

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

**ENCAPSULAMENTO DE MONÓMEROS DA LENHINA
PELA β -CICLODEXTRINA:
ESTUDOS QUÍMICO E DE BIODEGRADAÇÃO**

ELIANA REGINA MARQUES VALE

Mestrado em Engenharia Química
Ramo Tecnologias de Protecção Ambiental
Novembro 2008

**ENCAPSULAMENTO DE MONÓMEROS DA LENHINA
PELA β -CICLODEXTRINA:
ESTUDOS QUÍMICO E DE BIODEGRADAÇÃO**

ORIENTADOR: MANUELA GARRIDO
CO-ORIENTADOR: JORGE GARRIDO

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não seria possível sem o apoio de diversas pessoas que directa ou indirectamente contribuíram para a sua realização.

À minha orientadora, Professora Manuela Garrido, pela orientação científica,
por todo o apoio prestado e pela amizade construída.

Ao meu co-orientador, Professor Jorge Garrido, pela orientação científica e pelo esforço final de revisão.

Ao Professor Christopher Sá um agradecimento muito especial
pela disponibilidade constante e orientação científica.

Ao Professor Crispim por tão prontamente ter permitido que eu utilizasse os recursos do CIETI.

A todos os meus colegas de laboratório que coordenaram esforços para eu
poder desenvolver os meus estudos.

Ao INEB e a todos os INEBianos por me terem ajudado a amadurecer,
pessoal e cientificamente...

Ao Ricardo pela leitura e ideias fornecidas ao longo da escrita da tese.

Ao meu pai, Manuel, por sempre acreditar em mim e ser o meu ombro de apoio em tudo na vida!

À minha mãe, Teresa, pela dedicação e incentivo incondicional.

À minha avó, Alice, pelo carinho e preocupação constante.

Ao meu irmão, Pedro, pelo apoio e compreensão.

Aos meus amigos pelo encorajamento e paciência ao longo deste último ano.

Às Anas Ribeiro, de nomes semelhantes, mas em tudo diferentes:

Aninha pela meiguice, carinho e preocupação e pelas gargalhadas que tão bem sabem ouvir!

Ana MU! pela boa disposição, pela força transmitida, pela atenção continua, mesmo a milhares de km...

À Dudu, pela boa ouvinte que é, por me aturar, mesmo em dias menos bons e amenizar, com palavras doces, as minhas dificuldades.

E finalmente e principalmente ao meu AMOR,
meu porto de abrigo, meu companheiro em noitadas ao computador,
pelo apoio incondicional, pela presença constante, pelo amor e carinho. Obrigada Miguel.

E um obrigada acrescido que fica entre nós!

RESUMO

Com este trabalho pretendeu-se estudar o encapsulamento de monómeros da lenhina, especificamente o ácido sinápico e o álcool coniferílico, pela β -ciclodextrina, tendo em vista a sua aplicação e utilização no tratamento de efluentes das indústrias do papel e da celulose.

Este estudo foi dividido em duas partes essenciais: o estudo químico, por forma a avaliar a influência dos complexos formados na solubilidade do composto, e o estudo da biodegradação, em que se pretendeu avaliar e comparar a biodegradabilidade dos monómeros livres e quando encapsulados pela β -ciclodextrina.

Os resultados obtidos na avaliação da influência da β -ciclodextrina na solubilidade do ácido sinápico não foram conclusivos; no entanto, não é de excluir o facto de ter ocorrido complexação.

Relativamente aos estudos do álcool coniferílico, verificou-se um aumento da solubilidade pelo aumento da concentração de β -ciclodextrina em solução. Foi também possível concluir que ocorreu complexação na razão 1:1.

Os estudos de biodegradação permitiram verificar um aumento da taxa de consumo de oxigénio dos microrganismos com o aumento da concentração de β -ciclodextrina, o que confirma a melhoria da biodegradação do álcool coniferílico.

Verificou-se também que o encapsulamento do álcool coniferílico pela β -ciclodextrina garante a sua estabilidade, conseqüente biodegradação e que o arejamento promove o aceleração dessa mesma biodegradação.

