

“NOVO DISPOSITIVO PARA MONITORAMENTO CONTÍNUO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM EFLUENTES INDUSTRIAIS”

A contaminação de solos e corpos d'água por poluentes orgânicos representa um sério problema ambiental. A determinação de fenóis e de seus compostos derivados é de grande importância, uma vez que estas espécies são liberadas no meio ambiente por um grande número de indústrias, tais como as indústrias de plásticos, tintas, drogas, antioxidantes, alimentos, desinfetantes, resinas, pesticidas, polímeros sintéticos, papel e celulose, etc. Uma grande variedade de compostos orgânicos é gerada durante estes processos, muitos dos quais são recalcitrantes aos processos de tratamento de efluentes normalmente utilizados pelas indústrias (Freire e col., Quim Nova 23 (2000) 504; Rossato e col., Quim Nova 24 (2001), 77). O tipo e a abundância dos compostos fenólicos gerados varia com o processo industrial em particular, no efluente da indústria de papel e celulose, por exemplo, são encontrados guaiacóis (o-metoxifenois), catecois (o-dihidroxibenzenos), veratrois (dimetoxibenzenos), siringois (dimetoxifenois) e seus derivados clorados (Gundersen e MacIntyre, Environ. Toxicol. Chem, 15 (1996) 809).

A importância ambiental dos compostos fenólicos e seus derivados clorados pode ser observada por seu comportamento em ambientes aquáticos. Metabólitos de cloroguaiacóis têm sido detectados na bile de peixes que vivem em regiões próximas a indústrias de papel e celulose. 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, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 36 (1986) 429; Gundersen e MacIntyre, Environ. Toxicol. Chem, 15 (1996) 809). Além disso, muitos compostos fenólicos, dentre os quais guaiacol e cloroguaiacol, possuem efeitos tóxicos em animais e plantas, pois facilmente penetram pela pele e membranas celulares, determinando um amplo espectro de genotoxicidade, mutagenicidade e efeitos hepatotóxicos (Russel e Burton, Anal Chim Acta 389 (1999) 161). E mais, mesmo em pequenas concentrações ($< 1 \text{ mg L}^{-1}$), os compostos fenólicos afetam o gosto e odor de águas potáveis e peixes, tendo sido classificados como recalcitrantes (não biodegradáveis) e com propensão para

bioacumulação e biomagnificação.

Devido aos riscos para a saúde e para o meio ambiente causados pela exposição aos compostos fenólicos, existe um grande interesse em sua determinação 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 tem feito com que estes métodos mostrem-se pouco atraentes para serem empregados no monitoramento contínuo de compostos fenólicos. Sendo que 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 não aceitáveis 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.

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., *Biotech. Adv.* 13 (1995) 1). Biossensores eletroquímicos a base de peroxidase, tirosinase e lacase têm mostrado grande seletividade e sensibilidade na determinação de fenóis e seus derivados (Russel e col., *Anal Chim Acta* 389 (1999) 161; Rosatto e col., *Anal. Chim. Acta* 390 (1999) 65; Yaropolov e col., *Anal. Chim. Acta*, 308 (1995) 137; Bogdanovs e col., Patente DD280790-A; Kubota e col., Patente PI 0004323).

Assim o dispositivo apresentado baseia-se na técnica de análise em fluxo e detecção por biossensores. Para as medidas em fluxo o biossensor foi inserido dentro de uma célula amperométrica, tal qual descrito na Figura 1. Esta figura mostra um diagrama esquemático do sistema analítico, que pode ser disposto na configuração para análise por injeção em fluxo (i) ou 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. A Figura 1 também mostra um diagrama esquemático da célula amostradora (sistema de diálise com membrana) (iii) e da célula eletroquímica (iv), onde EA = entrada da amostra, AS = saída da amostra, M = membrana, ET = entrada da solução tampão, ST = saída da solução tampão, ET = eletrodo de trabalho (biossensor), CE = contra-eletrodo, ER = eletrodo de referência, e = entrada da célula eletroquímica e s = saída da célula eletroquímica.

Os resultados ilustrativos aqui apresentados referem-se a um biossensor amperométrico a base de lacase. Esta enzima foi imobilizada sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo conforme descrito na patente brasileira PI 0004323 (Kubota e col., 2000).

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 (meios básicos) (Freire e col., Talanta, 54 (2001) 861; Wang e Quen, Anal. Chim. Acta, 312 (1995) 39). 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 (Freire e col, Environ. Technol., 22 (2001) 897).

Para contornar este problema e outros efeitos de matriz, este processo 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.

