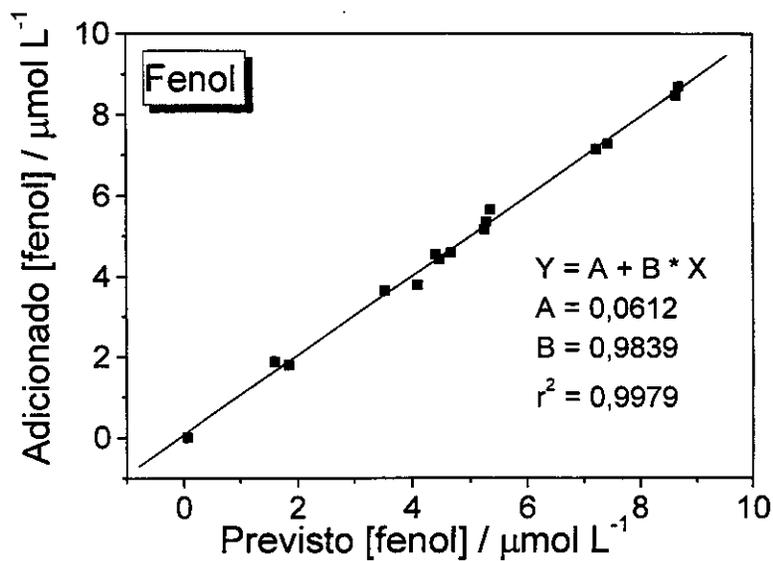


Figura 3.35 – Correlação entre os valores previstos e adicionados na determinação de fenol em uma mistura de catecol e fenol.

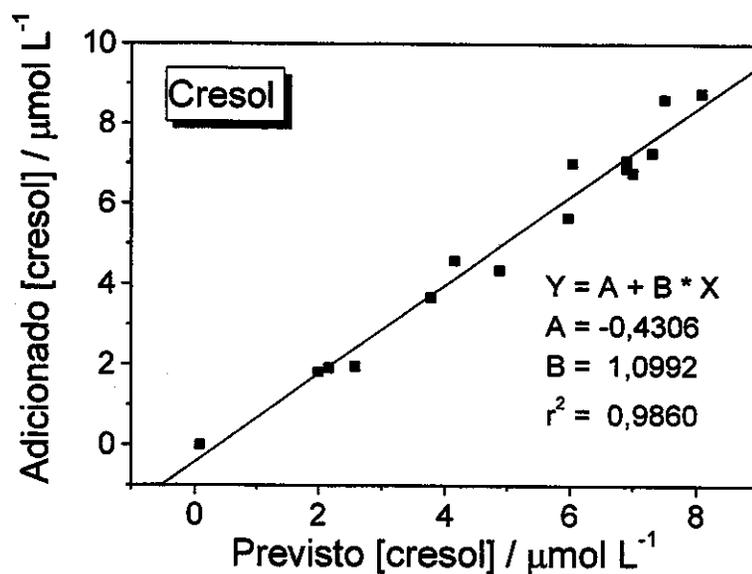


Figura 3.36 – Correlação entre os valores previstos e adicionados na determinação de cresol em uma mistura de cresol e clorocresol.

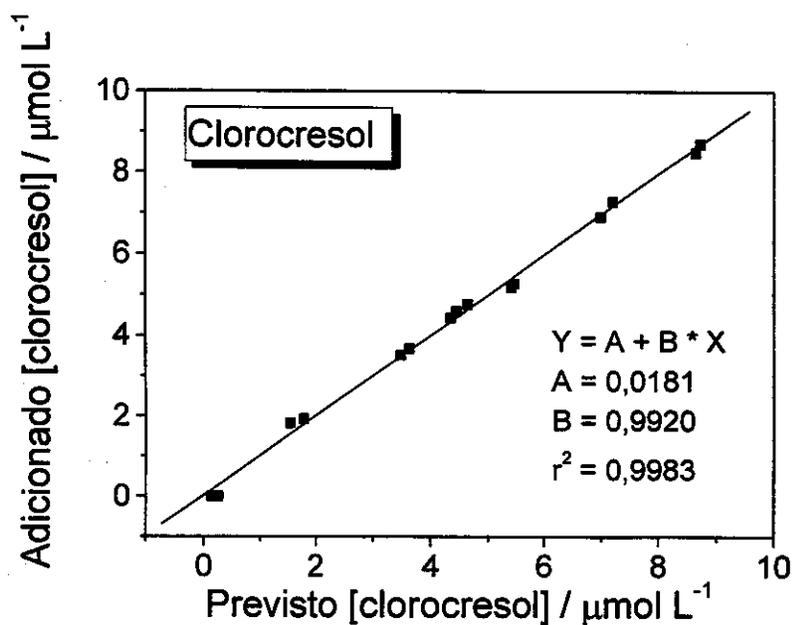


Figura 3.37 – Correlação entre os valores previstos e adicionados na determinação de clorocresol em uma mistura de cresol e clorocresol.

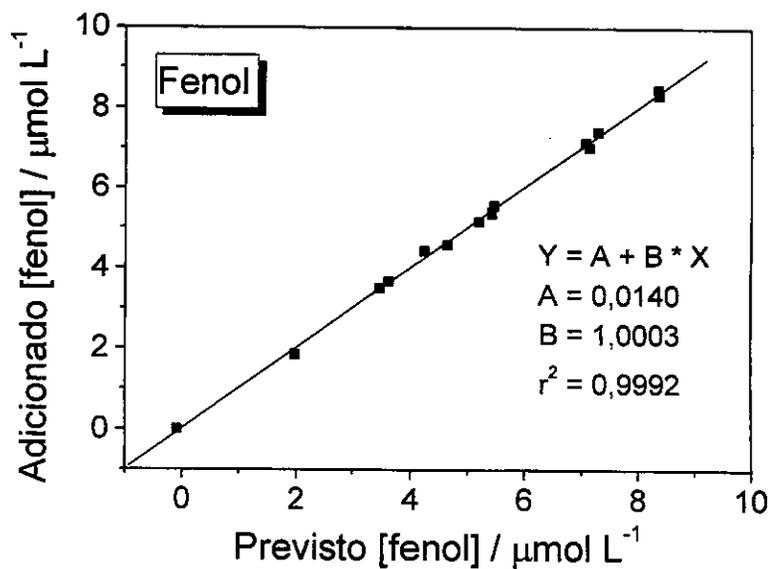


Figura 3.38 – Correlação entre os valores previstos e adicionados na determinação de fenol em uma mistura de fenol e cresol.

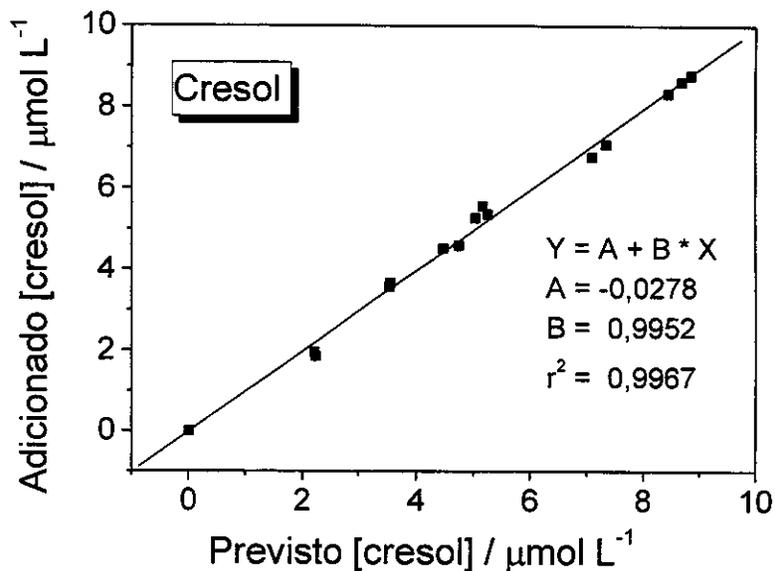


Figura 3.39 – Correlação entre os valores previstos e adicionados na determinação de cresol em uma mistura de fenol e cresol.

O sistema de biossensores amperométricos multicomponente também apresentou uma excelente sensibilidade, conforme mostram as Figuras de 3.32 a 3.39, onde se pode observar que as concentrações das espécies fenólicas analisadas situavam-se na faixa de 10^{-6} mol L⁻¹.

A quantidade de componentes das misturas pode ser incrementada. Se necessário mais eletrodos podem ser acoplados ao sistema sem nenhum inconveniente operacional (por exemplo, um biossensor a base de HRP). Isto pode contribuir para aumentar a gama de compostos fenólicos detectáveis.

Até o presente momento, a literatura não descreve a utilização de biossensores eletroquímicos na análise simultânea de compostos fenólicos, a comparação com outras análises deste tipo, mas realizadas com métodos espectroscópicos e eletroquímicos (Cladera e col., 1992a/b; Olmo e col., 1996; Guardia e col., 1996; Todeschini e col., 1999; de Carvalho e col., 2000), revela que a metodologia desenvolvida possui características e qualidades vantajosas, principalmente para o monitoramento destes compostos em matrizes de interesse ambiental. Além disso, esta metodologia pode ser facilmente modificada, (incorporando-se, por exemplo, diferentes elementos biológicos) para abranger outros tipos de compostos poluentes, e proporcionar uma rápida e efetiva análise de uma ampla gama de compostos em matrizes ambientais.

