

CYNTIA CRISTINA DA ROCHA

**DEGRADAÇÃO DO BROMETO DE ETÍDIO EM SOLUÇÃO AQUOSA VIA
OZONIZAÇÃO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

R672d Rocha, Cyntia Cristina da, 1989-
2014 Degradação do brometo de etídio em solução aquosa via ozonização /
 Cyntia Cristina da Rocha. - Viçosa, MG, 2014.
 xiii, 85f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: André Fernando de Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.80-85.

1. Brometo de etídio - Deterioração. 2. Ozonização. 3. Toxicologia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa de
Pós-graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 547

CYNTIA CRISTINA DA ROCHA

**DEGRADAÇÃO DO BROMETO DE ETÍDIO EM SOLUÇÃO AQUOSA VIA
OZONIZAÇÃO**

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

APROVADA: 11 de julho de 2014.

Prof^a. Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz
(Coorientadora)

Prof. Antônio Augusto Neves
(Coorientador)

Prof^a. Lêda Rita D'Antonino Faroni

Prof.^a Renata Pereira Lopes Moreira

Prof. André Fernando de Oliveira
(Orientador)

À minha família...
minha grande inspiração!

*“Todo grande progresso da ciência resultou
de uma nova audácia da imaginação”*

(John Dewey)

AGRADECIMENTOS

Pelo amparo, refúgio e permitir que todo esse trabalho se concretizasse, agradeço a Deus.

Pelo amor incondicional, porto-seguro, por nunca me deixarem desistir dos meus sonhos, agradeço aos meus pais, Gelmires e Celeste.

Pela sinceridade, fortaleza e conselhos, agradeço ao meu irmão, David.

Pelo companheirismo, compreensão e apoio em todas as h, agradeço ao meu querido Marquinho.

Pela amizade sincera, pelos momentos mais felizes juntas, por serem a minha segunda família, agradeço às minhas amigas, Juliana e Indira.

Pelos grandes ensinamentos, orientação e conselhos. Por tornar essa experiência de vida mais rica e inspiradora, agradeço ao meu orientador, André Fernando.

Pelo carinho, apoio e disponibilidade, agradeço aos professores Maria Eliana e Antônio Augusto.

Pelos ensinamentos, socorro nas h de desespero, dedicação e apoio, agradeço à Fernanda Heleno.

Pela amizade, apoio e por tornarem os dias de trabalho mais leves, agradeço a todos os membros do Laqua, queridos Laquarianos.

Pela confiança e oportunidade de fazer mais pela minha pesquisa, agradeço à professora Ann Honor Munteer.

Pela contribuição, paciência e ensinamentos, agradeço à Déborah Magalhães e o Laboratório de Ecotoxicologia da UFV.

Pela minha formação acadêmica e pela oportunidade, agradeço à Universidade Federal de Viçosa.

A todos vocês, que fizeram dessa caminhada uma grande experiência de vida, muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. Brometo de Etídio (EtBr)	3
2. Processos Oxidativos Avançados (POA)	6
2.1. Sistemas típicos de Processos Oxidativos Avançados.....	7
2.1.1. Sistemas homogêneos	8
2.1.2. Sistemas heterogêneos	9
2.2. Aplicação dos Processos Oxidativos Avançados na degradação de compostos orgânicos.....	10
2.2.1. Alternativas para remoção/degradação do brometo de etídio em efluentes.....	11
3. Ozônio.....	12
3.1. Estabilidade do ozônio em água.....	14
3.2. Geração do Ozônio.....	15
3.2.1. Processo corona.....	15
3.2.2. Radiação ultravioleta	16
3.3. Ozonização como técnica de degradação de compostos orgânicos	17
3.3.1. Ozônio / Radical hidroxila	18
3.3.2. Ozônio/UV	21
3.3.3. Ozonização catalítica.....	21
4. Planejamento e otimização de experimentos.....	24
4.1. Planejamento univariado	25

4.2.	Planejamento multivariado	25
4.2.1.	Método do planejamento fatorial.....	26
4.2.2.	Metodologia de Superfície de Resposta	26
4.2.3.	Matriz de Doehlert	28
5.	Testes ecotoxicológicos	30
5.1.	Organismos-teste	32
OBJETIVOS	34
CAPÍTULO 2: OZONIZAÇÃO DO BROMETO DE ETÍDIO LIVRE EM SOLUÇÃO AQUOSA	35
1.	Materiais e métodos.....	35
1.1.	Reagentes e soluções.....	35
1.2.	Instrumentação	35
1.3.	Procedimento experimental.....	36
1.3.1.	Planejamento experimental.....	37
1.3.2.	Determinação da concentração do ozônio	38
1.3.3.	Monitoramento dos produtos de degradação	39
1.3.4.	Determinação das constantes de velocidade e eficiência do processo de degradação	39
1.3.5.	Testes de toxicidade dos produtos de degradação	40
2.	Resultados e Discussão	42
2.1.	Caracterização da amostra	42
2.2.	Estudo da cinética de degradação do brometo de etídio	46
2.2.1.	Seleção do modelo cinético	47
2.2.2.	Avaliação da influência de parâmetros na cinética de degradação via Matriz de Doehlert.....	49
2.3.	Estudo do percentual de degradação do brometo de etídio via Matriz de Doehlert.....	56
2.4.	Testes ecotoxicológicos	59

2.4.1. Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i>	59
2.4.2. Teste de toxicidade aguda com semente de <i>Lactuca sativa</i>	61
CAPÍTULO 3: OZONIZAÇÃO CATALÍTICA DO BROMETO DE ETÍDIO EM SOLUÇÃO AQUOSA	66
1. Procedimento experimental.....	66
1.1. Planejamento experimental	66
1.2. Monitoramento dos produtos de degradação	67
2. Resultados e Discussão.....	67
2.1. Estudo da eficiência de degradação via ozonização catalítica	68
2.2. Testes de toxicidade.....	72
2.2.1. Germinação da semente de alface	72
2.2.2. Comprimento da raiz de alface	73
PERSPECTIVAS FUTURAS	78
CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura molecular do Brometo de Etídio. Fonte: NTP (1994).	3
Figura 2: Espectros de excitação e emissão do brometo de etídio.....	4
Figura 3: Ilustração do processo de intercalação em dupla hélice de DNA.	5
Figura 4: Tolerância do ser humano à exposição ao ozônio. Fonte: Bernardo, 1993.	14
Figura 5: Esquema do princípio de funcionamento de um gerador de ozônio tipo corona. Fonte: Barlow, 1994.	16
Figura 6: Mecanismo de reação via ataque direto do ozônio molecular à matéria orgânica em meio ácido (Mecanismo de Criegee). Fonte: Solomons, 2013.....	19
Figura 7: Possíveis mecanismos de degradação via ozonização catalítica heterogênea. Fonte: Nawrocki, 2013.....	23
Figura 8: Esquema de gráficos de superfície de resposta. (a) gráfico tridimensional; (b) superfície de contorno. Fonte: Montgomery, 2005.....	28
Figura 9: Distribuição espacial dos pontos experimentais em um design Doehlert para 2 (pontos 1 a 7) e 3 (pontos 1 a 13) variáveis. Fonte: Araújo & Janagap, 2012.....	29
Figura 10: Microcrustáceo <i>Daphnia similis</i> . Fonte: (IPEN, 2013).	32
Figura 11: Esquema da montagem do experimento de ozonização. Fonte: Autor	36
Figura 12: Esquema geral do procedimento realizado para teste de toxicidade com semente de alface (<i>Lactuca sativa</i>). Fonte: Sobrero, Ronco, 2004.....	42
Figura 13: Espectro de absorção de solução aquosa de Brometo de Etídio $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$	43
Figura 14: Espectros de absorção em solução aquosa para (■) Na_2CO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$; (●) Na_2HPO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, (○) H_3BO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$; (Δ) tampão universal, usando água como branco.....	44
Figura 15: Espectro de absorção do tampão universal e Na_2CO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, ambos em pH 2,0.	45
Figura 16: Curva analítica obtida da absorção máxima em 295 nm de soluções aquosas do EtBr entre $0,25$ e $4,00 \mu\text{mol L}^{-1}$, em pH 2,0.....	46
Figura 17: Comportamento da degradação do brometo de etídio $1,27 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ via ozonização a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 11,0 e $c(\text{O}_3) = 2,0 \text{ mg L}^{-1}$	47

Figura 18: Gráficos de resíduo <i>versus</i> ordem de coleta para os ajustes de (a) pseudo-primeira ordem e (b) pseudo-segunda ordem.....	48
Figura 19: Gráfico de resíduos dos dados ajustados à Matriz de Doehlert <i>versus</i> ordem de coleta.	52
Figura 20: Coeficientes determinados por regressão Stepwise para os parâmetros avaliados e suas interações.	53
Figura 21: (a) Superfície de resposta e (b) Superfície de contorno obtidas a partir da Matriz de Doehlert tendo a constante de velocidade como resposta analítica.....	54
Figura 22: Espectros de absorção molecular do brometo de etídio ($1,27 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹) antes e após procedimento de ozonização sob diferentes condições experimentais.	56
Figura 23: Coeficientes de regressão para a influência do (■) pH e (○) concentração de ozônio.	59
Figura 24: Resultado do teste agudo com semente de alface (a) controle negativo (b) inibição da germinação das sementes.	62
Figura 25: Intervalos de confiança da ANOVA para o percentual de germinação do branco, do produto de degradação A e produto de degradação B.....	63
Figura 26: Comparação do comprimento da raiz de semente de alface exposta à água destilada, ao produto de degradação A e ao produto de degradação B.	64
Figura 27: Eficiência de degradação do brometo de etídio na presença e ausência de catalisador com dosagem de 0,1 g L ⁻¹ , variando o pH do sistema. Temperatura igual a 25 °C e concentração de ozônio igual 2,0 mg L ⁻¹	68
Figura 28: Eficiência de degradação do brometo de etídio na presença e ausência de catalisador com dosagem de 0,5 g.L ⁻¹ , variando o pH do sistema. Temperatura igual a 25 °C e concentração de ozônio igual 2,0 mg L ⁻¹	69
Figura 29: Intervalo de confiança do Teste <i>post hoc</i> de Tukey a 95/ para o percentual de degradação do brometo de etídio via ozonização catalítica heterogênea com dosagem dos catalisadores a 0,5 g L ⁻¹ e pH 2,0.	70
Figura 30: Comprimento médio da raiz de sementes de alface após exposição a diferentes produtos de degradação do brometo de etídio. (*) Ensaio que apresentaram diferença significativa segundo Teste <i>post hoc</i> de Tukey a 95/	74

- Figura 31: Comparação do comprimento da raiz de semente de alface exposta à água destilada (branco) e aos produtos de degradação do brometo de etídio via ozonização catalítica na presença de (a) ZnO, (b) Al₂O₃, (c) XAD-7. 75
- Figura 32: Comparação do comprimento médio da raiz de sementes de alface em meio ácido e meio básico, na ausência e presença de diferentes catalisadores. 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Potencial elétrico padrão de redução de alguns agentes oxidantes.....	7
Tabela 2: Propriedades físico-químicas do ozônio.....	13
Tabela 3: Valores reais e códigos das variáveis experimentais analisadas para montagem do planejamento experimental via Matriz de Doehlert.....	37
Tabela 4: Valores da constante de velocidade de degradação do brometo de etídio e parâmetros estatísticos para ajuste dos dados aos modelos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem para a condição 30 °C, pH 6,5 e $c(O_3) = 2,0 \text{ mgL}^{-1}$	49
Tabela 5: Valores críticos para o Teste de Grubbs a 95% , para um conjunto com N dados amostrais.	50
Tabela 6: Condições experimentais de temperatura, pH e concentração de ozônio planejada segundo Matriz de Doehlert e respectivas constantes de velocidade para cada experimento.	51
Tabela 7: Condições experimentais de temperatura, pH e concentração de ozônio planejadas segundo Matriz de Doehlert e respectivos percentual de degradação para cada experimento	57
Tabela 8: Resultados qualitativos do teste de toxicidade aguda com <i>D. similis</i> para amostras da composição do tampão universal, do brometo de etídio e dos produtos de degradação para diluições sucessivas, a partir da solução original.....	61
Tabela 9: Taxa de germinação das sementes de alface após exposição aos produtos de degradação em pH 2,0 (A) e em pH 11,0 (B) por 120 h.	62
Tabela 10: Condições de atividade catalítica observadas para os catalisadores ZnO e Al ₂ O ₃ e resina XAD-7.	70
Tabela 11: Condições experimentais e percentual de germinação de sementes de alface após exposição aos produtos de degradação do brometo de etídio via ozonização catalítica.	73
Tabela 12: Resultado da toxicidade dos produtos de degradação do brometo de etídio via ozonização catalítica heterogênea com teste agudo com sementes de alface.....	76

RESUMO

ROCHA, Cyntia Cristina da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2014. **Degradação do brometo de etídio em solução aquosa via ozonização.** Orientador: André Fernando de Oliveira. Co-orientadores: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz e Antônio Augusto Neves.

O brometo de etídio é um composto comumente utilizado em laboratórios de biologia molecular como marcador para visualização de DNA. Apresenta riscos potenciais de toxicidade e mutagenicidade, sendo necessário o tratamento dos seus resíduos antes do descarte. Na tentativa de evitar riscos de contaminação ambiental, a ozonização tem se mostrado uma técnica promissora devido o seu elevado potencial oxidante. Embora o uso de ozônio para degradação de compostos orgânicos venha se tornando cada vez mais comum, ainda pouco se sabe sobre os intermediários de reação e produtos formados durante a ozonização de efluentes. Dessa forma, é preciso garantir que esses produtos de degradação não sejam tóxicos. Para tanto se faz necessária aplicação de estudos toxicológicos. Esse trabalho estudou a cinética de degradação do brometo de etídio e a eficiência de degradação do corante em solução aquosa na presença e ausência dos catalisadores ZnO, Al₂O₃ e resina XAD-7, além de identificar o caráter tóxico dos produtos de degradação. Na aplicação da ozonização, observou-se que a cinética de degradação do composto é favorecida em meio ácido, sendo dependente também da concentração de ozônio. A eficiência de degradação é dependente do pH do meio e apresenta melhores resultados em meio básico, com cerca de 96% de remoção do corante. Nessa técnica, os produtos de degradação, tanto para meio ácido, quanto para meio básico, apresentaram toxicidade. A ozonização catalítica apresentou aumento da eficiência de degradação do brometo de etídio na presença do catalisador ZnO em meio ácido, em uma dosagem de 0,5 g L⁻¹, aumentando o percentual de degradação de 75,3% para 95,5%, nessa condição. O Al₂O₃ e a XAD-7 não apresentaram atividade catalítica significativa. Os testes de toxicidade realizados para os produtos de degradação via ozonização catalítica se apresentaram atóxicos quando comparados aos resultados da ozonização sem a presença de catalisadores.

ABSTRACT

ROCHA, Cyntia Cristina da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2014. **Degradation of ethidium bromide in aqueous solution via ozonation.** Advisor: Andre Fernando de Oliveira. Co-advisors: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz and Antônio Augusto Neves.

Ethidium bromide is a compound commonly used in molecular biology laboratories as a marker for visualization of DNA. Presents potential risks of toxicity and mutagenicity, the treatment of their waste before disposal is required. In an attempt to prevent environmental contamination, ozonation has shown a promising technique due to its high oxidizing potential. Although the use of ozone for degradation of organic compounds come becoming increasingly common, little is known about the reaction intermediates and products formed during the ozonation of wastewater. Thus, it must ensure that these degradation products are not toxic. So is necessary the application of toxicological studies. This study investigated the kinetics of degradation of ethidium bromide and the efficiency degradation of the dye in aqueous solution in the presence and absence of catalysts ZnO, Al₂O₃ and XAD -7 resin and identify the nature of toxic degradation products. In the application of ozonation, it was observed that the degradation of the compound is favored in acidic environment, which also depends on the concentration of ozone. The efficiency of degradation is dependent on the pH and the best results are in basic medium, with approximately 95% removal of the dye. In this technique, the degradation products in acidic and basic medium showed toxicity. The catalytic ozonation showed an increase in the degradation efficiency of ethidium bromide in the presence of ZnO catalyst in acid medium, at a dosage of 0.5 g L⁻¹, increasing the rate of degradation of 75.3% to 95.5 %, in that condition. The Al₂O₃ and XAD-7 showed no significant catalytic activity. The toxicity tests performed for degradation products via catalytic ozonation presented nontoxic when compared to the results of ozonation without the presence of catalysts.

INTRODUÇÃO GERAL

A poluição ambiental tem sido um assunto de interesse nas últimas décadas em todo o mundo. Tanto países desenvolvidos quanto em desenvolvimento têm se preocupado com as questões ambientais e buscado alternativas capazes de solucionar e evitar problemas que comprometam seriamente a manutenção de um ecossistema saudável. Cada vez mais fóruns de discussão e pesquisas sobre o tema têm reunido esforços para conscientizar a sociedade civil dos riscos de contaminação do meio ambiente.

A poluição aquática tem sido uma das questões ambientais que tem provocado preocupação devido aos riscos diretos à saúde humana e ao ecossistema, causando desequilíbrios naturais e doenças. Um dos grandes causadores dessa poluição são as águas residuárias, provenientes muitas vezes de indústrias e laboratórios de pesquisa que, por falta de planejamento e fiscalização, acabam promovendo o descarte dos seus resíduos diretamente nos mananciais sem os devidos tratamentos. Dessa maneira, o tratamento de efluentes tóxicos é um assunto de interesse devido à relevância dos impactos ambientais que são causados quando ocorrem manejo e gerenciamento inadequados.

Dentre os contaminantes do sistema aquático, a remoção de compostos orgânicos tem sido responsável por um grande número de pesquisas e também se tornando um desafio tecnológico, uma vez que os tratamentos convencionais não são suficientemente eficientes e outras vezes esbarram em dificuldades operacionais e de custos elevados, principalmente quando aplicados em escala industrial.

O controle da contaminação causada por compostos orgânicos é de grande importância devido à toxicidade associada a muitos desses compostos. Os efeitos adversos dessa contaminação podem colocar em risco não só o equilíbrio natural do meio ambiente, como também a saúde humana pelo consumo de fontes contaminadas e acúmulo de substâncias tóxicas. Diante disso, tem crescido a busca por novas tecnologias aplicáveis ao tratamento de efluentes que sejam mais

modernas, atendendo as reais necessidades de descontaminação e que tenham menor custo, garantindo uma aplicação mais viável.

CAPÍTULO I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Brometo de Etídio (EtBr)

O brometo de etídio (EtBr) é um corante ainda muito utilizado como marcador não-radioativo para identificação e visualização de ácidos nucleicos em métodos analíticos, como a eletroforese. No entanto, a sua capacidade de se intercalar aos pares de bases do DNA acaba também lhe conferindo características perigosas, como a mutagênese e a carcinogênese (FAISAL *et al.*, 2007; CARBAJO *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2012).

O brometo de etídio (Figura 1) é um composto aromático da classe da fenantridina. É um sólido vermelho escuro, cristalino, não volátil, solúvel em água, que fluoresce sob luz ultravioleta numa coloração alaranjada, sendo estável em condições normais de temperatura e pressão (NTP, 1994).

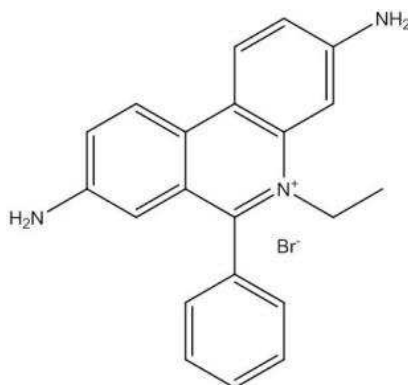


Figura 1: Estrutura molecular do Brometo de Etídio. Fonte: NTP (1994).

Em soluções aquosas, o EtBr apresenta absorção máxima na região do espectro eletromagnético do ultravioleta (UV) em 210 nm e 285 nm. Sua excitação permite emissões de fluorescência na banda de 605 nm (Figura 2) (NTP, 1994; SABNIS, 2010).

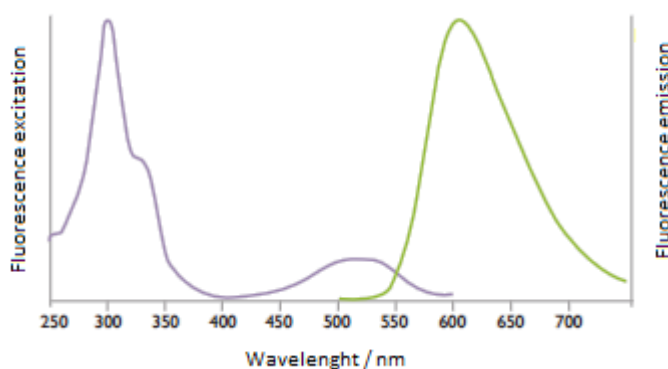


Figura 2: Espectros de excitação e emissão do brometo de etídio.

Fonte NTP (1994).

O brometo de etídio surgiu em 1950 como uma droga anti-tripanosossoma para o tratamento de bovinos contaminados por *Trypanossoma brucei* (espécie de protozoário) na África, desenvolvido por químicos do Boot Pure Drug Co., Ltd, em Nottingham, Reino Unido. Seu uso veterinário consiste na sua capacidade de promover perda do genoma mitocondrial dos protozoários, chamado DNA do cinetoplasto (kDNA, semelhante em estrutura e função genética ao DNA mitocondrial nos eucariontes), a partir da inibição da replicação do kDNA, sendo esse o mecanismo mais provável para a morte do tripanossoma (ROY *et al.*, 2010).

É largamente utilizado em laboratórios de biologia molecular e bioquímica como agente para visualização de ácidos nucleicos devido a sua capacidade de se intercalar aos pares das bases do DNA. Um grande número de técnicas faz uso do EtBr, tais como: eletroforese, fluorimetria, espectrofotometria e amplificação da reação de polimerase em cadeia (PCR) (NTP, 1994). Sua utilidade é diversificada nessas áreas podendo ser usado para coloração de ácidos nucleicos em estudos de microscopia de fluorescência para diversas drogas; caracterização e quantificação de DNA; como um reagente analítico para monitoramento contínuo de níveis de medicamentos anticancerígenos em fluidos biológicos, como sangue, soro e urina, através dos níveis de dosagem crítica de ligação do DNA (Miller & Hirschfeld, 1992, apud (NTP, 1994)).

Ao se intercalar ao DNA, a fluorescência do brometo de etídio aumenta cerca de 20 vezes, o que o torna bastante útil para visualização do DNA. A razão para essa fluorescência intensa após a ligação é o meio hidrofóbico encontrado entre os

pares de bases ao se mover para esse ambiente, além do aumento da rigidez da molécula, atenuando efeitos intermoleculares que causam a diminuição da fluorescência (*quenching*), por exemplo, pelo ambiente isento de água, que é um agente supressor de fluorescência altamente eficiente. Com a intercalação, o brometo de etídio deforma a estrutura do DNA localmente, removendo as moléculas de água (Figura 3) (OLMSTED; KEARNS, 1977).

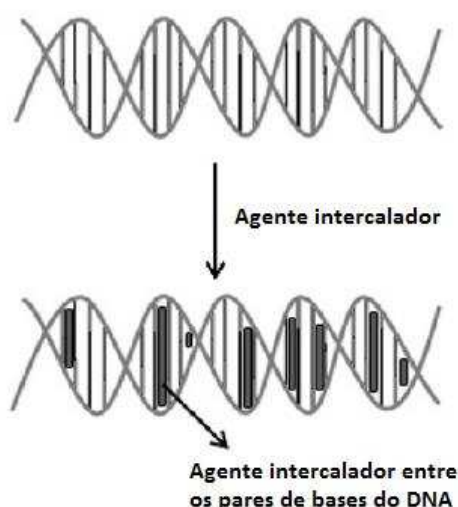


Figura 3: Ilustração do processo de intercalação em dupla hélice de DNA.

Fonte: Carbajo *et al* (2011).

Sua capacidade de se intercalar às fitas duplas de DNA também torna o EtBr perigoso à saúde humana, tornando-o como um suspeito agente genotóxico¹ (HUSSEN; NTP, 1994; SABNIS, 2010), devido à deformação da cadeia dupla de DNA, impedindo a ação da DNA polimerase e assim comprometendo processos biológicos como a transcrição e a replicação do DNA.

Não há dados referentes aos valores de toxicidade (LD₅₀) do brometo de etídio em humanos (NTP, 1994). Testes realizados apresentaram mutagenicidade² para bactérias *Salmonella typhimurium*, mas somente após o tratamento com

¹ Agente genotóxico é aquele que interage com o DNA produzindo alterações em sua estrutura ou função causando efeitos tóxicos sobre o material genético (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006)

² Mutagenicidade é a propriedade que tem um agente, substância ou fenômeno em ser capaz de induzir ou aumentar a frequência de mutações num organismo.

homogeneizado de fígado, que simula a degradação metabólica da molécula a ser testada. A ausência de mutagenicidade sem a presença do homogeneizado de fígado indica que o EtBr não é diretamente mutagênico, entretanto seus metabólitos são (MCCANN; AMES, 1975). Segundo o National Toxicology Program (1994), estudos em ratos e camundongos não indicaram um potencial mutagênico do composto; tais estudos avaliaram a carcinogenicidade subcrônica e a desmielinização induzida do nervo ciático em ratos (RIET-CORREA *et al.*, 2002). Outros estudos ainda avaliam a utilização do brometo de etídio como quimioterápico antitumoral (KRAMER; GRUNBERG, 1973; WURMB-SCHWARK, VON *et al.*, 2006; GENTRY *et al.*, 2011) por atuar como um veneno de topoisomerase I, tal como outras drogas anticâncer utilizadas em seres humanos. Tais estudos se apoiam na ideia de que o EtBr não é um agente mutagênico potente em seres humanos, no entanto indicam que ele pode ser tóxico em altas concentrações.