A utilização de membranas em química analítica tem sido reportada com sucesso, esta técnica foi já usada para coletar poluentes no ar e também para determiná-los em plasma sanguíneo (Motomizy e Yodem, Anal. Chim. Acta., 261 (1992) 461; Zhang e col., Talanta, 47 (1998) 25; Zhang e col., Anal. Chim. Acta., 441 (1999) 283; Norberg e col., J. Chromatogr. B, 701 (1997) 39). 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., Anal. Chim. Acta., 441 (1999) 283). 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 e Δ é o coeficiente de difusão da membrana.

O comportamento do dispositivo proposto foi investigado em termos da variação da resposta analítica em função do potencial de trabalho, velocidade do fluxo, pH e força iônica.

INFLUÊNCIA DO POTENCIAL DE TRABALHO: 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 mostra a Figura 2, onde E_{ox} = enzima no estado oxidado, E_{red} = enzima no estado reduzido, CF_{ox} = composto fenólico oxidado, CF_{red} = composto fenólico reduzido, E = potencial de trabalho, ECS = eletrodo saturado de calomelano e e^- = elétron. 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 reduzida 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 0,0 V. 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
5 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
10 durante oxidação eletroquímica direta de fenóis; amplificação da resposta como uma consequência da redução de quinonas e/ou radicais fenoxi ao composto fenólico inicial, além da performance dos eletrodos se enquadrar no intervalo de potenciais ótimo para medidas eletroquímicas (Marko Varga e col., Trends Anal Chem 14 (1995) 319).

15 A Figura 3 (A) mostra a variação da corrente em função do potencial aplicado para o biossensor a base de lacase empregado neste protótipo. Pode-se observar que a redução dos produtos enzimáticos (quinonas) começou em 300 mV vs Ag/AgCl, obtendo-se correntes catódicas maiores conforme o potencial é diminuído. Uma intensidade máxima da corrente foi observada ao redor de 0,0 V.
20 Além da resposta máxima este potencial apresenta uma menor probabilidade de interferência devido à oxidação/redução de contaminantes, e apresenta também uma baixa corrente residual. Desde modo, para os experimentos subseqüentes foi adotado o potencial de trabalho de 0,0 V vs Ag/AgCl.

INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DO FLUXO: A Figura 3 (B) mostra a
25 variação da resposta em função do fluxo, onde se pode 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
30 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 (B) 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. 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 nesta descrição foram obtidos empregando-se um fluxo de $1,6 \text{ mL min}^{-1}$.

A Figura 3 (C) mostra 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 pelo 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 apresentados nesta descrição foram obtidos empregando-se um volume de amostragem de $220 \mu\text{L}$.

INFLUENCIA DO pH A 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 promoveria 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. Os resultados apresentados nesta descrição foram obtidos empregando-se tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ pH 5,0 com solução interna (Freire e col., Talanta, 54 (2001) 861).

A Figura 4 mostra a influência do pH (A) e da força iônica (B) de uma solução externa (amostra) sobre a resposta do biossensor para uma solução 50 μmol 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 (Freire e col., Talanta, 54 (2001) 861; Wang e Quen, Anal. Chim. Acta, 312 (1995) 39).

ESTABILIDADE DO SISTEMA ANALÍTICO: O biossensor a base de lacase mostrou uma grande estabilidade, conforme mostra a Figura 5 (A), que representa os dados de corrente obtidos a partir de repetidas análises realizadas em intervalos de 10 minutos durante um prolongado período de tempo. As análises realizadas com este biossensor apresentaram um desvio padrão relativo de 1,7%, para uma série de 20 medidas sucessivas de uma solução 50 μmol L⁻¹ de guaiacol. Nenhuma passivação do sensor foi observada durante todos os experimentos. Além disso, a bioatividade foi mantida por um longo período (90% após 300 determinações), de acordo com a excelente estabilidade da lacase (Freire e col, Talanta 54 (2001) 861). A estabilidade observada também é 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, teve responder rapidamente a mudanças súbitas na concentração dos compostos poluentes. A Figura 5 (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 μmol L⁻¹ e 10 μmol L⁻¹.