III.4.5 – SISTEMA DE ANÁLISE EM FLUXO EMPREGANDO-SE BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA O MONITORAMENTO CONTÍNUO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NO EFLUENTE PAPELEIRO

Para contornar os problemas e efeitos de matriz indicados no item III.1.3.3, este trabalho descreve a utilização de um sistema de análise em fluxo dotado de um amostrador por diálise, para coletar os compostos fenólicos de uma matriz complexa e transferi-los para uma solução interna que proporcione condições ótimas para a detecção destes compostos.

O comportamento do dispositivo proposto foi investigado usando-se biossensores a base de carbono vítreo e avaliando-se a influência do potencial de trabalho, velocidade do fluxo, pH e força iônica na resposta analítica do sistema.

III.4.5.1- Influência do potencial de trabalho

Na Figura 3.40 é mostrada a variação da corrente em função do potencial aplicado para os biossensores a base de lacase (a) e tirosinase (b). Pode-se observar que, para o biossensor a base de lacase, a redução dos produtos enzimáticos (quinonas) iniciou-se ao redor de 250 mV vs Ag/AgCl, obtendo-se uma resposta máxima em 0 mV, mantendo-se constante até -300 mV. Um comportamento bastante similar foi observado para o biossensor a base de tirosinase, o qual apresentou resposta amperométrica a partir de 300 mV, com um aumento acentuado da corrente até 150 mV, e decréscimo a partir de 50 mV.

Assim, os demais experimentos foram realizados aplicando-se 0 mV para o biossensor a base de lacase e 50 mV para o biossensor a base de tirosinase. Mais uma vez, esta faixa de potencial é muito favorável para análise de matrizes ambientais, já que ela apresenta uma menor probabilidade de interferência devido à oxidação/redução de contaminantes, e também apresenta uma baixa corrente residual.

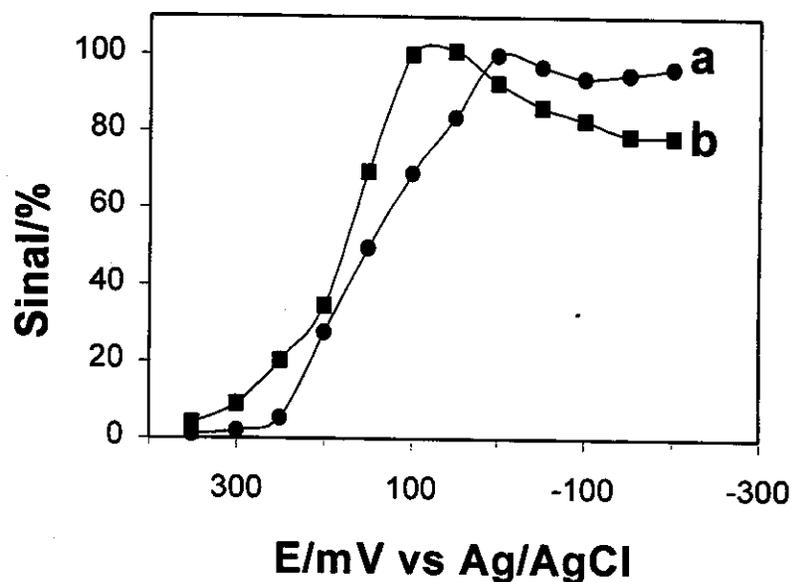


Figura 3.40 – Voltamograma hidrodinâmico para os biossensores a base de lacase (a) e tirosinase (b) inseridos no sistema de análise por injeção em fluxo (velocidade do fluxo: $1,6 \text{ mL min}^{-1}$). Volume de injeção: $220 \mu\text{L}$ de guaiacol $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ (para o biossensor de lacase) e $220 \mu\text{L}$ de fenol $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ fenol (para o biossensor de tirosinase); solução carregadora: tampão fosfato (10 mmol L^{-1} , pH 5,0); solução interna: tampão fosfato (10 mmol L^{-1} , pH 5,0 e 5,5; para os biossensores de lacase e tirosinase, respectivamente).

III.4.5.2 - Influência da velocidade do fluxo

Na Figura 3.41 (A) é mostrada a variação da resposta do biossensor a base de lacase em função da velocidade do fluxo, pode-se observar que a resposta diminui com o aumento do fluxo. Este perfil de resposta é devido a um efeito combinado da diálise, da taxa de transferência de massa para a superfície do eletrodo, da velocidade de reação enzimática e da velocidade da redução eletroquímica dos produtos enzimáticos. O aumento do fluxo favorece o transporte de massa do substrato para a superfície biocatalítica e, deste modo, um aumento na intensidade da corrente deveria ser esperada se a enzima estivesse trabalhando sob condições cinéticas de primeira ordem. O patamar observado na Figura 3.41 (A) indica que para altas velocidades de fluxo, a barreira difusional ativa (membrana), a cinética biocatalítica e as reações eletroquímicas são as etapas limitantes para a resposta global. Tal comportamento reflete o efeito do fluxo sobre os vários processos envolvidos no dispositivo, incluindo a amostragem dos compostos fenólicos e a detecção dos produtos enzimáticos (Ortega e col., 1994). Enquanto que, com o aumento do fluxo, é esperado um aumento na resposta do detector, baixos fluxos aumentam a eficiência da diálise (amostragem) e da conversão enzimática (devido a um maior tempo de residência para a coleta e biocatálise). Um fluxo que permita uma maior e mais rápida resposta amperométrica, com economia dos reagentes e maior frequência analítica deve ser o almejado. Os resultados apresentados neste trabalho foram obtidos empregando-se um fluxo de $1,6 \text{ mL min}^{-1}$.

Na Figura 3.41 (B) é apresentada a resposta do biossensor em função do volume de amostra injetado, pode-se observar que, na faixa avaliada ($25 - 200 \mu\text{L}$), existe uma dependência linear entre estas duas variáveis. A faixa linear de resposta e o limite de detecção são muito influenciados pela velocidade do fluxo e volume de amostra injetado. A influência deste último parâmetro pode ser atribuída ao processo de transporte através da membrana. Para pequenos volumes injetados, a amostra permanece menos tempo em contato com a superfície da membrana. Quando a concentração da amostra é muito pequena, de acordo com a lei de Fick, a taxa de difusão através da membrana também será

muito pequena. Deste modo, o volume de amostra injetado e a velocidade do fluxo devem ser escolhidos e modificados de acordo com a faixa de concentração de interesse. Os resultados aqui apresentados foram obtidos empregando-se um volume de amostragem de 220 μL .

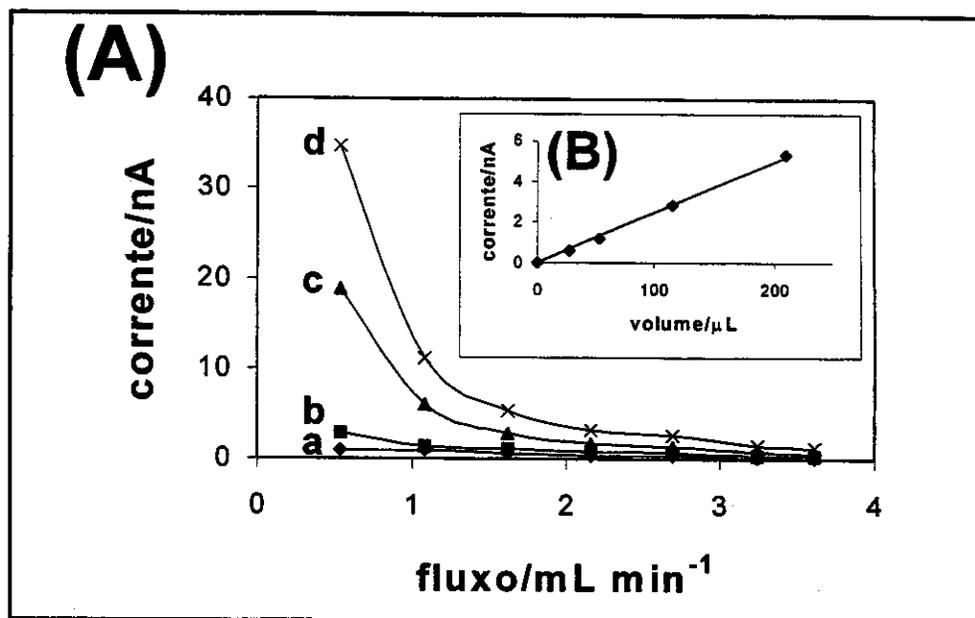


Figura 3.41 – Efeito da velocidade do fluxo na resposta do biossensor a base de lacase (A), para 25 μL (a), 55 μL (b), 110 μL (c) e 220 μL (d) da guaiacol 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Variação da intensidade da corrente em função do volume de amostra injetado (B). Potencial aplicado 0,0 V vs Ag/AgCl ; Volume de injeção: 220 μL de guaiacol 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$; solução carregadora e solução interna: tampão fosfato (10 mmol L^{-1} , pH 5,0).