2. Processos Oxidativos Avançados (POA)

Os processos oxidativos avançados têm se mostrado como uma importante alternativa no tratamento de águas superficiais e subterrâneas, bem como de águas residuárias devido à variedade de mecanismo de atuação, podendo ser aplicados tanto para a degradação de compostos orgânicos quanto inorgânicos.

Os POA são uma tecnologia muito utilizada atualmente, especialmente para o tratamento e desinfecção das águas. O primeiro trabalho utilizando ozônio como desinfetante foi realizado em 1886 por De Meritens (GUNTEN, VON, 2003; SANCHES *et al.*, 2003). Entretanto, só a partir de 1973 o termo Tecnologia de Oxidação Avançada passou a ser incorporado. A partir da década de 90 é que surgiu um grande número de estudos relacionados à degradação de compostos orgânicos devido a crescente preocupação da sociedade com o meio ambiente, promovendo grandes debates em torno da aplicação, da eficiência e das limitações da técnica (TEIXEIRA; JARDIM, 2004).

Essa tecnologia envolve a formação de espécies altamente reativas, como radicais hidropoxila (HO_2^*), radicais superóxido (O_2^{*-}) e, principalmente, os radicais hidroxila (OH^*), que são altamente oxidativos e não seletivos (ANDREOZZI *et al.*,

1999; PERKOWSKI; KOS, 2003). Esse processo gera uma quantidade suficiente de espécies reativas transitórias capazes de provocar a mineralização total da matéria orgânica a dióxido de carbono, água e íons inorgânicos, dentre outros (TEIXEIRA; JARDIM, 2004). A taxa de geração e concentração dos radicais influencia diretamente no poder oxidativo (MASTEN; DAVIES, 1994; MARTINS, 2011). Os POA podem ser usados para destruir compostos orgânicos tanto em fase aquosa, como em fase gasosa ou adsorvidos numa matriz sólida; além disso, são considerados processos limpos e não seletivos (STASINAKIS, 2008).

A Tabela 1 lista os potenciais de redução de alguns oxidantes importantes. O radical hidroxila apresenta alto poder oxidante, superando o permanganato e o peróxido de hidrogênio, por exemplo.

Tabela 1: Potencial elétrico padrão de redução de alguns agentes oxidantes.

Espécie	E° / V
Gás flúor	3,03
Radical hidroxila	2,80
Ozônio	2,08
Peróxido de hidrogênio	1,78
Permanganato	1,68
Dióxido de cloro	1,57
Gás cloro	1,36
Gás iodo	0,54

Fonte: Teixeira, Jardim, 2004.

2.1. Sistemas típicos de Processos Oxidativos Avançados

Os radicais hidroxila podem ser gerados a partir de reações que envolvem oxidantes fortes, como ozônio e peróxido de hidrogênio, além de semicondutores e irradiação ultravioleta (VIANNA; TÔRRES, 2008; MARTINS, 2011). Os processos que utilizam catalisadores sólidos são chamados de heterogêneos, e os demais são chamados homogêneos.

2.1.1. Sistemas homogêneos

Em sistemas homogêneos, a degradação pode ocorrer por dois mecanismos distintos: a fotólise direta com ultravioleta e a geração de radical hidroxila.

- Fotólise direta com ultravioleta: a fotólise pode promover reações de oxidação/redução se a energia eletromagnética fornecida for igual à energia necessária para promover os elétrons do estado fundamental para o estado excitado (TEIXEIRA; JARDIM, 2004; MARTINS, 2011). A maioria dos estudos envolve sua aplicação conjunta com outros processos oxidativos, como $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, O_3/UV , $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_3/\text{UV}$. No sistema, O_3/UV , por exemplo, o ozônio absorve radiação ultravioleta, sofrendo fotólise e se convertendo a H_2O_2 , formando radicais hidroxila subsequentemente.
- Geração de radical hidroxila: nesse mecanismo, os radicais hidroxila podem ser gerados a partir da presença de oxidantes fortes, com ou sem a presença de irradiação, bem como por métodos como: oxidação eletroquímica, radiólise, feixe de elétrons e ultrassom.

A oxidação eletroquímica baseia-se na aplicação de corrente elétrica, por meio de um reator eletroquímico, entre dois eletrodos em solução aquosa. Reações de oxidação e redução ocorrem na superfície do eletrodo formando radicais hidroxila.

Na radiólise e feixe de elétrons, são formadas espécies altamente reativas quando se irradia água com um feixe de elétrons de alta energia produzidos por um acelerador de elétrons. O processo provoca a formação de $\text{OH}\cdot$ e radicais de hidrogênio (TEIXEIRA; JARDIM, 2004; MARTINS, 2011).

O ultrassom promove a formação, o crescimento e o rompimento de bolhas de gás em uma matriz líquida. A compressão adiabática (chamada de implosão) dessas bolhas é causada por altas temperaturas (de 4.000 °C a 10.000 °C) e alta pressão (de 1.000 atm a 10.000 atm), promovendo a cavitação. Nessas condições, a sonicação da água leva à dissociação térmica do vapor de água em átomos de

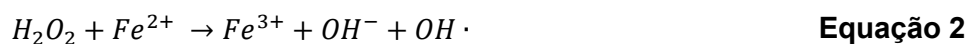
hidrogênio e radicais (CARVALHO *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2012).

Na geração de radicais hidroxila pelo uso de oxidantes fortes, os mais comuns são o peróxido de hidrogênio, Fenton e ozônio, com ou sem a presença de irradiação ultravioleta.

O peróxido de hidrogênio, quando combinado com a técnica de irradiação ultravioleta, produz radicais hidroxila através da quebra da molécula, que gera um rendimento de dois OH• para cada molécula de H₂O₂ (TEIXEIRA; JARDIM, 2004; CARBAJO *et al.*, 2011).



O processo Fenton é um método simples que ocorre pela reação de íons ferrosos com H₂O₂ em meio ácido, independente da presença de luz, promovendo a formação de radicais hidroxila (Equação 2).



Os radicais hidroxila podem ser consumidos reagindo com Fe²⁺ ou peróxido de hidrogênio. Enquanto o Fe³⁺ formado pode reagir com o H₂O₂ promovendo a regeneração do Fe²⁺, criando um ciclo fotocatalítico (GUIMARÃES, 2012).

Diversas variações do método Fenton clássico têm sido pesquisadas, apresentando inclusive melhores resultados, como é o caso da técnica foto-Fenton, que combina o reagente de Fenton com a radiação ultravioleta, melhorando significativamente sua eficiência e a velocidade de degradação (MARTINS, 2011; GUIMARÃES, 2012).

2.1.2. Sistemas heterogêneos

No sistema heterogêneo ocorre a presença de semicondutores, também chamados de catalisadores (TEIXEIRA; JARDIM, 2004; VIANNA; TÔRRES, 2008).

Em técnicas que fazem uso de catalisadores, os semicondutores são expostos à radiação ultravioleta. Quando um fóton é absorvido com energia suficiente para promover um elétron de uma banda de menor energia para uma de maior energia, ocorre a formação de uma lacuna em uma de suas bandas, que irão apresentar potenciais positivos, suficientes para gerar radicais hidroxila provenientes de moléculas de água adsorvidas na superfície do semicondutor (GUIMARÃES, 2012). O dióxido de titânio tem sido o fotocatalisador mais empregado na degradação de compostos orgânicos (ÁDAN *et al.*, 2007), no entanto, outros catalisadores também são relatados na literatura, ZnO, Fe₂O₃, caolinita, SiO₂ e Al₂O₃ (GAO *et al.*, 2009; ZHANG, J. *et al.*, 2009; CARBAJO *et al.*, 2011; YILDIRIM *et al.*, 2011).

2.2. Aplicação dos Processos Oxidativos Avançados na degradação de compostos orgânicos

Estudos mais recentes têm explorado técnicas envolvendo processos oxidativos avançados na degradação de compostos orgânicos, obtendo-se bons resultados, além de baixo custo.

O reagente de Fenton tem apresentado resultados satisfatórios na degradação de corantes como contaminantes de efluentes e águas residuárias (HAMMAMI *et al.*, 2007; CHEN; LIN, 2009; HAMEED; LEE, 2009; ZHANG, H. *et al.*, 2009; FU *et al.*, 2010; JI *et al.*, 2011).

O uso do ozônio está bastante estabelecido na literatura como um potente agente oxidante de compostos orgânicos, especialmente de corantes. Por exemplo, os trabalhos envolvendo a degradação de azocorantes e corantes catiônicos via ozonização (ZHANG, J. *et al.*, 2009; KUSVURAN *et al.*, 2011; YILDIRIM *et al.*, 2011), e também via ozonização combinada com outros métodos, como o uso assistido de ultrassom (DESTAILLATS *et al.*, 2000; LALL *et al.*, 2003; MARTINS *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2006; SONG *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2012), ou de catalisadores para melhorar a eficiência do processo (GAO *et al.*, 2009; YILDIRIM *et al.*, 2011).

2.2.1. Alternativas para remoção/degradação do brometo de etídio em efluentes

Normas ou diretrizes não foram definidas quanto à exposição humana aos níveis ambientais seguros para esse composto, no entanto, seu potencial risco à saúde incentiva pesquisas que busquem seu tratamento e descarte adequados, evitando a contaminação por um composto de alto risco. Na tentativa de descontaminar soluções aquosas de brometo de etídio, muitas técnicas já foram aplicadas para a degradação e/ou remoção do composto.

Dentre esses procedimentos, podem ser citados os métodos baseados na sua adsorção, buscando a retenção do EtBr sobre a superfície de um adsorvente. A adsorção em carvão ativado foi relacionada como alternativa em literatura das décadas de 80 e 90 (QUILLARDET; HOFNUNG, 1988; HENGEN, 1994). Oliveira *et al.* (2009) estudaram o uso de resinas poliméricas como a XAD-7 para pré-concentração do brometo de etídio, para posterior degradação. O problema envolvido na utilização de técnicas adsorptivas é a transferência de fase do contaminante, que sai do meio aquoso e fica retido em uma matriz sólida, que normalmente tem que ser incinerada. A incineração é um dos métodos mais antigos de tratamento de resíduos, porém esbarra em desvantagens como o uso de altas temperaturas (acima de 850 °C), requerimento de energias muito elevadas para tratamento de resíduos líquidos, além de possibilitarem a formação de compostos mais tóxicos que os iniciais (MUNTER, 2001).

Outros protocolos utilizam a degradação com agentes oxidantes, como permanganato de potássio e hipoclorito de sódio, todavia, estudos de toxicidade indicaram que os produtos de degradação envolvendo tais oxidantes podem ser ainda mais tóxicos do que o próprio EtBr, não se mostrando como uma maneira completamente segura para degradação (SANSONE; LUNN, 1987).

Zhang *et al.* (2012) realizaram pesquisas para a degradação do brometo de etídio via oxidação anódica em eletrodo de diamante dopado com boro, considerando a técnica promissora, especialmente se combinada com outras metodologias, como a fotocatalise.

O uso de dióxido de titânio têm sido bastante explorado também para a degradação catalítica do EtBr. Estudos como os mostrados por Faisal *et al.* (2007) e Ádan *et al.* (2007) avaliaram a composição do TiO₂ (rutilo ou anatase) que apresenta melhores resultados de eficiência de degradação.

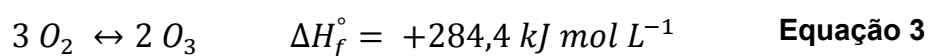
Carbajo *et al.* (2011) utilizaram catalisadores de TiO₂ dopados com partículas nanométricas de ferro para degradação fotocatalítica do brometo de etídio com auxílio de oxigênio. A técnica mostrou elevada eficiência de remoção de carga orgânica, apesar de necessitar de um longo período de exposição. Swetha *et al.* (2011), por sua vez, fizeram uso de catalisadores de TiO₂ dopados com nanopartículas de zircônio em um estudo de degradação com luz solar. Seus resultados apresentaram uma descoloração total do brometo de etídio sobre luz solar e a perda de suas propriedades mutagênicas.

A maior parte dos estudos que avaliam a degradação do brometo de etídio são, na verdade, estudos de descoloração do composto, pois acompanham somente o decaimento da absorvância associada à coloração. Poucos estudos realizaram testes de toxicidade para observar o comportamento dos produtos de degradação formados.

3. Ozônio

O ozônio (O₃) é um gás incolor a baixas concentrações, de odor característico e irritante. É um agente oxidante poderoso (E₀ = 2,08 V, Tabela 1).

O ozônio foi identificado pela primeira vez em 1886 pelo químico alemão C. F. Schonbein, quando percebeu um odor característico produzido durante a geração de uma fásca elétrica. Seu nome é derivado do grego, *ozein*, cheiro. O ozônio é uma molécula triatômica alótropa do oxigênio e sua formação é endotérmica (Equação 3).



As propriedades físico-químicas do ozônio são listadas na Tabela 2.

Tabela 2: Propriedades físico-químicas do ozônio

Propriedades	
Fórmula química	O ₃
Massa molar	48 g mol ⁻¹
Ponto de fusão (1 atm)	-192,5 °C
Ponto de ebulição (1atm)	-111,9 °C
Massa específica do gás (CNTP)	2,14 g L ⁻¹
Solubilidade em água	1,05 g L ⁻¹ (0 °C)
Solubilidade	Muito solúvel em CCl ₄ , H ₂ SO ₄

O ozônio é um agente eficiente contra microorganismos e bactérias, sendo atualmente aplicado no tratamento de águas como substituto do cloro, por não formar organoclorados após o tratamento (GUNTEN, VON, 2003; SANCHES *et al.*, 2003).

Devido as suas propriedades fortemente oxidantes, o ozônio é irritante, afetando principalmente os olhos e o sistema respiratório, podendo ser perigoso mesmo em baixas concentrações. Sua concentração máxima segura é da ordem de 0,1 mg L⁻¹ no ambiente da ozonização (CHERNICHARO *et al.*, 2001). A gravidade da lesão depende tanto da concentração do ozônio quanto do tempo de exposição.

A Figura 4 representa a tolerância do ser humano à exposição ao ozônio. Sintomas como secura na boca e garganta, dores no peito, perda de habilidade mental, dificuldade de coordenação e articulação, tosse e perda de cerca de 13% da capacidade vital começam a aparecer em exposições de duas h ao ozônio com uma concentração de 2 mg L⁻¹ (BERNARDO, 1993).

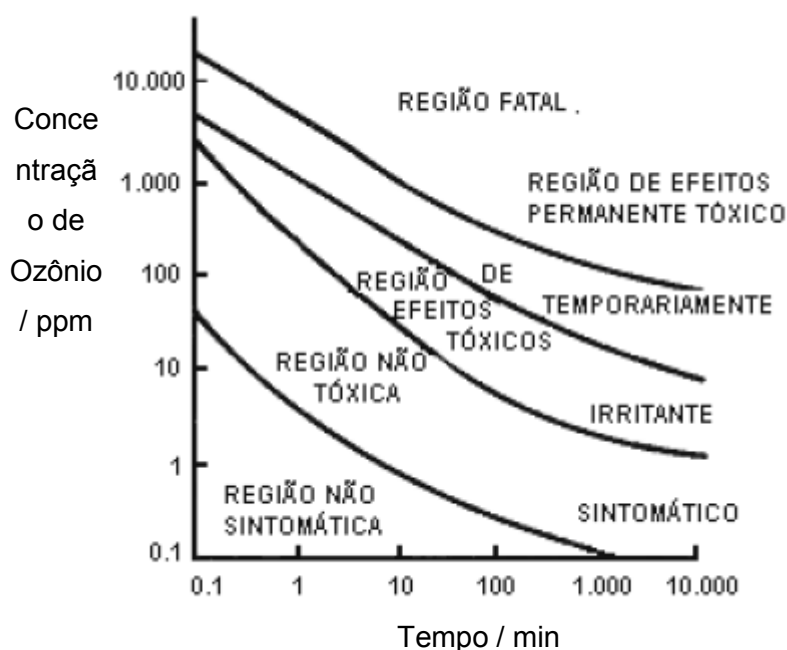


Figura 4: Tolerância do ser humano à exposição ao ozônio. Fonte: Bernardo, 1993.

3.1. Estabilidade do ozônio em água

A transferência do ozônio gasoso para a água acontece pela dispersão do gás na fase líquida e, em seguida, incorporado à massa líquida através da interface gás-líquido (BERNARDO, 1993; KUSVURAN *et al.*, 2011). A concentração do ozônio em água é dependente da solubilidade do gás. A solubilidade do ozônio é descrita pela Lei de Henry, indicando que a concentração da saturação é proporcional à pressão parcial do ozônio a uma determinada temperatura (Equação 4).

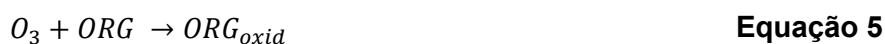
$$[O_3] = \frac{p(O_3)}{K_H} \quad \text{Equação 4}$$

Em que $[O_3]$ é a concentração de ozônio; K_H é a constante de Henry (2,027 mol atm⁻¹, a 25 °C); e $p(O_3)$ é a sua pressão parcial.

O ozônio decompõe-se naturalmente de maneira rápida em água, sendo o radical hidroxila e o oxigênio os principais produtos da sua decomposição. Durante sua decomposição, inicialmente ocorre uma diminuição rápida da concentração do

ozônio e, em seguida, a diminuição da concentração passa a seguir uma cinética de primeira ordem (GUNTEN, VON, 2003).

Sua estabilidade em soluções aquosas é mais complexa do que em água pura e depende de fatores como o pH, tipo do composto a ser degradado e outros compostos concomitantes (MASTEN; DAVIES, 1994). Em relação ao pH, os íons hidróxido iniciam a decomposição do ozônio até a formação dos radicais hidroxila. Já o tipo do composto pode influenciar a estabilidade de duas maneiras: o composto pode (i) reagir diretamente com o ozônio (Equação 5) ou (ii) afetar indiretamente a sua estabilidade através da eliminação de radicais (Equação 6) (STAEHELIN; HOLGNE, 1982; SEHESTED *et al.*, 1984)



3.2. Geração do Ozônio

Devido à sua meia-vida relativamente curta, o ozônio precisa ser gerado no local onde vai ser usado. Qualquer método de geração de ozônio depende da energia aplicada na quebra das ligações de oxigênio molecular, permitindo a sua ruptura homolítica e em seguida, a formação do ozônio. A energia aplicada atua de forma aleatória, gerando uma produção pouco eficiente do gás e com grande liberação de calor residual.

Atualmente, os principais métodos usados na produção de ozônio envolvem o processo corona e a radiação ultravioleta. O processo corona é o mais comum pelas suas vantagens.

3.2.1. Processo corona

A descarga corona é uma condição criada quando o O₂ gasoso passa por uma descarga elétrica de alta tensão. Nesse caso, a descarga elétrica transfere energia para a quebra da molécula de O₂, permitindo a formação da molécula triatômica – o ozônio. Um dielétrico é usado para manter e controlar a descarga

elétrica, enquanto o calor excessivo dos eletrodos é frequentemente resfriado por água ou pelo ar (BARLOW, 1994).

A Figura 5 mostra um esquema do princípio do funcionamento de um gerador de ozônio do tipo corona.

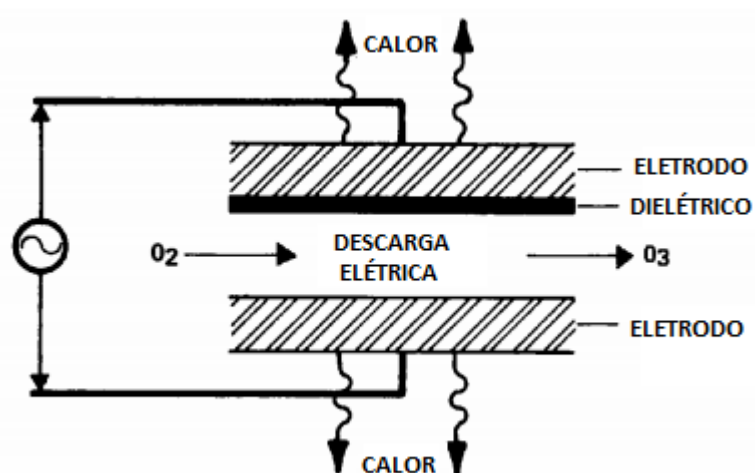


Figura 5: Esquema do princípio de funcionamento de um gerador de ozônio tipo corona. Fonte: Barlow, 1994.

A quantidade de ozônio gerada está diretamente relacionada com alguns fatores como: a qualidade do gás de alimentação (O_2 ou ar), a quantidade de energia aplicada pelos eletrodos e o resfriamento do sistema.

Os geradores de ozônio tipo corona são normalmente de baixo custo e não requerem uma fonte de oxigênio que não seja o ar ambiente. As flutuações no ar ambiente, devido a umidade podem causar variações na produção de ozônio. No entanto, um secador de ar pode eliminar o excesso de vapor d'água e aumentar a produção do gás.

3.2.2. Radiação ultravioleta

Como a formação de ozônio a partir do oxigênio é uma reação endotérmica e, portanto, requer energia, quando exposta à radiação ultravioleta, a molécula de O_2 absorve a energia da radiação e se dissocia, reagindo em seguida com outras moléculas de oxigênio e formando o ozônio. O rendimento dessa reação é maior em

comprimentos de onda inferiores a 200 nm. No entanto, o ozônio também absorve radiação podendo sofrer fotólise, que ocorre na faixa de comprimento de onda de 200 a 308 nm. Devido o seu baixo rendimento e elevado consumo energético, esse método não é aplicado industrialmente.

3.3. Ozonização como técnica de degradação de compostos orgânicos

O ozônio apresenta grandes vantagens quando usado em técnicas de degradação de compostos contaminantes uma vez que (i) é um processo rápido; (ii) seus produtos de degradação são radicais hidroxila ou gás oxigênio; (iii) é gerado no local da utilização, evitando transporte e estoque (MUNTER, 2001; ASSALIN; DURÁN, 2007). Atualmente, o baixo custo envolvido para a produção do ozônio tem sido também uma vantagem para a aplicação e popularização do método.

Embora a produção de ozônio apresente custos reduzidos, se tornando um atrativo para a aplicação da técnica em sistemas de descontaminação ambiental, sua baixa solubilidade e estabilidade ainda são pontos negativos para sua aplicação como agente oxidante na degradação de compostos, além de baixas taxas de redução de carga orgânica, devido a pouca seletividade do íon hidroxila, ainda se apresentarem como problemas a serem resolvidos na técnica (MASTEN; DAVIES, 1994; ASSALIN; DURÁN, 2007).

Mesmo com suas limitações, a ozonização tem sido um dos métodos mais amplamente estudados e empregados para a descoloração de efluentes e degradação de compostos orgânicos e inorgânicos. Vários trabalhos que envolvem a degradação de matéria orgânica fazem uso da técnica de ozonização, observando as condições de ataque direto do ozônio ou via radicalar, dependendo do analito a ser degradado.

Gilbert (2002) analisou em seu trabalho a influência do ozônio na degradação de compostos orgânicos como glioxal e ácido toluenossulfônico, obtendo bons resultados com a diminuição da demanda química de oxigênio (DQO) após o processo. Gao *et al.* (2009) também obtiveram resultados satisfatórios de baixa DQO em seu estudo sobre a degradação do corante azul de metileno via ozonização assistida. Zhang *et al.* (2006) estudaram a descoloração do azo corante laranja de

metila, apresentando bons resultados para a descoloração, mas baixa remoção de matéria orgânica.

Kusvuran *et al.* (2011) observaram a descoloração do corante verde malaquita e a inibição de sua atividade antibacteriana após processo de ozonização. Yildirim *et al.* (2011) obtiveram bons resultados de mineralização com o azo corante RR194, a partir do acompanhamento de carbono orgânico total (COT).

3.3.1. Ozônio / Radical hidroxila

A eficiência de remoção da carga orgânica é dependente de vários parâmetros importantes como: tempo do tratamento, concentração do ozônio, tipo do substrato e pH (ROSENFELDT *et al.*, 2006; ASSALIN; DURÁN, 2007). Como o pH influencia na concentração do íon hidroxila, esse parâmetro acaba influenciando diretamente na decomposição do ozônio (MASTEN; DAVIES, 1994; LEGUBE; LEITNER, 1999; KUSVURAN *et al.*, 2011).

