



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM RECURSOS NATURAIS DO CERRADO

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
Pró Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Câmpus de Ciências Exatas e Tecnológicas
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais do Cerrado**

**Desenvolvimento de microdispositivos para detecção e
biorremediação de compostos fenólicos**

Discente: Denes Ferraz de Souza

Orientador: Flávio Marques Lopes



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM RECURSOS NATURAIS DO CERRADO

Anápolis

2018

DENES FERRAZ DE SOUZA

**Desenvolvimento de microdispositivos para detecção e
biorremediação de compostos fenólicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Recursos Naturais do Cerrado, da Universidade Estadual de Goiás para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais do Cerrado. Orientador (a): Prof. Dr. Flávio Marques Lopes.

Anápolis

2018

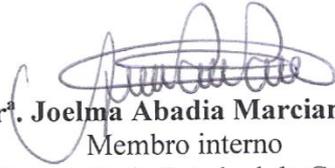
DENES FERRAZ DE SOUZA

DESENVOLVIMENTO DE
MICRODISPOSITIVOS PARA DETECÇÃO E
BIORREMEDIAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS

Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos
Naturais do Cerrado da Universidade Estadual de Goiás,
para a obtenção do grau de Mestre, aprovada em 07 de fevereiro de 2018, pela
Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:


Prof. Dr. Flávio Marques Lopes
Presidente da banca
Universidade Federal de Goiás


Prof.ª Dr.ª Ellen Flávia Moreira Gabriel
Membro externo
Universidade Federal de Goiás


Prof.ª Dr.ª Joelma Abadia Marciano de Paula
Membro interno
Universidade Estadual de Goiás

Agradecimentos

Com o intuito de não me arriscar a esquecer o nome das diversas pessoas especiais em minha vida e que contribuíram tanto de maneira direta como indireta para o desenvolvimento desta pesquisa, direciono meus agradecimentos apenas às seguintes instituições e pessoas:

À Universidade de Estadual de Goiás que, por meio da Central de Bolsas, possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa. Ao meu orientador, Dr. Flávio Marques Lopes, pela excelente orientação, essa que foi indispensável à conclusão deste trabalho. Ao professor Dr. Wendell Koltro que disponibilizou os recursos do laboratório de microfluídica e orientou desenvolvimento dos dispositivos. À professora Dr^a Mariangela Fontes Santiago por disponibilizar o laboratório de enzimologia para realização de parte dos experimentos. Ao Dr. Paulo de Tarso Garcia pela grande contribuição na execução dos ensaios experimentais. Ao Msc. Werther Pereira Ramalho pela colaboração nas análises estatísticas.

Sumário

1. Contextualização	13
1.1 Processo de ocupação e industrialização.....	13
1.2 Efluentes fenólicos: características	13
1.3 Métodos de detecção de compostos fenólicos.....	15
1.4 Detecção colorimétrica.....	15
1.5 Técnicas de tratamento de efluentes fenólicos	16
1.5.2 Fotocatálise.....	17
1.5.3 Biorremediação	17
1.6 Desenvolvimento de sistemas miniaturizados.....	20
2. Objetivos	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
4. Referencias	22
ARTIGO I	11
1. Introdução	28
2. Material e métodos	29
Materiais e Reagentes.....	29
Instrumentação	29
Desenvolvimento dos microdispositivos de papel	29
Ensaio	30
Determinação do limite de detecção e da sensibilidade do dispositivo.....	31
Detecção colorimétrica.....	31
Curvas analíticas	33
Testes de recuperação.....	33
Amostras reais	33
Teste de prateleira	34
Testes estatísticos	34
3. Resultados e Discussão	34

Concentração de Carbonato de sódio	34
Curvas analíticas no microdispositivo de papel	36
Ensaio de Recuperação.....	38
Teste com amostra real.....	39
Teste de prateleira	39
4. Considerações Finais.....	40
5. Referencias.....	41
ARTIGO II.....	43
1. Introdução	44
2. Material e Métodos	45
Materiais e Reagentes.....	45
Coleta dos frutos	46
Processamentos dos frutos e obtenção dos extratos brutos	46
Prospecção enzimática de frutos	46
Impressão do dispositivo 3D.....	47
Ensaio de degradação	48
Biorremediação sem a presença de luz.....	48
Biorremediação com a presença de luz	49
TiO ₂ sem a presença de luz.....	49
Fotodegradação com TiO ₂	49
Ensaio sinérgico	50
Quantificação do percentual de degradação.....	50
3. Resultados	50
Prospecção enzimática	50
Ensaio de biorremediação e fotodegradação	51
4. Considerações finais.....	57
5. Referencias.....	58

Resumo:

A contaminação de ambientes aquáticos por resíduos sólidos e líquidos é um sério problema que causa danos à biodiversidade. Os efluentes fenólicos são exemplo de contaminantes que são lançados na natureza sem o devido tratamento e causam distúrbios ambientais, podendo dar início a processos carcinogênicos e também causar danos severos ao sistema nervoso central. Tais compostos são frequentemente desprezados no meio ambiente em concentrações extremamente elevadas. Os tratamentos biológicos e os processos oxidativos avançados são as técnicas que podem ser utilizadas para a degradação desses compostos, onde se destacam a fotodegradação tendo o TiO_2 como catalisador e biorremediação promovida por enzimas que podem ser obtidas a partir de vegetais. Desta maneira, este trabalho teve como propósito o desenvolvimento de dois dispositivos, sendo um a base de papel e impresso a cera, para detecção colorimétrica e quantificação de compostos fenólicos e outro impresso tridimensionalmente e acoplado a luzes de diferentes espectros luminosos, capaz de simular, em escala micro, testes de biorremediação e fotodegradação, possibilitando também processos sinérgicos. O dispositivo de papel desenvolvido apresenta precisão na detecção de compostos fenólicos totais em concentrações a partir de 25 mg/L, e pode ser utilizado como uma ferramenta de controle ambiental. A prospecção enzimática indicou que o fruto do Cerrado, *Philodendron bipinnatifidum* é uma excelente fonte de polifenoloxidase (392,2 unidades enzimáticas) com elevado potencial de biorremediação de compostos fenólicos. O dispositivo 3D apresentou capacidade para simulação de testes de fotodegradação e biorremediação de compostos fenólicos, especialmente quando foram tais métodos foram aplicados sinergicamente e com o uso de radiação UV onde a concentração do composto foi reduzida de 1000 mg/L para 301,48 mg/L (69,85%).

Palavras chave: biorremediação, fotodegradação, polifenoloxidase, dispositivo de papel, dispositivo 3D, detecção colorimétrica.

Abstract

Contamination of aquatic environments by solid and liquid waste is a serious problem that causes damage to biodiversity. Phenolic effluents are examples of contaminants that are released into the wild without proper treatment and cause environmental disturbances, which can initiate carcinogenic processes and also cause severe damage to the central nervous system. Such compounds are often neglected in the environment at extremely high concentrations. The biological treatments and the advanced oxidative processes are the techniques that can be used degradation of these compounds, where they stand out the photodegradation having the TiO₂ as catalyst and bioremediation promoted by enzymes that can be obtained from vegetables. In this way, the purpose of this work was to develop two devices, one paper-based and wax-printed, for colorimetric detection of quantification of phenolic compounds and another three-dimensional printed and coupled to lights of different luminous spectra, capable of simulating micro scale, bioremediation and photodegradation tests, also allowing synergic processes. The developed paper device presents accuracy in the detection of total phenolic compounds at concentrations of 25 mg / L and can be used as an environmental control tool. Enzymatic prospecting indicated that the fruit of the Cerrado, *Philodendron bipinnatifidum* is an excellent source of polyphenoloxidase (392.2 enzymatic units) with a high potential for bioremediation of phenolic compounds. The 3D device was able to simulate photodegradation and bioremediation tests of phenolic compounds, especially when such methods were applied synergistically and with the use of UV radiation where the concentration of the compound was reduced from 1000 mg / L to 301.48 mg / L (69.85%).

Key words: bioremediation, photodegradation, polyphenoloxidase, paper device, 3D device, colorimetric detection.

Lista de figuras

Contextualização

Figura 1: esquema de uma estação de tratamento de efluentes utilizando lodo ativo, empregado no tratamento de efluentes têxtil..... 19

Artigo 1

Figura 1: ilustração das etapas de desenvolvimento do microdispositivo a base de papel impresso em cera. 30

Figura 2: ilustração das etapas da análise das intensidades da reação colorimétrica. Na etapa A o microdispositivo com as microzonas onde ocorreram a reação colorimétrica, na etapa B é mostrado o scanner utilizado para a captura da imagem com as intensidades de cor em cada uma das microzonas, em C ocorre a escolha da área com maior uniformidade de cor para que na etapa D, seja utilizada a função histograma do *software* de análise de imagens ImageJ para obter os valores relativos a quantidade de pixels. 32

Figura 3: gráfico com a variação da intensidade de cor em função da concentração de Carbonato de Sódio (Na_2CO_3). 35

Figura 4: gráfico de barras com a variação da intensidade de cor em função da concentração do composto Fólin-Ciocalteu. 36

Figura 5: Curvas analíticas com as variações de cor em função da concentração dos compostos fenólicos analisados (Ácido Gálico, Catecol, Pirogalol e Vanilina). 37

Figura 6: gráfico com a intensidade de cor obtida de cada composto fenólico a uma concentração de 1000 m/L..... 38

Figura 7: gráfico ilustrativo com a intensidade cor gerada no teste de prateleira, com trinta dias de armazenamento do dispositivo..... 40

Artigo 2

Figura 1: esquema do processo de criação de um modelo tridimensional no software gráfico, onde em A o arquivo SLT é exportado para um software CAM, em B ocorre a configuração dos parâmetros de impressão e em C observa-se o início do processo de impressão. 48

Figura 2: dispositivo de fotodegradação e biorremediação de compostos fenólicos 48

Figura 3: gráfico de barras com os resultados da prospecção enzimática dos frutos *Solanum paniculatum* L., *Solanum lycocarpum* A. St. -Hil, *Genipa americana* L., *Eugenia uniflora* L., *Philodendron bipinnatifidum* Schott. 51

Figura 4. gráfico ilustrando o potencial de degradação do ensaio de biorremediação e do TiO_2 sem a presença dos diferentes espectros luminosos. 52

Figura 5: gráfico ilustrando o potencial de degradação do ensaio de biorremediação com a presença dos diferentes espectros luminosos.....	54
Figura 6: gráfico representando o potencial do ensaio de fotodegradação com TiO ₂ exposto aos diferentes espectros luminosos.....	54
Figura 7: gráfico representando o potencial de degradação do ensaio sinérgico utilizando TiO ₂ e polifenoloxidase e a exposição à diferentes espectros luminosos durante diferentes intervalos de tempo.....	56
Figura 8: gráfico comparando o potencial de degradação dos ensaios de biorremediação com presença de luz, fotodegradação e sinergismo mediante aos tratamentos de exposição aos diferentes espectros luminosos.	57

Lista de tabelas

Artigo I

Tabela 1: concentrações dos reagentes usados para a detecção colorimétrica de compostos fenólicos.	31
Tabela 2: valores relativos às concentrações reais, estimadas e o percentual de precisão do ensaio de recuperação.	38

Siglas e abreviações

BR: branca

IV: infravermelha

AOP's: processos oxidativos avançados

CONAMA: Conselho Nacional de Meio Ambiente

DPI: Dots Per Inch

EAD: detecção de arranjo elétrico

EAG: equivalentes de ácido gálico

EC: Enzyme Commission Numbers

ECD :detecção eletroquímica

FDM: modelagem por fusão e deposição

GO: Goiás

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LD: limite de detecção

LED: Light Emitting Diode

LOM: fabricação de objeto laminado

M: mol

mg/L: miligramas por litro

MS: espectrometria de massas

pH: percentual hidrogeniônico

PADs: dispositivos analíticos a base de papel

RMN: detecção de arranjo nuclear

SLS: sintetização seletiva a laser

TNT: tecido não tecido

UV: ultravioleta

μL: microlitro

μTAS: sistemas miniaturizados para análises totais

3D; 3 dimensões

1. Contextualização

1.1 Processo de ocupação e industrialização

O crescimento populacional e industrial das últimas décadas causou sérios problemas à saúde humana e também à natureza, com isso a responsabilidade ambiental tem aumentado e diversos países estão se esforçando para atingir a auto sustentabilidade, conseguindo assim obter o progresso industrial sem colocar em risco a qualidade dos recursos hídricos e a biodiversidade para as futuras gerações (Silva, 2005).

As ações antrópicas durante o processo de ocupação e industrialização do território brasileiro são alguns dos principais fatores que levaram à degradação dos ecossistemas aquáticos e terrestres, devido as práticas não sustentáveis realizadas ao longo do tempo, como o excesso de desmatamento e produção de resíduos sólidos e líquidos (Cruz, 2016; Weyermüller, 2010).

Um dos principais desafios que a humanidade está enfrentando no século XXI, é a baixa disponibilidade de recursos hídricos causada pelo mal planejamento em relação ao uso e ocupação do solo, que acabam levando à poluição dos corpos hídricos bem como dos aquíferos (águas subterrâneas) (Lucas et al., 2010).

Entre as ações antrópicas que geram danos ao meio ambiente, está o descarte inadequado de efluentes de alta toxicidade que as indústrias de diversos seguimentos como refinarias, fábricas de tintas e corantes, indústrias farmacêuticas e têxteis que, no processo de produção geram resíduos com elevados teores de corantes, gases tóxicos, resíduos sólidos e líquidos que são desprezados na natureza de modo incorreto, agredindo o meio ambiente. Entre esses poluentes temos os compostos fenólicos, dos quais alguns como o fenol C_6H_5OH , estão entre os 50 compostos químicos mais produzidos no mundo, o que aumenta a probabilidade de exposição dos seres vivos a esse poluente. (Alves et al. 2013; Ho et al., 2008)

1.2 Efluentes fenólicos: características

Os fenóis são exemplos de efluentes que têm sido amplamente estudados devido ao impacto que geram em ambientes aquáticos, pois, afetam significativamente as propriedades organolépticas da água e, no processo de cloração, podem originar clorofenóis e policlorofenóis que são altamente carcinogênicos (Britto, 2008).

Os fenóis são compostos que possuem em sua estrutura uma hidroxila ligada a um anel aromático, podendo estar ligados com grupos clorados, nitrados, metilênicos e alquílicos, e assim serem responsáveis pela alteração do pH das águas dos corpos hídricos onde são lançados na forma de efluentes. Tais compostos ocorrem com abundância na natureza, dentre eles destacam-se os fenóis simples, cumarinas, taninos, flavonóides, ácidos fenólicos, ligninas e tocoferóis que são utilizados na fabricação de corantes, aromatizantes, antissépticos, adesivos, tintas e corantes, desinfetantes, herbicidas (McMurry 2005; Lee et al, 2005).

Por apresentarem estruturas variadas, são considerados multifuncionais e bastante abundantes (cerca de cinco mil compostos fenólicos diferentes), esses compostos produzem efeitos adversos em função de sua facilidade de interação com o organismo, pois, podem causar danos às células epiteliais e ao sistema nervoso central, dando origem a processos de metagênese e carcinogênese (Ho et al, 2008).

A solubilidade dos compostos fenólicos em água pode variar de acordo com o tipo. O pentaclorofenol, por exemplo, apresenta solubilidade relativamente baixa, enquanto o fenol apresenta alta solubilidade, o que explica a facilidade de acúmulo e transporte de tais compostos nos ambientes aquáticos (Zhou et al, 2005).

Os fenóis estão sempre suscetíveis a reações onde ocorre a introdução de um grupo funcional alquila (alquilação), e também a introdução de um grupo funcional acetila (acetilação) ou ainda a substituição de um hidrogênio ácido do composto com um grupo alquil-silício (sinalização), entre outras reações (McMurry 2005).