CALIBRAÇÃO: A resposta analítica do novo dispositivo foi avaliada empregando-se diferentes compostos fenólicos. A Figura 6 (A) mostra curvas

analíticas obtidas para guaiacol (a), cloroguaiacol (b), p-clorofenol (c) e fenol (d). A ordem de sensibilidade apresentada pelo biossensor a base de lacase foi guaiacol > cloroguaiacol >> p-clorofenol > fenol. A Figura 6 (B) mostra curvas analíticas obtidas para guaiacol (a) e cloroguaiacol (b) na faixa de concentração entre 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, estas curvas podem ser ajustadas pelas equações: $i(\text{nA}) = 0,11 \text{ nA } (\mu\text{mol L}^{-1})^{-1} [\text{guaiacol}]$, $r^2 = 0,9988$ e $i(\text{nA}) = 0,06 \text{ nA } (\mu\text{mol L}^{-1})^{-1} [\text{cloroguaiacol}]$, $r^2 = 0,9981$. Limites de detecção ao redor de $1,2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para guaiacol e $2,4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para cloroguaiacol foram estimados, baseados na boa razão sinal/ruído e na pequena corrente residual. Esta última propriedade, pode ser atribuída ao baixo potencial de trabalho (0,0 V) 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.

ANÁLISE DE EFLUENTES INDUSTRIAIS: A seletividade e sensibilidade apresentadas pelo dispositivo permitiram uma conveniente quantificação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. A Figura 7 mostra a resposta do biossensor a base de lacase para amostras de tampão fosfato (A) e de efluente papelheiro 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). O reconhecimento biológico, aliado ao baixo potencial de trabalho e ao sistema de diálise permitiram uma análise seletiva dos compostos alvos (espécies fenólicas) presentes em uma matriz ambiental complexa (efluente papelheiro 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, materiais suspensos e meio bastante alcalino (pH 11).

A grande versatilidade apresentada pelo dispositivo permitiu o monitoramento da degradação de compostos orgânicos durante um processo de tratamento o efluente papelheiro. Para este propósito foi utilizada a configuração para monitoramento por fluxo contínuo, descrita na Figura 1 (ii). A Figura 8 mostra que os compostos fenólicos foram significativamente reduzidos durante o processo de

remediação (realizado via oxidação avançada por ozonização). Um decréscimo de aproximadamente 90% na concentração destas espécies foi obtido após 30 minutos de tratamento.

5 O dispositivo desenvolvido para o monitoramento contínuo de compostos fenólicos mostrou-se extremamente eficiente na detecção e quantificação de diferentes compostos fenólicos e clorofenólicos em diferentes matrizes. A versatilidade deste sistema torna-o ideal para monitoramento ambiental de efluentes industriais, contribuindo para diminuir o tempo e o custo envolvidos na análise de poluentes, proporcionando uma maior eficiência no gerenciamento ambiental.

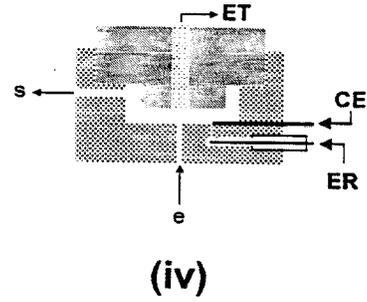
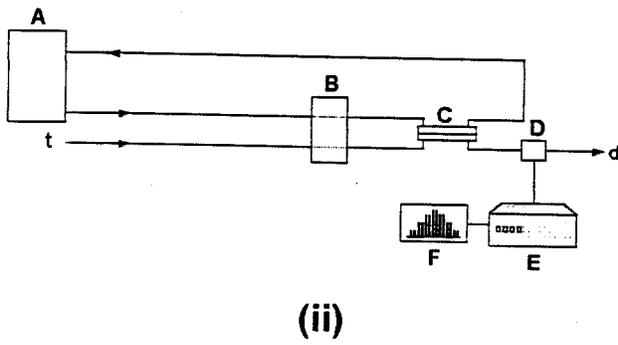
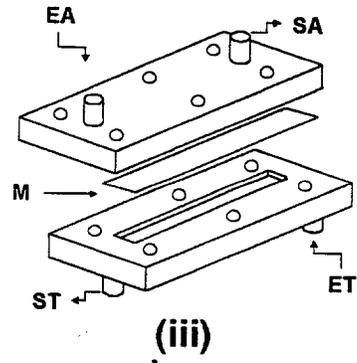
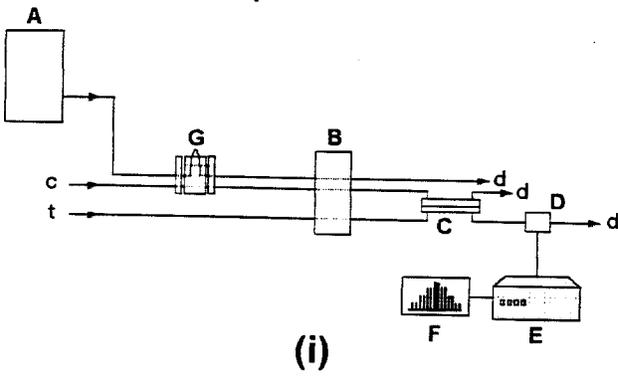


