

JANAÍNA CONRADO LYRA DA FONSECA

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA TRATAMENTO DE RESÍDUOS
QUÍMICOS ORIGINADOS EM LABORATÓRIOS BIOLÓGICOS**

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

**Profa Dra Mary Rosa Rodrigues de Marchi
Orientadora**

**Profa Dra Raquel Fernandes Pupo Nogueira
Co-orientadora**

**Araraquara
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Formação Acadêmica

Engenheira Industrial Química pela Faculdade de Engenharia Química de Lorena - FAENQUIL- Lorena – SP (1997).

Mestrado em Biofísica Molecular - Depto. de Física – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP- Câmpus S. J. do Rio Preto.

Título da Dissertação - Análise Preliminar da Estrutura Cristalográfica da Hemoglobina-II do *Brycon cephalus* (2002).

Doutora em Química - Depto. de Química Analítica – Instituto de Química (IQ) – UNESP - Câmpus Araraquara.

Título da Tese: Estudos sobre o tratamento e a eliminação de resíduos químicos originados em laboratórios biológicos.

Publicações Científicas

FONSECA, J. C. L.; HONDA, R. T.; DELATORRE, P; FADEL, V.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O.; DE AZEVEDO JR., W. F. Crystallization and preliminary X-ray analysis of hemoglobin-II from the fish *Brycon cephalus*. **Acta Crystallografica Section D – Biological Crystallography**, v. 59, p. 752-754, 2003.

FONSECA, J. C. L.; RODRIGUES, G. O. B.; NOGUEIRA, R. F. P.; SANTIAGO-SILVA, M. R. R. M. Estudos sobre o tratamento e a eliminação de resíduos químicos originados em laboratórios biológicos – Brometo de Etídeo. In: I Forum das universidades públicas paulistas: ciência e tecnologia em resíduos, 2003, São Pedro (SP). **Anais de Trabalhos Completos** (CD-ROM).

Outras Atividades realizadas no período

1) Co-orientação de alunos de Iniciação Científica.

Trabalhos desenvolvidos:

a) Levantamento dos resíduos gerados pelos laboratórios didáticos e de pesquisa do Instituto de Química da UNESP de Araraquara

b) Preparo de fichas de segurança de todas as substâncias manuseadas nos referidos laboratórios.

2) Aulas de Segurança Química e Gerenciamento de Resíduos, como professora voluntária, no curso de Química Ambiental do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP de São José do Rio Preto.

Duração: 30 horas/aula.

3) Participação em mesa redonda intitulada: "Mutagênese e Antimutagênese", apresentando palestra de título: Produtos mutagênicos de uso em laboratórios de pesquisa. Ocorrida durante o VII Simpósio de Genética, realizado no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP de São José do Rio Preto.

Data: 27/11/04

Dedicatória

A Deus por me dar saúde e perseverança para trilhar esta trajetória, mas principalmente por ter me dado uma família que *sempre* fez diferença.

A minha mãe por inúmeros motivos, mas principalmente por me mostrar o valor e a importância da educação, por respeitar e incentivar minhas escolhas sempre.

A minha irmã pela amizade incondicional, por me mostrar que nós mulheres apesar de prosaicas (em teoria) fazemos da nossa história uma militância diária.

Ao meu irmão, que mesmo estando a centenas de quilômetros sempre esteve ao meu lado e que sem seu apoio (principalmente nos últimos dias) não teria sido possível concluir este trabalho.

Ao meu marido pelo apoio incansável, pelas horas de atenção dispensada, por acreditar e me incentivar sempre, por ser o amigo, companheiro e quase tão fã deste trabalho quanto eu.

A minha filha por ser a grande motivação e minha inspiração para trabalhar, principalmente quando estava *dormindo*.

Enfim a todos aqueles que alimentaram minhas primeiras curiosidades, me incentivaram a nunca desistir de entender os porquês e que de alguma forma me inspiraram a seguir este caminho e chegar até aqui.

Agradecimentos

A Deus por me dar saúde e perseverança para trilhar esta trajetória.

A minha orientadora pela confiança, pela amizade, mas principalmente por ser esta pessoa tão fácil de conviver. Sempre tão cientificamente inspiradora.

A minha co-orientadora, por me ensinar a enxergar atentamente os detalhes, por me tornar mais crítica, principalmente comigo mesma.

Enfim as duas agradeço igualmente pela formação, pelas sugestões, pela atenção e por me ajudarem a me tornar um aprendiz de cientista.

A professora Maria Lúcia Ribeiro, a quem carinhosamente chamamos Bilu, pela atenção e pelas sugestões no Exame Geral de Qualificação.

Ao Sr Wellington Ciro de Almeida Leite pela atenção e pelas sugestões no Exame Geral de Qualificação.

Ao Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodrigues do IBILCE - UNESP São José do Rio Preto pelo apoio e pelas informações.

Ao Prof. Dr. Marcio José Tiera do IBILCE - UNESP São José do Rio Preto por me ceder seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Classius de Oliveira do IBILCE - UNESP São José do Rio Preto por me conceder as amostras de resíduo.

À profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP.

Aos amigos do Grupo de Resíduos Sólidos e Contaminantes Orgânicos (GRESKO) pela acolhida, pela pronta ajuda sempre, pela convivência, pelas discussões sempre enriquecedoras, enfim por terem dividido comigo horas maravilhosas de muito aprendizado e de algumas festas.

Quero deixar registrado meu carinho muito especial a: Allynson, Andréia, Ana Paula Inocentini, Ana Paula Sacco, Carolina, Diogenes, Evaneide, Felipe, João Batista, José Antonio, Laudicéia, Mara Nilza.

Aos amigos do Laboratório de Processos Oxidativos Avançados pela amizade, pela paciência, pela atenção, por terem me dado a oportunidade de aprender um pouco mais a cada dia. A vocês também faço questão de deixar meu carinho: Alam, Ivonete, Jeane, Milady, Ricardo Villa, Silene.

Aos colegas do laboratório de mutagenicidade embora tenha sido curta a convivência, não foi menos importante: Ana Paula, Fábio e Walclécio.

Sem esquecer daqueles que já levantaram vô: Karina, Mirela, Ricardo Martini, Rodrigo, Sandro.

A Fapesp pelo auxílio financeiro.

Às funcionárias da Seção de pós-graduação e da biblioteca, sempre tão atenciosas e prestativas.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram pelo sucesso deste trabalho.

A dúvida é o começo da sabedoria.

Segus

Resumo

Substâncias perigosas são freqüentemente utilizadas em laboratórios de ensino e pesquisa das Universidades. Até pouco tempo não existia preocupação com o destino destas substâncias após o uso. Tinha-se a falsa idéia de que como a Universidade utiliza poucas quantidades, de diferentes produtos, seu efeito ao ambiente era irrelevante. Felizmente atualmente este cenário é outro e as Universidades estão implementando programas de gerenciamento e em alguns poucos casos, de tratamento de resíduos. Diferentemente de agentes biológicos, substâncias químicas não possuem um procedimento de degradação que seja eficaz às diferentes classes e é necessário o desenvolvimento de diferentes métodos para diferentes produtos. Este trabalho adaptou métodos degradativos apresentados na literatura à três substâncias, escolhidas por sua toxicidade e pelo volume gerado anualmente das mesmas: brometo de etídeo (BE), formaldeído e fenol. A degradação do BE foi monitorada por fluorescência e pela concentração de Carbono Orgânico Total (COT), como BE é mutagênico seu produto de degradação foi submetido ao teste de mutação gênica com *Salmonella thiphimurium* (teste de Ames) utilizando as linhagens TA97a, TA98 e TA100, para avaliar se havia perdido esta característica. Observou-se que embora todos os tratamentos apresentassem a mesma resposta quanto a fluorescência, o ensaio mutagênico mostrou que apenas dois procedimentos poderiam ser realmente empregados. Os demais resíduos (fenol e formaldeído) tiveram seus produtos de degradação avaliados por COT e segundo as premissas da legislação estadual para efluentes em ambos os casos os resíduos apresentaram uma boa redução da carga orgânica. A toxicidade dos produtos formados foi avaliada por testes ecotoxicológicos (*Daphna magna*) e como todo formaldeído e fenol foram oxidados essa propriedade foi efetivamente eliminada. Ainda assim os resultados obtidos mostraram que tais procedimentos são simples, podem ser aplicados por seus próprios geradores e *in situ*, bastando para isso seguir os procedimentos apresentados neste trabalho. Os protocolos de degradação baseados nos estudos efetuados serão transformados em uma cartilha que será distribuída a todas as unidades da UNESP que possuam cursos na área biológica.

Palavras-chaves: degradação, resíduo de laboratório, brometo de etídeo, fenol, formaldeído.

Abstract

Hazardous substances often have been used in university teaching and researching laboratories as well. Few years ago there was not the concern about the destiny of these substances after their application. There was the wrong concept as the university use a few quantities of different kind of products, the behavior of these products in the environment were insignificant. Fortunately, nowadays the context has changed and the universities have established management programs of waste treatment. Distinctly of biological agents, chemicals substances do not have a model is better (or pattern) of destruction efficient to so many categories or types. So it is necessary the development of different methods for different products. This present work adjusted degradative methods presented on the literature for three different substances, chosen by their toxicity and quantity yearly storage: ethidium bromide (EB); formaldehyde and phenol. The degradation of EB was observed by fluorescence and by total carbon organic concentration, as BE is mutagenic, its degradation product was submitted to mutagenicity test with *Salmonella thiphimurium* (Ames test) using TA97a, TA98 and TA100, for evaluate original characteristics. The obtained data shown that although all of treatments presented the same answer for the fluorescence, the mutagenic assay has shown that just two methods could be efficiently used. The another products (phenol and formaldehyde) have had yours degradatives products evaluated by TOC according the supposition from the state legislation for wastewater, in both cases the results data shown reduction organic. The toxicity of products in this case were evaluated by ecotoxicological tests (*Daphnia magna*), as all formaldehyde and phenol have been oxidized the toxicity was banished. Even tough the results obtained shown that methods are simple and could be applied for own creators *in situ*, just follow the methods shown in these work. The results will be joining in a book witch each UNESP biology campus will receive.

Keywords: degradation, ethidium bromide, laboratory waste, formaldehyde, phenol.

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL	18
OBJETIVOS	22
CAPÍTULO 1 - Estudo da degradação de Brometo de Etídeo empregando diversos agentes oxidantes.	23
1.1 Introdução – Brometo de etídeo	23
1.1.2 Tratamentos para brometo de etídeo	24
1.1.3 Mutagenicidade	27
1.2 Materiais e métodos	29
1.2.1 Agentes oxidantes empregados	29
1.2.2 Análises químicas	31
1.2.3 Análise toxicológica: Teste de Ames	31
1.3 Resultados e discussão	33
1.3.1 Acompanhamento da degradação ao longo do tempo por Espectrofluorimetria	33
1.3.2 Estudo do emprego de agentes químicos	34
1.3.2.1 Estudo da degradação do BE por Ácido Hipofosforoso e Nitrito de Sódio	34
1.3.2.2 Estudo da degradação do BE por Hipoclorito de Sódio	35
1.3.2.3 Estudo da degradação do BE por Permanganato de Potássio em meio ácido	36
1.3.2.4 Estudo da degradação do BE por Peróxido de Hidrogênio	37
1.3.2.5 Estudo da degradação do BE por processo Fenton	38
1.3.3 Avaliação da variação da intensidade de fluorescência do BE após tratamento	39
1.3.4 Acompanhamento do COT após o tratamento químico	40
1.3.5 Avaliação da mutagenicidade	42
1.4 Conclusões	46
Capítulo 2 Estudo da degradação do formaldeído por foto-Fenton solar	48
2.1 Introdução	48
2.2 Materiais e métodos	49
2.2.1 Amostras	50
2.2.2 Soluções empregadas	50
2.2.3 Análises químicas	52
2.3 Resultados e discussão	53
2.3.1 Estudos preliminares	54
2.3.2 Determinação das condições ótimas	55
2.3.2.1 Estudo da variação das fontes de ferro	56
2.3.2.2 Estudo da concentração de peróxido de hidrogênio	58
2.3.2.3 Estudo da variação da concentração da amostra	60

2.3.2.4 Estudo do aumento do volume tratado	64
2.3.2.5 Influência do horário sobre a eficiência do processo.	66
2.4 Avaliação do resíduo após tratamento	66
2.5 Avaliação da toxicidade do resíduo após tratamento	69
2.6 Conclusões	71
Capítulo 3 - Aplicação do método Taguchi no estudo da degradação de resíduos de fenol provenientes de laboratórios biológicos usando variações do processo Fenton	72
3.1 Introdução	72
3.2 Materiais e métodos	78
3.2.1 Planejamento de experimentos	78
3.2.1.1 Determinação dos fatores e de seus níveis	82
3.2.2 Amostragem	82
3.2.3 Execução dos experimentos	83
3.2.4 Soluções empregadas	85
3.2.5 Análises químicas	85
3.3 Resultados e discussão	85
3.3.1 Processo Fenton e suas variações	86
3.3.2 Caracterização do resíduo após tratamento	98
3.3.3 Avaliação da toxicidade do resíduo após tratamento	101
3.4 Conclusões	102
4. Considerações Finais	102
REFERENCIAS	105
APÊNDICE A - Processos Oxidativos Avançados	115
APÊNDICE B - Mutagenicidade	120
APÊNDICE c - Preparo de soluções e Procedimentos de degradação de resíduos	127

Lista de Figuras

Figura 1.1. Molécula de BE.	22
Figura 1.2. Espectro de emissão do BE utilizando-se excitação em 540 nm e emissão em 570 nm.	33
Figura 1.3. Decaimento da intensidade de fluorescência do BE por Ácido Hipofosforoso 5% e NaNO ₂ 0,5 mol L ⁻¹ ($\lambda_{exc} = 540\text{nm}$;  $\lambda_{em} = 285\text{nm}$,  $\lambda_{em} = 570\text{nm}$,  $\lambda_{em} = 662\text{nm}$).	34
Figura 1.4 Decaimento da intensidade de fluorescência do BE por Hipoclorito de Sódio 2% ($\lambda_{exc} = 540\text{ nm}$;  $\lambda_{em} = 285\text{ nm}$,  $\lambda_{em} = 570\text{nm}$,  $\lambda_{em} = 662\text{nm}$).	35
Figura 1.5 Decaimento da intensidade de fluorescência do BE por KMnO ₄ 1mol L ⁻¹ , HCl 2,5 mmol L ⁻¹ ($\lambda_{exc} = 540\text{ nm}$;  $\lambda_{em} = 285\text{nm}$,  $\lambda_{em} = 570\text{nm}$,  $\lambda_{em} = 662\text{nm}$).	36
Figura 1.6 Acompanhamento do decaimento da intensidade de fluorescência do BE por H ₂ O ₂ 5mol L ⁻¹ ($\lambda_{exc} = 540\text{nm}$;  $\lambda_{em} = 285\text{nm}$,  $\lambda_{em} = 570\text{nm}$,  $\lambda_{em} = 662\text{nm}$)	37
Figura 1.7 Acompanhamento do decaimento da intensidade de fluorescência do BE por Fenton ($\lambda_{exc} = 540\text{nm}$;  $\lambda_{em} = 285\text{nm}$,  $\lambda_{em} = 570\text{nm}$,  $\lambda_{em} = 662\text{nm}$)	38
Figura 1.8 Decaimento da concentração de COT de BE (0,5 mg mL ⁻¹) tratado por diferentes processos químicos	40
Figura 2.1. Esquema empregado na irradiação solar	50
Figura 2.2. Estudo das fontes de ferro, H ₂ O ₂ 30 mmol L ⁻¹ , Formol 20000 mg L ⁻¹	52
Figura 2.3. Avaliação da fonte de ferro, H ₂ O ₂ 1,0 mol L ⁻¹ , formol 500 mg L ⁻¹	55
Figura 2.4. Influência da concentração de peróxido de hidrogênio na remoção de COT do resíduo de formaldeído. Condições empregadas: 500 mg C L ⁻¹ de resíduo ; 0.5 mmol L ⁻¹ FeOx. () H ₂ O ₂ = 1.0 mol L ⁻¹ , () H ₂ O ₂ = 0.9 mol L ⁻¹ , () H ₂ O ₂ = 0.8 mol L ⁻¹ . (). Consumo de H ₂ O ₂ = 1.0 mol L ⁻¹	57
Figura 2.5. Estudo da variação da concentração da amostra de formaldeído, H ₂ O ₂ mol.L ⁻¹ , FeOx 0,5 mmol ¹ – Lote 1	59
Figura 2.6. Estudo da variação da concentração da amostra de formaldeído, H ₂ O ₂ 1,0 mol.L ⁻¹ , FeOx 0,5 mmol L ⁻¹ – Lote 2	60
Figura 2.7a. Estrutura esquemática de aminoácido	61
Figura 2.7b. Cinco das vinte diferentes estruturas de aminoácidos.	61
Figura 2.8. Estudo do aumento do volume de amostra tratado, formaldeído 500 mg L ⁻¹ , H ₂ O ₂ 1,0 mol.L ⁻¹ , FeOx 0,5 mmol L ⁻¹	62
Figura 2.9. Estudo da influência do horário sobre a eficiência do processo	64
Figura 3.1. Frascos descartáveis empregados nos protocolos de extração de DNA utilizando fenol.	70
FIGURA 3.2. Sistema empregado para foto-Fenton artificial.	81
Figura 3.3. Resultados obtidos na degradação de resíduo de fenol usando Fenton.	84

<p> </p> <p> </p>	
<p>Figura 3.4. Monitoramento da concentração de H₂O₂ durante a remoção de COT.</p>	85
<p>Figura 3.5. Mecanismo proposto para degradação do fenol no resíduo.</p>	86
<p>Figura 3.6. Resultados obtidos na degradação de resíduo de fenol usando foto-Fenton artificial.</p> <p> </p>	87
<p>Figura 3.7. Resultados obtidos na degradação de resíduo de fenol usando foto-Fenton solar</p>	89
<p>Figura 3.8. Experimento de confirmação. A₂ = com agitação; B₃ = 1,0 mmolL⁻¹ de Ferro; C₃ = 35 mg L⁻¹ de resíduo de Fenol; D₂ = foto-Fenton artificial; E₃ 60 mmolL⁻¹ de H₂O₂.</p>	92
<p>Figura 3.9. Adaptação feita às condições ótimas (1,0 mmol L⁻¹ de Ferro, 60 mmol L⁻¹ de H₂O₂, fot-Fenton solar e sem agitação).</p>	94
<p>Figura 3.10. Reator empregado para degradação de 4,5 litros de resíduo.</p>	95

Lista de Tabelas

Tabela 1.1. Acompanhamento da diminuição da intensidade de fluorescência e da remoção de COT para os processos os diferentes agentes de degradação.	41
Tabela 1.2. Linhagens testadas sem ativação metabólica.	42
Tabela 1.3. Linhagens testadas com ativação metabólica.	43
Tabela 2.1. Caracterização do resíduo de formaldeído segundo decreto 8468 -Lei 997 - artigo 18 da COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB.	66
Tabela 3.1. Remoção de COT obtida.	90
Tabela 3.2. Influência do efeito da razão S/R sobre a variável resposta.	91
Tabela 3.3. Influência do efeito de cada fator sobre a variável resposta.	93
Tabela 3.4. Resultados obtidos para a amostra bruta e tratada avaliada quanto aos parâmetros do decreto 8468 -Lei 997 do artigo 18 da COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB.	97

Lista de Quadros

Quadro 3.1. Matriz de Taguchi L ₁₈ .	77
Quadro 3.2. Definição dos fatores e seus níveis.	78

Lista de abreviações

BE	Brometo de Etídeo
CI	Carbono Inorgânico
COT	Carbono Orgânico Total
CT	Carbono Total
DAB	Diaminobenzidina
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
TEB	Tampão TRIS, EDTA e Ácido bórico
TRIS	Hidroximetilaminometano
POA	Processo Oxidativo Avançado

Introdução: A universidade e a geração de resíduos

Durante as últimas décadas a população mundial vem despertando para a necessidade de criar mecanismos onde os resíduos gerados pelos mais diferentes segmentos sejam tratados de maneira eficaz. Seja por cobrança dos órgãos fiscalizadores ou constatação da necessidade de manutenção do ambiente. O fato é que atualmente existem políticas que controlam o descarte de resíduos e o lançamento de poluentes nos diversos compartimentos ambientais sem serem prévia e corretamente tratados vêm diminuindo. Como existem órgãos governamentais que fiscalizam regularmente as indústrias, estas já tomam as providências necessárias para o descarte correto de seus resíduos há anos. As instituições de ensino, embora não estejam sujeitas à fiscalização, têm buscado fazer sua parte. Projetos de gerenciamento de resíduos de laboratório têm sido implementados nas grandes universidades como UNICAMP (JARDIM, 1998), UFRGS (AMARAL, 2000), UFPR (CUNHA, 2001), USP - São Carlos (ALBERGUINI, 2003) e UNESP.

Resíduos químicos de diversas procedências são gerados em laboratórios de pesquisa e ensino das diversas áreas como biológicas, farmacêuticas, veterinárias, etc, visto que muitas substâncias tóxicas são empregadas. Diferente dos agentes biológicos que podem ser destruídos por formaldeído, álcool 70%, ciclos de autoclavagem etc.,

não existe nenhuma regra geral para a degradação de agentes químicos.

Um levantamento inicial feito em um dos *campi* da Universidade Estadual Paulista (Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas – IBILCE – São José do Rio Preto) mostrou que laboratórios biológicos produzem resíduos das mais variadas classes: tóxicos, carcinogênicos, mutagênicos, teratogênicos. Estes resíduos têm, normalmente, dois destinos: são acumulados nos próprios laboratórios sem destinação adequada, expondo funcionários, docentes e alunos cotidianamente, ou são descartados sem qualquer tratamento na rede de esgoto, representando um problema de exposição e contaminação ainda maior. Além disso, o uso destas substâncias nem sempre é feito por profissionais com formação adequada para manusear e descartar tais insumos químicos.

Até pouco tempo atrás não existia nas universidades brasileiras a preocupação com o destino destas substâncias após seu uso. Como esses estabelecimentos utilizam pequenas quantidades, tinha-se a falsa idéia de que seu efeito ao ambiente era irrelevante. Outro fator agravante é que são geradas pequenas quantidades de diferentes tipos de resíduos, conseqüentemente, buscar alternativas para tratar cada um deles de maneira adequada é muito difícil, além de dispendioso.

Mas, felizmente, algumas medidas vêm sendo tomadas como a implementação de programas de gerenciamento de resíduos (JARDIM, 1998; AMARAL, et al, 2000; ALBERGUINI et al, 2003). Porém estes programas tratam muitas vezes apenas da segregação e em alguns casos da neutralização de alguns resíduos, sem aplicação de processos de degradação efetiva dos resíduos gerados.

Outro passo importante vem sendo dado: buscar alternativas de tratamento para os resíduos, em substituição à incineração ou ao simples descarte na rede de esgoto sem qualquer forma de tratamento. Entretanto, ainda são poucos os procedimentos de degradação validados que são capazes de formar produtos menos tóxicos (BAREK, 1986; LUNN e SANSONE, 1987, 1990).

Visando contribuir para a melhora deste cenário este trabalho tem como objetivo a adaptação de métodos que viabilizem a degradação e/ou o tratamento de resíduos gerados em laboratórios da área de Ciências Biológicas dos *campi* da UNESP. De acordo com a toxicidade ou volume gerado quatro substâncias foram escolhidas para este estudo: brometo de etídeo (BE), fenol, formaldeído e diaminobenzidina, porém esta última deixou de ser empregada e, portanto sua degradação não foi estudada.

Reverendo a literatura verificou-se que a degradação destes produtos pode ser feita não apenas por meios químicos convencionais,

mas utilizando processos oxidativos avançados como boa alternativa e de aceitável eficiência. Os procedimentos empregados para cada uma das substâncias foram descritos detalhadamente nos capítulos seguintes.

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho é adaptar métodos apresentados na literatura à realidade dos laboratórios biológicos dos *campi* da UNESP e recomendar sua implementação, tornando possível a degradação dos resíduos pelos próprios geradores. Foram escolhidos para este estudo resíduos de brometo de etídio, formaldeído e fenol.

Capítulo 1

Estudo da degradação de Brometo de Etídeo (BE) empregando diversos agentes oxidantes

1.1 Introdução - Brometo de Etídeo (BE)

O Brometo de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantrídio ou comumente conhecido Brometo de Etídeo (**Figura 1.1**) é um sólido vermelho, de grande potencial mutagênico e apesar de comportamento citotóxico é considerado pela literatura como possuindo toxicidade moderada (LUNN e SANSONE, 1994). Isso porque na maioria das vezes a toxicidade de uma substância química está associada aos efeitos agudos que pode causar sua DL₅₀ ou CL₅₀¹.

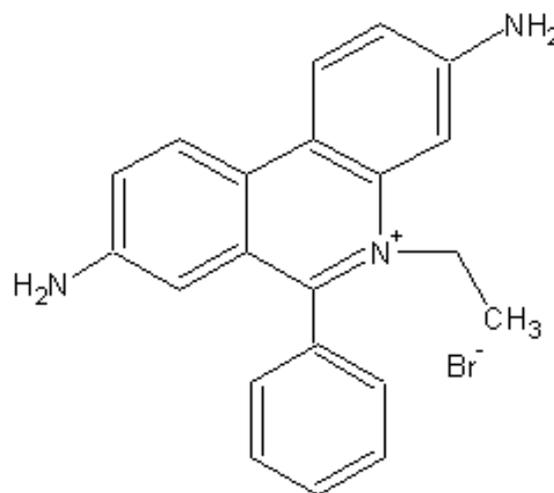


Figura 1.1. Estrutura do BE.

O brometo de etídeo é um corante muito empregado por detectar diretamente ácidos nucleicos em gel de eletroforese. Este composto é

¹[0] **DL₅₀ – Dose Letal cinqüenta** : é a dose calculada de um agente num meio que causa mortalidade em cinqüenta por cento (50%) da população animal em condições bem definidas, por qualquer via de administração, exceto por inalação.