III.4.5.3 - Influência do pH e da força iônica da amostra

A resposta dos biossensores é influenciada por mudanças físico-químicas que normalmente são observadas em amostras reais (por exemplo, pH, força iônica, convecção, etc.), e geralmente estes parâmetros não podem ser ajustados em um monitoramento contínuo. Esta limitação dos biossensores pode ser contornada usando-se um sistema de análise em fluxo que integre este tipo de detector com um sistema de diálise amostrador dos compostos alvos. Este sistema promove a coleta destes compostos através de uma solução interna que, por sua vez, iria conduzi-los até o biossensor. Assim, através de uma criteriosa seleção da solução interna, o biossensor irá operar sempre em condições ótimas.

Na Figura 3.42 são apresentadas as influências do pH (A) e da concentração do tampão (força iônica) (B) de uma solução externa (amostra) sobre a resposta do biossensor a base de lacase para uma solução $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de guaiacol. Os dados desta figura mostram que a resposta analítica do sistema é aproximadamente independente do pH e da força iônica. A influência destes fatores é ínfima quando comparada com o perfil de resposta obtido sem a utilização do sistema de diálise (Wang e Chen, 1995b; Freire e col., 2001). Resultados semelhantes foram obtidos com o biossensor a base de tirosinase na análise de fenol (dados não mostrados).

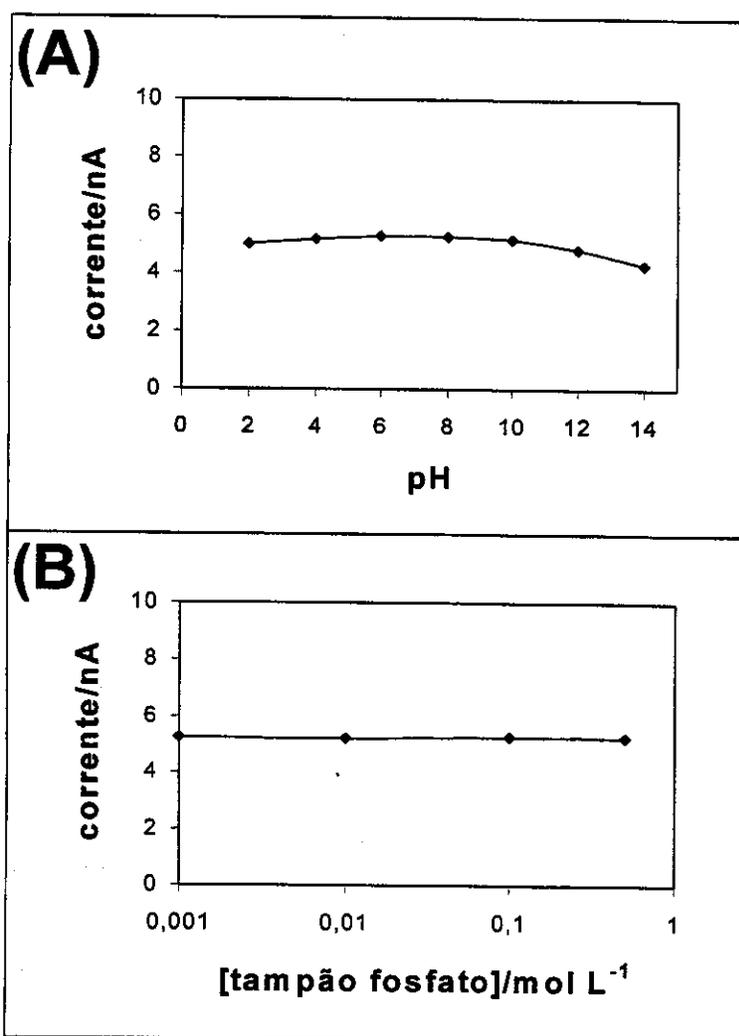


Figura 3.42 – Variação da intensidade da corrente do biossensor de lacase em função do pH (A) e da concentração de tampão fosfato (B), utilizando-se o sistema de análise em fluxo. Potencial aplicado 0,0 V vs Ag/AgCl ; Volume de injeção: 220 μL de guaiacol $50 \mu\text{mol L}^{-1}$; solução carregadora e solução interna: tampão fosfato (10 mmol L^{-1} , pH 5,0).

III.4.5.4 - Estabilidade do sistema analítico

Os biossensores a base de lacase (a) e tirosinase (b) mostraram uma grande estabilidade, conforme é mostrado na Figura 3.43 (A), que representa os dados de corrente obtidos a partir de repetidas determinações realizadas em intervalos de 10 minutos durante um prolongado período de tempo. As análises realizadas com o biossensor a base de lacase apresentaram um desvio padrão relativo de 2,8%, para uma série de 20 medidas sucessivas de uma solução $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de guaiacol. Uma estabilidade similar foi observada para o biossensor a base de tirosinase, com um desvio padrão relativo de 3,9% nas análise de uma solução de fenol $50 \mu\text{mol L}^{-1}$.

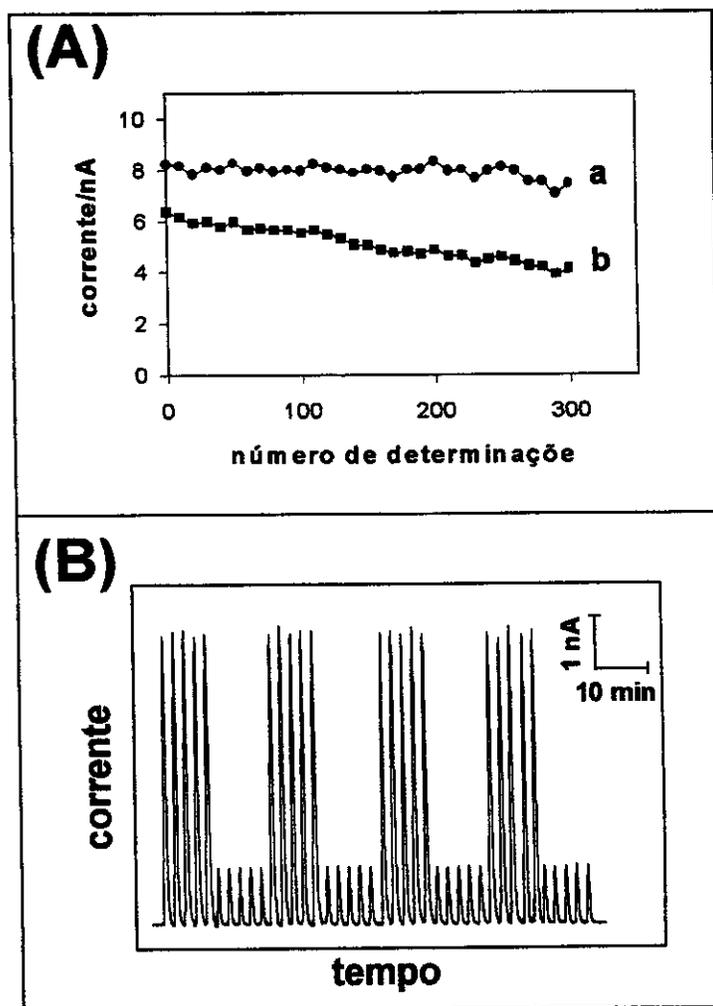


Figura 3.43 – Experimentos para avaliar a estabilidade (A) dos biossensores a base de lacase (a) e tirosinase (b) e o efeito memória do biossensor a base de lacase (B) ([guaiacol] nível alto: $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, nível baixo: $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. Volume de injeção: $220 \mu\text{L}$ de guaiacol $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ (para o biossensor de lacase) e $220 \mu\text{L}$ de fenol $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ (para o biossensor de tirosinase); demais condições como na Figura 3.40.

Nenhuma passivação do sensor foi observada durante todos os experimentos. Além disso, a bioatividade foi mantida por um longo período, após 300 determinações 90% para o biossensor de lacase e 75% para o biossensor de tirosinase, de acordo com a excelente estabilidade destas enzimas (Durán e Espósito, 2000; Freire e col., 2001). A repetibilidade e a estabilidade observadas também são um reflexo da reprodutibilidade apresentada pelos sistemas de diálise, entrega dos compostos alvos e da ação protetora da membrana.

Um sistema para monitoramento ambiental em tempo real, além de oferecer uma resposta estável, deve responder rapidamente às mudanças súbitas na concentração dos compostos poluentes. A Figura 3.43 (B) mostra que o biossensor a base de lacase responde rapidamente a mudanças dinâmicas na concentração de guaiacol. Nenhum efeito memória foi observado entre amostra com concentrações de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. Resultados similares foram obtidos para o biossensor de tirosinase na análise de fenol.