Figura 1

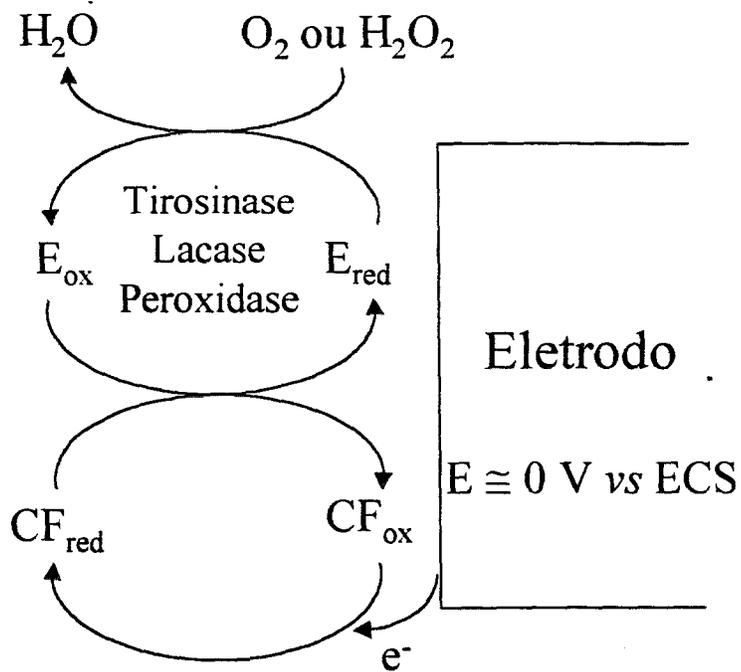


Figura 2

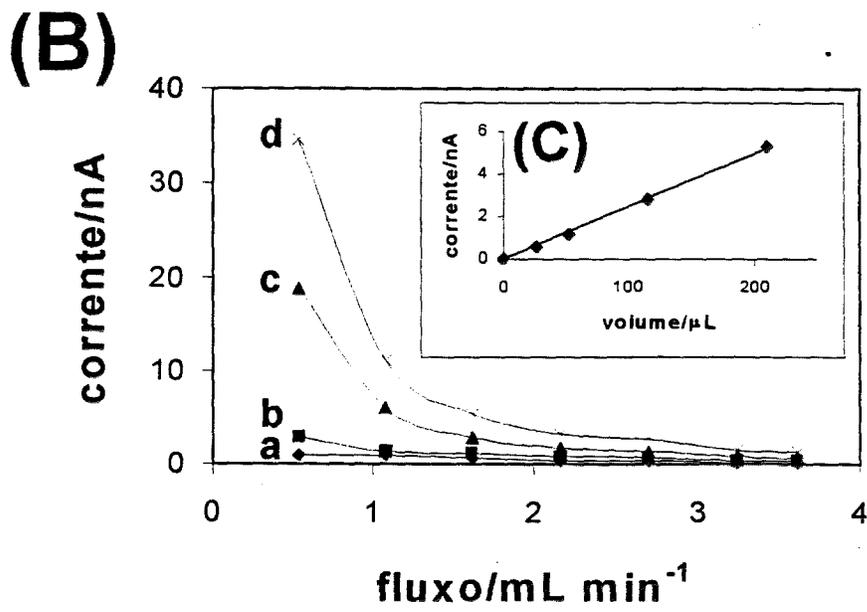
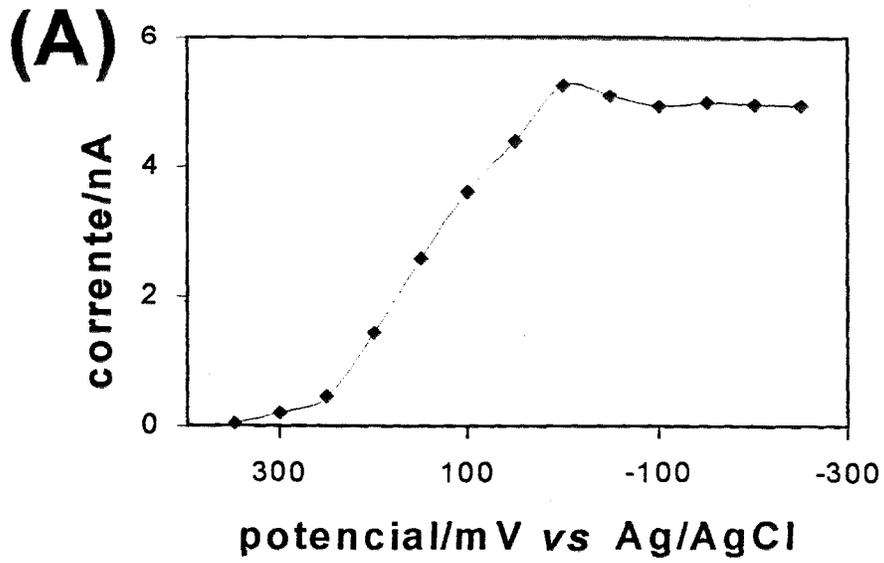