Em solução aquosa em meio ácido ($\text{pH} < 3$), a decomposição do ozônio é pouco afetada devido a baixa concentração de íons hidroxila no meio; assim, a oxidação é favorecida por uma reação direta do ozônio molecular (ASSALIN; DURÁN, 2007). Nessa condição, o mecanismo atualmente aceito é o proposto por Rudolf Criegee em 1953, em que o ozônio reage seletivamente nas duplas ligações (centro nucleofílico) do composto, ligando os oxigênios que constituem o O_3 aos carbonos da dupla ligação, através de uma cicloadição 1,3, formando um intermediário instável, chamado molozonídeo. O processo leva à formação de rearranjos espontâneos de compostos conhecidos como ozoneto (SOLOMONS; FRYHLE, 2013). A água, por sua vez, reduz o ozoneto formando outros compostos carbonílicos (SANTOS; MAGALHÃES, 1992; TEIXEIRA; JARDIM, 2004; ASSALIN; DURÁN, 2007; SOLOMONS; FRYHLE, 2013). A Figura 6 apresenta o mecanismo da reação direta do ozônio com a matéria orgânica.

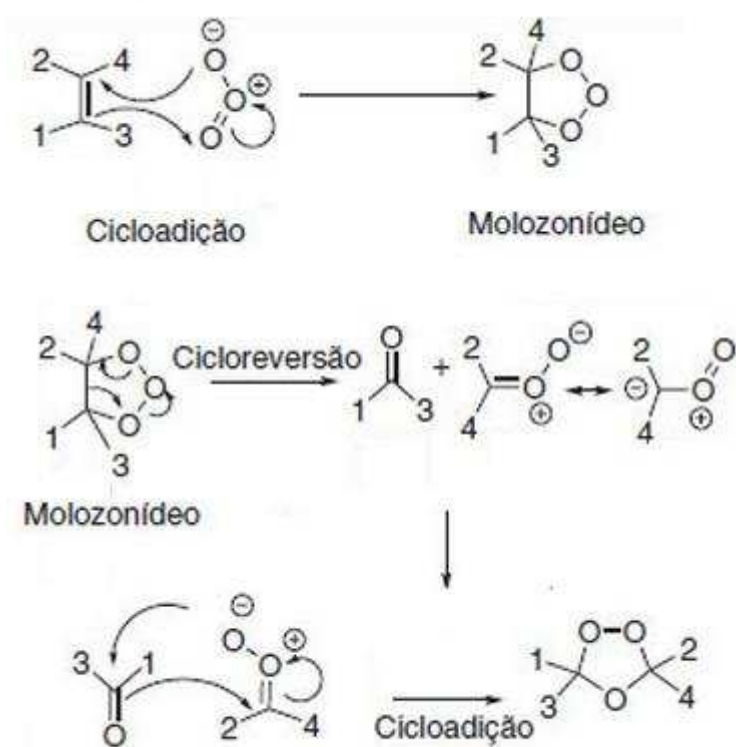


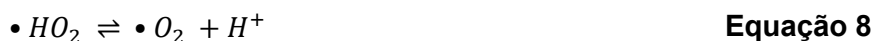
Figura 6: Mecanismo de reação via ataque direto do ozônio molecular à matéria orgânica em meio ácido (Mecanismo de Criegee). Fonte: Solomons, 2013.

O ataque eletrofílico pode ocorrer em átomos que carregam cargas negativas (como N, P, O ou carbonos nucleofílicos). Em compostos aromáticos substituídos com grupos doadores de elétrons ($-OH$, ou $-NH_2$), os carbonos nas posições *-orto* e *-para* em relação ao grupo doador de elétrons têm alta densidade eletrônica, o que favorece o ataque do ozônio a essas posições (LANGLAIS *et al.*, 1991; MASTEN; DAVIES, 1994).

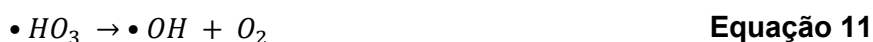
Em meio básico ($pH > 10$), a reação indireta ou radicalar é favorecida devido o aumento da concentração de íons hidroxila, que proporciona a decomposição do ozônio. A reação entre o ozônio e o OH^- desencadeia uma série de reações radicalares e levam à formação do radical hidroxila (OH^\bullet). Nesse caso, as reações de oxidação são muito energéticas e não seletivas (MAHMOUND; FREIRE, 2007; KUSVURAN *et al.*, 2011; YILDIRIM *et al.*, 2011; GUIMARÃES, 2012).

O mecanismo de decomposição do ozônio via reação radicalar pode ser dividido em duas etapas importantes: iniciação e propagação (GUNTEN, VON, 2003;

MAHMOUND; FREIRE, 2007). Na iniciação, o íon hidroxila inicia a decomposição do ozônio formando o radical hidroperoxila ($\bullet HO_2$) e o ânion radical superóxido ($\bullet O_2$) (Equações 7 e 8).

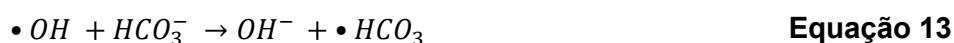


Em seguida, na propagação, o radical superóxido ($\bullet O_2$), em uma série de reações contínuas, reage com mais ozônio formando o ânion radical ozonídeo ($\bullet O_3^-$) (Equação 9). Por fim, o íon ($\bullet O_3^-$) se decompõe formando radicais hidroxila (Equação 11).



O mecanismo de degradação via indireta (ou radicalar) apresenta uma rápida cinética de reação. Além disso, a sua baixa seletividade permite a degradação de uma vasta gama de compostos (MAHMOUND; FREIRE, 2007).

No entanto, apesar de ser mais enérgica, nem sempre os resultados de remoção de carga orgânica são satisfatórios, devido à complexidade da matriz. Somado a isso, a presença de compostos sequestradores do radical hidroxila podem causar uma diminuição na eficiência do processo, resultando em desaproveitamento de energia do sistema. Exemplos desses compostos sequestradores são: substâncias húmicas, HCO_3^- , CO_2^- , Cl^- , S^{2-} (TEIXEIRA; JARDIM, 2004; ASSALIN; DURÁN, 2007), que reagem com o radical hidroxila e formam radicais secundários que não produzem $\bullet O_2^-$ / $\bullet HO_2$ (Equações 12 e 13), inibindo as reações em cadeia descritas anteriormente:



Em pH neutro (em torno de 7,0), ambos os mecanismos podem proporcionar a degradação dos compostos; nesse caso, outros fatores como o tipo do composto alvo e a presença de metais de transição contribuirão para definir a atuação de cada mecanismo (MAHMOUD; FREIRE, 2007).

3.3.2. Ozônio/UV

Na ozonização assistida por radiação ultravioleta, a geração de radicais hidroxila ocorre a partir da quebra do ozônio em oxigênio molecular e atômico, esse último reagindo com água e formando peróxido de hidrogênio. A partir daí, o íon hidroperóxido (HO_2^-) pode reagir com o ozônio para formar O_3^- e radicais hidroxila (TEIXEIRA; JARDIM, 2004; GUIMARÃES, 2012).

A Equação 14 indica uma forma simplificada de representar a reação envolvida:



3.3.3. Ozonização catalítica

A reação do ozônio com matéria orgânica normalmente leva a formação de aldeídos e ácidos carboxílicos que não reagem com o ozônio. Desse modo, a ozonização por si só não é capaz de atingir a completa remoção de carga orgânica do meio (NAWROCKI; KASPRZYK-HORDERN, 2010). Devido a essa limitação do processo convencional, a ozonização catalítica aparece como uma das técnicas mais promissoras aplicadas ao processo de descontaminação ambiental, uma vez que controla a geração de radicais e melhora a eficiência do consumo do ozônio (MASTEN; DAVIES, 1994; ROSENFELDT *et al.*, 2006). Essa técnica pode ser realizada de dois modos: homogênea e heterogênea.

Basicamente, a ozonização catalítica homogênea utiliza íons metálicos dissolvidos como catalisadores, enquanto que a heterogênea faz uso de uma variedade de sólidos, como óxidos metálicos, zeólitas, etc.

Na ozonização catalítica homogênea, uma série de metais de transição, como Fe (II), Mn (II), Zn (II) (ASSALIN; DURÁN, 2007) têm sido utilizados no tratamento de águas e efluentes por ozônio, melhorando a degradação da carga orgânica do meio.

Os mecanismos de reação podem ser relacionados à decomposição do ozônio pelos íons metálicos levando a geração de radicais livres ou então pela formação de complexo entre a molécula orgânica e o catalisador, seguido da oxidação do complexo (NAWROCKI; KASPRZYK-HORDERN, 2010). A via de degradação depende da natureza do íon metálico, influenciando especialmente a seletividade do processo.

O método homogêneo apresenta uma melhora na remoção de carga orgânica do sistema, quando comparado à ozonização convencional, devido provavelmente à maior formação de radicais hidroxila no meio e a minimização da interferência dos sequestrantes de hidroxila, devido à formação de complexo entre o íon metálico e o contaminante (ASSALIN; DURÁN, 2007; NAWROCKI, 2013).

Na ozonização catalítica heterogênea, a oxidação de compostos orgânicos faz uso de catalisadores sólidos no processo, combinando as propriedades oxidativas do ozônio com as propriedades adsorptivas e oxidativas dos catalisadores em fase sólida, o que leva a melhora dos resultados referentes à mineralização dos contaminantes orgânicos (ASSALIN; DURÁN, 2007). Dentre os principais catalisadores heterogêneos encontram-se: alguns óxidos metálicos (MnO_2 , TiO_2 , Al_2O_3 , ZnO , dentre outros); íons metálicos (Cu, Ru, Pt, Co) em suportes (SiO_2 , Al_2O_3 , TiO_2); zeólitas e carvão ativado (ASSALIN; DURÁN, 2007; NAWROCKI; KASPRZYK-HORDERN, 2010).

De maneira geral, o mecanismo de degradação envolve a adsorção ou do ozônio, ou da molécula orgânica, ou ainda de ambos, na superfície do catalisador (Figura 7). Quando essa adsorção não ocorre com nenhum desses componentes, não é observado um efeito catalítico (NAWROCKI, 2013). Assim, a reação pode prosseguir na água ou na superfície do catalisador.

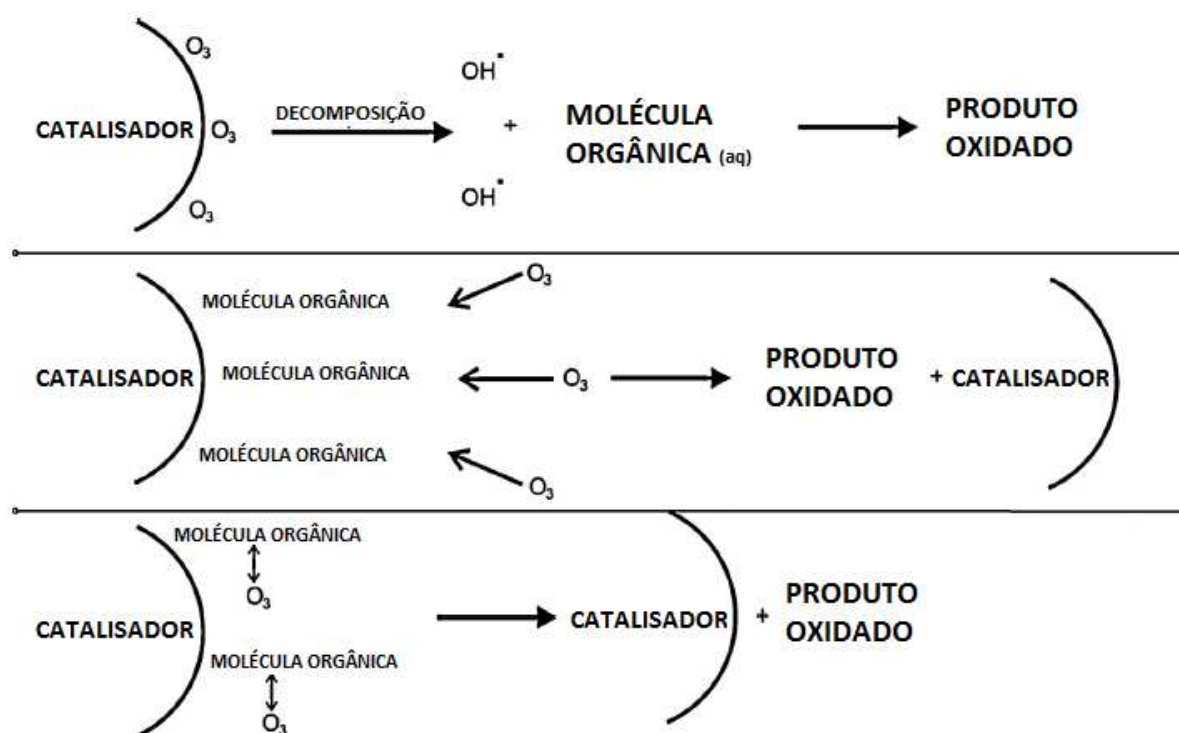


Figura 7: Possíveis mecanismos de degradação via ozonização catalítica heterogênea. Fonte: Nawrocki, 2013.

A ozonização é considerada catalítica quando a eficiência de ozonização é maior na presença do catalisador do que na ausência, considerando o mesmo pH.

As propriedades da superfície do catalisador, o pH da solução, bem como as reações de decomposição do ozônio em solução aquosa são os principais fatores capazes de influenciar a eficiência do processo catalítico (ASSALIN & DURAN, 2006). As características químicas da superfície dos óxidos são bastante similares: podendo estar cobertas por hidroxilas favorecendo o processo de troca iônica e se tornando o principal centro de adsorção; podem ter também sítios hidrofóbicos que permitam uma afinidade com moléculas orgânicas menos polares; além de ser possível também a presença de centros de Lewis (NAWROCKI, 2013).

Dessa forma, as propriedades da superfície dos óxidos são influenciadas pelo pH, como por exemplo a sua carga, o que tem efeito direto sobre a capacidade de adsorção de moléculas orgânicas sobre os óxidos metálicos (NAWROCKI; KASPRZYK-HORDERN, 2010). A polaridade do composto orgânico também apresenta influência sobre a sua adsorção, de modo que compostos polares podem

ficar adsorvidos na superfície, enquanto compostos não polares precisam de sítios hidrofóbicos para garantir a adsorção.

Estudos de revisão como os de Legube & Karpel Vel Leitner (1999) e Assalin & Dúran (2007) mostram a utilização de óxidos metálicos na mineralização de vários compostos orgânicos, como ozonização de fenol na presença de Fe(III)/Al₂O₃; benzeno, 1-4-dioxina, antrazina e ácido oxálico na presença de MnO₂; ácido fúlvico, ácido oxálico, nitrobenzeno catalisados por TiO₂; ácido oxálico e clorofenol na presença de Al₂O₃.

Embora o uso de ozônio para degradação de compostos orgânicos venha se tornando cada vez mais comum, ainda pouco se sabe sobre os intermediários de reação e produtos formados durante a ozonização de efluentes (WANG *et al.*, 2003). É importante estudar os produtos de degradação gerados no processo e avaliar sua toxicidade para garantir que esses não sejam tóxicos..

4. Planejamento e otimização de experimentos

O planejamento e a otimização dos experimentos a serem realizados especialmente em pesquisa são uma das etapas mais críticas do trabalho científico, uma vez que a sua correta aplicação implica em uma análise mais clara, completa e abrangente dos resultados, além de um menor custo e tempo na realização da pesquisa.

Questões como: quantas variáveis são relevantes, ou quais valores devem ser ensaiados, ou qual melhor resposta a ser analisada devem ser levadas em consideração para se obter resultados eficientes (NETO *et al.*, 1995).

Segundo Araújo (2012), o delineamento (ou planejamento) experimental pode ser definido como:

o processo racional de planejamento de experimentos com suficiente poder estatístico, tamanho da amostra e tipo adequados de dados a fim de fornecer o máximo de informações a partir de dados químicos e responder de forma eficaz aos desafios propostos pela pesquisa.

Em geral, dois grupos de métodos de planejamento e otimização vêm sendo utilizados para extrair o máximo de informações úteis do sistema, são eles: o método univariado e os métodos multivariados.

4.1. Planejamento univariado

O planejamento univariado é um método clássico de pesquisa em que se fixam os fatores estudados em um certo nível, exceto um deles. Este último fator é então variado até se obter a melhor resposta para o sistema em estudo. Em uma variação, os níveis dos fatores são alterados e novamente o último fator é avaliado. Em seguida, esse fator passa a ser fixo, enquanto outro fator passa a variar. Todos os fatores são testados a fim de obter a melhor resposta.

Entretanto, esse método não garante a localização da região ótima real do sistema analítico em estudo, pois além da interdependência dos fatores não ser facilmente avaliada nessa metodologia, a dependência dos valores iniciais das variáveis também interfere na determinação. Além disso, exige um grande número de experimentos, uma vez que deve-se realizar tantos ciclos quantos forem necessários até se observar que não ocorre melhora no resultado da otimização (EIRAS *et al.*, 2000; PERALTA-ZAMORA *et al.*, 2005).

Desse modo, o método de planejamento univariado se apresenta seguro apenas em sistemas em que as variáveis otimizadas são independentes (EIRAS *et al.*, 2000) ou quando o objetivo é compreender a relação entre diversas variáveis.

4.2. Planejamento multivariado

Nos últimos anos, os sistemas multivariados de otimização têm ganhado muita força e apresentado bastante versatilidade em sua aplicação nos campos de conhecimento. Sua característica principal é permitir a avaliação dos efeitos sinérgicos e antagônicos proporcionados pela forte dependência estatística entre as variáveis de interesse. Dentre as várias alternativas existentes, destaca-se o planejamento fatorial e o método de superfície de resposta.

4.2.1. Método do planejamento fatorial

Esse método permite a avaliação simultânea do efeito de um grande número de variáveis, com um número reduzido de ensaios experimentais. Para realizar um planejamento fatorial, escolhem-se as diferentes variáveis (fatores) a serem estudadas e em seguida, efetuam-se experimentos em diferentes valores dos fatores. Por último, são realizados experimentos para todas as combinações possíveis dos níveis (EIRAS *et al.*, 2000; PERALTA-ZAMORA *et al.*, 2005).

Segundo Neto *et al.* (1995), planejamentos desse tipo são bastante úteis em investigações preliminares, quando se deseja saber se determinados fatores exercem influência sobre o sistema ou não, sem detalhar sobre a descrição dessa influência, sendo então vantajoso na triagem inicial dos fatores.

Para executar um planejamento fatorial é necessário especificar os níveis em que cada condição será estudada, ou seja, os valores dos fatores. O número de ensaios a serem realizados é uma relação entre o número de níveis e de fatores em estudo. Ao variar um fator e observar a variação de seus resultados é possível estudar o efeito do fator sobre a resposta (MARINHO; CASTRO, 2005).

Uma grande desvantagem desse método é o uso de apenas dois níveis da variável. Embora mais níveis possam ser usados, o número de experimentos (N) aumenta de maneira acentuada com o número de níveis (A) e o número de fatores (K) (Equação 15).

$$N = A^K$$

Equação 15

4.2.2. Metodologia de Superfície de Resposta

A metodologia de superfície de resposta é um método matemático e estatístico que modela e analisa problemas em que uma resposta experimental sofre a influência de várias variáveis e tem como objetivo a otimização da resposta,

determinando a sensibilidade da variável resposta às mudanças dos níveis dos fatores de interesse (MONTGOMERY, 2005).

A resposta observada y é uma função f dos níveis das variáveis independentes x e normalmente é desconhecida, no entanto, pode-se aproximar esta função por uma relação polinomial. Normalmente, um modelo polinomial de baixa ordem é inicialmente usado para descrever a função f que descreve a superfície de resposta. Se a superfície de resposta puder ser definida como uma função linear das variáveis independentes, então a função aproximada é um modelo de primeira-ordem (FERREIRA *et al.*, 2004). Um modelo de primeira ordem com duas variáveis independentes pode ser expresso por:

$$y = \varepsilon + a(A) + b(B) \quad \text{Equação 16}$$

Se a superfície de resposta apresentar curvatura, então um modelo polinomial de maior grau deve ser utilizado. A função (\hat{y}) é chamada de modelo de segunda ordem quando existe, pelo menos, um termo quadrático.

$$\hat{y} = a(A) + b(B) + c(A)^2 + d(B)^2 + e(A)(B) + f \quad \text{Equação 17}$$

Onde a , b , c , d , e , f são os coeficientes da regressão. Após a coleta dos dados, um modelo de regressão múltipla é usado para estimar os coeficientes dos polinômios. Geralmente, as superfícies de resposta podem ser visualizadas graficamente, através de gráficos tridimensionais ou superfícies de contorno (quando há apenas duas variáveis independentes), permitindo a visualização de pontos importantes, como ponto de máximo, mínimo ou ponto de sela (Figura 8). Para mais variáveis, não é possível observar o comportamento de todas em um mesmo gráfico, pois a hipersuperfície obtida não é visível no espaço R^3 .

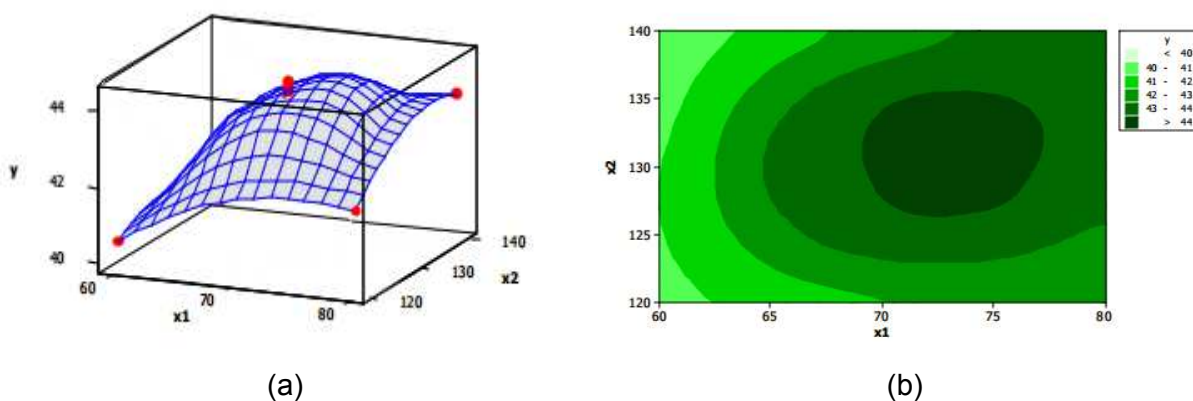


Figura 8: Esquema de gráficos de superfície de resposta. (a) gráfico tridimensional; (b) superfície de contorno. Fonte: Montgomery, 2005.

4.2.3. Matriz de Doehlert

Os planejamentos de superfície baseados nas matrizes de Doehlert (chamados de matrizes de Doehlert ou designs de Doehlert) são uma alternativa recente bastante útil na otimização de variáveis em planejamentos de modelos de segunda ordem. Apresenta como vantagens um menor número de experimentos a serem realizados e são mais eficientes (FERREIRA *et al.*, 2004). São conhecidos também como “designs de escudo uniforme”, devido à distribuição dos pontos experimentais de forma regular sobre uma superfície de casca esférica, conferindo a esse modelo características interessantes (FERREIRA *et al.*, 2004; ARAUJO; JANAGAP, 2012).

Matrizes de Doehlert para k variáveis ($k > 3$) são gerados a partir da distribuição dos pontos experimentais sobre a superfície de uma esfera. Para duas ou três variáveis, por exemplo, os pontos experimentais são circunscritos a um círculo e a uma esfera, respectivamente, com de raio igual à unidade (Figura 9). Para duas variáveis, o projeto consiste de um ponto central e seis pontos formando um hexágono regular sobre um círculo. Enquanto que para três variáveis, a distribuição dos pontos está localizada nos vértices de um cuboctaedro, com um ponto central (FERREIRA *et al.*, 2004; ARAUJO & JANAGAP, 2012).

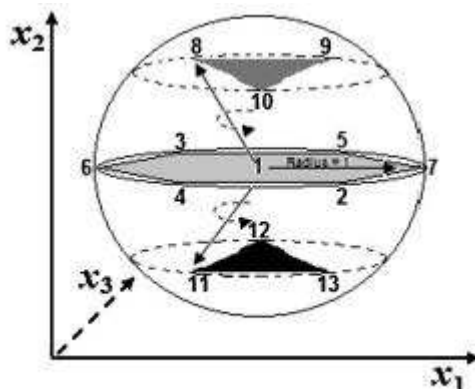


Figura 9: Distribuição espacial dos pontos experimentais em um design Doehlert para 2 (pontos 1 a 7) e 3 (pontos 1 a 13) variáveis. Fonte: Araújo & Janagap, 2012.

O número de experimentos necessários pode ser determinado pela expressão:

$$N = k^2 + k + C_0 \quad \text{Equação 18}$$

Em que k é o número de variáveis estudadas e C_0 é o número de pontos centrais. Dessa forma, estudos com duas e três variáveis necessitam de 7 e 13 experimentos, respectivamente. São realizados ensaios em duplicata a fim de validar o modelo por meio de uma estimativa de variância experimental (FERREIRA *et al.*, 2004).