CL₅₀ - Concentração Letal cinqüenta: é a concentração de um agente num meio que causa mortalidade em cinqüenta por cento (50%) da população exposta, durante um determinado período de tempo CROMPTOM, (1997).

largamente usado em laboratórios de biologia molecular, por ser um corante fluorescente. Porém ao se intercalar entre as bases de DNA tem essa propriedade aumentada de 20-25 vezes (SINGER et al, 1999), o que permite a visualização do Ácido Desoxirribonucleico (DNA), pois a luz absorvida é reemitida no espectro visível na região de 570 nm (LUNN e SANSONE, 1994).

Normalmente usado em solução tampão de TEB (Tris $0,09 \text{ mol L}^{-1}$, EDTA $0,002 \text{ mol L}^{-1}$, Ácido Bórico $0,09 \text{ mol L}^{-1}$), o BE pode ser usado tanto em banho para corar o gel como diretamente incorporado antes que o mesmo se solidifique. As soluções empregadas têm concentração de $0,5$ ou $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e são utilizadas até que não seja possível corar mais os géis com eficiência. Na maioria dos casos a solução é então descartada na rede de esgoto, em outros é armazenada primeiramente nos laboratórios e em seguida enviada para o entreposto de resíduos da Instituição sem ter uma destinação final adequada.

1.1.2 Tratamentos para Brometo de Etídeo

Por meio de um levantamento feito junto a algumas unidades da UNESP foi verificado que nos laboratórios, principalmente de Biologia Molecular, são gerados resíduos de BE e muitas vezes não se tem conhecimento de como destiná-los.

Algumas universidades oferecem em seus *sites* planos de gerenciamento, protocolos de degradação e de neutralização de substâncias perigosas baseados em trabalhos da literatura. A Universidade do Estado de Michigan, por exemplo, orienta o descarte de solução de brometo de etídeo na rede de esgoto desde que a concentração seja menor ou igual a 5 ppm ou mg L^{-1} . Já a Universidade de Minesota indica o protocolo de LUNN e SANSONE (1994) que emprega ácido hipofosforoso e nitrito de sódio para tratamento de soluções diluídas e para descontaminação de equipamentos, um dos procedimentos investigados neste estudo.

No Brasil existem algumas universidades que também dão orientações de como descartar soluções e gel de acrilamida contaminados com BE. No IBILCE-UNESP, por exemplo, adotam as seguintes instruções: soluções de concentração menor que 10 mg mL^{-1} é indicado o descarte na pia. Para concentrações superiores deve-se adsorver em carvão ativado (1 mg mL^{-1}) e o carvão contaminado deve ser encaminhado para o entreposto de resíduos químicos. O mesmo deve ser feito para soluções não aquosas de BE, em ambos os casos o filtrado pode ser descartado na pia. Já os géis devem ser descartados junto com o lixo biológico/hospitalar (BROMETO..., 2006a). O site da Unicamp (GEL..., 2006) apresenta destino apenas para os géis de acrilamida: a incineração. A UFRGS preconiza que só deve ser

descartado na pia soluções aquosas com concentrações iguais ou inferiores a $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ após serem exposta à luz por 3 semanas (BROMETO..., 2006b). Há ainda instituições que indicam a neutralização do BE com hipoclorito de sódio (água sanitária comercial) BROMETO..., 2006c). Contudo era preciso avaliar se as práticas de descarte eram pouco impactantes ao ambiente e se poderiam ser adotadas.

Foi feita uma pesquisa para se avaliar qual era o destino deste resíduo nos *campi* da UNESP (ambiente onde este trabalho foi desenvolvido) e verificou-se que existiam dois destinos: a solução era descartada na pia ou armazenada nos laboratórios e em seguida enviada para o entreposto. Porém em nenhum dos casos recebia destinação final adequada.

Assim este trabalho utilizou as informações existentes na literatura (LUNN e SANSONE, 1987; QUILLARDET e HOFNUNG, 1988) que empregam agentes oxidantes como ácido hipofosforoso e permanganato de potássio no tratamento do BE. Fez adaptações aos métodos como os apresentados por LUNN e SANSONE (1994) onde H_2O_2 1% e ozônio são utilizados. Além de verificar se práticas comuns aos laboratórios são realmente eficazes, como no caso da utilização de hipoclorito de sódio 2%.

Como a literatura (CASERO, 1997) mostra o emprego eficiente do reagente de Fenton (apêndice 1) na oxidação total (mineralização) ou

parcial (formação de produtos insolúveis) de algumas aminas aromáticas, este trabalho também aplicou este processo na degradação do brometo de etídeo.

O amplo emprego do BE em biologia molecular se dá justamente por apresentar caráter mutagênico, assim não bastava tratá-lo quimicamente, era preciso averiguar se o produto de degradação deixava de apresentar esta característica.

1.1.3 Mutagenicidade e o teste de Ames

Mutagenicidade é a propriedade que confere a uma substância o potencial de alterar ou mutar o DNA, mudando suas características genéticas. Embora mutação seja um processo natural que ocorre na ausência de substâncias xenobióticas, a maioria das mutações é prejudicial (RIBEIRO, 2003).

Como danos mutagênicos podem ser desencadeados por substâncias químicas, era preciso avaliar a mutagenicidade do produto formado pelos processos degradativos antes do descarte, para isso foi empregado o teste de Ames.

O teste de Ames é considerado a metodologia de triagem mais utilizada para detectar substâncias carcinogênicas genotóxicas² (UMBUZEIRO e VARGAS, 2003) e estudar a degradação de produtos

² Propriedade de romper o DNA.

químicos como pesticidas (TANAKA, 1996). Além de estar frequentemente relacionada a investigações de aminas aromáticas (WATANABE, 1989) e de ser empregada como ferramenta para estudos de poluentes ambientais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (BIONKOVÁ et al, 2003).

O teste emprega linhagens de *Salmonella typhimurium* derivadas da parental LT2, auxotróficas³ para histidina, apresentando diferentes mutações no *operon* deste aminoácido, sendo construídas para detectar mutações do tipo deslocamento no quadro de leitura ou substituição de pares de base no DNA. Estas linhagens são incapazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina a menos que ocorram mutações que restaurem a sua capacidade de síntese.

Aliado aos testes clássicos é recomendado que se faça teste de Ames utilizando a fração S9. Que consiste no teste de mutagenicidade com sistema de ativação metabólica, realizado com a fração microsomal S9 (S9 mix), preparada a partir do homogeneizado de fígado de ratos *Sprague Dawley*, previamente tratado com Arocloror 1254, adquiridos sob a forma liofilizada (MARON e AMES, 1983). Este teste deve ser realizado empregando a fração S9, pois algumas substâncias precisam ser metabolizadas para que seu caráter mutagênico seja despertado.

³ Uma linhagem auxotrófica é aquela que precisa de metabólitos complexos para sobreviver, portanto dificilmente sobrevive fora dos meios de cultura.

O resultado é expresso em número de revertentes, que é o número de colônias que crescem em meio mínimo, após exposição de uma população de células à substância a ser testada (UMBUZEIRO e VARGAS, 2003).

1.2 Materiais e métodos

1.2.1 Agentes oxidantes empregados

1) Ácido Hipofosforoso a 5% e nitrito de sódio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foram empregados para tratar BE em meio aquoso ou tamponado. A concentração inicial de BE deve ser igual ou inferior a $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ e o tempo de reação preconizado por LUNN e SANSONE (1987) é de 24 horas.

2) Permanganato de Potássio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e Ácido Clorídrico $2,5 \text{ mol L}^{-1}$. Os reagentes devem ser empregados na proporção de 1:1:1 ($\text{KMnO}_4:\text{HCl}:\text{BE}$). O tempo de reação não é bem definido. (QUILLARDET e HOFNUNG, 1988).

3) Peróxido de Hidrogênio – $5,0 \text{ mol L}^{-1}$, neste procedimento o uso do ozônio foi extinto, aplicando-se apenas o peróxido de hidrogênio, visto que este é um agente fortemente oxidante (MATTOS, 2003).

4) Hipoclorito de Sódio 2% é usado na proporção 1:1 (NaClO:BE), que de acordo com a literatura (HAZARDOUS Laboratory Chemicals Disposal Guide, 1996), degrada BE formando 2-carboxibenzofenona.

5) Reagente de Fenton (peróxido de hidrogênio e íons ferro produzindo radical hidroxila) - foram realizados experimentos empregando sulfato de ferro (II) na concentração de $1,8 \text{ mmol L}^{-1}$, peróxido de hidrogênio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ como indicado por CASERO e colaboradores (1997).

Todos os reagentes utilizados foram grau p.a. da marca *Synth*, exceto o ácido hipofosforoso que era da *Vetec Química Fina LTDA*, ambas as marcas de procedência nacional.

Como não existem informações consistentes quanto ao período de incubação das reações, foram feitos testes após 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 15 e 30 dias de degradação para todos os agentes oxidantes empregados, exceto quando reagente de Fenton foi empregado, neste caso a degradação foi monitorada após 1, 2, 3, 4 e 24 horas.

1.2.2 Análises químicas

O desempenho obtido pelos processos de degradação foi acompanhado por determinações de fluorescência, utilizando o espectro fluorímetro *Fluorescence Spectrophotometer F4500 Hitachi*, com excitação em 540 nm e emissão em 570 nm.

O acompanhamento do processo degradativo empregando processo oxidativo avançado foi feito também por um analisador de carbono TOC 5000A – Shimadzu. Para a determinação de carbono total (CT), a amostra injetada é carregada para um tubo de combustão a 680°C e passa por uma oxidação catalítica a CO₂. Para a determinação de carbono inorgânico a amostra injetada reage com o ácido fosfórico 25% (reagente para carbono inorgânico). Desta forma todo carbono inorgânico (CI) convertido a CO₂ é detectado por absorção no infravermelho não dispersivo. O COT é dado pela subtração de CT e CI.

1.2.3 Análise toxicológica: Teste de Ames

Após o término deste ciclo de experimentos os produtos de degradação formados foram submetidos a testes de mutagenicidade. Foi empregado o teste de AMES (1973) por ser o indicado na literatura básica utilizada (LUNN e SANSONE, 1987). Uma descrição detalhada deste teste pode ser vista no Apêndice B.

Para o ensaio foram utilizadas as cepas TA97a, TA98 e TA100 de *S. thyphimurium*. Os experimentos foram realizados no laboratório de microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara. Essas cepas são algumas das recomendadas pela literatura (LUNN e SANSONE, 1994). As cepas TA98 e TA100 são consideradas clássicas em estudos de triagem, mostrando eficiência na detecção de grande número de agentes mutagênicos (MARON e AMES, 1983). A TA97a responde bem em baixas concentrações como descrito por SINGER e colaboradores (1999).

As cepas são armazenadas em freezer a -80°C , em frascos para congelamento com 0,9 mL de cultura e 0,1 mL de DMSO como agente crioprotetor, para que se mantenham inalteradas todas suas características genéticas. Foi utilizado o método de pré-incubação em tampão fosfato pH 7,4 nos sistemas sem ativação metabólica.

Os resultados são expressos em revertentes/placa ou pela razão de mutagenicidade (RM), também denominada índice de mutagenicidade (IM), dada pela razão entre a média do número de revertentes na placa teste e a média do número de revertentes por placa do controle negativo. É considerado mutagênico $\text{RM} \geq 2$.

É prática comum a realização dos ensaios na presença de controles positivo e negativo para assegurar a capacidade de resposta da linhagem e a eficácia do sistema de ativação metabólica. O controle

positivo é específico para cada linhagem e são substâncias reconhecidamente mutagênicas em concentrações bem definidas. O controle negativo é o solvente utilizado para dissolver as amostras, nesse caso o tampão TEB. Mas neste trabalho era preciso avaliar se o agente oxidante por si não apresentava potencial mutagênico, então foi feito um terceiro controle, denominado branco. Este branco foi composto seguindo o mesmo princípio de composição empregado em química analítica: a exclusão do analito.

1.3 Resultados e discussão

1.3.1 Acompanhamento da degradação ao longo do tempo por Espectrofluorimetria

O BE apresenta três bandas de emissão quando é submetido à excitação em 540 nm sendo que a maior intensidade ocorre a 570 nm, como pode ser visto na **Figura 1.2**.

Para se acompanhar a eficiência da degradação apresentada pelos procedimentos aplicados por diferentes agentes de degradação foi feito um acompanhamento, durante trinta dias, nos três comprimentos de onda que apresentam picos de emissão (285, 570 e 662 nm), como descrito anteriormente. Os resultados são apresentados na seção 1.3.2.

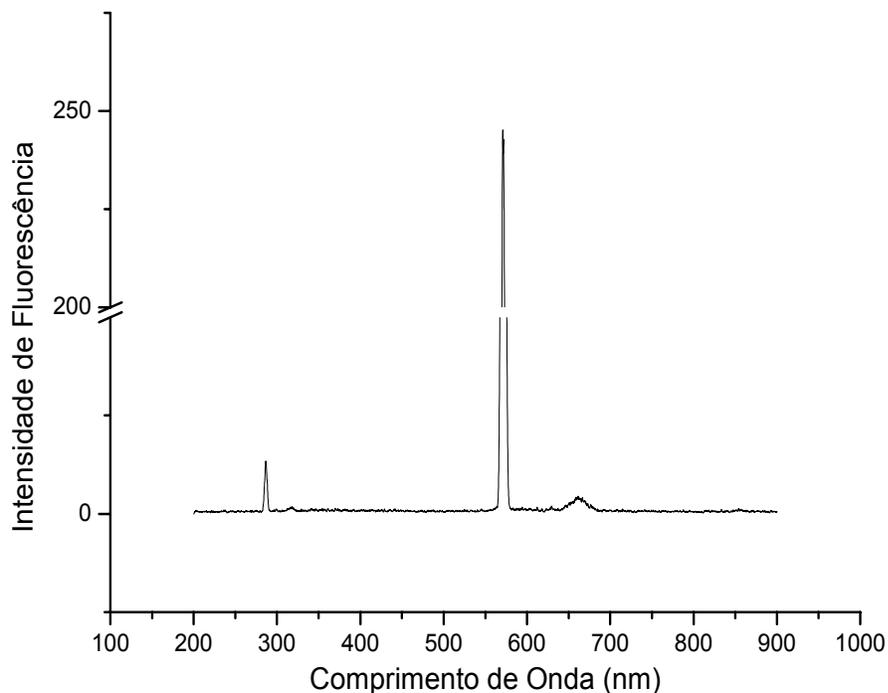


Figura 1.2 Espectro de emissão do BE utilizando-se excitação em 540 nm e emissão em 570 nm.

1.3.2 Estudo do emprego de agentes químicos

1.3.2.1 Estudo da degradação do BE por Ácido Hipofosforoso e Nitrito de Sódio

A **Figura 1.3** apresenta o acompanhamento da degradação para os 3 comprimentos de onda em estudo e pode ser observado que o pico de emissão, que o BE apresentava em 285 nm, já não pode ser observado depois de seis dias de incubação. O mesmo acontece no comprimento de onda de 662 nm, porém a partir do terceiro dia.

Já para o comprimento de 570 nm há uma sensível redução na intensidade relativa do sinal de fluorescência, de aproximadamente

88%, após sete dias de reação (**Figura 1.3**) quando atinge a estabilidade. Porém não se verifica a extinção do mesmo, indicando que o BE pode ter sido parcialmente oxidado. Este fato merece cuidado especial no estudo da toxicidade da solução resultante.

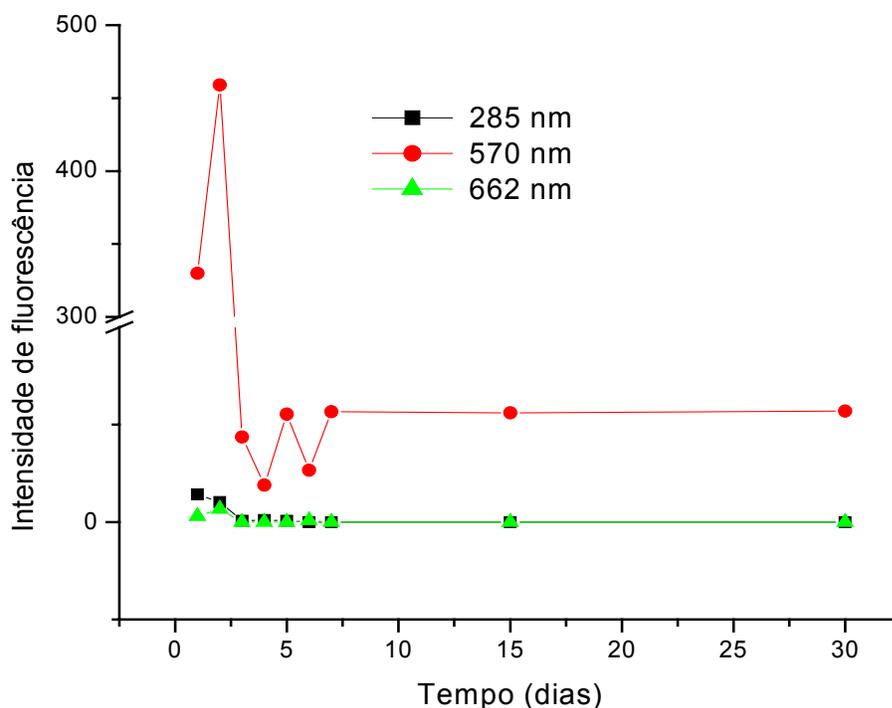


Figura 1.3 Decaimento da intensidade de fluorescência do BE por Ácido Hipofosforoso 5% e NaNO_2 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($\lambda_{\text{exc}} = 540\text{nm}$; \blacksquare $\lambda_{\text{em}} = 285\text{nm}$, \bullet $\lambda_{\text{em}} = 570\text{nm}$, \blacktriangle $\lambda_{\text{em}} = 662\text{nm}$).

1.3.2.2 Estudo da degradação do BE por Hipoclorito de Sódio (NaClO)

A **Figura 1.4** apresenta os resultados de acompanhamento dos picos de emissão em 285, 570 e 662 nm obtidos quando se emprega NaClO na degradação de BE. Nos comprimentos de onda de 285 e 662 nm a intensidade de fluorescência observada foi bastante baixa, atingindo valores próximos a zero por volta do terceiro dia de reação.

Como em 570 nm a substância apresenta seu sinal máximo não é possível extinguir o sinal e a estabilidade só é alcançada depois do sétimo dia.

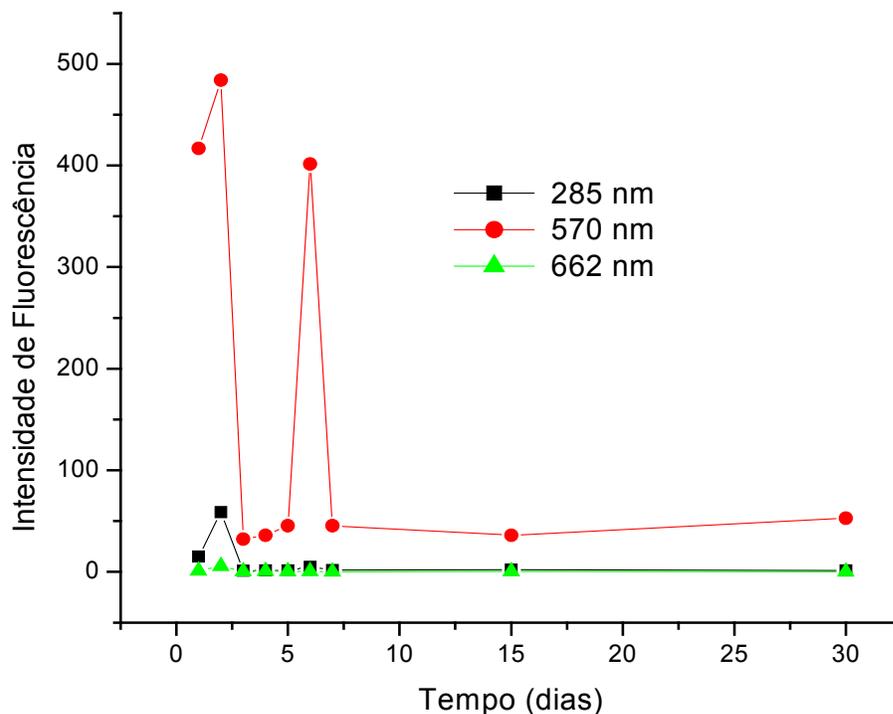


Figura 1.4 Decaimento da intensidade de fluorescência do BE por Hipoclorito de Sódio 2% ($\lambda_{exc} = 540 \text{ nm}$; \blacksquare $\lambda_{em} = 285 \text{ nm}$, \bullet $\lambda_{em} = 570 \text{ nm}$, \blacktriangle $\lambda_{em} = 662 \text{ nm}$).

1.3.2.3 Estudo da degradação do BE por Permanganato de Potássio (KMnO_4) em meio ácido

Assim como no comprimento de onda de 285, em 570 nm também a partir do terceiro dia verifica-se a estabilização do produto de degradação (**Figura 1.5**). Pode-se observar que a intensidade de fluorescência apresenta uma redução de 97% de 650 para valores próximos a 20.

Em 662 nm (**Figura 1.5**) a intensidade de fluorescência atinge valores próximos a zero já a partir do segundo dia.

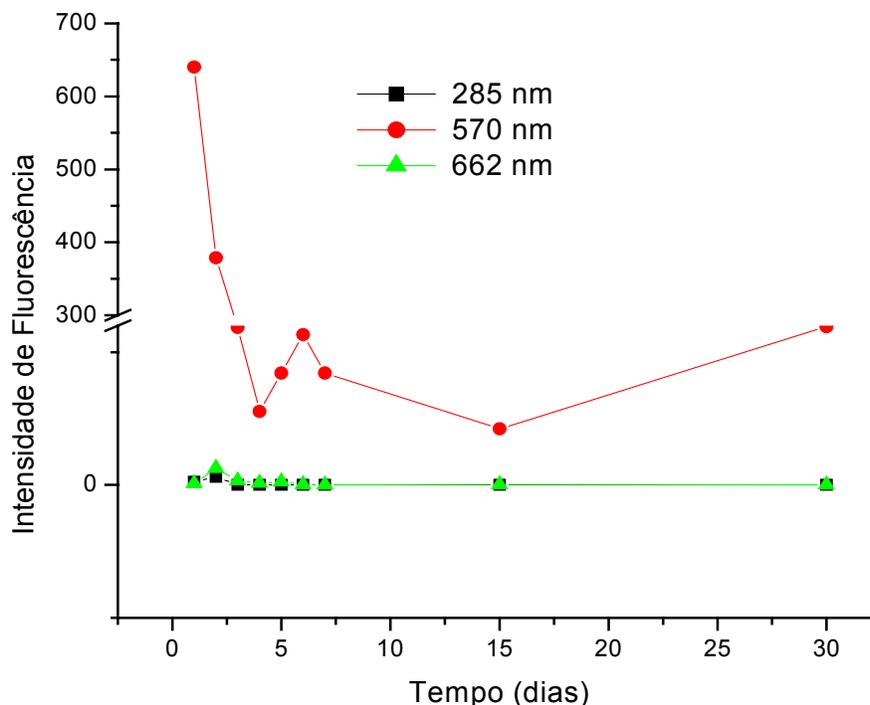


Figura 1.5 Decaimento da intensidade de fluorescência do BE por KMnO_4 1 mol L^{-1} , HCl 2,5 mmol L^{-1} ($\lambda_{\text{exc}} = 540$ nm; \blacksquare $\lambda_{\text{em}} = 285$ nm, \bullet $\lambda_{\text{em}} = 570$ nm, \blacktriangle $\lambda_{\text{em}} = 662$ nm).

1.3.2.4 Estudo da degradação do BE por Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

O gráfico do acompanhamento do BE com H_2O_2 5,0 mol L^{-1} (**Figura 1.6**), difere dos demais casos, pois não apresenta pico em 285 nm após ter sido submetido ao tratamento, indicando que o grupamento fluorescente presente neste comprimento de onda pode ter sido oxidado a outro que não apresenta tal característica. Algo semelhante pode estar ocorrendo no comprimento de onda de 662 nm, que no terceiro dia de incubação não apresenta sinal de fluorescência. Já em 570 nm há uma

queda bastante intensa a partir do terceiro dia de incubação, apresentando redução superior a 98% do sinal fluorescente, mostrando-se um bom agente oxidante para o BE. Devido a este comportamento foi aplicado o processo Fenton, como descrito no item **1.2.4**.

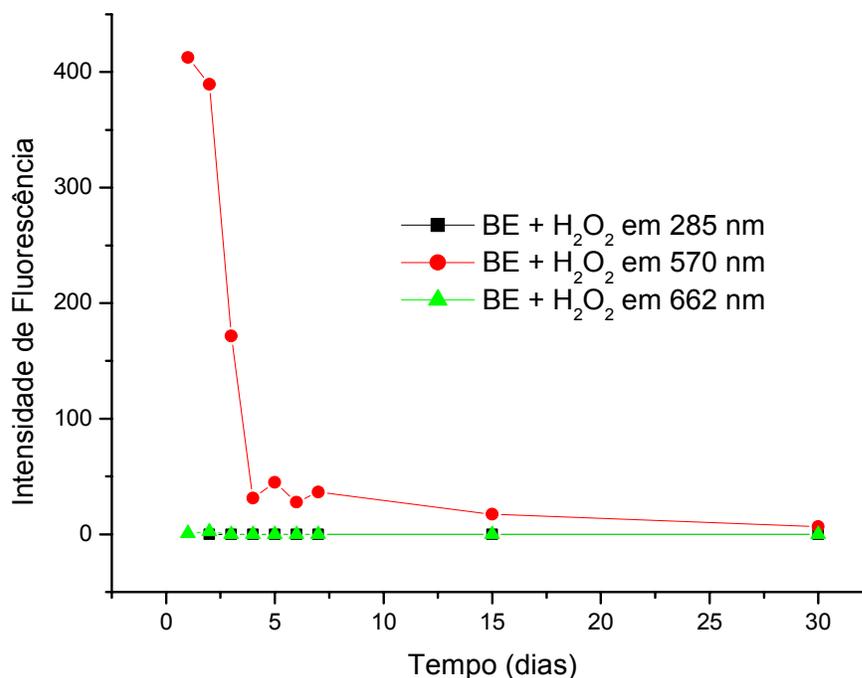


Figura 1.6 Decaimento da intensidade de fluorescência do BE por H_2O_2 5mol L⁻¹ ($\lambda_{exc} = 540nm$; \blacksquare $\lambda_{em} = 285nm$, \bullet $\lambda_{em} = 570nm$, \blacktriangle $\lambda_{em} = 662nm$).

