

Determinação de Compostos Prioritários em Efluentes

Relatório de Estágio

PRODEP

Alquímica – Indústria Química Lda.

Maria Helena Paiva Clare Neves

Julho de 2001

66(047.3)
LEQ 2000
NEVm



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Social Europeu

prodep III

Mais Educação

Determinação de Compostos Prioritários em Efluentes

Relatório de Estágio

PRODEP

Alquímica – Indústria Química Lda.

Maria Helena Paiva Clare Neves

Julho de 2001



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Social Europeu



Mais Educação

CG (047.3) / LEQ 2000 / NEVm

Universidade do Porto Faculdade de Engenharia Biblioteca
Nº 88318
CDU
Data 16 / 4 / 2007

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora da FEUP, Prof. Dra. Lúcia Santos pelo acompanhamento científico e amizade demonstrada no decorrer deste estágio.

À supervisora da empresa Alquímica - Química Industrial Lda., Eng^a. Maria João Archer pelo apoio no decorrer do estágio.

À Prof. Dra. Olga Nunes pelo acompanhamento prestado nas experiências de microbiologia e ao Prof. Dr. Luís Madeira pelo acompanhamento prestado nas experiências com o reagente de Fenton.

Ao colega Eng. António Ribeiro pelo apoio prestado no procedimento analítico.

Resumo

O trabalho realizado no âmbito deste estágio teve como objectivo o estudo de métodos de remediação de compostos prioritários em efluentes, mais especificamente os clorofenóis. Os clorofenóis estudados foram o 2-clorofenol e o 2,4-clorofenol. Estes foram escolhidos por apresentarem uma toxicidade mais baixa em relação aos triclorofenóis, tetraclorofenóis e pentaclorofenol.

O processo de biorremediação poderá ser uma alternativa atractiva no tratamento de solos e efluentes líquidos contaminados. Esta poderá envolver a bioestimulação de microorganismos endógenos presentes em solos contaminados ou lamas municipais. A partir do enriquecimento de alguns destes meios poderão ser isolados consórcios ou estirpes de bactérias capazes de degradar clorofenóis.

A biorremediação tem como principais vantagens ser uma técnica económica e de fácil implementação em relação a outros métodos de remediação não biológicos. Porém, este método apresenta algumas desvantagens. O desenvolvimento de bactérias depende de muitos factores externos: nutrientes presentes no meio, concentração dos poluentes no meio, pH e temperatura, entre outros.

Para concentrações de clorofenóis muito elevadas os métodos biológicos são pouco eficientes. De igual modo, descargas esporádicas de clorofenóis no meio poderão afectar negativamente a quantidade de bactérias sobreviventes.

Outro processo de remediação alternativo é a oxidação avançada com reagente de Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$). Este baseia-se na formação de radicais hidroxilo, OH^\bullet , altamente oxidantes e capazes de reagir com quase todos os substractos orgânicos. Alguns estudos tem sido realizados aplicando este processo à degradação de clorofenóis apresentando resultados satisfatórios. Porém, a aplicação deste processo a efluentes reais é mais dispendiosa, embora mais eficiente, que a biorremediação. Uma solução para este problema poderá passar pela articulação destes dois processos.

A biorremediação foi testada no tratamento do 2-clorofenol e 2,4-clorofenol e a oxidação com reagente de Fenton testada no tratamento de 2-clorofenol

De modo a proceder à biorremediação destes compostos foi feito um enriquecimento utilizando como inóculo amostras de lixiviado da lixeira e de aterro sanitário. Em ambos os casos o crescimento das bactérias foi nulo. Este resultado poderá ser justificado pela toxicidade dos compostos em estudo ou pela inexistência de bactérias capazes de degradar clorofenóis nestes meios.

Os ensaios realizados para o tratamento do 2-clorofenol com o reagente de Fenton foram feitos num reactor *batch* com camisa de arrefecimento. Ao longo de cada experiência foram seguidos os seguintes parâmetros: temperatura da reacção, potencial de oxidação redução e pH.

Foram realizadas duas experiências com concentrações diferentes de Fe^{2+} e H_2O_2 . Na primeira experiência as concentrações iniciais de Fe^{2+} e H_2O_2 foram 6,21 mg/L e 197,3 mg/L e na segunda experiência 10,62 mg/L e 395 mg/L respectivamente.

Em ambas as experiências verificou-se um aumento acentuado do potencial de oxidação redução ,ORP, logo após o início da reacção seguido de uma diminuição também acentuada, particularmente nos primeiros 15 minutos de reacção. No final da primeira experiência este parâmetro estabilizou nos 382 mV e na segunda nos 464 mV. A temperatura manteve-se aproximadamente constante ao longo do tempo e o pH, diminuiu em ambas as experiências estabilizando num valor de cerca de 2,9.

Foram ainda retiradas amostras do reactor *batch* de modo a quantificar posteriormente a diminuição de concentração de 2-clorofenol na mistura reaccional ao longo do tempo.

De modo a pré-concentrar as amostras, contendo 2-clorofenol e 2,4-clorofenol em quantidades vestigiárias, foi utilizada a microextracção em fase sólida (SPME) para posterior determinação por GC/MS. Esta técnica não utiliza solventes e permite trabalhar com soluções em fase aquosa, condições experimentais que se aplicam ao trabalho desenvolvido.

A técnica de análise escolhida foi o GC-MS. Deste modo, poderemos avaliar não só a diminuição na concentração de um determinado clorofenol ao longo do tempo mas também identificar os diferentes intermediários resultantes da degradação deste composto.

Na pré-concentração das amostras por SPME utilizou-se o modo de imersão e uma fibra de poliacrilato. O tempo de extracção foi de 60 min, a temperatura de extracção 40°C, o pH da amostra ajustado a um valor inferior a 3 e foi adicionado sal até saturar a amostra.

Os cromatogramas obtidos por GC/MS não são apresentados neste relatório. As análises efectuadas foram poucas e a avaria do aparelho impossibilitou que fosse quantificada a diminuição de 2-clorofenol ao longo do tempo. Contudo, a análise dos restantes resultados experimentais, variação do ORP e pH ao longo do tempo, leva a acreditar que esta diminuição ocorreu.

Abreviaturas

Abreviatura	Designação
CP	clorofenol
CP's	clorofenóis
DCP	diclorofenol
EDTA	Etilenodiaminotetraacetato
EPA	Environmental Protection Agency
Fig.	Figura
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplado a um Espectómetro de massa
h	hora
min	minuto
NTA	Ácido nitrili triacético
ORP	Potencial de oxidação/redução
PCP	pentaclorofenol
ppb	partes por bilião
ppm	partes por milhão
s	segundo
SPME	Microextracção em fase sólida
TCP	triclorofenol
TeCP	tetraclorofenol
U.E.	União Europeia
UV	Ultra violeta

Índice

	página
1. Referência à empresa Alquímica – Química Industrial Lda.	7
2. Objectivos	10
3. Introdução	11
3.1 Fontes de contaminação, impacte ético social e ambiental	11
3.2 Propriedades físico-químicas dos clorofenóis	12
3.3 Limites legais	13
4. Tratamento de efluentes contaminados com clorofenóis	13
4.1 Biorremediação	13
4.2 Adsorção	14
4.3 Métodos oxidativos avançados	14
4.3.1 Métodos oxidativos avançados heterogéneos	14
4.3.2 Métodos oxidativos avançados homogéneos	15
4.4 Oxidação Electroquímica	16
4.5 Oxidação com H ₂ O Supercrítico	16
4.6 Ultra-sons	16
5. Métodos de extracção, pré-concentração e análise	18
5.1 SPME	19
5.1.1 Breve introdução	19
5.1.2 Parâmetros que influenciam a eficiência da microextracção	19
5.1.3 Aplicabilidade da técnica de SPME ao estudo realizado	21
5.2 GC-MS	22
5.2.1 Breve introdução	22
5.2.2 Aplicabilidade do processo cromatográfico GC-MS ao estudo realizado	23
6. Parte experimental	24
6.1 Enriquecimento de uma cultura de microorganismos	24
6.1.1 Clorofenóis em estudo	24
6.1.2 Preparação das soluções	24

6.1.3	Recolha das culturas de inóculo	24
6.1.4	Esterilização e cuidados de assepsia	24
6.1.5	Preparação do meio de cultura	25
6.1.6	Enriquecimento	25
6.1.6.1	Inóculo: lixiviado da lixeira	25
6.1.6.2	Inóculo: lixiviado do aterro	26
6.1.7	Preparação das amostras para análise	26
6.2	Degradação de 2-CP por adição do reagente de Fenton	27
6.2.1	Instalação experimental	27
6.2.2	Reagentes	28
6.2.3	Procedimento experimental	29
6.2.4	Equipamento para análise	30
6.2.4.1	Extracções por SPME	30
6.2.4.2	Análises por GC-MS	30
7.	Resultados e discussão	32
7.1	Experiência de enriquecimento de uma cultura de microorganismos	32
7.1.1	Inóculo do lixiviado da lixeira	32
7.1.2	Inóculo do lixiviado do aterro	32
7.2	Degradação de 2-CP a partir da adição do reagente de Fenton	34
8.	Conclusões	43
9.	Trabalho futuro	44
10.	Bibliografia	45
11.	Apêndices	48
	Apêndice A	48
	Apêndice B	50
	Apêndice C	51

1. Referência à empresa Alquímica – Química Industrial Lda.

(Adaptado de Perfil da Empresa, Julho de 2001)

ORGANIZAÇÃO E RECURSOS

Constituída em 10/07/1992 e tendo iniciado a laboração no ano de 1993, a ALQUÍMICA é uma empresa dedicada à prestação de serviços especializados nas áreas do Ambiente e da Qualidade.

A missão da ALQUÍMICA é contribuir para o aumento da competitividade das empresas portuguesas, auxiliando-as na inovação tecnológica, na melhoria da qualidade, na protecção do ambiente e no acesso à informação.

A ALQUÍMICA possui um Laboratório devidamente equipado para a realização de trabalhos analíticos e de investigação e desenvolvimento; e um Sistema Informático que inclui software de simulação e projecto de unidades industriais.

LIGAÇÕES INTERNACIONAIS

A ALQUÍMICA é representante exclusivo em Portugal da empresa italiana CTIDA, especializada no fabrico de instalações compactas e automatizadas para o tratamento de pequenos e médios caudais de águas residuais altamente contaminadas. Com um grande número de unidades instaladas em Itália e noutros países europeus, a CTIDA atingiu já um nível de excelência na qualidade dos modelos que fabrica (trata-se de uma empresa certificada pela norma ISO 9001).

A CTIDA está integrada no grupo de empresas da ENEL (equivalente à EDP em Portugal) formando a Enel.Hydro. A Enel.Hydro lider do mercado da água em Itália cobre todo o ciclo da água desde a captação, passando à aducção, potabilização, distribuição e finalmente ao tratamento de águas residuais.

DOMINIOS DE ACTIVIDADE

Vocacionados principalmente para as áreas da qualidade e ambiente, os serviços oferecidos pela ALQUÍMICA dividem-se por três grandes áreas de actividade - Análises e Estudos Laboratoriais, Consultadoria e Engenharia. O quadro seguinte apresenta um elenco dos principais tipos de serviços que a ALQUÍMICA presta em cada uma destas três áreas de actividade.