Cada projeto é definido considerando-se o número de variáveis em estudo e seus valores codificados (C_i) da matriz experimental. A relação entre os valores codificados e reais é dada pela Equação 21.

$$C_i = S(X_i - X^0) + C^0 \quad \text{Equação 19}$$

$$S = \left(\frac{C_{Max} - C_{Min}}{X_{Max} - X_{Min}} \right) \quad \text{Equação 20}$$

$$X_i = \frac{(C_i - C^0)}{S} + X^0$$

Equação 21

Em que C_i é o valor do código para o nível do fator i em um experimento, X_i é o valor real, X^0 é o valor real em relação ao ponto central, C^0 é valor do código em relação ao ponto central

A matriz de Doehlert apresenta uma característica diferente dos demais planejamentos multivariados, nele o número de níveis não é o mesmo para todas as variáveis (FERREIRA *et al.*, 2004), por exemplo, para um estudo envolvendo três variáveis, um fator é estudado em três níveis, outro em cinco e o outro em sete níveis. Essa propriedade permite a livre escolha das variáveis a serem atribuídas aos diferentes níveis. Critérios diferentes podem ser utilizados para designar os fatores, no entanto, quando o sistema não apresenta influencia significativa nos fatores, comumente a atribuição aos níveis pode ser feita de acordo com a magnitude do efeito da variável. Assim, o maior efeito de uma variável relativa à resposta experimental é atribuído ao maior nível (FERREIRA *et al.*, 2004; ARAUJO; JANAGAP, 2012).

Outra característica dos designs Doehlert é o seu eficiente mapeamento espacial, uma vez que a formação de hexágonos regulares promove um preenchimento mais eficiente e completo dos espaços, sem sobreposição.

5. Testes ecotoxicológicos

Embora tenham sido desenvolvidas várias metodologias para degradação de compostos orgânicos, ainda pouco se sabe sobre os intermediários de reação e produtos formados (WANG *et al.*, 2003). Dessa forma, é preciso garantir que esses produtos de degradação não sejam tóxicos. Nesse sentido, os estudos de toxicidade são uma ferramenta importante para avaliação dos produtos de degradação formados.

Assim sendo, a ecotoxicologia aparece como uma alternativa para esse tipo de avaliação toxicológica. A ecotoxicologia nasceu como ferramenta de monitoramento ambiental, baseada na resposta de organismos vivos a estressores

químicos (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008). Seu objetivo, segundo Chapman *et al.* (1992), é entender e prever efeitos de substâncias químicas em seres vivos e comunidades naturais que constituem a biosfera.

Essa área da ciência é baseada em testes de toxicidade com organismos vivos, integrantes de um ecossistema definido, que também são chamados de bioensaios. Esses testes são de grande importância uma vez que permitem avaliar os danos ocorridos nos diversos ecossistemas após a contaminação e ainda prever impactos futuros (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

A alteração no comportamento dos bioindicadores³ é considerada um alerta para um dano ou estresse sofrido, uma vez que, segundo Magalhães (2008), o comportamento é uma resposta toxicológica que reflete o efeito de todos os níveis do organismo e representa a interação de processos fisiológicos com estímulos ambientais.

Os testes ecotoxicológicos são realizados com organismos indicadores (bioindicadores) que, devido às suas características de pequeno limite de tolerância ecológica a determinadas substância química, apresentam algumas alterações, sejam elas morfológicas, fisiológicas ou comportamentais quando expostas a alguns poluentes (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008; CHARLES *et al.*, 2011).

A principal vantagem dos testes ecotoxicológicos é que a detecção de compostos tóxicos é realizada com base na atividade biológica, não sendo necessário um conhecimento químico prévio sobre o agente tóxico para identificar a sua presença. Além disso, os sistemas biológicos podem reagir a concentrações de substâncias abaixo dos limites de detecção de vários métodos analíticos (CHAPMAN *et al.*, 1992; KNIE; LOPES, 2004).

Em testes ecotoxicológicos, alguns procedimentos são importantes para que os resultados sejam considerados válidos, como séries de diluição, controle negativo e controle positivo. A série de diluição é um indicativo de qual concentração o material testado apresenta toxicidade sobre uma população. Com esse indicador é possível avaliar os limites de tolerância do indivíduo estudado. O controle negativo

³ Bioindicador é uma espécie ou grupo de espécies que reflete o estado biótico ou abiótico de um meio ambiente, o impacto produzido sobre um habitat, comunidade ou ecossistema (RIBEIRO *et al.*).

ajuda a eliminar possíveis outros contaminantes que possam causar danos. O controle positivo é usado para garantir que o organismo responde apropriadamente a um contaminante (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

5.1. Organismos-teste

Uma vez que os processos metabólicos de cada espécie respondem de maneira diferente aos contaminantes, é recomendada a utilização de diferentes espécies de organismos nas caracterizações ecotoxicológicas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Uma grande variedade de espécies tem sido empregada em testes de toxicidade, destacando-se: fitoplânctons (algas), microcrustáceos (zooplânctons), peixes e bactérias. Algumas plantas superiores também são sensíveis a substâncias tóxicas e podem ser utilizadas como bioindicadores, como é o caso do pepino, agrião, alface e soja (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

A espécie *Daphnia similis* (Figura 10), vulgarmente conhecida como pulga d'água, é um microcrustáceo zooplanctônico amplamente distribuído nos corpos de água doce (ABNT, 2009). É um consumidor primário da cadeia alimentar e fonte de alimento para os consumidores secundários. Essa espécie apresenta sensibilidade a diversas classes de compostos químicos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).



Figura 10: Microcrustáceo *Daphnia similis*. Fonte: (IPEN, 2013).

Para a realização dos testes com a *Daphnia similis* é preciso observar condições de temperatura, luminosidade, qualidade da água de cultivo e alimentação, como descreve a norma NBR 12713 (2009).

O teste de toxicidade em plantas superiores apresenta algumas vantagens: é simples, rápido e confiável; as plantas podem ser mais sensíveis ao estresse ambiental do que outros organismos; são fáceis de manipular e armazenar, além de ser uma alternativa de baixo custo e boa correlação (CHARLES *et al.*, 2011). A fitotoxicidade⁴ pode ser determinada, por exemplo, pelas características da germinação de sementes, comprimento da raiz e taxa de crescimento da muda (GREENE *et al.*; CHARLES *et al.*, 2011).

A germinação de sementes e o comprimento da raiz podem ser aplicados para identificação de toxicidade aguda causada por contaminantes a partir de um teste rápido, de 120 h. Os resultados são baseados nos efeitos negativos observados em relação às funções bioquímicas e fisiológicas dos organismos testados e o parâmetro a ser avaliado é a inibição da germinação e do comprimento da raiz quando comparada aos controles (LÓPEZ *et al.*, 2008).

⁴ Fitotoxicidade é a alteração no desenvolvimento de uma planta causado por efeito tóxico de certas substâncias.

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Degradação do brometo de etídio em solução aquosa usando ozônio como método oxidativo e avaliação ecotoxicológica dos produtos de degradação gerados.

Objetivos Específicos

- Avaliação dos parâmetros que influenciam o processo de ozonização na degradação do brometo de etídio e sua otimização;
- Avaliação do processo de degradação da solução de brometo de etídio a partir dos métodos de ozonização catalíticos (ZnO, Al₂O₃ e XAD-7);
- Estudo ecotoxicológico dos produtos de degradação do brometo de etídio em solução aquosa.

CAPÍTULO 2: OZONIZAÇÃO DO BROMETO DE ETÍDIO LIVRE EM SOLUÇÃO AQUOSA

1. Materiais e métodos

1.1. Reagentes e soluções

Foi preparada uma solução de brometo de etídio (EtBr) (Merck) com concentração de $1,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para ser utilizada como solução estoque. As soluções utilizadas nos experimentos foram preparadas a partir da diluição desta matriz.

Solução tampão universal foi preparada a partir de compostos inorgânicos contendo fosfato de sódio dibásico, Na_2HPO_4 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$), carbonato de sódio, Na_2CO_3 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e ácido bórico, H_3BO_3 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$). O pH foi ajustado com soluções de HNO_3 ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) e NaOH ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$) conforme a necessidade. A força iônica foi corrigida com solução aquosa de NaCl ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$) para se manter constante em $0,2 \text{ mol L}^{-1}$.

Água destilada foi utilizada no preparo e diluição de todas as soluções.

1.2. Instrumentação

Para realização das medidas de absorvância e análise dos espectros de absorção foi utilizado um espectrofotômetro UV-visível duplo feixe Femto Cirrus 60ST, cubeta de quartzo em fluxo com caminho ótico de 10,0 mm.

O ozônio foi gerado por um gerador de ozônio da marca Ozone & Life a partir de oxigênio puro com uma vazão de $0,5 \text{ L min}^{-1}$.

Para os experimentos de ozonização foi utilizado um reator de vidro Pyrex[®] em formato cônico com entrada e saída para dispersão do gás ozônio, encamisado com mangueiras para circulação de água, auxiliando na manutenção da temperatura, capacidade de 0,250 L (Figura 11).

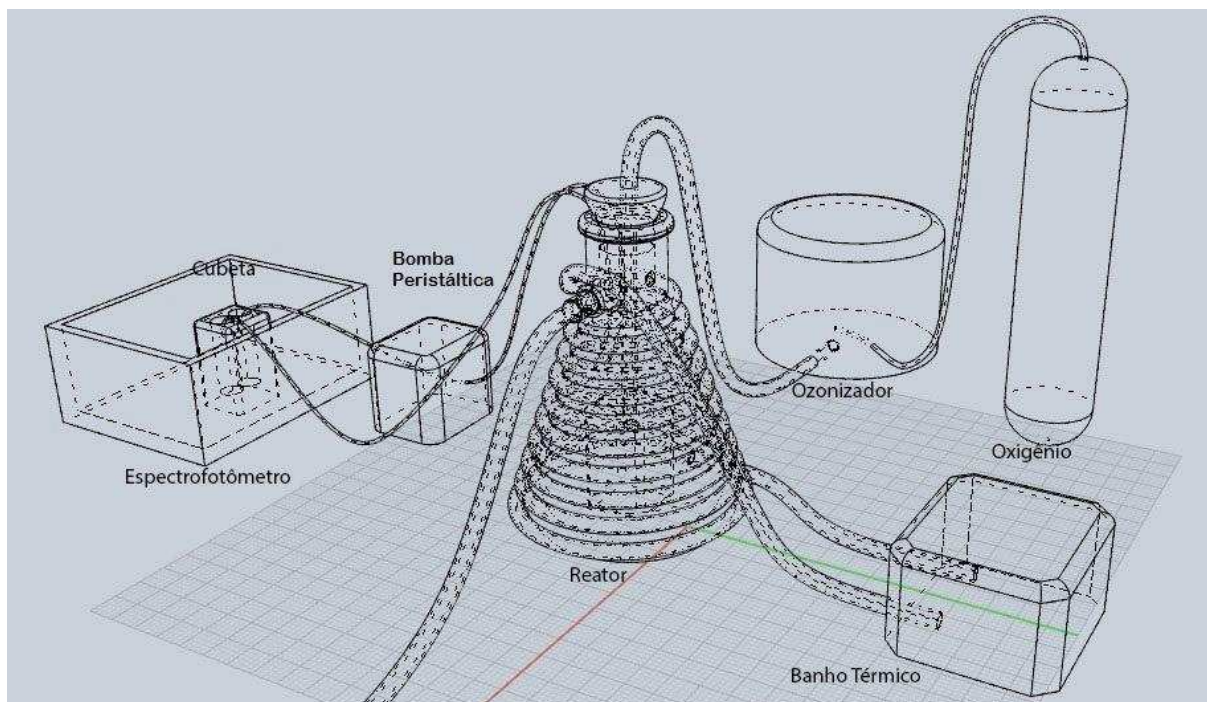


Figura 11: Esquema da montagem do experimento de ozonização. Fonte: Autor

1.3. Procedimento experimental

A fim de estudar a cinética de degradação do brometo de etídio em solução aquosa por processos oxidativos avançados com uso de ozônio e a sua eficiência de degradação, foi necessário avaliar a influência de algumas variáveis no comportamento do sistema durante o processo de ozonização.

Para determinar as melhores condições para realização dos experimentos de degradação do brometo de etídio, foram analisadas a influência do pH, temperatura do meio e concentração de ozônio gasoso. A concentração do brometo de etídio foi mantida constante a $1,27 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ou $0,500 \text{ mg L}^{-1}$, a partir da diluição da solução estoque para um volume de 250 mL. Os valores de pH variaram entre 2,0 e 11,0; a temperatura entre 10 °C e 30 °C; e a concentração de ozônio entre 1,0 e 3,0 mg L^{-1} .

1.3.1. Planejamento experimental

A Matriz de Doehlert foi escolhida como método de planejamento e otimização experimental por permitir a avaliação da interação entre as variáveis, além da escolha de diferentes níveis dos fatores, o que garante um maior detalhamento das influências dos parâmetros avaliados.

Foram planejados 13 experimentos com três variáveis experimentais (pH, concentração de ozônio e temperatura) e um ponto central.

O fator de maior nível escolhido foi o pH (sete variações), seguido pela temperatura (cinco variações), e concentração de ozônio (três variações). Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados para realização do experimento em Matriz de Doehlert são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3: Valores reais e códigos das variáveis experimentais analisadas para montagem do planejamento experimental via Matriz de Doehlert.

Ensaio	Valores reais			Código das variáveis experimentais		
	Temp / °C	Ph	Concentração de O ₃ /(mg L ⁻¹)	Temp	pH	Concentração de O ₃
1	20,0	6,5	2,0	0,000	0,000	0,000
2	30,0	6,5	2,0	1,000	0,000	0,000
3	25,0	11,0	2,0	0,500	0,866	0,000
4	25,0	8,0	3,0	0,500	0,289	0,817
5	10,0	6,5	2,0	-1,000	0,000	0,000
6	15,0	2,0	2,0	-0,500	-0,866	0,000
7	15,0	5,0	1,0	-0,500	-0,289	-0,817
8	25,0	2,0	2,0	0,500	-0,866	0,000
9	25,0	5,0	1,0	0,500	-0,289	-0,817
10	15,0	11,0	2,0	-0,500	0,866	0,000
11	20,0	9,5	1,0	0,000	0,577	-0,817
12	15,0	8,0	3,0	-0,500	0,289	0,817
13	20,0	3,5	3,0	0,000	-0,577	0,817

O sistema composto pela solução de brometo de etídio em tampão universal nas condições determinadas segundo a Matriz de Doehlert foi ozonizada durante 30 min, em cada experimento. A absorvância foi medida no máximo de absorção do composto a cada minuto. Uma curva analítica para o brometo de etídio foi obtida no comprimento de onda de 295 nm em pH 9,5.

1.3.2. Determinação da concentração do ozônio

A concentração de ozônio no meio gasoso e em solução foi determinada a partir de titulação iodométrica indireta, em que o oxidante foi determinado fazendo-se reagir com excesso de íons iodeto e determinando-se o iodo liberado com um redutor padrão.

Para a determinação da concentração no gás, borbulhou-se ozônio em 50,0 mL de solução de iodeto de potássio (KI) 20,0 g L⁻¹, por 2 min. Em seguida, a solução foi acidificada com 2,5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,5 mol L⁻¹ e titulada com solução padronizada de tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) 0,1 mol L⁻¹ até a descoloração da mistura em um tom de amarelo pálido. Adicionou-se 1,0 mL de solução de amido 1,0% e prosseguiu-se com a titulação até o desaparecimento da cor azul. A concentração do ozônio gasoso é dada pela equação Equação 22:

$$c(O_3)(mg L^{-1}) = \frac{c_{Na_2S_2O_3} \times f_{Na_2S_2O_3} \times V_{Na_2S_2O_3} \times MM_{O_3}}{2 \times \emptyset \times t} \quad \text{Equação 22}$$

Em que $c_{Na_2S_2O_3}$; $f_{Na_2S_2O_3}$ e $V_{Na_2S_2O_3}$ são a concentração, o fator de correção e o volume gasto de tiosulfato de sódio; MM_{O_3} , é a massa molecular do ozônio; \emptyset , é o fluxo do gás e t é o tempo de borbulhamento.

Para a determinação da concentração em solução, ao invés de borbulhar ozônio em solução de iodeto de potássio, adicionou-se a solução aquosa já ozonizada por 10 min à solução de iodeto e prosseguiu-se com o mesmo procedimento anterior.

1.3.3. Monitoramento dos produtos de degradação

Foram obtidos os espectros UV-visível, na faixa de 190 a 800 nm da solução inicial e final de cada experimento de degradação. O sistema de monitoramento contínuo da absorbância foi realizado com cubeta de fluxo a 3,3 mL min⁻¹.

1.3.4. Determinação das constantes de velocidade e eficiência do processo de degradação

A cinética de degradação do brometo de etídio em solução aquosa na ozonização foi estudada avaliando-se o modelo não-linear de pseudo-primeira ordem (Equações 23 a 25), e a forma linearizada do modelo de pseudo-segunda ordem (Equações 26 a 28).

$$\frac{-dC_{EtBr}}{dt} = k' \cdot C_{EtBr} \quad \text{Equação 23}$$

$$\int_{C_{A_0}}^{C_A} -\frac{dC_{A_0}}{C_A} = \int_0^t k' dt \quad \text{Equação 24}$$

$$C_A = C_{A_0} \cdot e^{-k't} \quad \text{Equação 25}$$

$$-\frac{dC_{EtBr}}{dt} = k' \cdot C_{EtBr}^2 \quad \text{Equação 26}$$

$$\int_{C_{A_0}}^{C_A} -\frac{dC_{A_0}}{C_A^2} = \int_0^t k' \cdot dt \quad \text{Equação 27}$$

$$\frac{1}{C_A} = \frac{1}{C_{A_0}} + k't \quad \text{Equação 28}$$

Em ambos os modelos, o termo $\frac{-d C_{EtBr}}{dt}$ representa a taxa de decomposição do corante; k' é a constante de velocidade; e C_{EtBr} é a concentração do corante no instante t .

A eficiência da degradação (ou descoloração) do brometo de etídio foi determinada a partir da Equação 29.

$$\% \text{ degradação} = \frac{C_{EtBr}^0 - C_{EtBr}}{C_{EtBr}^0} \times 100 \quad \text{Equação 29}$$

Em que C_{EtBr}^0 é a concentração inicial do brometo de etídio, antes do processo de ozonização; e C_{EtBr} , a concentração final, após 30 min de ozonização.

1.3.5. Testes de toxicidade dos produtos de degradação

Para avaliar se os produtos da degradação do brometo de etídio em solução aquosa via ozonização são seguros para descarte, testes ecotoxicológicos foram realizados, observando especialmente características de toxicidade do produto final.

Foram realizados dois testes de toxicidade aguda com organismos de diferentes níveis tróficos: o microcrustáceo *Daphnia similis*, e sementes de alface (*Lactuca sativa*).

Para os testes de toxicidade aguda com *D. similis* foram seguidas as indicações especificadas na norma NBR 12713 (ABNT, 2009), através da exposição de organismos jovens, de 6 a 24 h de idade, a amostras dos produtos de degradação por 48 h, sem nenhuma diluição.

Os resultados obtidos foram dicotômicos, ou seja, expressaram a ocorrência ou não da toxicidade. Os testes foram realizados em quatro repetições com cinco organismos em cada repetição e 10,0 mL de amostra. O controle foi realizado na água de cultivo dos organismos. Foi feito um ajuste de pH das amostras dos produtos de degradação antes da exposição para uma faixa entre 7,0 e 8,0, que é a faixa de sobrevivência dos organismos-teste. O ensaio foi mantido a 22 °C, com fotoperíodo de 16 h, sem qualquer alimentação. Após 48 h, foi registrado o número de organismos imóveis.

Foram ainda realizados testes de germinação da semente de alface (*Lactuca sativa*) variedade Manteiga, e seu comprimento de raiz segundo as indicações de

Sobrero e Ronco (2004). As sementes utilizadas foram obtidas comercialmente, sem tratamento químico.

Nesse teste, as sementes foram expostas ao produto de degradação por 120 h, com duas repetições, sem diluição. Os ensaios foram realizados em placas de Petri de 10,0 cm de diâmetro forradas com papel de filtro qualitativo embebido em 4,0 mL de amostra. Em seguida, 20 sementes de alface foram dispostas sobre o papel de filtro e a placa coberta com filme plástico de PVC para evitar a desidratação. O período de incubação foi de 5 dias a 22 °C, sem iluminação. Foi utilizada água destilada como controle negativo.

No final do teste, os parâmetros observados foram o percentual de inibição da germinação das sementes e o comprimento da raiz. A Figura 12 ilustra o método utilizado para avaliar a fitotoxicidade dos produtos de degradação em sementes de alface.

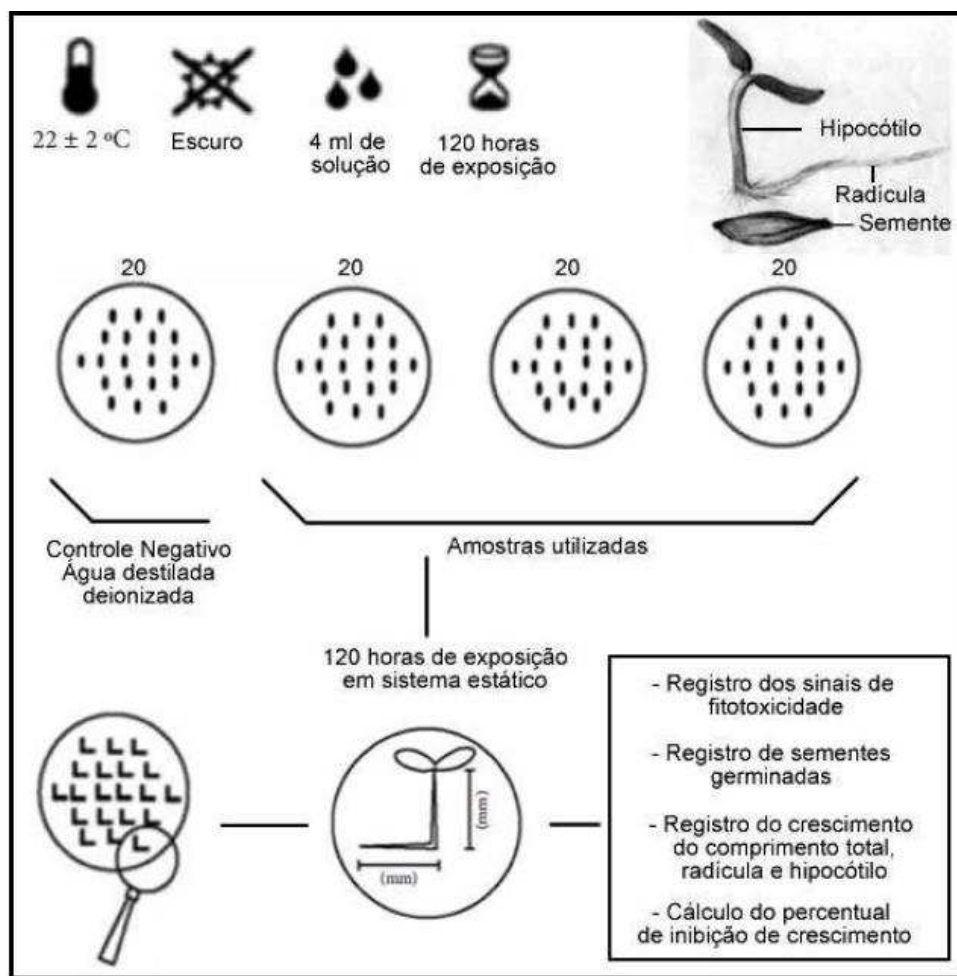


Figura 12: Esquema geral do procedimento realizado para teste de toxicidade com semente de alface (*Lactuca sativa*). Fonte: Sobrero, Ronco, 2004.

2. Resultados e Discussão

2.1. Caracterização da amostra

O espectro de absorção na região do ultravioleta-visível de EtBr $8,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em água é apresentado na Figura 13. O etídio é capaz de absorver radiação devido a presença de grupos cromóforos em sua estrutura molecular, fornecendo orbitais π conjugados, permitindo as transições entre os níveis de energia. Apresenta também elétrons não-ligantes que são capazes de se excitar a outros níveis energéticos.

Seu espectro de absorção apresenta máximos na região UV em 217 nm e 295 nm e na região do visível em 483 nm. O monitoramento da degradação do composto foi realizado no máximo comprimento de onda do EtBr, isto é, em 295 nm.

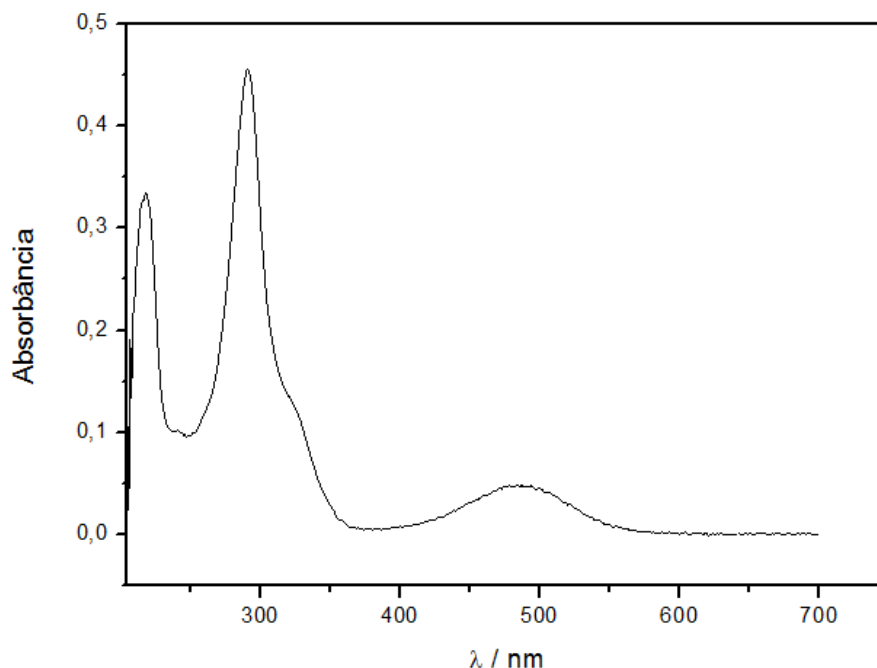


Figura 13: Espectro de absorção de solução aquosa de EtBr $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Foi realizada também uma análise espectrofotométrica dos componentes do tampão universal para verificar se apresentavam absorção na mesma região do analito de interesse, ainda que a solução de tampão universal em cada valor de pH estudado tenha sido usada como branco nos experimentos de degradação. A Figura 14 mostra os espectros de absorção de soluções $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (sem ajuste de pH) de Na_2CO_3 (pH 11,10), Na_2HPO_4 (9,36) e H_3BO_3 (6,37), além do espectro de absorção do tampão universal (pH 10,2), após a mistura dos componentes inorgânicos.