1.3.2.5 Estudo da degradação do BE por processo Fenton

Observando a **Figura 1.7** é possível notar que na primeira hora de reação ocorre uma diminuição bem significativa da intensidade do sinal de fluorescência, de aproximadamente 90%, indicando que os grupos cromóforos podem ter sido oxidados, mesmo que parcialmente.

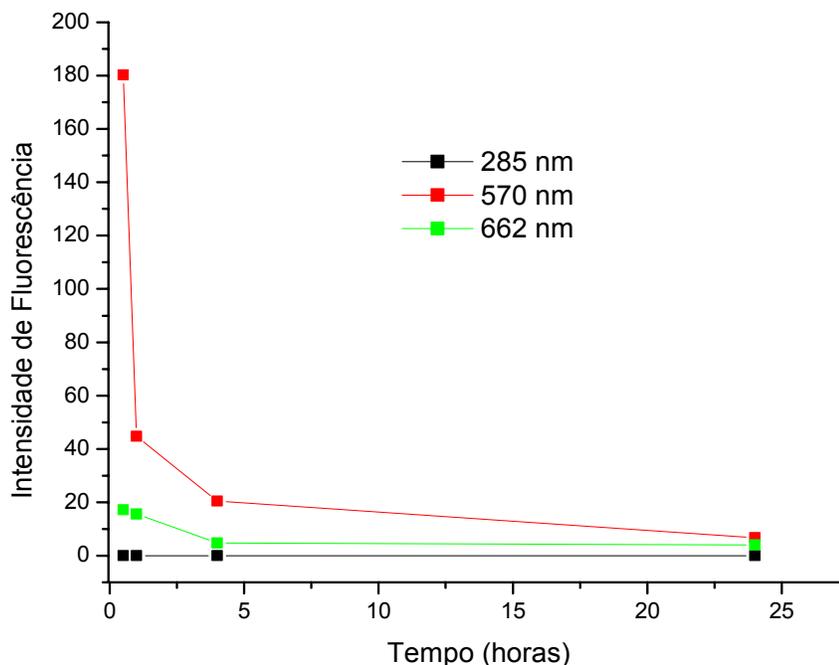


Figura 1.7 Decaimento da intensidade de fluorescência do BE por Fenton ($\lambda_{exc} = 540\text{nm}$; \blacksquare $\lambda_{em} = 285\text{nm}$, \bullet $\lambda_{em} = 570\text{nm}$, \blacktriangle $\lambda_{em} = 662\text{nm}$)

1.3.3. Avaliação da variação da intensidade de fluorescência do BE após tratamento

Ao se observar a **Figura 1.1**, pode ser visto que a molécula de BE possui vários grupos cromóforos (anéis aromáticos, grupo amina e o próprio íon brometo), e que a diminuição da intensidade de fluorescência pode ocorrer pela quebra de uma ou mais dessas estruturas devido à ação dos agentes de degradação empregados.

Pode-se inferir que o aumento da intensidade de fluorescência, após algum tempo de incubação, para alguns processos possa se dar pelo rearranjo de alguns destes grupos. Mas não existe na literatura registro indicando quais os possíveis produtos formados pelos diferentes

métodos de degradação aplicados ao BE. Para avaliar se a redução da intensidade de fluorescência era função da oxidação efetiva do composto foi feito um acompanhamento da redução de Carbono Orgânico Total (COT) da amostra, descrito na próxima seção, assim, seria possível verificar se estava ocorrendo a mineralização ou formação de produtos intermediários.

1.3.4 Acompanhamento do COT após o tratamento químico

Pela determinação de COT da amostra tratada, quimicamente, (**Figura 1.8**) foi observado que nenhum dos processos alcançou a mineralização da amostra. Os índices de remoção de COT variaram de 32 a 84%, como mostrado na **Tabela 1.1**. Embora tanto o H_2O_2 quanto o reagente de Fenton tenham reduzido mais de 90% da intensidade de fluorescência remover apenas 32 e 84% de COT, respectivamente. Estes experimentos indicam que o resíduo, embora tenha perdido a capacidade de fluorescer, como acompanhado nas seções anteriores, não foi totalmente oxidado, confirmando a formação de intermediários.

A literatura não apresenta dados de produtos intermediários formados durante a oxidação do BE. Mas, sabe-se que a oxidação de aminas aromáticas não se limita ao grupamento amino, estende-se por todo anel, devido à capacidade deste grupo funcional de doar elétrons, fazendo com que o anel fique rico deles e por isso mais sensível a oxidação. É sabido apenas que outros grupamentos ligados ao anel

aromático não conseguem ser oxidados na presença de grupo amino, pois ocorrerá primeiro a oxidação do anel e, subsequentemente, sua ruptura (SOLOMONS, 1996)

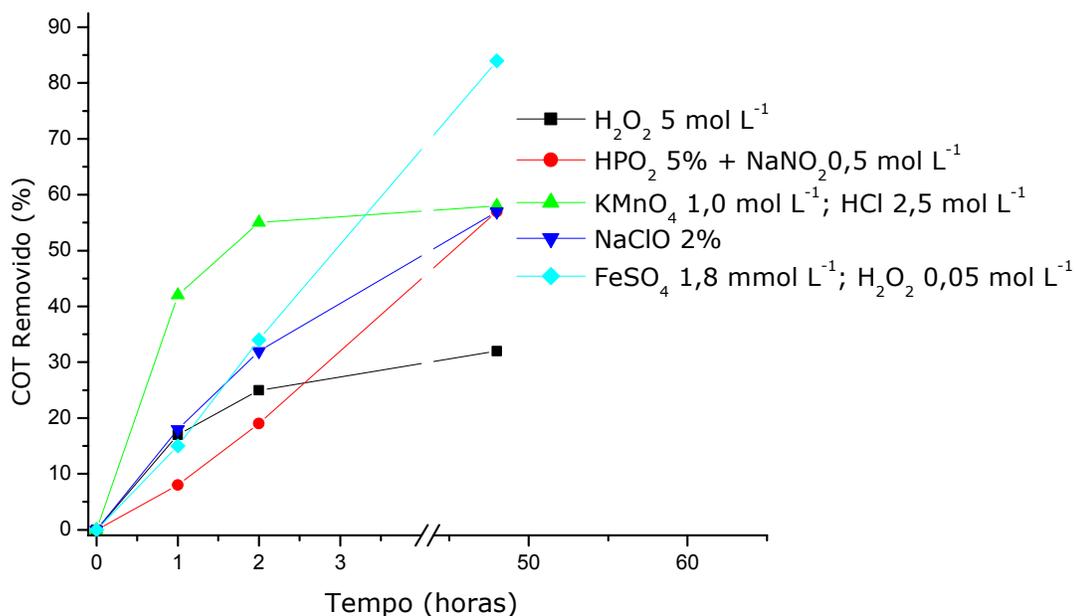


Figura 1.8 Decaimento da concentração de COT de BE (0,5 mg mL⁻¹) tratado por diferentes processos químicos.

Comparando as informações de decaimento de intensidade e redução de COT conjuntamente (**Tabela 1.1**) tampouco é possível definir qual processo deva ser empregado ou se o produto formado possui toxicidade menor ou maior que a do BE. Para essa avaliação a literatura sugere o teste de mutagenicidade Salmonella/microsossoma ou teste de Ames.

Tabela 1.1 Acompanhamento da diminuição da intensidade de fluorescência e da remoção de COT para os diferentes agentes de degradação.

Agentes Oxidantes	Redução da intensidade de fluorescência em 570nm (%)			Redução de COT (%)		
	3 dias	7 dias	30 dias	1 h	2 h	48 h
H ₂ O ₂	93	91	98	17	25	32
H ₃ PO ₂ +NaNO ₂	87	83	83	8	19	57
KMnO ₄	55	94	82	42	58	58
NaClO	93	90	88	18	32	57
Fenton	1 h	3 h	24 h	15	34	84
	75	90	96			

1.3.5 Avaliação da mutagenicidade

Foram aplicados testes de mutagenicidade ao BE e aos seus produtos de degradação em diferentes concentrações, após três dias de incubação, pois a partir deste período todos os procedimentos apresentaram estabilidade na redução da intensidade de fluorescência.

A Sociedade Brasileira de Mutagenicidade e Carcinogenicidade orienta que sempre que forem feitos testes de triagem deve ser aplicada a bateria mínima de linhagens: TA 98, TA100, TA 97a ou TA1537, e com e sem ativação metabólica e que dependendo do objetivo, do resultado dos testes e da disponibilidade da amostra, deve-se acrescentar outras linhagens. Por isso, mesmo LUNN e SANSONE (1994) já tendo afirmado que o BE só responde quando empregado em sistema ativado os testes foram realizados sem (**Tabela 1.2**) e com ativação metabólica (**Tabela 1.3**).

Tabela 1.2 Linhagens testadas sem ativação metabólica

Substâncias testadas	Linhagens testadas			
	TA98		TA100	
	Dose ($\mu\text{g/placa}$)	RM	Dose ($\mu\text{g/placa}$)	RM
BE	$6,25 \times 10^{-3}$	1,1	$6,25 \times 10^{-3}$	0,8
	$12,5 \times 10^{-3}$	1,0	$12,5 \times 10^{-3}$	0,9
	25×10^{-3}	1,0	25×10^{-3}	1,0
	50×10^{-3}	1,1	50×10^{-3}	1,0
BE+NaClO	$6,25 \times 10^{-3}$	1,0	$6,25 \times 10^{-3}$	1,0
	$12,5 \times 10^{-3}$	1,2	$12,5 \times 10^{-3}$	1,0
	25×10^{-3}	1,3	25×10^{-3}	0,9
	50×10^{-3}	1,5	50×10^{-3}	T
Branco	-	1,7	-	T
BE+KMnO ₄	$6,25 \times 10^{-3}$	0,8	$6,25 \times 10^{-3}$	0,9
	$12,5 \times 10^{-3}$	1,0	$12,5 \times 10^{-3}$	0,8
	25×10^{-3}	0,9	25×10^{-3}	0,8
	50×10^{-3}	1,5	50×10^{-3}	0,8
Branco	-	1,0	-	1,0
BE+H ₃ PO ₂ +NaNO ₂	$6,25 \times 10^{-3}$	0,8	$6,25 \times 10^{-3}$	0,9
	$12,5 \times 10^{-3}$	1,0	$12,5 \times 10^{-3}$	0,8
	25×10^{-3}	1,1	25×10^{-3}	0,7
	50×10^{-3}	1,2	50×10^{-3}	0,8
Branco	-	1,3	-	1,0
BE+H ₂ O ₂	$1,0 \times 10^{-3}$	0,8	$1,0 \times 10^{-3}$	1,0
	$2,0 \times 10^{-3}$	1,1	$2,0 \times 10^{-3}$	T
	$4,0 \times 10^{-3}$	-	$4,0 \times 10^{-3}$	T
	$6,0 \times 10^{-3}$	-	$6,0 \times 10^{-3}$	T
Branco	-	-	-	T
BE+Fenton	$6,25 \times 10^{-3}$	0,7	20×10^{-3}	0,8
	$12,5 \times 10^{-3}$	0,8	40×10^{-3}	0,7
	25×10^{-3}	0,9	80×10^{-3}	0,8
	50×10^{-3}	0,8	150×10^{-3}	1,0
Branco	-	0,8	-	0,8

T= Toxicidade às bactérias, ou seja, nas condições de ensaios as bactérias não sobreviveram.

Tabela 1.3 Linhagens testadas com ativação metabólica.

Substâncias testadas	Linhagens testadas			
	TA 97a		TA 98	
	Dose ($\mu\text{g/placa}$)	RM	Dose ($\mu\text{g/placa}$)	RM
BE	5×10^{-2}	1,4	$6,25 \times 10^{-3}$	8,5
	10×10^{-2}	1,1	$12,5 \times 10^{-3}$	11,6
	50×10^{-2}	1,8	25×10^{-3}	26,8
	100×10^{-2}	2,6	50×10^{-3}	34,7
BE+NaClO	$6,25 \times 10^{-3}$	1,4	$6,25 \times 10^{-3}$	2,7
	$12,5 \times 10^{-3}$	2,1	$12,5 \times 10^{-3}$	3,7
	25×10^{-3}	2,0	25×10^{-3}	5,5
	50×10^{-3}	2,0	50×10^{-3}	5,9
Branco	50×10^{-3}	-	-	4,9
BE+KMnO ₄	20×10^{-3}	1,1	$6,25 \times 10^{-3}$	1,4
	40×10^{-3}	1,4	$12,5 \times 10^{-3}$	1,7
	80×10^{-3}	1,8	25×10^{-3}	1,9
	100×10^{-3}	2,6	50×10^{-3}	3,0
Branco	-	2,4	-	0,9
BE+H ₃ PO ₂ +NaNO ₂	40×10^{-3}	1,0	$6,25 \times 10^{-3}$	2,1
	80×10^{-3}	0,9	$12,5 \times 10^{-3}$	1,6
	150×10^{-3}	0,7	25×10^{-3}	1,0
	300×10^{-3}	0,7	50×10^{-3}	1,3
Branco	-	0,6	-	1,2
BE+H ₂ O ₂	$1,25 \times 10^{-4}$	0,8	$1,0 \times 10^{-3}$	2,4
	$2,0 \times 10^{-4}$	1,1	$2,0 \times 10^{-3}$	1,6
	$4,0 \times 10^{-4}$	1,2	$4,0 \times 10^{-3}$	1,0
	$6,0 \times 10^{-4}$	1,1	$6,0 \times 10^{-3}$	1,3
Branco	-	1,0	-	1,2
BE+Fenton	$6,25 \times 10^{-3}$	0,9	$6,25 \times 10^{-3}$	1,4
	$12,5 \times 10^{-3}$	1,1	$12,5 \times 10^{-3}$	1,7
	25×10^{-3}	1,3	25×10^{-3}	1,2
	50×10^{-3}	1,7	50×10^{-3}	1,6
Branco	-	1,4	-	1,6

Os resultados demonstraram que quando BE é tratado com hipoclorito de sódio e com permanganato de potássio o produto da degradação permanece mutagênico para as duas linhagens empregadas com ativação metabólica (**Tabela 1.3**). Mesmo para as linhagens sem ativação o NaClO já apresentava indícios de caráter mutagênico.

O procedimento empregando NaClO é comumente utilizado em laboratórios biológicos como técnica de degradação de ampla aplicação, talvez por ser empregado na esterilização de bancadas e equipamentos. A resposta mutagênica apresentada pode ser devido à formação de compostos clorados como os trihalometanos (THM), subprodutos de processos em que cloro é empregado. Devido aos riscos que proporcionam à saúde a Agência de Proteção Ambiental (EPA) estabeleceu que 30 substâncias são nocivas à saúde e que seu nível de tolerância é zero, entre elas incluem-se os THM (MACEDO et al., 1999).

DE MÉO e colaboradores (1991) relatam que o KMnO_4 em meio H_2SO_4 também usado para degradar compostos tóxicos formam misturas mutagênicas devido à formação de manganês. O mesmo pode estar acontecendo neste caso, justificando a formação de produtos degradados com caráter mutagênico.

De acordo com os resultados obtidos apenas os procedimentos empregando ácido hipofosforoso, peróxido de hidrogênio e reagente de Fenton não formam produtos mutagênicos e, portanto poderiam ser

empregados em protocolos de degradação do BE. Porém na execução dos testes de Ames para o BE tratado com H₂O₂ foram empregadas doses muito baixas (de 0,1 a 6 ng/placa) do produto de degradação, visto que doses maiores eram tóxicas à Salmonella. Sendo assim, não foi recomendado o uso deste agente por não ser considerado seguro seu emprego na degradação do BE.

1.4 Conclusões

Diferentemente de algumas informações disponíveis sobre procedimentos de tratamento para o brometo de etídeo, que não descrevem sobre a periculosidade do produto formado (QUILLARDET, 1988), este trabalho se preocupou em avaliar esses produtos usando instrumentos químicos e biológicos. Foram verificados os dados de redução da intensidade de fluorescência e de remoção de COT, além do teste de mutagenicidade de Ames.

De posse destas informações, foi possível afirmar que dentre os procedimentos estudados os indicados para tratar brometo de etídeo são: o reagente de Fenton e ácido hipofosforoso com nitrito de sódio, já que o emprego destes agentes oxidantes não apresentou formação de produtos de degradação mutagênicos.

Sendo o brometo de etídeo muito empregado em laboratórios biológicos um tratamento eficaz, simples e barato facilita sua

aplicabilidade, visto que estes procedimentos serão aplicados pelos diversos *campi* da UNESP que fazem uso deste produto. O protocolo completo de degradação pode ser visto no apêndice C.

CAPÍTULO 2

Estudo do tratamento de resíduo contendo formaldeído por processo foto-Fenton

2.1 Introdução

Largamente produzido no mundo inteiro (12 milhões de toneladas/ano) o formaldeído tem suas aplicações industriais bastante conhecidas. Em laboratórios biológicos é um solvente bastante utilizado como antibactericida, mas, sua principal aplicação é a preservação de animais e peças anatômicas, para evitar sua decomposição.

Era classificado até 2004 pela International Agency of Research in Câncer ou Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) como *provavelmente* carcinogênico ao homem (grupo 2A) (IARC, 1995). A partir de 2004 passou a ser considerado comprovadamente carcinogênico a humanos - grupo 1A (IARC, 2004). Embora apresente comprovada toxicidade aos seres humanos, grande parte dos laboratórios de anatomia empregam-no como conservante por ser uma técnica tradicional e apresentar resultados satisfatórios (OLIVEIRA, 2004). Segundo IARC a exposição ocupacional a formaldeído resulta em danos ao tecido nasal, aumentando a preocupação sobre a atmosfera destes laboratórios (IARC, 1995).

Em hospitais e universidades o uso de formaldeído também é bastante comum, gerando centenas de litros de resíduos por ano. Os hospitais normalmente possuem programas de gerenciamento de resíduos bem estruturados enquanto as universidades têm tentado implementar programas deste tipo. Os maiores geradores são os cursos das áreas de Ciências Biológicas e de Saúde.

Encontrar a melhor forma de tratar e descartar estes resíduos tem sido a preocupação de diversos pesquisadores (ARAÑA et al., 2004, OLIVEIRA, 2004). Esse trabalho busca corroborar com estes dados aplicando processo foto-Fenton para tratar resíduos que contêm formaldeído.

Os processos oxidativos avançados (ver **apêndice A**) têm se apresentado como uma alternativa eficaz para a degradação de uma grande variedade de compostos orgânicos, entre eles formaldeído (MURPHY, 1989).

O processo empregado neste trabalho foi o foto-Fenton por ter se mostrado mais eficiente e barato quando comparado a outros processos oxidativos (UV/H₂O₂, O₃/UV e TiO₂/UV), principalmente quando se utiliza a luz solar como fonte de irradiação (SPACEK, 1995; BAUER, 1997;BAUER, 1999; BENITEZ, 2000).

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Amostras

As amostras de resíduos de formaldeído empregadas foram cedidas pelo Prof. Dr. Classius de Oliveira do Departamento de Biologia do IBILCE câmpus da UNESP de São José do Rio Preto-SP. Como estas amostras possuem níveis muito altos de carbono orgânico total (COT) aproximadamente $30.000 \text{ mg C L}^{-1}$, a amostra foi previamente diluída para níveis de concentração apresentados no trabalho de MURPHY e colaboradores (1989). Foram testados dois lotes diferentes de amostras, diluídas para concentrações que variaram de 500 a 2000 mg C L^{-1} e de 500 a 1100 mg C L^{-1} , respectivamente.

2.2.2 Soluções empregadas

1. Ferrioxalato de potássio (III) ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{C}_2\text{O}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O})$) – foi preparada solução estoque $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ dissolvendo-se $3,0704 \text{ g}$ do sal em 25 mL de água deionizada (HATCHARD e PARKER, 1956). Esta solução foi mantida em frasco plástico escuro para que fosse evitada a sua fotólise.

2. Sulfato de ferro (II) ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Carlo Erba) - foi preparada solução estoque $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ dissolvendo-se $1,7378 \text{ g}$ do sal em 25 mL de água deionizada e volume de ácido sulfúrico suficiente para que a solução final tivesse $1,8 \text{ mol L}^{-1}$ deste ácido ($2,5 \text{ mL}$) (MORITA,1972).

3. Nitrato de ferro ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$) (Mallinckrodt) - foi preparada uma solução estoque $0,25 \text{ mol L}^{-1}$. dissolvendo-se 2,525 g do sal em 25 mL de água deionizada.

4. Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) - 30% (m/V) - (Synth).

5. Solução de formaldeído utilizada em laboratórios de anatomia para preservação de amostras biológicas. Estas soluções residuais possuem altos níveis de carbono orgânico total (COT) com valores que oscilam de 20.000 a 30.000 mg C L^{-1} , portanto foram empregadas diluídas para concentrações que variaram de 500 a 2200 mg C L^{-1} e de 500 a 1100 mg C L^{-1} , para dois lotes diferentes de amostra.

6. Solução padrão de Carbono Total (CT) foi preparada na concentração de 1000 mg L^{-1} de carbono a partir de hidrogeno ftalato de potássio (Nacalai Tesque).

7. Solução padrão de Carbono Inorgânico (CI) foi preparada na concentração de 1000 mg L^{-1} a partir de uma mistura de hidrogeno carbonato de sódio e carbonato de sódio (Nacalai Tesque), de acordo com o manual de instruções do equipamento TOC 5000 A-Shimadzu.

O esquema da **Figura 2.1** ilustra o procedimento experimental empregado na fotodegradação do formaldeído por irradiação natural. O reator de vidro âmbar utilizado tem profundidade de 35 mm e diâmetro de 90 mm, comportando volume de 150 mL previamente estudado por NOGUEIRA e colaboradores (2002). O pH das amostras foi ajustado para 2,5 utilizando ácido sulfúrico. Tal pH foi considerado ótimo em trabalho apresentado por Nogueira e Guimarães (2000).

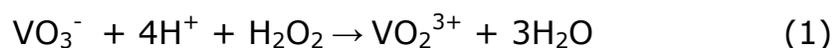


Figura 2.1 Esquema empregado na irradiação solar.

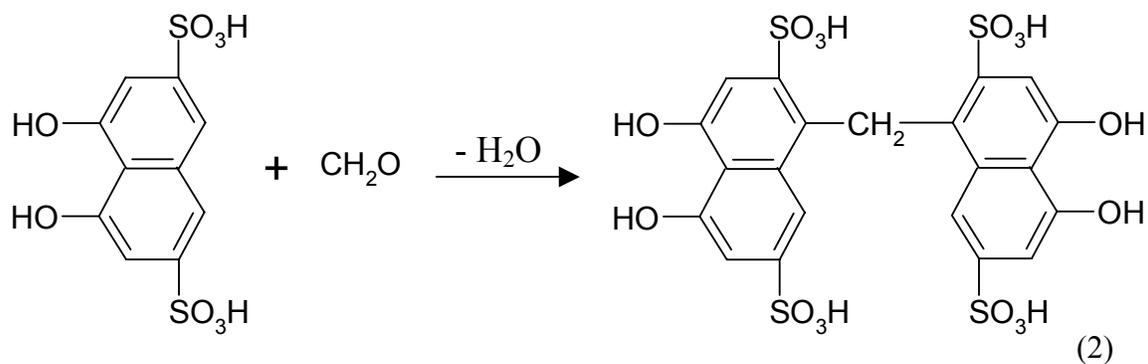
2.2.3 Análises químicas

Durante os experimentos foram coletadas amostras de 20 em 20 minutos até o término do processo, em 2 horas. Foi feito o monitoramento da concentração de COT, como descrito na seção 1.2.2, observando sua remoção.

A determinação da concentração de H_2O_2 durante o procedimento foi feita utilizando o método espectrofotométrico descrito por Nogueira e colaboradores (2005a), que se baseia na reação do peróxido de hidrogênio remanescente com metavanadato de amônio em meio ácido resultando na formação do cátion peroxovanadium que apresenta coloração vermelho-alaranjado com absorvância máxima em 450 nm.



A concentração de formaldeído foi medida colorimetricamente por método espectrofotométrico e consiste em reagir formaldeído com ácido cromotrópico e ácido sulfúrico formando o monocátion cromogen de cor lilás e que pode ser determinado em 580 nm, como visto na reação (2) (LODGE, 1989).



2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Estudos preliminares

A determinação das concentrações ótimas dos reagentes empregados foi feita baseada em estudos prévios realizados MURPHY e colaboradores (1989) e NOGUEIRA e colaboradores (2002).

Primeiramente foi feito um estudo empregando peróxido de hidrogênio 30 mmol L^{-1} , resíduo bruto de formaldeído e variando as fontes de ferro. Foi empregado nitrato férrico, sulfato ferroso e ferrioxalato de potássio (FeOx) todos na concentração de $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$. Avaliando a remoção de COT obtida para cada uma das fontes de ferro, como apresentado na **Figura 2.2**, pode-se notar: 20%, 13% e 3% para respectivamente $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, FeSO_4 e FeOx .