Constatou-se que a taxa de crescimento microbiano aumenta com a presença de β -ciclodextrina. Estes resultados são confirmados pela aplicação do modelo cinético de 1ª ordem. Com a aplicação do modelo de Monod determinou-se a constante de Monod (150,7 mM), ou seja, a concentração de β -ciclodextrina para a qual a taxa de crescimento é metade da taxa de crescimento máxima (0,883 h⁻¹). No entanto, verificou-se que este modelo não é o mais adequado, sendo restrita a sua aplicação às concentrações estudadas.

Palavras-chave: Solubilidade, Biodegradação, β -ciclodextrina, Lenhina, Complexação, Ácido Sinápico, Álcool Coniferílico

ABSTRACT

The aim of this work was to study the encapsulation of specific monomers of lignin, namely, sinapic acid and coniferyl alcohol, with β -cyclodextrin, in order to use it for waste treatment in paper industries.

The work done includes two fundamental parts: a chemical study, to evaluate the influence of the complexes formed in the solubility of the monomers and a biodegradation study to evaluate and compare free monomers and β -cyclodextrin encapsulated monomers biodegradability.

The results regarding the influence of β -cyclodextrin in the solubility of sinapic acid were not conclusive; however, the complexation between this monomer and β -cyclodextrin might still have happened.

Concerning the results obtained with coniferyl alcohol, with the increase on the concentration of β -cyclodextrin in solution, it was observed an increase in the solubility of the monomer. The complexation occurred in a proportion of 1:1.

The biodegradation studies showed an increase on the oxygen consumption rate, with the increase of the concentration of β -cyclodextrin, which confirms a better biodegradation of coniferyl alcohol by microorganisms.

The encapsulation of coniferyl alcohol with β -cyclodextrin guarantees its proper stabilization and biodegradation. Besides, the aeration promotes an acceleration of this biodegradation.

Finally, it was observed that the microbial growth rate increased with the presence of the encapsulating agent, β -cyclodextrin. These results were confirmed using the 1st order kinetical model.

Applying the Monod model, it was possible to determinate the Monod constant (150,7 mM), referring to the concentration of β -cyclodextrin for which the growth rate is half of the maximum (0,883 h⁻¹). However, one can conclude that this is not the most adequate model, so its application is restrict to the studied concentrations.

Key-words: Solubility, Biodegradation, β -cyclodextrin, Lignin, Complexation, Sinapic Acid, Coniferyl Alcohol.

ÍNDICE

Capítulo 1. Introdução teórica	1
1.1. Contextualização	1
1.2. Indústrias de Papel e Celulose – Efluentes Líquidos	1
1.3. Lenhina – Fibra de Celulose	3
1.4. Ciclodextrinas	6
1.4.1. História	6
1.4.2. Interesse	7
1.4.3. Propriedades	8
1.4.4. Encapsulamento com ciclodextrinas	9
1.4.5. Ensaio de Avaliação do Encapsulamento	13
1.4.6. Aplicações	14
1.5. Biodegradabilidade e Crescimento Microbiano	15
1.5.1. Lamas Activadas e Comunidade de Biomassa	15
1.5.2. Biodegradabilidade e Respirometria	16
1.5.3. Modelos de Avaliação do Crescimento Microbiano	18
1.5.3.1. Modelo de Monod	19
Capítulo 2. Estudo Químico do Encapsulamento do Ácido Sinápico e do Álcool Coniferílico	21
2.1. Parte Experimental	21
2.1.1. Ácido Sinápico	21
2.1.1.1. Materiais	21
2.1.1.2. Métodos	22
2.1.1.2.1. Método A	22
2.1.1.2.2. Método B	23
2.1.1.2.3. Método C	24
2.1.2. Álcool Coniferílico	27
2.1.2.1. Materiais	27
2.1.2.2. Métodos	27
2.1.2.2.1. Avaliação da Solubilidade do Álcool Coniferílico	27
2.1.2.2.2. Avaliação da Estabilidade do Álcool Coniferílico	28
2.2. Resultados e Discussão	30
2.2.1. Ácido Sinápico	30
2.2.1.1. Determinação Espectrofotométrica por UV-Visível do Ácido Sinápico	30
2.2.1.2. Avaliação da Solubilidade do Ácido Sinápico	32
2.2.2. Álcool Coniferílico	44
2.2.2.1. Determinação Espectrofotométrica por UV-Visível do Álcool Coniferílico	44
2.2.2.2. Avaliação da Solubilidade do Álcool Coniferílico	46
2.2.2.3. Avaliação da Estabilidade do Álcool Coniferílico	51
2.3. Conclusões	54