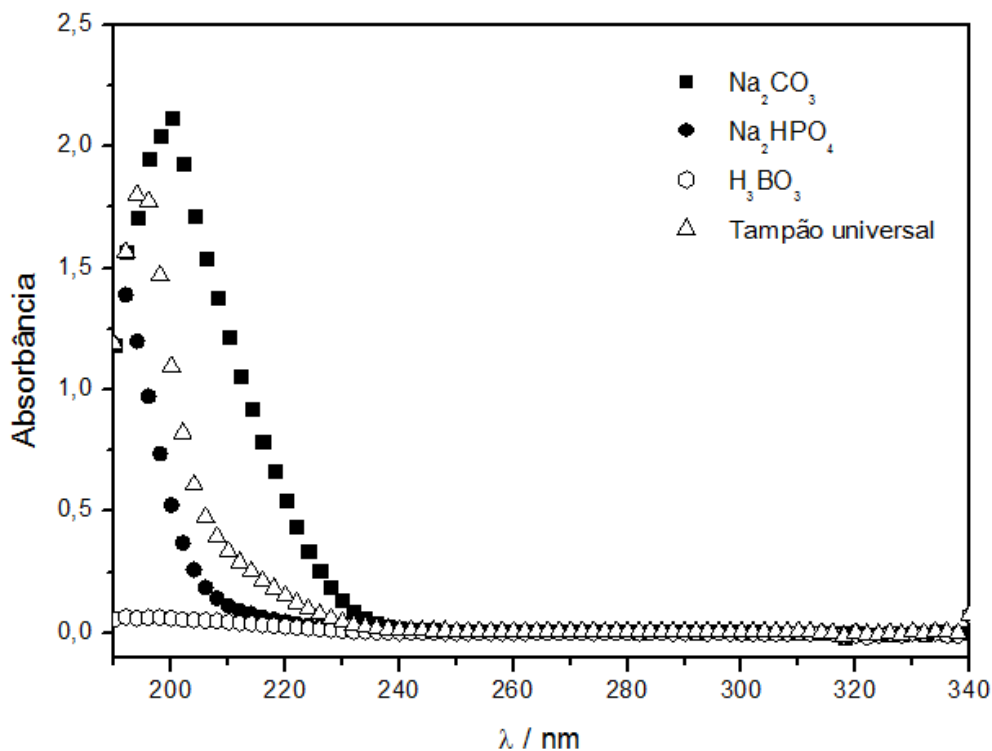


Figura 14: Espectros de absorção em solução aquosa para (■) Na_2CO_3 0,01 mol L^{-1} ; (●) Na_2HPO_4 0,01 mol L^{-1} , (○) H_3BO_3 0,01 mol L^{-1} ; (△) tampão universal, usando água como branco

O carbonato e o fosfato apresentam absorção na região do ultravioleta devido a presença de elétrons não-ligantes que são capazes de absorver radiação, sendo excitados a níveis de maior energia. Entretanto, não ocorre superposição de bandas de absorção com o brometo de etídio em 295 nm ou em 483 nm.

A absorvidade molar das outras espécies dos sistemas ácido base presentes no tampão universal são distintos entre si, de maneira que o espectro dessa solução depende do pH. Por exemplo, em meio ácido, o sistema carbonato é o principal componente que altera o perfil do tampão universal (Figura 15). É interessante lembrar que, em valores de pH abaixo de 6,4, predomina a espécie H_2CO_3 ; acima desse valor, até pH 10,3 predomina o bicarbonato (HCO_3^-) e, em valores acima de 10,3 predomina o carbonato (CO_3^{2-}) e cada espécie apresenta diferente espectro de absorção.

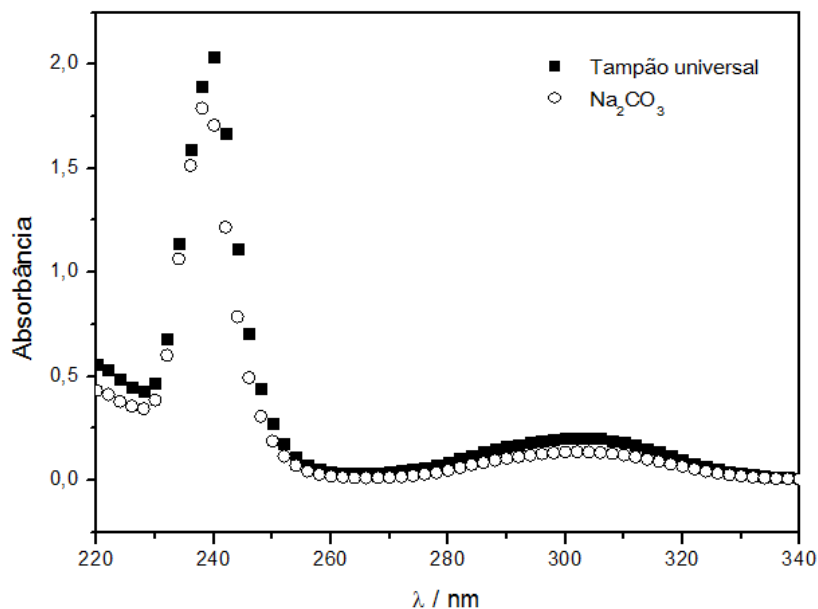


Figura 15: Espectro de absorção do tampão universal e Na_2CO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, ambos em pH 2,0.

Apesar das espécies no equilíbrio ácido-base envolvendo o H_3BO_3 e fosfato também sofrerem alteração dependendo do pH, os espectros de absorção não provocaram sobreposição na região de interesse para determinação do EtBr.

A curva analítica em 295 nm foi obtida entre $0,25$ e $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, obtendo-se uma absorvidade molar de $6,96 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Figura 16), similar ao observado por Oliveira *et al.* (2009). Uma vez que as concentrações estudadas nos experimentos de degradação estavam dentro da faixa analítica, pode ser realizado o monitoramento contínuo sem etapas de diluição. O limite de detecção (LOD) e de quantificação foram respectivamente iguais a $0,0135$ e $0,045$, obtidos a partir do modelo da curva analítica considerando 3 e 10 vezes o desvio padrão do branco.

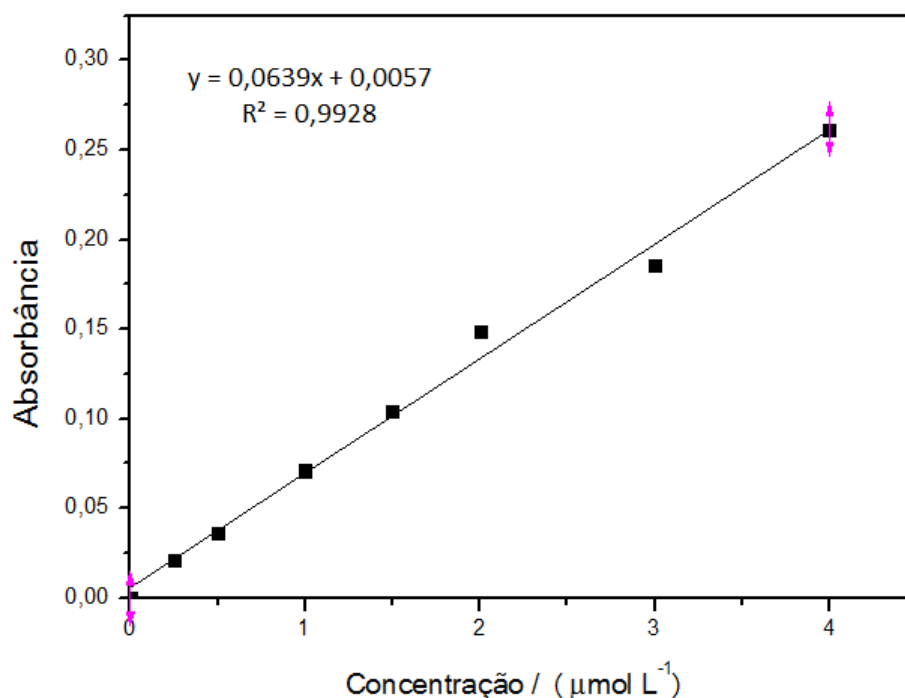


Figura 16: Curva analítica obtida da absorção máxima em 295 nm de soluções aquosas do EtBr entre 0,25 e 4,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em pH 2,0.

2.2. Estudo da cinética de degradação do brometo de etídio

Os estudos de degradação foram realizados em uma concentração similar àquela utilizada em banhos para revelação de géis de eletroforese. Como esse valor é inferior ao limite de quantificação de analisadores de carbono (TOC), foi realizado apenas o monitoramento espectrofotométrico da degradação. Dessa maneira, foi avaliada a descoloração do etídio, ou seja, pelo menos a quebra de ligações que determinam a formação dos cromóforos. Neste texto, o termo descoloração e degradação serão usados como sinônimos, a menos que explicitamente descrito o contrário.

O comportamento da degradação do brometo de etídio durante a ozonização pode ser exemplificado pela Figura 17, que representa o processo em três condições experimentais distintas.

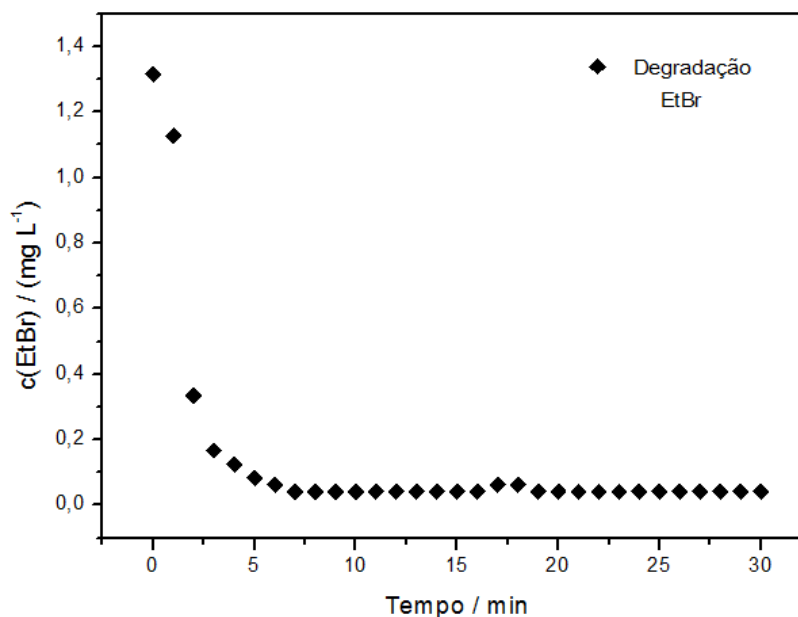


Figura 17: Comportamento da degradação do brometo de etídio $1,27 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ via ozonização a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 11,0 e $c(\text{O}_3) = 2,0 \text{ mg L}^{-1}$.

2.2.1. Seleção do modelo cinético

Foram analisados os modelos cinéticos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem para avaliar o comportamento da degradação do brometo de etídio. É interessante lembrar que os modelos cinéticos chamados “*pseudo*” consideram que apenas um dos reagentes influencia a cinética da reação, mantendo a concentração dos outros reagentes constante, podendo então incluí-la na constante de taxa, k' (ou constante de velocidade). Nesse estudo, foram avaliados os efeitos da cinética e da eficiência de degradação referentes à concentração de brometo de etídio, considerando a concentração de ozônio constante, devido o seu excesso em relação ao corante (concentração de 2 a 6 vezes maior, dependendo dos experimentos).

Foi ajustado um modelo não-linear de cinética de pseudo-primeira ordem na forma integrada (Equação 25, página 3939).

A comparação dos gráficos de resíduos dos modelos de regressão foi realizada (Figura 18). Os gráficos de resíduos permitem a verificação subjetiva da independência, da variância constante e da média nula dos erros, que são

pressupostos necessários para os modelos de regressão. Além disso, a menor variância (ou mesmo a estimativa do desvio-padrão dos resíduos) permite selecionar o melhor modelo. Assim, para confirmar tais pressupostos, os pontos do gráfico devem distribuir-se de forma aleatória, sem seguir nenhum padrão, indicando que nenhuma variável “extra” tenha influenciado nos resultados dos experimentos, tampouco há a existência de *outliers*.

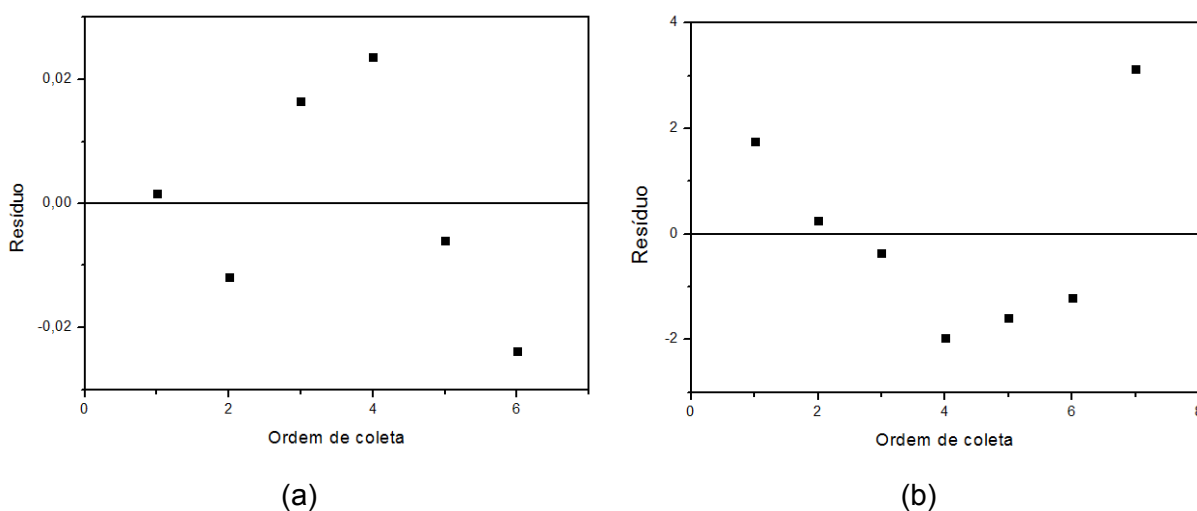


Figura 18: Gráficos de resíduo *versus* ordem de coleta para os ajustes de (a) pseudo-primeira ordem e (b) pseudo-segunda ordem.

A fim de avaliar a normalidade da distribuição de frequência dos resíduos, foi empregado o teste estatístico Kolmogorov-Smirnov, com auxílio do software Action®. Este teste indicou que, para ambos os modelos, os erros apresentaram distribuição normal com p-valores maiores que 0,77.

O teste Kolmogorov-Smirnov observa a máxima diferença entre a distribuição acumulada assumida para os dados, no caso a normal e a função de distribuição empírica, obtida experimentalmente. Como critério, compara-se essa diferença com um valor crítico para um dado nível de significância ou verifica-se se a probabilidade (p-valor) de aceitar que não há diferença significativa (hipótese nula) entre as distribuições é maior que o nível de significância. Desse modo, tal teste para um nível de significância de 5% (probabilidade de erro ao rejeitar a hipótese nula) considera a hipótese nula do teste para p-valor acima de 0,05, ou seja, considera

que os resíduos observados apresentam uma distribuição normal, que é um quesito para a obtenção dos modelos de regressão paramétricos.

Em relação à qualidade dos ajustes, os modelos de pseudo-primeira e pseudo-segunda ordem apresentaram um bom ajuste, definido pelos valores elevados de R^2 , assim como o p-valor foi maior que 0,05. Tal resultado significa a existência de um ajuste, comparado à ausência do ajuste.

No entanto, o fator R^2 indicou que os dados apresentam melhor correlação com o modelo de pseudo-primeira ordem (Tabela 4:), indicando que esse modelo explica mais satisfatoriamente o comportamento do brometo de etídio no processo de degradação, além de apresentar também menor desvio padrão dos resíduos. Dessa forma, esse modelo descreve melhor a degradação do EtBr e foi o escolhido para a determinação da constante de velocidade nos experimentos de degradação do corante.

Tabela 4: Valores da constante de velocidade de degradação do brometo de etídio e parâmetros estatísticos para ajuste dos dados aos modelos de pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem para a condição 30 °C, pH 6,5 e $c(O_3) = 2,0 \text{ mgL}^{-1}$.

Modelo	k / ($\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Desvio padrão dos Resíduos	R^2
Pseudo-primeira ordem	$1,302 \pm 0,022$	0,017	0,996
Pseudo-segunda ordem	$3,601 \pm 0,387$	1,869	0,934

2.2.2. Avaliação da influência de parâmetros na cinética de degradação via Matriz de Doehlert

A influência dos parâmetros pH, temperatura e concentração de ozônio na velocidade de degradação do EtBr em solução aquosa foi estudada considerando-se a constante de velocidade de pseudo-primeira ordem (k') como resposta, calculada para as três repetições dos dados cinéticos.

Para avaliar a presença de *outliers* no conjunto de dados obtidos, ou seja, dados que difiram excessivamente de seu conjunto, foi aplicado o Teste de Grubbs a 95% para decidir sobre a rejeição. O Teste de Grubbs relaciona o valor do dado suspeito com a média e o desvio-padrão do conjunto (Equação 33), obtendo-se assim um valor $Q_{\text{calculado}}$.

$$Q_{\text{calculado}} = \frac{|x_n - \bar{x}|}{s} \quad \text{Equação 33}$$

Em que x_n é o valor suspeito; \bar{x} é a média do conjunto; e s é o desvio-padrão dos dados. Assim, se o valor de Q calculado (Q_c) for maior que o tabelado (Q_t), pode-se concluir que o valor suspeito é um *outlier*.

A Tabela 5 mostra os valores críticos calculados para o Teste de Grubbs para um conjunto de 3 a 8 dados amostrais.

Tabela 5: Valores críticos para o Teste de Grubbs a 95%, para um conjunto com N dados amostrais.

N	3	4	5	6	7	8
Q_c	1,155	1,481	1,715	1,887	2,020	2,126

A Tabela 1Tabela 6 mostra os resultados das constantes de velocidade para cada ensaio planejado pela Matriz de Doehlert, com a indicação dos dados rejeitados pelo Teste de Grubbs.

Tabela 6: Condições experimentais de temperatura, pH e concentração de ozônio planejada segundo Matriz de Doehlert e respectivas constantes de velocidade para cada experimento.

Ensaio	Valores reais			k'		
	Temp/ °C	pH	Conc O ₃ / (mg L ⁻¹)	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3
1	20,0	6,5	2,0	1,011	1,022	1,545*
2	30,0	6,5	2,0	1,302	1,302	1,346*
3	25,0	11,0	2,0	1,118	1,157	1,216
4	25,0	8,0	3,0	1,566	1,707	1,896
5	10,0	6,5	2,0	1,01	1,633	1,699
6	15,0	2,0	2,0	1,355	1,902	3,179*
7	15,0	5,0	1,0	0,644	0,774	0,983
8	25,0	2,0	2,0	0,931*	2,275	2,439
9	25,0	5,0	1,0	0,555	0,678	0,988
10	15,0	11,0	2,0	1,198	1,248	1,972
11	20,0	9,5	1,0	0,763	0,773	1,068*
12	15,0	8,0	3,0	1,576*	2,19	2,394
13	20,0	3,5	3,0	1,784*	2,051	2,051

* *outlier de acordo com teste de Grubbs*

Após a exclusão dos *outliers* foram obtidos os modelos de regressão múltipla para explicar a influência da temperatura, da concentração de ozônio e do pH do meio sobre a constante de velocidade de degradação do brometo de etídio (Equação 34).

$$k' = a + b(T) + c(pH) + d(cO_3) + e(T^2) + f(pH^2) + g(cO_3^2) + h(T * pH) + i(T * cO_3) + j(pH * cO_3) \quad \text{Equação 34}$$

Em que k' é a resposta experimental a ser otimizada; a é o termo independente (branco); b, c e d, são os coeficientes dos termos lineares; e, f e g são os coeficientes dos termos quadráticos; h, i e j são os termos das interações entre os três fatores.

Para cada modelo obtido foi realizada uma análise estatística dos resíduos dos dados calculados da constante de velocidade para avaliar características importantes do conjunto. A análise de normalidade a partir do teste Kolmogorov-

Smirnov apresentou um p-valor de 0,454, indicando a normalidade dos dados pelo Teste de Kolmogorov-Smirnov ao nível de 5% de significância.

O gráfico de resíduo obtido para os dados ajustados à Matriz de Doehlert para a constante de velocidade (Figura 19) dá a indicação de que os resíduos se distribuem aleatoriamente em torno do zero, e não foi observada heterocedasticidade (diferença de variância ao longo do gráfico), ou seja, que a variância constante, a média nula e a independência dos erros são pressupostos válidos.

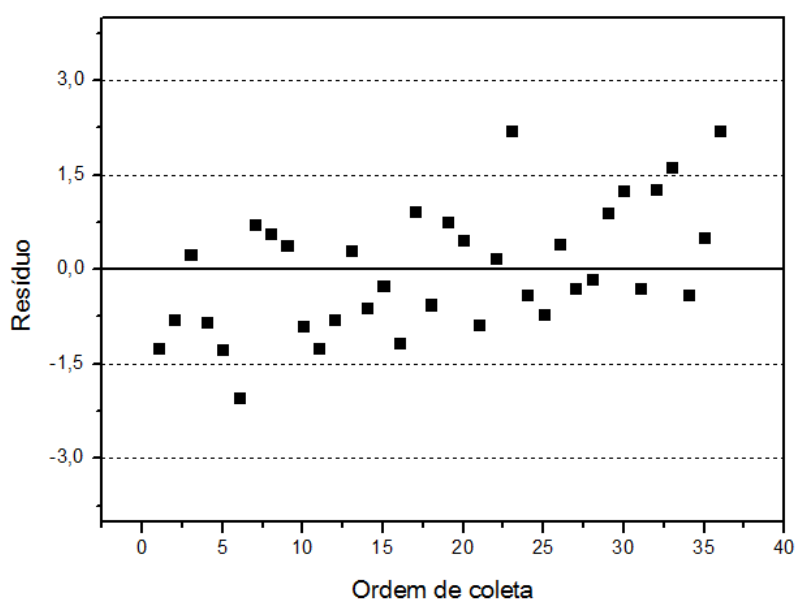


Figura 19: Gráfico de resíduos dos dados ajustados à Matriz de Doehlert versus ordem de coleta.