As indústrias são as principais responsáveis pelo lançamento de efluentes fenólicos nos corpos hídricos, alguns destes compostos foram incluídos na lista de poluentes prioritários de alguns países como os Estados Unidos, por exemplo, e devem ter, obrigatoriamente, suas concentrações determinadas nos efluentes antes do descarte. O Brasil apesar de ter uma normativa específica (Resolução do CONAMA 420/ 2011) para os limites máximos de fenóis totais em efluentes, não exige que sejam feitos teste de detecção da concentração dos mesmos antes do descarte (Ribeiro et al, 2002; CONAMA, 2011).

1.3 Métodos de detecção de compostos fenólicos

A detecção e quantificação dos compostos fenólicos presentes em uma amostra pode ser realizada por diferentes métodos. Swain e Hills, em 1959, propôs a determinação colorimétrica por meio da redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, em 1977 Price e Butler propôs a detecção por redução do íon férrico pelas hidroxilas fenólicas, dando origem ao ferrocianeto. Slinkard & Singleton, também em 1977, propôs o reagente de Fólin-Ciocalteu, constituído do ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico e no momento em que reage com fenóis, em meio alcalino, ocorre a dissociação de um próton fenólico, o que leva a formação do ânion fenolato que tem a capacidade de reduzir o reagente, formando o complexo azul de molibdênio. Dentre todos os métodos químicos, o método de Fólin-Ciocalteu é o mais aceito, por apresentar mais simplicidade e reprodutibilidade (King & Young, 1999; Shahidi, 1995; Huang *et al.* 2005).

Também são utilizados na detecção de compostos fenólicos a detecção eletroquímica (ECD), detecção de arranjo elétrico (EAD), espectrometria de massas (MS) e detecção de arranjo nuclear (RMN). Sendo que os dois últimos são mais aplicados para confirmação da estrutura molecular dos compostos (Azmir et al, 2013; Peng, 2017; Arigò et al., 2017; Ferrer-Gallego, 2017).

A detecção de compostos fenólicos de massa molecular elevada e a distribuição da massa molecular destes, ainda são um desafio nas análises de polifenóis. A cromatografia líquida de fase reversa acoplada ao espectrômetro de massas é considerada um dos melhores métodos para o estudo de compostos fenólicos provenientes de diferentes fontes biológicas, desta maneira são efetivos no estudo de suas estruturas, entretanto apresentam custos bastante elevados, o que leva a utilização de métodos com menor custo, como a detecção colorimétrica (Santos et al., 2013).

1.4 Detecção colorimétrica

A detecção colorimétrica consiste em uma mudança de cor ocasionada pela adição de determinados reagentes, que variam de acordo com o tipo de detecção que se deseja realizar. Podendo ocorrer em meio aquoso, ou em superfícies como a do papel. O papel é um suporte que vem sendo cada vez mais utilizado na química analítica para detecção de diversos compostos, geralmente são utilizados em análises com reações colorimétricas que oferecem a

possibilidade de diagnóstico a olho nu ou com uso de dispositivos de mão como smartphones ou scanners, com quantificação da intensidade da reação colorimétrica em computadores, com auxílio de softwares específicos que podem ser facilmente operados (Zhang et al. 2015).

Quando se trata de dispositivos em papel, a detecção colorimétrica é o método mais utilizado pelos pesquisadores, pois, apresenta numerosas vantagens no que tange à acessibilidade, baixo custo e portabilidade, mencionando ainda que tais dispositivos possibilitam a realização de análises *in situ* (Martinez et al., 2008; Carrilho et al., 2009; Martinez et al., 2010; Zhang et al. 2015).

A reação colorimétrica possibilita a detecção e quantificação uma série de compostos químicos, que quando combinados com reagentes cromógenos nas zonas dos microdispositivos de papel, promovem uma mudança de cor, desta maneira, a captura da imagem da zona onde ocorre a mudança de cor pode ser feita com o auxílio de um dispositivo fotográfico e a concentração do analito em questão pode ser relacionada à intensidade de cor gerada na zona. Após a captura da imagem onde ocorre a reação colorimétrica pode ser feita usando dispositivos simples e de fácil acesso como câmeras digitais, smartphones, scanners, e a intensidade de cor determinada usando a função “Histograma” de softwares como ImageJ ou Corel PhotoPaint, por exemplo, e assim podem ser criadas curvas analíticas para determinação da concentração do analito de interesse (Martinez et al., 2008; Shen et al., 2012).

A captura das imagens das zonas, no entanto, alguns testes apontam que o scanner é o dispositivo mais aconselhado para a captura das imagens, pois, a mesma ocorre em ambiente fechado e com isso há um maior controle da luminosidade e dispensa a necessidade de ajuste de foco que deve ser feito em câmeras digitais e celulares (De Souza et al., 2014).

1.5 Técnicas de tratamento de efluentes fenólicos

Os Processos avançados de oxidação (AOP's) são constituídos por técnicas de oxidação consideradas eficientes e que podem ser realizadas em baixas temperaturas e pressões. Nesses processos são produzidos radicais livres OH que reagem com moléculas orgânicas alifáticas de maneira rápida, resultando na formação de radicais orgânicos que reagem com oxigênio, que leva ao início de diversas reações de degradação que podem levar à formação de dióxido de carbono e água. Podem ser citados como AOP's com ar, peróxido de hidrogênio, ozônio, óxido de titânio, entre outras. (Andreozzi & Marotta, 1999; Tiburtius & Peralta-Zamora, 2004).

1.5.1 Fotólise

A radiação ultravioleta pode ser aplicada no tratamento de resíduos visando a desinfecção e também pode ser usada no tratamento de compostos orgânicos voláteis. Essa técnica é baseada na incidência de luz nas moléculas, o que causa sua dissociação em fragmentos, sendo eficiente na degradação de poluentes como o clorofenóis que surgem no processo de cloração de águas contaminadas com compostos fenólicos. Entretanto, não são eficientes no tratamento de efluentes (Pupo Nogueira et al., 2007).

1.5.2 Fotocatálise

A fotocatalise é uma técnica alternativa que pode ser utilizada no tratamento de água contaminada com compostos fenólicos, pois, pode fazer com que os mesmos sejam neutralizados sem que fique resíduos nocivos ao meio ambiente. Nesse processo são utilizados óxidos de metal semicondutor como catalisador e o oxigênio como oxidante. Entre os muitos catalisadores testados para tal finalidade, o dióxido de titânio na forma de anatase apresenta estabilidade, baixo custo e alto desempenho. A utilização do sistema heterogêneo de dióxido de titânio e sistemas homogêneos do tipo foto-Fento, com o uso de luz solar utilizados na degradação de compostos fenólicos também são eficazes na degradação desse tipo de composto. A fotocatalise é vantajosa no que se refere ao quesito ambiental, pois utiliza de produtos pouco nocivos, sendo eficiente para degradar compostos orgânicos (Gernjak et al. 2003; Grzechulska & Morawski, 2002).

Processos oxidativos avançados como a fotocatalise podem ainda, serem utilizados como complemento às técnicas convencionais de tratamento de efluentes, como o tratamento biológico, ou como pós-tratamento para promover a mineralização de compostos recalcitrantes que surgem durante a aplicação de outros processos (Teixeira & Jardim, 2004).

1.5.3 Biorremediação

O tratamento biológico ou biorremediação de poluentes é um processo em que organismos vivos, geralmente plantas ou microrganismos são utilizados como promotores da redução ou remoção de compostos nocivos ao meio ambiente. Esse tipo de processo tem sido amplamente explorado pela comunidade científica atual como método alternativo para o tratamento de ambientes poluídos, como águas superficiais, solos e também de efluentes oriundos de plataformas industriais. Embora existam diversos processos de tratamentos

químicos e físicos a biorremediação é uma alternativa ecologicamente viável e eficaz no tratamento de ambientes onde há a presença de contaminantes com moléculas orgânicas de difícil degradação (Gaylarde et al., 2005).

O tratamento biológico com o uso de microrganismos, apesar de apresentar diversas vantagens pelo seu baixo custo de aplicação e eficiência na mineralização da matéria orgânica, pode apresentar falhas no tratamento de compostos fenólicos que, em altas concentrações, pode ser letal aos microrganismos ou inibir o metabolismo dos mesmos. Dessa maneira, ao invés de microrganismos, as enzimas podem ser utilizadas como catalisadores biológicos com grande potencial na remoção de poluentes, uma vez que possuem grande especificidade e podem operar mesmo em efluentes com elevada concentração de poluentes (Durán & Esposito, 2000).

O tratamento biológico é utilizado em indústrias têxteis para redução das concentrações de compostos fenólicos em seus efluentes (Kunz et al., 2002). O efluente ao saírem da lavanderia são direcionados aos sistemas de grades com filtro de areia e cascalho para retirada do material particulado, logo após o efluente vai para a decantação onde o lodo (microrganismos) são adicionados e logo após segue para a aeração onde o lodo é recirculado e posteriormente retirado por decantação e logo após a desinfecção o efluente tratado é lançado para o local de descarte (Figura 1)

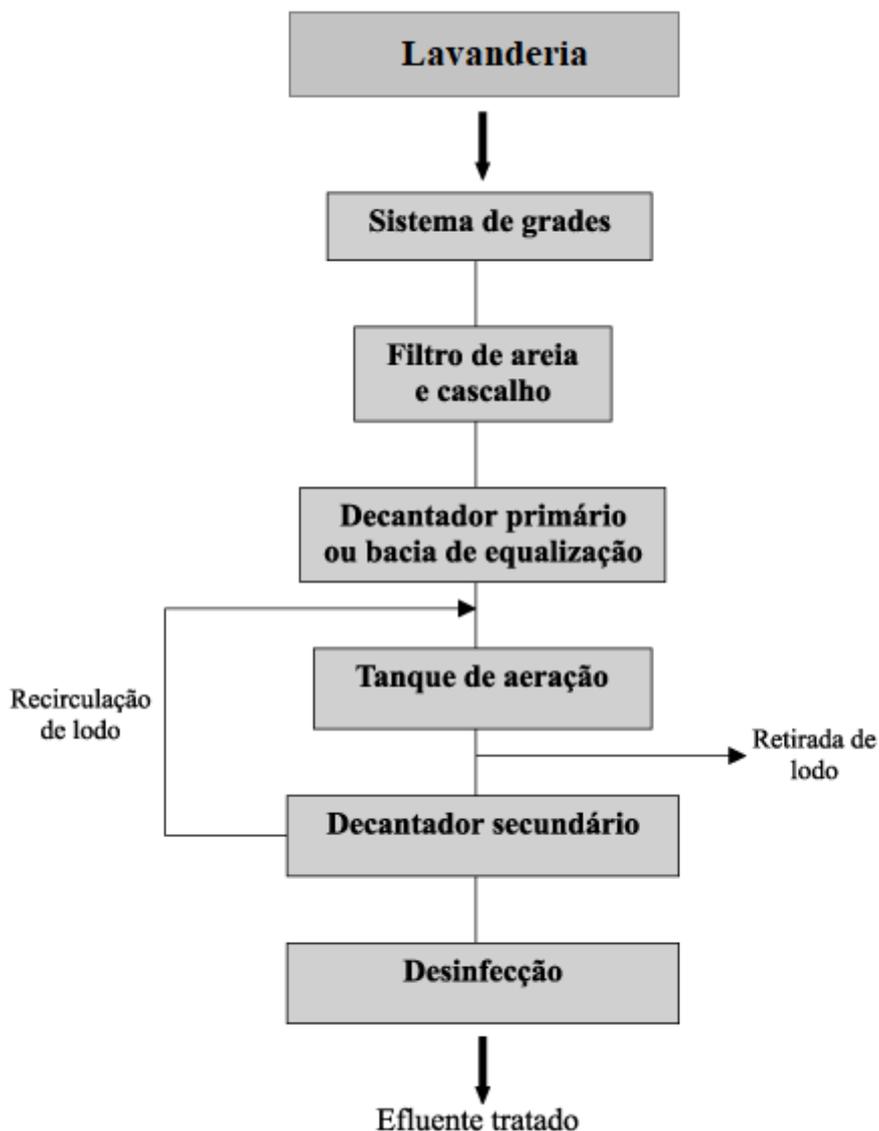


Figura 1: esquema de uma estação de tratamento de efluentes utilizando lodo ativo, empregado no tratamento de efluentes têxtil.

Por apresentarem bons resultados no tratamento de poluentes, enzimas como a polifenoloxidase (EC 1.10.3.1), que se caracterizam por conter cobre no centro ativo, têm capacidade de catalisar dois tipos de reações, sendo a primeira com a hiroxilação de monofenóis levando à formação de orto-difenóis e a segunda sendo a oxidação de orto-difenóis levando à formação de orto-quinonas. A polifenoloxidase tem a capacidade de atuar na degradação de diferentes compostos, podendo citar a tirosina, catecol, p-cresóis, diidroxifenillaninaa, ácido p-

cumárico, ácido clorogênico e substratos difenólicos e são produzidas por bactérias e fungos e diversas espécies de plantas. (Mukherjee et al., 2013; Mayer, 2006).

O Brasil, em especial o Bioma Cerrado possui uma vasta flora com cerca de 12.356 espécies de plantas vasculares com elevado potencial biotecnológico que podem ser utilizadas como fonte enzimática, entretanto são pouco exploradas. A utilização de extratos brutos enzimáticos de fonte vegetal é uma tendência em pesquisas, sendo vantajoso pela economia, fácil acesso e maior tempo de vida (Mendonça et al., 2008; Vieira et al., 2004 Garcia et al., 2016).

1.6 Desenvolvimento de sistemas miniaturizados

No início da década de 90 foi proposto um conceito para criação de sistemas miniaturizados para análises totais (μ TAS) por Manz e colaboradores (Manz et al., 1990), esse trabalho foi pioneiro na área, com a ideia de integrar todas etapas de uma análise em um só sistema, podendo ser feito o pré-tratamento da amostra, injeção, separação e detecção de um determinado composto, tudo de forma automatizada e integrada.

Desde então, muitos cientistas passaram a se dedicar à miniaturização de sistemas, uma vez que oferecem diversas vantagens no que diz respeito a redução de consumo de reagentes, amostras e espaço, portabilidade e menor consumo de energia (Coltro et al. 2014; Dittrich et al., 2006; Kovarik et al., 2011; Kovarik et al., 2013).

Com os avanços obtidos nessa nova área e o aprimoramento do transporte das soluções em canais de escala reduzida, os dispositivos miniaturizados começaram a serem utilizados em diversos seguimentos, como nas áreas forenses, proteômica, monitoramento de reações enzimáticas e até mesmo como uma ferramenta de controle de qualidade ambiental (Aurox et al., 2002; Arora et al., 2010; Sackmann et al., 2014).

Os microdispositivos podem ser desenvolvidos a partir de tecnologias convencionais ou alternativas, podendo ser utilizados diferentes substratos. As tecnologias convencionais se caracterizam pela necessidade de uma fonte energética para a transferência da imagem do dispositivo para o substrato. Processos litográficos, como a litografia por raios-X, litografia por feixe de elétrons, litografia "soft", ou litografia com radiação UV são as técnicas mais utilizadas para microfabricação (Chen & Pépin, 2001).

Os dispositivos impressos tridimensionalmente (3D) são desenvolvidos a partir de um projeto montado digitalmente. A impressão 3D cria objetos por meio da adição de sucessivas camadas de um determinado material até que o objeto tenha sua forma criada por completo. Desde quando foi desenvolvida, essa tecnologia vem ganhando espaço devido as variadas possibilidades de impressão de diferentes objetos de forma simplificada e com precisão (Anderson et al., 2013; Chen 2014; Hoque et al. 2012; 2014; Kitson et al., 2012).