Capítulo 3. Estudos de Biodegradação do Álcool Coniferílico e Respectivo Complexo	55
3.1. Parte Experimental	55
3.1.1. Materiais	55
3.1.2. Métodos	56
3.1.2.1. Solução de Lamas	56
3.1.2.2. Estudo de Biodegradação em Meio Não Tamponado com Recurso à Medição da Taxa de Consumo de Oxigénio e Controlo Espectrofotométrico	57
3.1.2.3. Estudo de Biodegradação em Meio Mineral Tamponado com Recurso ao Controlo Espectrofotométrico e Análise do Crescimento Bacteriano	60
3.2. Resultados e Discussão	63
3.2.1. Estudo de Biodegradação em Meio Não Tamponado com Recurso à Medição da Taxa de Consumo de Oxigénio e Controlo Espectrofotométrico	63
3.2.2. Estudo de Biodegradação em Meio Mineral Tamponado com Recurso ao Controlo Espectrofotométrico e Análise do Crescimento Bacteriano	75
3.3. Conclusões	83
Capítulo 4. Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro	85
Capítulo 5. Bibliografia	87
Anexos	91
Anexo A. Avaliação da Solubilidade do Ácido Sinápico	93
Anexo B. Avaliação da Solubilidade do Álcool Coniferílico	99
Anexo C. Estudo de Biodegradação em Meio Não Tamponado com Recurso à Medição da Taxa de Consumo de Oxigénio e Controlo Espectrofotométrico	105
Anexo D. Estudo de Biodegradação em Meio Mineral Tamponado com Recurso ao Controlo Espectrofotométrico e Análise do Crescimento Bacteriano	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Derivação da via de biossíntese das lenhinas	3
Figura 1.2. Representação de uma unidade fenilpropano (C6-C3)	3
Figura 1.3. Representação do álcool cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinápico	4
Figura 1.4. Estruturas de ciclodextrinas naturais: A- α -ciclodextrina; B- β -ciclodextrina; C- γ -ciclodextrina	7
Figura 1.5. Representação da estrutura da ciclodextrina	7
Figura 1.6. Representação esquemática da incorporação de um monómero na cavidade da ciclodextrina	9
Figura 1.7. Relacionamento entre respiração, crescimento e biodegradação	17
Figura 1.8. Fases de metabolismo no crescimento de microrganismos	18
Figura 1.9. Relação entre μ e S prevista pelo modelo de Monod	20
Figura 2.1. Espectro do Ácido Sinápico na zona do UV-Visível (190 nm a 420 nm)	30
Figura 2.2. Curva de calibração do Ácido Sinápico com concentrações compreendidas entre 0 e 500 μ M	31
Figura 2.3. Recta de calibração do Ácido Sinápico com concentrações compreendidas entre 0 e 123 μ M	31
Figura 2.4. Resultados obtidos para a solubilização do AS em função de concentrações crescentes de β CD	32
Figura 2.5. Resultados obtidos para a taxa de solubilização de AS sob a influência de concentrações crescentes de β CD	33
Figura 2.6. Resultados obtidos para uma solução de concentração teórica em AS aproximada a 100 μ M sob a influência de concentrações crescentes de β CD	34
Figura 2.7. Resultados obtidos para a taxa de solubilização de AS sob a influência de concentrações crescentes de β CD	35
Figura 2.8. Espectros de UV-Visível das soluções de concentração teórica máxima em AS igual a 30 μ M sob a influência de concentrações crescentes de β CD	36
Figura 2.9. Espectros de UV-Visível das soluções de concentração teórica máxima em AS igual a 50 μ M sob a influência de concentrações crescentes de β CD	36
Figura 2.10. Espectros de UV-Visível das soluções de concentração teórica máxima em AS igual a 100 μ M sob a influência de concentrações crescentes de β CD	37
Figura 2.11. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 308 nm para a solubilização de AS sob a influência de concentrações crescentes de β CD e da concentração teórica máxima inicial de AS	38
Figura 2.12. Espectros de UV-Visível de uma solução de $[\text{AS}] = 100 \mu\text{M}$ e $[\beta\text{CD}] = 0 \text{ mM}$, ao longo do tempo de incubação (20h, 42h, 65h)	39
Figura 2.13. Espectros de UV-Visível de uma solução de $[\text{AS}] = 100 \mu\text{M}$ e $[\beta\text{CD}] = 3 \text{ mM}$, ao longo do tempo de incubação (20h, 42h, 65h e 88h)	39
Figura 2.14. Espectros de UV-Visível de uma solução de $[\text{AS}] = 100 \mu\text{M}$ e $[\beta\text{CD}] = 6 \text{ mM}$, ao longo do tempo de incubação (20h, 42h, 65h e 88h)	40