A determinação dos coeficientes do modelo e a seleção das variáveis importantes foi realizada a partir de uma análise de regressão *Stepwise*, que é um modelo baseado na inclusão e exclusão de variáveis através de uma regra de decisão. A importância da variável é definida em termos de significância estatística do coeficiente associado a ela. Foi utilizado um teste t para avaliar a diferença significativa do coeficiente em relação ao zero (95% de confiança).

$$t_{calc} = \frac{\text{coeficiente}}{\text{estimativa do desvio padrão do coeficiente}}$$

Equação 35

A partir da análise de regressão *Stepwise*, os dados obtidos pelo planejamento via Matriz de Doehlert geraram um modelo de regressão descrito pela Equação 36. Os coeficientes podem ser comparados mais facilmente na Figura 20.

$$k = 1,79 \pm 0,11 - (0,960 \pm 0,19)pH + (1,49 \pm 0,20)cO_3 - (2,75 \pm 0,49) pH * cO_3$$

Equação 36

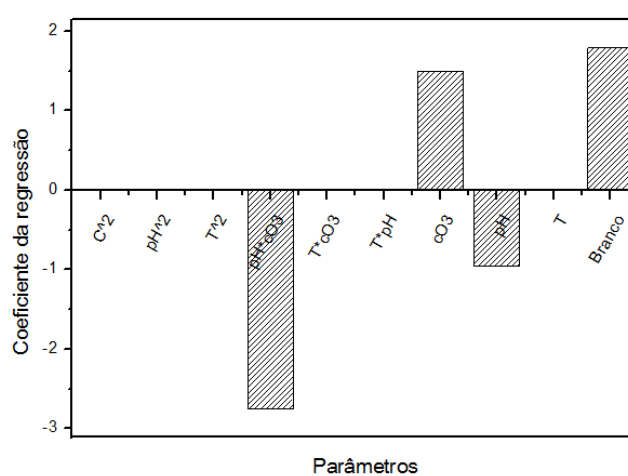
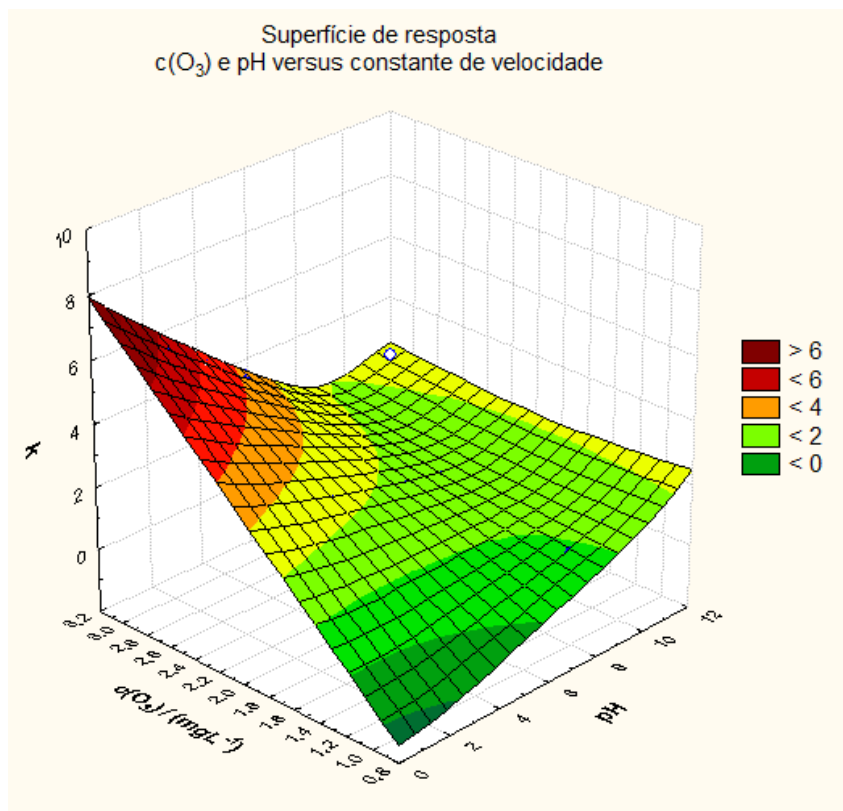


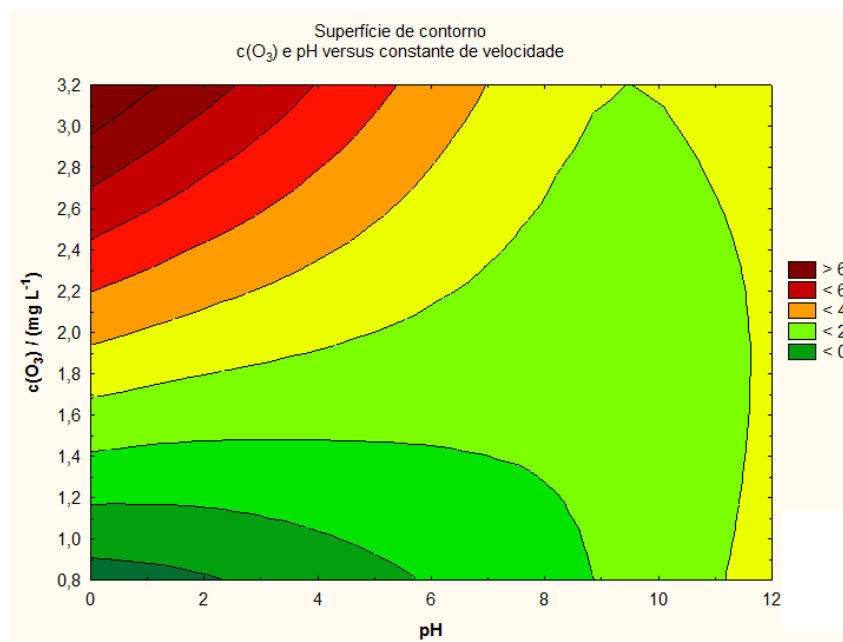
Figura 20: Coeficientes determinados por regressão *Stepwise* para os parâmetros avaliados e suas interações.

Por esse modelo, observa-se que a constante de velocidade (k) aumenta com a diminuição do pH e pelo aumento da concentração de ozônio. Esse resultado também pode ser visto nos gráficos de superfície de resposta e de contorno (Figura 21).

A temperatura não afetou significativamente a constante de velocidade. Ainda que o abaixamento da temperatura aumente a solubilidade do ozônio em água, usualmente as constantes cinéticas também diminuem. Nesse caso, aparentemente os efeitos se anularam.



(a)



(b)

Figura 21: (a) Superfície de resposta e (b) Superfície de contorno obtidas a partir da Matriz de Doehlert tendo a constante de velocidade como resposta analítica.

A influência do pH na constante de velocidade demonstra a relação existente entre o mecanismo da degradação e a cinética do processo. O modelo indica que em valores mais baixos de pH a cinética de degradação é favorecida. Desse modo, o ataque direto do ozônio às duplas ligações é o mecanismo pelo qual a descoloração do brometo de etídio ocorreu de maneira mais rápida e, portanto, com maior constante de velocidade.

A interação entre o pH e a concentração de ozônio também atua na cinética da degradação, especialmente em meio ácido, em que o aumento da concentração de ozônio favorece uma cinética mais rápida. Nesse caso, o aumento da concentração do ozônio molecular na solução aquosa pode permitir um maior número de “ataques” ao brometo de etídio, tornando o processo mais rápido. No caso do ataque direto, como o ozônio ataca seletivamente às duplas ligações da molécula, ou seja, a concentração de ozônio influencia na velocidade da degradação de tal modo que quanto menos moléculas de ozônio estiverem disponíveis para o ataque às duplas ligações, mais lento será o processo. Desse modo, é possível que o mecanismo cinético do processo de degradação envolva a molécula de ozônio.

Por outro lado, em meio com pH acima de 8,0, a concentração de ozônio não parece alterar a constante de velocidade de maneira significativa. Dessa forma, os radicais hidroxila formados, mesmo em maior quantidade com o aumento da concentração de ozônio, não promovem uma melhora na cinética de degradação. Tal fato pode estar relacionado com a eficiência na geração dos radicais e o seu ataque não seletivo. O ataque não seletivo pode levar ao consumo dos radicais hidroxila para quebrar ligações não ligadas diretamente aos grupos cromóforos, assim como reações paralelas com outras espécies no meio (como com carbonato e bicarbonato), promovendo um mecanismo de degradação cineticamente mais lento, devido à competição de atuação do oxidante.

2.3. Estudo do percentual de degradação do brometo de etídio via Matriz de Doehlert

A degradação do EtBr foi monitorada pela medida de absorvância em 295 nm e a concentração na solução calculada com auxílio da curva analítica obtida nesse comprimento de onda. A comparação dos espectros obtidos no início e no final dos experimentos indicam a degradação do composto inicial e formação de produtos de degradação, devido o surgimento de picos na região de baixo comprimento de onda, sugerindo a formação de compostos orgânicos, por exemplo, aromáticos ou com duplas ligações, como mostrado na Figura 22.

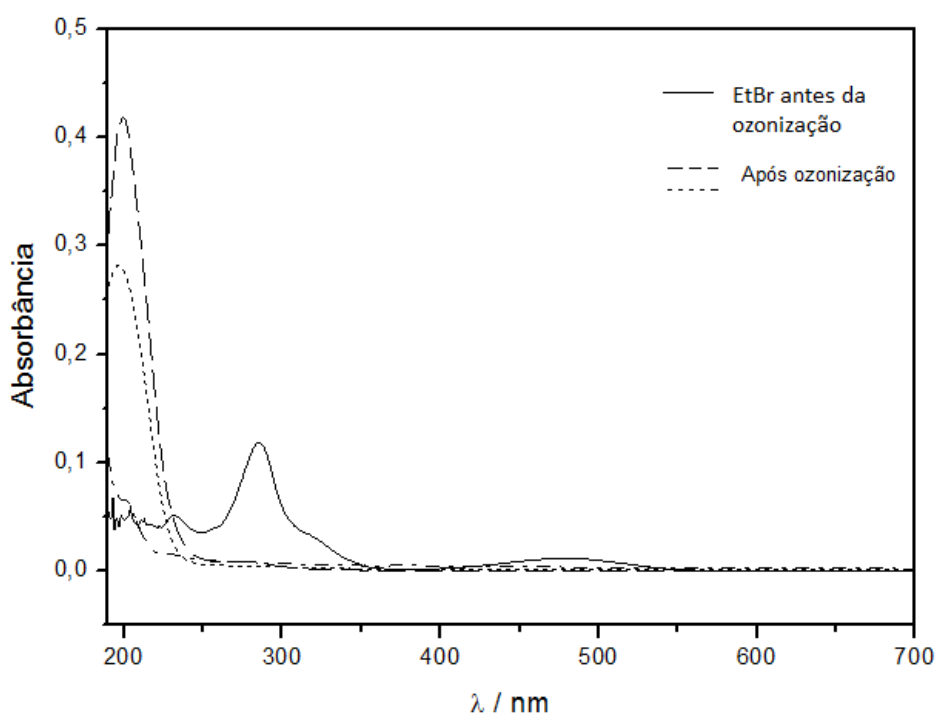


Figura 22: Espectros de absorção molecular do brometo de etídio ($1,27 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) antes e após procedimento de ozonização sob diferentes condições experimentais.

O percentual de degradação do brometo de etídio em solução aquosa foi avaliado segundo a influência dos mesmos parâmetros da constante de velocidade a partir da Matriz de Doehlert. Foram realizadas análises nos min iniciais do processo de ozonização (2 min) e no final (30 min). A exclusão de *outliers* foi baseada no teste de Grubbs. Os dados para a eficiência de degradação do EtBr estão relacionados na

Tabela 7. Foram ainda realizadas as análises de resíduo para confirmar a normalidade e independência dos erros.

Tabela 7: Condições experimentais de temperatura, pH e concentração de ozônio planejadas segundo Matriz de Doehlert e respectivos percentual de degradação para cada experimento

Ensaio	% degradação (2 min)			% degradação (30 min)		
	Repetição	Repetição	Repetição	Repetição	Repetição	Repetição
	1	2	3	1	2	3
1	60,00	68,90	69,90	84,97	87,33	90,67
2	60,60*	68,40	68,40	77,30*	88,36	88,36
3	48,20*	68,40	74,60	54,91*	95,90	96,82
4	66,60	72,10	72,60	82,00	84,09	85,21
5	61,00*	69,90	69,90	83,28	84,15	87,53
6	58,90	62,50	67,30	64,57	73,20	76,90
7	50,90	55,30	59,70	83,43*	86,54	86,55
8	50,00	66,00	67,30	67,98	73,06	84,76
9	39,30	54,50	66,70	86,87	90,53	91,65
10	59,40	62,50	71,20	40,59*	85,50	93,21
11	53,30	56,40	59,40	79,99	83,60	88,70
12	66,10	66,10	76,10	74,16	74,16	79,07
13	73,10	81,10	84,80	79,33	80,61	83,03

* outlier segundo teste de Grubbs

O gráfico de resíduos apresentou uma distribuição aleatória dos pontos indicando a independência dos erros. A normalidade da análise de resíduos foi confirmada através do teste de Kolmogorov-Smirnov (p -valor de 0,414) para ambos os tempos de ozonização.

O tratamento dos dados segundo o modelo de regressão *Stepwise* gerou uma equação que relaciona os parâmetros importantes para a condição do percentual de degradação com a variável resposta (percentual de degradação).

Após 2 min de ozonização, a eficiência de degradação é influenciada basicamente pelo efeito direto da concentração de ozônio (Equação 37), de modo

que o aumento dessa concentração favorece um melhor rendimento na eficiência de degradação do brometo de etídio nos min iniciais do processo. Nenhum outro parâmetro demonstrou uma influência significativa.

$$Eficiência\ de\ degradação_i = 0,68 \pm 0,01 + (0,12 \pm 0,01) cO_3 \quad \text{Equação 37}$$

No final do processo de ozonização, o percentual de degradação foi dependente apenas do pH (Equação 38), melhorando a eficiência na degradação à medida que o pH do meio se torna mais básico.

$$Eficiência\ de\ degradação_f = 0,85 \pm 0,01 + (0,07 \pm 0,02) pH \quad \text{Equação 38}$$

Observando o comportamento diferenciado das variáveis que influenciam as condições inicial e final do tratamento, os dados em 3, 5 e 10 min de ozonização também foram analisados para detalhar a influência dos parâmetros estudados no decorrer do tempo.

Nos primeiros quatro min de ozonização há influência da concentração de ozônio, que decai com o tempo, e também do pH, cujo coeficiente aumenta e se mantém estável até o final do processo (Figura 23). Esse resultado sugere a alteração do mecanismo da reação ao longo do tempo, onde inicialmente há várias regiões que podem ser atacadas por qualquer mecanismo (em meio ácido ou básico), mas no final, o ataque não seletivo radicalar é mais eficiente de maneira que o pH do meio se torna importante. Além disso, deve-se considerar a cinética de dissolução do ozônio nos primeiros min do experimento, até sua saturação.

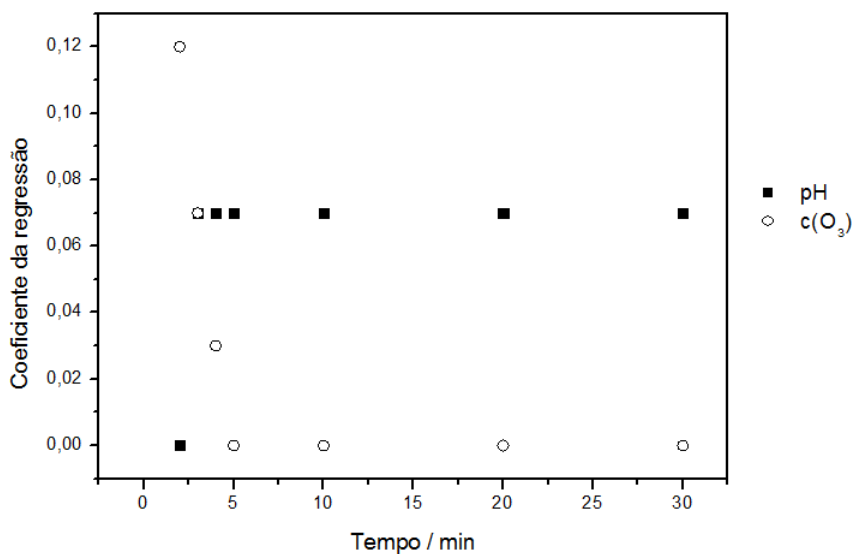


Figura 23: Coeficientes de regressão para a influência do (■) pH e (○) concentração de ozônio.

Os melhores resultados para a degradação do corante aconteceram em meio básico (pH 11,0), chegando a uma média de eficiência de degradação de 96,4%. Enquanto que em meio ácido (pH 2,0), a média foi de 75,3%.

2.4. Testes ecotoxicológicos

Foram realizados dois testes de toxicidade aguda com (i) *Daphnia similis* e (ii) *Lactuca sativa*, a fim de observar um possível comportamento tóxico dos produtos de degradação da ozonização do brometo de etídio.

2.4.1. Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis*

Os testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis* foram inicialmente realizados com amostras do tampão universal a fim de observar se os organismos apresentavam sensibilidade à sua composição. Este teste é qualitativo, ou seja, apenas para classificar a amostra como tóxica (ou não), através da observação da mortalidade ou ausência da mobilidade dos organismos-teste.

Após a exposição dos organismos ao tampão universal (sem diluição) por 48 h, foi observada a morte de todos os microcrustáceos, indicando a toxicidade da amostra.

Foram ainda realizados testes com diluição do tampão universal a 75%, 50%, 25% e 10% e também com os componentes individuais do tampão (Na_2CO_3 , Na_2HPO_4 , H_3BO_3 e NaCl) a fim de encontrar uma faixa em que não apresentasse toxicidade. Os testes indicaram toxicidade a todos os componentes do tampão, exceto para o ácido bórico com diluição a 10% (Tabela 8).

É relatado que a espécie *Daphnia magna* (foi utilizado *D. similis* nos experimentos), apresenta sensibilidade para concentrações de NaCl acima de $0,286 \text{ g L}^{-1}$ (5 mmol L^{-1}) e para o H_3BO_3 , concentrações acima de $0,133 \text{ g L}^{-1}$ (JMGS, 2012). Nas condições experimentais tais concentrações foram cerca de 20 vezes maior no caso do NaCl e 4 vezes no H_3BO_3 .

Para viabilizar a aplicação do teste com microcrustáceos, foram feitas novas ozonizações, sem a presença do tampão, em duas condições que apresentaram os melhores resultados de degradação, uma em meio ácido (pH 2,0) e outra em meio básico (pH 11,0). A retirada do tampão não influenciou a eficiência de degradação do brometo de etídio nos valores de pH escolhidos.

Foram então realizados testes com (i) brometo de etídio (sem diluição e outra diluída 20 vezes (5% da solução original)), a fim de avaliar se o composto é tóxico na concentração inicial e na concentração estimada após a ozonização; (ii) solução ozonizada A (pH 2,0) e (iii) solução ozonizada B (pH 11,0). O teste apresentou como resultado que todas as amostras avaliadas foram tóxicas (Tabela 8).

Tabela 8: Resultados qualitativos do teste de toxicidade aguda com *D. similis* para amostras da composição do tampão universal, do brometo de etídio e dos produtos de degradação para diluições sucessivas, a partir da solução original.

Amostra	Sem diluição	Diluições				
		75%	50%	25%	10%	5%
Tampão universal	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	*
Na₂CO₃	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	*
Na₂HPO₄	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	*
H₃BO₃	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Não tóxico	*
NaCl	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	*
EtBr	Tóxico	*	*	*	*	Tóxico
Solução ozonizada A	Tóxico	*	*	*	*	*
Solução ozonizada B	Tóxico	*	*	*	*	*

* condições não aplicadas ao teste.

2.4.2. Teste de toxicidade aguda com semente de *Lactuca sativa*

O teste com semente de alface (*Lactuca sativa*) foi realizado com as mesmas amostras do teste agudo com *Daphnia similis*. A diferença entre os testes é a possibilidade de acompanhar os níveis de toxicidade das amostras através do comprimento da raiz e da taxa de germinação, ou seja, os resultados são quantitativos.

O primeiro teste foi realizado com o tampão universal, colocando as sementes de alface em contato com a amostra por 120 h. Como resultado, a presença do tampão causou uma inibição completa da germinação das sementes (Figura 24) confirmando a toxicidade da sua composição. Essa toxidez pode estar associada à uma pressão osmótica elevada devido à concentração do tampão.

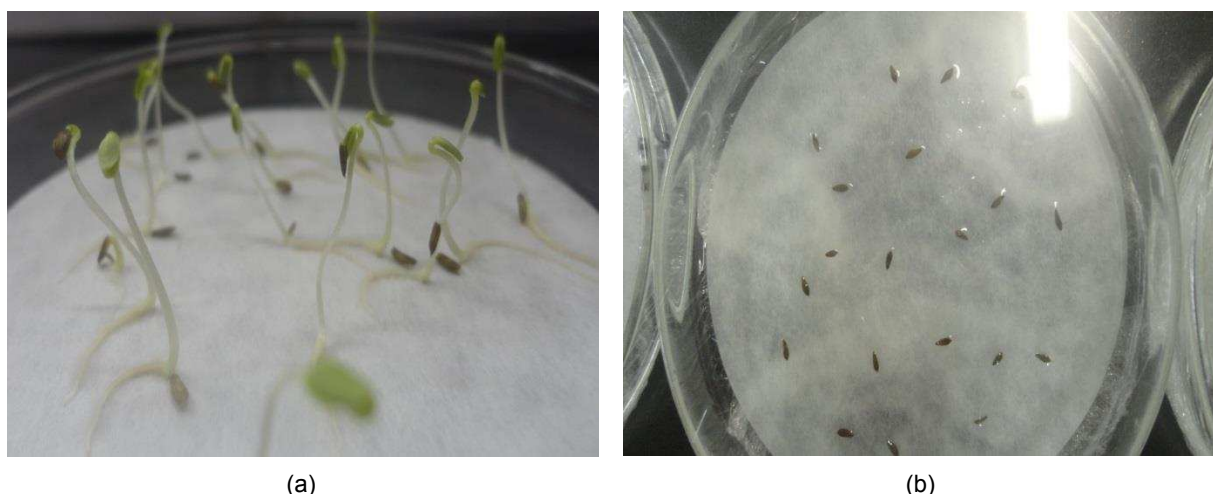


Figura 24: Resultado do teste agudo com semente de alface (a) controle negativo (b) inibição da germinação das sementes.

Os testes subsequentes foram então realizados sem a presença de tampão.

A embalagem das sementes adquiridas comercialmente indicou um percentual de germinação acima de 80%. Desse modo, o branco pode ser validado por apresentar um percentual de germinação acima do mínimo indicado (Tabela 9).

As amostras dos produtos da ozonização A e B (pH 2,0 e 11,0, respectivamente) apresentaram menor percentual de germinação do que o branco, como mostrado na Tabela 9.

Tabela 9: Taxa de germinação das sementes de alface após exposição aos produtos de degradação em pH 2,0 (A) e em pH 11,0 (B) por 120 h.

Amostra	Sementes Germinadas	% Germinação
Branco	35	87,5
Prod. Ozonização A	28	70,0
Prod. Ozonização B	31	77,5

Foi realizada uma análise de variância (ANOVA), mostrando não haver diferença significativa entre os níveis de germinação (p-valor igual a 0,2178) com

auxílio do software Action®. Ou seja, os produtos de degradação *A* e *B* não apresentaram significativa inibição da germinação das sementes.

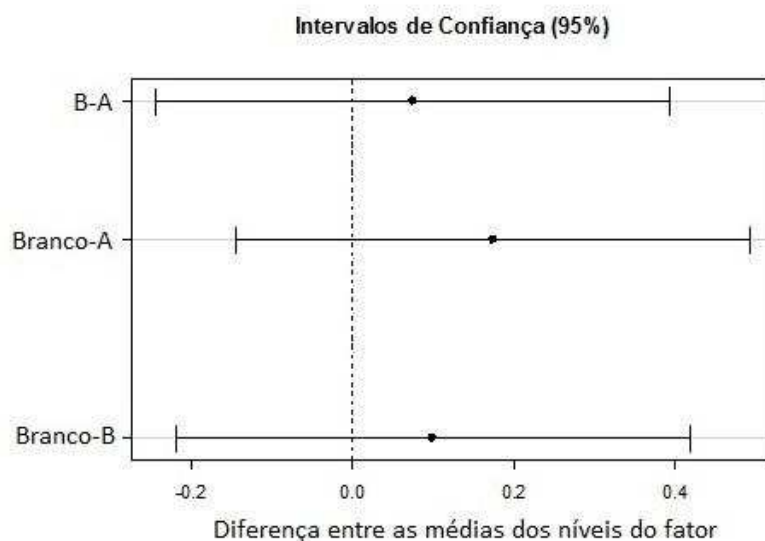


Figura 25: Intervalos de confiança da ANOVA para o percentual de germinação do branco, do produto de degradação *A* e produto de degradação *B*.

O comprimento da raiz das sementes de alface foi medido e os dados foram avaliados pelo mesmo teste estatístico a fim de observar se ocorreriam variações significativas no crescimento para diferentes condições de ozonização.

Para o teste realizado com branco de água destilada, o crescimento médio da raiz foi de 12,4 mm, enquanto que para os produtos de degradação *A* e *B* foi de 6,9 mm e 10,3 mm, respectivamente (Figura 26).

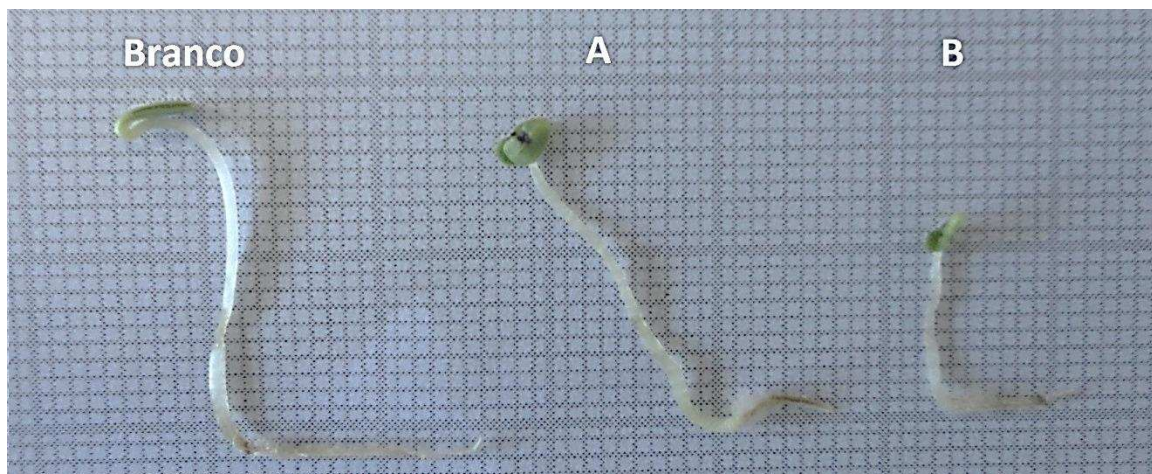


Figura 26: Comparação do comprimento da raiz de semente de alface exposta à água destilada, ao produto de degradação A e ao produto de degradação B.