III.4.5.5 – Calibração

A resposta analítica do novo dispositivo foi avaliada empregando-se diferentes compostos fenólicos. A Figura 3.44 mostra curvas analíticas obtidas para guaiacol (a), cloroguaiacol (b), p-clorofenol (c) e fenol (d), usando-se o biossensor a base de lacase. A ordem de sensibilidade apresentada por este biossensor foi guaiacol > cloroguaiacol >> p-clorofenol > fenol. Por outro lado, o biossensor a base de tirosinase mostrou maior sensibilidade para fenol e clorofenol, sendo pouco efetivo na análise de guaiacol e cloroguaiacol. A Tabela 3.5 mostra a sensibilidade de ambos biossensores para os compostos fenólicos estudados.

As curvas analíticas na faixa de concentração entre $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram obtidas para guaiacol e cloroguaiacol, com o biossensor a base de lacase, assim como, para fenol e clorofenol, com o biossensor a base de tirosinase, e ajustadas pelas equações: $i(nA) = 0,122 \pm 0,003 \text{ nA}/\mu\text{mol L}^{-1}$ [guaiacol], $r^2 = 0,9997$ $n = 10$ e $i(nA) = 0,061 \pm 0,002 \text{ nA}/\mu\text{mol L}^{-1}$ [cloroguaiacol], $r^2 = 0,9996$ $n = 10$; $i(nA) = 0,091 \pm 0,003 \text{ nA}/\mu\text{mol L}^{-1}$ [fenol], $r^2 = 0,9996$ $n = 10$ e

$i(nA) = 0,131 \pm 0,005 \text{ nA}/\mu\text{mol L}^{-1}$ [clorofenol], $r^2 = 0,9995$ $n = 10$. Limites de detecção ao redor de $1,1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para guaiacol e $1,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para cloroguaiacol, usando-se o biossensor a base de lacase, e de $1,5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para fenol e $0,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para clorofenol, usando-se o biossensor a base de tirosinase, foram estimados baseados na boa razão sinal/ruído e na pequena corrente residual. Esta última propriedade pode ser atribuída ao baixo potencial de trabalho e pela ação protetora da membrana de diálise. Conforme exposto anteriormente, a faixa linear de trabalho e o limite de detecção podem ser facilmente melhorados, simplesmente mudando-se o volume de injeção e o fluxo.

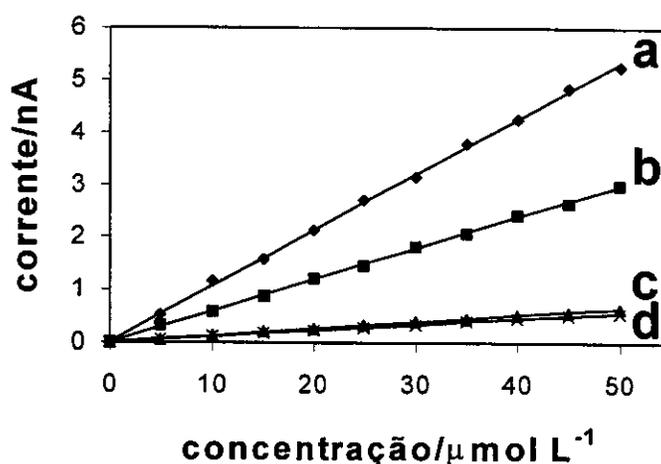


Figura 3.44 – Resposta do biossensor a base de lacase em função da variação da concentração de guaiacol (a), cloroguaiacol (b), p-clorofenol (c) e fenol (d). Condições de fluxo e potencial conforme descrito na Figura 3.40.

Tabela 3.5 – Sensibilidade dos biossensores a base de lacase e tirosinase para diferentes compostos fenólicos. Demais condições conforme descrito na Figura 3.40.

Composto	LACASE		TIROSINASE	
	Sensibilidade ($\text{nA}/\mu\text{mol L}^{-1}$)	Coefficiente de correlação (r^2)	Sensibilidade ($\text{nA}/\mu\text{mol L}^{-1}$)	Coefficiente de correlação (r^2)
fenol	$0,008 \pm 0,001$	0,998	$0,091 \pm 0,003$	0,999
clorofenol	$0,009 \pm 0,001$	0,998	$0,131 \pm 0,005$	0,999
guaiacol	$0,122 \pm 0,003$	0,999	$0,006 \pm 0,001$	0,989
cloroguaiacol	$0,061 \pm 0,002$	0,999	$0,005 \pm 0,001$	0,988

III.4.5.6 - Análise do efluente papeleiro

A seletividade e sensibilidade apresentadas pelo dispositivo permitiram uma conveniente quantificação de compostos fenólicos presentes no efluente papeleiro. A Figura 3.45 mostra a resposta do biossensor a base de lacase para amostras de tampão fosfato (A) e de efluente papeleiro Kraft E1 (B) contendo sucessivos incrementos de guaiacol. Uma resposta favorável em ambos os meios foi observada para mudanças de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ na concentração (a-f). Uma resposta similar foi obtida com o biossensor a base de tirosinase na análise de fenol, conforme mostra a Figura 3.46. O reconhecimento biológico, baixo potencial de trabalho e o sistema de diálise permitiram uma análise seletiva dos compostos alvos (espécies fenólicas) presentes em uma matriz ambiental complexa (efluente papeleiro Kraft E1) com interferência mínima (pequena redução na sensibilidade), apesar deste tipo de efluente apresentar muitos possíveis interferentes, tais como derivados de lignina, oligômeros, polímeros, substâncias húmicas, sólidos em suspensão e meio bastante alcalino (pH 11).

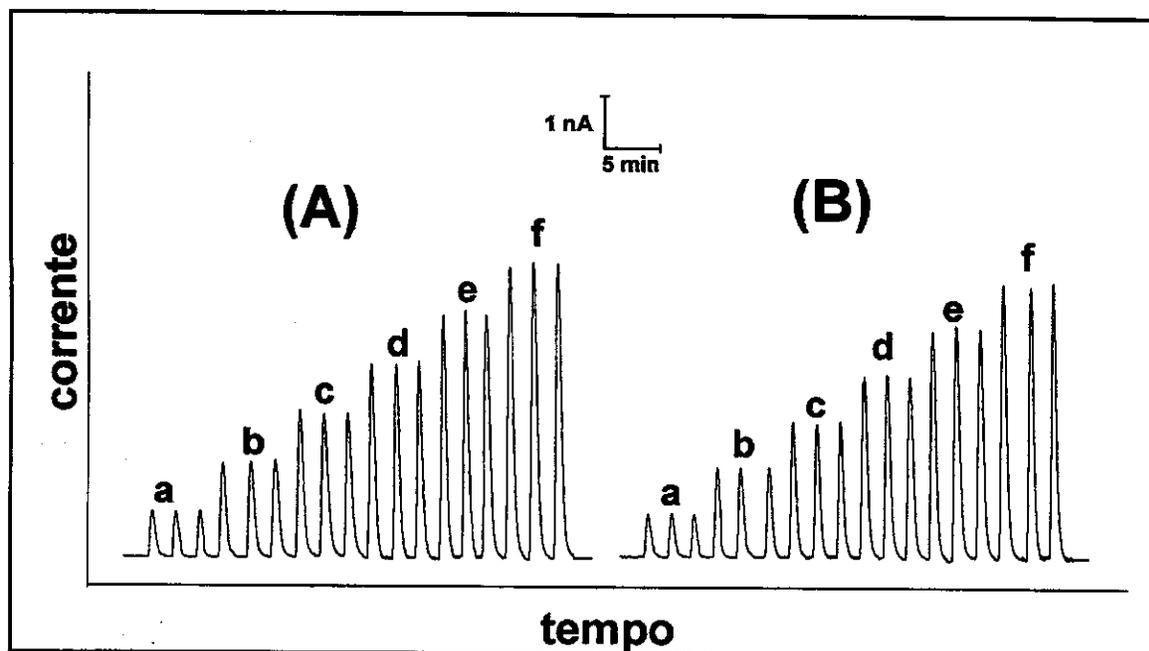


Figura 3.45 – Resposta do biossensor a base de lacase para soluções de tampão fosfato pH 5,0 (A) e de efluente papeleiro Kraft E1 não tratado (B) sob condições naturais de pH e força iônica, após sucessivos incrementos de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ na concentração de guaiacol (a partindo de a até f). Condições de fluxo e potencial conforme descrito na Figura 3.40.