ANÁLISES E ESTUDOS LABORATORIAIS	CONSULTADORIA	ENGENHARIA
<ul style="list-style-type: none"> - Análises a Águas Potáveis, Recreativas, para Rega, de Processo e Residuais. 	<ul style="list-style-type: none"> - Estudos de Diagnóstico e Auditorias Ambientais. Estudos de Impacte Ambiental. 	<ul style="list-style-type: none"> - Projecto, Fornecimento e Montagem de Estações de Tratamento de Águas Residuais Industriais.
<ul style="list-style-type: none"> - Análises a Produtos Químicos, Cosméticos e de Higiene e Limpeza. 	<ul style="list-style-type: none"> - Consultas sobre legislação ambiental e de higiene e segurança industrial. 	<ul style="list-style-type: none"> - Projecto, Fornecimento e Montagem de Estações de Tratamento de Efluentes Gasosos.
<ul style="list-style-type: none"> - Análises a Efluentes e Resíduos Industriais. 	<ul style="list-style-type: none"> - Gestão e Controlo de Estações de Tratamento de Águas Residuais. 	<ul style="list-style-type: none"> - Projecto, Fornecimento e Montagem de Estações de Tratamento de Águas Primárias.
<ul style="list-style-type: none"> - Outras Análises e Estudos Laboratoriais mediante consulta e avaliação prévias. 	<ul style="list-style-type: none"> - Gestão dos Resíduos Industriais produzidos nas empresas, e elaboração e manutenção do Inventário Obrigatório, e do respectivo Mapa Anual de Registo para apresentação à Direcção Geral da Indústria e Energia. 	<ul style="list-style-type: none"> - Projecto, Fornecimento e Montagem de Estações de Tratamento de Águas Residuais Domésticas.
	<ul style="list-style-type: none"> - Elaboração de Fichas Técnicas e de Segurança de Produtos Químicos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Projecto, Fornecimento e Montagem de Instalações Industriais de Processo Químico, mediante consulta e avaliação prévias.
	<ul style="list-style-type: none"> - Estudos de avaliação comparativa da qualidade de produtos de grande consumo. 	

CLIENTES PREFERENCIAIS

Os destinatários principais dos serviços que a ALQUÍMICA oferece, e portanto os seus clientes preferenciais, são os seguintes:

- empresas industriais ou agrícolas que necessitem de análises químicas a produtos ou efluentes, estudos de pesquisa tecnológica de novos processos ou produtos, projectos de estações de tratamento de efluentes ou resíduos industriais, estudos de viabilidade técnico-económica de projectos ou estudos de impacto ambiental.
- empresas comerciais que necessitem de testes laboratoriais rápidos e seguros dos produtos que importam e comercializam.
- autarquias locais que necessitem, com rapidez e segurança, de análises químicas ou biológicas de águas potáveis, residuais ou recreativas, bem como de projectos de tratamento de resíduos sólidos e águas residuais.
- empresas de consultoria que, no desenvolvimento da sua actividade, necessitem de realizar ensaios laboratoriais, ou careçam de assessoria técnica em engenharia de processo, ou na avaliação técnico-económica e de impacto ambiental de projectos.
- promotores de investimentos que necessitem de estudos de viabilidade técnico-económica ou de impacte ambiental de novos projectos.

2. Objectivos

Os objectivos deste estágio foram:

1. Pesquisa bibliográfica acerca de métodos de degradação e determinação de clorofenóis.
2. Isolamento de uma estirpe ou consorcio de bactérias capazes de degradar clorofenóis a partir do enriquecimento de uma cultura presente num lixiviado de um aterro sanitário.
Avaliação da diminuição na concentração do 2-CP e 2,4-CP em solução, após tratamento biológico, pelo método de análise GC/MS.
3. Tratamento de clorofenóis com reagente de Fenton num reactor *batch*. Monitorização dos parâmetros: ORP, temperatura de reacção e pH ao longo da experiência.
Avaliação da diminuição na concentração do 2-CP através de GC/MS.

3. Introdução

O uso generalizado de organoclorados, poluentes persistentes em efluentes líquidos industriais e domésticos, tornou-se num problema ambiental grave (1). Estes podem ser encontrados em lençóis de água superficiais e subterrâneos havendo necessidade de serem removidos de modo a obter água potável.

3.1. Fontes de contaminação, impacte ético social e ambiental

Os clorofenóis são utilizados como conservantes da madeira, nomeadamente o pentaclorofenol nos EUA. Na Europa são empregues misturas de clorofenóis para este efeito. Estão ainda presentes como matéria prima no fabrico de herbicidas, insecticidas, fungicidas, retardadores de chama, diversos solventes, intermediários industriais, tintas, colas e na industria do papel (2,3,4,5). No último caso é mais frequente o uso do 2-clorofenol.

Uma vez descarregados no meio ambiente, particularmente em meios aquáticos, acumulam-se nos organismos aí presentes persistindo ao longo da cadeia alimentar.

Uma das fontes directas de contaminação é a água desinfectada com cloro. Este reage facilmente com substractos orgânicos. Este processo de tratamento é ainda utilizado em Portugal. Outra fonte de contaminação das águas resulta da presença de clorofenóis em lixiviados de aterros sanitários e lixeiras e efluentes. Estes, se não forem devidamente tratados, poderão contaminar solos e cursos de água circundantes. Devido à toxicidade, propriedades lipofílicas e recalcitrantes, os clorofenóis tem tendência a acumular-se nos tecidos gordos dos organismos aquáticos, vítimas directas da contaminação das águas, permanecendo assim ao longo da cadeia alimentar (1).

Os efeitos sanitários da presença de quantidades elevadas de clorofenóis em água para consumo humano são particularmente graves. Estes compostos aumentam a probabilidade do aparecimento do cancro, aumento de abortos espontâneos e diversas malformações congénitas graves.

Um mau uso, derrames acidentais ou deposição imprópria de clorofenóis, resulta em poluição intensiva.

3.2. Propriedades físico-químicas dos clorofenóis

Com a exceção do 2-CP, todos os clorofenóis são sólidos à temperatura ambiente. Têm odor intenso e característico. São de solubilidade moderada em água, mas muito solúveis em álcoois.

A principais propriedades físicas dos clorofenóis são apresentadas na Tabela 1:

Tabela 1 - Propriedades físicas dos clorofenóis.

	Fórmula	MM (g/mol)	p.f. (°C)	p.e. (°C)	pKa	Solubilidade em água 20 °C (g/l)
2-CP	C ₆ H ₅ ClO	128.56	8.7	174.5	8.52	28.5
3-CP	C ₆ H ₅ ClO	128.56	32.8	216	8.97	
4-CP	C ₆ H ₅ ClO	128.56	42.8	217	9.37	27.1
2,3-DCP	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	163.00	58	206	7.71	
2,4-DCP	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	163.00	45	210	7.90	4.5
2,5-DCP	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	163.00	59	210	7.51	
2,6-DCP	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	163.00	66	220	6.78	
3,4-DCP	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	163.00	65	253	8.62	
3,5-DCP	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	163.00	68	233	8.25	
2,3,5-TCP	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	197.45	62	248-249		
2,4,5-TCP	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	197.45	68	245-246	6.72	
2,4,6-TCP	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	197.45	68	246	5.99	0.8
2,3,4-TCP	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	197.45	83.5	sublima	6.97	
3,4,5-TCP	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	197.45	101	275	7.55	
2,3,6-TCP	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	197.45	101	272	5.80	
2,3,5,6-TeCP	C ₆ H ₂ Cl ₄ O	231.89	115	sublima	5.03	
2,3,4,6-TeCP	C ₆ H ₂ Cl ₄ O	231.89	69-70	164 (3 kPa)	5.22	
2,3,4,5-TeCP	C ₆ H ₂ Cl ₄ O	231.89	116.-117	sublima	5.64	
PCP	C ₆ HCl ₅ O	266.34	190	309-310	4.74	0.014

3.2. Limites legais

Devido à sua elevada toxicidade, propriedades mutagénicas e carcinogénicas, os clorofenóis são considerados poluentes prioritários tanto pela União Europeia, U.E., como pela Agência de Protecção Ambiental dos EUA, EPA. A U.E. estabeleceu um limite máximo de 2 µg/l de pentaclorofenol em águas de superfície, águas de estuário, águas costeiras e águas marítimas territoriais. (6).

Em Portugal o limite estabelecido é de 1 µg/l para águas para consumo humano. Contudo, este limite não é específico dos clorofenóis mas aplicado a “outros compostos organoclorados (sem ser pesticidas)”(7).

A EPA fixou um valor limite máximo de 1 µg/l para o pentaclorofenol presente em águas para consumo humano, águas superficiais e subterrâneas (8).

4. Tratamento de efluentes contaminados com clorofenóis

Considerando então os factos anteriormente apresentados é de importância evidente o desenvolvimento de métodos que permitam eliminar ou reduzir a quantidade destes compostos no ambiente nomeadamente em águas residuais.

4.1. Biorremediação

O processo de biorremediação poderá ser uma alternativa atractiva no tratamento de solos e efluentes líquidos contaminados. De modo a maximizar a eficiência deste método deverá ser feito um estudo caso a caso (9,10).

A biodegradação poderá envolver a bioestimulação de microorganismos endógenos presentes em solos contaminados ou lamas municipais (2,3,10,11,12). A partir do enriquecimento de alguns destes meios poderão foram isolados consórcios ou estirpes de bactérias capazes de degradar clorofenóis (11,12). Encontram-se ainda disponíveis comercialmente bactérias ou consórcios de bactérias já testados experimentalmente (9, 13).

Foram igualmente estudados os mecanismos e velocidades de degradação e ou mineralização dos clorofenóis. Os principais intermediários identificados na biodegradação do 2-,3-, e 4-clorofenol foram catecois (12,13).

A biorremediação tem como principais vantagens ser uma técnica económica e de fácil implementação em relação a outros métodos de remediação não biológicos (9). Porém, este método apresenta algumas desvantagens. O desenvolvimento de bactérias depende de muitos factores externos: nutrientes presentes no meio, concentração dos poluentes no meio, pH e

temperatura entre outros. Em climas frios e temperados as baixas temperaturas actuam como factor limitante. Uma solução para este problema poderá ser a utilização de bactérias encapsuladas (9).

Para concentrações de clorofenóis muito elevadas os métodos biológicos são pouco eficientes. Para o 2-clorofenol concentrações superiores a 200 ppm são muito tóxicas para os microorganismos responsáveis pela degradação deste composto (4). De igual modo, descargas esporádicas de clorofenóis no meio poderão afectar negativamente a quantidade de bactérias sobreviventes.

Os métodos físico-químicos são uma alternativa à biorremediação e têm como objectivos principais: modificar a estrutura do composto orgânico de forma a que este seja mais facilmente biodegradado, alterar parcialmente a estrutura do composto diminuindo a sua toxicidade e, se possível, oxidar completamente o composto a H_2O e CO_2 .

4.2. Adsorção

O processo de adsorção poderá ser igualmente utilizado na remoção de clorofenóis. Um adsorvente usualmente utilizado é o carvão activado (15). Kao et al. observaram valores para a eficiência de remoção de 2-clorofenol e 2,4-diclorofenol entre 90-100% em soluções de 1:1. Porém, apesar de eficiente, o adsorvente necessita de tratamento posterior (16).