Os dados do comprimento da raiz apresentaram diferença significativa (ANOVA, p valor igual a $7,23 \times 10^{-12}$), ou seja, as diferentes condições de pH durante a ozonização resultam em produtos de degradação com toxicidade significativamente diferentes, e diferentes do controle. O teste *post hoc* de Tukey mostrou que ambos os produtos de degradação apresentam toxicidade significativamente maior que o controle negativo, no entanto, o produto de degradação em meio ácido (produto A) é mais tóxico para o comprimento da raiz do que o produto de degradação em meio básico (produto B), apresentando uma variação no crescimento da raiz 44,4% menor em relação ao controle negativo.

O Teste de Tukey é um teste exato em que, para a família de todas as comparações duas a duas, a taxa de erro da família dos testes é exatamente α (no caso, $\alpha = 0,05$). O teste utiliza a amplitude da distribuição studentizada e tem como hipótese nula a igualdade entre os níveis.

O comportamento observado no comprimento das raízes pode indicar a influência do mecanismo de degradação da molécula orgânica pelo ozônio na formação de produtos de degradação diferentes, uma vez que os mecanismos de atuação do oxidante é função do pH do meio.

Assim, não foi obtida uma condição experimental onde seja possível degradar o brometo de etídio a espécies não-tóxicas pela ação do ozônio em solução na ausência de catalisadores.

Optou-se, então, ao estudo da influência de catalisadores heterogêneos sobre a eficiência de degradação e a toxicidade dos produtos de degradação na ozonização do brometo de etídio.

CAPÍTULO 3: OZONIZAÇÃO CATALÍTICA DO BROMETO DE ETÍDIO EM SOLUÇÃO AQUOSA

Como alternativa para a obtenção de produtos de degradação não-tóxicos da degradação do brometo de etídio, foram realizados experimentos de ozonização catalítica heterogênea com alguns sólidos metálicos que apresentam atividade catalítica na degradação de outros compostos, como o óxido de zinco (ZnO) e o óxido de alumínio (Al₂O₃); além da resina macroporosa não-iônica XAD-7 Amberlite, que permite a adsorção do EtBr na sua superfície.

1. Procedimento experimental

O procedimento realizado foi similar àquele descrito no Capítulo 2.

Foi preparado 250 mL de solução aquosa de brometo de etídio (1,27 $\mu\text{mol L}^{-1}$) a partir da diluição da solução estoque, sem a presença de tampão. Foram adicionados em cada experimento os catalisadores heterogêneos ZnO (Synth), Al₂O₃ (Synth) e XAD-7 (Sigma-Aldrich) à solução do corante em duas dosagens: 0,1 e 0,5 g L⁻¹, com agitação magnética constante para manter os sólidos em suspensão.

1.1. Planejamento experimental

Os experimentos de ozonização catalítica foram realizados a partir de um planejamento univariado baseado nos resultados de otimização da Matriz de Doehlert para a eficiência de degradação, em que apenas a variação do pH apresentou influência significativa na degradação durante o tempo de ozonização avaliado.

O pH foi variado em três níveis: 2, 7 e 11, enquanto que a temperatura foi mantida constante à 25 °C e a concentração de ozônio a em 2,0 mg L⁻¹. Os experimentos foram realizados em duplicata.

1.2. Monitoramento dos produtos de degradação

Foram retiradas alíquotas de 3,0 mL inicialmente a cada minuto (até o tempo de cinco min), seguida posteriormente por coletas a cada cinco min (até o tempo de 30 min), com o auxílio de uma seringa acoplada ao reator. As amostras retiradas foram centrifugadas a 2000 rpm (Centrífuga Excelsa II, modelo 206MP, FANEM) por cinco min e a absorbância da solução sobrenadante foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 295 nm.

2. Resultados e Discussão

A solução de brometo de etídio foi preparada sem a presença de tampão devido a toxicidade da sua composição, observada durante a realização dos testes ecotoxicológicos (Cap.2). O pH do meio foi ajustado após a adição do catalisador na solução aquosa, uma vez que a ausência de tampão facilita a alteração do pH do sistema.

Foram realizados testes de adsorção do brometo de etídio sobre a superfície dos catalisadores em cada situação experimental, mantendo-se a mistura em agitação constante por 30 min. Foram coletadas amostras antes e depois da adição do catalisador à solução de EtBr, podendo-se estimar a adsorção do catalisador pela comparação dos resultados de absorbância antes e após sua adição. O brometo de etídio apresentou adsorção somente sobre a superfície da resina XAD-7. Para fins de cálculos da eficiência de degradação, não foi considerada a concentração de EtBr adsorvida sobre a superfície da resina. Essa aproximação foi razoável uma vez que, ao final da ozonização, a resina inicialmente de cor avermelhada devido à adsorção do brometo de etídio, ficou novamente branca ao final da ozonização.

2.1. Estudo da eficiência de degradação via ozonização catalítica

A influência de catalisadores na eficiência de degradação do corante via ozonização catalítica heterogênea foi avaliada a partir de um planejamento univariado. A eficiência de degradação obtida em diferentes valores de pH e diferentes sólidos na dosagem de $0,1 \text{ g L}^{-1}$ podem ser observados nas Figura 27.

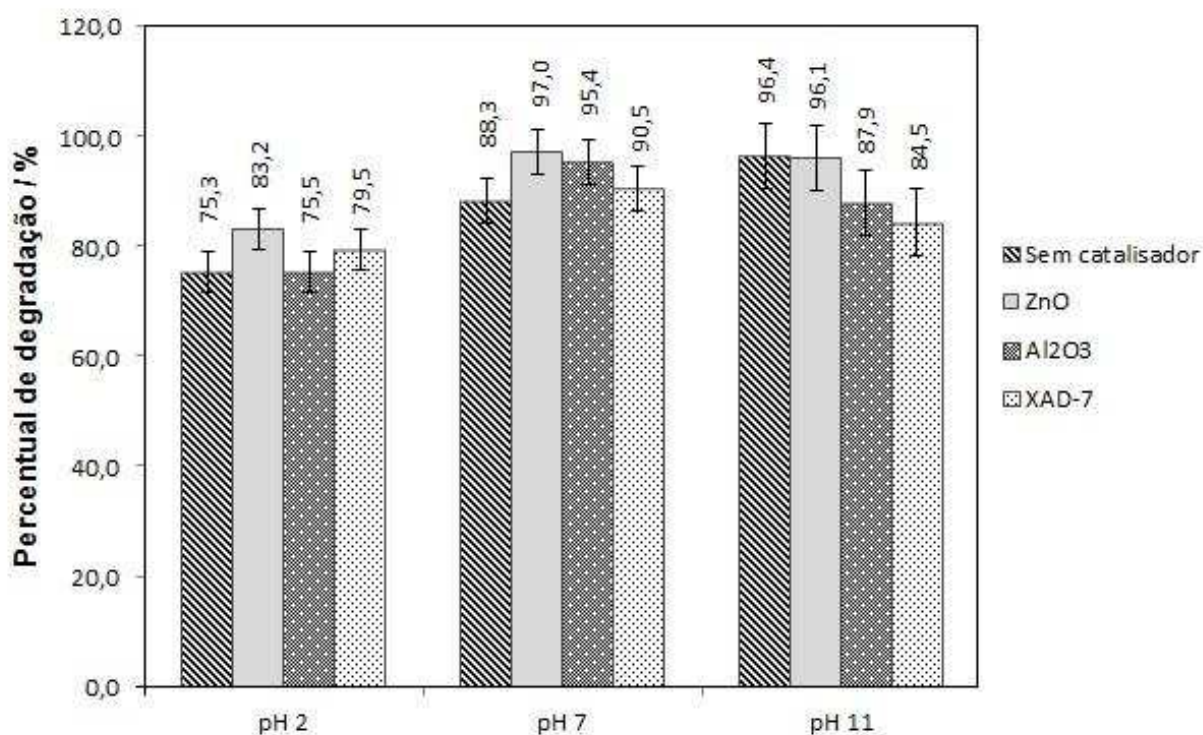


Figura 27: Eficiência de degradação do brometo de etídio na presença e ausência de catalisador com dosagem de $0,1 \text{ g L}^{-1}$, variando o pH do sistema. Temperatura igual a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e concentração de ozônio igual $2,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Para os experimentos com dosagem de sólidos igual a $0,5 \text{ g L}^{-1}$, as eficiências de degradação são apresentadas na Figura 28.

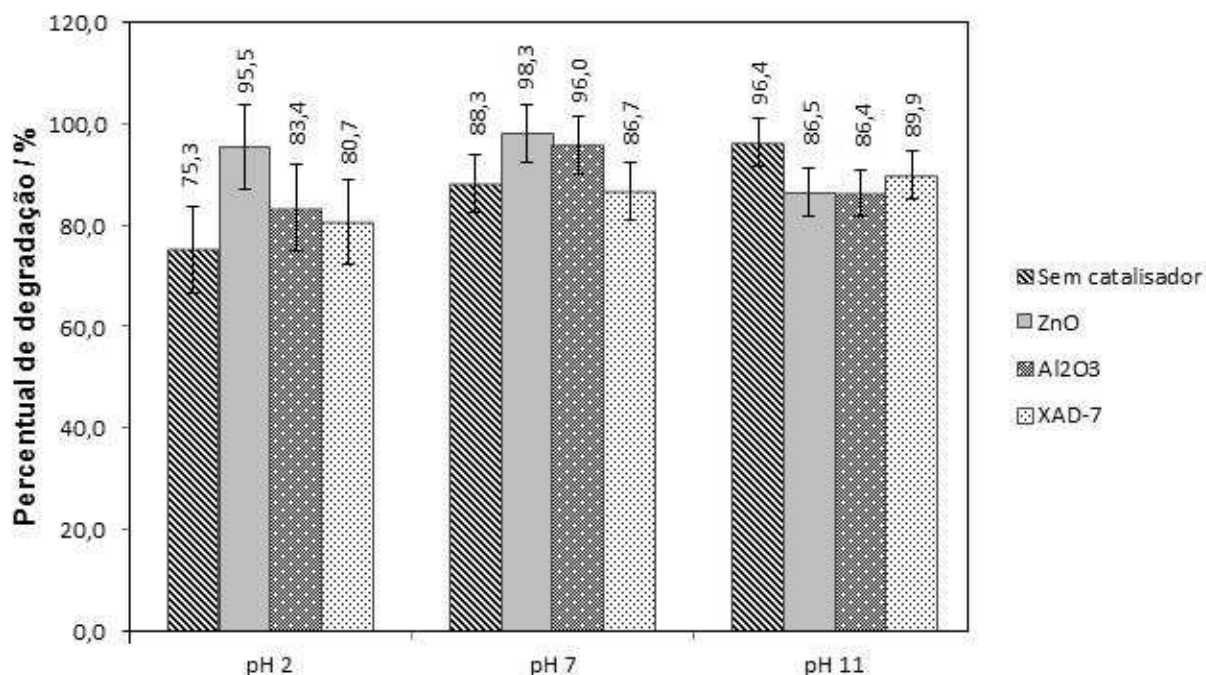


Figura 28: Eficiência de degradação do brometo de etídio na presença e ausência de catalisador com dosagem de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, variando o pH do sistema. Temperatura igual a 25°C e concentração de ozônio igual $2,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Foi realizada ANOVA com dois critérios e com teste *post hoc* de Tukey para as condições estudadas a fim de avaliar se as diferenças observadas nos percentuais de degradação são significativas estatisticamente. O teste foi aplicado para cada condição do planejamento univariado.

Em meio ácido, para os ensaios realizados em baixa dosagem dos catalisadores ($0,1 \text{ g L}^{-1}$), o pH não influenciou significativamente o percentual de degradação do composto, de modo que os resultados obtidos ao final do processo na presença do ZnO, Al₂O₃ e XAD-7, são estatisticamente iguais ao resultado sem a presença dos catalisadores.

No entanto, na dosagem mais alta ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), a presença do ZnO melhorou efetivamente a eficiência da degradação do brometo de etídio em meio ácido, obtendo um resultado de percentual de degradação de 95,5%, aumentando em 26,8% quando comparado à ausência do catalisador (Figura 29).

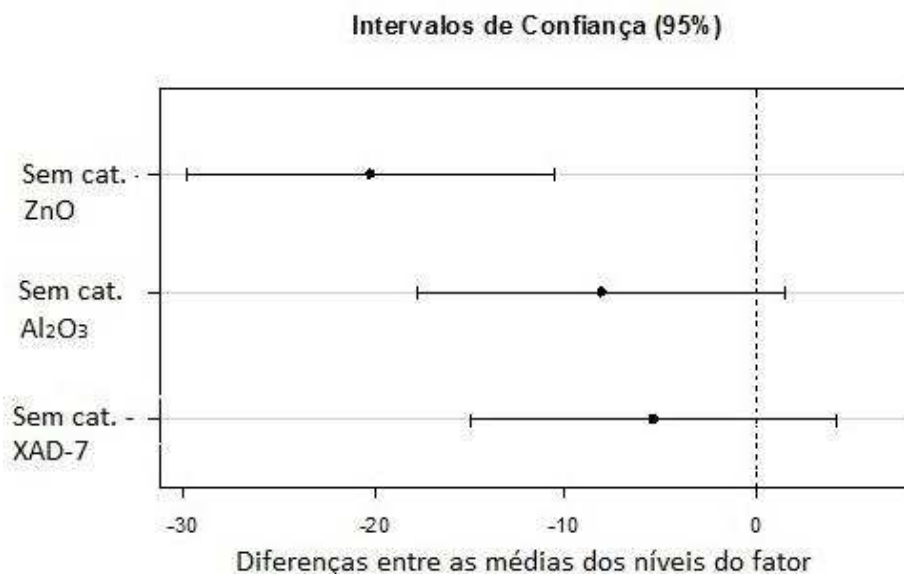


Figura 29: Intervalo de confiança do Teste *post hoc* de Tukey a 95% para o percentual de degradação do brometo de etídio via ozonização catalítica heterogênea com dosagem dos catalisadores a $0,5 \text{ g L}^{-1}$ e pH 2,0.

Em meio neutro e em meio básico, a presença dos catalisadores não apresentou diferença significativa em relação à eficiência da degradação, independentemente das dosagens utilizadas nos experimentos, ou seja, não foi observada atividade catalítica dos catalisadores estudados, uma vez que não se observou melhora significativa da eficiência de degradação quando comparado ao processo de ozonização sem catálise (Tabela 10).

Tabela 10: Condições de atividade catalítica observadas para os catalisadores ZnO e Al_2O_3 e resina XAD-7.

Catalisador	Atividade Catalítica	pH	Dosagem (g L^{-1})
ZnO	Sim	2,0	0,5
Al_2O_3	Não	Nenhum	Nenhuma
XAD-7	Não	Nenhum	Nenhuma

Dessa forma, foi possível aumentar a eficiência de degradação do brometo de etídio em meios com baixo valor de pH a partir do procedimento de ozonização

catalítica na presença de ZnO, com dosagem de $0,5 \text{ g L}^{-1}$, aproximando o resultado obtido daqueles realizados em meio básico.

A observação da atividade catalítica de alguns sólidos tem sido questionada por alguns pesquisadores (NAWROCKI; KASPRZYK-HORDERN, 2010; NAWROCKI, 2013), que atribuem muitas vezes tal característica a erros experimentais que acabam mascarando o resultado, dando a falsa impressão de que a presença do sólido promoveu a catálise de processo. Para tanto, alguns cuidados experimentais devem ser observados, como (i) o ajuste do pH do meio, que deve ser realizado após a adição do catalisador, uma vez que a adição do sólido pode influenciar o pH, alterando o comportamento da decomposição do ozônio, que é fortemente dependente dessa variável; (ii) escolha de uma dosagem adequada, pois o excesso do catalisador pode aumentar a quantidade de impurezas presentes em solução, mascarando o resultado obtido. Com base nessas observações, pode-se concluir que o ZnO apresentou atividade catalítica, melhorando significativamente a eficiência de degradação do brometo de etídio, uma vez que as observações citadas foram cuidadosamente atendidas no desenvolvimento do experimento.

Em relação ao mecanismo envolvido no processo catalítico, considera-se atualmente que, para que ocorra atividade catalítica, é necessário que ao menos um dos reagentes (ou ambos) sejam adsorvidos na superfície do catalisador. Como não foi observada a adsorção de brometo de etídio sobre o óxido de zinco ou sobre a alumina, pode-se concluir que ocorra a adsorção do ozônio, seguindo o mecanismo sugerido pela literatura (LEGUBE; LEITNER, 1999; ASSALIN; DURÁN, 2007; MAHMOUD; FREIRE, 2007; YILDIRIM et al., 2011). Entretanto, nesse mecanismo, o ozônio sofre decomposição gerando radicais hidroxila, em uma reação que ocorre em valores de pH elevado, uma vez que necessita de íons hidroxila para que ocorra. Como foi no meio ácido que ocorreu a atividade catalítica, outros radicais podem ser formados (como superóxidos) ou até mesmo a ação do próprio ozônio, por estar em uma condição estericamente favorável na superfície do sólido. Além disso, a hipótese de geração de radicais hidroxila mesmo em baixos valores de pH tem sido questionada por autores como Nawrocki (2013).

Outro mecanismo possível envolve a adsorção tanto do ozônio quanto de um produto intermediário na degradação do etídio auxiliando no processo de degradação. Nessa condição, ao se adsorver sobre a superfície do catalisador, o

composto orgânico pode manter uma conformação que seja mais suscetível ao ataque do ozônio molecular, que também pode estar adsorvido.

Devido à conhecida capacidade de adsorção do brometo de etídio sobre a superfície da XAD-7 descrita na literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2009), essa resina foi escolhida para a realização dos experimentos e avaliação da sua potencial atividade catalítica. Apesar de apresentar uma visível descoloração da superfície da resina após o processo de ozonização, seus resultados referentes à eficiência de degradação do corante não apresentaram significância estatística. Foram ainda observados os cuidados em avaliar o percentual de degradação sem considerar a quantidade de corante já adsorvido pela superfície do catalisador, o que poderia tornar o resultado do efeito catalítico controverso.

Dessa forma, apesar da resina ter a capacidade de adsorção do brometo de etídio, atuando como forma de pré-concentração do corante, esse mecanismo não garantiu um ataque mais eficiente do ozônio molecular e, conseqüentemente, a melhora na eficiência de degradação foi inexpressiva.

2.2. Testes de toxicidade

Para os ensaios de ozonização na presença de catalisadores, a toxicidade dos produtos de degradação foi avaliada no teste agudo com sementes de alface, observando o seu efeito na germinação das sementes e no comprimento da raiz. Foram estudadas amostras dos ensaios realizados na dosagem de 0,5 g L⁻¹, variando o tipo do catalisador e o pH do meio.

2.2.1. Germinação da semente de alface

Na avaliação da germinação das sementes, nenhum dos produtos de degradação estudados apresentou influência significativa para a inibição da germinação. O valor médio do percentual de germinação foi maior do que 70 (Tabela 11). Nessa avaliação, todos os ensaios se apresentaram significativamente iguais ao controle negativo.

Tabela 11: Condições experimentais e percentual de germinação de sementes de alface após exposição aos produtos de degradação do brometo de etídio via ozonização catalítica.

Código do experimento	Catalisador	pH inicial	Germinação / %
θ	Controle negativo	7,0	88,0
J	ZnO	2,0	80,0
K	ZnO	7,0	75,0
L	ZnO	11,0	80,0
M	Al ₂ O ₃	2,0	85,0
N	Al ₂ O ₃	7,0	80,0
O	Al ₂ O ₃	11,0	90,0
P	XAD-7	2,0	90,0
Q	XAD-7	7,0	90,0
R	XAD-7	11,0	85,0

2.2.2. Comprimento da raiz de alface

Para o teste que avalia o comprimento da raiz, o comprimento médio do controle negativo foi em torno de 12,4 mm. As maiores diferenças observadas foram no produto de degradação obtido a partir da ozonização com Al₂O₃ em pH 2,0, com redução no crescimento da raiz de 26,6%, e no produto de degradação a partir do XAD-7 em pH 11,0, com aumento do crescimento da raiz em 29,1% (Figura 30). A Figura 31 mostra o comparativo do comprimento da raiz após exposição a diferentes produtos de degradação. Os resultados medidos apresentaram diferenças significativas em relação ao controle negativo somente para os ensaios com Al₂O₃ em pH 2,0 e 7,0 (ensaios M e N) e XAD-7 em pH 11,0 (ensaio R).

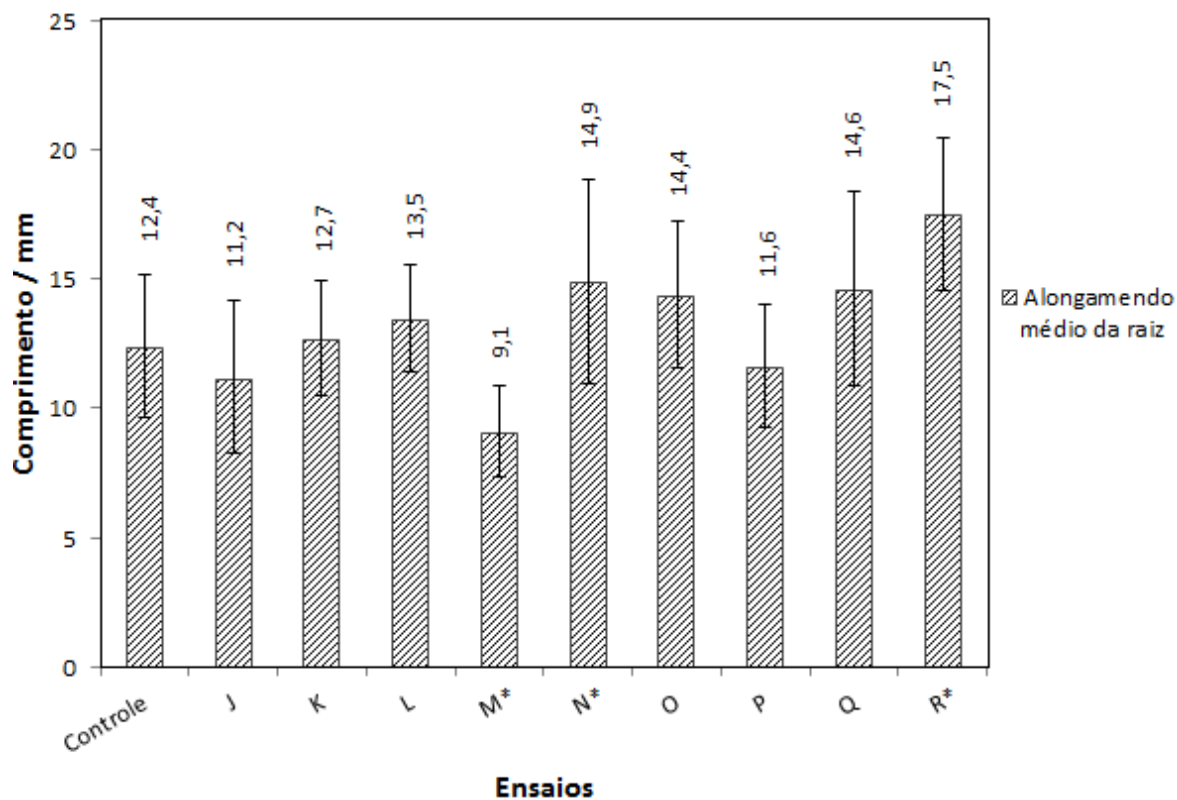
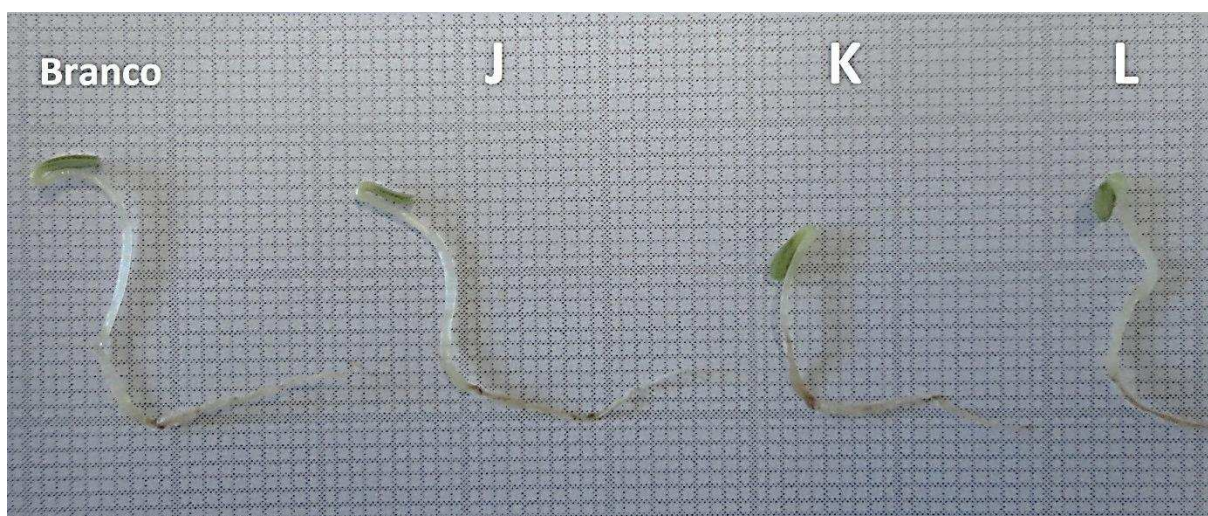
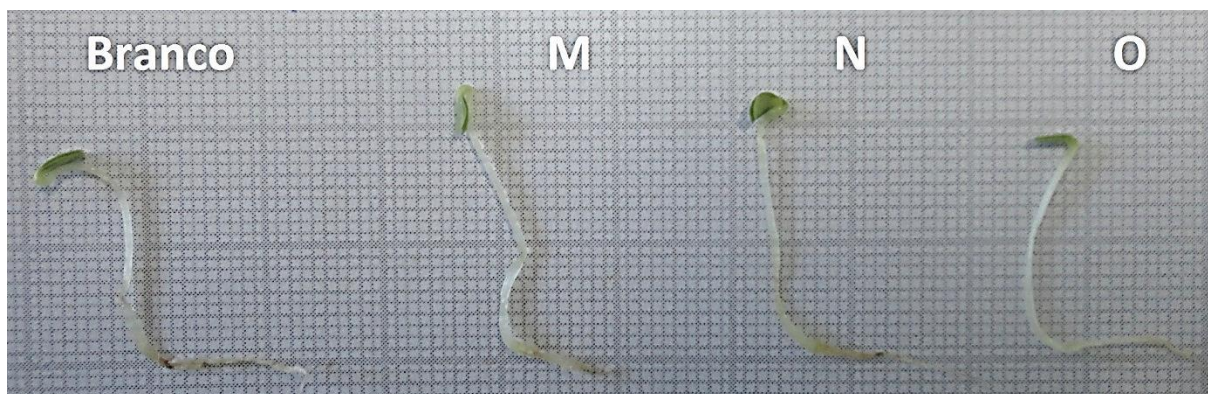