Figura 2.15. Espectros de UV-Visível de uma solução de $[AS] = 100 \mu\text{M}$ e $[\beta\text{CD}] = 9 \text{ mM}$, ao longo do tempo de incubação (20h, 42h, 65h e 88h)	40
Figura 2.16. Espectros de UV-Visível de uma solução de $[AS] = 100 \mu\text{M}$ e $[\beta\text{CD}] = 12 \text{ mM}$, ao longo do tempo de incubação (20h, 42h, 65h e 88h)	41
Figura 2.17. Espectros de UV-Visível de uma solução de $[AS] = 100 \mu\text{M}$ e $[\beta\text{CD}] = 15 \text{ mM}$, ao longo do tempo de incubação (20h, 42h, 65h e 88h)	41
Figura 2.18. Resultados obtidos para a solubilização de AS sob a influência de concentrações crescentes de βCD e do tempo de incubação (resultados obtidos a 232nm).	42
Figura 2.19. Resultados obtidos para a solubilização de AS sob a influência de concentrações crescentes de βCD e do tempo de incubação (resultados obtidos a 314nm).	43
Figura 2.20. Espectro do Álcool Coniferílico na zona do UV	44
Figura 2.21. Recta de calibração do Álcool Coniferílico com concentrações compreendidas entre 0 e 300 μM , a 263 nm	45
Figura 2.22. Resultados espectrofotométricos da análise espectral das soluções de concentração teórica máxima inicial de AC 700 μM pela influência de concentrações crescentes de βCD (soluções sujeitas a diluição 1:5), para $t = 20\text{h}$.	47
Figura 2.23. Resultados espectrofotométricos da análise espectral das soluções de concentração teórica máxima inicial de AC 700 μM pela influência de concentrações crescentes de βCD (soluções sujeitas a diluição 1:5), para $t = 42\text{h}$.	47
Figura 2.24. Resultados espectrofotométricos da análise espectral das soluções de concentração teórica máxima inicial de AC 700 μM pela influência de concentrações crescentes de βCD (soluções sujeitas a diluição 1:5), para $t = 65\text{h}$.	48
Figura 2.25. Resultados espectrofotométricos da análise espectral das soluções de concentração teórica máxima inicial de AC 700 μM pela influência de concentrações crescentes de βCD (soluções sujeitas a diluição 1:5), para $t = 86\text{h}$.	48
Figura 2.26. Resultados obtidos para a solubilização do AC em função de concentrações crescentes de βCD e do tempo de incubação, para $t = 65\text{h}$ e $t = 86\text{h}$	49
Figura 2.27. Resultados obtidos para a taxa de solubilização do AC em função de concentrações crescentes de βCD , para $t = 65\text{h}$ e $t = 86\text{h}$.	50
Figura 2.28. Resultados espectrofotométricos obtidos após 24h para: uma solução em AC exposta às condições laboratoriais durante 130 minutos (solução A) e uma solução em AC protegida (solução C)	52
Figura 2.29. Resultados espectrofotométricos obtidos após 24h para: uma solução com AC e βCD , exposta às condições laboratoriais durante 130 minutos (solução B) e uma solução com AC e βCD , protegida (solução D)	52
Figura 3.1. Imagens ao microscópio da solução de lammas proveniente da ETAR (ampliação 100x)	56
Figura 3.2. Evolução temporal da concentração de oxigénio dissolvido para soluções com diferentes concentrações de βCD em meio não tamponado [mg/L O_2 dissolvido a 25°C]	64
Figura 3.3. Evolução temporal da concentração de oxigénio dissolvido para a solução controlo nº8 (sem solução de lammas) em meio não tamponado [mg/L O_2 dissolvido a 25°C]	64