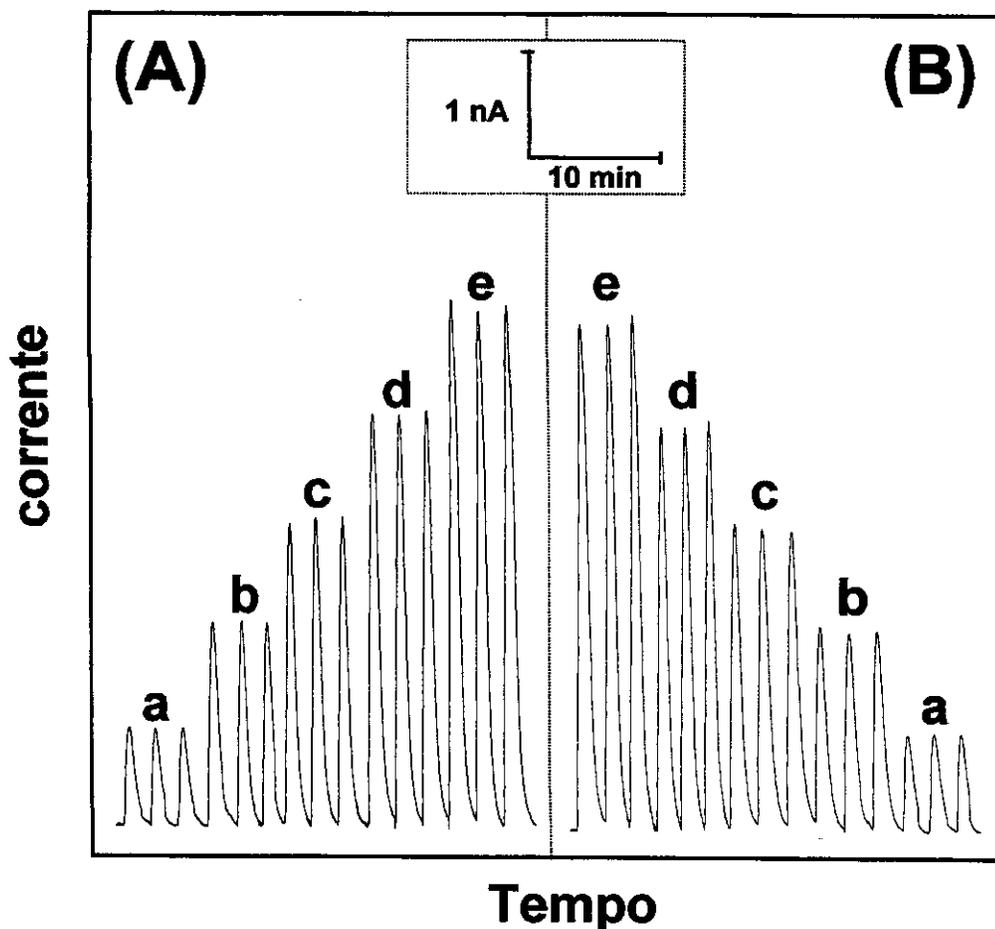


Figura 3.46 – Resposta do biossensor a base de tirosinase para soluções de tampão fosfato pH 5,5 (A) e de efluente papaleiro Kraft E1 não tratado (B) sob condições naturais de pH e força iônica, após sucessivos incrementos de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ na concentração de fenol (a partir de a até d). Condições de fluxo e potencial conforme descrito na Figura 3.40.

Na Tabela 3.6 é mostrada a concentração de fenóis presentes no efluente papaleiro Kraft E1 determinada por meio dos biossensores a base de lacase e de tirosinase, assim como, pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. As concentrações determinadas por estes métodos foram completamente diferentes. A diferença entre o método colorimétrico e os biossensores pode ser explicada devido à baixa seletividade apresentada pela metodologia colorimétrica. Este método fornece uma resposta positiva para uma grande gama de compostos, tais como, fenóis, taninos e ligninas, sendo que fragmentos de lignina são abundantes

neste tipo de efluente, já que a lignina é um dos componentes da madeira, que é a matéria-prima da indústria de papel e celulose. Por outro lado, o reconhecimento biocatalítico dos biossensores oferece uma resposta altamente seletiva para os compostos fenólicos estudados. Assim, devido à seletividade inerente dos biossensores, eles não permitem uma medida adequada da concentração de fenóis totais. Um outro método analítico deveria ser usado para estimar inequivocamente a concentração de fenóis totais presentes no efluente papeleiro. Entretanto, esta não é uma tarefa trivial pois, como mencionado anteriormente, este tipo de efluente possui mais de 300 compostos orgânicos diferentes, um alto valor de pH, sólidos em suspensão e outras condições extremas, que dificultam a análise contínua destes compostos alvos. Neste sentido, os biossensores desenvolvidos podem ser empregados para monitorar compostos fenólicos específicos com grande relevância do ponto de vista ambiental, fornecendo uma informação química mais precisa a respeito da composição do efluente.

A diferença entre as concentrações obtidas pelos biossensores é mais uma vez devida à diferença na sensibilidade que a lacase e tirosinase apresentam frente a diferentes compostos fenólicos, como apresentado nas Tabela 3.4 e 3.5. A análise cuidadosa dos dados presentes na Tabela 3.6 sugere que ambos os biossensores responderam basicamente somente para fenol (lembrando que o biossensor a base de lacase apresenta uma sensibilidade muito menor para fenol), indicando que a concentração de guaiacóis no efluente estudado é muito pequena.

Tabela 3.6 – Resultados obtidos pelo método de adição de padrão na determinação da concentração de fenóis presentes no efluente papeleiro Kraft E1, empregando-se diferentes biossensores (lacase e tirosinase) e o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu.

Método	Concentração de fenóis (mg L⁻¹)
Biossensor a base de lacase	0,19 ± 0,01
Biossensor a base de tirosinase	2,74 ± 0,10
Colorimétrico	25,27 ± 1,48

III.4.5.7 – Monitoramento contínuo de espécies fenólicas durante a remediação do efluente papelheiro

A grande versatilidade apresentada pelo dispositivo permitiu o monitoramento da degradação de compostos fenólicos durante um processo de tratamento do efluente papelheiro. Para este propósito foram utilizados o biossensor a base de lacase e a configuração para monitoramento por fluxo contínuo, descrita na Figura 3.11 (ii) (página 133), que torna a resposta do biossensor praticamente independente das condições da amostra. Na Figura 3.47 é mostrado que os compostos fenólicos foram significativamente reduzidos durante o processo de remediação, realizado ilustrativamente via oxidação avançada por ozonização/pH11. Um decréscimo de aproximadamente 90% na concentração destas espécies foi obtido após 30 minutos de tratamento.

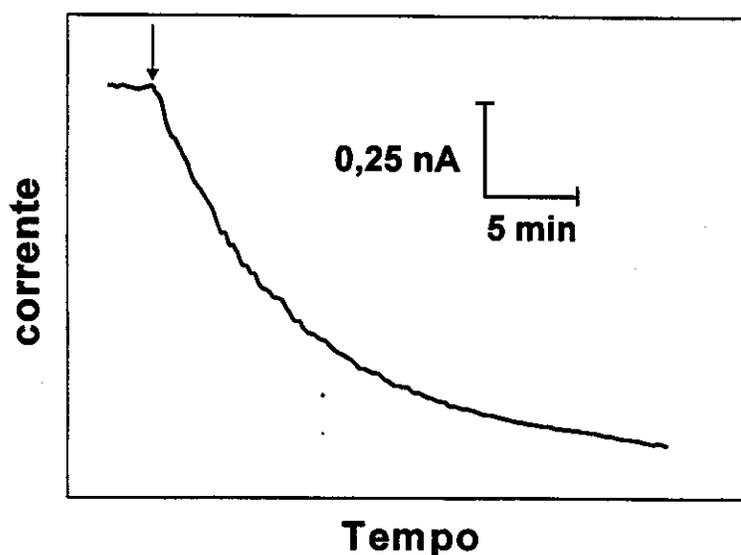


Figura 3.47 – Decréscimo na concentração de espécies fenólicas em função do tempo de tratamento pelo processo de ozonização/pH11. A seta indica o início do processo de remediação. Perfil obtido empregando-se fluxo contínuo. Biossensor a base de lacase. Velocidade do fluxo: $1,6 \text{ mL min}^{-1}$; solução interna tampão fosfato (10 mmol L^{-1} , pH 5,0). Potencial aplicado: $0,0 \text{ V vs Ag/AgCl}$. Concentração inicial de fenóis: $0,21 \text{ mg L}^{-1}$; concentração final de fenóis: $0,02 \text{ mg L}^{-1}$.

O dispositivo desenvolvido para o monitoramento contínuo de compostos fenólicos mostrou-se eficiente na detecção e quantificação de diferentes

compostos fenólicos e clorofenólicos no efluente papaleiro. A versatilidade deste sistema torna-o apto para o monitoramento ambiental de efluentes industriais, contribuindo para diminuir o tempo e os custos envolvidos na análise de poluentes, proporcionando uma maior eficiência no gerenciamento ambiental.

III.5 – CONCLUSÕES PARCIAIS

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento dos biossensores amperométricos mostraram que os processos de imobilização exercem um grande efeito sobre a sensibilidade dos biossensores. A imobilização das enzimas lacase e tirosinase sobre fibras de carbono, utilizando-se glutaraldeído e carbodiimida, foram mais eficientes que a adsorção física. Um efeito sinérgico entre o glutaraldeído e a carbodiimida foi observado, e este efeito promoveu um aumento significativo na sensibilidade dos biossensores. Os biossensores desenvolvidos por meio da imobilização com glutaraldeído/carbodiimida mostram uma excelente estabilidade, mantendo sua atividade por mais de 300 determinações, durante três meses. Estes biossensores também mostraram uma excelente faixa operacional e limite de quantificação.