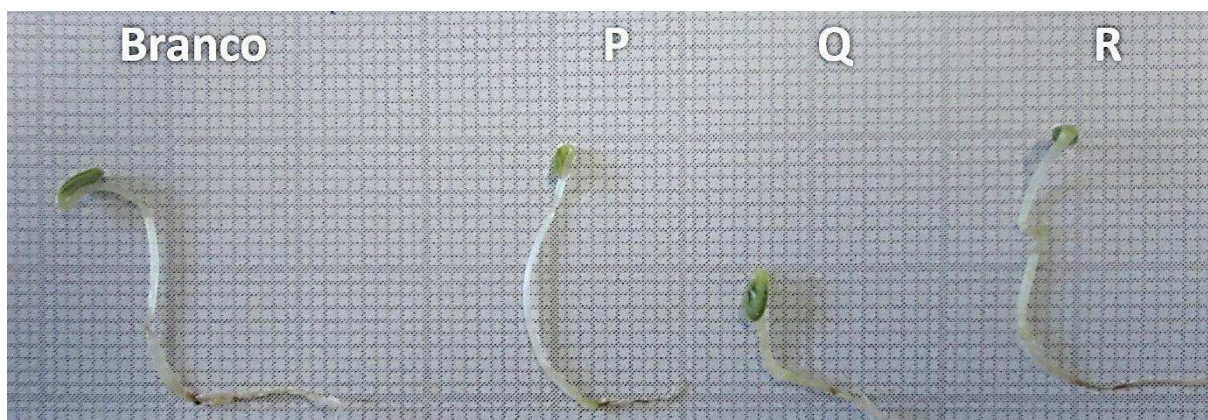
Figura 30: Comprimento médio da raiz de sementes de alfaca após exposição a diferentes produtos de degradação do brometo de etídio. (*) Ensaio que apresentaram diferença significativa segundo Teste *post hoc* de Tukey a 95%.



(a)



(b)



(c)

Figura 31: Comparação do comprimento da raiz de semente de alface exposta à água destilada (branco) e aos produtos de degradação do brometo de etídio via ozonização catalítica na presença de (a) ZnO, (b) Al₂O₃, (c) XAD-7.

Foram considerados “não tóxicos” os produtos de degradação que não apresentaram diferença significativa de taxa de germinação e comprimento da raiz quando comparados ao controle negativo (Tabela 12).

Tabela 12: Resultado da toxicidade dos produtos de degradação do brometo de etídio via ozonização catalítica heterogênea com teste agudo com sementes de alface.

Código dos experimentos	Condição experimental	pH	Toxicidade
J	ZnO	2,0	Não tóxico
K	ZnO	7,0	Não tóxico
L	ZnO	11,0	Não tóxico
M	Al ₂ O ₃	2,0	Tóxico*
N	Al ₂ O ₃	7,0	Tóxico**
O	Al ₂ O ₃	11,0	Não tóxico
P	XAD-7	2,0	Não tóxico
Q	XAD-7	7,0	Não tóxico
R	XAD-7	11,0	Tóxico**

* *crescimento da raiz menor do que o controle negativo*

** *crescimento da raiz maior do que o controle negativo*

O resultado obtido indica a ausência de toxicidade de alguns produtos de degradação no processo de ozonização catalítica, uma vez que o comprimento da raiz e a germinação não apresentaram alteração significativa.

Ao comparar os resultados de comprimento da raiz para os produtos de degradação na ausência e presença de catalisadores e nas mesmas condições de pH (para aquelas condições que não apresentaram toxicidade), observou-se aumento no comprimento médio da raiz de 39,4% em meio ácido e 26,2% em meio básico (Figura 32).

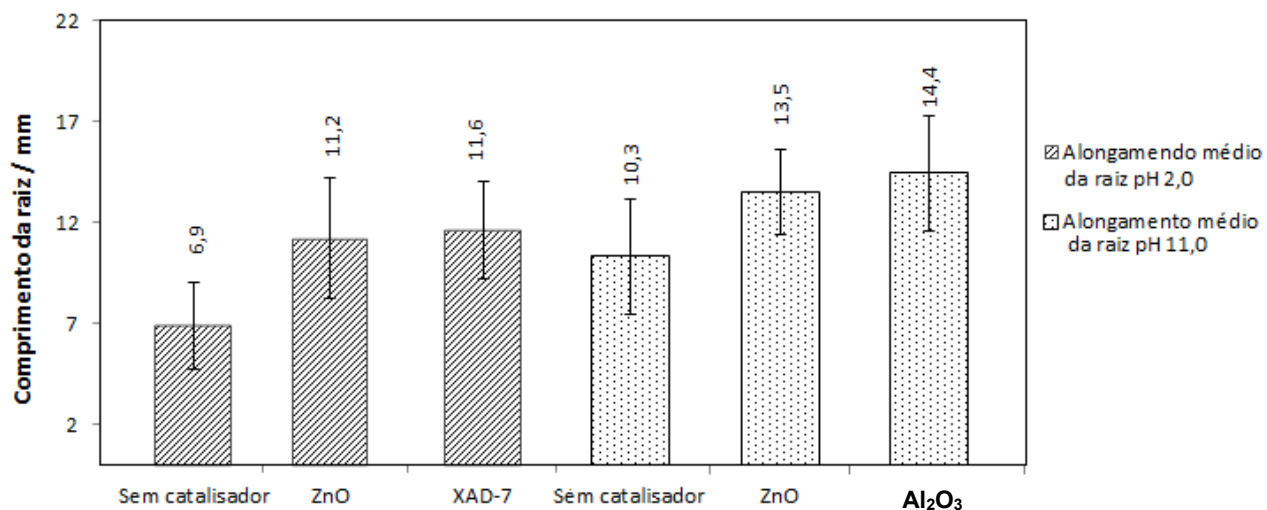


Figura 32: Comparação do comprimento médio da raiz de sementes de alface em meio ácido e meio básico, na ausência e presença de diferentes catalisadores.

Os resultados de toxicidade indicam que, além de melhorar a eficiência de degradação em meio ácido, a presença de catalisadores altera o mecanismo de atuação do ozônio e dos radicais hidroxila de tal forma que os produtos finais não são os mesmos daqueles obtidos via ozonização simples, tendo como resultado um produto de degradação não tóxico.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Algumas análises podem ser feitas para complementar os resultados e ajudar na compreensão do comportamento da degradação do brometo de etídio. Nesse sentido, a realização de análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massa permitirá a identificação e quantificação dos produtos de degradação formados em cada procedimento de ozonização, permitindo a avaliação da melhor técnica a ser utilizada.

Além disso, na ozonização catalítica faz-se necessário um estudo mais aprofundado do comportamento de adsorção dos compostos orgânicos sobre a superfície dos catalisadores, especialmente no caso da resina XAD-7 para avaliar se após a ozonização ainda permanecem moléculas do corante adsorvidas sobre a superfície. Para tanto, sugere-se o uso da técnica de reflectância difusa.

Um estudo envolvendo o DNA e a sua ligação com brometo de etídio, avaliando se o aduto formado influencia na cinética e degradação do corante.

CONCLUSÃO

A ozonização do corante brometo de etídio apresentou maiores constantes de velocidade quando realizada em meio ácido, favorecendo o mecanismo de degradação de ataque direto do ozônio sobre as duplas ligações do composto orgânico. Na determinação da constante de velocidade, são parâmetros importantes que influenciam diretamente a velocidade da reação: o pH do meio, a concentração de ozônio e a interação entre esses fatores.

Em relação à eficiência de degradação, a ozonização realizada em meio básico apresentou melhores resultados, chegando a um percentual de remoção do EtBr de aproximadamente 96%, enquanto em meio ácido o percentual médio foi de aproximadamente 75%. Ambas as condições apresentaram produtos de degradação tóxicos diante de testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis* e sementes de alface (*Lactuca sativa*).

Com a realização da ozonização catalítica, apenas o ZnO ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) apresentou atividade catalítica na condição de meio ácido aumentando a eficiência de degradação nessa condição de pH para 95,5%, se aproximando aos bons resultados obtidos em meio básico. Apesar de em outras condições não ter havido uma melhora significativa em relação à remoção do corante, os teste de toxicidade indicaram que os produtos de degradação produzidos na ozonização catalítica na presença de ZnO, Al_2O_3 (em pH 11,0) e XAD-7 (em pH 2,0 e 7,0) não foram tóxicos. Além disso, comparando os produtos de degradação em meio ácido e meio básico para as duas condições de ozonização, a ozonização catalítica eliminou a toxicidade apresentada pelos produtos da ozonização comum.

Dessa forma, deve-se ressaltar a importância da realização de testes de toxicidade para avaliar os produtos de degradação formados via ozonização, uma vez que o acompanhamento da descoloração do corante não garante a ausência da toxicidade. A ozonização catalítica se apresentou como uma boa alternativa para o aumento da eficiência de degradação em meios ácidos e também na formação de produtos de degradação seguros para descarte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia ssp* (Crustacea, Cladocera)**. 2009.

ÁDAN, C.; MARTINEZ-ARIAS, A.; FERNANDEZ-GARCÍA, M.; BAHAMONDE, A. Photocatalytic degradation of ethidium bromide over titania in aqueous solutions. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 76, p. 395–402, 2007.

ANDREOZZI, R.; CAPRIO, V.; INSOLA, A.; MAROTTA, R. Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. **Catalysis Today**, v. 53, n. 1, p. 53–59, 1999.

ARAUJO, P.; JANAGAP, S. Doehlert uniform shell designs and chromatography &. **Journal of Chromatography B**, v. 910, p. 14–21, 2012. Elsevier B.V.

ASSALIN, M. R.; DURÁN, N. Novas tendências para aplicação de ozônio no tratamento de resíduos: ozonização catalítica. **Revista Analytica**, p. 76–86, 2007.

BARLOW, P. J. **An Introduction To Ozone Generation**. 1994.

BERNARDO, L. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. 1993.

CARBAJO, J.; ADÁN, C.; REY, A.; MARTÍNEZ-ARIAS, A.; BAHAMONDE, A. Optimization of H₂O₂ use during the photocatalytic degradation of ethidium bromide with TiO₂ and iron-doped TiO₂ catalysts. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 102, n. 1-2, p. 85–93, 2011. Elsevier B.V.

CARVALHO, L. R. F.; SOUZA, S. R.; MARTINIS, B. S.; KORN, M. Monitoring of the ultrasonic irradiation effect on the extraction of airborne particulate matter by ion chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 317, p. 171–179, 1995.

CHAPMAN, P. M.; POWER, E. A.; BURTON JR, G. A. Integrated assessments in aquatic ecosystems. **Sediment Toxicity Assessment**, 1992.

CHARLES, J.; SANCEY, B.; MORIN-CRINI, N.; et al. Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 2057–2064, 2011.

CHEN, W. S.; LIN, S. Z. Destruction of nitrotoluenes in wastewater by electro-Fenton oxidation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 168, p. 1562–1568, 2009.

CHERNICHARO, C. A. L.; DANIEL, L. A.; SENS, M.; CORAUCCI FILHO, B. **Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios**. 2001.

DESTAILLATS, H.; COLUSSI, A. J.; JOSEPH, J. M.; HOFFMANN, M. R. Synergistic effects of sonolysis combined with ozonolysis for the oxidation of azobenzene and

methyl orange. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 104, n. 39, p. 8930–8935, 2000.

EIRAS, S. D. P.; COSCIONE, A. R.; ANDRADE, J. C. DE. Métodos de Otimização em Química.

FAISAL, M.; TARIQ, M. A.; MUNEER, M. Photocatalysed degradation of two selected dyes in UV-irradiated aqueous suspensions of titania. **Dyes and Pigments**, v. 72, p. 233–239, 2007.

FERREIRA, S. L. C.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; NETO, B. DE B.; BOSQUE-SENDRA, J. M. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review. **Talanta**, v. 63, p. 1061–1067, 2004.

FU, F.; WANG, Q.; TANG, B. Effective degradation of Cl Acid Red 73 by advanced Fenton process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 174, p. 17–22, 2010.

GAO, L.; ZHAI, Y.; MA, H.; WANG, B. Degradation of cationic dye methylene blue by ozonation assisted with kaolin. **Applied Clay Science**, v. 46, n. 2, p. 226–229, 2009. Elsevier B.V.

GENTRY, A. C.; JUUL, S.; VEIGAARD, C.; KNUDSEN, B. R.; OSHEROFF, N. The geometry of DNA supercoils modulates the DNA cleavage activity of human topoisomerase I. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 3, p. 1014–1022, 2011.

GILBERT, E. Influence of ozone on the photocatalytic oxidation of organic compounds. **Ozone Science & Engineering**, v. 24, p. 75–82, 2002.

GREENE, J. C.; BARTELS, C. L.; WARREN-HICKS, W. J.; et al. **Protocols For Short Term Toxicity Screening Of Hazardous Waste Sites**. .

GUIMARÃES, J. R. Processos oxidativos avançados e desinfecção. ,2012.

GUNTEN, U. VON. Ozonation of drinking water: Part I . Oxidation kinetics and product formation. **Water Research**, v. 37, p. 1443–1467, 2003.

HAMEED, B. H.; LEE, T. W. Degradation of malachite green in aqueous solution by Fenton process. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, p. 468–472, 2009.

HAMMAMI, S.; OTURAN, O.; BELLAKHAL, N.; DACHRAOUI, M.; OTURAN, M. A. Oxidative degradation of direct orange 61 by electro-Fenton process using a carbon felt electrode: application of the experimental design methodology. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 610, p. 75–84, 2007.

HENGEN, P. N. Disposal of ethidium bromide. **Tends in Biochemical Sciences**, p. 257–258, 1994.

HUSSEN, B. M. **Ethidium bromide**. .

IPEN. Instituto de Pesquisa Energética e Nuclear. .

JI, F.; LI, C.; ZHANG, J.; DENG, L. Efficient decolorization of dye pollutants with $\text{LiFe}(\text{WO}_4)_2$ as a reusable heterogeneous Fenton-like catalyst. **Desalination**, v. 269, n. 1-3, p. 284–290, 2011.

JMGS. Ficha de dados de segurança. .

KNIE, J. L.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. 2004.

KRAMER, M. J.; GRUNBERG, E. Effect of ethidium bromide against transplantable tumors in mice and rats. **Chemotherapy**, v. 19, n. 4, 1973.

KUSVURAN, E.; GULNAZ, O.; SAMIL, A.; YILDIRIM, Ö. Decolorization of malachite green, decolorization kinetics and stoichiometry of ozone-malachite green and removal of antibacterial activity with ozonation processes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 1, p. 133–143, 2011. Elsevier B.V.

LALL, R.; MUTHARASAN, R.; SHAH, Y. T.; DHURJATI, P. Decolorization of the dye, reactive blue 19, using ozonation, ultrasound, and ultrasound-enhanced ozonation. **Water Environment Research**, v. 75, n. 2, p. 171–179, 2003.

LANGLAIS, B.; RECKHOW, D. A.; BRIND, D. R. **Ozone in Water Treatment: Application and Engineering**. 1991.

LEGUBE, B.; LEITNER, N. K. V. Catalytic ozonation: a promising advanced oxidation technology for water treatment. **Catalysis Today**, v. 53, p. 61–72, 1999.

LÓPEZ, G. D.; CAMBERO, J. P. G.; CALVO, A. C. Germination of *Lactuca sativa* seeds as pre-screening in toxicology studies in higher plants. **Toxicology Letters**, p. 182, 2008.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355–381, 2008.

MAHMOUD, A.; FREIRE, R. S. Métodos emergentes para aumentar a eficiência do ozônio no tratamento de águas contaminadas. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 198–205, 2007.

MARINHO, M. R. M.; CASTRO, W. B. Planejamento Fatorial: uma ferramenta poderosa para os pesquisadores. XXXIII Congresso Brasileiro de Ensino de Engenharia. **Anais...**, 2005. Campina Grande - Paraíba - Brasil.

MARTINS, A. D.; CANALLI, C. M.; AZEVEDO, C. M. N.; PIRES, M. Degradation of pararosaniline (CI Basic Red 9 monohydrochloride) dye by ozonation and sonolysis. **Dyes and Pigments**, v. 68, n. 2-3, p. 227–234, 2006.

MARTINS, L. M. **Estudo da aplicação de processos oxidativos avançados no tratamento de efluentes têxteis visando o seu reúso**, 2011.

MASTEN, S. J.; DAVIES, S. H. R. The use of ozonation to degrade organic contaminants in wastewaters. **Environ. Sci. Technol.**, v. 28, n. 4, p. 180–185, 1994.

MCCANN, J.; AMES, B. N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 72, n. 12, p. 5135–5139, 1975.

MONTGOMERY, D. **Design and Analysis of Experiments: Response surface method and designs**. 2005.

MUNTER, R. Advanced oxidation process - current status and prospects. **Proc. Estonian Acad. Sci. Chem**, v. 50, n. 2, p. 59–80, 2001.

NAWROCKI, J. Catalytic ozonation in water: Controversies and questions . Discussion paper. “**Applied Catalysis B, Environmental**”, v. 142-143, p. 465–471, 2013. Elsevier B.V.

NAWROCKI, J.; KASPRZYK-HORDERN, B. The efficiency and mechanisms of catalytic ozonation. “**Applied Catalysis B, Environmental**”, v. 99, n. 1-2, p. 27–42, 2010. Elsevier B.V.

NETO, B. DE B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 1995.

NTP. **National Toxicology Program**. 1994.

OLIVEIRA, M. W.; HILSDORF, A. W. S.; SILVA, A. F. DE S.; OLIVEIRA, A. F. Estudo da adsorção de brometo de etídeo em resina XAD-7. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1134–1138, 2009.

OLMSTED, J. I.; KEARNS, D. R. Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acids. **Biochemistry**, v. 16, n. 3647-3654, 1977.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. **Por que otimização multivariada ?** 2005.

PERKOWSKI, J.; KOS, L. Descolouration of real textile wastewater with advanced oxidation processes. **Fibres e textiles**, v. 11, n. 4, p. 81–85, 2003.

QUILLARDET, P.; HOFNUNG, M. Ethidium bromide and safety - alternative solutions. **Trens in Genetics**, p. 89–90, 1988.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. .

RIET-CORREA, G.; FERNANDES, C. G.; PEREIRA, L. A. V.; GRAÇA, D. L. Ethidium bromide-induced demyelination of the sciatic nerve of adult Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 99–104, 2002.

ROSENFELDT, E. J.; LINDEN, K. G.; CANONICA, S.; GUNTEN, U. VON. Comparison of the efficiency of .OH radical formation during ozonation and the

advanced oxidation processes O₃/H₂O₂ and UV/H₂O₂. **Water Research**, v. 40, p. 3695–3704, 2006.

ROY, A.; BAKSHI, R.; WANG, J.; et al. The killing of african trypanosomes by ethidium bromide. **PLOS Pathogens**, v. 6, n. 12, 2010.

SABNIS, R. W. **Handbook of biological dyes and stains**. 2010.

SANCHES, S. M.; SILVA, C. H. T. P.; VIEIRA, E. M. Agentes desinfetantes alternativos para o tratamento de água. **Química Nova na Escola**, v. 17, p. 8, 2003.

SANSONE, E. B.; LUNN, G. Ethidium Bromide : Destruction and Decontamination of Solutions. **Analytical Biochemistry**, v. 162, p. 453–458, 1987.

SANTOS, M. L.; MAGALHÃES, G. C. Clivagem oxidativa de ligações duplas carbono-carbono. Álcoois alílicos: um caso particular. **Química Nova**, v. 15, n. 3, p. 211–218, 1992.

SEHESTED, K.; HOLCMAN, J.; BJERBAKKE, E.; HART, E. J. Formation of ozone in the reaction of O₃⁻ and the decay of the ozonide ion radical at pH 10–13. **Phys Chem**, v. 88, p. 269–273, 1984.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas**. p.71–79, 2004.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química orgânica**. 2013.

SONG, S.; YING, H. P.; HE, Z. Q.; CHEN, J. M. Mechanism of decolorization and degradation of CI Direct Red 23 by ozonation combined with sonolysis. **Chemosphere**, v. 66, n. 9, p. 1782–1788, 2007.

STAEHELIN, J.; HOLGNE, J. Decomposition of Ozone in Water: Rate of Initiation by Hydroxide Ions and Hydrogen Peroxide. **Environ. Sci. Technol**, v. 16, n. 040, p. 676–681, 1982.

STASINAKIS, A. S. Use of selected advanced oxidation processes (AOPs) for wastewater treatment – a mini review. **Global NEST Journal**, v. 10, n. 3, p. 376–385, 2008.

SWETHA, S.; BALAKRISHNA, R. G. Preparation and Characterization of High Activity Zirconium-Doped Anatase Titania for Solar Photocatalytic Degradation of Ethidium Bromide. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 32, n. 5, p. 789–794, 2011. Dalian Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences.

TEIXEIRA, C. P. DE A. B.; JARDIM, W. DE F. **Processos oxidativos avançados**. 2004.

VIANNA, V. B.; TÔRRES, A. R. Degradação de corantes ácidos por processos oxidativos avançados usando um reator com disco rotatório de baixa velocidade. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1353–1358, 2008.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, p. 139–145, 2004.

WANG, C.; YEDILER, A.; LIENERT, D.; WANG, Z.; KETTRUP, A. Ozonation of an azo dye C . I . Remazol Black 5 and toxicological assessment of its oxidation products. **Chemosphere**, v. 52, p. 1225–1232, 2003.

WURMB-SCHWARK, N. VON; CAVELIER, L.; CORTOPASSI, G. A. A low dose of ethidium bromide leads to an increase of total mitochondrial DNA while higher concentrations induce the mtDNA 4997 deletion in a human neuronal cell line. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 596, n. 1-2, p. 57–63, 2006.

YILDIRIM, A. Ö.; GÜL, Ş.; EREN, O.; KUŞVURAN, E. A Comparative Study of Ozonation, Homogeneous Catalytic Ozonation, and Photocatalytic Ozonation for C.I. Reactive Red 194 Azo Dye Degradation. **CLEAN - Soil, Air, Water**, v. 39, n. 8, p. 795–805, 2011.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2006.

ZHANG, C.; YANG, L.; RONG, F.; FU, D.; GU, Z. Boron-doped diamond anodic oxidation of ethidium bromide: Process optimization by response surface methodology. **Electrochimica Acta**, v. 64, p. 100–109, 2012. Elsevier Ltd.

ZHANG, H.; DUAN, L.; ZHANG, D. Decolorization of methyl orange by ozonation in combination with ultrasonic irradiation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 138, p. 53–59, 2006.

ZHANG, H.; ZHANG, J.; ZHANG, C.; LIU, F.; ZHANG, D. Ultrasonics Sonochemistry Degradation of C . I . Acid Orange 7 by the advanced Fenton process in combination with ultrasonic irradiation. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 16, n. 3, p. 325–330, 2009. Elsevier B.V.

ZHANG, J.; LEE, K.; CUI, L.; JEONG, T. Degradation of methylene blue in aqueous solution by ozone-based processes. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 15, p. 185–189, 2009.

ZHOU, X.; GUO, W.; YANG, S.; ZHENG, H.; REN, N. Ultrasonic-assisted ozone oxidation process of triphenylmethane dye degradation: Evidence for the promotion effects of ultrasonic on malachite green decolorization and degradation mechanism. **Bioresource Technology**, p. 10–13, 2012. Elsevier Ltd.