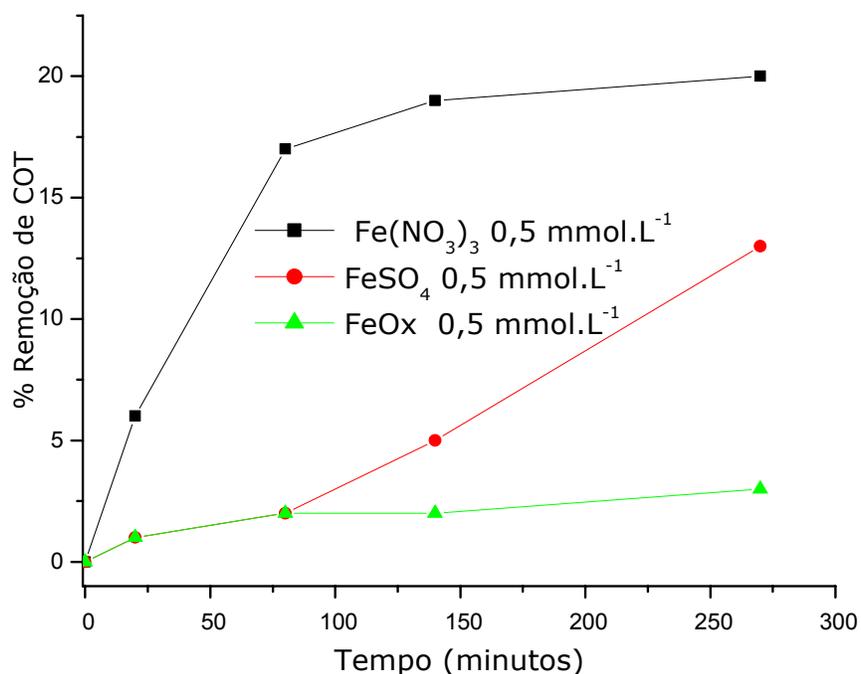


Figura 2.2 Estudo das fontes de ferro, H_2O_2 30 mmol L^{-1} , Formol $30.000 \text{ mg C L}^{-1}$

A remoção alcançada não foi significativa, pois não ultrapassou 20% mesmo depois de mais de quatro horas de irradiação. Uma possível explicação para baixa remoção de COT talvez fosse a alta concentração da amostra empregada, cerca de 30.000 mg L⁻¹ de COT, visto que MURPHY e colaboradores (1989) empregaram concentrações da ordem de 500 mg L⁻¹ de formaldeído, embora empregasse Fenton como processo oxidativo.

Então, foram feitos testes tentando reproduzir as condições descritas no trabalho citado anteriormente (razão molar de 6:1 de H₂O₂ /formaldeído) e os resultados foram bastante satisfatórios, aproximadamente 90% de remoção de COT da amostra. Pode-se concluir que para a obtenção destes níveis de remoção seria necessário diluir a amostra inicial e aumentar a concentração de peróxido empregada. Mas, ainda era preciso buscar as concentrações ótimas dos reagentes. E foram feitos os seguintes estudos: a) variação da fonte de ferro, b) variação da concentração do peróxido de hidrogênio, c) variação da concentração da amostra, d) influência da intensidade da radiação ao longo do dia, e) da agitação e de possíveis perdas por evaporação, como serão apresentadas a seguir:

2.3.2 Determinação das condições ótimas

2.3.2.1 Estudo da variação das fontes de ferro.

De acordo com o trabalho apresentado por NOGUEIRA e colaboradores (2005b), que tratou solução padrão de formaldeído usando ferro complexado, o FeOx mostrou-se mais eficiente no tratamento de formaldeído; portanto, foi testado. Como já citado, a amostra usada neste trabalho é a solução de descarte do armazenamento de peças anatômicas com concentração de COT maior que a apresentada no trabalho citado anteriormente, já que o formaldeído está contaminado por proteínas, lipídeos etc. Assim, foi necessário verificar se aplicação de ferro complexado seria mais eficiente quando comparado com nitrato férrico, visto que o nitrato tinha apresentado os melhores resultados no experimento preliminar. Os resultados são apresentados a seguir (**Figura 2.3**).

A concentração empregada foi de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ para ambas as fontes de ferro, foi utilizado H_2O_2 a $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e a concentração da amostra foi de 500 mg L^{-1} de COT.

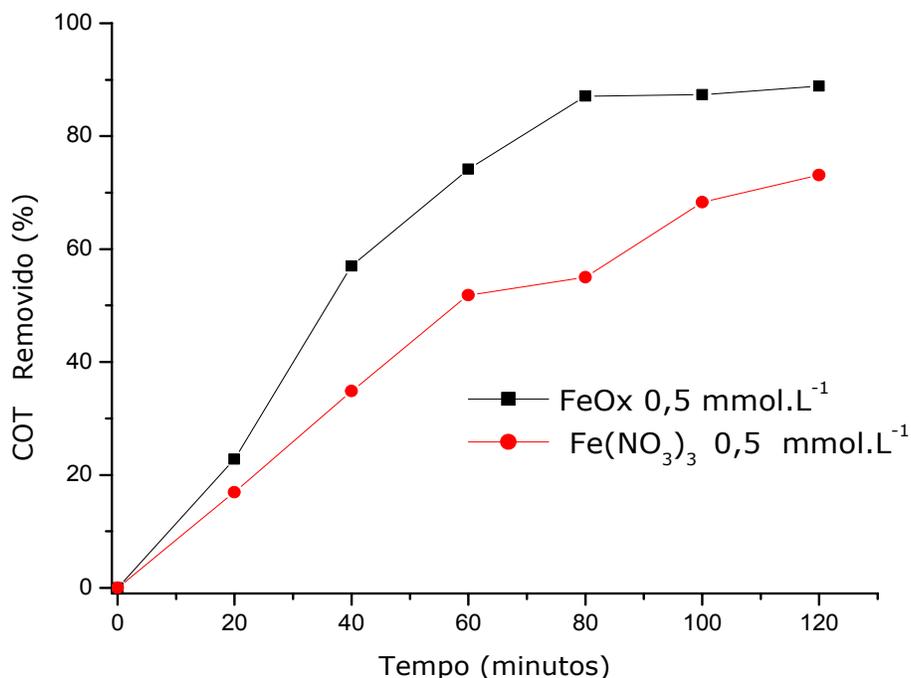
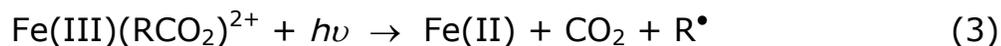


Figura 2.3 Avaliação da fonte de ferro, H₂O₂ 1,0 mol L⁻¹, formol 500 mg C L⁻¹

O aumento da degradação de contaminantes por FeOx já havia sido relatado na literatura quando se compara ferro complexado com ferro livre em processo foto-Fenton irradiado naturalmente (ZEPP et al., 1992; SAFARZADEH-AMIRI et al., 1996; NOGUEIRA et al., 2005b). Embora existam compostos como clorofenóis e fenóis, que são mais eficientemente oxidados por Fe(NO₃)₃ que por FeOx (NOGUEIRA et al., 2005b).

A literatura relaciona a maior eficiência do ferrioxalato com sua capacidade de capturar a energia solar já que absorve entre 250-500 nm, além da fotogeração dos íons ferrosos alcançarem rendimento quântico maior que 1 (equação 3) (SAFARZADEH-AMIRI et al. 1996).



Embora o uso de ferrioxalato ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) aumente a concentração de COT em 36 mg C L^{-1} , este acréscimo é muito pequeno quando comparado à concentração inicial da amostra, 500 mg C L^{-1} , além de resultados mais eficientes serem obtidos quando FeOX é empregado. Com 80 minutos de irradiação cerca de 87% de COT já haviam sido removidos da amostra, enquanto que no mesmo tempo o sistema que empregava nitrato tinha sido capaz de remover apenas 50%. E mesmo após duas horas de exposição à irradiação, apenas 70% de COT tinham sido removidos do reator empregando nitrato de ferro, enquanto que para o FeOX a remoção havia sido de superior a 90%.

A maior eficiência do ferrioxalato em relação ao nitrato de ferro pode ser realçada pelo aumento de radicais hidroxila formados pela foto-geração de Fe^{2+} estabelecendo um ciclo para o ferro (reações 1 e 2). Além disso o radical hidroxila pode reagir com o radical orgânico R^\bullet e promover a degradação de outros contaminantes presentes na amostra (SAFARZADEH-AMIRI et al, 1997).

2.3.2.2 Estudo da concentração de peróxido de hidrogênio

Este estudo tem como objetivo reduzir o consumo de peróxido de hidrogênio e minimizar os custos do processo degradativo.

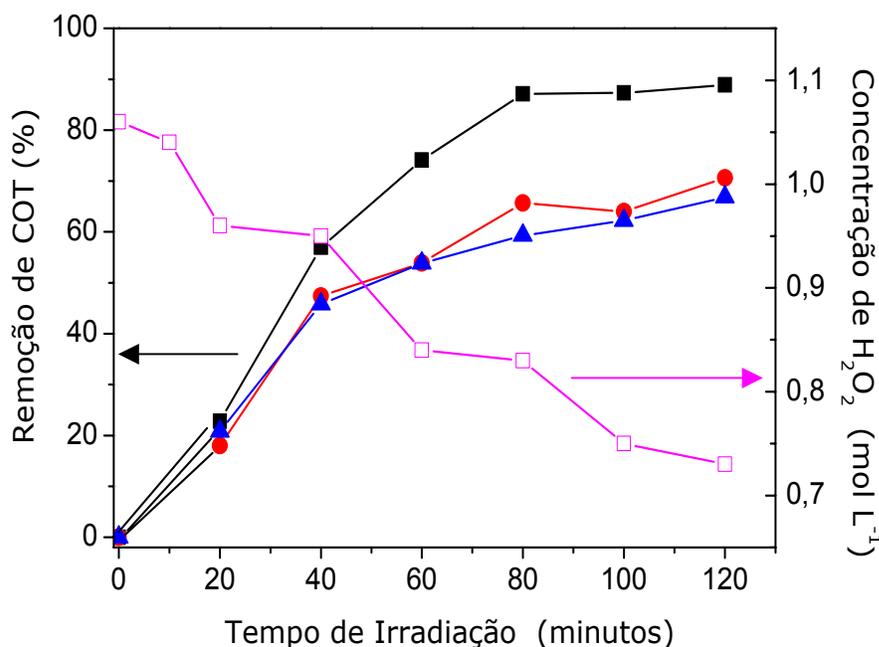
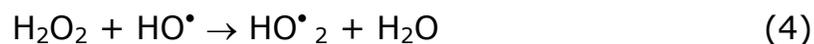


Figura 2.4 Influência da concentração de peróxido de hidrogênio na remoção de COT do resíduo de formaldeído. Condições empregadas: 500 mg C L^{-1} de resíduo ; 0.5 mmol L^{-1} FeOx. (—■—) $H_2O_2 = 1.0 \text{ mol L}^{-1}$, (—●—) $H_2O_2 = 0.9 \text{ mol L}^{-1}$, (—▲—) $H_2O_2 = 0.8 \text{ mol L}^{-1}$. (—□—). Consumo de $H_2O_2 = 1.0 \text{ mol L}^{-1}$

A concentração ideal de peróxido é um parâmetro muito importante a ser avaliado. Como a amostra possui uma grande quantidade de matéria orgânica é necessária uma concentração de peróxido relativamente alta (1.0 mol L^{-1}) para promover a remoção dos contaminantes presentes. Para avaliar se esta concentração poderia ser reduzida e conseqüentemente reduzir o custo do processo foram feitos experimentos empregando concentrações de $0,8$ e $0,9 \text{ mol L}^{-1}$. Embora tivesse peróxido até o fim da reação em todas as concentrações avaliadas, a remoção de COT foi de 67 e 71% para $0,8$ e $0,9 \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente, sendo então mantida a

concentração de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ que é capaz de remover cerca de 90% (**Figura 2.4**).

Outra razão para se avaliar a concentração de peróxido é que a razão entre as concentrações de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}$ é de 2000. Altas concentrações de peróxido podem reduzir o rendimento da reação pelo seqüestro dos radicais hidroxila gerados no meio, aumentando a formação de um radical menos oxidante o HO^*_2 (equação 4) observado por TORRADES (2003).



Nestas condições ($0,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ FeOX}$, $1,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ e 500 mg L^{-1} de COT), a concentração de formaldeído foi reduzida de $0,11 \text{ mol L}^{-1}$ até abaixo do limite de detecção apresentado por Lodge (1989) que é de $0,0033 \text{ mmol L}^{-1}$.

Considerando que a alta toxicidade do resíduo se deva principalmente à presença de formaldeído, o método proposto representa uma significativa redução desta propriedade, mesmo não tendo sido possível atingir a mineralização total. Informações sobre a toxicidade serão discutidas na seção 2.6.

2.3.2.3 Estudo da variação da concentração da amostra

Os experimentos foram realizados mantendo as condições definidas anteriormente: FeOX $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e H_2O_2 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, variando

apenas a diluição do resíduo de formaldeído de 500 a 2200 mg L⁻¹ de COT no primeiro lote e de 500 a 1100 mg L⁻¹ de COT no segundo lote. No primeiro lote o processo se mostrou eficiente para concentrações de até 2200 mg L⁻¹ de COT, já no segundo lote isso não se repetiu como pode ser visto mais detalhadamente a seguir.

Na **Figura 2.5**, a eficiência atingida é de aproximadamente 90% de remoção de COT após 120 minutos em todas as diluições, enquanto que os resultados apresentados na **Figura 2.6**, mostraram variação de 80 a 10% de mineralização da matéria orgânica da solução, para as soluções de concentração entre 500 a 1100 mg L⁻¹, respectivamente.

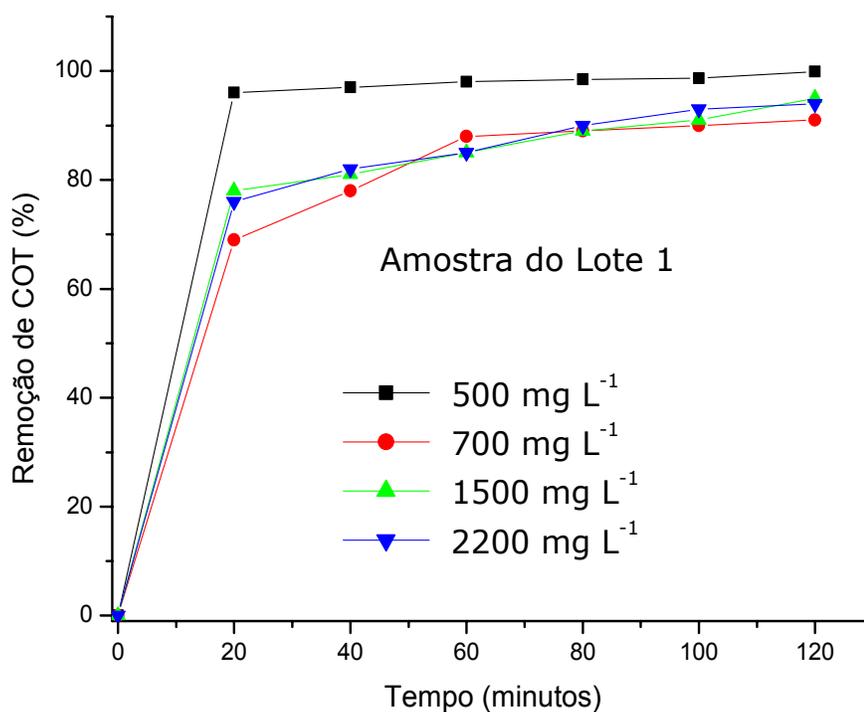


Figura 2.5 Estudo da variação da concentração da amostra de formaldeído, H₂O₂ mol L⁻¹, FeOx 0,5 mmol L⁻¹

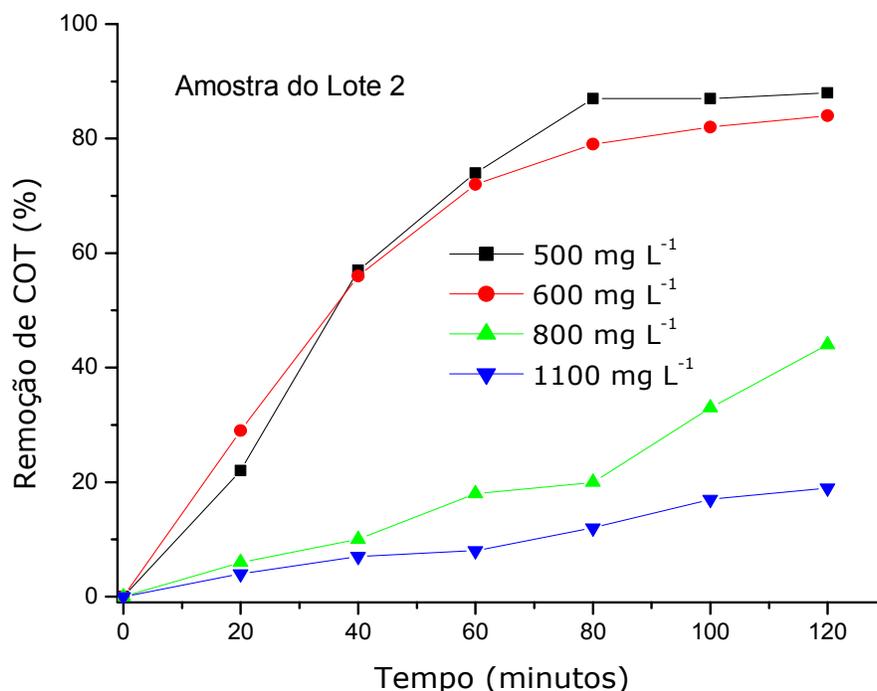


Figura 2.6 Estudo da variação da concentração da amostra de formaldeído, H_2O_2 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, FeOx $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$

Duas hipóteses poderiam estar envolvidas na diferença de remoção de matéria orgânica obtida: a primeira era a concentração de peróxido utilizada ser inferior a necessária. Foi constatado (**Figura 2.4**) que mesmo após 120 minutos de reação ainda havia cerca de 50% do H_2O_2 inicial, ou seja, a concentração foi mantida em excesso durante todo o processo eliminando esta hipótese.

Outra justificativa que explicaria a diferença de remoção entre os lotes de amostras é que as proteínas das peças sejam extraídas pela solução de formaldeído durante o período de armazenamento (até dois anos) dificultando o processo degradativo. Proteínas são formadas por aminoácidos, que por sua vez são constituídos por um grupo amino, um

grupo carboxílico e por um substituinte R como mostrado na **Figura 2.7a** (Lehninger et al., 1995). É a complexidade destes substituintes, em destaque na **Figura 2.7b** que pode ocasionar dificuldade na degradação dos resíduos de formol. Tais substâncias podem ser refratárias à oxidação nas condições empregadas neste procedimento, permanecendo na solução e chegando a precipitar devido ao aumento da força iônica. Portanto para garantir eficiência na remoção de COT, a solução foi diluída e as concentrações máximas utilizadas foram de 500 mg L^{-1} .

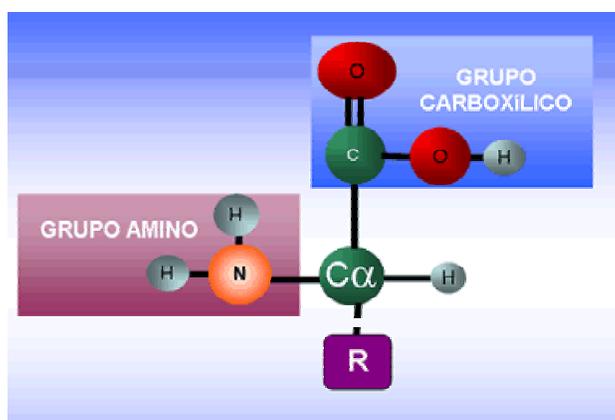


Figura 2.7a Estrutura esquemática de aminoácido.

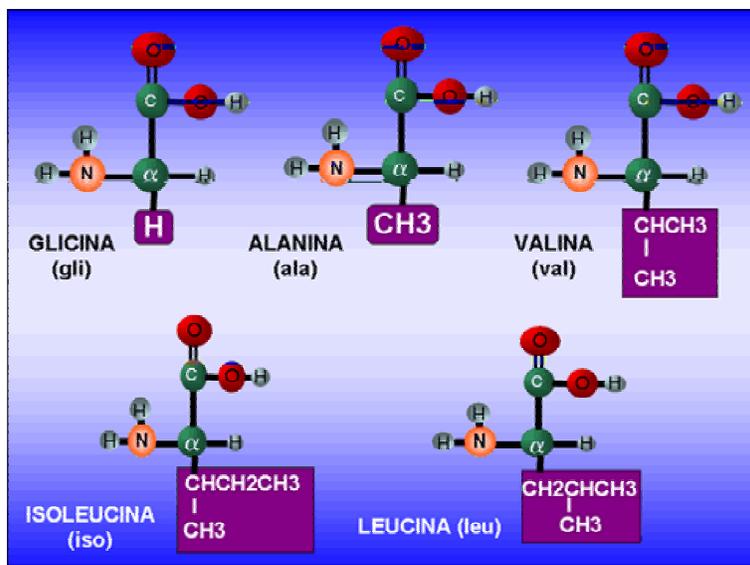


Figura 2.7b Cinco das vinte diferentes estruturas de aminoácidos.

2.3.2.4 Estudo do aumento do volume tratado

Aumentando o volume tratado por batelada diminuiria o número de bateladas e, conseqüentemente, o tempo gasto com o processo de tratamento. Assim foram feitos experimentos empregando reatores com as seguintes dimensões: capacidade de 200, 500 e 600 mL, diâmetro de 90, 130 e 150 mm e altura de 50 mm para todos os casos. Para se atingir os mesmo índices de remoção (90%), o tempo de exposição precisou ser aumentado de duas para três horas, como pode ser visto na **Figura 2.8**. Tais informações foram muito importantes para elaboração do procedimento de degradação do resíduo de formaldeído, pois poderiam reduzir o tempo gasto com a degradação diminuindo o número de bateladas a serem efetuadas.

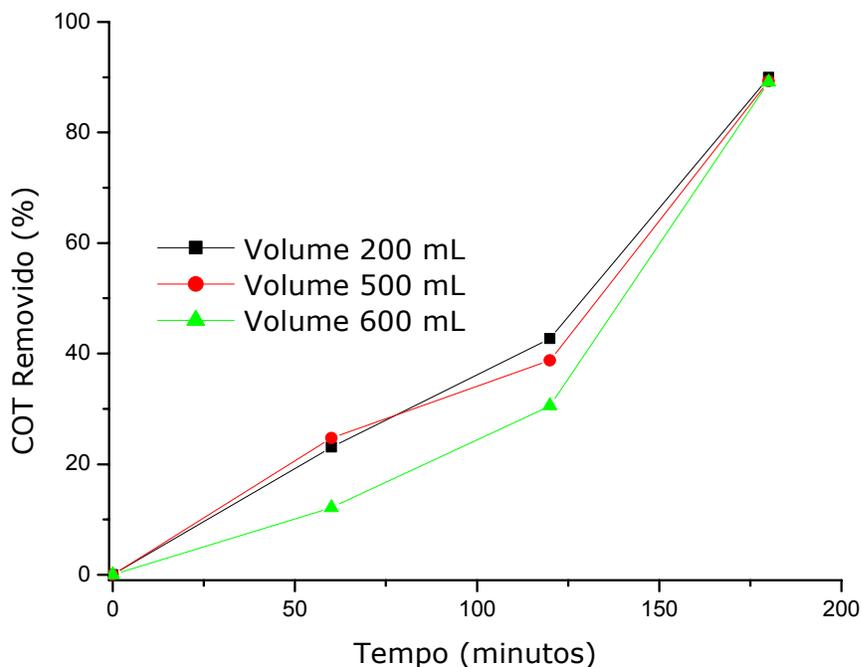


Figura 2.8 Estudo do aumento do volume de amostra tratado, formaldeído 500 mg C L^{-1} , H_2O_2 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, FeOx $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$

Como o aumento do volume a ser tratado implica num aumento da água necessária para a diluição, foram feitos testes empregando a solução de formaldeído tratada para este fim, e a remoção mostrou-se eficiente, alcançando níveis superiores a 90% em duas horas de exposição à irradiação, indicando que sua utilização pode ser uma maneira de reduzir o impacto que a diluição causaria. Além disso, essa diluição também pode ser feita com água de chuva, visto que a carga orgânica ser de algumas dezenas de mg C L^{-1} .

2.3.2.5 Influência do horário do dia sobre a eficiência do processo.

Como o objetivo deste trabalho é tornar o tratamento factível pelos próprios geradores do resíduo, foi feito um estudo do melhor período do dia para que o processo fosse aplicado. Os experimentos foram realizados num mesmo dia (23/09/03) em três horários diferentes 8h30, 11h30 e 13h50, todos com duração de duas horas.

Foram empregadas as condições determinadas como ótimas 0,5 mmol.L⁻¹ FeOx, 1,0 mol L⁻¹ de H₂O₂ e 500 mg C L⁻¹ de formaldeído.

Pela **Figura 2.9** pode-se observar que o período do dia não influencia na remoção de COT, desde que o tempo de duração do processo seja alterado. Além da exposição de duas horas à irradiação, a solução foi deixada em repouso por 24 horas. A inclusão desta etapa mostrou-se importante, pois aumenta o rendimento da remoção de COT em até 10%, garantindo que será sempre alcançada uma remoção superior a 90%. Sendo assim esta prática será mantida. Portanto no protocolo também será adotado o tempo de repouso.

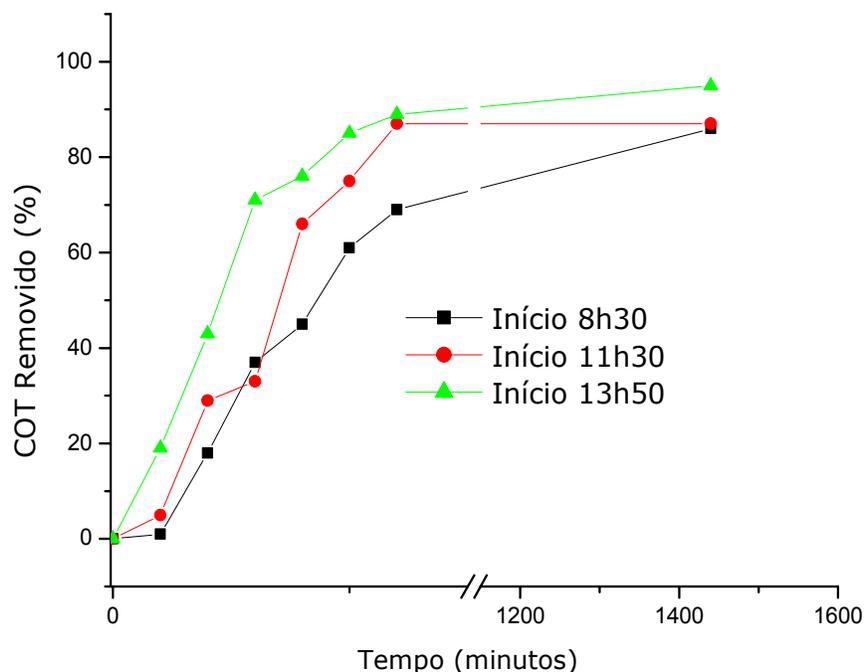


Figura 2.9 Estudo da influencia do horário sobre a eficiência do processo.