A prática de fabricar objetos em três dimensões com a sobreposição de finas camadas de material, surgiu no final do século XIX por Blather em 1822. Com o avanço da tecnologia, logo nas décadas de 80, Charles Hull desenvolveu uma máquina com capacidade de fabricar objetos sólidos a partir resinas poliméricas, sendo considerado o pioneiro da impressão em 3D. Atualmente esses dispositivos tridimensionais são facilmente criados utilizando softwares como SolidWorks®, PTC Creo Parametric®, AutoCAD®, CATIA®, Solid Edge® e FreeCAD®. Dentre as tecnologias de impressão 3D utilizadas atualmente as mais exploradas são a estereolitografia (SLA), a impressão por jato de tinta (inkjet printing), a síntese seletiva a laser (SLS), a fabricação de objeto laminado (LOM) e a modelagem por fusão e deposição (FDM), cada uma com suas peculiaridades e especificidades na deposição das camadas do material (Blather, 1822; Hull, 1986; Wong & Hernandez, 2012).

Desta maneira, o desenvolvimento de técnicas alternativas e de baixo custo para detecção e tratamento de poluentes, bem como o aproveitamento do potencial biotecnológico da flora do Cerrado tornam-se fundamentais na contribuição para a melhora das condições ambientais.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Desenvolver microdispositivos de papel e impressos tridimensionalmente (3D) para detecção e degradação compostos fenólicos, respectivamente.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um dispositivo a base de papel para detecção de compostos fenólicos;
- Identificar frutos do Cerrado com elevados teores de polifenoloxidase;

- Desenvolver um dispositivo 3D com LED's integrados para dar suporte à fotodegradação e biorremediação de compostos fenólicos;
- Avaliar o potencial de degradação sinérgica da biorremediação e fotodegradação em compostos fenólicos.

4. Referencias

G.C. Alves, P.A. Costa, A.M.F. Lima, N.R.C.F. Machado, V.S. Santana. Rev. de Engenharia e Tecnologia. 2013, **5**, 54-63.

K. B. Anderson, S. Y. Lockwood, R. S. Martin, D. M. Spence. Analytical Chemistry. 2013, **85**, 5622-5626.

Andreozzi, R.; Marotta, R.; J. Ozonation of p-chlorophenol in aqueous solution. Harzard. Mater. 1999, 15, 69, 3, 303-17.

A. Arora, G. Simone, G. B. Salieb-Beugelaar, J. T. Kim, A. Manz. Analytical Chemistry. 2010, **82**, 4830-4847.

A. Arigò, P. Česla, P. Šilarová, M. L. Calabrò, L. Česlová.. Food Chemistry, 2017, **245**, 829-837.

P. A. Auroux, D. Iossifidis, D. R. Reyes, A. Manz., Analytical Chemistry, 2002, **74**, 2637-2652.

J. Azmir, I. S. M. Zaidul, M. M. Rahmman, K. M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M. H. A. Jahurul, K. Ghafoor, N. A. N. Norulaini, A. K. M. Omar. Journal of Food Engineering. 2013, **117**, 426 – 36.

J. Barraula, C. Bouchoule, K. Echachoui, N. Frini-Srasra, M. Trabelsi, F. Bergaya.. Appl. Catal., B 1998, **15**, 269-274.

J. E. Blather. Google Patents 1892.

N. M. Brito, M. L. Ribeiro, O. P. Amarante Junior, L. Polese. R. Ecotox. e Meio Ambiente 2003, **13**, 129.

E. Carrilho, A. W. Martinez, G. M. Whitesides. Analytical Chemistry. 2009, **81**, 7091-7095.

Y. Chen, A. Pépin. Electrophoresis 2001, **22**, 187-207.

W. K. T. Coltro, C. M. Cheng, E. Carrilho, D. P. De Jesus. *Electrophoresis*. 2014, **00**, 1–16.

Conama. Conselho Nacional de Meio Ambiente. 2014, DOU nº 92, 89.

C. P. Chen, Y. M. Wang, S. Y. Lockwood, D. M. Spence.. *Analyst*. 2014, **139**, 3219-3226.

J.L. Cruz. Teófilo Otoni- UFVJM, 2016.

F. R. De Souza, G. F. Duarte Junior, P. T. Garcia, W. K. T. Coltro. *Quim. Nova*. 2014, **37**, 1171-1176.

P. S. Dittrich, K. Tachikawa, A. Manz. *Analytical Chemistry*, 2006, **78**, 3887-3907.

N. Durán, E. Esposito. *Appl. Catal. B: Environmental*, 2000, **28**, 83-89.

E. Evans, E. F. M. Gabriel, T. E. Benavidez, W. K. T. Coltro, C. D. Garcia. *Analyst*. 2014, **139**, 5560-5567.

O. Fatibello-Filho, I. C. Vieira. *Quím. Nova*, 2001, **25**, 455-464.

R. Ferrer-Gallego, J. M. Hernández-Hierro, N. F. Brás, N. Vale, P. Gomes, N. Mateus, V. De Freitas, F. J. Heredia, T. Escribano-Bailon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, **65**, 6434-6441.

C. C. Gaylarde, M. L. Bellinaso, G. P. Manfio. *Biotec. Ciên. & Desen*. 2005, **34**, 36-43.

W. Gernjak, T. Krutzler, A. Glaser, S. Malato, J. Caceres, R. Bauer, A. R. Fernández-Alba. *Chemosphere*, 2003, **50**, 71-78.

M. K. Ghose. *Water Res*. 2002, **36**, 1127-34.

M. R. A. Gomes, M. G. A. Oliveira, G. E. S. Carneiro, E. G. Barros, M. A. Moreira. *Ciênc. Tecnol. Aliment*, 2001, **21**, 69-72.

J. Grzechulska, A. W Morawski. *App. Catalysys B.*, 2002. **36**, 45-41.

D. J. Harrison, A. Manz, Z. H. Fan, H. Ludi, H. M Widmer. *Analytical Chemistry*. 1992, **64**, 1926-1932.

H. Hsin-Pin, L. Ren-Jye, L. Maw-Rong. *Journal of Chromatography A*. 2008, **1213**, 245-248.

M. E. Hoque, Y. L. Chuan, I. Pashby. *Biopolymers*. 2012, **97**, 83-93.

H. Hsin-pin; L. Ren-Jye, L. Maw-Rong. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, **53**, 1841-1856.

C. W. Hull. Google Patents- 1986.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INIMETRO); Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQ–CGCRE–008, 2003.

A. King, & G. Young. *Journal Am Diet Assoc*. 1999, 50, 2, 213-8.

P. J. Kitson, M. H. Rosnes, V. Sans, V. Dragone, L. Cronin. *Lab on a Chip*. 2012, **12**, 3267-3271.

T. Kojima, K. Nishijima, M. Matsukata, J. Membr. *Sci*. 1995, **102**, 43-47.

M. L. Kovarik, P. C. Gach, D. M. Ornoff, Y. Wang, J. Balowski, L. Farrag, N. L. Allbritton.. *Analytical Chemistry*, 2011, **84**, 516-540.

M. L. Kovarik, D. M. Ornoff, A. T. Melvin, N. C. Dobes, Y. Wang, A. J. Dickinson, P. C. Gach, P. K. Shah, N. L. Allbritton. *Analytical Chemistry*, 2013, **85**, 451-72.

L. Seung-Joo; K. Umamo, T. Shibamoto, L. Kwang-Geun. *Food Chem*. 2005. **91**, 131-7.

Y. Lu, W. W. Shi, L. Jiang, J. H. Qin, B. C. Lin. *Electrophoresis*. 2009, **30**, 1497-1500.

A. A. T. Lucas, M. V. Folegatti, S. N. Duarte. *Rev. bras. eng. agríc*. 2010, **14**, 937-943.

A. S. M. Maia, V. K. L. Osorio. *Quím. Nova*. 2003, **26**, 595-601,.

A. Manz, N. Graber, H. M. Widmer. *Sensors and Actuators B- Chemical*. 1990, **1**, 244-248.

A. W. Martinez, S. T. Phillips, E. Carrilho, S. W. Thomas, H. Sindi, G. M. Whitesides. *Analytical Chemistry*. 2008, **80**, 3699-3707.

A. W. Martinez, S. T. Phillips, G. M. Whitesides, E. Carrilho. *Analytical Chemistry*. 2010, **82**, 2010.

K.N. Matsui, J.A.W. Gut, P.V. Oliveira, C.C. Tadini. *Journal of food Engineering*, 2008, **88**, 169-176.

A.M. Mayer. *Phytochemistry*, 2006, **67**, 2318-2331.

J. McMurry, Química Orgânica. Vol1, 6º ed. 2005.

R. C. Mendonça, J. M. Felfi li, B. M. T. Walter, M. C. Silva Júnior, A. V. Rezende, T. S. Filgueiras, P. E. Nogueira, Flora Vascul ar do Cerrado. 2008, 289-556.

V.S. Mishra, V. Kumar, V. Mohajari, J.T.B. Joshi. Chemistry Research, 1995, **34**, 2.

S. Mukherjee, B. Basak, B. Bhunia, A. Dey, B. Mondal. Sci. and Bio-tec., 2013. **12**, 61-73.

R. H. Muller, D. L. Clegg. 1949, **21**, 1123-1125.

M. Naczk, & F. Shahidi. J Chromatogr A. 2004, **1054**, 95-111.

T. S. Park, W. Y. Li, K. E. Mccracken, J. Y. Yoon. Lab on a Chip. 2013, **13**, 4832-4840.

R. Pelton. Trac-Trends in Analytical Chemistry. 2009, **28**, 925-942.

P. Li-Qing, J. Cao, D. Li-Jing, Z. Qi-Dong, S. Yu-Tin, X. Jing-Jing. Journal of Chromatography, 2017, **1499**, 132-139.

P. L. Martin & L. G. Butler. J Agric Food Chem 1977, **25**, 1268-70.

R. F. Pupo Nogueira, A. G. Trovó, M. R. A. Silva, R. D. Villa. Química Nova, 2007, **30**, 400 - 408.

A. Ribeiro, M. H. Neves, M. F. Almeida, A. Alves, L. Santos. J. Chromatogr. 2002, **975**, 267.

Sackmann, E. K.; Fulton, A. L.; Beebe, D. J. The Present And Future Role Of Microfluidics In Biomedical Research. Nature, 2014, V. 507, P. 181-189.

M. Santhiago, E. W. Nery, G. P. Santos, L. T. Kubota. Bioanalysis. 2014, **6**, 89-106.

R. M. P. P. Santos, E. Marino Júnior. Rev. Cient. Elet. de Eng. Flor. 2012, **20**, 56-75.

S. A. O Santos, C. Vilela, C. S. R. C. P. Freire Neto, A. J. D. Silvestre. Journal of Chromatography B. 2013, **938**, 65– 74.

F. Shahidi, & M. Technomic; 1995.

L. Shen, J. A. Hagen, I. Papautsky. Lab on a Chip. 2012, **12**, 4240-4243.

F. M. Silva, P. S. B. Lacerda, J. Joel Junior. Quim. Nova 2005, **28**, 103.

K. Slinkard, V.L. Singleton. Am J Enol Viticult. 1977, **28**,49-55.

- T. Swain, W.E. Hillis. *J Sci Food Agric.*, 1959, **10**, 63-8.
- C. P. A. B.; Teixeira, W. F. Jardim. *Caderno temático*, v. 3. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2004.
- E. R. L. Tiburtius, P. Peralta-Zamora. *Quim. Nova*, 2004, **27**, 441-446.
- I. C. Vieira, O. Fatibello-Filho, A. C. E. Granato, K. O. Lupetti. *Eclética Química*. 2004, **29**, 7-14.
- P.C. Wankat. Elsevier Science Publishing Co., London, 1988, 515-542.
- A. R. Weyermüller. São Paulo, Atlas, 2010.
- K. V. Wong, A. Hernandez. *ISRN Mechanical Engineering*, 2012, 2012.
- A. K. Yetisen, M. S. Akram, C. R. Lowe. *Lab on a Chip*. 2013, **13**, 2210-2251.
- L. Zhang, X. Cao, L. Wang, X. Zhao, S. Zhang, P. Wang. *Analyst*. 2015, **140** 4105–4113.
- F. Zhou, L. Xiujuan, Z. Zhaorui. *Analytica Chimica Acta*. 2005, **538**, 63–70

ARTIGO I

Detecção colorimétrica de compostos fenólicos totais em amostras de efluentes industriais usando dispositivos a base de papel

1. Introdução

O crescimento populacional e industrial tem causado sérios problemas à saúde humana e também à natureza, em especial devido à grande produção de resíduos sólidos e líquidos. O crescimento industrial desorganizado promoveu a poluição dos corpos hídricos e dos aquíferos subterrâneos, levando a humanidade à baixa disponibilidade de água potável para consumo (Lucas et al., 2010). Indústrias como refinarias, fábricas de tintas e corantes, indústrias farmacêuticas e têxteis geram efluentes altamente tóxicos, muitas vezes desprezados na natureza de modo incorreto (Alves et al. 2013).

Os fenóis são exemplos de efluentes que têm sido amplamente estudados devido ao impacto que geram em ambientes aquáticos (Britto, 2008). Tais compostos possuem em sua estrutura uma hidroxila ligada a um anel aromático e podem ser responsáveis pela alteração do pH dos corpos hídricos onde são desprezados. Além de causar danos às células epiteliais e ao sistema nervoso central, dando origem a processos de metagênese e carcinogênese. São amplamente utilizados na fabricação de diversos produtos como corantes, aromatizantes, antissépticos, adesivos, tintas e corantes, desinfetantes, herbicidas (Ho et al, 2008; Lee et al, 2005; McMurry 2005).

O método convencional para detecção de compostos fenólicos é espectrofotométrico, onde o reagente Fólin-Ciocalteu, na presença de um meio alcalino, reage com compostos fenólicos e ocorre a dissociação de um próton fenólico, o que leva a formação do ânion fenolato que tem a capacidade de reduzir o reagente, levando a uma mudança de cor do amarelo para o azul. Este método, apesar de ser bastante utilizado, necessita de equipamentos de alto custo e o volume final da reação pode chegar a mais de 500 ml (King & Young, 1999; Shahidi, 1995; Huang *et al.* 2005).

Como alternativa, dispositivos analíticos a base de papel (PADs) vem sendo bastante utilizados como plataforma miniaturizada para realização de diversos tipos de análises. Tais dispositivos podem ser utilizados em diversos seguimentos como diagnósticos na área de saúde, segurança alimentar e monitoramento da qualidade ambiental devido às vantagens que apresentam em relação a grande disponibilidade de papel, descartabilidade, baixo custo de fabricação e baixos volumes de reagentes (Meredith et al., 2016; Liana et al., 2012).

Os PADs podem ser utilizados na detecção de diversos compostos em análises colorimétricas obtidas a partir de uma reação química entre um analito de interesse e um reagente colorimétrico, como o Fólin-Ciocalteu, pode ser facilmente detectada a olho nu ou com uso de dispositivos de mão, como smartphones ou scanners. Além de possibilitar a realização de análises *in situ* (Martinez et al., 2008; Carrilho et al., 2009; Martinez et al., 2010; Zhang et al. 2015).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um dispositivo de papel que seja capaz de detectar e quantificar a presença de fenóis totais em efluentes industriais, com o propósito de facilitar a identificação de tais compostos em amostras reais, funcionando como uma ferramenta de controle de qualidade ambiental.

2. Material e métodos

Materiais e Reagentes

Fólin-Ciocalteu foi adquirido da empresa Belga Industrias Químicas; Carbonato de Sódio da Cromoline Química Fina; Vanilina da Isofar Industria e Comércio de Produtos Químicos Ltda; Ácido Gálico, Catecol e Pirogalol da Vetec (Sigma-Aldrich Corporation); Etanol (99,9%) da Nox Lab Solutions; e papel cromatográfico (CHR grau 1) fornecido pela Whatman (Maidson Kent).

Instrumentação

As capturas das intensidades de cor foram feitas utilizando um Scanner de mesa da marca Hewlett-Packard, modelo G4050, acoplado a um computador de mesa. Para a impressão dos dispositivos de papel foi usada uma Impressora Xerox Colorqube, modelo 8570.