Figura 3.4. Resultados da análise espectral das soluções 1-6. Soluções com quantidade constante de AC e quantidades crescentes de β CD: a) antes da introdução das lamas; b) após introdução das lamas e logo após arejamento; c) após introdução das lamas e 30 min após arejamento.	66
Figura 3.5. Resultados espectrofotométricos (190 a 350 nm) da solução padrão de Aldeído Coniferílico	67
Figura 3.6. Resultados espectrofotométricos da solução A1 ($[\beta$ CD] \cong 0 mM, [AC] \cong 0,5 mM, [Lamas] \cong 0 mg SSV/L) para t=0, t=50min, t=90min, t=130min e t=24h (solução sujeita a diluição 1:5)	69
Figura 3.7. Resultados espectrofotométricos da solução B1 ($[\beta$ CD] \cong 6 mM, [AC] \cong 0,5 mM, [Lamas] \cong 0 mg SSV/L) para t=0, t=50min, t=90min, t=130min e t= 24h (solução sujeita a diluição 1:5)	69
Figura 3.8. Resultados espectrofotométricos da solução A2 ($[\beta$ CD] \cong 0 mM, [AC] \cong 0,5 mM, [Lamas] \cong 1500 mg/L) para t=0, t=50min, t=90min, t=130min e t=24h (solução sujeita a diluição 1:5)	70
Figura 3.9. Resultados espectrofotométricos da solução B2 ($[\beta$ CD] \cong 6 mM, [AC] \cong 0,5 mM, [Lamas] \cong 1500 mg/L) após a introdução das lamas a t=0, t=50min, t=90min, t=130min e t=24h (solução sujeita a diluição 1:5)	71
Figura 3.10. Comparação entre o espectro de absorvância (Figura 3.4.) para a solução 5 (β CD \cong 6 mM, [AC] \cong 0,35 mM, [Lamas] \cong 1500 mg/L) com arejamento e o espectro (Figura 3.9.) para a solução B2 ($[\beta$ CD] \cong 6 mM, [AC] \cong 0,5 mM, [Lamas] \cong 1500 mg/L)	72
Figura 3.11. Evolução temporal da concentração de oxigênio dissolvido nas soluções A3 ($[\beta$ CD] \cong 0 mM, [AC] \cong 0,5 mM, [Lamas] \cong 1500 mg/L) e B3 ($[\beta$ CD] \cong 6 mM, [AC] \cong 0,5 mM, [Lamas] \cong 1500 mg/L) [mg/L O ₂ dissolvido a 25°C]	72
Figura 3.12. Evolução temporal da concentração de oxigênio dissolvido das soluções 1 ($[\beta$ CD] \cong 6 mM) e 2 ($[\beta$ CD] \cong 6 mM e [AC] \cong 0,5 mM) [mg/L O ₂ dissolvido a 25°C]	74
Figura 3.13. Correspondência da Absorvância obtida com a concentração da solução de lamas	75
Figura 3.14. Resultados espectrofotométricos da solução 1A ($[\beta$ CD] \cong 0 mM, [AC] \cong 0,6 mM, [Lamas] \cong 56 mg/L) ao longo das 50 h do crescimento bacteriano, (solução sujeita a diluição 1:5)	76
Figura 3.15. Resultados espectrofotométricos da solução 2A ($[\beta$ CD] \cong 3 mM, [AC] \cong 0,6 mM, [Lamas] \cong 56 mg/L) ao longo das 50h do crescimento bacteriano (solução sujeita a diluição 1:5)	77
Figura 3.16. Resultados espectrofotométricos da solução 3A ($[\beta$ CD] \cong 6 mM, [AC] \cong 0,6 mM, [Lamas] \cong 56 mg/L) ao longo das 50h do crescimento bacteriano (solução sujeita a diluição 1:5)	77
Figura 3.17. Resultados espectrofotométricos da solução 4A ($[\beta$ CD] \cong 9 mM, [AC] \cong 0,6 mM, [Lamas] \cong 56 mg/L) ao longo das 50h do crescimento bacteriano (solução sujeita a diluição 1:5)	78