2.4 Avaliação do resíduo após tratamento

Embora o resíduo em questão tenha uma carga orgânica alta sua toxicidade efetiva é dada pela presença de formaldeído. Portanto, era preciso avaliar a presença de formol na amostra após o tratamento e assim verificar se a toxidez havia sido eliminada. Foi feita a determinação da eficiência da fotodegradação do formaldeído avaliando-se a concentração de formaldeído antes e depois de duas horas de processo. Como já mencionado na seção 2.3.2.2, a concentração de formaldeído diminuiu de $0,11 \text{ mol L}^{-1}$ para valores abaixo do limite de detecção do método ($0,0033 \text{ mol L}^{-1}$), garantindo que todo o formaldeído quantificável da amostra foi degradado.

Ainda que não haja legislação ou normas sobre o descarte de resíduos gerados especificamente nas universidades na avaliação da eficiência do processo de degradação este trabalho se baseou na legislação ambiental empregada no estado de São Paulo, que preconiza que um processo é considerado eficiente se a DBO for $\leq 60 \text{ mg L}^{-1}$ ou apresentar uma eficiência de 80% de redução desta variável. Para avaliar esta questão, as amostras foram enviadas para caracterização segundo o DECRETO N. 8.468, DE 8 DE SETEMBRO DE 1976 do artigo 18 da COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB), realizado pelo laboratório *AMPRO Laboratório e Engenharia S/C Ltda* (**Tabela 2.1**).

Os resultados apresentados na Tabela 2.1 indicam uma redução da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) de 98,2%, viabilizando a aplicação do processo para degradação de resíduo de formaldeído. Outra questão a ser comentada é que a concentração de ferro determinada na amostra tratada foi de apenas $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, embora tenha sido usado $2,5 \text{ mg L}^{-1}$. Esta variação se deve à precipitação de ferro devido a uma pequena elevação no pH da solução passando de 2,5 para 3,9.

Tabela 2.1 Caracterização do resíduo de formaldeído segundo decreto 8468 – Lei 997 - artigo 18 da COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB.

PARÂMETROS	DECRETO 8468 – LEI 997 ARTIGO 18	Resíduo bruto de formol (mg/L)	Resíduo tratado de formol (mg/L)
Arsênio	Máx. – 0,2 mg/L	<0,001*	<0,001*
Bário	Máx. – 5,0 mg/L	<0,1*	<0,1*
Boro	Máx. – 5,0 mg/L	1,3	1,5
Cádmio	Máx. – 0,2 mg/L	<0,1*	<0,1*
Chumbo	Máx. – 0,5 mg/L	<0,1*	<0,1*
Cianeto	Máx. – 0,2 mg/L	<0,001*	<0,001*
Cobre	Máx. – 1,0 mg/L	<0,1*	<0,1*
Crômio Total	Máx. – 5,0 mg/L	<0,1*	<0,1*
Crômio VI	Máx. – 0,1 mg/L	<0,1*	<0,1*
D.B.O	Máx. – 60 mg/L ou 80% η	26200	480
D.Q.O	---	58920	1060
Estanho	Máx. – 4,0 mg/L	<0,1*	<0,1*
Fenol	Máx. – 0,5 mg/L	<0,001*	0,01
Ferro Solúvel	Máx. – 15 mg/L	0,1	0,1
Fluoreto	Máx. – 10 mg/L	1,1	5,1
Manganês Solúvel	Máx. – 1,0 mg/L	<0,1*	<0,1*
Material Sedimentável	Máx. – 1,0 ml/L	<0,1* ml/L	<0,1* ml/L
Mercúrio	Máx. – 0,01 mg/L	<0,001*	<0,001*
Níquel	Máx. – 2,0 mg/L	<0,1*	<0,1*
Óleos e Graxas	Máx. – 100 mg/L	8,0	8,0
pH	Entre 5,0 a 9,0	6,8	3,9
Prata	Máx. – 0,02 mg/L	<0,01*	<0,01*
Selênio	Máx. – 0,02 mg/L	<0,01*	<0,01*
Temperatura	Inferior a 40°C	25,6°C	25,7°C
Zinco	Máx. – 5,0 mg/L	0,1	0,2

* Abaixo do Limite de Detecção. Não existe um valor limite para DQO.

2.5 Avaliação da toxicidade do resíduo após tratamento

Embora os resultados obtidos com o tratamento do resíduo estivessem de acordo com a legislação, o que já seria suficiente para descartá-lo, ainda havia uma dúvida quanto à toxicidade já que o formaldeído é comprovadamente carcinogênico e, portanto não há limite

seguro para esta classe de substâncias (WHO, 2000). Quando se pretende avaliar o impacto de substâncias tóxicas em sistemas aquáticos, análises que medem as concentrações destas substâncias são muito importantes, porém são limitadas para uma real compreensão dos processos e interações destas substâncias com o meio e a biota e para estimativas dos efeitos resultantes na estrutura e na função ecológicas (BRIGANTE E ESPINDOLA, 2003).

Para avaliar esta questão foi feito um teste ecotoxicológico: toxicidade aguda por *Daphnia Magna*. Este teste que tem amplo uso na determinação da toxidez de substâncias foi também empregado como parâmetro de avaliação deste trabalho. O teste foi executado pelo laboratório *Bioagri Laboratórios Ltda* mostrou que a toxicidade do resíduo tratado passou de 0,015% (amostra bruta) para 0,030% (amostra tratada). Esta é a concentração necessária para imobilizar 50% da população após 48 horas de exposição.

Estes dados indicam que houve uma redução de 50% da toxidez, embora esta seja ainda bastante alta. Neste caso se faz necessário o teste de toxicidade crônica. Existem dois fatos que precisam ser considerados: este efeito não é devido à presença de formaldeído, visto que foi totalmente degradado (seção 2.4) e que para o descarte nos corpos d' água é preciso acertar o pH para valores entre 6 e 9, o que talvez mude um pouco este quadro.

2.7 Conclusões

Tratar resíduos com alta carga orgânica mostrou ser tarefa árdua, visto que este material pode variar como constatado nas seções 2.5 e 2.6. Por hora é possível concluir que o método pode ser empregado como uma alternativa ao tratamento de resíduo de formaldeído resultante da conservação de peças anatômicas. Embora seja necessário diluir o resíduo bruto (aumentando o volume a ser tratado) ainda é uma opção melhor que a empregada até o presente momento que é o descarte na rede de esgoto sem qualquer tratamento prévio. Existem duas alternativas menos impactantes para se fazer esta diluição: a primeira delas é usando água de chuva, já que apresenta uma carga orgânica por volta de dezenas de mg C L^{-1} . Ou utilizar a própria solução tratada, pois a viabilidade foi comprovada pelos testes. O procedimento completo para o tratamento pode ser visto no apêndice C.

Capítulo 3

Aplicação do método Taguchi no estudo da degradação de resíduos de fenol provenientes de laboratórios biológicos usando variações do processo Fenton

1 Introdução

O fenol é uma substância tóxica, facilmente absorvida através das mucosas e da pele. Como é corrosivo, pode causar severa ulceração e queimaduras de até terceiro grau, após exposições repetidas; a pele pode apresentar uma despigmentação localizada. Porém, segundo o IARC (1999) pertence ao Grupo 3: não existindo evidências adequadas de que seja carcinogênico a humanos e a animais.

Em laboratórios biológicos é principalmente aplicado em protocolos de extração de ácidos nucleicos. Por exemplo, no protocolo empregado por Faleiro (2004) cerca de trezentos microlitros de fenol são utilizados em cada uma das 10 amostras analisadas. Foi observado que este é um procedimento padrão e largamente empregado por diversos laboratórios da UNESP, mas como seu emprego é regulado pelo volume de projetos fica difícil estimar o volume gerado durante o ano.

Os resíduos gerados permanecem, normalmente, em frascos descartáveis tipo *ependof* (**Figura 3.1**) após a extração; assim, estes frascos também devem ser descartados. Portanto, para dar uma

destinação correta seria necessário criar um sistema onde o resíduo de fenol pudesse ser removido dos frascos, que seriam lavados e ambos adequadamente destinados.



Figura 3.1. Frascos descartáveis empregados nos protocolos de extração de DNA utilizando fenol.

Algumas unidades da UNESP possuem programas de gerenciamento de resíduos, onde este é previamente armazenado nos próprios laboratórios, sendo posteriormente enviado para entrepostos e finalmente para destinação final (co-processamento, incineração etc.). Mas na maioria dos *campi* estes resíduos acabam sendo armazenados nos próprios laboratórios por tempo indeterminado ou pior ainda descartados na rede de esgoto sem qualquer tipo de tratamento, despertando para necessidade de aplicar um método para tratamento destes resíduos.

Os fenóis são empregados como composto alvo para estudo por diferentes processos oxidativos por estar presente nos efluentes de diversas indústrias como: de pesticidas, têxteis e de papel e celulose.

Largamente empregado como desinfetante e na produção de resinas, além de outras aplicações (KIDAK e INCE, 2006; TRYBA et al, 2006).

Sua eliminação de efluentes e água, mesmo em baixas concentrações ($0,001 \text{ mg L}^{-1}$) se faz necessária, pois além de tóxico, confere sabor e odor desagradáveis à água (FORTUNY et al., 1999). Devido à sua ação bactericida, o fenol deve ser tratado antes de ser enviado para tratamentos biológicos.

Foi descrito por FORTUNY e colaboradores (1999) que se a concentração de fenol for baixa, ele pode ser degradado por oxidação catalítica por via úmida. Este método emprega oxigênio ou ar como agente oxidante e os intermediários, eventualmente formados, apresentam menor ou nenhuma toxicidade quando comparados com o fenol. A desvantagem deste método é que o catalisador necessita de temperaturas por volta de 200°C e pressão 10MPa.

Um outro método para tratar fenol é a degradação ultra-sônica. Baseia-se na exposição de um líquido a um campo acústico suficientemente grande para que as ondas formem lacunas. No interior destas bolhas existem pequenas quantidades de vapores dissolvidos e ao serem expandidas, durante os ciclos das ondas, se tornam tão grandes que não se sustentam e implodem alcançando altas temperaturas e pressões. Sob estas condições, as moléculas de vapor pirolisam, dissociando-se em uma variedade de espécies de radicais

livre que se caracterizam por um tempo de meia-vida curto. O impacto do colapso das bolhas depende da frequência vibracional do campo aplicado sobre o líquido que as circunda (KIDAK e INCE, 2006).

A remoção de poluentes por ultra-som envolve tanto a degradação por via direta: ativada termicamente por reações de decomposição; como indiretamente pela geração de espécies oxidativas como radical hidroxila. KIDAK e INCE (2006) apresentaram, em um artigo de revisão, vários trabalhos empregando ultra-som como uma alternativa para degradar fenol e seus derivados alcançando bons resultados. Existem ainda trabalhos onde ultra-som é aliado a outros processos, por exemplo, sonicação a 20 kHz na presença de reagente de Fenton (PAPADAKI, et al., 2004), mas os resultados mostraram não se tratar de uma combinação eficaz, pois tanto Fe^{2+} quanto ultra-som competem pelo peróxido, reduzindo a concentração de reagente de Fenton.

Em trabalho apresentado por WU e colaboradores (2001) os autores aliam irradiação UV a ultra-som para degradar fenol e não conseguem mineralizar mais que 20% do contaminante. Foi possível constatar que esta técnica não se aplicaria a este estudo primeiramente pela dificuldade em acertar os parâmetros que regulam o processo como: frequência, tempo de contato, tipo de gás injetado, configuração

do reator e pH ideal e principalmente pelo custo de um equipamento de ultra-som.

A fotocatalise é também bastante empregada em estudos de degradação do fenol. Neste processo é empregado como catalisador um semi-condutor, normalmente o dióxido de titânio que é um material absorvente de luz UV. A absorção de luz UV promove um elétron da banda de valência para a banda de condução do TiO_2 resultando na geração de um par elétron/lacuna. A vacância positiva na banda de valência é um oxidante muito forte podendo oxidar substâncias adsorvidas na superfície do catalisador ou gerar radicais hidroxila a partir do íon hidroxila, que tem sido descrito como o mecanismo mais provável.

No trabalho apresentado por SANTOS e colaboradores (2002) foi observado que de acordo com o catalisador empregado um intermediário específico era formado. Quando cobre é usado os intermediários formados mantinham seus anéis aromáticos que posteriormente eram rompidos formando ácidos de cadeia curta, como fórmico, acético, maleico e oxálico. Mas se havia formação de catecol como intermediário, maiores índices de mineralização eram atingidos. ILISZ e DOMBI (1999) mostraram que em sistemas empregando TiO_2 como catalisador e na presença de seqüestradores de elétrons como Ag^+ , O_2 , H_2O_2 verificava-se a formação apenas de *p*-benzoquinona.

Avaliando estas informações o trabalho apresentado por KAVITHA e PALANIVELU (2004) parecia ser a melhor alternativa para tratar este resíduo. Este procedimento empregou variações do processo Fenton (**Apêndice 1**) alcançando níveis máximos de remoção de 82, 95 e 99%, para Fenton, foto-Fenton com irradiação artificial e foto-Fenton com irradiação natural, respectivamente, embora usasse solução padrão de fenol. Este trabalho indicava ser possível aplicar Fenton *in situ* para tratar os resíduos de fenol; o processo poderia ser executado pelos próprios geradores evitando seu acúmulo nos laboratórios e conseqüentemente, o prolongamento da exposição de seus usuários.

Como a degradação de fenol já foi exaustivamente estudada seja em solução (ILISZ e DOMBI, 1999; SANTOS et al., 2002) ou em solo (MECOZZI et al., 2006; YARDIN e CHIRON, 2006), este trabalho limitou-se a ajustar as concentrações de ferro e de peróxido ao tratamento de resíduo de fenol em questão.

A otimização das condições empregadas foi obtida empregando o método de Taguchi (WU e CHANG, 2004). Foi feito um planejamento de experimentos, com o qual foi possível avaliar quantos e quais fatores deveriam ser estudados e a influência de cada um desses fatores no resultado esperado, ou seja, a degradação do fenol. Detalhes são apresentados na seção 3.2.1.

3.2. Materiais e métodos

3.2.1. Planejamento de experimentos

Neste trabalho foi empregado o método Taguchi para o planejamento de experimentos. Tal método foi considerado como o melhor e mais robusto (pouco sensível à influência do ruído) apresentado pela literatura (WU e CHANG, 2004). O planejamento de experimentos empregando Taguchi visa: estabelecer as condições ótimas, verificar a influência do efeito que cada parâmetro estudado exerce sobre a variável resposta, reduzir oscilações no resultado e finalmente obter tais informações realizando o menor número de experimentos (TORTUM, 2005).

O método Taguchi oferece matrizes prontas que apresentam sugestões para diferentes números de experimentos e que podem ser variadas em dois, três ou mais níveis. A escolha é feita tendo em vista o número de variáveis independentes (fatores) e de como estas variáveis podem ser flexionadas (níveis). O objetivo é descobrir como a resposta (o rendimento da reação) depende dos fatores (parâmetros avaliados) e encontrar o melhor ajuste para estes fatores.

Neste trabalho foi utilizada a Matriz de Taguchi L_{18} (**Quadro 3.1**), onde foram realizados 18 experimentos em triplicata, executados de maneira aleatória para evitar erros sistemáticos. Esta matriz foi a que melhor se adaptou às condições em estudo, pois apresenta um arranjo

que permite investigar até 8 fatores, sendo 7 deles em três níveis e 1 em dois níveis. Cada fator representa um dos parâmetros em estudo (por exemplo, concentração dos reagentes) e os níveis são as variações que os parâmetros podem ter. Estudar os fatores em dois ou três níveis depende da situação em estudo. Dois níveis são, freqüentemente, empregados para variáveis qualitativas, por exemplo: agitação (1 - com/2 - sem), e três níveis (variáveis quantitativas) são utilizados quando se deseja explorar uma região, estudando limites abaixo e acima de um ponto de partida. E, finalmente, a variável dependente é a resposta dada pelo sistema. Os parâmetros e seus níveis são definidos no **Quadro 3.2.**

Quadro 3.1 Matriz de Taguchi L₁₈.Cod. Codificado; As concentrações de ferro e H₂O₂ estão em mmol L⁻¹, as de resíduo de fenol em mg C L⁻¹.

Experimentos	Fatores e seus níveis									
	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.	Real	Cod.	Real
	A	Agitação	B	[] Ferro	C	[] Resíduo Fenol	D	Processo	E	[] H ₂ O ₂
1	1	sem	1	0,5	1	200	1	Fenton	1	15
2	1	sem	1	0,5	2	70	2	Fenton Artificial	2	30
3	1	sem	1	0,5	3	35	3	Fenton Natural	3	60
4	1	sem	2	0,8	1	200	1	Fenton	2	30
5	1	sem	2	0,8	2	70	2	Fenton Artificial	3	60
6	1	sem	2	0,8	3	35	3	Fenton Natural	1	15
7	1	sem	3	1,0	1	200	2	Fenton Artificial	1	15
8	1	sem	3	1,0	2	70	3	Fenton Natural	2	30
9	1	sem	3	1,0	3	35	1	Fenton	3	60
10	2	com	1	0,5	1	200	3	Fenton Natural	3	60
11	2	com	1	0,5	2	70	1	Fenton	1	15
12	2	com	1	0,5	3	35	2	Fenton Artificial	2	30
13	2	com	2	0,8	1	200	2	Fenton Artificial	3	60
14	2	com	2	0,8	2	70	3	Fenton Natural	1	15
15	2	com	2	0,8	3	35	1	Fenton	2	30
16	2	com	3	1,0	1	200	3	Fenton Natural	2	30
17	2	com	3	1,0	2	70	1	Fenton	3	60
18	2	com	3	1,0	3	35	2	Fenton Artificial	1	15

Quadro 3.2. Definição dos fatores e seus níveis.

Fatores	Nível 1	Nível 2	Nível 3
A = agitação magnética	s/ agitação	c/ agitação	-
B = Sulfato ferroso	0,5 mmol L ⁻¹	0,8 mmol L ⁻¹	1,0 mmol L ⁻¹
C = Resíduo de fenol	200 mg L ⁻¹	70 mg L ⁻¹	35 mg L ⁻¹
D = Variações processo Fenton	Fenton	Foto-Fenton artificial	Foto-Fenton solar
E = Peróxido de hidrogênio	15 mmol L ⁻¹	30 mmol L ⁻¹	60 mmol L ⁻¹

Para Taguchi a resposta deve ser tão próxima do alvo quanto possível, além de robusta à influência do ruído. São considerados ruídos os parâmetros que não podem ser controlados, exemplo: composição inicial da amostra (BARROS NETO, 2003). Para avaliar os resultados obtidos Taguchi emprega uma razão genérica Sinal/Ruído (S/R) que quantifica as oscilações apresentadas pelo ruído e pelo processo. Dependendo das características particulares do problema, diferentes relações S/R podem ser empregadas como: "menor é melhor", "maior é melhor" ou "nominal é melhor".

A razão S/R empregada neste estudo foi maior é melhor (equação 3.1), já que quanto maior fosse a remoção de carbono orgânico total (variável resposta) melhor a eficiência atingida pelo processo.

$$S/R = - 10 \log \frac{\sum 1/M^2}{n} \dots\dots\dots(3.1)$$

onde, M = % COT removido em cada condição experimentada.

n = número de replicatas.

3.2.1.1. Determinação dos fatores e de seus níveis

A degradação de fenol por processo Fenton já foi exaustivamente descrita na literatura (KAVITHA e PALANIVELU, 2004; MACIEL et al, 2004; WILL et al., 2004) sendo dispensável um estudo prévio detalhado do processo Fenton a ser empregado. Assim, os fatores e níveis empregados na determinação da condição ótima, foram obtidos (GERNJAK et al., 2003; KAVITHA e PALANIVELU, 2004;) e estão apresentados detalhadamente no **Quadro 3.2**. Vale ressaltar que os trabalhos citados apresentam fenol em solução padrão, sem a presença de interferente e com uma concentração de matéria orgânica dada apenas pelo próprio fenol. Diferentemente do caso em estudo, que por ser proveniente de resíduos de laboratório possui substâncias orgânicas desconhecidas. Foi feita uma avaliação da influência de cada fator sobre a variável resposta empregando o software Minitab Statistical Software 13.0 e os dados estão apresentados na **Tabela 3.3**.

3.2.2. Amostragem

Os resíduos de fenol empregados neste estudo foram obtidos junto aos *campi* da UNESP de São José do Rio Preto (Laboratório de Fitovirologia) e de Jaboticabal (Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva), representativos dos demais laboratórios da UNESP onde o fenol é empregado na extração de DNA.

No campus de São José do Rio Preto estas amostras já haviam sido retiradas dos frascos *ependorf* e estavam armazenadas em frascos âmbar no laboratório onde foram utilizadas, perfazendo um total de 350 mL.

As amostras provenientes do campus de Jaboticabal estavam armazenadas em frascos *ependorf* (cerca de 50 frascos). Neste caso, o resíduo foi retirado dos frascos e os mesmos foram lavados⁴. Os resíduos e as águas de lavagem foram reunidos e mantidos sob as mesmas condições de armazenamento do laboratório de Jaboticabal. O volume total deste resíduo foi de 2,5 L, sendo aproximadamente 0,5 L do resíduo original e 2 L das águas de lavagem, a concentração final de carbono orgânico deste resíduo era de 30.000 mg C L⁻¹ e 24,5 mg L⁻¹ de fenol, valores determinados neste trabalho.

3.2.3. Execução dos experimentos

Os experimentos foram realizados aleatoriamente de acordo com TORTUM e colaboradores (2005) para evitar que fontes de ruído, não consideradas inicialmente, pudessem influenciar os resultados. As medidas de COT foram feitas mantendo um coeficiente de variação de 2%. O tempo de duração do experimento (duas horas) e o pH das

⁴ Os frascos foram primeiramente lavados com água de torneira, um a um com um volume igual a duas vezes sua capacidade que é de 2 mL. Posteriormente ficaram num banho por 24 horas, sendo que está água foi trocada 2x e as águas de lavagem também foram empregadas no estudo de degradação.

soluções ($3,0 \pm 0,2$, ajustado com H_2SO_4 ou NaOH) empregados foram os mesmos apresentados no trabalho de KAVITHA e PALANIVELU (2004), onde também foi feita uma comparação entre as variações do processo Fenton. As condições empregadas foram anteriormente descritas no **Quadro 3.2**.

Todos os experimentos foram realizados em reatores com capacidade para 250 mL e dimensões de 45 mm de altura por 90 mm de diâmetro.

Nos experimentos onde foi aplicado foto-Fenton sob irradiação artificial, os reatores descritos anteriormente foram acondicionados em uma caixa retangular de 23 x 53 x 28 cm (**Figura 3.2**). A esta caixa foram conectadas duas lâmpadas germicidas de 15 W cada, que emitem em 254 nm, dentro da região indicada como ideal por LEGRINI e colaboradores (1993) para degradação de compostos aromáticos substituídos que é de 253-257 nm. Já os experimentos empregando foto-Fenton solar foram realizados como descritos na seção 2.2.1.



FIGURA 3.2. Sistema empregado para foto-Fenton artificial.

3.2.4. Soluções empregadas

1. Resíduo de fenol nas concentrações de 35, 70, 100, 150 e 200 mg L⁻¹ de Carbono Orgânico Total (COT).
2. Sulfato ferroso (Carlo Erba) em concentrações de 0,5; 0,8 e 1,0 mmol L⁻¹.
3. Peróxido de hidrogênio (Synth) em concentrações de 15, 30 e 60mmol L⁻¹.

3.2.5. Análises químicas

Durante os experimentos foram coletadas amostras (4 mL) de 20 em 20 minutos até o término do processo em 2 horas. Foi feito o monitoramento da concentração de COT, observando sua remoção.

A verificação da presença de H₂O₂ durante o procedimento foi feita utilizando o método espectrofotométrico descrito por Nogueira e colaboradores (2005a), descrito detalhadamente na **seção 2.2.3**.

3.3. Resultados e discussão

Usando as combinações dos fatores apresentadas nos **Quadros 3.1 e 3.2**, 18 experimentos foram realizados para se determinar qual dentre as condições resultaria no melhor fator de resposta (maior remoção de COT da amostra).

3.3.1. Processo Fenton e suas variações

A literatura descreve que ao adicionar peróxido de hidrogênio à solução contendo fenol e sal de ferro esta se torna marrom e, à medida que ocorre a degradação a solução se torna incolor (KAVITHA e PALANIVELU, 2004). Tal fato também foi observado neste trabalho, porém nos experimentos realizados com agitação as soluções tornaram-se amareladas ao longo da reação enquanto que as soluções em repouso permaneceram marrons, indicando que a degradação não havia sido efetiva, fato comprovado pelas determinações de COT.

Observando a **Figura 3.3** é possível notar que o emprego do processo Fenton sem irradiação não foi eficaz na remoção de COT do resíduo de fenol. Os maiores índices de remoção de COT atingidos não ultrapassam 40%.