Embora nenhuma tecnologia tenha sido aceita como majoritária na elaboração de eletrodos descartáveis, o uso de “screen-printing” vem crescendo em popularidade e pode vir a se tornar uma técnica padrão, particularmente devido a sua simplicidade e adequação a laboratórios em geral. Os SPE apresentam excelente desempenho analítico e reúnem as características de modificação de eletrodos sólidos em geral e de eletrodos de pasta de carbono (o modificador pode ser incorporado a tinta), além de serem compatíveis com instrumentos miniaturizados e portáteis. Os eletrodos de referência e auxiliar também podem ser impressos, o que facilita a elaboração de pequenas células eletroquímicas completamente descartáveis.

A combinação da atividade biocatalítica da lacase com a técnica de fabricação “screen-printed” ofereceu um meio de produção simples para biossensores descartáveis sensíveis a compostos fenólicos. A lacase pode ser imobilizada sobre a superfície dos eletrodos tipo “screen printed” pelo uso de métodos de imobilização “simples” (método de ligação covalente e ligação cruzada simultâneos). A detectibilidade apresentada por este biossensor foi muito satisfatória, na faixa de nanomol, o que permitiu a obtenção de limites de detecção com valores de 50 nmol L^{-1} e 30 nmol L^{-1} para guaiacol e cloroguaiacol,

respectivamente. Este novo dispositivo também mostrou uma excelente estabilidade permitindo medidas por um longo período de tempo. As experiências descritas ilustraram a habilidade para empregar este biossensor no monitoramento de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. Esta capacidade foi devida à junção da seletividade, sensibilidade, reposta reversível e baixo custo de produção.

O dispositivo remoto para monitoramento de compostos fenólicos mostrou-se bastante apropriado para sua aplicação em análises em campo. Este dispositivo portátil demonstra capacidade para aumentar a qualidade das atividades de monitoramento e remediação de locais contaminados com esta classe de composto orgânico. Pela primeira vez foi empregado a co-imobilização de diferentes enzimas em um sensor remoto. A utilização das enzimas lacase e tirosinase permitiu que este sensor fosse utilizado na análise de uma ampla gama de compostos fenólicos, mas principalmente para estimar a concentração de fenóis totais presentes em uma determinada matriz ambiental. Além disso, os biossensores desenvolvidos com estas enzimas mostraram excelentes sensibilidade, seletividade e estabilidade. Por exemplo, a detectibilidade apresentada pelo biossensor a base de lacase para compostos clorofenólicos foi satisfatória, o que permitiu a obtenção de limites de detecção na ordem $8,5 \text{ nmol L}^{-1}$ para cloroguaiacol.

A literatura possui exemplos de biossensores amperométricos muito mais sensíveis, que apresentam limites de detecção na ordem de $0,2 \text{ nmol L}^{-1}$ para fenol (Liu e col., 2000). Entretanto, ressalta-se que o principal objetivo durante o desenvolvimento dos biossensores não foi a busca de menores limites de detecção, mas sim a aplicabilidade destes sensores em matrizes complexas de interesse ambiental.

O sistema desenvolvido para a análise simultânea de compostos fenólicos em misturas binárias mostrou-se extremamente eficiente na detecção e quantificação de diferentes compostos fenólicos e clorofenólicos. A versatilidade deste sistema indica que o mesmo pode ser empregado no monitoramento ambiental de efluentes industriais, contribuindo para diminuir o tempo e o custo

envolvidos na análise de poluentes, proporcionando uma melhor eficiência no gerenciamento ambiental, por meio de uma informação química precisa e detalhada a respeito da composição do efluente.

O emprego de um sistema de análise em fluxo com célula amostradora eliminou a influência do pH e força iônica das amostras sobre as respostas dos biossensores, aumentando a aplicabilidade dos mesmos. Tal sistema foi empregado com sucesso no monitoramento contínuo dos compostos fenólicos presentes no efluente papaleiro durante sua remediação pelo processo de ozonização. Ressaltando-se que este sistema está capacitado para ser empregado durante a degradação do efluente papaleiro pelos demais processos oxidativos avançados.

III.6 - REFERÊNCIAS

- Amatore, C.; Maisonhaute, E.; Simonneau, G.; *J. Electroanal. Chem.*, 486 (2000) 141.
- Baird, C.L.; Myszka, D.G.; *J. Mol. Recognit.*, 14 (2001) 261.
- Beebe, K.R.; Pell, R.J.; Seasholtz, M.B.; *Chemometrics: A Practical Guide*; Wiley: New York (1998).
- Bendall, D.S.; Gregory, R.P.F.; *Purification of phenol oxidases*. In Pridham, J.B., Ed. *Enzyme chemistry of phenolic compounds*. Pergamon, Oxford, (1963) 7.
- Bier, F.F.; Ehrentreich-Förster, E.; Scheller, F.W.; Makower, A.; Eremenko, A.; Wollenberger, U.; Bauer, C.G.; Pfeiffer, D.; Michael, N.; *Sens. Actuators B*, 33 (1996) 5.
- Bogdanovskaya, V.A.; Tarasevich, M.R.; *Biosens. Bioelectron.*, 11 (1996) 853.
- Brainina, K.Z.; Ivanova, A.V.; Khanina, R.M.; *Anal. Chim. Acta*, 436 (2001) 129.
- Buerck, J.; Roth, S.; Kraemer, K.; Scholz, M.; Klaas, N.; *J. Hazard. Mater.*, 83 (2001) 11.
- Burestedt, E.; Narvaez, A.; Ruzgas, T.; Gorton, L.; Emnéus, J.; Domíngues, E.; Marko-Varga, G.; *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1605.
- Cladera, A.; Gómez, E.; Estela, J.M.; Cerala, V.; *Anal. Chim. Acta.*, 267 (1992a) 95.
- Cladera, A.; Gómez, E.; Estela, J.M.; Cerala, V.; *Anal. Chim. Acta.*, 267 (1992b) 103.
- Campanella, L.; Sammartino, M.P.; Tomassetti, M.; *Sens. Actuators B*, 7 (1992) 383.
- Campanella, L.; Beone, T.; Sammartino, M.P.; Tomassetti, M.; *Analyst*, 118 (1993) 979.
- Canofeni, S.; Di Sario, S.; Mela, J.; Pilloton, R.; *Anal. Lett.*, 27 (1994) 1659.
- Chibata, I.; *Immobilized enzymes research and development*, cap.2 Preparation of immobilized enzymes and cells, Wiley, New York (1978) 47.
- Chiti, G.; Marrazza, G.; Mascini, M.; *Anal. Chim. Acta*, 427 (2001) 155.
- Cosnier S.; *Biosens. Bioelectron.*, 14 (1999) 443.
- Cosnier, S.; Innocent, C.; *J. Electroanal. Chem.*, 328 (1992) 361.
- Cosnier, S.; Innocent, C. H.; *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 31 (1993) 147.
- Cosnier, S.; Popescu, I.C.; *Anal. Chim. Acta*, 319 (1996) 145.
- Cosnier, S.; Fanbon, J.J.; Labbe, P.; Linosin, D.; *Sens. Actuators B*, 59 (1999) 134.
- Csőregi, E.; Jönsson-Pettersson, G.; Gorton, L.; *J. Biotechnol.*, 30 (1993) 315.
- Czaplicka, M.; *Chromatographia*, 53 (2001) S470.
- De Carvalho R.M.; Kubota L.T.; Rohwedder J.J.R.; Csőregi E.; Gorton L.; *J. Electroanal. Chem.*, 457 (1998) 83.
- De Carvalho, R.M.; Kubota, L.T.; Rohwedder, J.J.R.; *Quim. Nova*, 22 (1999) 591.
- De Carvalho, R.M.; Mello, C.; Kubota, L.T.; *Anal. Chim. Acta*, 420 (2000)109.
- Denninson, M.J.; Turner, A.P.F.; *Biotechnol. Adv.*, 13 (1995) 1.
- Durán, N.; Espósito, E.; *Appl. Catal. B: Environ.*, 28 (2000) 83.
- Durán, N.; Espósito, E.; "Enzimas lignolíticas", in *Biologia, Bioquímica e Biotecnologia de Fungos* (Espósito, E.; Azevedo, J.L.; Eds); Editora Univ. Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes/SP, Brasil, no prelo (2002).