Figura 3

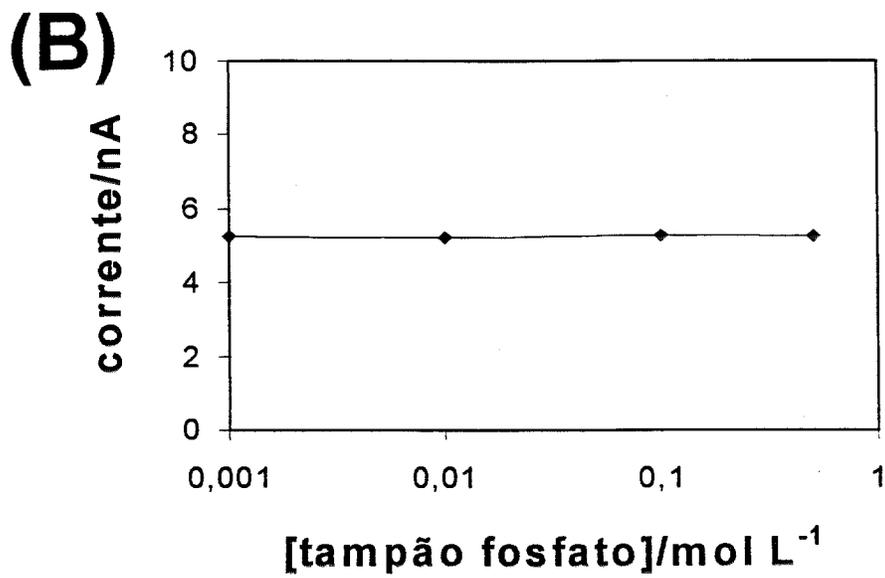
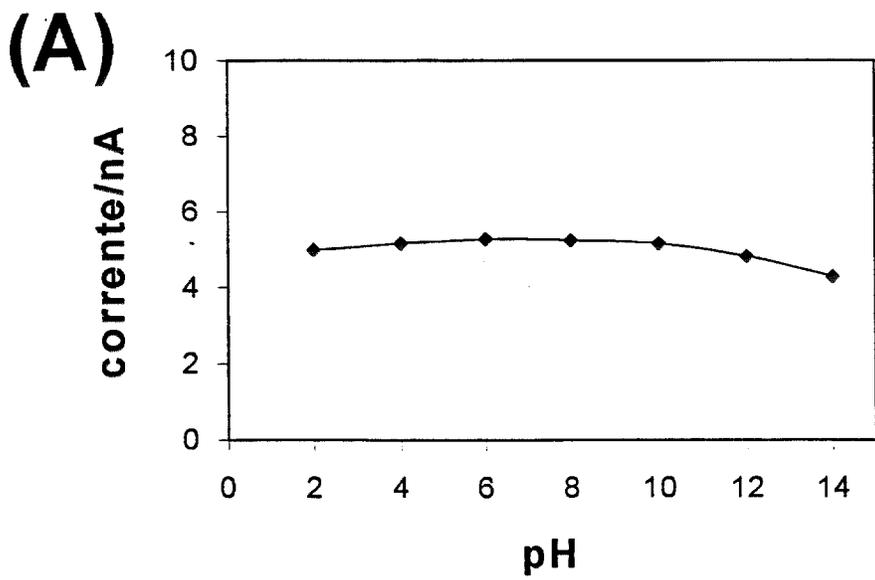
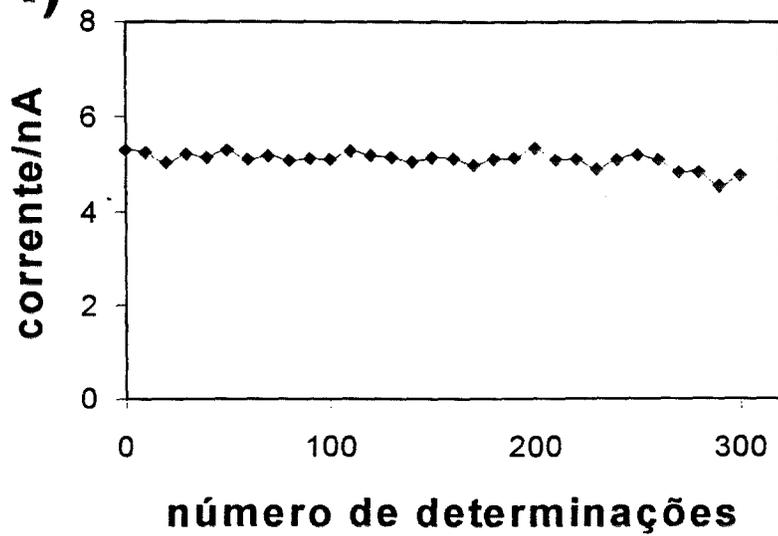