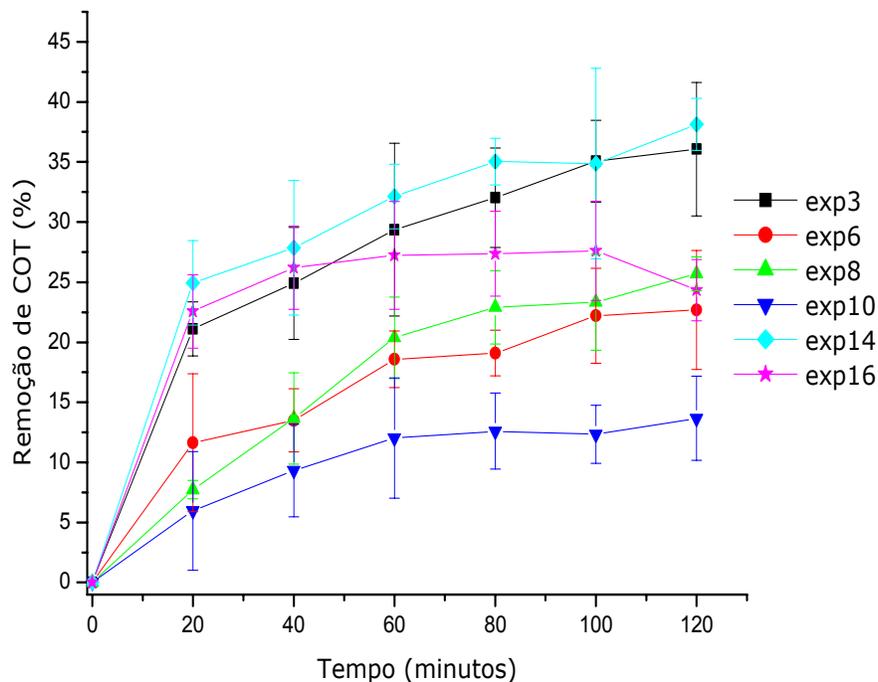


Figura 3.3. Resultados obtidos na degradação de resíduo de fenol usando Fenton.

- $\text{H}_2\text{O}_2=60 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{Fe}=0,5 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{COT} = 35 \text{ mg L}^{-1}$, sem agitação.
- $\text{H}_2\text{O}_2=15 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{Fe}=0,8 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{COT} = 35 \text{ mg L}^{-1}$, sem agitação.
- ▲ $\text{H}_2\text{O}_2=30 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{Fe}=1,0 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{COT}= 70 \text{ mg L}^{-1}$, sem agitação.
- ▼ $\text{H}_2\text{O}_2=60 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{Fe}=0,5 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{COT} = 200\text{mg L}^{-1}$, com agitação.
- ◆ $\text{H}_2\text{O}_2=15 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{Fe}=0,8 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{COT} = 70 \text{ mg L}^{-1}$, com agitação.
- ★ $\text{H}_2\text{O}_2=30 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{Fe}=1,0 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{COT} = 200\text{mg L}^{-1}$, com agitação.

Um fator que pode estar relacionado à ineficiência da remoção de COT é a extinção do peróxido de hidrogênio durante o tempo de reação. Na primeira hora de reação os resultados mostraram uma remoção de COT ascendente, após 60 minutos essa remoção permaneceu constante (exp. 8, 10 e 16) ou apresentou um pequeno avanço (exp. 3, 6, 14). Para verificar se a pequena remoção de COT ocorreu devido ao consumo de todo H_2O_2 presente foi feito um monitoramento da concentração do

oxidante e pode ser observado pela **Figura 3.4**, que havia H_2O_2 após 120 minutos, eliminando esta hipótese.

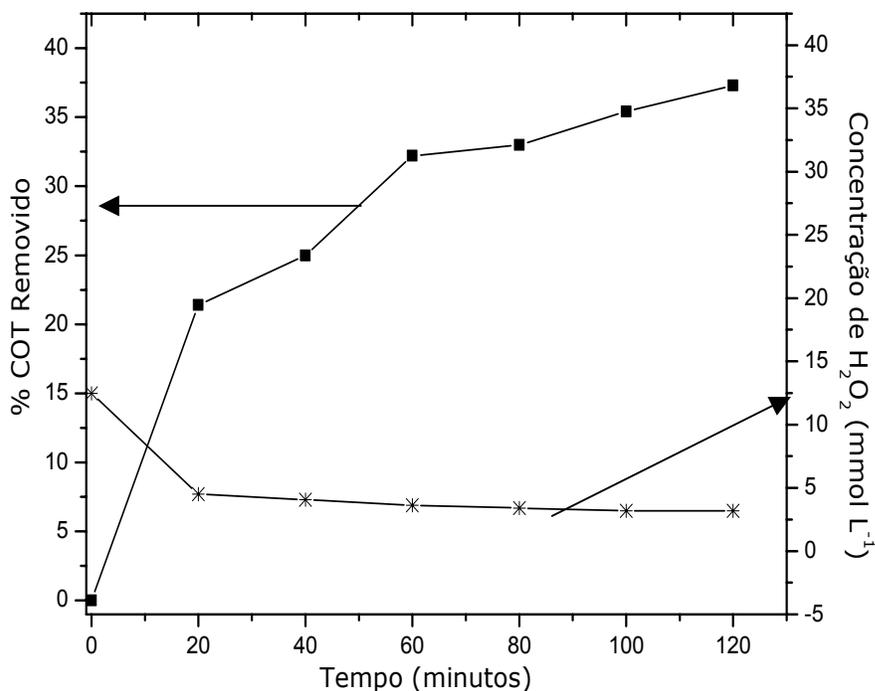


Figura 3.4. Monitoramento da concentração de H_2O_2 durante a remoção de COT.

Foi observado que assim como no trabalho descrito por KAVITHA e PALANIVELU (2004) a solução tornava-se marrom após a adição de peróxido, mas diferente do trabalho citado onde a coloração tornava-se amarelada após duas horas de reação, a solução sem agitação mantinha-se marrom após mesmo tempo de reação. WILL e colaboradores (2004) relacionam a permanência da coloração marrom à formação de intermediários coloridos como quinonas e complexos solúveis de ferro, fato que pode ser corroborado pelos dados de COT.

Foi ainda descrito por Santos e colaboradores (2002) que de

acordo com as condições do meio, diferentes intermediários podem ser obtidos (hidroquinona, benzoquinona, catecol) e que cada um deles obedece a uma rota de degradação diferente, resultando em subprodutos diferentes (ver **Figura 3.5**). É possível que a aplicação de Fenton aos resíduos de fenol estudados resultou na formação de hidroquinona e/ou benzoquinona, e que posteriormente formam ácidos orgânicos de cadeia curta, já que se observou uma pequena diminuição no pH das soluções tratadas (2,6) em relação ao pH inicial (3,2).

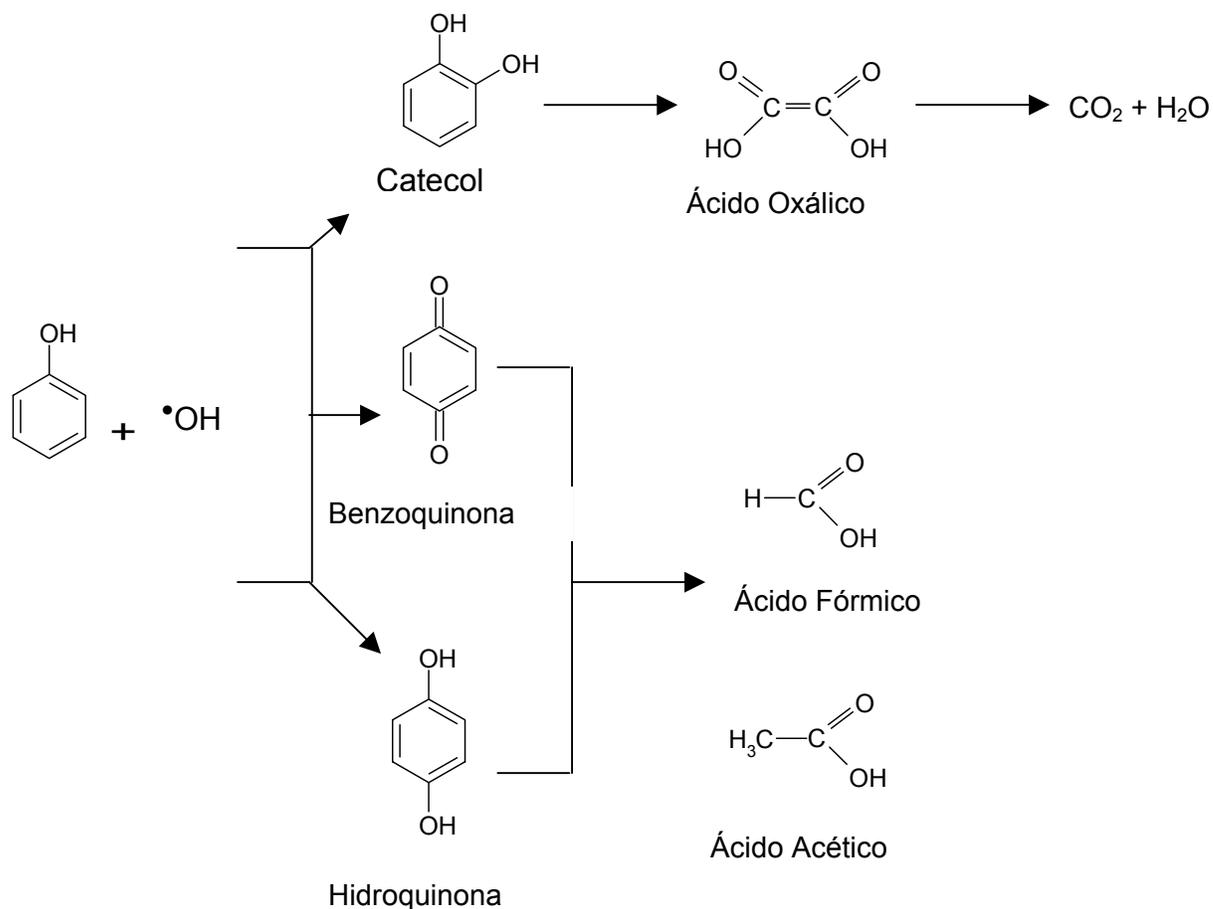


Figura 3.5 Esquema proposto para degradação do fenol no resíduo.

Outro fator que poderia influenciar esta remoção limitada é a composição da amostra. Como a carga orgânica não é composta apenas por fenol, mas também por substâncias desconhecidas extraídas do material biológico em estudo, estas substâncias podem ser resistentes a este processo.

Assim a próxima etapa foi avaliação da remoção aplicando foto-Fenton que tende a ser mais eficiente, pois conta com o aumento da geração de radicais hidroxila no meio catalisado pela irradiação (**Figura 3.6**).

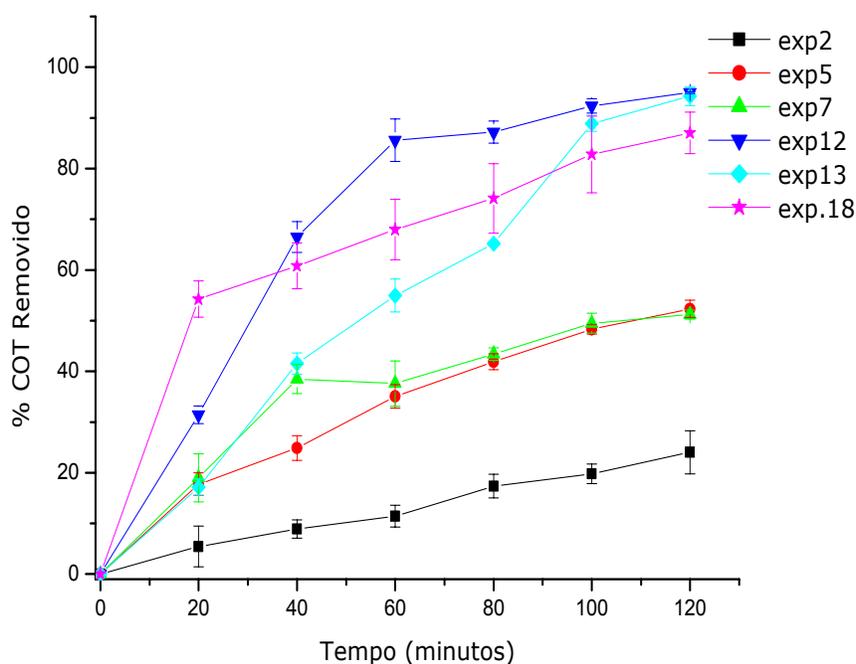


Figura 3.6 Resultados obtidos na degradação de resíduo de fenol usando foto-Fenton artificial.

- $\text{H}_2\text{O}_2=30 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{Fe}=0,5 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{COT} = 70 \text{ mg L}^{-1}$, sem agitação
- $\text{H}_2\text{O}_2=60 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{Fe}=0,8 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{COT} = 70 \text{ mg L}^{-1}$, sem agitação
- ▲ $\text{H}_2\text{O}_2=15 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{Fe}=1,0 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{COT}= 200\text{mg L}^{-1}$, sem agitação
- ▼ $\text{H}_2\text{O}_2=30 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{Fe}=0,5 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{COT} = 35 \text{ mg L}^{-1}$, com agitação
- ◆ $\text{H}_2\text{O}_2=60 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{Fe}=0,8 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{COT}= 200\text{mg L}^{-1}$, com agitação
- ★ $\text{H}_2\text{O}_2=15 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{Fe}=1,0 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{COT} = 35 \text{ mg L}^{-1}$, com agitação

Observando a **Figura 3.6** é possível notar que o emprego do processo foto-Fenton artificial foi mais eficiente quando aliado à agitação magnética (experimentos 12, 13 e 18). Nestes casos a remoção de COT variou de 87 a 95% , enquanto que sem agitação os valores variaram de 24 a 52% (experimentos 2, 5 e 7), indicando a possível influência deste fator na eficiência da remoção de COT.

PIGNATELLO (1992) e MURPHY (1989) já haviam relatado que a taxa de degradação de poluentes orgânicos e a eficácia da mineralização com Fe(II), Fe(III)/H₂O₂ aumentavam consideravelmente em sistemas submetidos à irradiação com luz visível e UV-próximo. A agitação garante que toda solução presente no reator seja exposta à irradiação e não somente a camada superficial como acontece em sistemas estáticos.

Quando se compara Fenton e foto-Fenton artificial este último apresenta melhores resultados de remoção de COT do resíduo de fenol. KAVITHA e PALANIVELU (2004) atribuem esta observação aos diversos compostos intermediários que podem ser formados durante o processo degradativo do fenol como: benzoquinonas, ácidos carboxílicos alifáticos e aromáticos. Alguns destes intermediários são considerados resistentes à oxidação por Fenton (BIGDA, 1995) como os ácidos oxálico e acético, justificando os resultados alcançados com processo Fenton não ultrapassarem 40% de remoção de COT da amostra.

Para finalizar as comparações foi aplicado o processo foto-Fenton com irradiação solar e os dados são apresentados na **Figura 3.7**

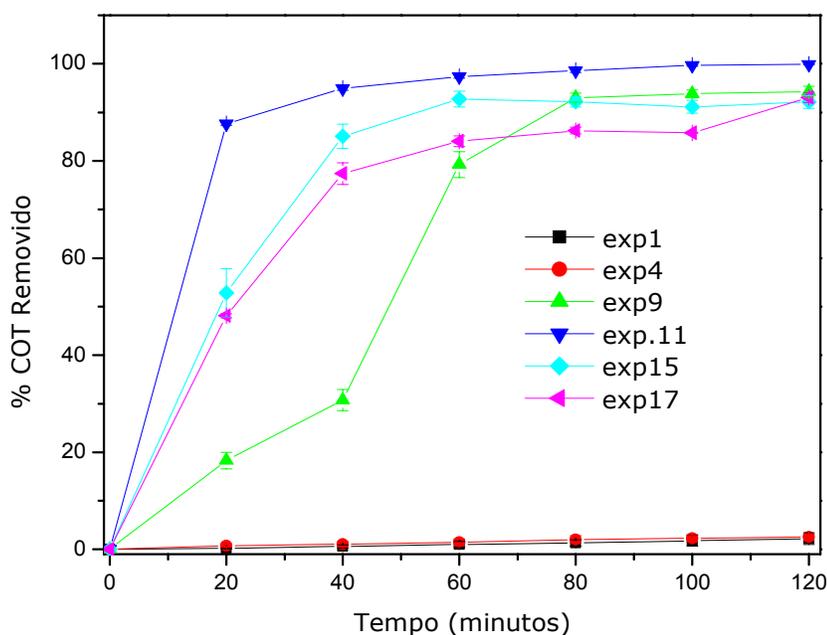


Figura 3.7 Resultados obtidos na degradação de resíduo de fenol usando foto-Fenton solar.

- $\text{H}_2\text{O}_2=15 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{Fe}=0,5 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{COT} = 200 \text{ mg L}^{-1}$, sem agitação.
- $\text{H}_2\text{O}_2=30 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{Fe}=0,8 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{COT} = 200 \text{ mg L}^{-1}$, sem agitação.
- ▲ $\text{H}_2\text{O}_2=60 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{Fe}=1,0 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{COT} = 35 \text{ mg L}^{-1}$, sem agitação.
- ▼ $\text{H}_2\text{O}_2=15 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{Fe}=0,5 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{COT} = 70 \text{ mg L}^{-1}$, com agitação.
- ◆ $\text{H}_2\text{O}_2=30 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{Fe}=0,8 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{COT} = 35 \text{ mg L}^{-1}$, com agitação.
- ★ $\text{H}_2\text{O}_2=60 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{Fe}=1,0 \text{ mmolL}^{-1}$; $\text{COT} = 70 \text{ mg L}^{-1}$, com agitação.

Na **Figura 3.7** observa-se que os maiores índices de remoção foram obtidos quando foto-Fenton solar foi empregado, embora existam dois experimentos onde a remoção foi de aproximadamente 2%⁵. Esta baixa remoção deve-se provavelmente ao emprego das condições mais desfavoráveis nestes experimentos: peróxido e ferro (níveis mais baixos), concentração da amostra empregada (nível mais alto) e

⁵ Estes experimentos foram repetidos e os resultados foram confirmados.

ausência de agitação. Em todos os demais experimentos a remoção de COT obtida foi superior a 90%.

Os resultados encontrados para os três processos foram submetidos à equação 3.1 para se obter os valores correspondentes à razão sinal/ruído (S/R) e estão apresentados na **Tabela 3.1**.

Tabela 3.1. Remoção de COT obtida.

Experimento	Replicatas			Média	Desvio Padrão	S/R
	1	2	3			
1	1,2	3,4	1,9	2,2	1,1	4,5
2	28,2	19,7	24,2	24,0	4,3	27,3
3	37,3	40,9	30,0	36,1	5,6	30,9
4	1,8	3,0	2,3	2,4	0,6	6,9
5	50,8	54,2	52,0	52,3	1,7	34,4
6	22,8	27,6	17,7	22,7	5,0	26,7
7	50,4	52,2	51,0	51,7	0,9	34,2
8	27,2	24,4	24,9	25,5	1,5	28,1
9	95,5	93,3	93,8	94,2	1,2	39,5
10	15,0	16,3	9,7	13,7	3,5	22,0
11	99,9	99,9	99,7	99,8	0,1	40,0
12	95,1	94,8	94,5	94,8	0,3	39,5
13	93,0	96,8	93,7	94,5	2,0	39,5
14	38,9	39,8	35,7	38,1	2,1	31,6
15	90,7	93,3	91,5	91,8	1,3	39,3
16	26,4	25,1	21,5	24,3	2,5	27,6
17	92,1	94,2	92,8	93,0	1,1	39,4
18	83,0	91,2	87,8	87,3	4,1	38,8

Segundo Taguchi a resposta deve ser tão próxima do alvo quanto possível, mas também deve ser robusta (pouco sensível) a influencia de ruídos. Como já relatado na seção 3.2.1 neste caso onde o objetivo é alcançar a máxima remoção de COT, Taguchi recomenda maximizar a relação sinal/ruído empregando a equação 3.1, onde MAIOR É MELHOR. Os resultados obtidos podem ser observados na **Tabela 3.2**.

Tabela 3.2. Efeito de cada fator na razão S/R sobre a variável resposta.

Efeito fator A Agitação	Nível 1	25,8
	Nível 2	35,3
Efeito fator B Ferro	Nível 1	27,4
	Nível 2	29,7
	Nível 3	34,6
Efeito fator C Resíduo de Fenol	Nível 1	22,5
	Nível 2	33,5
	Nível 3	35,8
Efeito fator D Processo	Nível 1	28,3
	Nível 2	35,6
	Nível 3	27,8
Efeito fator E peróxido	Nível 1	29,3
	Nível 2	28,1
	Nível 3	34,3

Estes cálculos foram realizados usando o programa Minitab Statistical Software versão 13.0, calculados como mostrado na equação 3.2, e estão apresentados na **Tabela 3.2**. Foi então verificado que a condição ideal seria A_2, B_3, C_3, D_2, E_3 , e como esta condição não foi testada foi realizado o experimento de confirmação (**Figura 3.8**).

Efeito do Fator $X = \sum R_n / m$

Fator X = Um dos fatores testados.

$\sum R_n$ = remoção de COT média no nível n , com n variando de 1 a 3.

m = número de condições experimentais do arranjo ortogonal no nível n .

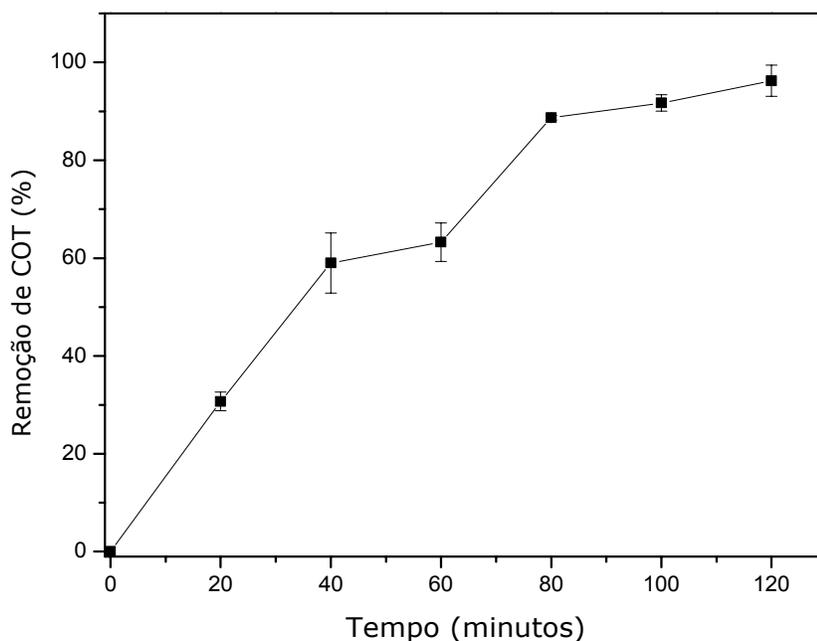


Figura 3.8 Experimento de confirmação.

A₂ = com agitação; **B₃** = 1,0 mmolL⁻¹ de Ferro; **C₃** = 35 mg L⁻¹ de resíduo de Fenol; **D₂** = foto-Fenton artificial; **E₃** 60 mmolL⁻¹ de H₂O₂.

O experimento de confirmação resultou em uma remoção de COT menor ($96,2 \pm 3,2\%$) que a obtida pelo experimento 11 ($99,8\% \pm 0,1$), porém estas diferenças não são significativas. Assim as condições empregadas em ambas situações foram investigadas para buscar o ajuste ideal.

Tabela 3.3. Influência do efeito de cada fator sobre a variável resposta.

Efeito fator A Agitação	Nível 1	35,2
	Nível 2	71,4
Efeito fator B Ferro	Nível 1	46,0
	Nível 2	51,0
	Nível 3	62,9
Efeito fator C Resíduo de Fenol	Nível 1	32,0
	Nível 2	55,8
	Nível 3	72,1
Efeito fator D Processo	Nível 1	28,5
	Nível 2	67,4
	Nível 3	64,0
Efeito fator E H ₂ O ₂	Nível 1	50,9
	Nível 2	44,2
	Nível 3	64,9

Foi feita também uma avaliação da influência de cada fator sobre a variável resposta (**Tabela 3.3**) e observou-se que a diferença encontrada entre os valores da influência do efeito D (processo aplicado) para os níveis 2 (67,4) e 3 (64,0) (foto-Fenton artificial e solar, respectivamente) era muito pequena, o que indicava a possibilidade de se aplicar irradiação natural.

De acordo com WILL (2004) o custo com energia é a principal desvantagem do processo foto-Fenton. O emprego da luz solar reduziria o custo aumentando sua aplicabilidade. Os resultados obtidos mostraram uma eficiência bastante próxima da apresentada pelo experimento de confirmação: aproximadamente 92,6 %.

Outro ponto importante a ser avaliado é que nos resíduos contendo fenol provenientes de laboratórios de ensaios biológicos, as concentrações de fenol podem ser maiores do que 60 mg/L,

concentração máxima presente nos experimentos efetuados até então. Assim sendo, para avaliar o desempenho do método em concentrações mais elevadas de fenol foram realizados mais dois experimentos com as seguintes concentrações de resíduo de fenol na amostra: 115 e 180 mg L⁻¹, os resultados estão apresentados na **Figura 3.9**.

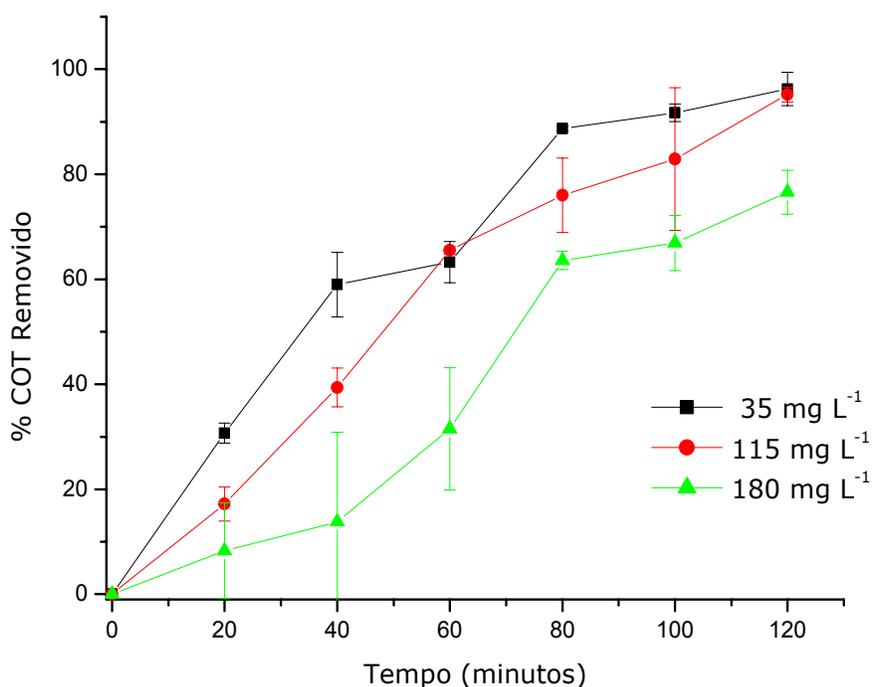


Figura 3.9 Adaptação feita às condições ótimas (1,0 mmol L⁻¹ de Ferro, 60 mmol L⁻¹ de H₂O₂, foto-Fenton solar e sem agitação).