4.3. Métodos oxidativos avançados

Outro método não biológico que se tem vindo a desenvolver nos últimos anos é o conjunto de processos designados por oxidativos avançados. Estes baseiam-se na formação de radicais hidroxilo, OH^\bullet , altamente oxidantes e capazes de reagir com quase todos os substractos orgânicos. Assim, os poluentes são transformados em compostos inofensivos como CO_2 e H_2O e num número reduzido de ácidos e sais.

Os processos oxidativos avançados podem-se dividir em duas categorias distintas: processos homogéneos e processos heterogéneos. Tanto num caso como noutro estes processos têm-se revelado eficientes na remoção de clorofenóis em efluentes (1).

4.3.1. Métodos oxidativos avançados heterogéneos

Nos processos heterogéneos são utilizados catalisadores como por exemplo dióxido de titânio, TiO_2 , (16,17,18) e óxido de zinco ZnO .

O principal problema apresentado por este método é a dificuldade em separar o catalisador da solução.

Theurich et al. observaram a mineralização completa do 4-clorofenol utilizando TiO_2 como catalisador, para as condições experimentais escolhidas. Observaram igualmente que a velocidade de

mineralização do 4-clorofenol atingia um valor mínimo para pH=9 verificando-se após este valor de pH um ligeiro aumento da velocidade de mineralização. Para pH=9 a quantidade de intermediários presentes em solução é máxima. Os principais intermediários identificados durante a degradação do 4-clorofenol foram benzoquinona e hidroquinona (17).

Li et al. estudaram igualmente o mecanismo de degradação do 4-clorofenol em presença de TiO_2 e observaram a total mineralização de 100ml de uma solução de concentração 2mM ao fim de 800min (18).

4.3.2. Métodos oxidativos avançados homogéneos

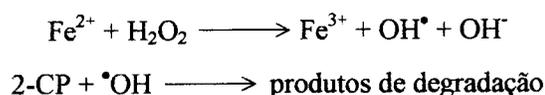
Os processos homogéneos como próprio nome indica caracterizam-se por ocorrerem numa fase única. Alguns dos exemplos mais comuns de processos de oxidação avançada do tipo homogéneo são: Ozono/UV, H_2O_2 /UV, ozono/ H_2O_2 e reagente de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$).

Dos processos homogéneos o de instalação, manutenção e compreensão mais simples é o H_2O_2 /UV. A sua desvantagem mais relevante é a vulnerabilidade a meios alcalinos e a interferentes que absorvam luz UV (1).

Boncz et al. estudaram a influência do valor de pH na velocidade de degradação do 2-CP e 4-CP aplicando o processo ozono/UV e observaram que a velocidade de degradação era mais elevada para valores de pH alto. A partir deste facto podemos concluir que a reactividade o anião clorofenolato é maior que a da molécula de clorofenol. Estes investigadores observaram ainda que o ião carbonato retirava radicais OH^\bullet da solução diminuindo assim a velocidade de degradação (14).

O mecanismo de degradação mais importante, embora dependente das condições experimentais, é segundo os mesmos autores a oxidação directa com ozono (14).

Foram igualmente feitos vários estudos para a degradação de clorofenóis com reagente de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$). Este processo baseia-se igualmente na formação de radicais hidroxilo, OH^\bullet , e na hidroxilação do sucessiva do anel aromático. De um modo simplificado, as reacções envolvidas neste processo são:



Huling et al. (19) estudaram a degradação do 2-clorofenol, adsorvido em carvão activado, por adição de reagente de Fenton e concluíram que este era degradado por este método. O produtos resultantes que predominaram da degradação deste composto foram ácido oxálico e ácido maleico.

Lin et al. (20) estudaram a influência da concentração de H_2O_2 e Fe^{2+} na eficiência de degradação do 2-CP e verificaram que as concentrações óptimas de H_2O_2 e Fe^{2+} foram 50 mg/L e

10 mg/L respectivamente. Concluíram ainda que a monitorização do potencial de oxidação redução, ORP, era eficaz na obtenção de uma estimativa da eficiência de decomposição de 2-CP em solução.

Doong et al. (21) compararam a eficiência de degradação de 2-CP, 4-CP e 2,4-DCP observada usando um método de degradação fotocatalítico (TiO_2/UV) e o reagente de Fenton e UV. Concluíram que o último processo de degradação era mais eficiente na degradação de clorofenóis que o primeiro. Os intermediários mais frequentemente identificados são hidroquinonas, quinonas e catecois.

A principal limitação à utilização dos processos oxidativos avançados é o seu custo elevado. Uma solução para este problema baseia-se numa utilização mais eficiente do oxidante, isto é, oxidando apenas poluentes muito tóxicos para o sistema biológico. Preterindo uma oxidação completa em favor de uma oxidação parcial introduzimos o conceito de selectividade (14).

4.5. Oxidação electroquímica

A oxidação electroquímica, apesar de ainda terem sido efectuados poucos estudos aplicando este método à degradação de clorofenóis, revelou ser um método eficiente na mineralização do 2-clorofenol e do 2,6-clorofenol (22). Os produtos finais resultantes da mineralização destes compostos foram CO_2 e ácidos alifáticos. O mecanismo de reacção baseia-se na reacção química entre os radicais OH^\bullet gerados a partir da oxidação da água e o clorofenol adsorvido no eléctrodo de carvão activado. O principal factor que influencia a velocidade da reacção é a intensidade de corrente afectando principalmente a concentração de intermediários provenientes da degradação dos clorofenóis.

4.6. Oxidação em H_2O supercrítico

Recorrendo ainda ao uso de um catalisador, outro método de eliminação de clorofenóis em solução é a oxidação em H_2O supercrítico. O catalisador tem como função diminuir as altas temperaturas e pressões que são necessárias para atingir as condições supercríticas. Lin et al. estudaram a oxidação supercrítica do 2-clorofenol utilizando como catalisador um zeólito. A eficiência da reacção de mineralização de 2-clorofenol foi de aproximadamente 99% (4).

4.7. Ultra-sons

A degradação do 2-, 3-, 4-clorofenol e pentaclorofenol por ultra-sons em água é apresentada num estudo de Nagata et al. (22,23). O mecanismo de degradação baseia-se na geração de radicais

OH^\bullet a partir de H_2O originando a hidroxilação sucessiva do anel aromático. A adição de reagente de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$) numa concentração de 1mM aumentou 2,4 vezes a velocidade de degradação do 3-clorofenol. Uma eficiência de degradação de clorofenóis de quase 100% foi observada numa atmosfera de Argon e de 80-90% em ar para 1h de ultra-sons.

Também foi comparada a combinação entre ultra-sons e reagente de Fenton com o emprego exclusivo de reagente de Fenton, para as mesmas condições experimentais. Deste modo o tempo de tratamento foi diminuído de 6 h para 90 min aumentando a eficiência de degradação do 2-CP de cerca de 52% para 100% (23).

O principal obstáculo para aplicação deste processo é o desenvolvimento de um reactor para o tratamento de efluentes industriais.

Uma maneira vantajosa de ultrapassar algumas das desvantagens dos métodos de degradação de clorofenóis acima apresentados poderá passar pela associação entre alguns deles. Assim, e a título de exemplo, os clorofenóis poderiam ser tratados primeiramente através de um processo oxidação avançada ou submetidos a ultra-sons, diminuindo assim a toxicidade dos clorofenóis, e posteriormente ser aplicada a biodegradação de modo a mineralizar completamente estes compostos (24,25).

5. Métodos de extracção, pré-concentração e análise

Os clorofenóis encontram-se no meio ambiente em concentrações vestigiárias na ordem dos mg/L ou até $\mu\text{g/L}$, sendo necessário por isso recorrer a um método de extracção e/ou pré-concentração para posterior análise.

Um método analítico envolve, geralmente etapas como:

- Amostragem
- Preparação da amostra (extracção e pré-concentração)
- Análise (separação, identificação e quantificação)
- Análise de resultados

Mais de 80% do tempo de análise é gasto nas etapas de preparação da amostra: extracção e concentração das espécies a analisar.

A maioria dos equipamentos analíticos não consegue lidar directamente com a amostra, especialmente se esta constituir uma matriz complexa e o pré-tratamento é muitas vezes necessário de modo a isolar o componente ou componentes que se pretende estudar. Muitas vezes durante este processo ocorrem perdas do analito afectando a reprodutibilidade e repetibilidade dos ensaios. A escolha de uma técnica de extracção torna-se por isso de importância fundamental.

Apesar dos recentes avanços feitos na área de preparação das amostras, as técnicas de extracção separação e quantificação, os métodos ainda em uso, nomeadamente os recomendados pela US-EPA, baseiam-se em técnicas tradicionais de preparação das amostras. A técnica de extracção líquido-líquido é usualmente usada na extracção de clorofenóis (26). As desvantagens mais relevantes desta técnica são o uso de grandes volumes de solvente e tempos longos de extracção.

Um passo igualmente importante na preparação da amostra é a concentração da mesma visto que muitas vezes os clorofenóis se encontram em quantidades vestigiárias inferiores aos limites de detecção do equipamento utilizado na análise. Neste caso poderão ser usadas algumas técnicas de concentração entre as quais se destaca SPME (Microextracção em fase sólida).

5.1 SPME

5.1.1 Breve introdução

A técnica de SPME foi introduzida por Janusz Pawliszyn (25) no início dos anos 90.

A técnica consiste na utilização de uma fibra de sílica fundida revestida com uma fase estacionária de modo a extrair o composto ou compostos que se pretende analisar. A fibra, contida num suporte apropriado, é introduzida num frasco com a amostra a analisar e os compostos com afinidade para a fibra adsorvem nesta. Posteriormente, no caso de uma análise cromatográfica, a fibra é introduzida no injector, a temperatura elevada e durante um certo tempo, de modo a que ocorra a dessorção dos compostos adsorvidos anteriormente e se proceda à quantificação do composto na amostra. Um esquema pormenorizado da fibra pode ser vista na figura 1.

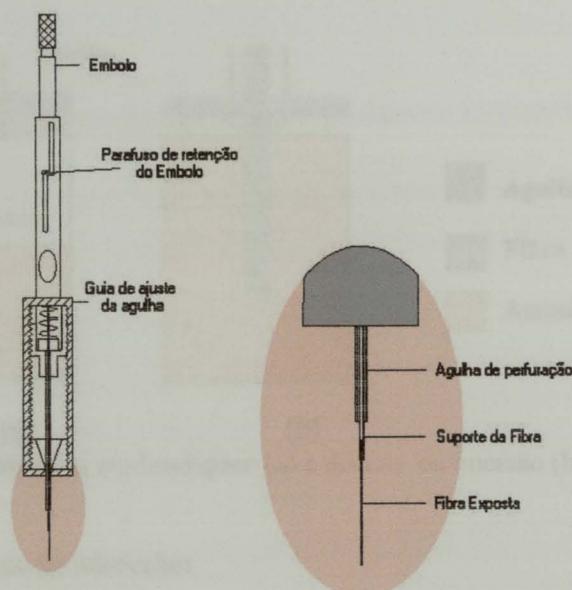


Fig.1 - Representação esquemática da seringa e da fibra utilizadas em SPME.

Fonte: (Simplicio et al, 1997).