Figura 4

(A)



(B)

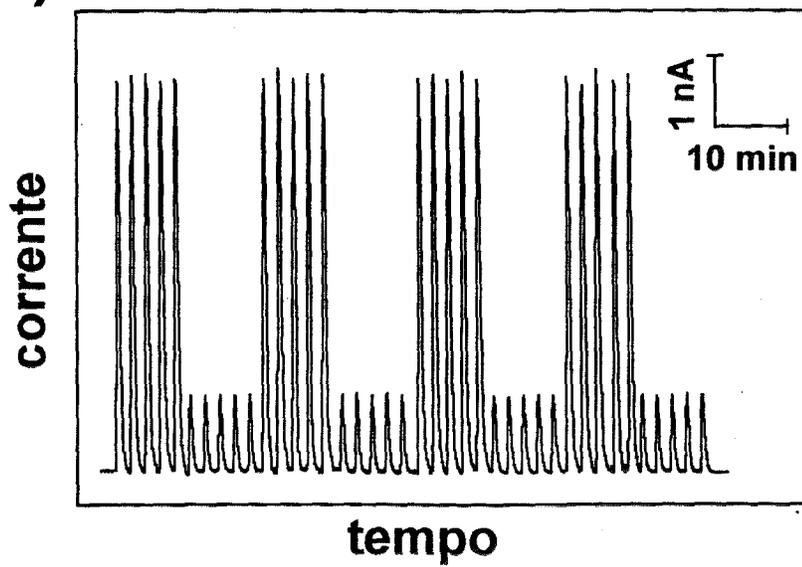


Figura 5

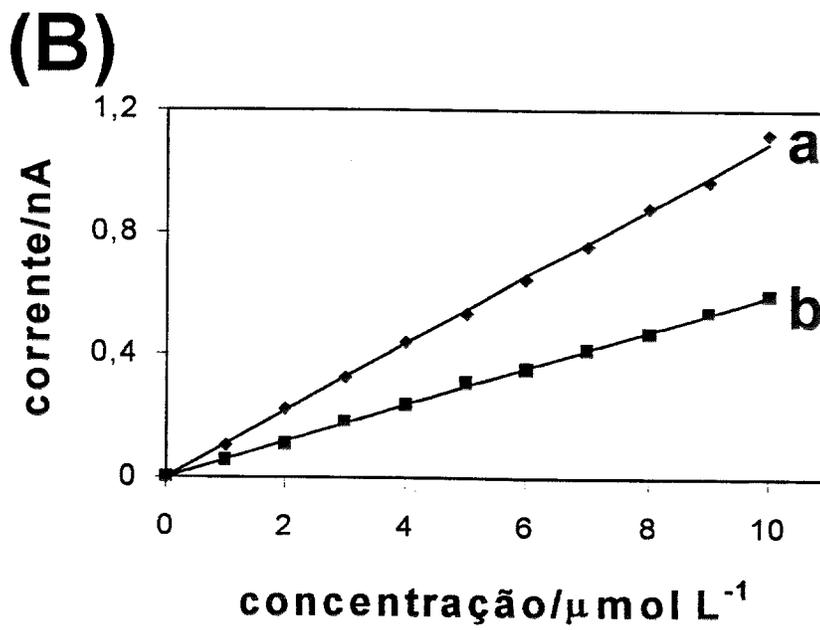
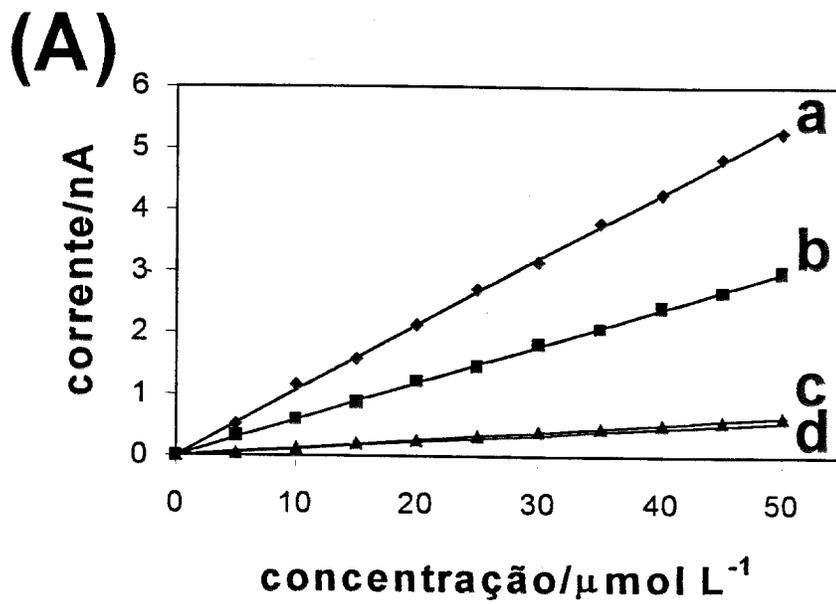