O aumento na concentração da amostra mostrou que valores até 115 mg L⁻¹ ainda resultavam em degradação considerável de COT: 95,2%. Além da concentração, outro fator que pode facilitar a aplicação é a remoção do sistema de agitação e o aumento do volume. Para verificar se os níveis de remoção ainda se mantinham acima de 90% foi

feito então este último experimento empregando o reator mostrado na **Figura 3.10** com dimensões de 7 x 25,5 x 36 cm e observou-se que aumentando o volume tratado de 200 mL para 4,5 litros ainda resultava em remoção de 92,6%, para tanto foi necessário aumentar o tempo de irradiação para três horas. Sendo assim, o procedimento para tratamento foi elaborado baseado nos ajustes feitos sobre a condição ideal, previamente, determinada (30 mmol L⁻¹ de H₂O₂, 0,5 mmol L⁻¹ de FeSO₄ e 115 mg L⁻¹ de resíduo de fenol, tempo de irradiação mínimo de 3 horas e sem agitação magnética) e pode ser visto no apêndice C.



Figura 3.10 Reator empregado para degradação de 4,5 litros de resíduo.

3.3.2. Caracterização do resíduo após tratamento

Como comentado anteriormente, no Brasil as universidades não sofrem fiscalização de nenhum órgão público quanto ao descarte de resíduos e/ou efluentes. Mas os resíduos tratados foram avaliados segundo disposto no DECRETO N. 8.468, DE 8 DE SETEMBRO DE 1976 do artigo 18 da COMPANHIA TECNOLÓGICA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

(CETESB), que declara que os efluentes de fonte pública ou privada só poderão ser lançados em corpos receptores se obedecerem às condições descritas na **Tabela 3.4**. A caracterização do resíduo bruto e após tratamento foi realizada pelo laboratório AMPRO Laboratório e Engenharia S/C Ltda (**Tabela 3.4**), segundo o seguinte critério: caracterização completa da amostra bruta e os parâmetros que estivessem acima do limite permitido, a DBO e a DQO da amostra tratada. Na amostra bruta o único parâmetro encontrado acima das especificações da decreto 8468 –Lei 997 - artigo 18 da COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB foi o fenol.

Tabela 3.4. Resultados obtidos para a amostra bruta e tratada avaliada quanto aos parâmetros do decreto 8468 –Lei 997 do artigo 18 da COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB.

PARÂMETROS	DECRETO 8468 – LEI 997 ARTIGO 18	AMOSTRA BRUTA mg/L	AMOSTRA TRATADA mg/L
Arsênio	Máx. – 0,2 mg/L	<0,001*	ND
Bário	Máx. – 5,0 mg/L	<0,1*	ND
Boro	Máx. – 5,0 mg/L	0,5	ND
Cádmio	Máx. – 0,2 mg/L	<0,1*	ND
Chumbo	Máx. – 0,5 mg/L	<0,1*	ND
Cianeto	Máx. – 0,2 mg/L	<0,001*	ND
Cobre	Máx. – 1,0 mg/L	<0,1*	ND
Cromo Total	Máx. – 5,0 mg/L	<0,1*	ND
Cromo VI	Máx. – 0,1 mg/L	<0,1*	ND
D.B.O	Máx. – 60 mg/L ou 80% η	50	8,0
D.Q.O	---	106	18
Estanho	Máx. – 4,0 mg/L	<0,1*	ND
Fenol	Máx. – 0,5 mg/L	24,5	0,01
Ferro Solúvel	Máx. – 15 mg/L	0,2	ND
Fluoreto	Máx. – 10 mg/L	0,2	ND
Manganês Solúvel	Máx. – 1,0 mg/L	<0,1*	ND
Material Sedimentável	Máx. – 1,0 ml/L	<0,1* ml/L	ND
Mercúrio	Máx. – 0,01 mg/L	<0,001*	ND
Níquel	Máx. – 2,0 mg/L	<0,1*	ND
Óleos e Graxas	Máx. – 100 mg/L	7,0	ND
Ph	Entre 5,0 a 9,0	6,4	ND
Prata	Máx. – 0,02 mg/L	<0,01*	ND
Selênio	Máx. – 0,02 mg/L	<0,01*	ND
Temperatura	Inferior a 40°C	19,9°C	ND
Zinco	Máx. – 5,0 mg/L	0,1	ND

*: Valores abaixo do limite de detecção. ND: não determinado.

--- Não existe um valor limite para DQO.

Observando a **Tabela 3.4** é possível constatar que o processo de degradação foi eficiente, (removeu 99,96% do fenol), pois a amostra bruta apresentava 24,5 mg L⁻¹, passando a 0,01 mg L⁻¹ (valor limite 0,5 mg L⁻¹) após o tratamento. Os parâmetros DBO e DQO são bastante empregados como avaliação de eficiência de processo de tratamento de

efluentes, se o processo consegue reduzir a DBO em 80% ou trazê-la para níveis inferiores a 60 mg L^{-1} é considerado eficiente. Neste caso a redução da DBO foi de 84%.

Embora ferro seja usado como catalisador, e conseqüentemente é mantido no meio reacional, a concentração de sal de ferro empregada $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ou $1,4 \text{ mg L}^{-1}$, está dentro dos limites permitidos pela legislação (15 mg L^{-1}), além disso, como é necessário ajustar o pH da solução para intervalo de 6-9, o ferro é precipitado formando hidróxido.

3.3.3. Avaliação da toxicidade do resíduo após tratamento

Como já discutido na seção 2.2 o teste empregando-se *Daphnia magna* é bastante utilizado para a determinação da toxicidade de efluentes líquidos e foi também usado como parâmetro de avaliação neste trabalho. O teste foi executado pelo laboratório Bioagri Laboratórios Ltda. De acordo com os dados apresentados pelo laboratório com uma concentração de 2,37% o resíduo tratado apresentou uma toxicidade capaz de imobilizar 50% dos organismos-teste, no período de 48 horas de exposição. A COMPANHIA TECNOLOGICA DE SANEAMENTO AMBIENTAL disponibiliza em seu *site* uma Ficha de Informação de Produto Químico onde há, entre outras informações, valores de toxicidade limite para organismos vivos entre eles a *Daphnia Magna* (<http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia>

/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=FENOL%20SOLUÇÕES). Para o fenol este limite é de 100 mg L^{-1} , inferior ao valor encontrado de fenol mesmo na amostra bruta. Assim os resultados de toxicidade encontrados para a substância em questão não podem ser considerados tóxicos ao organismo vivo estudado.

3.4. Conclusões

Utilizando ferramentas de planejamento de experimentos (Método de Taguchi) foi possível realizar a otimização do processo de tratamento de resíduos de laboratório contendo fenol. O procedimento otimizado permite o tratamento de até 4,5 litros de resíduo contendo concentrações de até 115 mg L^{-1} de fenol, com ou sem agitação, empregando o processo foto-Fenton com irradiação solar, apresentando uma redução de COT superior a 90% e redução de fenol de aproximadamente 100%.

O procedimento otimizado, simples, de baixo custo e eficiente, será recomendado para implantação em todos os laboratórios biológicos da UNESP.

4. Considerações Finais

Este trabalho buscou contribuir com o cenário atual apresentado nas universidades brasileiras, mostrando a importância de se instituir uma cultura de geração responsável de resíduos: onde cada gerador possa tratar seu próprio resíduo. Utilizando métodos fáceis e de simples aplicação tornou possível minimizar um problema compartilhado por laboratórios de biologia molecular nos quais o emprego do brometo de etídeo e do fenol é prática comum. O mesmo ocorre com o formaldeído visto que peças anatômicas utilizadas em aulas práticas precisam ser conservadas e isso é feito por esta substância, mantendo constante seu uso e conseqüentemente a geração de resíduos que a contenham.

As principais contribuições deste trabalho foram:

- 1) Avaliação do desempenho de métodos descritos na literatura ou utilizados tradicionalmente em laboratórios biológicos para tratamento de BE, demonstrando a ineficácia dos tratamentos com hipoclorito de sódio e permanganato de potássio e concluindo assim que os métodos mais eficientes foram nitrito de sódio em meio ácido hipofosforoso e foto-fenton.
- 2) Estudo aprofundado da aplicação de processos oxidativos avançados em amostras "reais", uma vez que embora existam inúmeros trabalhos na literatura que apresentam o comportamento do formaldeído frente a estes processos, foram

realizados empregando soluções padrão desta substância. Este trabalho demonstrou de forma inédita, que as características da matéria orgânica que está presente nos resíduos que contém formaldeído podem influenciar de forma decisiva na eficiência da aplicação do POA.

- 3) O mesmo ocorreu em relação ao fenol que já foi também muito estudado (em soluções-padrão), mas que este trabalho demonstrou que o processo Fenton com irradiação natural pode ser aplicado com sucesso no tratamento de resíduos que contenham fenol em concentração de até 115 mg L⁻¹.

Sugere-se como perspectivas para este trabalho:

- Para os tratamentos de formaldeído e de fenol é necessário diluir o resíduo de partida, para tornar este procedimento menos impactante ao ambiente pode ser empregada água de chuva ou próprio de resíduo tratado como água de diluição.
- Aplicar o procedimento de tratamento de fenol a um resíduo contendo fenol e BE;
- Reaplicar o teste de toxicidade por *Daphnia magna* aos resíduos tratados;
- Confeccionar e distribuir nas unidades da UNESP as cartilhas que contenham os procedimentos aqui apresentados.

Referências

ALBERGUINI, L. B.; SILVA, L. C.; REZENDE, M. O. O. Laboratório de resíduos químicos do campus USP-São Carlos: resultados da experiência pioneira em gestão e gerenciamento de resíduos químicos em um campus universitário. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 291-295, 2003.

AMARAL, S. T.; MACHADO, P. F. L.; PERALBA, M. C. R.; CAMARA, M. R.; SANTOS, T.; BERLEZE, A. L.; FALCÃO, H. L.; MARTINELLI, M.; GONÇALVES, R. S.; OLIVEIRA, E. R.; BRASIL, J. L.; ARAÚJO, M. A.; BORGES, A. C. A. Reporting an experience: recovering and recording residues of teaching laboratories of chemical institute of Federal University of Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 419-423, 2001.

AMES, B. E.; DURSTON, W. E.; YAMASAKI, E.; LEE, F. D. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**. v. 70, p. 2281-2285, 1973.

ARANÃ, J.; MARTINEZ NIETO, J. L.; HERRERA MELIAN, J. A.; DONA RODRÍGUEZ, J. M.; GONÇALVES DIAS, O.; PEREZ PENA, J.; BERGASA, O.; ALVAREZ, C.; MENDEZ, J. Photocatalytic degradation of formaldehyde containing wastewater from veterinarian laboratories. **Chemosphere**, v. 55, p. 893-904, 2004.

BANDARA, J.; MORRISON, C.; KIWI, J.; PULGARIN, C.; PERINGER, C. Degradation/decoloration of concentrated solutions of Orange II. Kinetics and quantum yield for sunlight induced reactions via Fenton type reagents. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 57-66, 1996.

BAREK, J. Destruction of carcinogens in laboratory wastes. **Microchemical Journal**, v. 33, p. 97-101, 1986.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: Ed. Unicamp, 2003.

BAUER, R.; FALLMANN, H. The photo-Fenton oxidation – a cheap and efficient wastewater treatment method. **Research Chemical of the Intermediates**, v. 23, p. 341-354, 1997.

BAUER, R.; WALDNER, G.; FALLMANN, H.; HAGER, S.; KLARE, M.; KRUTZLER, T.; MALATO, S.; MALETZKY, P. The photo-Fenton reaction and the TiO₂/UV process for waste water treatment – novel developments. **Catalysis Today**, v. 53, p. 131-144, 1999.

BENITEZ, F. J.; BELTRÁN-HEREDIA, J.; ACERO, J. L.; RUBIO, F. J. Contribution of free radicals to chlorophenols decomposition by several advanced oxidation process. **Chemosphere**, v. 41, p. 1271-1277, 2000.

BIGDA, R. J. Consider Fenton's chemistry for wastewater treatment. **Chemical and Engineering Progress**, v. 34, n. 2, p. 62-66, 1995.

BINKOVÁ, B.; CERNÁ, M.; PASTORKOVÁ, A.; JELÍNEK, R.; BENES, I.; NOVÁK, J.; SRÁM, R. Biological activities of organic compounds adsorbed onto ambient air particles: comparison between the cities of Teplice and Prague during the summer and winter seasons 2000–2001. **Respiration**

BROMETO de etídeo. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/cbiot/CS/CS_CBiot02.htm>. Acesso em: 05 mar. 2006b.

BROMETO de etídeo. Disponível em: <<http://www.higieneocupacional.com.br/download/2be+hipoclorito>>. Acesso em: 05 de mar. 2006c.

CASERO, I.; SICILIA, D.; RUBIO, S.; PÉREZ-BENDITO, D. Chemical degradation of aromatic amines y Fenton's reagent. **Water Research**, v. 31, n. 8, p. 1985-1995, 1997.

COMPANHIA TECNOLÓGICA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Aprova o Regulamento da Lei n. 997, de 31 de maio de 1976, que dispõe sobre a Prevenção e Controle da poluição do Meio Ambiente. DECRETO n. 8.468, de 8 de setembro de 1976. Diário oficial do Estado de São Paulo, 09 de setembro de 1976.

COMPANHIA TECNOLÓGICA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Manual de Produtos Químicos. Ficha de informação de produto químico. Fenol Soluções. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/produtos/fichacompleta1.asp?consulta=FENOL%20SOLUÇÕES>>. Acesso em: 04 mar.06.

CROMPTON, T. R. **Toxicants in aqueous ecosystem**. New York: John Wiley and Sons, 1997.

CUNHA, C. J. O Programa de gerenciamento dos resíduos laboratoriais do depto de química da UFPR. **Química Nova**, v. 24, n. 3, p. 424-427, 2001.

DE MÉO, M.; LAGET, M.; CASTEGNARO, M.; DUMÉNIL, G. Genotoxic activity of potassium permanganate in acidic solutions. **Mutation Research**, v. 260, p. 295-306, 1991.

DI PALMA, L.; FERRANTELLI, P.; PETRUCCI, E. Experimental study of the remediation of atrazine contaminated soils through soil extraction

and subsequent peroxidation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 99, n. 3, p. 265–276, 2003.

FALEIRO, F. G.; GILVALDO, R.; CERQUEIRA, A. R. R. N.; DAMACENO, V. O.; GOMES, L. M. C.; FALEIRO, A. S. G. Produção de micélio de *Crinipellis pernicioso* em quatro meios de cultura visando extração de DNA. **Fitovirolgia Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 312-315, 2004.

FORTUNY, A.; BENGUA, C.; FONT, J.; FABREGAT, J. Bimetallic catalysts for continuous catalytic wet air oxidation of phenol. **Journal of Hazardous Materials B**, v. 64, p. 181-193, 1999.

GERNJAK, W.; KRUTZLER, T.; GLASER, A.; MALATO, S.; CACERES, J.; BAUER, R.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Photo-Fenton treatment of water containing natural phenolic pollutants. **Chemosphere**, v. 50, p. 71–78, 2003.

GEL de brometo de etídeo. Disponível em: <<http://www.cibio-iq.unicamp.br/regras.htm>>. Acesso em 05 mar. 2006.

HATCHARD, C. G.; PARKER, C. A. A new sensitive chemical actinometer. II Potassium ferrioxalate as a standard chemical actinometer. **Proceedings Research Society A**, v. 235, p. 518-536, 1956.

INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH CANCER. **Formaldehyde**. 1995. v. 62, p. 217. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/iarc/vol62/formal.html>>. Acesso em: 05 mar. 2006.

INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH CANCER. **Fenol**. 1999. v. 71, p. 749. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/iarc/vol71/027-phenol.html>>. Acesso em: 05 mar. 2006.

INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH CANCER. **Formaldehyde**. 2004. v. 88, p. 2-9. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/htdocs/monographs/vol88/formal.html>>. Acesso em: 05 mar. 2006.

ILISZ, I.; DOMBI, A. Investigation of the photodecomposition of phenol in near-UV-irradiated aqueous TiO₂ suspensions. II. Effect of charge-trapping species on product distribution. **Applied Catalysis A: General**, v. 180, p. 35-45, 1999.

JARDIM, W. F. Gerenciamento de resíduos químicos em laboratórios de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 671-673, 1998.

KAVITHA, V.; PALANIVELU, K. The role of ferrous ion in Fenton and photo-Fenton process for degradation of phenol. **Chemosphere**, v. 55, p. 1235-1243, 2004.

KIDAK, R.; INCE, N. H. Ultrasonic destruction of phenol and substituted phenols: a review of current research. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, p. 195-199, 2006.

LEGRINI, O. M.; OLIVEROS, E.; BRAUN, A. M. Photochemical process for water treatment. **Chemical Reviews**, v. 93, p. 671-698, 1993.

LOGDE, J. P. Methods of air sampling and analysis. 3rd ed. USA: Lewis, 1989. p. 274-278.

LUNN, G.; SANSONE, E. B. Destruction and decontamination of solutions. **Analytical Biochemistry**, v. 162, p. 453, 1987.

LUNN, G.; SANSONE, E. B. Validated methods for degrading hazardous chemicals: some alkylating agents and other compounds. **Safety in the Chemical Laboratory**, v. 67, n. 10 A, p. 249-251, 1990.

LUNN, G.; SANSONE, E. B. **Destruction of hazardous chemicals in the laboratory**. 2nd ed. Nova York: John Wiley & Sons, 1994. p. 1-10; 47-55; 183-190.

MACEDO, J. A. B.; ANDRADE, N. J.; CHAVES, J. B. P.; ARAÚJO, J. M. A.; COELHO SILVA, M. T.; JORDÃO, C. P. Formação de trihalometanos em

soluções sanificantes utilizadas no processo de desinfecção de indústria de alimentação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 54, n. 309, p. 216-230, 1999.

MACIEL, R.; SANT'ANNA JR., G. L.; DEZOTTI, M. Phenol removal from high salinity effluents using Fenton's reagent and photo-Fenton reactions. **Chemosphere**, v. 57, p. 711-719, 2004.

MARON D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella Mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173-215, 1983.

MATTOS, I. L.; SHIRAISHI, K. A.; BRAZ, A. D.; FERNANDES, J. R. Peróxido de Hidrogênio: importância e determinação. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 373-380, 2003.

MECOZZI, R.; DI PALMA, L.; MERLI, C. Experimental in situ chemical peroxidation of atrazine in contaminated soil. **Chemosphere**, v. 62, n. 9, p. 1481-1489, 2006.

MORITA, T. **Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparo e purificação**. 2nd ed, São Paulo: Edgard Blucher, 1972.

MOURATO, S.; OZDEMIROGLU, E.; Foster, V. Evaluating health and environmental impacts of pesticides use: implications for the design of ecolabels and pesticides taxes. **Environmental Science and Technology**, v. 34, p. 1456-1461, 2000.

MURPHY, A. P.; BOEGLI, W. J.; PRICE, M. K.; MOODY, C. D. Fenton-like reaction to neutralize formaldehyde waste solutions. **Environmental Science Technology**, v. 23, p. 166-169, 1989.

NOGUEIRA, R. F. P.; GUIMARÃES, J. R. Photodegradation of dichloroacetic acid and 2,4-dichlorophenol by ferrioxalate/H₂O₂ system. **Water Research**, v. 34, p. 895-901, 2000.

NOGUEIRA, R. P. F.; TROVÓ, A. G.; MODÉ, D. F. Solar photodegradation of dichloroacetic acid and 2,4-dichlorophenol using an enhanced photo-Fenton process. **Chemosphere**, v. 48, p. 385-391, 2002.

NOGUEIRA, R. F. P.; OLIVEIRA, M. C.; PATERLINI, W. C. Simple and fast spectrophotometric determination of H₂O₂ in photo-Fenton reactions using metavanadate. **Talanta**, v. 66, p. 86-91, 2005.

NOGUEIRA, R. F. P.; SILVA, M. R. A.; TROVÓ, A. G. Influence of the iron source on the solar photo-Fenton degradation of different classes of organic compounds. **Solar Energy**, v. 79, p. 384-392, 2005.

OLIVEIRA, S. V. W. B.; ZAIAT, M. Gerenciamento de solução de formol em laboratórios de anatomia. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, v. 1, p. 18 -25, 2004.

PAPADAKI, M.; EMERY, R. J.; ABU-HASSAN, M. A.; BUSTOS, A. D.; METCALFE, I. D.; MANTZAVINOS, D. Sonocatalytic oxidation processes for the removal of contaminants containing aromatic rings from aqueous effluents. **Separation Purification Technology**, v. 34, p. 35, 2004.

PIGNATELLO, J. J. Dark and photoassisted Fe³⁺-catalized degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide. **Environmental Science Technology**, v. 26, p. 944-951, 1992.

QUILLARDET, P.; HOFNUNG, M. Ethidium bromide and safety – readers suggest alternative solutions. **Trends Genetic**, v. 4, p. 89, 1988.

SAFARZADEH-AMIRI, A.; BOLTON, J. R.; CARTER, S. R. Ferrioxalate - mediated solar degradation of organic contaminants in water. **Solar Energy**, v. 56, p. 439-444, 1996.

SAFARZADEH-AMIRI, A.; BOLTON, J. R.; CARTER, S. R. Ferrioxalate-mediated photodegradation of organic pollutants in contaminated water. **Water Research**, v. 31, n. 4, p. 787-798, 1997.

SANTOS, A.; YUSTOS, P.; QUINTANILLA, A.; RODRIGUEZ, R.; GARCIA-OCHOA, F. Route of the catalytic oxidation of phenol in aqueous phase. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 39, p. 97-113, 2002.

SANSONE, E. G.; LUNN, G. Decontamination and destruction of chemical carcinogens. **American Laboratory**, v. 39, p. 82-89, 1983.

SINGER, V. L.; LAWLOR, T. E.; YUE, S. Comparison of SYBRw Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the *Salmonella* mammalian microsome reverse mutation assay/Ames test. **Mutation Research**, v. 439, p. 37-47, 1999.

SPACEK, W.; BAUER, R. Heterogeneous and homogeneous wastewater treatment – comparison between photodegradation with TiO₂ and the photo-Fenton reaction. **Chemosphere**, v. 30, p. 477-484, 1995.

TANAKA, Y.; IWASAKI, H.; KITAMORI, S. Biodegradation of herbicide chlornitrofen (CNP) and mutagenicity of its degradation products. **Water Science and Technology**, v. 34, n. 7/8, p. 15-20, 1996.

TORRADES, F.; PEREZ, M.; MANSILLA, H. D.; PERAL, J. Experimental design of Fenton and photo-Fenton reactions for treatment of cellulose bleaching effluents. **Chemosphere**, v. 53, p. 1211-1220, 2003.

TORTUM, A.; CELIK, C.; AYDIN, A. C. Determination of the optimum conditions for tire rubber in asphalt concrete. **Building and Environment**, v. 40, p. 1492-1504, 2005.

TRYBA, B.; MORAWSKI, A. W.; INAGAKI, M.; TOYODA, M. The kinetics of phenol decomposition under UV irradiation with and without H₂O₂ on TiO₂, Fe-TiO₂ and Fe-C-TiO₂ photocatalysts. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 63, p. 215-221, 2006.

TROVÓ, A. G.; VILLA, R. D.; NOGUEIRA, R. F. P. Utilização de reações foto-Fenton na prevenção de contaminantes agrícolas. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 847-851, 2005.

UMBUZEIRO, G. A.; VARGAS, V. M. F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagenese ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. cap. 4, p. 81-112.

WATANABE M.; ISHIDATE JR., M.; NOHMI, T. A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100. **Mutation Research**, v. 216, p. 211-220, 1989.

WILL, I. B. S.; MORAES, J. E. F.; TEIXEIRA, A. C. S. C.; GUASDANI, R.; NASCIMENTO, C. A. O. Photo-Fenton degradation of wastewater containing organic compounds in solar reactors. **Separation and Purification Technology**, v. 34, p. 51-57, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. Adverse effects of chemicals on humans. In: _____. **Hazardous chemicals in human and environmental health: a resource book for school, college and university students**. Genebra: 2000. cap. 3, p. 37-59.

WU, C.; LIU, X.; WEI, D.; FAN, J.; WANG, L. Photosonochemical degradation of Phenol in water. **Water Research**, v. 35, p. 3927, 2001.

WU, D. H.; CHANG, M. S. Use of Taguchi method to develop a robust design for the magnesium alloy die casting process. **Materials Science and Engineering A**, v. 379, p. 366-371, 2004.

YARDIN, G.; CHIRON, S. Photo-Fenton treatment of TNT contaminated soil extract solutions obtained by soil flushing with cyclodextrin. **Chemosphere**, v. 62, p. 1395-1402, 2006.

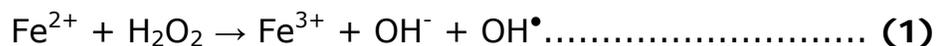
ZEPP, R. G.; FAUST, B. C.; HOIGNÉ, J. Hydroxyl radicals formation in the aqueous reactions (pH 3-8) of iron (II) with hydrogen peroxide: the photo-Fenton reaction. **Environmental Science Technology**, v. 26, p. 313-319, 1992.

APÊNDICE A - Processos Oxidativos Avançados (POAs)

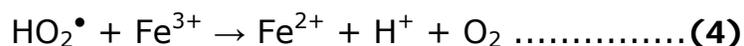
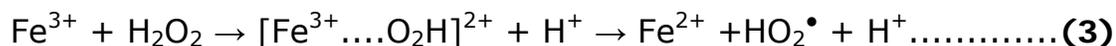
Os POAs têm se apresentado como uma alternativa aos tratamentos de convencionais resíduos graças à sua eficiência em oxidar uma grande variedade de classes de resíduos (LEGRINI, 1993). Principalmente por serem processos capazes de promover a completa mineralização de componentes potencialmente tóxicos, por métodos simples e de baixo custo.