5.1.2. Parâmetros que influenciam a eficiência da microextração

Os principais parâmetros que influenciam a eficiência de extração são:

- tipo de fibra
- forma de extração, imersão ou "headspace"
- temperatura de adsorção
- tempo de adsorção
- temperatura de dessorção
- tempo de dessorção
- adição de sal e/ou alteração do pH

- Selecção do tipo de fibra:

A fibra a utilizar deverá ser escolhida de acordo com o composto a extrair, isto é, que o composto que se pretende extrair tenha mais afinidade para a fibra e ao mesmo tempo que esta não adsorva os restantes compostos existentes na amostra.

- Modo de extracção:

A microextracção em fase sólida pode realizar-se de duas formas distintas: por extracção em fase líquida (imersão) ou por extracção em fase gasosa (Headspace), (Fig. 2). Esta selecção é baseada na pressão vapor do componente a extrair. Assim, quanto maior a pressão vapor do composto a extrair mais aconselhável será a utilização do modo Headspace. Esta técnica apresenta ainda a vantagem da fibra não entrar em contacto directo com a amostra.

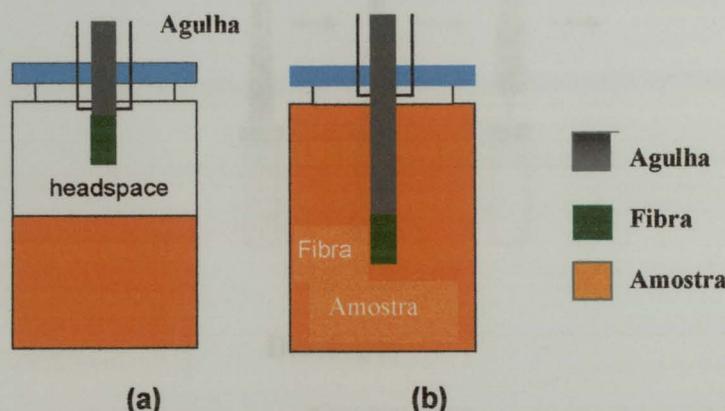


Fig. 2 - Métodos de amostragem em headspace (a) e directa ou imersão (b).

- Temperatura e tempo de adsorção:

O aumento da temperatura de adsorção possibilita o aumento da pressão vapor do composto a analisar possibilitando deste modo a sua extracção por headspace. Porém este parâmetro não deverá ser tão elevado que provoque igualmente a dessorção do composto a extrair ou até a alteração da estrutura do mesmo.

De modo a otimizar do tempo necessário de exposição da fibra deverão ser realizados ensaios de extracção dos compostos para uma gama de temperaturas compreendida, por exemplo, entre os 25 °C e 80 °C e tempos de extracção de 0 a 60 minutos. Este factor poderá ter influência na área dos picos obtida num método de análise cromatográfico.

- Temperatura e tempo de dessorção:

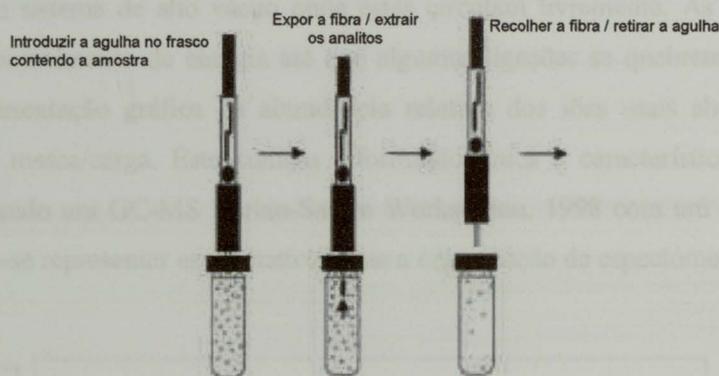
A temperatura e tempo de dessorção do composto ou compostos adsorvidos na fibra deverão ser suficientemente elevados de modo a que o analito dessorva totalmente da fibra para o injector.

- Adição de sal e/ou alteração do pH

A adição de sal e/ou alteração do pH da amostra pode aumentar a força iónica da solução diminuindo a solubilidade de certos componentes e aumentando a solubilidade de outros. No caso de diminuir a solubilidade do composto ou compostos a extrair a extracção em headspace poderá ser usada. Deverá então ser efectuado um estudo caso a caso.

Seguidamente encontra-se representado esquematicamente o procedimento de uma extracção de SPME:

Extracção



Dessorção

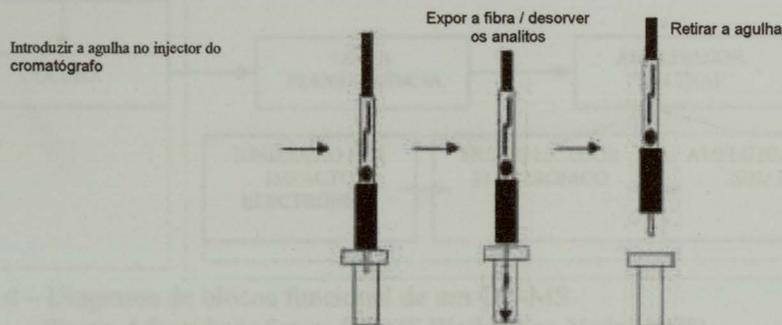


Fig. 3 - Procedimento de extracção e dessorção numa análise por SPME.

5.1.3. Aplicabilidade da técnica de SPME ao estudo realizado

A técnica de SPME permite concentrar analitos que estejam presentes em solução em concentrações na ordem dos ppb, como é o caso dos clorofenóis estudados neste trabalho.

Por ser uma técnica que não utiliza solventes permite por um lado minimizar as perdas de analito quando comparada com outras técnicas convencionais e por outro permite trabalhar com soluções em fase aquosa, condições experimentais que se aplicam ao trabalho desenvolvido.

5.2. GC-MS

5.2.1. Breve Introdução

A análise por GC-MS permite analisar os iões formados a partir de substâncias puras introduzidas num sistema de alto vácuo onde estas circulam livremente. As substâncias podem ser excitadas pelo fornecimento de energia até que algumas ligações se quebrem. O espectro de massa consiste na representação gráfica da abundância relativa dos iões mais abundantes definidos em função da razão massa/carga. Este contém informação única e característica da substância. Neste trabalho foi utilizado um GC-MS Varian-Saturn Workstation, 1998 com um detector "Ion trap". Na figura 4 pretende-se representar esquematicamente a organização de espectrómetro de massa.

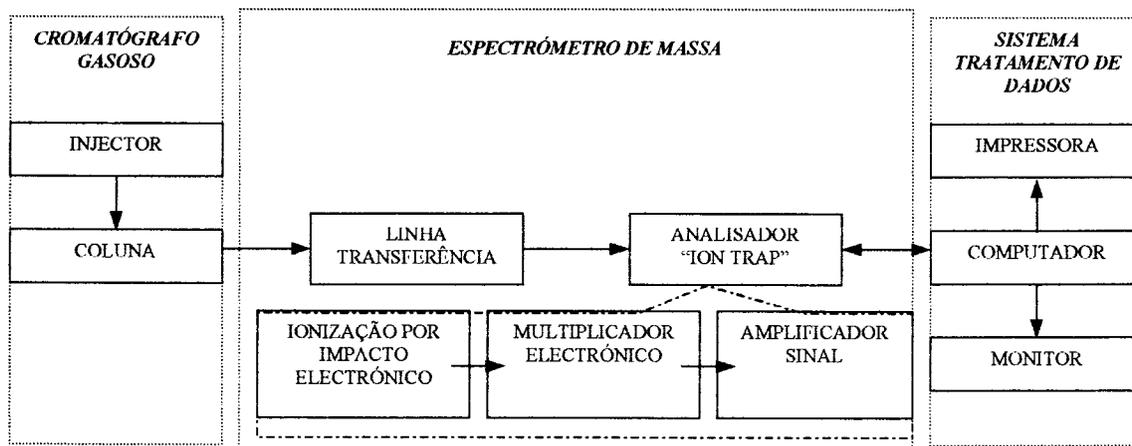


Fig 4 – Diagrama de blocos funcional de um GC-MS.

(Fonte: Adaptado de Saturn GC-MS Workstation-Varian,1998)

5.2.2. Aplicabilidade do processo cromatográfico GC-MS ao estudo realizado

O GC-MS acrescenta à capacidade de separar componentes de uma mistura, característica das técnicas cromatográficas convencionais, a capacidade um sistema de detecção capaz de gerir, para cada substância detectada, informação característica e susceptível de a distinguir de todas as outras. Deste modo, poderemos identificar, através de um programa de temperaturas apropriado, não só a diminuição na concentração de um determinado clorofenol mas também identificar os diferentes intermediários resultantes da degradação deste composto.

6. Parte experimental

6.1. Enriquecimento de uma cultura de microorganismos

Aplicando este método pretendeu-se isolar de uma estirpe ou consorcio de bactérias capaz de degradar o 2-CP e o 2,4- DCP.

6.1.1. Clorofenóis em estudo

Os clorofenóis alvo deste estudo foram o 2-clorofenol, 2-CP, e o 2,4-clorofenol, 2,4-DCP. As razões que levaram à escolha destes compostos prendem-se com razões como a toxicidade, quando comparados com tri, tetra e pentaclorofenol, e pela referencia a estes compostos na literatura. Os tri, tetra e pentaclorofenol são mais tóxicos para os microorganismos e assim a dificuldades inerentes ao isolamento de uma estirpe ou consórcio de bactérias, capazes de degradar estes compostos, são agravadas.

6.1.2. Preparação das soluções de clorofenóis

Foram preparadas duas soluções de concentração 0,4 g/l de 2-CP e 2,4-DCP em água destilada e guardadas no frigorífico. Ambas as soluções foram preparadas a partir de reagentes da Supelco.

6.1.3. Recolha das culturas de inóculo:

O inóculo foi recolhido no Aterro Sanitário de Lousada, cuja entidade responsável é a RESIN.

Foram recolhidas duas amostras líquidas, lixiviados provenientes directamente e sem qualquer tratamento prévio da lixeira e do aterro , em erlenmeyers previamente esterilizados.

Procedeu-se deste modo devido às diferenças de composição das duas soluções. A diferença mais relevante é a quantidade de matéria orgânica, que é muito superior no lixiviado do aterro.

As amostras foram transportadas a baixa temperatura numa mala térmica, contendo termoacumuladores, e guardadas no frigorífico.

6.1.4. Esterilização e cuidados de assepsia

A esterilização é uma técnica que assegura a eliminação de todos os microorganismos garantindo assim que trabalhamos unicamente com as bactérias em estudo. Um dos métodos usados foi a esterilização por calor húmido em autoclave, com uma temperatura de 221 °C e pressão de 1,2 bar durante 15 min. Este primeiro método foi utilizado na esterilização de erlenmeyers, pontas de micropipetas, meios de crescimento e outras soluções necessárias. Outro

método foi a esterilização por vapor seco em estufa, com uma temperatura de 180 °C durante 2h. Este último foi utilizado para esterilizar material de vidro, especialmente pipetas graduadas.

Trabalhou-se sempre em condições assépticas: à chama e/ou em fluxo laminar.

6.1.5. Preparação do meio de cultura

Na preparação do meio de cultura foram utilizadas uma solução de macronutrientes, micronutrientes e tampão fosfato.

As composições de cada solução necessárias à preparação do meio de cultura são apresentadas no apêndice A.

Esterilizaram-se todas as soluções por autoclavagem e armazenaram-se a - 4°C, num frigorífico.