Desenvolvimento dos microdispositivos de papel

A fabricação dos microdispositivos foi realizada com base no método proposto por Yao Lu et al. (2009) e Carrilho et al. (2009). Os dispositivos tiveram suas dimensões e formatos estabelecidos com uso do *software* gráfico Corel Draw X6 e enviados à impressão com tinta a base de cera, utilizando papel cromatográfico (Whatman 200mm X 200mm). Os dispositivos desenvolvidos possuem formato quadriculado (1 cm X 1cm), com 4 microzonas circulares de 6 mm de diâmetro. Que após o aquecimento na estufa, têm seu diâmetro reduzido para 5mm (Figura 1).

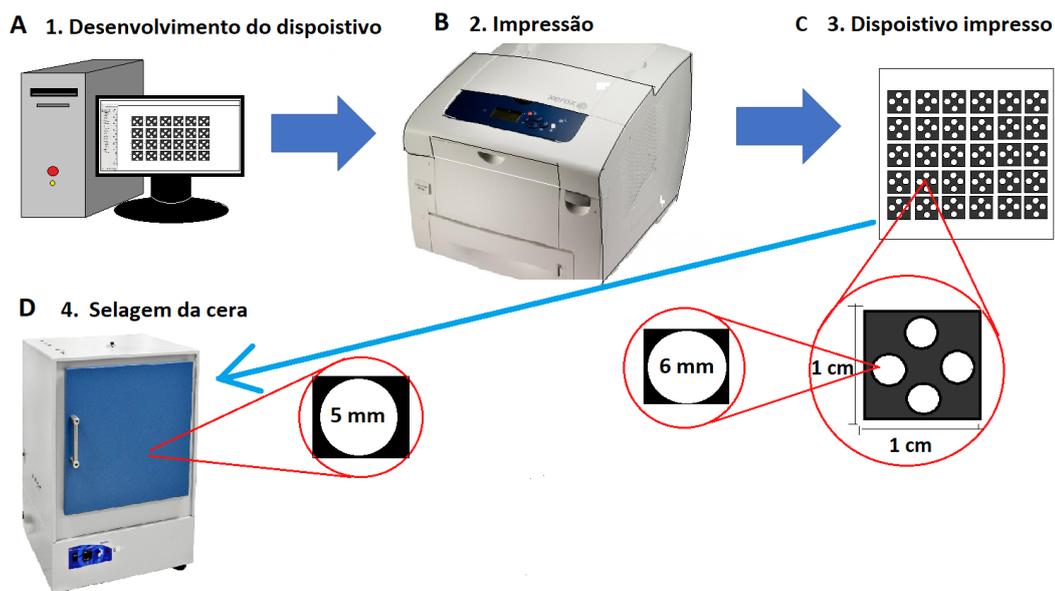


Figura 1: ilustração das etapas de desenvolvimento do microdispositivo a base de papel impresso em cera.

As dimensões do dispositivo foram determinadas de acordo com número de microzonas necessárias ao teste de detecção colorimétrica. As dimensões das mesmas (5 mm) foram estabelecidas de modo comportar o volume total após a adição da amostra e dos reagentes (5,5 μ L) necessários à reação colorimétrica. A selagem do dispositivo foi feita na parte inferior do mesmo com fita adesiva, a qual tem o propósito de evitar que os reagentes atravessem por completo as microzonas.

Ensaaios

O volume da reação foi determinado a partir da capacidade de água absorvida pelo papel. A partir daí, foi estabelecido um volume fixo dos reagentes em concentrações avaliadas (Tabela -1), com intuito de obter uma intensidade de cor quantificável pelo sistema e sensível às concentrações de fenol nas amostras.

Reagentes		Concentrações				
Carbonato de sódio	de	5 %	10 %	15%	20%	25%
Fólin-Ciocalteu		20%	25%	33%	50%	100%

Tabela 1: concentrações dos reagentes usados para a detecção colorimétrica de compostos fenólicos.

As amostras de compostos fenólicos foram preparadas conforme o método proposto por Slinkard & Singleton (1977). Para serem melhor solubilizadas, as amostras foram diluídas em 10% de etanol (99%) e tiveram seu volume completado para 100% com água destilada. Estabelecidas as concentrações adequadas à cada reagente, os testes de detecção dos compostos foram realizados adicionando primeiramente 1,85µL de Fólin-Ciocalteu. Em seguida foi adicionado 1,85µL de amostra e após um minuto de reação foram adicionados 1,85 µL de carbonato de sódio. Após o tempo mínimo de secagem (10 minutos) os dispositivos foram levados ao scanner para ter as intensidades de cor capturadas.

Para avaliar a capacidade do dispositivo de detectar fenóis totais em amostras distintas, foram realizados testes com quatro compostos fenólicos diferentes: Catecol, Pirogalol, Vanilina, Ácido Gálico, em concentrações que variaram de 25 mg/L à 1250 mg/L.

Determinação do limite de detecção e da sensibilidade do dispositivo

O limite de detecção (LD) de compostos fenólicos foi determinado com sucessivas diluições de quatro diferentes soluções estoque com concentração de 1000 mg/L preparadas a partir dos seguintes compostos: catecol, pirogallol, vanilina e ácido gálico. Os compostos foram diluídos para as seguintes concentrações: 750 mg/L, 500 mg/L, 250 mg/L, 100 mg/L, 50 mg/L 25 mg/L. Desta maneira, com a captura das intensidades de cor, foi possível observar a partir de qual concentração o dispositivo é capaz de detectar a presença dos compostos fenólicos. A sensibilidade foi determinada a partir do coeficiente angular (Slope) obtido nas curvas analíticas.

Detecção colorimétrica

A detecção colorimétrica dos compostos fenólicos foi realizada usando o método de Fólin-Ciocalteu (Slinkard & Singleton, 1977), com o ajuste de volume e tempo.

A captura das intensidades de cor foi realizada utilizando um scanner de mesa a 600 DPI (Dots Per Inch), onde a primeira etapa consistiu na digitalização das imagens dos microdispositivos, que ocorreu após 10 minutos de secagem. As imagens capturadas foram analisadas utilizando a função histograma do *software* de análise de imagens ImageJ, no canal

Red (24-bits), que após a seleção da área de interesse, é possível obter o número pixels distribuídos na área selecionada, sendo possível observa-los nas diferentes escalas de cor (Red, Gray, Back). O número de pixel é inversamente proporcional à intensidade de cor, dessa maneira é preciso subtrair do valor do “branco” o número de pixels encontrados, conforme a formula:

$$ic = np_0 - np_1$$

Onde, “ic” corresponde a intensidade de cor, “np₀” refere-se a média do número de pixels das microzonas antes da reação colorimétrica e “np₁” é a média do número de pixels após a reação de mudança de cor. As etapas da detecção colorimétrica podem ser observadas no esquema da Figura 2.

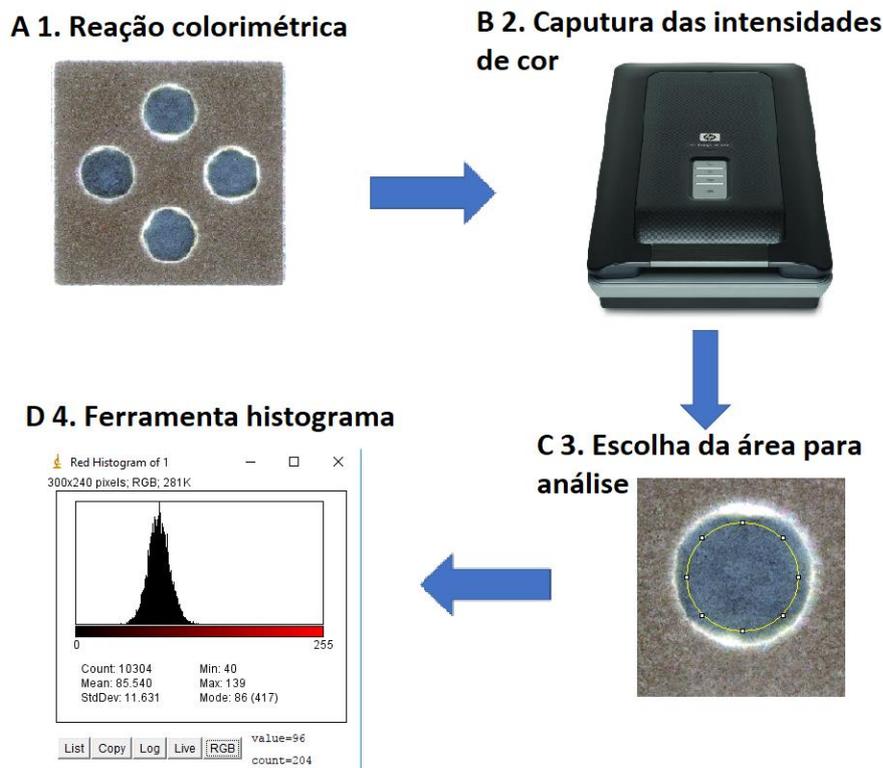


Figura 2: ilustração das etapas da análise das intensidades da reação colorimétrica. Na etapa A o microdispositivo com as microzonas onde ocorreram a reação colorimétrica, na etapa B é mostrado o scanner utilizado para a captura da imagem com as intensidades de cor em cada uma das microzonas, em C ocorre a escolha da área com maior uniformidade de cor para que na etapa D, seja utilizada a função histograma do *software* de análise de imagens ImageJ para obter os valores relativos a quantidade de pixels.

Curvas analíticas

As curvas analíticas foram montadas com base nos valores das intensidades de cor, obtidos por meio da captura das imagens das microzonas e correlacionadas com as concentrações de cada um dos compostos analisados. Esta correlação foi feita utilizando o *software* OriginPro 9.0.

Testes de recuperação

Para averiguar a precisão e exatidão do método de detecção desenvolvido, foi feito um teste de recuperação. Assim, uma solução de ácido gálico teve sua concentração sucessivamente elevada com a acréscimo de 80 mg/L, partindo de 150 mg/L até 390 mg/L, realizadas a partir de uma mesma matriz. Segundo o INMETRO (INMETRO, 2003), pode ser calculado da seguinte forma:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$$

Onde: C1 = concentração determinada na amostra fortificada; C2 = concentração determinada na amostra não fortificada; C3 = concentração adicionada.

Amostras reais

A amostra real foi obtida em uma indústria têxtil na cidade de Jaraguá-GO, mais especificamente do processo de coloração do jeans, que utiliza diversos tipos de corantes. A amostra foi coletada antes de ser direcionada para a estação de tratamento. A amostra foi armazenada em frascos âmbar, que foram posteriormente colocados em uma caixa térmica e fora do alcance da luz para evitar que a amostra sofresse algum tipo de deterioração. O teste para a detecção da presença de compostos fenólicos presentes na amostra foi realizado tanto no microdispositivo desenvolvido quanto no método tradicional (espectrofotométrico). O objetivo deste teste é verificar se o dispositivo atende às necessidades mínimas para ser utilizado na detecção de compostos fenólicos presentes em amostras reais e, ao comparar o resultado obtido utilizando o método convencional, comprovar sua precisão.

Teste de prateleira

Para avaliar se parte dos reagentes podem ser adicionados ao dispositivo, de modo que o mesmo possa ser preparado previamente e armazenado para uso posterior, foi feito o “Teste de prateleira”. Desta maneira, o reagente Fólín-Ciocalteu foi adicionado à microzona do dispositivo (1,85 µL) e o mesmo foi armazenado em frasco âmbar por 30 dias. A cada 6 dias eram feitas análises com a intensidade de cor gerada a partir de uma solução a base de ácido gálico com concentração de 1000 mg/L.

Testes estatísticos

Inicialmente, o teste de Shapiro Wilks foi realizado para verificar a normalidade dos dados. Ao verificar que os mesmos seguem uma distribuição normal ($p > 0,05$) foi aplicado uma Análise de Variância (Anova) para testar se as variações de concentrações dos compostos exercem efeito significativo sob a intensidade de cor. O teste post-hoc de Tukey foi utilizado para comparar par-a-par a intensidade de cor gerada a partir de cada um dos compostos analisados. Esta análise foi realizada com probabilidade de 5% com auxílio do software R (R Core Team, 2017). A linearidade das curvas analíticas foi determinada para verificar o coeficiente de determinação (R^2 ajustado) e o coeficiente de Pearson (r), expressos graficamente utilizando o Software estatístico OriginPro 9.0.

3. Resultados e Discussão

Concentração de Carbonato de sódio

A concentração de Carbonato de Sódio (Na_2CO_3) interfere na intensidade da reação colorimétrica ($p < 0,05$), sendo que as concentrações 5%, 10% e 25% não se diferem ($p > 0,05$) e diferem das concentrações com 15% e 20 %, que por sua vez são iguais entre si ($p > 0,05$) (Figura 3).

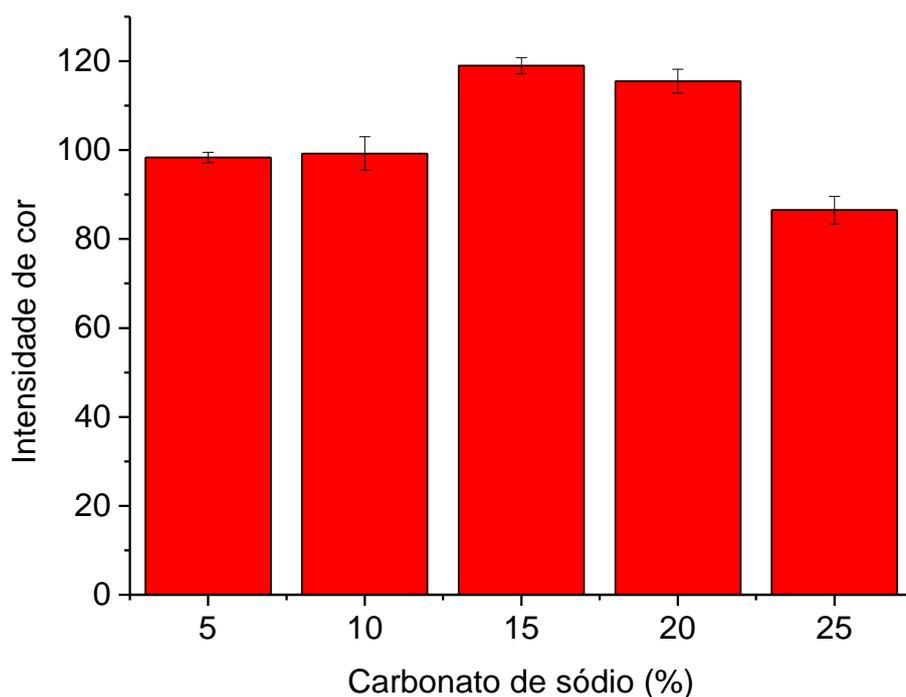


Figura 3: gráfico com a variação da intensidade de cor em função da concentração de Carbonato de Sódio (Na_2CO_3).

Como o Carbonato pode precipitar em concentrações muito elevadas (Maia & Osorio, 2003), optou-se por usar a concentração de 15%. Esta concentração resultou em uma melhor intensidade de cor (Figura 3). Em concentrações acima 20 % observou-se que, após a secagem, houve precipitação do carbonato de sódio, formando uma camada branca, que interferiu na análise de intensidade de cor. A concentração utilizada foi a com 15 % de carbonato de sódio, pois apresentou intensidade de cor mais elevada (Figura 3).

A intensidade da reação colorimétrica teve variação significativa ($p < 0,05$) em função da concentração do reagente Fólin Ciocalteu, quando comparado as menores concentrações com a concentração máxima (100%). No entanto, a intensidade da reação colorimétrica não diferiu nas concentrações 20, 25, 33 e 50% (Figura 4).