- Eickman N.C.; Solomon, E.I.; Larrabee, J.A.; Spiro, T.G.; Lerch, K.; *J. Am. Chem. Soc.*, 100 (1978) 6529.
- EPA Method 440; Ambient Water Quality Criteria for Phenol, EPA Manual, Washington, DC/USA (1980).
- EPA Method 420.1; Total Recoverable Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes, EPA Manual 600/4-79-020, Cincinnati/USA (1983).
- EPA Method 604, *Fed. Regist.*, 40 (1984) 58.
- Farre, M.; Pasini, O.; Alonso, M.C.; Castillo, M.; Barcelo, D.; *Anal. Chim. Acta*, 426 (2001) 155.
- Freire, R.S.; Pelegrini, R.; Kubota, L.T.; Durán, N.; Peralta-Zamora, P.; *Quim. Nova*, 23 (2000) 504.
- Freire, R.S.; Durán, N.; Kubota, L.T.; *Talanta*, 54 (2001) 681.
- Freire, R.S.; Thongngamdee S.; Durán, N.; Wang, J.; Kubota, L.T.; *Analyst*, 127 (2002) 258.
- Gauger, P.R.; Holt, D.B.; Patterson, C.H.; Charles, P.T.; Shriver-Lake, L.; Kusterbeck, A.W.; *J. Hazard. Mater.*, 83 (2001) 51.
- Gatti, R.; Gioia, M.G.; Di Pietra, A.M.; Cavrini, V.; *Anal. Chim. Acta*, 447 (2001) 89.
- Geladi, P.; Kowalski, B.R.; *Anal. Chim. Acta*, 185 (1986) 1.
- Gianfreda, L.; Xu, F.; Bollag, J.M.; *Bioremediation J.*, 3 (1999) 1.
- Gorton, L.; Jönsson-Petersson, G.; Csöregi, E.; Johansson, K.; Domínguez, E.; Marko-Varga, G.; *Analyst*, 117 (1992) 1235.
- Guardiá, M.; Khalaf, K.D.; Hasan, B.A.; Morales-Rubio, A.; Arias, J.J.; Garcia-Fraga, J.M.; Jiminez, A.J.; Jiminez, F.; *Analyst*, 121 (1996) 1321.
- Gundersen, J.L.; MacIntyre, W.G.; *Environ. Toxicol. Chem.*, 15 (1996) 809.
- Gundersen, J.L.; MacIntyre, W.G.; Hall, R.C.; *Environ. Sci. Technol.*, 31 (1997) 188.
- Harris, M.L.; Elliott, J.E.; *Environ. Poll.*, 110 (2000) 307.
- Hedenmo, M.; Narváez, A.; Domínguez, E.; Katakis, I.; *J. Electroanal. Chem.*, 425 (1997) 1.
- Ju H.X.; Dong L.; Chen H.Y.; *Talanta*, 43 (1996) 1177.
- Karhunen, E.; Niku-Paavola, M.-L.; Viikari, L.; Haltia, T.; Meer, R.A.; van der Duine, J. A.; *FEBS Lett.*, 267 (1990) 6.
- Karube, I.; Nomura, Y.; Arikama, Y.; *Trends Anal. Chem.*, 14 (1995) 295.
- King, W.P.; Joseph, K.T.; Kissinger, P.T.; *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 63 (1980) 137.
- Kinoshita, K.; *Carbon: Electrochemical and Physicochemical Properties*, Wiley, New York, (1988) 1.
- Korenman, Y.I.; Gruzdev, I.V.; Kondratenok, B.M.; *J. Anal. Chem.*, 56 (2001) 166.
- Kröger D.; Liley M.; Schiweck W.; Skerra A.; Vogel H.; *Biosens. Bioelectron.*, 14 (1999) 155.
- Kulys, J.; Schmid, R.D.; *Anal. Lett.*, 23 (1990) 589.
- Li, Y.F.; Zhang, H.; Xiao F.; Zhang, Z.Q.; *Talanta*, 47 (1998) 25.
- Liu, Z.J.; Liu, B.H.; Kung, J.G. Deng, J.Q.; *Anal. Chem.*, 72 (2000) 4707.
- Lutz, E.S.M.; Burestedt, E.; Emnéus, J.; Jarskog, S.; Gorton, L.; Marko-Varga, G.; *Anal. Chim. Acta*, 305 (1995) 8.
- Macholan, L.; Schanel, L.; *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 42 (1977) 3667.

- Marko-Varga, G.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; *Trends Anal. Chem.*, **14** (1995) 319.
- Mascini, M.; Palchetti, I.; Marrazza, G.; *Fresenius J. Anal. Chem.*, **369** (2001) 15.
- May, S.W.; *Curr. Opin. Biotechnol.*, **10** (1999) 370.
- Minussi, R.C.; Pastore, G.M.; Durán, N.; *J. Biotechnol.*, submetido (2002).
- Monteanu, F.-D.; Lindgren, A.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; Csöregi, E.; Ciucu, A.; van Hwystee, R.B.; Gazaryan, I.G.; Lagrimini, L.M.; *Anal. Chem.*, **70** (1998) 2596.
- Motomizy, S.; Yoden, T.; *Anal. Chim. Acta*, **261** (1992) 461.
- Mulchandani, A.; Bassi, A.S.; *Crit. Rev. Biotechnol.*, **15** (1995) 105.
- Nagaraja, P.; Vasantha, R.A.; Sunitha, K.R.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **25** (2001) 417.
- Nascimento, V.B.; Angnes, L.; *Quim. Nova*, **21** (1998) 614.
- Nistor, C.; Emnéus, J.; *Waste Manage*, **19** (1999) 147.
- Nistor, C.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Ciucu, A.; *Anal. Chim. Acta*, **387** (1999) 309.
- Norberg, J.; Emnéus, J.; Jönson, J.A.; Mathiasson, L.; Burestedt, E.; Knutsson, M.; Marko-Varga, G.; *J Chromatogr. B*, **701** (1997) 39.
- Oikari, A.O.J.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **36** (1986) 429.
- Olmo, M.; Diez, C.; Molina, A.; Orbe, I.; Vilchez, J.L.; *Anal. Chim. Acta*, **335** (1996) 23.
- Önnerfjord, P.; Emnéus, J.; Marko-Varga, G.; Gorton, L.; Ortega, F.; Domínguez, E.; *Biosens. Bioelectron.*, **10** (1995) 607.
- Ortega, F.; Domínguez, E.; Jönsson-Pettersson, G.; Gorton, L.; *J. Biotechnol.*, **31** (1993) 289.
- Ortega, F.; Domínguez, E.; Burestedt, E.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Marko-Varga, G.; *J. Chromatogr. A*, **675** (1994) 65.
- Parrellada, J.; Narváez, A.; López, M.A.; Domínguez, E.; Fernández, J.J.; Pavlov, V.; Katakis, I.; *Anal. Chim. Acta*, **362** (1998) 47.
- Parker, W.J.; Farquhar, G.J.; Hall, E.R.; *Environ. Sci. Technol.*, **27** (1993) 1783.
- Pelegri, R.T.; Freire, R.S.; Durán, N.; Bertazzoli, R.; *Environ. Sci. Technol.*, **35** (2001) 2849.
- Pena, N.; Reviejo, A.J.; Pingarron, J.M.; *Talanta*, **55** (2001) 179.
- Prahacs, S.M.; Hall, K.J.; Duncan, W.; *Water Res.*, **30** (1996) 2301.
- Puig, D.; Ruzgas, T.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Marko-Varga, G.; Barceló, D.; *Electroanalysis*, **8** (1996) 885.
- Puig, D.; Barcelo, D.; *Trends Anal. Chem.*, **15** (1996) 362.
- Reyes J.; Dezotti M.; Mansilla H.; Villaseñor J.; Esposito E.; Durán N.; *Appl. Catal. Environ.*, **15** (1998) 211.
- Rella, R.; Ferrara, D.; Barinson, G.; Donetti, L.; Lora, S.; *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **24** (1996) 83.
- Rodriguez, M.O.; Flurkey, W.H.; *J. Chem. Educ.*, **69** (1992) 767.
- Rogers, K.R.; Willians, L.R.; *Trends Anal. Chem.*, **14** (1995) 289.
- Rojendran, L.; Ananthi, P.; *J. Electroanal. Chem.*, **501** (2001) 210.
- Rossato, S.S.; Freire, R.S.; Durán, N.; Kubota, L.T.; *Quim. Nova*, **24** (2001) 77.
- Ruan, C.M.; Li, Y.B.; *Talanta*, **54** (2001) 1095.