Num frasco Schott de 1L, colocou-se a água necessária à preparação do meio e esterilizou-se por autoclavagem. Adicionaram-se 100 ml de solução de macronutrientes, 10 ml de solução de micronutrientes, 20 ml de solução tampão, 5 ml de sulfato de amónio e fez-se o volume final com água esterilizada. Os meios foram armazenados no frigorífico a - 4 °C até à sua utilização.

6.1.6. Enriquecimento

Com o objectivo de enriquecer o meio, erlenmeyers contendo 10 ml de meio foram inoculados com 1 ml de inóculo adicionando-se em intervalos de tempo pré-definidos uma determinada quantidade de 2-CP ou 2,4-DCP. Foram igualmente preparados os respectivos controlos abióticos e um erlenmeyer onde não se procedeu à adição de clorofenóis. Através deste procedimento foi possível, no caso dos controlos abióticos, e por comparação avaliar a quantidade de 2-CP ou 2,4-DCP degradado e no caso do erlenmeyer isento de clorofenol visualizar o crescimento de bactérias fitotróficas e/ou organotróficas. A composição de cada um destes erlenmeyers encontra-se descrita no Apêndice B.

6.1.6.1. Inóculo: lixiviado da lixeira

Erlenmeyers, designados por A e C (apêndice B) foram inoculados com 1 ml de lixiviado proveniente da lixeira. Ao erlenmeyer A foram adicionados de dois em dois dias 50 µl de 2-CP, de modo a que a concentração inicial no interior do erlenmeyer fosse 20 ppm. Ao erlenmeyer C foram adicionados 500 µl de 2-CP, de modo a que a concentração inicial no interior do erlenmeyer fosse 200 ppm.

Aos respectivos controlos abióticos, erlenmeyers E e G foram igualmente adicionadas 50 µl e 500 µl de 2-CP respectivamente. Estes servirão para avaliar se houve degradação do 2-CP.

Do mesmo modo, erlenmeyers designados por B e D (apêndice B) foram inoculados com 1 ml de lixiviado proveniente da lixeira. Ao erlenmeyer B foram adicionados de dois em dois dias 50 µl de 2,4-DCP, de modo a que a concentração inicial no interior do erlenmeyer fosse 20 ppm. Ao erlenmeyer D foram adicionados 500 µl de 2,4-DCP, de modo a que a concentração inicial no interior do erlenmeyer fosse 200 ppm.

Aos respectivos controlos abióticos, erlenmeyers G e H, foram igualmente adicionados 50 µl e 500 µl de 2,4-DCP respectivamente. Estes serviram para avaliar se houve degradação do 2,4-DCP.

Ao fim de uma semana procedeu-se à transferência de 1 ml da solução contida nos erlenmeyers A, B, C e D para erlenmeyers contendo meio fresco.

Durante o decorrer de toda a experiência os erlenmeyers foram mantidos a 30 °C e a 150 rpm.

6.1.6.2. Inóculo: lixiviado do aterro

O procedimento experimental assemelhou-se em tudo ao descrito na secção anterior excepto nos intervalos de adição de 2-CP e 2,4-DCP. Estes compostos foram unicamente adicionados no início e no fim da semana. Neste caso, o inóculo foi substituído por lixiviado do aterro.

6.1.7. Preparação das amostras para análise

Ao fim de uma semana foram retiradas amostras de 1ml de cada um dos erlenmeyers e guardadas em eppendorfs. Estes foram posteriormente centrifugados de modo a separar os pellets do sobrenadante. Este último foi transferido para novos eppendorfs e estes guardados no congelador para posterior análise por SPME/GC-MS.

6.2 Degradação de 2-CP a partir da adição do reagente de Fenton

Um outro método, para o qual foi feito um breve estudo, utilizado na degradação de clorofenóis, foi a adição do reagente de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$). Este pertence a um grupo dos processos denominados de oxidação avançada e que mostrou ser eficiente no tratamento de águas residuais contendo compostos de toxicidade elevada e pouco biodegradáveis.

6.2.1. Instalação experimental

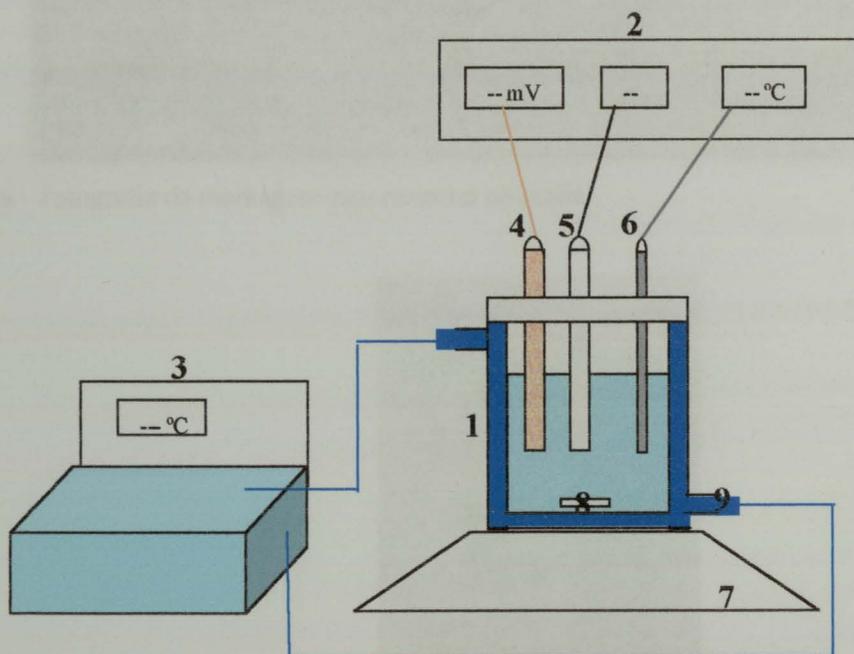


Fig. 5 - Representação esquemática da instalação experimental. 1- reactor *batch*, 2- aparelho de leitura de ORP, pH e T, 3- banho termostático, 4- electrodo de membrana para medir ORP, 5- electrodo de platina para medir pH, 6- termopar, 7- placa de agitação, 8- barra magnética.

O sistema representado era constituído por um reactor *batch* de 1 L (1), que continha a mistura reaccional (reagente de Fenton e 2-CP), provido de uma camisa de arrefecimento (9) ligada a um banho de arrefecimento (3) a 30 °C. O reactor encontrava-se sobre um agitador (7) e a agitação foi conseguida através de uma barra magnética (8) presente no interior do reactor.

Foram seguidos os seguintes parâmetros da reacção ao longo do tempo: Potencial de oxidação-redução (ORP), pH e temperatura do meio reaccional. O ORP foi medido ao longo do tempo com um electrodo de membrana Sentek, o pH com um electrodo de platina Sentek, a temperatura com um termopar.

Foram igualmente retiradas amostras ao longo do tempo com vista a seguir a diminuição na concentração de 2-CP ao longo da experiência. Várias amostras com cerca de 1 ml foram retiradas do reactor e armazenadas no congelador até serem analisadas em GC/MS.

Seguidamente é retransmitida a montagem experimental utilizada:

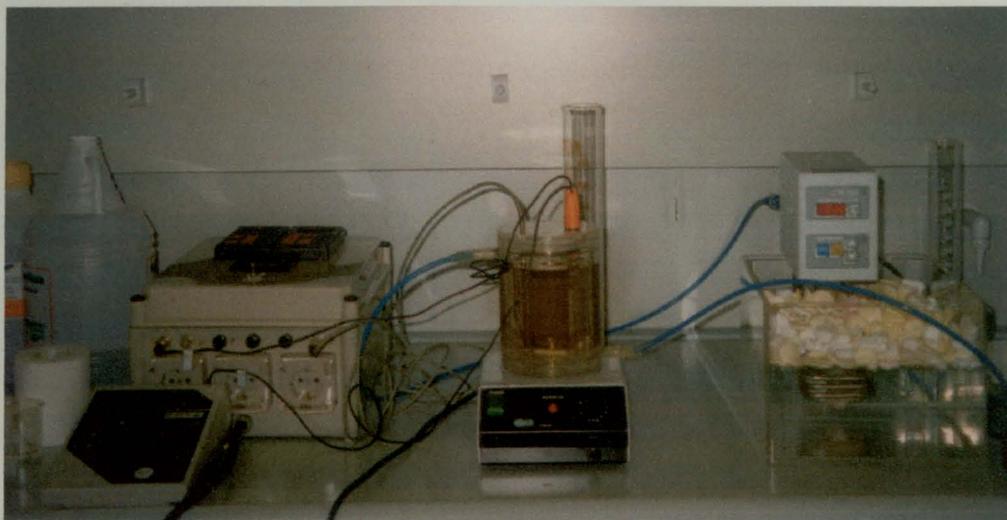


Fig. 6 - Fotografia da montagem experimental utilizada.



Fig. 7 - Fotografia do reactor *batch* utilizado.

6.2.2. Reagentes

- 2-clorofenol da Supelco (clorofenol em estudo).
- Reagente de Fenton: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p.a. (99,5%) da Merk, H_2O_2 da Drogaria Moura 35%.
- Ajuste do pH: H_2SO_4 da Pronalab p.a. (95-97%).
- Interrupção da reacção: NaSO_3 p.a. da Merk.
- H_2O destilada.

6.2.3. Procedimento experimental

Foram realizadas duas experiências sendo o único parâmetro a diferir entre elas a concentração de H_2O_2 e Fe^{2+} .

Experiência 1:

Primeiramente foi adicionado ao reactor 20 ml da solução de 2-clorofenol 4 g/L e em seguida acertou-se o pH a um valor inferior a 3, para que a solução de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a adicionar não precipitasse. Seguidamente, adicionou-se 400 ml de uma solução de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de concentração 22.74 mg/L e perpez-se com H_2O até 800 ml. De modo a iniciar a reacção adicionou-se 400 μl de H_2O_2 35%, 394,6 g/L.

Tabela 2 - Condições experimentais iniciais, experiência 1.

composto	concentração inicial no reactor
2-CP	100 mg/L
H_2O_2	197,3 mg/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	11,37 mg/L
T (°C)	30 °C
pH (inicial)	3,20

Experiência 2:

Na experiência 2 procedeu-se de igual modo à experiência 1 excepto no que diz respeito à concentração de H_2O_2 e Fe^{2+} . Assim, a concentração da solução de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ adicionada ao reactor foi de 38,88 mg/L e foram adicionados 800 μl de H_2O_2 .

Tabela 3 - Condições experimentais iniciais, experiência 2.

composto	concentração inicial no reactor
2-CP	100 mg/L
H_2O_2	395 mg/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10,62 mg/L
T (°C)	30 °C
pH (inicial)	3,16

6.2.4. Equipamento para análise

6.2.4.1. Extracções por SPME

Nas extracções utilizou-se uma fibra com um revestimento de poliacrilato com 85 μm de espessura da Supelco (PN 57304). O condicionamento da fibra foi efectuado no injector a 250 $^{\circ}\text{C}$, antes da sua primeira utilização.

Para as extracções, a fibra, colocada num suporte apropriado, foi mergulhada num vial de 4 ml com 2 ml de solução. Este frasco foi mergulhado num banho a 40 $^{\circ}\text{C}$ com agitação. A extracção foi efectuada durante 60 min.