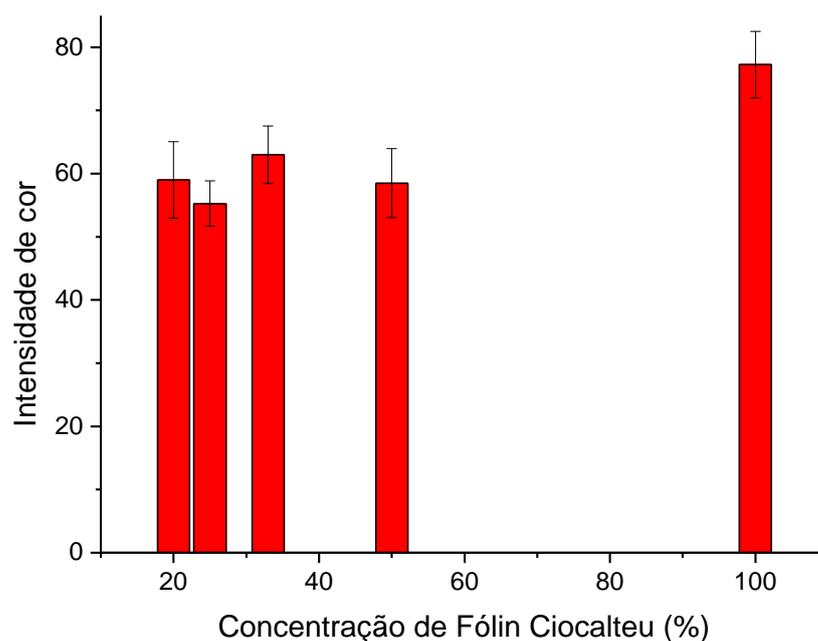


Figura 4: gráfico de barras com a variação da intensidade de cor em função da concentração do composto Fólín-Ciocalteu.

O reagente Fólín-Ciocalteu puro (100%) resultou em uma melhor intensidade de cor quando comparado com as demais concentrações (Figura 4). A diluição do Fólín-Ciocalteu não resultou em uma intensidade de cor desejável, sendo usado o composto na concentração comercial.

Curvas analíticas no microdispositivo de papel

As curvas analíticas indicam que o dispositivo apresenta maior sensibilidade na detecção de catecol e pirogalol (Slop= 0,104; 0,102). O modelo apresentado explica perfeitamente a variação apresentada, uma vez que o aumento da concentração dos compostos está diretamente relacionado ao aumento da intensidade de cor, apresentando valores de R^2 ajustado e coeficiente de Pearson acima de 0,99 (Figura 5).

O dispositivo apresentou limite de detecção de compostos fenólicos em concentrações a partir de 25 mg/L. Entretanto, foram expressos nas curvas analíticas apenas as intensidades obtidas a partir de 100 mg/L para os compostos Ácido gálico, Catecol e Pirogalol e a partir de 250 mg/L para Vanilina.

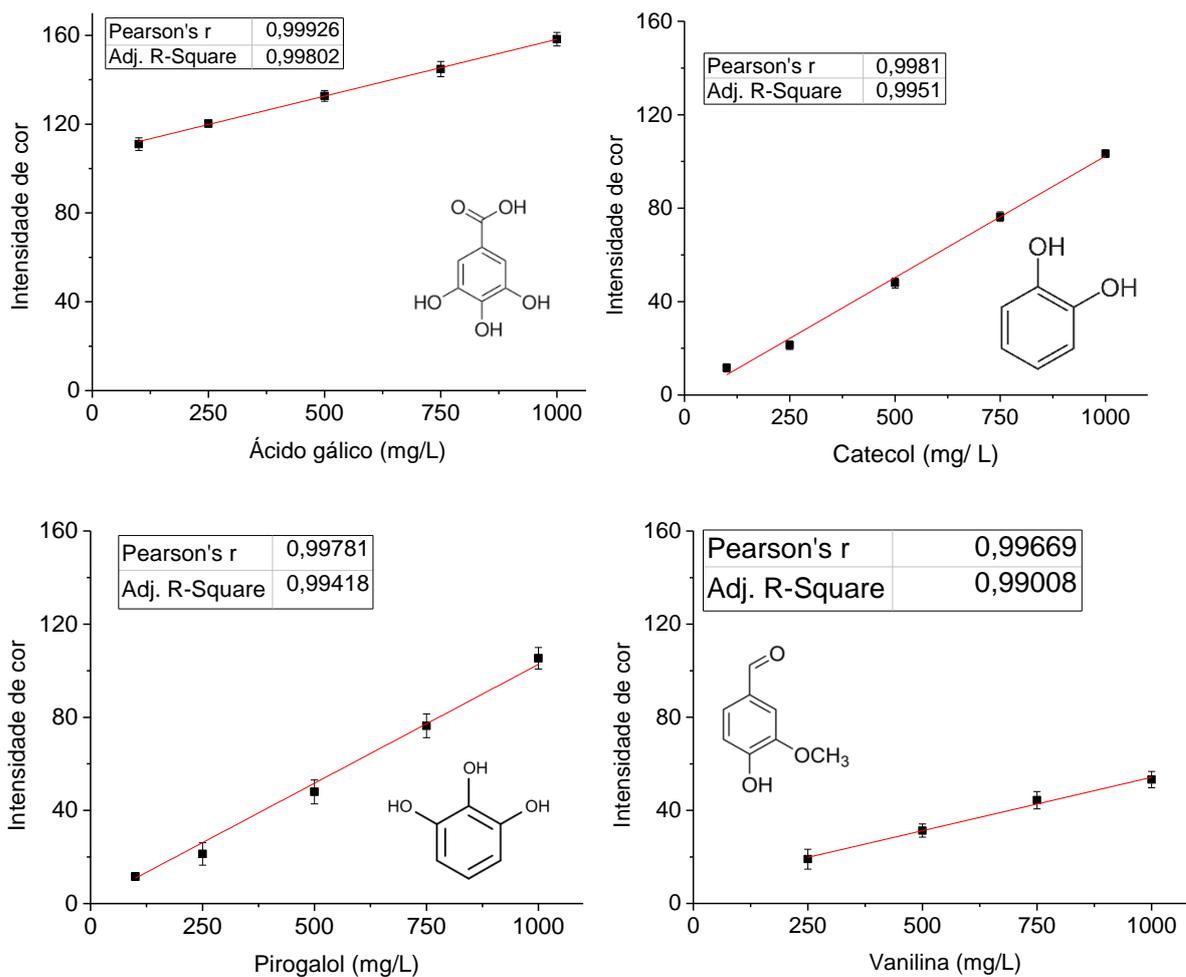


Figura 5: Curvas analíticas com as variações de cor em função da concentração dos compostos fenólicos analisados (Ácido Gálico, Catecol, Pirogalol e Vanilina).

As intensidades de cor diferiram entre os compostos fenólicos e tiveram variação significativa ($p < 0,05$). O ácido gálico apresentou maior intensidade de cor, seguido pelo Catecol, posteriormente o pirogalol e por último, com menor intensidade de cor, o composto vanilina. É possível observar que a variação na intensidade de cor está associada à ao número de hidroxilas (OH), uma vez que as intensidades variaram com o número das mesmas (Figura 5).

O Ácido gálico é comumente utilizado como padrão para determinação da concentração de compostos fenólicos totais em diversos tipos de amostras, como em extratos vegetais, vinhos, efluentes, entre outros, expressos em EAG (equivalentes de ácido gálico) (Souza et al., 2007; Malta et al., 2007; Seráglio et al., 2015; Silva et al. 2017).

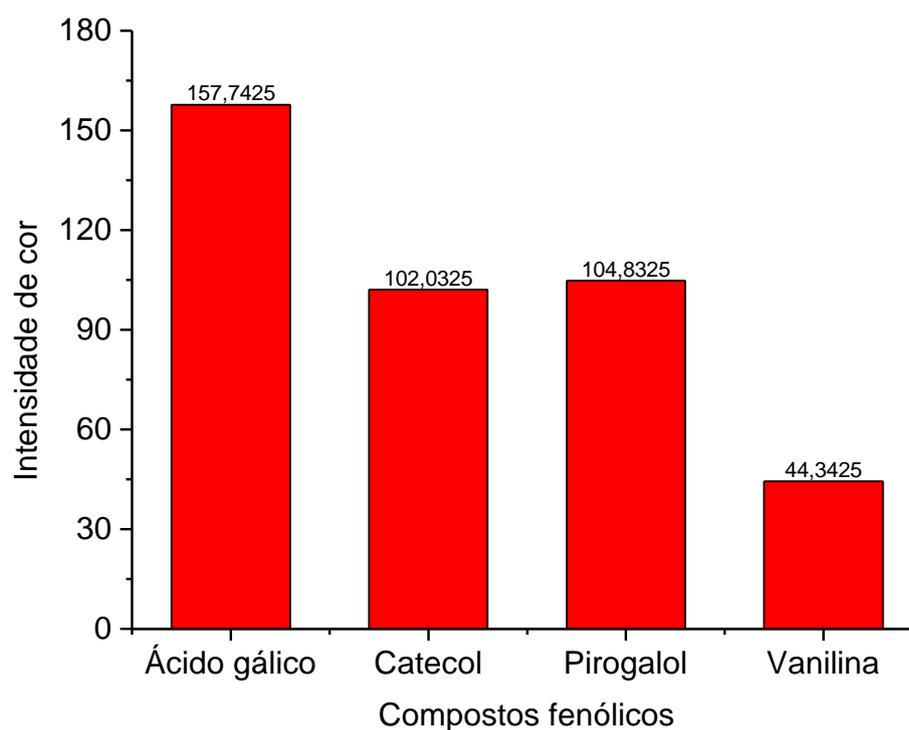


Figura 6: gráfico com a intensidade de cor obtida de cada composto fenólico a uma concentração de 1000 m/L.

Ensaio de Recuperação

Os fatores de recuperação obtidos apresentaram exatidão variando de 90,42 a 93,08%, mostrando que o dispositivo desenvolvido apresenta boa sensibilidade na detecção e quantificação de compostos fenólicos (Tabela 2).

Concentração real (mg/L)	Concentração estimada (mg/L)	Percentual de detecção (%)
390	359,12	92,08
310	280,31	90,42
230	215,89	93,08

Tabela 2: valores relativos às concentrações reais, estimadas e o percentual de precisão do ensaio de recuperação.

O teste de recuperação avaliou a exatidão do método e evidenciou a quantidade do analito recuperado no processo em detrimento da quantidade real presente na amostra (Brito et al., 2003).

Teste com amostra real

O valor de concentração da amostra obtida a partir do teste padrão com espectrofotômetro foi de 505,21 mg/L e no microdispositivo foi de 517,49 mg/L, que não diferindo entre si ($p > 0,05$). A comparação da concentração obtida nos dois métodos evidencia que os mesmos apresentam a mesma precisão na detecção de compostos fenólicos. A concentração máxima de compostos fenólicos permitida em efluentes industriais é, segundo o CONAMA (CONAMA, 2011), 0,5 mg/L, entretanto a concentração encontrada estava muito acima.

Apesar do dispositivo desenvolvido não detectar concentrações próximas ao mínimo permitido pela resolução do CONAMA, o mesmo pode ser utilizado para quantificar a concentração de compostos fenólicos totais em efluentes antes de serem direcionados para o tratamento em qualquer outro tipo de amostra com concentrações acima de 25 mg/L.

Teste de prateleira

O teste indicou que ocorre uma redução significativa na intensidade de cor gerada a partir da reação colorimétrica com o tempo de armazenamento (Figura 7).

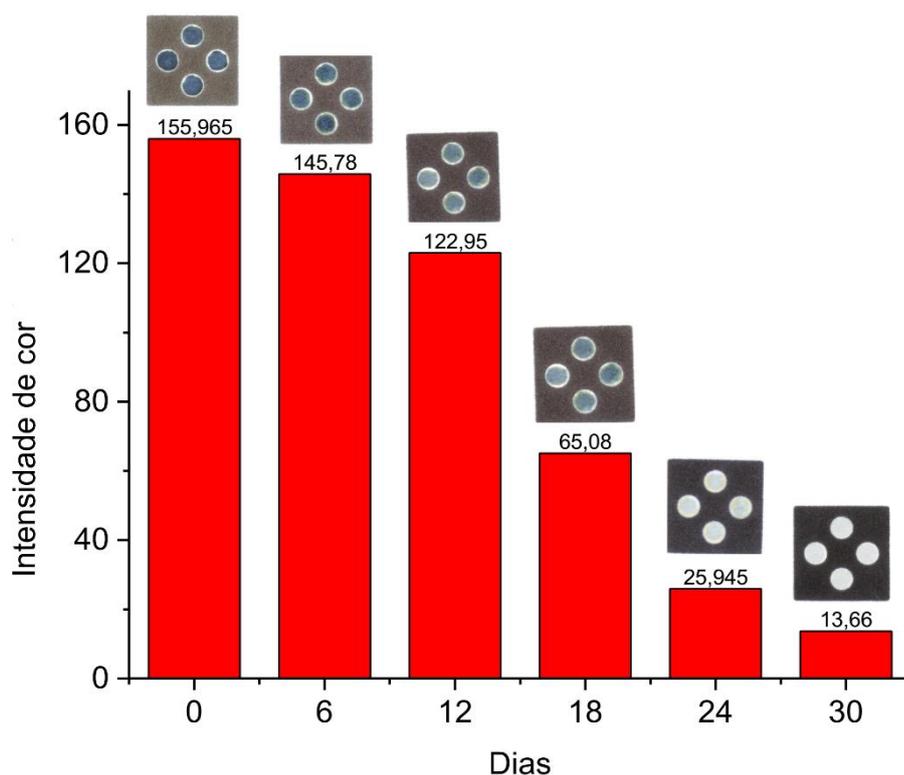


Figura 7: gráfico ilustrativo com a intensidade cor gerada no teste de prateleira, com trinta dias de armazenamento do dispositivo

Ao armazenar o dispositivo, o composto Fólin-Ciocalteu adicionado previamente nas microzonas perde gradativamente sua reatividade e diminui a precisão do método de detecção de compostos fenólicos. Entretanto, dada a facilidade e rapidez em que a detecção colorimétrica pode ser feita, isto não reduz a praticidade do teste, uma vez que pode ser feito em apenas 10 minutos no próprio ponto coleta do efluente.

4. Considerações Finais

O dispositivo desenvolvido apresenta precisão e facilidade na detecção de diferentes compostos fenólicos em concentrações a partir de 25 mg/L, com comportamento linear a partir de 100 mg/L.

O dispositivo possui sensibilidade igual ao método espectrofotométrico na detecção de tais compostos, mesmo em amostras desconhecidas. O dispositivo apresentou precisão na detecção da presença de compostos fenólicos em amostra real de efluente.

Apresenta ainda facilidade e praticidade para utilização em campo, além de ser totalmente portátil, com baixo custo de fabricação, necessidade de volumes de reagente extremamente baixos, reduzindo consideravelmente o custo final da análise quando comparado com o método espectrofotométrico.

5. Referencias

G. C. Alves, P.A. Costa, A.M.F. Lima, N. R. C. F. Machado, V. S. Santana. Rev. de Engenharia e Tecnologia. 2013, **5**, 54-63.

J. Azmir, I. S. M. Zaidul, M. M. Rahmman, K. M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M. H. A. Jahurul, K. Ghafoor, N. A. N. Norulaini, A. K. M. Omar. Journal of Food Engineering. 2013, **117**, 426 – 36.