Figura 6

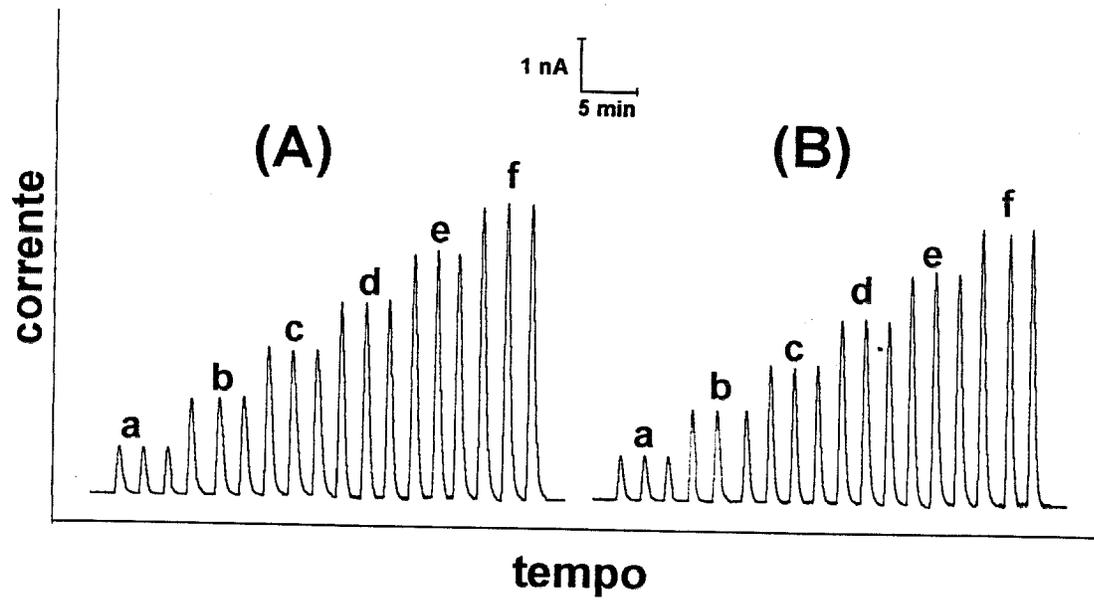


Figura 7

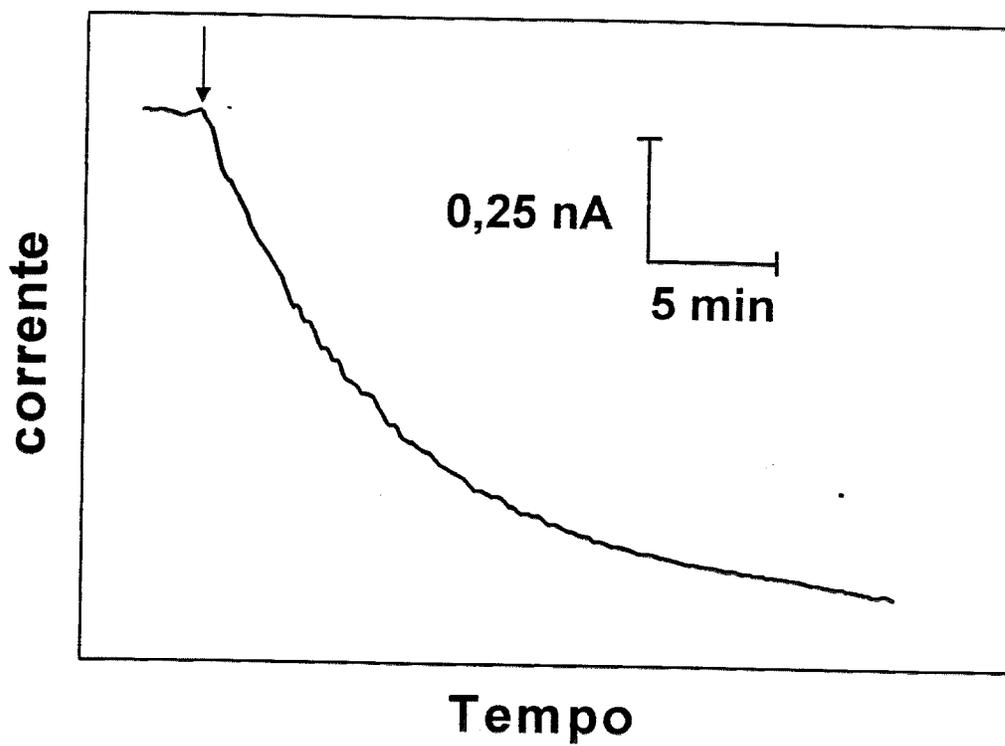


Figura 8

REIVINDICAÇÕES

1. **“NOVO DISPOSITIVO PARA MONITORAMENTO CONTÍNUO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM EFLUENTES INDUSTRIAIS”**, caracterizado por desenvolver, descrever, montar e otimizar um sistema de análise em fluxo, capaz de determinar e
5 quantificar diferentes compostos fenólicos em matrizes complexas sem nenhuma etapa prévia de tratamento ou separação.

2. **“NOVO DISPOSITIVO PARA MONITORAMENTO CONTÍNUO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM EFLUENTES INDUSTRIAIS”**, caracterizado por utilizar um sistema de diálise para a amostragem dos compostos alvos, conferindo
10 independência, versatilidade e robustez ao sistema de detecção.

3. **“NOVO DISPOSITIVO PARA MONITORAMENTO CONTÍNUO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM EFLUENTES INDUSTRIAIS”**, caracterizado por permitir o monitoramento contínuo de sítios contaminados e dos processos de tratamento destes sítios ou efluentes industriais.

5 4. **“NOVO DISPOSITIVO PARA MONITORAMENTO CONTÍNUO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM EFLUENTES INDUSTRIAIS”**, caracterizado por usar biossensores amperométricos em análises de amostras de interesse clínico, industrial e ambiental.

RESUMO

“NOVO DISPOSITIVO PARA MONITORAMENTO CONTÍNUO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM EFLUENTES INDUSTRIAIS”