Figura 3.18. Resultados espectrofotométricos da solução 5A ($ \beta\text{CD} \cong 12 \text{ mM}$, $ \text{AC} \cong 0,6 \text{ mM}$, $ \text{Lamas} \cong 56 \text{ mg/L}$) ao longo das 50h do crescimento bacteriano (solução sujeita a diluição 1:5)	78
Figura 3.19. Evolução temporal da absorvância obtida a 650 nm para as soluções 1A a 5A	79
Figura 3.20. Representação da relação entre $\text{Ln}(X/X_0)$ ao longo do tempo para a solução 4A ($ \beta\text{CD} = 9\text{mM}$, $ \text{AC} _{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$)	80
Figura 3.21. Evolução temporal de SSV obtidos experimentalmente e pelo modelo cinético de 1ª ordem para a solução 4A ($ \beta\text{CD} = 9\text{mM}$, $ \text{AC} _{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$)	81
Figura 3.22. Evolução temporal da concentração de SSV prevista pelo modelo de 1ª ordem para as soluções 1A a 5A, após transladação para $X_0 = 55,56 \text{ mg SSV/L}$	82
Figura D1. Representação da relação entre $\text{Ln}(X/X_0)$ ao longo do tempo para a solução 1A ($ \beta\text{CD} = 0 \text{ mM}$, $ \text{AC} _{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$)	110
Figura D2. Evolução temporal de SSV obtidos experimentalmente e pelo modelo cinético de 1ª ordem para a solução 1A ($ \beta\text{CD} = 0 \text{ mM}$, $ \text{AC} _{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$)	110
Figura D3. Representação da relação entre $\text{Ln}(X/X_0)$ ao longo do tempo para a solução 2A ($ \beta\text{CD} = 3 \text{ mM}$, $ \text{AC} _{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$)	112
Figura D4. Evolução temporal de SSV obtidos experimentalmente e pelo modelo cinético de 1ª ordem para a solução 2A ($ \beta\text{CD} = 3 \text{ mM}$, $ \text{AC} _{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$)	112
Figura D5. Representação da relação entre $\text{Ln}(X/X_0)$ ao longo do tempo para a solução 3A ($ \beta\text{CD} = 6\text{mM}$, $ \text{AC} _{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$)	114
Figura D6. Evolução temporal de SSV obtidos experimentalmente e pelo modelo cinético de 1ª ordem para a solução 3A ($ \beta\text{CD} = 6\text{mM}$, $ \text{AC} _{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$)	114
Figura D7. Representação da relação entre $\text{Ln}(X/X_0)$ ao longo do tempo para a solução 5A ($ \beta\text{CD} = 12\text{mM}$, $ \text{AC} _{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$)	117
Figura D8. Evolução temporal de SSV obtidos experimentalmente e pelo modelo cinético de 1ª ordem para a solução 5A ($ \beta\text{CD} = 12\text{mM}$, $ \text{AC} _{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$)	117
Figura D9. Evolução temporal de SSV obtidos experimentalmente e pelo modelo cinético de 1ª ordem para as soluções 1A a 5A (sem trasladação)	118
Figura D10. Aplicação do modelo de Monod aos resultados experimentais obtidos	120