J. M. Britto & M. C Rangel. Quím. Nova, 2008, 31, 1, 114-122..

E. Carrilho, A. W. Martinez, G. M. Whitesides. Analytical Chemistry, 2009, **81**, 7091-7095, 2009.

J. L. Cruz. Teófilo Otoni- UFVJM, 2016.

H. Hsin-Pin, L. Ren-Jye, L. Maw-Rong. Journal of Chromatography A. 2008, **1213**, 245-248.

H. Hsin-Pin, L. Ren-Jye, L. Maw-Rong. Journal of Chromatography A. 2008, **1213**, 245-248.

L. Seung-Joo; K. Umamo, T. Shibamoto, L. Kwang-Geun. Food Chem. 2005. **91**, 131-7.

A. A. T. Lucas, M. V. Folegatti, S. N. Duarte. Rev. bras. eng. agríc. 2010, **14**, 937-943.

R. Roesler, L. G. Malta, L. C. Carrasco, R. B. Holanda, C. A. S. Souza, G. M. Pastore. Ciênc. e Tec. de Alimentos. 2007. **27**, 53-60.

S. K. T. Seraglio, L. V. Gonzaga, C. V. Helm, P. Nehring, I. S. Olivo, R. Fett. Rev. CSBEA. 2015, **1**, 1-8.

D. D. Liana. Raguse, J. J. Gooding, E. Chow. Sensors, 2012, **12**, 11505-11526

N. A. Meredith, C. Quinn, D. M. Cate, T.H. J. Volckens, C. S. Henry. Analyst, 2016, **141**, 1874-1887

A. W. Martinez, S. T. Phillips, E. Carrilho, S. W. Thomas, H. Sindi, G. M. Whitesides. Analytical Chemistry. 2008, **80**, 3699-3707.

A. W. Martinez, S. T. Phillips, G. M. Whitesides, E. Carrilho. *Analytical Chemistry*. 2010, **82**, 3-10.

McMURRY, John. *Química Orgânica*. Vol1, 6° ed. 2005.

F. M. Silva, P. S. B. Lacerda, J. Joel Junior. *Quim. Nova* 2005, **28**, 103.

M. G. G. Silva, E. R. B. Santana, R. J. A. S. Padilha, C. S. A. Lima, R. Yara. *Encontro Anual da Biofísica*. 2017, **1**, 96-97.

C. M. M. Sousa, H. R. Silva, G. M. Vieira Junior, M. C. C. Ayres, C. L. S. Costa Araújo, L. C. D. Cavalcante, E. D. S. Barros, P. B. M. Araújo, M. S. Brandão, M. H. Chaves.. *Quim. Nova*. 2007, **30**, 351-355.

A. R. Weyermüller. São Paulo, Atlas, 2010.

L. Zhang, X. Cao, L. Wang, X. Zhao, S. Zhang, P. Wang. *Analyst*. 2015, **140** 4105–4113.

ARTIGO II

Desenvolvimento de um microdispositivo 3D para degradação sinérgica de compostos fenólicos

1. Introdução

O processo de industrialização, uso e ocupação do solo do território brasileiro ao longo das últimas décadas causaram sérios danos ao meio ambiente, por meio do descarte inadequado de efluentes de alta toxicidade produzidos por indústrias como refinarias de petróleo, fônos de coque, fabricas de resinas fenólicas, tintas e herbicidas que lançam efluentes no meio ambiente, principalmente em corpos hídricos sem o devido tratamento (Alves et al. 2013; Cruz, 2016; Gao et al., 2011; Weyermüller, 2010).

Os compostos fenólicos são um dos principais efluentes produzidos por indústrias desses seguimentos e se caracterizam por serem tóxicos, cancerígenos, mutagênicos, e teratogênico e também causam modificações nas propriedades organolépticas da água e por conta dessas características, as técnicas de tratamento destes compostos estão sendo amplamente estudadas (Brito, 2008; Gao et al., 2011).

Os Processos avançados de oxidação (AOP's) são técnicas que podem ser utilizadas no tratamento de efluentes fenólicos e são baseadas na oxidação de tais compostos, pois nesses processos são produzidos radicais livres OH que reagem com moléculas orgânicas alifáticas de maneira rápida, resultando na formação de radicais orgânicos que reagem com oxigênio, que leva ao início de diversas reações de degradação, entre estas técnicas está a fotocatalise e a fotólise. (Andreozzi & Marotta, 1999; Tiburtius & Peralta-Zamora, 2004; Ayed et al. 2017).

A fotólise e a fotocatalise são processos oxidativos avançados que são baseados na utilização da incidência de radiação UV (ultravioleta) sobre compostos orgânicos afim de promover a sua oxidação, sendo eficientes na degradação de clorofenois e demais compostos de natureza fenólica. São processos vantajosos pois utiliza produtos pouco nocivos ao meio ambiente e podem ainda serem utilizados como complemento a técnicas convencionais, como a biorremediação (Ayed et al., 2017; Teixeira & Jardim, 2004; Pupo Nogueira et al., 2007).

A biorremediação de compostos fenólicos são processos biológicos de tratamento de efluentes compatíveis com o meio ambiente e pouco dispendiosos, entretanto nem sempre proporcionam resultados satisfatórios quando feito com microrganismos (fungos, bactérias, etc), pois, a alta concentração de compostos fenólicos pode ser letal ou retardar o metabolismo dos mesmos (Ayed et al., 2017; Durán & Esposito, 2000)

Dessa maneira as enzimas podem ser utilizadas como catalisadores biológicos com grande potencial no tratamento de poluentes, uma vez que possuem grande especificidade e podem operar mesmo em efluentes com elevada concentração de poluentes, podendo ser obtidas a partir de fontes vegetais. O Cerrado brasileiro abriga cerca de 12.356 espécies de plantas vasculares com elevado potencial biotecnológico para extração enzimática. Apesar de ainda ser pouco explorado, a utilização de extratos brutos enzimáticos de fonte vegetal é uma tendência em pesquisas, sendo vantajoso pela economia, fácil acesso e maior tempo de vida (Durán & Esposito, 2000; Mendonça et al., 2008; Vieira et al., 2004).

E aliados a essas técnicas podem ser utilizados os sistemas miniaturização (μ Pad's), uma vez que oferecem diversas vantagens no que diz respeito a redução de consumo de reagentes, amostras e espaço, portabilidade e menor consumo de energia (Coltro et al. 2014; Dittrich et al., 2006; Kovarik et al., 2011; Kovarik et al., 2013).

Os dispositivos impressos tridimensionalmente (3D) são exemplos de sistemas miniaturizados que podem ser desenvolvidos a partir de um modelo montado digitalmente e desde quando foi desenvolvida, essa tecnologia vem ganhando espaço devido as variadas possibilidades de impressão de diferentes objetos de forma simplificada e com precisão podendo ser utilizados em diagnósticos clínicos e ambientais (Anderson et al., 2013; Chen 2014; Hoque et al. 2012; 2014; Kitson et al., 2012).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da biorremediação promovida pela enzima polifenoloxidase de frutos do Cerrado em sinergismos com a fotodegradação utilizando o TiO_2 como catalizador exposto a diferentes espectros luminosos, utilizando um microdispositivo impresso tridimensionalmente como suporte para realização dos testes.

2. Material e Métodos

Materiais e Reagentes

O Catecol utilizado foi adquirido juntamente a Vetec (Sigma-Aldrich Corporation), o Fosfato de Sódio dibásico foi adquirido da Dinâmica Química Contemporânea, Fosfato de Sódio Monobásico (Monohidratado) da marca Labsynth Produtos para Laboratórios, Polivinilpirrolidona também adquirido da Vetec (Sigma-Aldrich), papel de filtro adquirido da Unifil Produtos, polímero para impressão 3D, lâmpadas LED Philips. O Copolímero

acrilonitrila-butadieno-estireno (ABS) foi fornecido pela MovtecH Comercial Tecnologia LTDA-ME.

Coleta dos frutos

Os frutos foram coletados em áreas de cerrado *stricto sensu*, a partir de matrizes adultas nas cidades de Rianópolis-GO, Itapuranga-GO, Nova Veneza-GO e Rialma-GO, obedecendo os critérios mínimos para a escolha de matrizes, que leva em consideração a circunferência do tronco, altura, ausência de cicatrizes e patógenos aparentes (Santos & Marino Júnior 2012).

Processamentos dos frutos e obtenção dos extratos brutos

Os frutos foram lavados e imersos em uma solução de hipoclorito de sódio (2%) durante 20 minutos, enxaguados e posteriormente processados utilizando um liquidificador doméstico adquirido exclusivamente para tal finalidade. Para a obtenção do extrato bruto, foram utilizados 20 gramas dos frutos e juntamente foi adicionado 100 ml de tampão fosfato (pH6) e 1 grama de Polivinilpirrolidona e após 2 minutos de processamento, o extrato foi filtrado em filtro de TNT, de modo a reter as partículas, evitando problemas na pipetagem durante o procedimento experimental. Os extratos dos frutos foram fracionados e armazenados em tubos eppendorf e posteriormente congelados, de modo a evitar a inativação da polifenoloxidase.

Prospecção enzimática de frutos

A atividade enzimática dos frutos escolhidos (*Solanum paniculatum* L., *Solanum lycocarpum* A. St. -Hil, *Genipa americana* L., *Eugenia uniflora* L., *Philodendron bipinnatifidum* Schott.) foi verificada em meio a solução tampão fosfato de sódio 0,005M (pH 6,0).

A detecção da polifenoloxidase (PPO) foi realizado com base no método descrito por Halpin e Lee (1987), onde um ensaio padrão foi feito adicionando-se 0,1 mL de extrato a 2,9 mL de solução de catecol com concentração molar de 46 mmol L, preparado em tampão fosfato. Após a adição da amostra foi feita a leitura da absorvância no espectrofotômetro em um comprimento de onda de 420 nm. A atividade foi definida como aumento de 0,1 unidade de absorvância por minuto.

. A atividade da enzima foi expressada com base no aumento da absorvância /min/g de peso fresco de amostra.

Impressão do dispositivo 3D

Primeiramente o dispositivo 3D teve seu layout e dimensões criados no software gráfico AutoCAD ® 2014 Free Student (Autodesk Inc., San Rafael, USA). Após estabelecido o seu design, o arquivo referente ao projeto do dispositivo foi salvo no formato STL (Stereolithography), esta extensão gera uma superfície de malhas triangulares no formato do modelo tridimensional, permitindo ajustar as dimensões e resolução do objeto à ser impresso. Posteriormente, o arquivo foi aberto utilizando um software gratuito conhecido como Cura, versão 15.02.1, configurado especificamente para o modelo da impressora. Este software calcula os movimentos da impressora com base na geometria do modelo contido no arquivo STL e prepara o objeto para impressão, de modo que é determinado o posicionamento, quantidade de material à ser depositado e a orientação das camadas à serem impressas. O tempo de impressão é determinado de acordo com a orientação e quantidade de camadas do objeto. Após a etapa de criação, a impressão foi realizada utilizando uma impressora 3D auto replicável modelo Prusa Movtech, que possui hardware livre e funciona com método de impressão FDM, baseada no modelo ReRap, com área de trabalho de 195 mm X 195 mm X 110 mm.

O dispositivo foi impresso por meio do método de Modelagem por Fusão e Deposição, este método de impressão 3D é baseado na deposição de filamentos termoplásticos aquecidos em um cabeçote de extrusão sobre uma plataforma de impressão. A deposição do material é feita camada por camada até que o modelo esteja totalmente impresso. A plataforma de impressão é mantida a uma temperatura menor (115 °C) que o bico de extrusão (220 °C) de forma que a primeira camada depositada endureça antes que seja iniciada a deposição da camada seguinte e assim por diante até que o processo de impressão esteja completo (Figura 1).

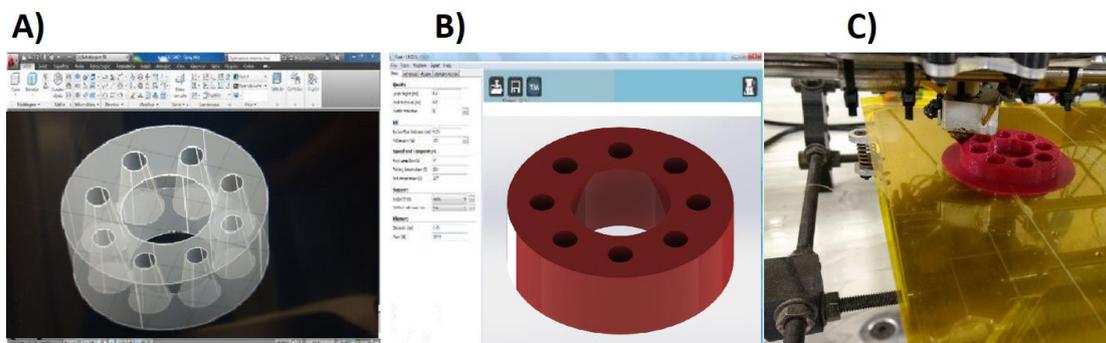


Figura 1: esquema do processo de criação de um modelo tridimensional no software gráfico, onde em A o arquivo SLT é exportado para um software CAM, em B ocorre a configuração dos parâmetros de impressão e em C observa-se o início do processo de impressão.

O dispositivo 3D foi criado contendo 2 partes, sendo a base ,com polímero de cor vermelha, com 6 cm de diâmetro e 1cm de altura, contendo 8 microzonas com capacidade de comportar até 550 μ L de amostra e outra parte é o suporte para placa de circuito com as lampadas de LED (polímero semi-translúcido). A placa de circuito foi motada com 6 lampadas, sendo com duas luz ultra violeta, duas com luz infravermelho e duas de luz branca que são alimentadas por uma fonte de 5V. As zonas onde não ocorre a incidência de luz são usadas para tratamento da amostra apenas com enzima polifenoloxidase, de modo a avaliar a eficiencia da mesma separadamente ao processo de fotodegradação (Figura 2).



Figura 2: dispositivo de fotodegradação e biorremediação de compostos fenólicos.

Ensaio de degradação

Biorremediação sem a presença de luz

O ensaio para avaliação do potencial de biorremediação da enzima (polifenoloxidase) proveniente do fruto *Philodendron bipinnatifidum* foram realizados com amostra a base de catecol, em concentração de 1000 mg/L, onde foram adicionados 100 μ L de amostra na zona do dispositivo e logo em seguida, foram adicionados 5 μ L de extrato enzimático bruto. As análises para verificar se houve mudança na intensidade de cor gerada a partir da reação iniciaram em 0 minutos e a cada 30 era feita uma nova análise, seguindo até o tempo final de 120 minutos de reação. Neste ensaio o tratamento com o uso da polifenoloxidase foi entitulado de “Enzima” e o teste controle foi chamado de “Controle”..

Biorremediação com a presença de luz

No ensaio para avaliar a eficiência da biorremediação promovida pela polifenoloxidase na presença de diferentes espectros luminosos (UV, BR, IV), foi realizado com amostra a base de catecol, em concentração de 1000 mg/L, onde foram adicionados em zonas correspondente a cada espectro de luz, 100 µL da solução de catecol e mais 100 µL da solução de catecol em uma quarta zona sendo o controle, onde não houve adção de enzima, tão pouco exposição a luz. As análises para verificar se houve mudança na intensidade de cor gerada a partir da reação iniciaram em 0 minutos e a cada 30 era feita uma nova análise, seguiu até o tempo final de 120 minutos de reação. Para este ensaio, o tratamento com a combinação da enzima com a luz branca foi entilulado de “Enzima + BR; o tratamento com a enzima e luz infravermelha foi entilulado de “Enzima + IV; o tratamento com a enzima e a luz ultravioleta foi entilulado de “Enzima + UV e o teste controle foi chamado de “Controle”.

TiO₂ sem a presença de luz

Para avaliar o potencial de degradação do TiO₂ sem a presença de luz, foi feito um ensaio onde foi preparado 100 ml de solução de catecol (1000 mg/L) onde foram adicionados 0,005 g , obtendo, portanto, uma concentração de TiO₂ equivalente a 500 mg/ L(Santana & Machado, 2006). A , que foi homogeneizada durante 5 min com uso de um agitador magnético. Os testes foram realizados com a adção de 100 µL da mistura de catecol e TiO₂ em cada na zona do dispositivo 3D e as análises para verificar se houve mudança na intensidade de cor gerada a partir da reação iniciaram em 0 minutos e a cada 30 era feita uma nova análise, seguiu até o tempo final de 120 minutos de reação. Neste ensaio, o tratamento com oxido de de titânio foi entilulado de de “TiO₂” 2 e o teste controle foi chamado de “Controle”.