- Russell, I. M.; Burton, S.G.; *Anal. Chim. Acta*, 389 (1999) 161.
- Ruzgas, T.; Gorton, L.; Emnéus, J.; Marko-Varga, G.; *J. Electroanal. Chem.*, 391 (1995) 41.
- Sánchez-Ferrer, A.; Rodríguez-Lopez, J.M.; García-Cánovas, F.; García-Carmona, F.; *Biochim. Biophys. Acta.*, 1247 (1995) 1.
- Schnell, A.; Steel, P.; Melcer, H.; Hodson, P.V.; Carey, J.H.; *Water Res.*, 34 (2000) 493.
- Sigrist, H.; Gao, H.; *Chimia*, 53 (1999) 81.
- Smeds, A.; Holmborn, B.; Pettersson, C.; *Chemosphere*, 28 (1994) 881.
- Sole, S.; Alegret, S.; *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 8 (2001) 256.
- Svitel, J.; Miertus, S.; *Environ. Sci. Technol.*, 32 (1998) 828.
- Szklarz, G.D.; Antibus, R.K.; Sinsabaugh, R.L.; Linkins, A.; *Micology*, 81 (1989) 234.
- Tarasevich, M.R.; Bogdanovskaya, V.A.; Gegeshidze, L.V.; Efremov, B.N.; Zhutaeva, G.V.; Tyurin, V.S.; *J. Anal. Chem.*, 54 (1999) 858.
- Thurston, C.F.; *Microbiology*, 140 (1994) 19.
- Todeschini, R.; Galvani, D.; Vilchez, J.L.; Olmo, M.; Navas, N.; *Trends Anal. Chem.*, 18 (1999) 93.
- VanLeewen, J.A.; Nicholson, B.C.; Hayes, K.P.; Mulcahy, D.E.; *Marine Freshwater Res.*, 47 (1996) 929.
- Vilchez, J.L.; del Olmo, M.; Diez, C.; Molina, A.; Orbe, I.; *Anal. Chim. Acta*, 335 (1996) 23.
- Vincent, G.; In *Organic Micropollutants in the Aquatic Environmental*; Angeletti, G.; Bjorseth, A. (Eds); Klumer, Dordrecht, (1991) 285.
- Wang, J.; *Lab. Robotics Automat.*, 12 (2000) 178.
- Wang, J.; Naser, N.; Kwon, H.-S.; Cho, M.Y.; *Anal. Chim. Acta*, 264 (1992a) 7
- Wang, J.; Reviejo, A.J.; Mannino, S.; *Anal. Lett.*, 25 (1992b) 1399.
- Wang, J.; Fang, L.; Lopez, D.; *Analyst*, 119 (1994a) 455.
- Wang, J.; Lu, F.; Lopez, D.; *Biosens. Bioelectron.*, 9 (1994b) 9.
- Wang, J.; Chen, Q.; *Electroanalysis*, 7 (1995a) 746.
- Wang, J.; Chen, Q.; *Anal. Chim. Acta*, 312 (1995b) 39.
- Wang, J.; Chen, Q.; *Anal. Lett.*, 28 (1995c) 1131.
- Wang, J.; Larson, D.; Foster, N.; Armalis, S.; Lu, J.; Rongrong, X.; Olsen, K.; Zirino, A.; *Anal. Chem.*, 67 (1995a) 1481.
- Wang, J.; Foster, N.; Armalis, S.; Larson, D.; Zirino, A.; Olsen, K.; *Anal. Chim. Acta*, 310 (1995b) 223.
- Wang, J.; Lin, Y.; *Anal. Lett.*, 26 (1997) 197.
- Wang, J.; Tian B.; Nascimento, V.B.; Angnes, L.; *Electrochim. Acta*, 43 (1998) 3459.
- Wang, J.; Lu, J.; Young, S.; Vuki, M.; Tian, B.; Adeniyi, W.K.; Armendariz, R.A.; *Anal. Chem.*, 72 (2000) 2659.
- Woodward, J.; *Immobilized cells and enzymes a practical approach*, IRL Press, New York (1985) 31.
- Winkler, M.E.; Solomon, E.I.; *J. Am. Chem. Soc.*, 107 (1985) 4015.

- Yaropolov, A.I.; Skorobogatko, O.V.; Vartanov, S.S.; Varfolomeyer, S.D.; *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 40 (1994) 257.
- Yaropolov, A.J.; Kharybin, A.N.; Emnéus, J.; Marko-Varga, G.; Gorton, L.; *Anal. Chim. Acta*, 308 (1995) 137.
- Young, S.J.; Hart, J.P.; Dowman, A.A.; Cowell, D.C.; *Biosens. Bioelectron.*, 16 (2001) 887.
- Zhang, Z.Q.; Chen, S.Z.; Li, Y.F.; Zhu, M.F.; *Anal. Chim. Acta*, 441 (1999) 283.
- Zimmermann, F.; Taylor-Mayer, R.; *Mutagenicity Testing in Environmental Pollution Control*, Wiley, New York (1985) 1.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES

IV.1 – CONCLUSÕES GERAIS

Os crescentes problemas, provocados pela contaminação do meio ambiente, têm feito com que novas formas de produção, assim como, de tratamento de resíduos sejam necessárias. Os processos estudados neste trabalho apresentam uma boa eficiência no tratamento do efluente papelero, contudo os custos mostraram-se elevados. Isto não deve ser visto como uma barreira, e sim como mais um estímulo para novas pesquisas que busquem desenvolver reatores e processos mais eficientes, que conduzam a uma diminuição do custo operacional. As considerações econômicas exercem um papel importante, quando se trata de definir a melhor tecnologia disponível. Esta definição é influenciada, até certo ponto, por fatores relativamente independentes das necessidades de controle da poluição. Além disso, os dados econômicos, que determinam se as medidas selecionadas são ou não viáveis, podem sofrer alterações bruscas em função das políticas governamentais ou pelas necessidades de mercado. Um exemplo deste tipo de situação é a queda acentuada no custo de produção de ozônio observada nas últimas décadas, o que já levou a algumas empresas a implementarem este processo em seus parques industriais.

O emprego combinado dos processos oxidativos avançados estudados apresenta boas perspectivas para uma depuração efetiva do efluente papelero Kraft E1. Uma outra abordagem promissora é a utilização dos processos oxidativos avançados como etapas preliminares ao tratamento biológico, buscando aumentar a biodegradabilidade dos compostos poluentes, o que proporcionaria um menor tempo de tratamento e maior eficiência aos subsequentes processos biológicos.

Em relação ao desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de compostos fenólicos, destaca-se que a detecção de substâncias em tempo real é a tendência da química analítica para o futuro. É cada vez maior a preocupação dos químicos de determinar em tempo real, preservando ao

máximo as condições existentes na natureza, os compostos ou substâncias presentes em alimentos e materiais de interesse clínico, biológico e ambiental.

Neste sentido, buscou-se desenvolver biossensores amperométricos com a maior aplicabilidade possível para o monitoramento de espécies fenólicas em amostras de interesse ambiental. Verificou-se que o processo de imobilização do componente biológico sobre a superfície dos eletrodos possui um papel fundamental na sensibilidade dos biossensores desenvolvidos. Com destaque para o efeito sinérgico entre os processos de ligação covalente e cruzada (carbodiimida e glutaraldeído), que permitiram a construção de biossensores com maiores sensibilidades e robustez.

Os dispositivos descartáveis (SPE) e remotos mostraram características favoráveis para serem empregados no monitoramento de compostos poluente *“in situ”*. Estas características que podem ser exploradas para popularizar o uso deste tipo de sensor em análise desta natureza.

A metodologia para a determinação simultânea de diferentes compostos fenólicos demonstrou propriedades singulares, que conferem a ele grande perspectiva para qualificar e quantificar diferentes compostos em matrizes complexas de interesse industrial, biológico ou ambiental.

O sistema de membranas para a amostragem de analitos é outro dispositivo que merece destaque, já que conferiu independência às respostas dos biossensores em função das características da amostra, principalmente em relação ao pH e força iônica. O uso de membranas de diferentes tipos e com cortes de massa molar distintos, além de soluções aceptoras com diferentes afinidades, podem contribuir para aumentar a seletividade e sensibilidade deste método analítico.

A combinação das metodologias propostas pode, por exemplo, fornecer mais informações qualitativas e quantitativas a respeito das espécies fenólicas presentes no efluente papelheiro Kraft E1. Estas informações podem ser úteis para estudar a correlação entre a concentração destas espécies, a toxicidade do efluente e a eficiência dos métodos de remediação frente os diferentes compostos, melhorando a qualidade de estudos sobre o monitoramento e tratamento de

efluentes industriais e outras amostras de interesse ambiental.

Finalmente, todas as metodologias propostas podem ser acopladas em um único dispositivo, que poderia fornecer informações químicas multi-elementares de forma contínua e remota.

IV.2 – PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Como propostas de trabalhos futuros sugere-se para o:

1) Tratamento de efluentes,

- Empregar metais (tais como Fe, Mn, Ni, Zn, Ag e Cr) para aumentar a eficiência dos processos de ozonização (processo de ozonização catalítica);
- Imobilizar os fotocatalisadores para aumentar a eficiência do processo fotocatalítico e eliminar a etapa de filtração para recuperação dos catalisadores;
- Explorar as excelentes propriedades dos processos eletroquímico e fotoeletroquímico para o tratamento de diversos efluentes industriais;
- Empregar os processos oxidativos avançados de maneira combinada, buscando-se explorar as características individuais de cada processo para promover uma depuração completa do efluente papelheiro Kraft E1;
- Empregar os processos oxidativos avançados como etapas de pré-tratamento ou pós-tratamento aos processos biológicos, buscando-se avaliar o aumento na biodegradabilidade promovido por estes processos.

2) desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para o monitoramento de amostras de interesse ambiental,

- Desenvolver novas formas de imobilização das enzimas sobre a superfície dos eletrodos, buscando aumentar a sensibilidade, seletividade e robustez dos biossensores;
- Empregar as metodologias de eletrodos impressos, sensores remotos, determinação simultânea e sistema de análise em fluxo para qualificar e quantificar a maior gama possível de compostos fenólicos no efluente

papeleiro Kraft E1 e/ou outras matrizes de interesse industrial, biológico e ambiental;

- Desenvolver dispositivos portáteis e/ou descartáveis para o monitoramento contínuo “*in situ*” de diferentes compostos fenólicos;
- Ampliar a aplicabilidade destas metodologias para novas matrizes e compostos;