Os POAs são caracterizados por apresentarem propriedades catalíticas, fotoquímicas e oxidativas (MACIEL et al, 2004). São classificados em sistemas homogêneos (agente oxidante e o contaminante estão na mesma fase) e heterogêneos (agente oxidante e o contaminante estão em fases diferentes) (**Quadro 1**). Baseados na geração de espécies oxidantes de alto potencial de oxidação ($E^0 = 2,73$ V

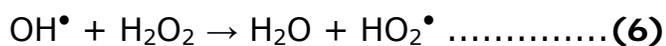
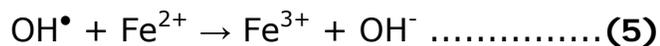
Dentre os processos oxidativos os que empregam reagente de **Fenton** ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$) são uma boa alternativa para remoção de poluentes orgânicos, principalmente quando seu potencial de oxidação é aumentado pelo emprego de irradiação UV-Vis, conhecido como **foto-Fenton** (ZEPP, 1992). O reagente de Fenton é uma mistura oxidativa formada por íons de ferro e peróxido de hidrogênio que produzem radicais hidroxila, e apresentam uma importante característica de serem extremamente reativos e não seletivos (Reações 1 e 2). Foi descoberto há pouco mais de 110 anos (1894), mas sua aplicação na oxidação de contaminantes aconteceu a partir de 1960 (HUANG et al, 1993).



Os íons férricos catalisam a decomposição do peróxido de hidrogênio como mostrado nas Reações 3 e 4.



A decomposição do peróxido é o principal caminho pelo qual o Fe^{2+} é regenerado e os radicais hidroxila podem ser consumidos como apresentado nas Reações 5 e 6:



Geralmente os radicais HO



Assim os POAs têm apresentado um grande potencial para degradar uma grande variedade de compostos orgânicos entre eles clorofenóis e formaldeído (NOGUEIRA, et al. 2002, MURPHY, 1989). Tais processos têm também aplicações de grande interesse comercial como a tratamento de efluentes da indústria de tintas (NOGUEIRA et al. 2005b) além de ser aplicável na remediação de impactos causados por pesticidas em solo (DI PALMA et al. 2003).

Referências

HUANG, C. O. P.; DONG, C.; TANG, Z. Advanced chemical oxidation: its present role and potential future in hazardous waste treatment. **Waste Managent**, vol. 13, p. 361-377, 1993.

LEGRINI, O. M.; OLIVEROS, E.; BRAUN, A. M. Photochemical process for water treatment, **Chemical Review**, v. 93, p. 671-698, 1993.

MACIEL, R.; SANT'ANNA JR., G. L.; DEZOTTI, M. Phenol removal from high salinity effluents using Fenton's reagent and photo-Fenton reactions. **Chemosphere**, v. 57, p. 711-719, 2004.

MURPHY, A. P.; BOEGLI, W. J.; PRICE, M. K.; MOODY, C. D. Fenton-like reaction to neutralize formaldehyde waste solutions. **Environmental Science Technology**, v. 23, p. 166-169, 1989.

NOGUEIRA, R. P. F.; TROVÓ, A. G.; MODÉ, D. F. Solar photodegradation of dichloroacetic acid and 2,4-dichlorophenol using an enhanced photo-Fenton process. **Chemosphere**, v. 48, p. 385-391, 2002.

NOGUEIRA, R. F. P.; OLIVEIRA, M. C.; PATERLINI, W. C. Simple and fast spectrophotometric determination of H_2O_2 in photo-Fenton reactions using metavanadate. **Talanta**. v. 66, p. 86–91, 2005a.

NOGUEIRA, R. F. P.; SILVA, M. R. A.; TROVO, A. G. Influence of the iron source on the solar photo-Fenton degradation of different classes of organic compounds. **Solar Energy**, v. 79, p. 384–392, 2005b.

SAFARZADEH-AMIRI, A.; BOLTON, J. R.; CATER, S. R. Ferrioxalate-mediated photodegradation of organic pollutants in contaminated water. **Water Research**. v. 31, n. 4, p. 787-798, 1997.

ZEPP, R. G.; FAUST, B. C.; HOIGNÉ, J. Hydroxyl radicals formation in the aqueous reactions (pH 3-8) of iron (II) with hydrogen peroxide: the photo-Fenton reaction. **Environmental Science Technology**, v. 26, p. 313-319, 1992.

APÊNDICE B - Mutagenicidade

A necessidade de se reconhecer e regular agentes mutagênicos ambientais fez-se urgente frente ao acúmulo de dados que relacionam mutagenicidade e carcinogenicidade. Assim no início dos anos 80 os órgãos de saúde pública e as agências ambientais acrescentaram testes de mutagenicidade à lista de propriedades tóxicas a serem avaliadas antes que agentes químicos, aditivos de alimentos e medicamentos fossem introduzidos no mercado (UMBUZEIRO e VARGAS, 2003). A cada ano milhares de substâncias novas são lançadas e os efeitos que elas poderão causar a médio e longo prazo não podem ser avaliados. Existem autores que defendem o fato que a exposição a substâncias com potencial mutagênico e de origem ambiental é pequena se comparada ao potencial do cigarro, por exemplo, (MARON e AMES, 1983). A preocupação a respeito da exposição humana a agentes químicos ambientais se justifica no risco de que uma exposição adicional representa um aumento na carga mutagênica e este risco precisa ser avaliado (UMBUZEIRO e VARGAS, 2003). Uma ferramenta bastante empregada nos testes de mutagenicidade é o teste com *Salmonella typhimurium* ou teste de Ames.

Teste de Mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*

(UMBUZEIRO e VARGAS, 2003)

Entre as diversas abordagens para se avaliar a atividade mutagênica de uma substância está o teste de Ames ou teste com *Salmonella*. É a metodologia de triagem mais utilizada por diversos laboratórios e é tida como ferramenta fundamental para definir a potencialidade de ação genotóxica cancerígena.

O teste de Ames, o qual detecta mutação gênica em *Salmonella thyphimurium*, é um teste de mutação reversa, o qual utiliza várias linhagens testes específicas para detecção de mutações de ponto. Uma vez que a genética de cada linhagem teste é bem definida, é possível identificar o tipo específico de efeito genético (isto é, substituição de base, mutação "frameshift") induzido por agentes que são ativos neste sistema. Em adição à caracterização genética, o teste de Ames tem várias outras vantagens, as quais fazem com que ele seja sempre incluído em uma bateria mínima de testes. O teste é fácil de ser realizado e é utilizado rotineiramente em laboratórios que realizam testes de Genética Toxicológica. Como resultado do seu amplo uso, o teste é bem validado e existe um extenso banco de dados de substâncias químicas já testadas.

Várias linhagens, com sensibilidade específica a determinadas classes de substâncias, têm sido selecionadas. As linhagens apresentam características genéticas adicionais que lhes conferem maior sensibilidade na detecção de diversos tipos de agentes mutagênicos:

Mutação no gene *hisD3052* constituído de 8 resíduos repetidos de -GC-, próximo ao local da mutação de deslocamento do quadro de leitura do **gene *hisD***, o qual codifica a enzima histidinol desidrogenase, específica da TA98.

Mutação no gene *hisG46*, está no quadro de leitura do **gene *hisG***, o qual codifica a primeira enzima para a síntese de histidina, específica da TA100.

Mutação rfa: gera perda parcial da barreira de lipopolissacarídeos da parede bacteriana, facilitando a difusão de moléculas grandes para o interior da célula, como aminas aromáticas, hidrocarbonetos e aflatoxinas.

Mutação *uvrB*: Provoca dano no sistema de reparo por excisão, resultando no aumento da sensibilidade na detecção de diversos agentes mutagênicos, deixando a bactéria dependente de biotina para crescer.

Plasmídio pKM101: favorece a resistência a ampicilina, assim como aumenta a mutagênese espontânea e química, por estímulo de reparo de DNA promotor de erro.

O Quadro 2 resume as características das principais linhagens utilizadas no teste de Ames.

Quadro 2 Principais características das linhagens usadas no teste de Ames.

Linhagem	Mutação his	Tipo de mutação
TA1535	<i>hisG46</i>	Substituição de pares de bases
TA1537	<i>hisC3076</i>	Deslocamento do quadro de leitura
TA1538	<i>hisD3052</i>	Deslocamento do quadro de leitura
TA97A	<i>hisD6610</i>	Deslocamento do quadro de leitura
TA98	<i>hisD3052</i>	Deslocamento do quadro de leitura
TA100	<i>hisG46</i>	Substituição de pares de bases
TA102	<i>hisG428</i>	Substituição de pares de bases
TA104	<i>hisG428</i>	Substituição de pares de bases

Protocolo para teste de Ames (Adaptado de AMES et al, 1973)

Quando o objetivo é uma triagem, costuma-se empregar as linhagens TA98 e TA100, que são eficientes na detecção de um grande número de de agentes mutagênicos. Mas se for análise par fins

regulatórios é recomendado usar uma bateria mínima com: TA98, TA100, TA97 ou TA1537. Ou as cepas recomendadas pela literatura.

Aliado aos testes clássicos é recomendado que se faça teste de Ames utilizando a fração S9. Que consiste no teste de mutagenicidade com sistema de ativação metabólica, realizado com a fração microsomal S9 (S9 mix), preparada a partir do homogeneizado de fígado de ratos *Sprague Dawley*, previamente tratado com Arocloror 1254, adquiridos sob a forma liofilizada (MARON e AMES, 1983).

As cepas são armazenadas em freezer a -80°C , em frascos para congelamento com 0,9 mL de cultura e 0,1 mL de DMSO como agente crioprotetor, para que se mantenham inalteradas todas suas características genéticas. Foi utilizado o método de pré-incubação em tampão fosfato pH 7,4 nos sistemas sem ativação metabólica.

Soluções Empregadas

1) Meio Vogel Bonner 50X

0,25 g de Sulfato de Magnésio.

2,5 g de Ácido Cítrico

12,5 g de Fosfato de potássio dibásico

4,35 g de Fosfato de Sódio e Amônio

16,75 mL de água destilada.

2) Glicose 40%

20 g de Glicose

50 mL de água destilada.

3) Agar mínimo Glicosado (AMG)

7,5g de ágar

465 mL de água destilada

4) Top Agar

0,5 g de Cloreto de Sódio

0,6 g de agar

100 mL de água destilada

5) Biotina/Histidina

0,00123 g de biotina

0,00096 g de histidina

10 mL de água destilada.

6) Caldo Nutriente (meio Oxoid nº2)

0,75 g de Meio Oxoid nº2

30 mL de água destilada

Todas as soluções foram esterilizadas em autoclave durante 15 minutos à 121 °C.

Procedimento sem o sistema de ativação metabólica**✓ 1º dia**

Prepara-se todas as soluções e os meios de cultura descritos como descritos anteriormente.

Em fluxo laminar, foi adicionado à solução esterilizada AMG 10 mL de VB e 25 mL de glicose 40%, homogeneizou-se, e distribuiu-se cerca de 25 mL dessa solução em cada placa. As placas são mantidas em repouso por 48 horas em estufa a 37°C para posterior utilização.

✓ 2º dia

Em fluxo laminar, as cepas de *S. thyphimurium* foram inoculadas com alça de platina, no caldo nutriente e mantidas a 37°C, sob agitação

A RM é dada pela seguinte equação:

$$RM = \frac{\text{Média do nº de revertentes por placa teste (espontâneos + Induzidos)}}{\text{Média do nº de revertentes por placa do controle negativo (espontâneos)}}$$

Referências

AMES, B. E.; DURSTON, W. E.; YAMASAKI, E.; LEE, F. D. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 70, p. 2281-2285, 1973.

MARON D. M.; AMES B. N. Revised methods for the Salmonella Mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173-215, 1983.

UMBUZEIRO, G. A.; VARGAS, V. M. F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Editora Ulbra, 2003. cap. 4, p. 81-112.

**APÊNDICE C - Preparo de Soluções e Procedimentos de
destruição de resíduos**

Preparo de Solução			1
Preparo de 100 mL de Ácido Hipofosforoso (H₃PO₂) 5%			
Reagentes	Cálculos	EPI	
Ácido Hipofosforoso 50% Água destilada	$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ $50 \times V_1 = 5 \times 100$ $V_1 = 10 \text{ mL.}$	Avental Luvas de nitrila Óculos de segurança	
Equipamentos	Procedimento		
Pipeta volumétrica de 10 mL. Pipetador ou pêra. Balão volumétrico (BV) de 100 mL.	1) Colocar 2/3 do volume do BV de água destilada. 2) Tomar 10 mL de Ácido Hipofosforoso 50% e adicionar no BV. 3) Completar o volume com água destilada até o menisco do balão. 4) Transferir a solução para frasco vidro e rotular de acordo com procedimento 9.		
Obs. Colocar sempre o ácido sobre a água e só então completar o volume do balão volumétrico.			

Preparo de Solução			2
Preparo de 100 mL de Nitrito de Sódio (NaNO₂) 0,5 mol L⁻¹			
Reagentes	Cálculos	EPI	
Nitrito de Sódio, MM = 69 g mol ⁻¹ Água destilada	$m = M \times MM \times V(L)$ $m = 0,05 \times 69 \times 0,1$ $m = 0,345 \text{ g}$	Avental Luvas de Nitrila	
Equipamentos	Procedimento		
Balança Espátula Béquer 50 mL Balão volumétrico (BV) de 100 mL.	1) Pesar 0,345 g de NaNO ₂ no béquer. 2) Colocar 40 mL de água destilada e solubilizar o nitrito totalmente. 3) Transferir a solução para o BV e em seguida completar com água até o menisco. 4) Transferir a solução para frasco vidro e rotular de acordo com procedimento 9.		

Preparo de Solução			3
Preparo de 100 mL de Sulfato ferroso (FeSO₄).0,1 mol L⁻¹			
Reagentes	Cálculos	EPI	
Sulfato ferroso, MM = 278 g mol ⁻¹ Ácido Sulfúrico (H ₂ SO ₄) Água destilada	$m = M \times MM \times V(L)$ $m = 0,1 \times 278 \times 0,1$ $m = 2,78 \text{ g}$	Avental Luvas de nitrila Óculos de segurança	
Equipamentos	Procedimento		
Balança Espátula Béquer 50 mL Balão volumétrico (BV) de 100 mL.	1) Pesar 2,78g de FeSO ₄ no béquer. 2) Colocar 80 mL de água destilada. 3) Acrescentar 10 mL de H ₂ SO ₄ concentrado e solubilizar o sulfato totalmente. 3) Transferir a solução para o BV e em seguida completar com água até o menisco. 4) Transferir a solução para frasco vidro e rotular de acordo com procedimento 9.		

Preparo de Solução			4
Preparo de 50 mL de Nitrato Férrico (Fe(NO₃)₃) 1,8 mol L⁻¹			
Reagentes	Cálculos	EPI	
Nitrato férrico, MM = 404 g mol ⁻¹ Água destilada	$m = M \times MM \times V(L)$ $m = 1,8 \times 404 \times 0,050$ $m = 36,36 \text{ g}$	Avental Luvas de Nitrila	
Equipamentos	Procedimento		
Balança Espátula Béquer 50 mL Balão volumétrico (BV) de 50 mL.	1) Pesar 36,36 g de Fe(NO ₃) ₃ no béquer. 2) Colocar 40 mL de água destilada e solubilizar o nitrato totalmente. 3) Transferir a solução para o BV e em seguida completar com água até o menisco. 4) Transferir a solução para frasco vidro e rotular de acordo com procedimento 9.		

Preparo de Solução			5
Preparo de 50 mL de Oxalato de Potássio (K₂C₂O₄) 1,8 mol L⁻¹			
Reagentes	Cálculos	EPI	
Oxalato de Potássio (K ₂ C ₂ O ₄), MM=184 g mol ⁻¹ Água destilada	$m = M \times MM \times V(L)$ $m = 1,8 \times 184 \times 0,05$ $m = 16,56g$	Avental Luvas e Nitrila	
Equipamentos	Procedimento		
Balança Espátula Béquer 50 mL Balão volumétrico (BV) de 50 mL	1) Pesar 16,56g de K ₂ C ₂ O ₄ no béquer. 2) Colocar 40 mL de água destilada e solubilizar o oxalato totalmente, usar chapa aquecedora. 3) Transferir a solução para o BV e em seguida completar com água até o menisco. 4) Transferir a solução para frasco vidro e rotular de acordo com procedimento 9.		

Preparo de Solução			6
Preparo e purificação de Ferrioxalato de potássio ($K_3Fe(C_2O_4)_3 \cdot 3H_2O$)			
Reagentes	Cálculos	EPI	
Solução $K_2C_2O_4$ 1,8 mol L ⁻¹ Solução $Fe(NO_3)_3$ 1,8 mol L ⁻¹		Avental Luvas de Nitrila	
Equipamentos	Procedimento		
Béquer 100 mL Bastão de vidro. Chapa aquecedora com agitação.	1) Tomar 17 mL de $Fe(NO_3)_3$ 1,8 mol L ⁻¹ (procedimento 4.) 2) Verter sobre o nitrato férrico 50 mL de $K_2C_2O_4$ 1,8 mol L ⁻¹ (procedimento 5). 3) Adicionar um cristal para funcionar como núcleo, caso não possua atritar um bastão de vidro contra o fundo do béquer. 4) Deixar na geladeira por 24 horas. 5) Após as 24 horas, descartar a solução sobrenadante e solubilizar os cristais formados no menor volume de água destilada possível. Pode ser feito em chapa aquecedora com agitação, em temperatura máxima de 40° C, fazer, repetir mais duas vezes o este passo. 6) Descartar o sobrenadante, secar em estufa 7) Transferir os cristais para frasco e rotular de acordo com procedimento 9, armazenar ao abrigo de luz..		

Preparo de Solução			7
Preparo de 100 mL de Ferrioxalato de Potássio (K₃Fe(C₂O₄)₃ · 3H₂O 0,1mol L⁻¹			
Reagentes	Cálculos	EPI	
Ferrioxalato de Potássio MM = 491 g mol ⁻¹ Água destilada	$m = M \times MM \times V(L)$ $m = 0,1 \times 491 \times 0,1$ $m = 4,91g$	Avental Luvas de Nitrila	
Equipamentos	Procedimento		
Balança Espátula Béquer 50 mL Balão volumétrico (BV) de 50 mL	1) Pesar 4,91 g de K ₃ Fe(C ₂ O ₄) ₃ no béquer. 2) Colocar 80 mL de água destilada e solubilizar o ferrioxalato totalmente. Pode ser feito em chapa aquecedora com agitação, em temperatura máxima de 40° C. 3) Transferir a solução para o BV e em seguida completar com água até o menisco. 4) Transferir a solução para frasco vidro e rotular de acordo com procedimento 9.		

Preparo de Solução			8
Preparo de 100 mL de KMnO₄			
Reagentes	Cálculos	EPI	
Sulfato ferroso Ácido Sulfúrico (H ₂ SO ₄) Água destilada	$m = M \times MM \times V(L)$ $m = 0,1 \times 278 \times 0,1$ $m = 2,78 g$	Avental Luvas de Nitrila	
Equipamentos	Procedimento		
Balança Espátula Béquer 50 mL Balão volumétrico (BV) de 25 mL.	1) Pesar 2,78 g de FeSO ₄ no béquer. 2) Colocar 40 mL de água destilada e solubilizar o sulfato totalmente. 3) Acrescentar 2,5 mL de H ₂ SO ₄ . 3) Transferir a solução para o BV e em seguida completar com água até o menisco. 4) Transferir a solução para frasco vidro e rotular de acordo com procedimento 9.		

Preparo de rótulo para soluções	
Um rótulo deve conter:	9
<ol style="list-style-type: none">1. Nome e fórmula da substância.2. Concentração da solução.3. Dia do preparo.4. Responsável pelo preparo.	
Exemplo	
<div style="border: 1px solid black; padding: 10px; width: fit-content; margin: 0 auto;"><p>Nitrito de Sódio (NaNO₂) – 0,5 mol L⁻¹ 04/07/2005 Luísa</p></div>	

Procedimento de Degradação			10
Procedimento para tratar 600 mL de resíduo de Formaldeído por Processo foto-Fenton solar			
Reagentes	Cálculos	EPIs	
1) Ferrioxalato de Potássio - $(K_3Fe(C_2O_4)_3 \cdot 3H_2O)$ - $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (Procedimento 7) 2) Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) 9 mol L^{-1} 3) Resíduo de formaldeído	Concentração necessária de $(K_3Fe(C_2O_4)_3 \cdot 3H_2O)$ é $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ $0,1 \times V_1 = 0,5 \times 10^{-3} \times 600$ $V_1 = 3 \text{ mL}$. Concentração necessária de H_2O_2 é 1 mol L^{-1} $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ $9 \times V_1 = 1 \times 600$ $V_1 = 67 \text{ mL}$.	Avental Luvas de nitrila Calça comprida Sapato fechado Óculos de segurança	
Equipamentos	Procedimento		
1) Proveta 2) pHmetro 3) Bastão de vidro 4) Empregar esquema mostrado na Foto 1 .	1) Para 15 mL de resíduo de formaldeído acrescentar 513 mL de água de torneira. 2) Acertar o pH da solução para o intervalo de 2,5-3,0. 3) Juntar 3 mL $K_3Fe(C_2O_4)_3 \cdot 3H_2O$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e 5 mL H_2O_2 9 mol L^{-1} . Misturar com bastão de vidro. 3) Deixar sob irradiação solar* por um período mínimo de 3 horas. 4) Após 24 horas do término da irradiação, acertar o pH da solução para o intervalo 6-9 usando H_2SO_4 ou $NaOH$ 1 mol L^{-1} e descartar em seguida na rede de esgoto.		
Obs.1) As etapas 1 e 2 devem ser realizadas em capela de exaustão. 2) Este procedimento deve ser empregado preferencialmente em dia de céu claro. 3) A diluição pode ser feita empregando água de chuva ou a própria solução de resíduo depois de tratada.			

Procedimento de Degradação			10
Procedimento para tratar 1L de resíduo de Fenol por Processo foto-Fenton			
Reagentes	Cálculos	EPIs	
1) Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (Proc. 3) 2) Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ 3) Brometo de Etídeo até $0,5 \mu\text{g/mL}$	Concentração necessária de FeSO_4 é $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ $0,1 \times V_1 = 0,5 \times 10^{-3} \times 1$ $V_1 = 5 \text{ mL}$. Concentração necessária de H_2O_2 é 30 mmol L^{-1} $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ $9 \times V_1 = 30 \times 10^{-3} \times 1$ $V_1 = 3,3 \text{ mL}$.	Avental Luvas de nitrila Calça comprida Sapato fechado	
Equipamentos	Procedimento		
1) Empregar esquema mostrado na Foto 1 .	1) Pegar 1L de resíduo de fenol. 2) Acertar o pH da solução para o intervalo de 2,5-3,0. Misturar com bastão de vidro. 3) Juntar 5 mL $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; 3,3 mL H_2O_2 9 mol L^{-1} Deixar sob irradiação solar por um período mínimo de 3 horas. 4) Acertar o pH da solução para o intervalo 6-8 usando H_2SO_4 ou NaOH 1 mol L^{-1} e descartar em seguida na rede de esgoto.		
Obs. As etapas 1 e 2 devem ser realizadas em capela de exaustão. 2) Este procedimento deve ser empregado preferencialmente em dia de céu claro. 3) Caso o resíduo esteja nos frascos descartáveis (<i>eppendorf</i>) devem ser primeiramente lavados com água de torneira, um a um com um volume igual a duas vezes sua capacidade que é de 2 mL. Posteriormente ficaram num banho por 24 horas, sendo que está água foi trocada 2x e as águas de lavagem também foram empregadas no estudo de degradação.			

Procedimento de Degradação			11
Procedimento de tratamento de BE com Ácido hipofosforoso (H₃PO₂) e Nitrito de Sódio (NaNO₂)			
Reagentes	Equipamentos	EPIs	
1) ácido hipofosforoso (HPO ₂) 5% (Proc. 1) 2) Nitrito de sódio (NaNO ₂) 0,5 mol L ⁻¹ (Proc. 2) 3) Brometo de Etídeo 0,5 µg/mL	Qualquer recipiente de capacidade superior a 100 mL. Para grandes volumes empregar esquema mostrado na Foto 1 .	Avental Calça comprida Luvas de nitrila Sapato fechado	
Procedimento			
1) Para cada 100 mL de BE (de concentração até 0,5 µg/mL) acrescentar 20 mL de ácido hipofosforoso 5% e 12 mL de nitrito de sódio 0,5 mol L ⁻¹ . Agitar com bastão de vidro lentamente e manter em repouso por 24 horas. 2) Acertar o pH da solução para o intervalo 6-8 usando H ₂ SO ₄ ou NaOH 1 mol L ⁻¹ . 3) Manter a solução em repouso por um período mínimo de 12 horas, descartar em seguida na rede de esgoto.			
Obs.O procedimento deve ser realizado em capela de exaustão.			

Procedimento de Degradação			12
Procedimento para tratamento de 200 mL de BE por Processo Fenton			
Reagentes	Equipamentos	EPIs	
1) Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (Proc. 3) 2) Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ 3) Resíduo de Brometo de Etídeo	1).Empregar esquema mostrado na Foto 1 . Capacidade do recipiente compatível com volume a ser tratado.	Avental Calça comprida Luvas de nitrila Sapato fechado	
Procedimento			
1) Juntar $1,5 \text{ mL FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $1 \text{ mL H}_2\text{O}_2$ $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, $197,5 \text{ mL}$ de resíduo de BE até $0,5 \mu\text{g/mL}$. 2) Acertar o pH da solução para o intervalo 6-8 usando H_2SO_4 ou NaOH 1 mol L^{-1} . 3) Manter a solução em repouso por um período mínimo de 12 horas, descartar em seguida na rede de esgoto.			
Obs. O procedimento deve ser realizado em capela de exaustão.			



Foto 1) Caixa plástica tampada com vidro empregada como reator

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)