6.2.4.2 Análises por GC-MS

Nas análises cromatográficas utilizou-se um cromatógrafo gasoso modelo 3800 da Varian acoplado a um espectómetro de massa – Saturn 2000, Ion Trap da Varian. A coluna usada na análise de clorofenóis foi uma CP Sil 8MS da Supelco de 25 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura do filme.

A temperatura do injector foi de 250 $^{\circ}\text{C}$ em posição *splitless*. Após a injeção, a fibra permaneceu no injector durante 3 min.

- Programa de temperaturas

Foi introduzido no cromatógrafo o seguinte programa de temperatura:

- Temperatura inicial (40 $^{\circ}\text{C}$), durante 4 min.
- Rampa de Temperatura a 12 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 220 $^{\circ}\text{C}$, durante 1 min.

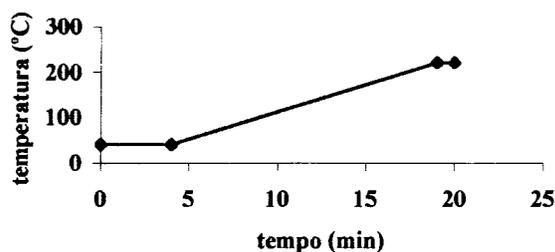


Fig. 8 - Programa de temperaturas utilizado nas análises por GC-MS.

O gás de arraste utilizado foi o Hélio com um caudal constante de 1 ml/min.

- Temperatura do Trap 160 °C.
- Temperatura da Transferline 250 °C.
- Temperatura do manifold 45 °C.

A velocidade de varrimento utilizada foi de 40 a 650 m/z sendo a corrente do filamento de emissão fixa 70 eV.

7. Resultados e discussão

7.1. Experiência de enriquecimento de uma cultura de microorganismos

7.1.1. Inóculo do lixiviado da lixeira

Ao fim de uma semana, nos erlenmeyers, designados por A e B (apêndice B) que foram inoculados com 1 ml de lixiviado proveniente da lixeira e aos quais foi adicionado 2-CP e 2,4-DCP de dois em dois dias respectivamente, não foi observado qualquer crescimento de bactérias.

Do mesmo modo e ao fim de uma semana, nos erlenmeyers designados por C e D (apêndice B) que foram inoculados com 1 ml com lixiviado proveniente da lixeira e aos quais foi adicionado no início e no fim da semana 2-CP e 2,4-DCP respectivamente, não foi observado qualquer crescimento de bactérias.

Igualmente no controlo, erlenmeyer designado por I (apêndice B) não foi observado qualquer crescimento de bactérias.

A partir destes resultados experimentais podemos concluir que os clorofenóis são compostos demasiadamente tóxicos para permitir o crescimento de bactérias ou o inóculo não continha bactérias capazes de degradar os clorofenóis em estudo.

7.1.2. Inóculo do lixiviado do aterro

Ao fim de uma semana, nos erlenmeyers, designados por A e B (apêndice B) que foram inoculados com 1 ml de lixiviado proveniente do aterro e aos quais foi adicionado 2-CP e 2,4-DCP no início e no fim da semana, foi observado crescimento de bactérias.

Do mesmo modo e ao fim de uma semana, nos erlenmeyers designados por C e D (apêndice B) que foram inoculados com 1 ml de lixiviado proveniente do aterro e aos quais foi adicionado no início e no fim da semana 2-CP e 2,4-DCP respectivamente, foi observado crescimento de bactérias.

Destes erlenmeyers foram retiradas amostras a ser analisadas por SPME/GC-MS de modo a verificar se houve alguma degradação do 2-CP e 2,4-DCP ou se as bactérias apenas toleravam a presença de clorofenóis.

Igualmente no controlo, erlenmeyer designado por I (apêndice B) foi observado crescimento de bactérias.

No fim da semana procedeu-se à transferência de 1 ml da solução contida nos erlenmeyers A, B, C e D para erlenmeyers contendo meio fresco e prepararam-se novamente os

respectivos controlos. Adicionou-se então 2- CP e 2,4-DCP procedendo-se do mesmo modo que no início da experiência.

Ao fim de duas semanas não se observou qualquer crescimento de bactérias, excepto no controlo I₁ (a letra 1 corresponde à primeira transferência) onde não foi adicionado qualquer quantidade de clorofenol. Pode-se então concluir que as bactérias que cresceram no controlo I₁ eram fitotróficas ou organotróficas.

Como no caso da experiência 1 pode-se igualmente concluir que os clorofenóis são compostos demasiadamente tóxicos para permitir o crescimento de bactérias ou o inóculo não continha bactérias capazes de degradar os clorofenóis em estudo.

7.2. Degradação de 2-CP a partir da adição do reagente de Fenton

No decorrer da reacção de degradação do 2-CP com reagente de Fenton foram monitorizados os seguintes parâmetros ao longo da reacção: potencial de oxidação redução (ORP), pH e temperatura da reacção. Foram retiradas igualmente amostras de cerca de 2 ml ao longo da reacção. Estas foram posteriormente analisadas por GC-MS.

Foram realizadas duas experiências. O único parâmetro que diferiu entre elas foi a concentração de H_2O_2 e Fe^{2+} .

Experiência 1:

Nesta experiência a concentração inicial no reactor *batch* de H_2O_2 foi de 197,3 mg/L e de Fe^{2+} 12,42 mg/L.

A temperatura foi mantida a cerca de 30 °C durante toda a experiência devido ao banho termostático.

Seguidamente são apresentados os resultados experimentais relativos à variação do ORP e pH ao longo da experiência.

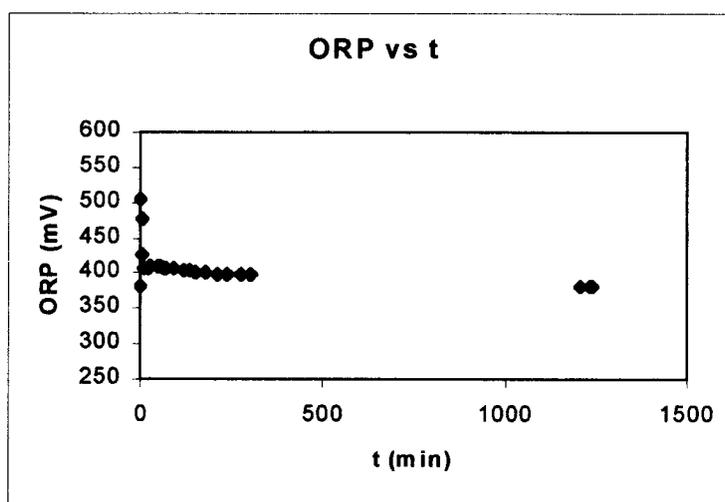


Fig. 9 a) - Variação do ORP ao longo da experiência 1.

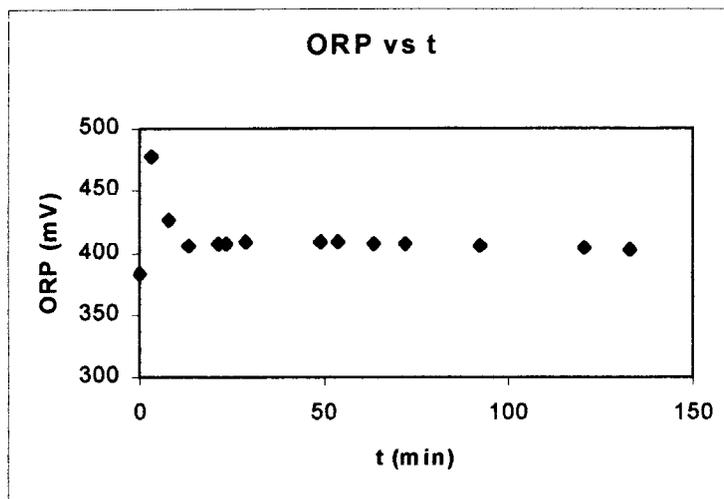


Fig. 9 b) - Variação do ORP em 100 min da experiência 1.

Primeiramente é conveniente esclarecer que o primeiro ponto representado nas figuras 9 a) e 9 b) corresponde ao ORP da solução imediatamente antes da adição da solução de peróxido de hidrogénio, isto é, o início da reacção.

A partir da observação directa das figuras 9 a) e 9 b) é obvio o aumento súbito do ORP no início da reacção e a sua variação ao longo da experiência particularmente nos primeiros 20 min, figura 9 b). No final da experiência, o valor do ORP estabilizou nos 382 mV. Estes resultados experimentais estão de acordo com os obtidos por Lin et al. (20).

Na presença de Fe^{2+} H_2O_2 o 2-CP é decomposto por hidroxilação do anel pelos radicais hidroxilo OH^\bullet . Assim, durante a reacção de decomposição do 2-CP, o ORP da solução diminui devido à diminuição na concentração de OH^\bullet em solução. A diminuição mais acentuada no valor do ORP deve ter coincidido com uma diminuição acentuada na concentração de 2-CP em solução. Tal só poderia ser confirmado nas análises efectuadas em GC-MS.

Seguidamente são apresentados os resultados relativos à variação do pH ao longo da experiência. O pH inicial da solução foi 3,20.

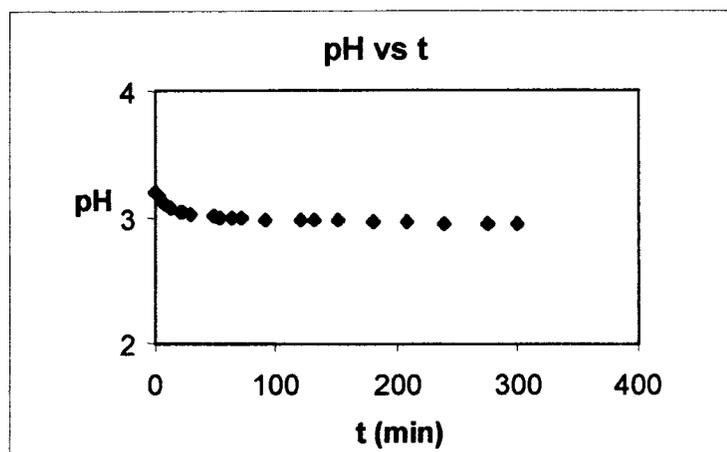


Fig. 10 a) - Variação do pH ao longo da experiência 1.

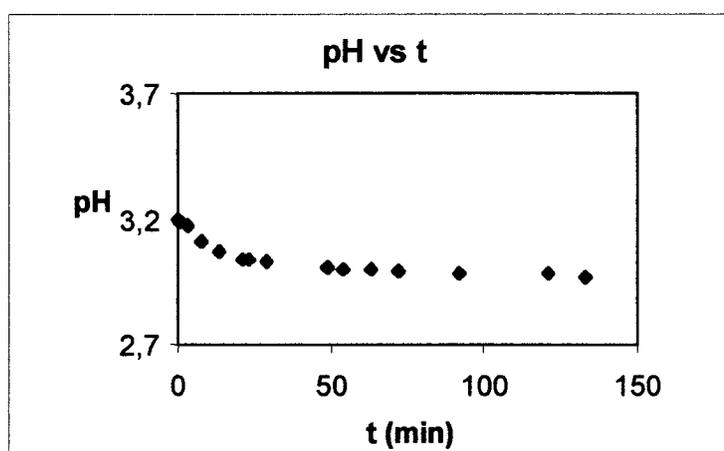


Fig. 10 b) - Variação do pH em 100 min de experiência 1.