Este processo descreve o desenvolvimento de um novo sistema para a
5 determinação eletroquímica de compostos fenólicos em amostras de interesse
ambiental e a aplicação deste sistema no monitoramento desta classe de compostos
em efluentes industriais. O método está baseado na utilização de um sistema de
análise em fluxo dotado de uma membrana para a diálise dos compostos alvos
(amostragem) e detecção destes compostos através de um biossensor
10 eletroquímico (a base de enzimas fenoloxidase, como a lacase). O desempenho
deste sistema foi investigado quanto a sua dependência em relação a fatores
críticos, tais como pH e força iônica da amostra, além da influência do potencial de
trabalho e da velocidade do fluxo na resposta do biossensor. O biossensor a base
de lacase mostrou boa sensibilidade para diferentes compostos fenólicos, tais como
15 fenol, clorofenol, guaiacol e cloroguaiacol. A integração, ao sistema de análise em
fluxo, de uma membrana de diálise amostradora conferiu ao detector independência
quanto às condições da amostra, além de proteger a superfície do biossensor,
eliminando uma série fatores que geralmente interferem no desempenho dos
biossensores. Estas características favoráveis permitiram que este sistema fosse
20 aplicado para medidas diretas em meios complexos sem nenhum tipo de pré-
tratamento das amostras. Esta habilidade foi explorada empregando-se este novo
dispositivo no monitoramento contínuo de compostos fenólicos durante um processo
de tratamento de efluentes industriais.