Fotodegradação com TiO₂

O potencial de fotodegradação utilizando o TiO₂ como catalizador foi utilizando as mesmas concentrações de catecol e TiO₂ do ensaio “TiO₂ sem a presença de luz” onde foram adicionados em zonas correspondente a cada espectro de luz, 100 µL da mistrua de catecol e TiO₂ e mais 100 µL de catecol puro em uma quarta zona sendo o controle, onde não houve exposição à luz. As análises para verificar se houve mudança na intensidade de cor gerada a partir da reação iniciaram em 0 minutos e a cada 30 era feita uma nova análise, seguiu até o tempo final de 120 minutos de reação. Neste ensaio, o tratamento com TiO₂ mais luz branca foi

nomeado de “TiO₂ + BR”; o tratamento com TiO₂ mais luz infravermelha foi nomeado de “TiO₂ + IV; o tratamento com TiO₂ e luz ultravioleta foi entitulado de “TiO₂ + UV e o teste controle foi chamado de “Controle”..

Ensaio sinergico

O ensaio de sinergismo foi realizado ulizilando a polifenoloxidase (biorremediação) e o TiO₂ com os diferentes espectros luminosos (fotodegradação). Dessa maneira, foram adicionados 100 µL uma mistura de catecol e óxido de titânio com concentrações de 1000 mg/L e 500 mg/L, respectivamente, em cada uma das zonas do dispositivo. Posteriormente a foram adicionados 5 µL de extrato enzimático bruto e deu-se início à exposição aos diferentes espectros luminosos. As análises para verificar se houve mudança na intensidade de cor gerada a partir da reação iniciaram em 0 minutos e a cada 30 era feita uma nova análise, seguindo até o tempo final de 120 minutos de reação. Para estes ensaios, o tratamento com e enzima, TiO₂ e luz branca foi chamado de “Singergismo + BR, o tratameto com com e enzima, TiO₂ e luz infravermelha foi chamado de “Sinergismo + IV, o tratameto com com e enzima, TiO₂ e luz ultravioleta foi chamado de “Sinergismo + UV e o teste controle foi chamado de “Controle”.

Quantificação do percentual de degradação

Em todos os ensaios, a detecção colorimétrica da concentração do composto fenolico foi realizada utilizando um dispositivo a base de papel com microzonas impressas em tinta a base de cera. O dispositivo foi utilizado como plataforma para realização do teste de detecção colorimétrica de Folin-Ciocalteu (Slinkard & Singleton, 1977) com ajustes dos volumes dos reagentes para a escala de µL. A quantificação da concentração foi feita com base na equação obtida a partir da curva analitica com diluições de catecol variando de 100 mg/L até 1000 mg/L.

3. Resultados

Prospecção enzimática

A prospecção enzimatica mostrou que todos os frutos (*Solanum paniculatum* L., *Solanum lycocarpum* A. St. -Hil, *Genipa americana* L., *Eugenia uniflora* L., *Philodendron bipinnatifidum* Schott.) possuem polifenoloxidase, podendo ser utilizados na biorremediação de compostos fenólicos, no entanto o fruto *Philodendron bipinnatifidum* é o mais indicado por

apresentar valores mais elevados de polifenoloxidase em relação aos demais ($p < 0,05$; Figura 4).

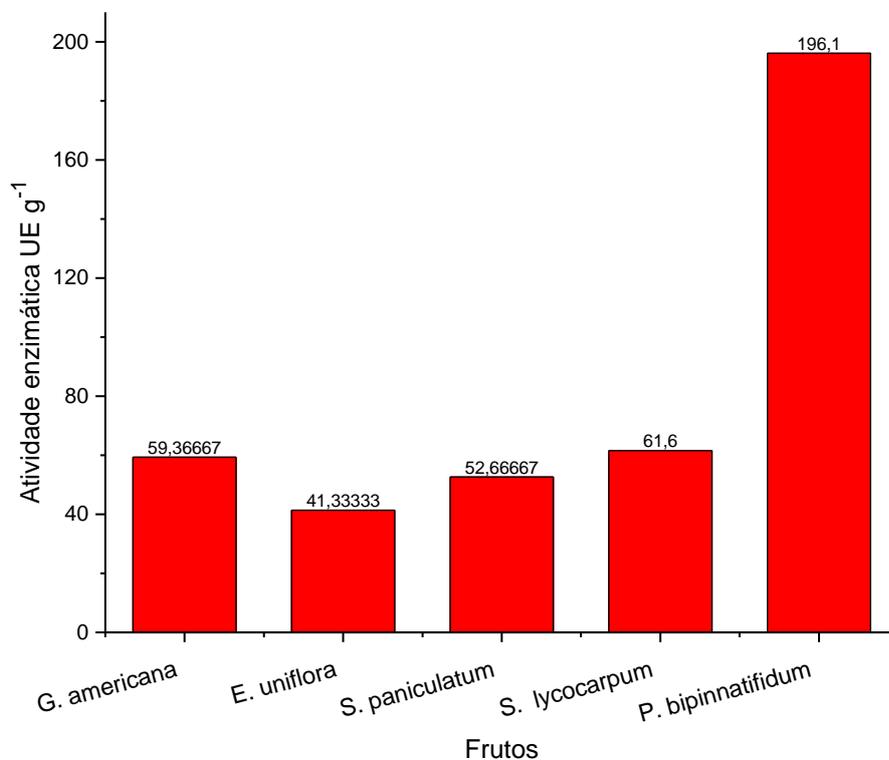


Figura 3: gráfico de barras com os resultados da prospecção enzimática dos frutos *Solanum paniculatum* L., *Solanum lycocarpum* A. St. -Hil, *Genipa americana* L., *Eugenia uniflora* L., *Philodendron bipinnatifidum* Schott.

Apesar Cerrado brasileiro possuir um elevado número de espécies de plantas que podem ser utilizadas como fontes enzimáticas, esse potencial biotecnológico ainda é pouco explorado para extração de enzimas na forma de extrato bruto (Durán & Esposito, 2000; Mendonça et al., 2008; Vieira et al., 2004)

Ensaio de biorremediação e fotodegradação

O ensaio para avaliação do potencial de biorremediação (polifenoloxidase) e degradação usando TiO_2 sem a presença de luz, mostrou diferença significativa ($f=1200,39$; $p < 0,01$; $df=2$), sendo que o ensaio com TiO_2 não se diferiu do controle. O tempo exerceu maior efeito no

tratamento de biorremediação ($f=357,97$; $p<0,01$; $df=4$) em relação aos tratamentos controle e TiO_2 , que não diferiram entre si, (Figura 5).

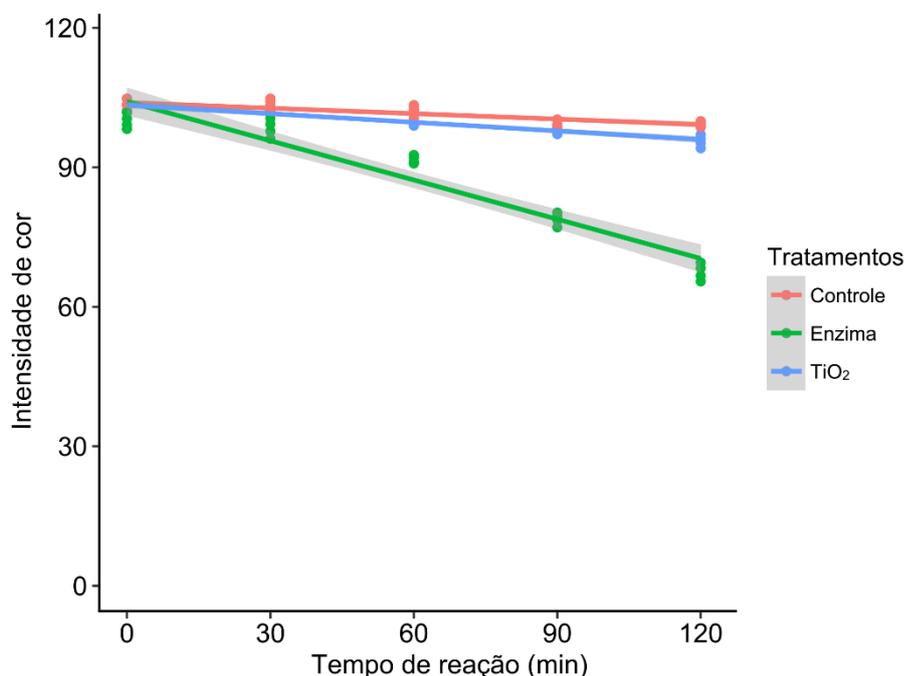


Figura 4. gráfico ilustrando o potencial de degradação do ensaio de biorremediação e do TiO_2 sem a presença dos diferentes espectros luminosos.

A Biorremediação é uma técnica para comum no tratamento de poluentes, e pode ser realizada utilizando agentes biológicos com capacidade de degradar poluentes (Barros, 2007) e a polifenoloxidase, conforme observado (Figura 5), é um exemplo de agente biológico capaz de degradar compostos fenólicos.

A redução na intensidade de cor (Figura 5) que, conseqüentemente, corresponde à redução na concentração do composto fenólico ocorreu porque a polifenoloxidase tem a capacidade de catalisar três diferentes tipos de reações. A hidroxilação de monofenóis à o-difenóis (monoxigenase), à oxidação de o-difenóis a o-quinonas (atividade difenoloxidase) e aoxidação de p-difenóis à p-quinonas (Zawistowski, Biliaderis & Eskin, 1991).

O composto fenólico (catecol) utilizado neste ensaio de biorremediação é um difenol, portanto, ocorreu uma reação de difenoloxidase. Nesse tipo de reação, a polifenoloxidase, que possui dois íons de Cu (cobre) no seu centro ativo, se liga primeiramente ao oxigênio e depois ao composto fenólico e as mudanças de valência dos íons de cobre levam à formação de um

complexo enzima-substrato, onde a ligação O - O se polariza intensamente, levando à hidroxilação do composto (Belitz & Grosch, 1997). O que explica a redução na intensidade de cor de 103 para 67 (Figura 5), aproximadamente, correspondendo a uma redução na concentração do composto fenólico de 1000 mg/L para 666,10 mg/L, o que corresponde a uma degradação de 33,39% do composto.

A avaliação do potencial de degradação do TiO₂ indicou que, na ausência de luz, não ocorre degradação significativa do composto, uma vez que a intensidade de cor ao final dos 120 minutos não se diferiu ($p > 0,05$) do tratamento controle (Figura 5). Isso ocorre porque o TiO₂, como catalizador, se mostra eficiente apenas na presença radiação com espectro de cor entre 350nm e 400nm (Paschoalino, Kiwi & Jardim, 2006). Apesar de não ter sido significativa, a variação ocorrida na intensidade do tratamento “TiO₂” pode ser explicada pela exposição da amostra, durante o preparo, à luz ambiente que possui espectros luminosos capazes de irradiar o TiO₂ (Inagaki et al., 2015).

Nos ensaios de biorremediação com luz, a degradação do composto fenólico foi maior em todos os espectros de luminosos em relação ao controle ($F = 887,83$; $p < 0,01$; $gl = 3$). Porém, tratamentos com diferentes espectros de luz não diferiram entre si. Todos os tratamentos com exposição a luz sofreram degradação conforme o tempo de exposição ($F = 1183,13$; $p < 0,01$; $gl = 4$). A interação significativa entre tempo e tratamento ($F = 169,12$; $p = 0,01$; $gl = 12$) mostra eficiência da biorremediação em relação à concentração inicial (Figura 5).

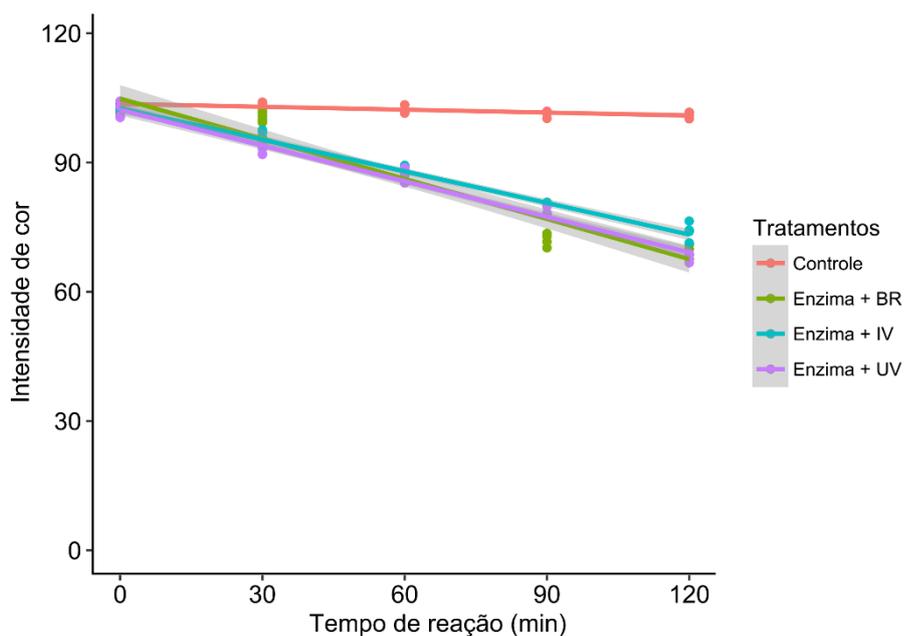


Figura 5: gráfico ilustrando o potencial de degradação do ensaio de biorremediação com a presença dos diferentes espectros luminosos.

O ensaio de biorremediação com exposição aos diferentes espectros luminosos não se diferiu do ensaio de biorremediação sem luzes, uma vez que a redução na intensidade de cor foi de 103 para 69,21, 74 e 67 o que corresponde a uma redução na concentração de 1000 mg/L para 682,64 mg/L (degradação: 31,73%), 728,7 mg/L (degradação: 27,13%) e 661,39 mg/L (degradação: 33,86%) para os espectros luminosos BR, IV e BR, respectivamente. Portanto, os espectros luminosos não interferem na atividade da polifenoloxidase.

No ensaio de fotodegradação com TiO_2 , os tratamentos diferiram em relação ao espectro de luz ($F= 879,40$; $p<0,01$; $gl=3$), ao tempo ($F=537,92$; $p<0,01$; $gl=$) e na interação entre os mesmos ($F= 106,9$; $p<0,01$; $gl=12$). O tratamento com luz ultravioleta apresentou maior degradação do composto, enquanto com luz branca foi intermediário e luz infravermelha não se diferiu do controle (Figura 6).

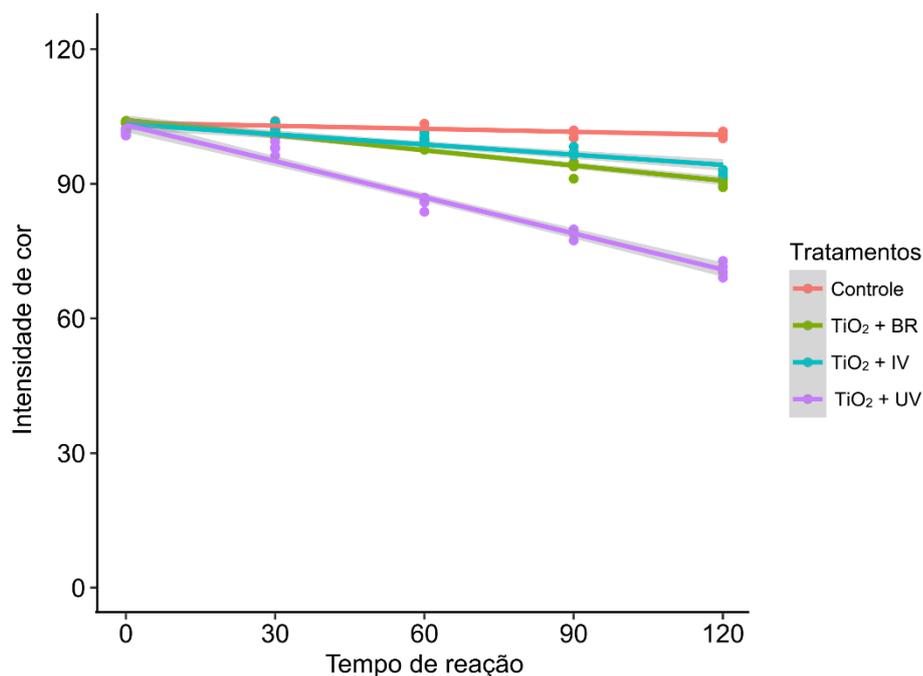


Figura 6: gráfico representando o potencial do ensaio de fotodegradação com TiO_2 exposto aos diferentes espectros luminosos.