O pH diminuiu ao longo da experiência, como pode ser observado nas figuras 10 a) e b). Esta diminuição deveu-se provavelmente ao facto de ao longo da reacção de degradação do 2-CP se formarem produtos mais ácidos. No final da experiência o pH estabilizou em 2,9.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por E. Chamarro (24) para a degradação do 4-CP usando reagente de Fenton. Estes observaram igualmente um decréscimo do pH o longo da reacção.

Observou-se igualmente ao longo da reacção uma alteração da cor, ou seja, no início da reacção, e antes da adição de, a solução apresentava uma cor incolor que passou a castanho escuro logo após a adição de H_2O_2 . Ao longo da experiência a cor castanha da mistura reaccional foi perdendo intensidade até se tornar quase incolor. Seguidamente são apresentadas figuras que retractsam a cor da solução no início e logo após a adição de H_2O_2 na experiência 1.



Fig. 11 a) - Cor apresentada pela mistura reaccional no interior do reactor *batch*, no início da experiência 1, antes da adição do H_2O_2 .



Fig. 11 b) - Cor apresentada pela mistura reaccional no interior do reactor *batch*, aos 15 min da experiência 1, após a adição de H_2O_2 .

A mudança de cor observada deveu-se tal com na experiência 1 à oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} .

Experiência 2:

Nesta experiência a concentração inicial no reactor *batch* de H_2O_2 foi de 395 mg/L e de Fe^{2+} 21.24 mg/L. Estes valores foram aproximadamente o dobro das concentrações utilizadas na experiência anterior.

A temperatura, foi mantida cerca dos 30 °C durante toda a experiência devido ao banho termostático.

Seguidamente serão apresentados os resultados experimentais relativos à variação do ORP e pH o longo da experiência.

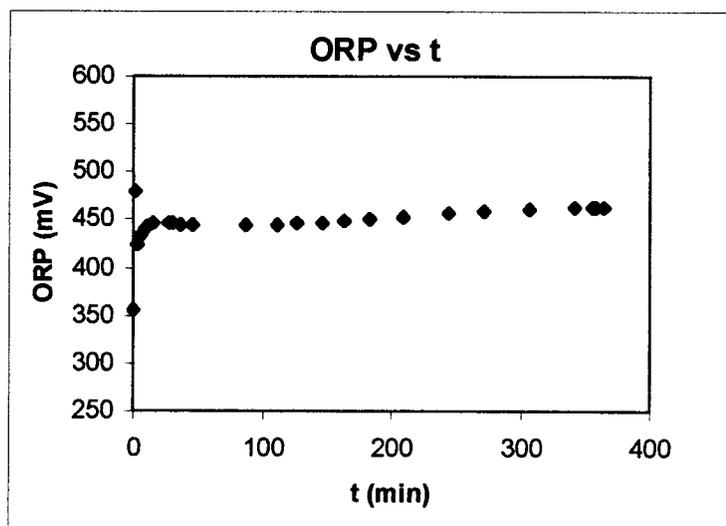


Fig. 12 a) - Variação do ORP ao longo da experiência 2.

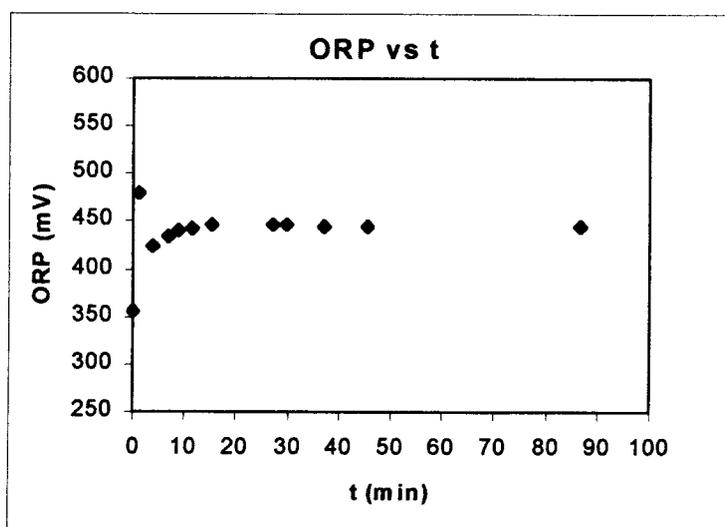


Fig. 12 b) - Variação do ORP em 100 min da experiência 2.

Primeiramente é conveniente esclarecer que o primeiro ponto representado nas figuras 12 a) e 12 b) corresponde ao ORP da solução imediatamente antes da adição da solução de peróxido de hidrogénio, isto é, o início da reacção.

A partir da observação directa das figuras 12 a) e 12 b), e à semelhança da experiência 1, figuras 9 a) e b), é obvio o aumento súbito do ORP no início da reacção e o decréscimo do valor deste parâmetro ao longo da experiência particularmente nos primeiros 20 min, figura 12 b). No final da desta experiência o valor de ORP estabilizou nos 464 mV.

Em comparação com a experiência anterior verificou-se um ligeiro aumento do ORP ao longo da experiência. Este facto foi devido ao aumento na concentração de Fe^{2+} e H_2O_2 o que implicou um aumento de radicais OH^\bullet em solução. Assim quanto maior a concentração de Fe^{2+} e H_2O_2 em solução maior é o valor do ORP ao longo de toda a experiência. Não foi porém avaliado qual a espécie em solução que contribui mais para este aumento.

Estes resultados experimentais estão de acordo com os obtidos por Lin et al. (20) e Chamarro et al. (24). Estes concluíram que a concentração de Fe^{2+} e H_2O_2 tem influencia na velocidade de degradação do 2-CP em estudo. assim para valores crescentes destas espécies em solução a velocidade de degradação do 2-CP será maior.

A diminuição mais acentuada no valor do ORP deve ter coincido com uma diminuição acentuada na concentração de 2-CP em solução. Esta diminuição deve ter sido mais rápida que no caso da experiência 1. Tal porém, só poderia ser confirmado nas análises efectuadas em GC-MS.

Seguidamente são apresentados os resultados relativos à variação do pH ao longo da experiência. O pH inicial da solução foi 3,16.

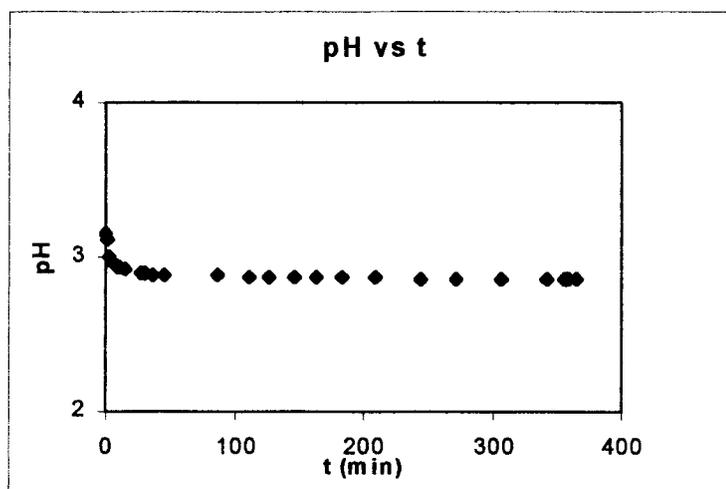


Fig. 13 a) - Variação do pH ao longo da experiência.

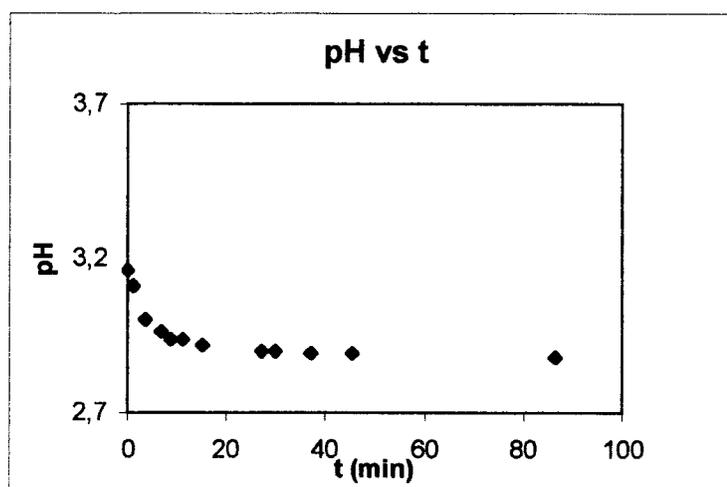


Fig 13 b) - Variação do pH em 100 min de experiência.

Como na experiência 1, figuras 10 a) e b), o pH diminuiu ao longo da experiência como pode ser observado nas figuras 13 a) e b). Esta diminuição deve-se provavelmente ao facto de ao longo da reacção de degradação do 2-CP se formarem produtos mais ácidos. No final da experiência o valor do pH estabilizou nos 2,9.

Comparando a figura 13 b) com a figura 10 b), relativa variação do pH na experiência 1 nos primeiros 100 min, podemos observar que a variação do pH ao longo do tempo decresce mais rapidamente o que poderá indicar que a velocidade de reacção de decomposição do 2-CP foi mais elevada na experiência 2.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por E. Chamarro (24) para a degradação do 4-CP usando reagente de Fenton. Estes observaram igualmente um decréscimo do pH o longo da reacção.

À semelhança da experiência 1 observou-se igualmente ao longo da reacção uma alteração da cor, ou seja, no início da reacção a solução apresentava uma cor castanho escuro que foi perdendo intensidade até se tornar quase incolor. Seguidamente são apresentadas figuras que retractam a cor da solução no início e no fim da experiência 2. As restantes figuras que retractam a variação de cor ao longo da experiência 2 podem ser consultadas no apêndice C.



Fig. 14 a) - Cor apresentada pela mistura reaccional no interior do reactor *batch*, no início da experiência 2, antes da adição do H_2O_2 .

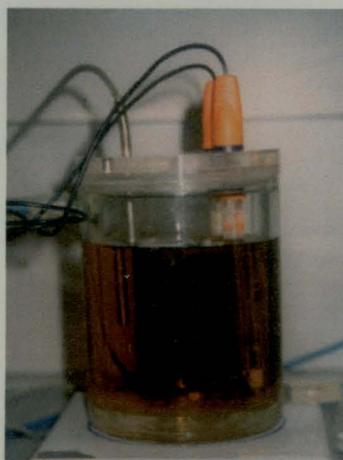


Fig. 14 b) - Cor apresentada pela mistura reaccional no interior do reactor *batch*, cerca de 4 min após o início da experiência 2, após a adição de H_2O_2 .



Fig. 14 c) - Cor apresentada pela mistura reaccional no interior do reactor *batch*, cerca de 5 horas após o início da experiência 2, após a adição de H_2O_2 .

A mudança de cor observada deveu-se tal com na experiência 1 à oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} .

8. Conclusões

Neste trabalho procurou avaliar-se de um modo simples a eficiência da biorremediação e oxidação com o reagente de Fenton do 2-clorofenol e do 2,4-clorofenol.

A biorremediação revelou-se ineficaz na degradação do 2-CP e do 2,4-DCP, não se observando o crescimento de bactérias aquando da utilização amostras de lixiviado da lixeira e amostras do lixiviado do aterro como inóculo. Tal poderá ter sido devido à elevada toxicidade dos compostos em estudo ou à inexistência de bactérias capazes de os degradar.