O TiO_2 (óxido de titânio) é um semicondutor, que ao ser irradiado por um espectro luminoso com energia superior ou igual ao seu “ban-gap” (3,2 eletrons-volt) é capaz de

promover a fotocatalise de compostos orgânicos como o catecol, por exemplo. Ao ser irradiado, o TiO_2 é ativado e promove a formação de um par de elétrons, criando uma lacuna nas "band-gap's" do catalisador, o que leva à formação de sítios de redução e oxidação e, dessa maneira, o composto fenólico pode reagir diretamente com a lacuna da banda ou com os radicais de hidroxilas que se formam na reação da água presente no efluente com os sítios de oxidação (Kondo et al., 2003).

O TiO_2 apresenta melhor potencial de fotodegradação de compostos orgânicos quando exposto à espectros luminosos com comprimento de onda fora do espectro visível, mais especificamente em um comprimento de onda entre 350nm 400nm Fox & Dulay, 1993; Hoffman et al., 1995). O tratamento " TiO_2 + UV", onde o composto foi exposto à luz ultravioleta, a degradação foi maior (Figura 6) devido ao comprimento de onda deste espectro (ente 280nm a 400nm), o que levou a uma maior degradação do composto fenólico, reduzindo a concentração do composto de 1000mg/L para 699,08, o que corresponde a uma redução de 30,09 % na concentração do composto fenólico (Fox & Dulay, 1993; Hoffman et al., 1995).

O tratamento " TiO_2 + BR" apresentou menor degradação quando comparado com o tratamento " TiO_2 + UV" (Figura 6). O comprimento de onda deste espectro (BR) está acima de 400nm, ou seja, dentro do espectro de luz visível, não sendo capaz de irradiar o TiO_2 (Fox & Dulay, 1993; Hoffman et al., 1995).

No tratamento TiO_2 + IV, apesar do composto ser exposto à um espectro luminoso fora do visível, o aproveitamento foi o menor em relação aos demais tratamentos (Figura 6), com redução na concentração do composto de 1000 mg/L para 909,27 (degradação: 9,07%). Isso ocorre porque este espectro luminoso possui um elevado comprimento de onda (> 700nm) e, conseqüentemente, energia menor ao "band-gap" do TiO_2 , não sendo capaz de irradiar-lo a um ponto que o mesmo possa degradar o poluente (Fox & Dulay, 1993; Hoffman et al., 1995; Kondo, et al., 2003).

No ensaio sinérgico houve diferença entre os espectros de luz e destes em relação ao controle ($F=3706,6$; $p<0,01$; $gl=3$). O tempo de exposição exerceu efeito sob a degradação do composto ($F=2123,8$; $p<0,01$; $gl=4$), exceto no controle. A interação entre tempo e tratamentos mostra a eficiência do sinergismo entre biorremediação ($F=310,1$; $p<0,01$; $gl=12$) e fotodegradação na degradação do composto (Figura 7).

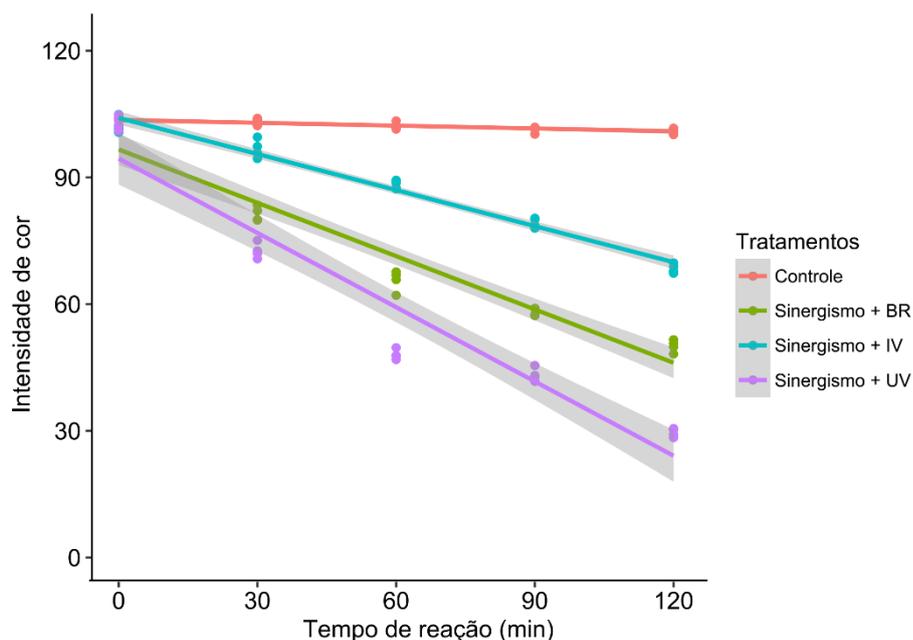


Figura 7: gráfico representando o potencial de degradação do ensaio sinérgico utilizando TiO_2 e polifenoloxidase e a exposição à diferentes espectros luminosos durante diferentes intervalos de tempo.

No ensaio sinérgico a degradação do composto foi significativamente maior em relação aos ensaios de biorremediação (tanto na presença quanto na ausência de luz) e fotodegradação. Se destacando em relação aos demais, o tratamento “Sinergismo + UV” apresentou redução na concentração do composto de 1000 mg/L para 301,48 mg/L, o que corresponde a um percentual de degradação equivalente a 69,85 %. O que mostra que a combinação dos métodos é capaz de promover significativamente a degradação de compostos fenólicos.

O percentual de degradação obtido no tratamento “Sinergismo + UV” foi maior devido ao fato de que o composto fenólico foi degradado tanto pela polifenoloxidase quanto pelo TiO_2 , que ao ser irradiado pela luz ultravioleta é capaz de promover a fotodegradação do composto.

Os demais tratamentos apresentaram menor degradação, com redução de 1000 mg/L para 498,70 mg/L para o tratamento “Sinergismo + BR” e de 1000 mg/L para 675,23 para o tratamento “Sinergismo + IV”, o que corresponde a um percentual de degradação equivalente a 50,13% e 32,47 %, respectivamente.

Os ensaios de biorremediação com presença de luz, fotodegradação com TiO_2 e a combinação (Sinergismo) dos mesmos diferiram entre si ($F= 84,66$; $p<0,01$; $gl= 2$). Onde o ensaio sinérgico

apresentou maior degradação ($t=-4.53$; $p<0,01$) e a fotodegradação menor degradação em relação à biorremediação ($t=3.35$; $p<0,01$). Os espectros de luz entre os tratamentos não diferiram em relação à degradação do composto ($p>0,05$). No ensaio de biorremediação não houve diferença entre os tipos de luz ($p>0,05$). O ensaio sinérgico utilizando a radiação UV foi o mais eficiente na degradação do composto ($t=-2.680$; $p<0,01$). O tratamento de fotodegradação com TiO_2 utilizando luz infravermelho foi o menos eficiente na degradação do composto ($t=2.922$; $p<0,01$; Figura 8).

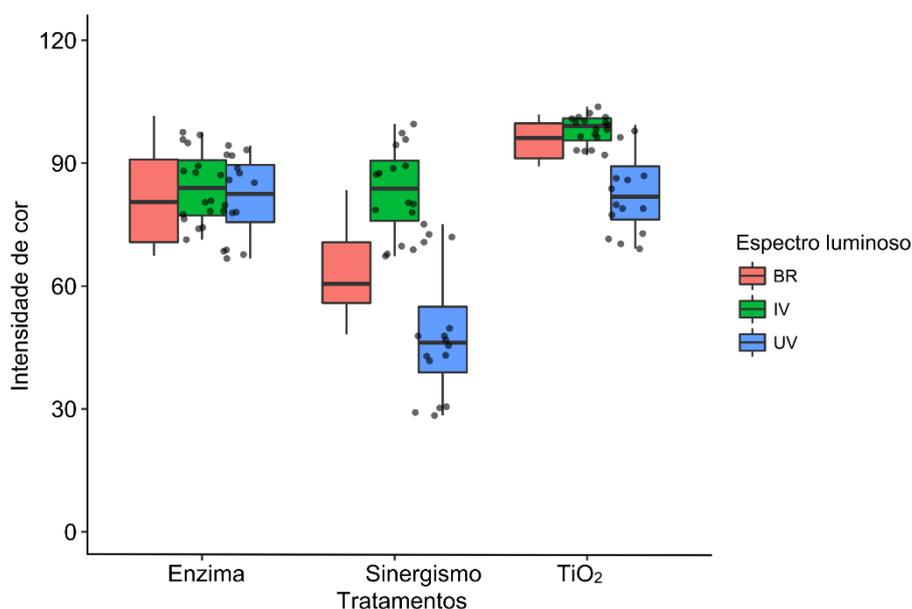


Figura 8: gráfico comparando o potencial de degradação dos ensaios de biorremediação com presença de luz, fotodegradação e sinergismo mediante aos tratamentos de exposição aos diferentes espectros luminosos.

A comparação dos ensaios em relação aos espectros luminosos mostra que sinergismo entre biorremediação e fotodegradação é o mais eficiente no tratamento do composto fenólico, principalmente quando exposto ao espectro ultravioleta (Figura 8) possui comprimento de onda que torna o TiO_2 mais efetivo na fotodegradação (350nm – 400nm; Fox & Dulay, 1993; Hoffman et al., 1995)

4. Considerações finais

Entre os frutos avaliados, o *Philodendron bipinnatifidum* é o mais indicado, pois apresenta elevados níveis de Polifenoloxidase, o que o torna adequados ao uso para o tratamento de efluentes fenólicos.

O dispositivo 3D desenvolvido possibilita a simulação do tratamento de tais compostos em microescala, com baixo custo e volume de resíduos, facilitando o estudo das técnicas de biorremediação e fotodegradação, que posteriormente podem ser utilizadas na escala macro.

A enzima polifenoloxidase consegue promover a biorremediação de compostos fenólicos, mesmo em concentrações elevadas. A fotodegradação com luz ultravioleta utilizando o TiO₂ como catalizador também é um método capaz de promover a degradação de compostos fenólicos. A utilização dessas duas técnicas, de maneira sinérgica, é ainda mais eficiente na degradação de compostos fenólicos, sendo capaz reduzir a concentração do composto em mais de 69%.

A utilização do dispositivo de papel na detecção das concentrações do composto fenólico, tornaram os ensaios mais práticos e reduziram tanto o tempo quanto o custo do experimento.

5. Referencias

- G. C. Alves, P. A. Costa, A. M. F. Lima, N. R. C. F. Machado, V. S. 2013, **5**, 54-63.
- K. B. Anderson, S. Y. Lockwood, R. S. Martin; D. M. Spence. *Analytical Chemistry*. 2013, **85**, 5622-5626.
- L. Ayed, N. Asses, N. Chammem, N. B. Othaman, M. Hamdi. *Biodegradation*. 2017, **28**, 125-138.
- R. Andreozzi, R. J. Marotta. *Harzard. Mater.* 1999, **69**, 303-17.
- C. A. Barros. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.
- H. D. Belitz, W. Grosch. *Química de los alimentos*. 2. ed. Zaragoza: Acríbia, 1997. 119-120
- N. M. Brito; M. L. Ribeiro, O. P. Amarante Junior, L. Polese. *R. Ecotox. e Meio Ambiente* 2003, **13**, 129.
- W. K. T. Coltro, C. M. Cheng, E. Carrilho, D. P. De Jesus. *Electrophoresis*. 2014, **00**, 1–16.
- J. L. Cruz. Teófilo Otoni- UFVJM, 2016.
- P. S. Dittrich, K. Tachikawa, A. Manz. *Analytical Chemistry*, 2006, **78**, 3887-3907.

- N. Durán, E. Esposito. *Appl. Catal. B: Environmental*, 2000, **28**, 83-89.
- Fox, M. A.; Dulay, M. T. *Chem Rev.*, 1993, **93**, 342-357.
- L. F. Garcia, S. R. Benjamin, R. S. Antunes, F. M. Lopes, V. S. Somerset, E. S. Gil. *Prepar. Biochem. & Biotec*, 2016, **46**, 850-855.
- P. Gao, Y. Feng, C. Wang, Z. Zhang, J. Liu, N. Ren *Amer. Soc. of Civ. Engineers*. 2011, 1114-1121.
- B. E. Halpin, C. Y. Lee. *J. Food Sci.*, Chicago, 1987, **52**, 1002-1005.
- M. R. Hoffman, S. T. Martin, W. D. W Choi. *Chem. Rev.*, 95: 69-96.
- M. E. Hoque, Y. L. Chuan, I. Pashby. *Biopolymers*. 2012, **97**, 83-93.
- C. S. Inagaki, A. E. S. Reis, N. M. Oliveira, V. H. Paschoal, Í. O. Mazali, A. A. S. Alfaya. *Química Nova*, 2015, **38**, 1037-1043
- M. M. Kondo, J. F. F. Orlanda, M. G. A. B. Ferreira, M. T. Grassi. *Química Nova*, 2003, **26**, 1.
- M. L. Kovarik, P. C. Gach, D. M. Ornoff, Y. Wang, J. Balowski, L. Farrag, N. L. Allbritton. *Analytical Chemistry*, 2011, **84**, 516-540.
- M. L. Kovarik, D. M. Ornoff, A. T. Melvin, N. C. Dobes, Y. Wang, A. J. Dickinson, P. C. Gach, P. K. Shah, N. L. Allbritton. *Analytical Chemistry*, 2013, **85**, 451-72.
- P. J. Kitson, M. H. Rosnes, V. Sans, V. Dragone, L. Cronin. *Lab on a Chip*. 2012, **12**, 3267-3271.
- R. C. Mendonça, J. M. Felfi li, B. M. T. Walter, M. C. Silva Júnior, A. V. Rezende, T. S. Filgueiras, P. E. Nogueira. *Flora Vascular do Cerrado*. 2008, 289-556.
- M.P. Paschoalino, J. Kiwi, W.F. Jardim. *Appl. Catal B: Environ*, 2006, **68**, 68–73.
- R. F. Pupo Nogueira, A. G. Trovó, M. R. A. Silva, R. D. Villa. *Química Nova*, 2007, **30**, 2, 400 - 408.
- V. S. Santana, N. R. C. F. Machado. *Acta Sci. Technol.*, 2006, **28**, 155-163.
- C. P. A. B. Teixeira, W. F. Jardim. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Química - IQ, Laboratório de Química Ambiental - LQA. Campinas, 2004, **3**.

E. R. L. Tiburtius, P. Peralta-Zamora, *Quim. Nova*, 2004, **27**, 441-446.

I. C. Vieira, O. Fatibello-Filho, A. C. E. Granato, K. O. Lupetti. *Eclética Química*. 2004, **29**, 7-14.

A. R. Weyermüller. São Paulo, Atlas, 2010.

J. Zawistowski, C. G. biliaderis, N. A. M. Eskin. London: Elsevier Science, 1991, 218-220.