O tratamento do 2-CP com reagente de Fenton revelou-se promissor. Esta conclusão é baseada na variação do ORP que foi semelhante à observada por autores de outros estudos (20), (24). Contudo, não se puderam realizar análises cromatográficas, devido a avaria no GC/MS que comprovem este facto, isto é, que mostrem a diminuição na concentração do 2-CP ao longo do tempo, bem como a possível identificação dos produtos de degradação.

9. Trabalho futuro

De modo avaliar de maneira mais concreta a eficiência dos processos de remediação utilizadas neste trabalho seria deveras interessante:

- Analisar por SPME/GC-MS as amostras recolhidas durante as experiências de biorremediação e oxidação avançada com reagente de Fenton de modo a quantificar a diminuição na concentração de 2-CP e 2,4-DCP e identificar os intermediários que surgem durante o processo.
- Estudar a relação do valor do ORP com a concentração de 2-CP.
- Estudar a influência da concentração de Fe^{2+} e H_2O_2 na eficiência de degradação do 2-CP.
- Tentar articular a biorremediação com a oxidação avançada com reagente de Fenton. Este último processo pode ser utilizado para aumentar o biodegradabilidade dos clorofenóis permitindo que os produtos decorrentes deste tratamento possam ser tratados por biorremediação.

10. Bibliografia

1. Hugül M., Apak R., Demirci S., Modeling the kinetics of UV / hydrogen peroxide oxidation of some mono-, di-, and trichlorophenols, *Journal of Hazardous Materials*, B77: 193-208, **2000**.
2. Atuanya E. I., Purohit H. J., Chakrabarti T., Anaerobic and aerobic biodegradation of chlorophenols using UASB and ASG bioreactors, *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16: 95-98, **2000**.
3. Melin E. S., Puhakka J. A., Ferguson J. F., Enrichment and operation strategies for polychlorophenol degrading microbial cultures in an aerobic fluidized-bed reactor, *Water Environment Research*, 70 (2): 171-180, **1998**.
4. Lin K. S., Wang H. P., Supercritical Water Oxidation of 2- Chlorophenol Catalyzed by Cu^{2+} Cations and Copper Oxide Clusters, *Environ. Sci. Technol.*, 34:4849-4854, **2000**.
5. Shin H. S., Yoo K. S., Park J. K., Removal of polychlorinated phenols in sequential anaerobic-aerobic biofilm reactors packed with tire chips, *Water Environment Research*, 71 (3): 363-367, **1999**.
6. Directiva do Conselho do Parlamento Europeu 86/280/CEE.
Disponível em: www.europa.eu.int/eur-lex/pt/consleg/pdf/1986/pt_1986L0280_do_001.pdf, Acesso em: Mar **2001**.
7. Diário da República-I Série A, nº176 de 1 de Agosto de **1998**, p.3702.
8. [EPA] Environmental Protection Agency.
Disponível em: www.epa.gov/safewater/mcl.html Acesso em: Mar **2001**.
9. Cassady M. B., Mullineers H., Lee H., Trevors J. T., Mineralization of pentachlorophenol in a contaminated soil by *Pseudomonas* sp UG30 cells encapsulated in k-carrageenan, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 19: 43-48, **1997**.
10. Ronen Z., Vasiluk L., Abeliovich A. and Nejdat A., Activity and survival of tribromophenol-degrading bacteria in a contaminated desert soil, *Soil Biology & Biochemistry*, 32: 1643-1650, **2000**.
11. Hollender J., Hopp J., Dott W., Cooxidation of chloro- and methylphenols by *Alcaligenes xylosoxidans* JH1, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 16: 445 -450, **2000**.

12. Hollender J., Hopp J., Dott W., Degradation of 4-chlorophenol via meta cleavage pathway by *Comamonas testosteroni* JH5, *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11): 4567-4572, **1997**.
13. Farrell A., Quilty B., Degradation of mono-chlorophenols by a mixed microbial community via a meta-cleavage pathway, *Biodegradation*, 10: 353-362, **2000**.
14. Boncz M. A., Bruning H., Rulkens W. H., Sudhölter, Harmsen G. H., Bijsterbosch J. W., Kinetic and Mechanistic Aspects of the Oxidation of Chlorophenols by Ozone, *Wat. Sci. Tech.*, 35(4): 65-72, **1997**.
15. Kao P. C., Tzeng J. H., Huang T. L., Removal of chlorophenols from aqueous solution by fly ash, *Journal of Hazardous Materials*, 76: 237-249, **2000**.
16. Puma G. L., Yue P. L., Photocatalytic Oxidation of chlorophenols in single-component and multicomponent systems, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 38: 3238-3245, **1999**.
17. Theurich J., Lindner M., Bahnemann D. W., Photocatalytic Degradation of 4-Chlorophenol in Aerated Aqueous Titanium Dioxide Suspensions: A Kinetic and Mechanistic Study, *Langmuir*, 12: 6368-6376, **1996**.
18. Li X., Cabbage J. W., Jens W. S Photocatalytic Degradation of 4-Chlorophenol. 2 The 4-Chlorocatechol Pathway, *J. Org. Chem.*, 64: 8525-8536, **1999**.
19. Huling S. G., Arnold R. G., Sierka R. A., Jones P. K. e Fine D. D., Contaminant Adsorption and Oxidation via Fenton Reaction, *Journal of Environmental Engineering*, 595-600, **2000**.
20. Lin G. J., Ma S. Y., Oxidation of 2-chlorophenol in water by ultrasound/Fenton method, *Journal of Environmental Engineering*, 126 (2): 130-137, **2000**.
21. Doong R. A., Maithreepala R. A. e Chang S. M., Heterogeneous and homogeneous photocatalytic degradation of chlorophenols in aqueous titanium dioxide and ferrous ion, *Water Science and Technology* 42 (7): 253-260, **2000**.
22. Polcaro A. M., Palmas S., Electrochemical Oxidation of Chlorophenols, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 36:1791-1798, **1997**.
23. Nagata Y., Nakagawa M., Okuno H., Mizukoshi Y., Yim B., Maeda Y., Sonochemical degradation of chlorophenols in water, *Ultrasonics Sonochemistry*, 7: 115-120, **2000**.

24. Chamarro E., Marco A. and Esplugas S., Use of Fenton Reagent to improve organic chemical biodegradability, *Water Research*, 35(4): 1047-1051, 2001.

25. Marco A., Esplugas S. and Saum G., How and why combine chemical and biological processes for wastewater treatment, *Wat. Sci. Tech*, 35(4): 321-327, 1997.

26. EPA Method 625 – Determination of Organic Compounds in Drinking Water by Liquid-Liquid Extraction and Capillary Column Gas Chromatography/Mass Spectrometry – Spectrum Laboratories, 2001. (www.speclab.com/compound/m515d2.htm) consultado em Março de 2001.

27. Pawliszyn J., *Solid Phase Microextraction – theory and practice*, Wiley – VHC; New York, 1997.

11. Apêndices

Apêndice A: Meios de cultura e outras soluções.

Soluções de 2-clorofenol e 2,4-clorofenol (Fonte de carbono e energia)	
componente	concentração (g/L)
2-CP	0,4
2,4- DCP	0,4

Macronutrientes (10 x concentrada) (1L)	
componente	concentração (g/L)
CaCl ₂ .H ₂ O	0,696
NaCl	0,08
KNO ₃	1,03
NaNO ₃	6,98
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,00
NTA	1,00

Micronutrientes (100 x concentrada) (1L)	
componente	concentração (g/L)
FeSO ₄ .7H ₂ O	200
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10
MnSO ₄ .5H ₂ O	4,3
H ₃ BO ₃	30
CoSO ₄ .7H ₂ O	24
CuSO ₄ .5H ₂ O	1
NiSO ₄ .7H ₂ O	2
NaMoO ₄ .2H ₂ O	3
Ca(OH) ₂	50
EDTA	500

Solução Tampão 1.35 mM (1L)	
componente	concentração (g)
KH ₂ PO ₄	50
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	175

Fonte de Azoto	
componente	concentração (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.500

Meio Mineral de cultura (1L)	
solução	volume (ml)
Macronutrientes	100
Micronutrientes	10
Solução Tampão	20
(NH ₄) ₂ SO ₄	5
H ₂ O	até perfazer 1L

Apêndice B

Matraz A	Matraz B
10 ml de meio mineral 1 ml de inóculo 50 µl de 2-CP	10 ml de meio mineral 1 ml de inóculo 50 µl de 2,4 -DCP
Matraz C	Matraz D
10 ml de meio mineral 1 ml de inóculo 500 µl de 2-CP	10 ml de meio mineral 1 ml de inóculo 500 µl de 2,4 -DCP

Controlos	
Matraz E	Matraz F
10 ml de meio mineral 1 ml de H ₂ O 50 µl de 2-CP	10 ml de meio mineral 1 ml de H ₂ O 50 µl de 2,4 -DCP
Matraz G	Matraz H
10 ml de meio mineral 1 ml de H ₂ O 500 µl de 2-CP	10 ml de meio mineral 1 ml de H ₂ O 500 µl de 2,4-DCP
Matraz I	
10 ml de meio mineral 1 ml de inóculo	

Apêndice C

Representação da alteração de cor da mistura reaccional ao longo da experiência 2:



Fig. 1 C - Cor apresentada pela mistura reaccional no interior do reactor *batch*, no início da experiência 2, antes da adição do H_2O_2 .

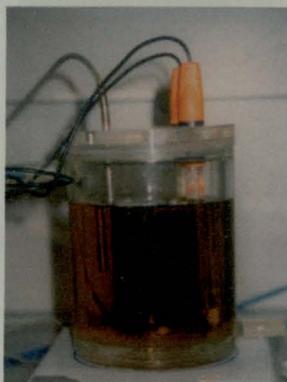


Fig. 2 C - Cor apresentada pela mistura reaccional no interior do reactor *batch*, cerca de 4 min após o início da experiência 2, após a adição de H_2O_2 .

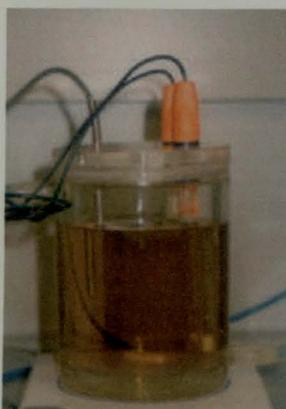


Fig. 3 C - Cor apresentada pela mistura reaccional no interior do reactor *batch*, cerca de 15 min após o início da experiência 2.

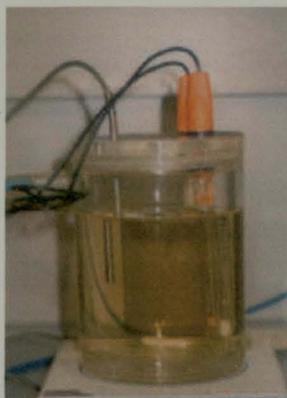


Fig. 4 C - Cor apresentada pela mistura reaccional no interior do reactor *batch*, cerca de 2 h após o início da experiência 2.



Fig. 5 C - Cor apresentada pela mistura reaccional no interior do reactor *batch*, cerca de 2 h após o início da experiência 2.

Para obter mais informações, consulte o site



Maria Helena Paiva (Luz Neves)





FACULDADE DE ENGENHARIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

BIBLIOTECA



0000088318

10
20