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Propriedades das ciclodextrinas	8
Tabela 2.1. Preparação das soluções com β CD e AS utilizando o método A	23
Tabela 2.2. Preparação das soluções com β CD e AS utilizando o método B	24
Tabela 2.3. Preparação das soluções com β CD e AS utilizando o método C	25
Tabela 2.4. Preparação das soluções com β CD e AS utilizando o método C	26
Tabela 2.5. Preparação das soluções com β CD e AC	28
Tabela 2.6. Preparação das soluções com β CD e AC	29
Tabela 2.7. Preparação e concentrações das soluções A-D	29
Tabela 2.8. Condições experimentais do estudo da estabilidade do AC	51
Tabela 2.9. Resultados do estudo do pH das soluções A, B, C e D.	53
Tabela 3.1. Concentrações das soluções após introdução das lamas	58
Tabela 3.2. Quantidades e concentrações das soluções A e B	58
Tabela 3.3. Preparação das soluções A1 e B1	59
Tabela 3.4. Preparação das soluções A2 e B2	59
Tabela 3.5. Preparação das soluções A3 e B3	60
Tabela 3.6. Preparação de 25 mL de soluções com β CD e AC	61
Tabela 3.7. Preparação do meio mineral	61
Tabela 3.8. Composição das soluções após introdução das lamas	63
Tabela 3.9. Taxa de consumo de oxigénio para as soluções concentração teórica máxima de AC 0,35 mM pela influência de concentrações crescentes de β CD	65
Tabela 3.10. Concentrações das soluções A1, B1, A2, B2, A3, B3	68
Tabela 3.11. Valores de pH nas soluções iniciais A, B, A1, B1, A2, B2.	73
Tabela 3.12. Evolução temporal do valor de pH das soluções A1, B1, A2, B2 na incubação a 25°C.	73
Tabela 3.13. Composição das soluções 1A-5A	76
Tabela 3.14. Taxa de crescimento microbiano (μ) para as soluções 1A a 5A	80
Tabela A1. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a comprimento de onda 308nm das soluções com $ AS _{m\acute{a}x.} = 16,1\mu M, 32,2\mu M$ e $64,5\mu M$ e $0mM \leq \beta CD \leq 10mM$, após incubação	93
Tabela A2. Determinação da taxa de solubilização efectiva da solução com $ AS _{m\acute{a}x.} = 16,1\mu M$ e $0mM \leq \beta CD \leq 10mM$	94
Tabela A3. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a comprimento de onda 308nm das soluções com $89,20\mu M \leq AS _{m\acute{a}x.} \leq 115,96\mu M$ e $0mM \leq \beta CD \leq 12mM$	94
Tabela A4. Determinação da taxa de solubilização efectiva da solução com $89,20\mu M \leq AS _{m\acute{a}x.} \leq 115,96\mu M$	95
Tabela A5. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a comprimento de onda 308nm das soluções com $ AS _{m\acute{a}x.} = 30\mu M, 50\mu M$ e $100\mu M$ e $0mM \leq \beta CD \leq 21mM$	96
Tabela A6. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível, para $t = 20h$, das soluções $ AS = 100\mu M$ e $0mM \leq \beta CD \leq 15mM$, após incubação	97
Tabela A7. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível, para $t = 42h$, das	97

soluções $ AS = 100 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq \beta\text{CD} \leq 15\text{mM}$, após incubação	
Tabela A8. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível, para $t = 65\text{h}$, das soluções $ AS = 100 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq \beta\text{CD} \leq 15\text{mM}$, após incubação	98
Tabela A9. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível, para $t = 88\text{h}$, das soluções $ AS = 100 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq \beta\text{CD} \leq 15\text{mM}$, após incubação	98
Tabela B1. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm, para $t = 20\text{h}$, das soluções $ AC _{\text{máx.}} = 700 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq \beta\text{CD} \leq 15\text{mM}$, após incubação (soluções sujeitas a diluição 1:5)	99
Tabela B2. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm, para $t = 42\text{h}$, das soluções $ AC _{\text{máx.}} = 700 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq \beta\text{CD} \leq 15\text{mM}$, após incubação (soluções sujeitas a diluição 1:5)	99
Tabela B3. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm, para $t = 65\text{h}$, das soluções $ AC _{\text{máx.}} = 700 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq \beta\text{CD} \leq 15\text{mM}$, após incubação (soluções sujeitas a diluição 1:5)	100
Tabela B4. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm, para $t = 86\text{h}$, das soluções $ AC _{\text{máx.}} = 700 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq \beta\text{CD} \leq 15\text{mM}$, após incubação (soluções sujeitas a diluição 1:5)	100
Tabela B5. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm, para $t = 112\text{h}$, das soluções $ AC _{\text{máx.}} = 700 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq \beta\text{CD} \leq 15\text{mM}$, após incubação (soluções sujeitas a diluição 1:5)	100
Tabela B6. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm, para $t = 136,5\text{h}$, das soluções $ AC _{\text{máx.}} = 700 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq \beta\text{CD} \leq 15\text{mM}$, após incubação (soluções sujeitas a diluição 1:5)	101
Tabela B7. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm, para $t = 147,5\text{h}$, das soluções $ AC _{\text{máx.}} = 700 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq \beta\text{CD} \leq 15\text{mM}$, após incubação (soluções sujeitas a diluição 1:5)	101
Tabela B8. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm, para $t = 20\text{h}$ e $t = 42\text{h}$, das soluções $ AC _{\text{máx.}} = 700 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq \beta\text{CD} \leq 15\text{mM}$, após incubação, corrigidos pelo factor de diluição	102
Tabela B9. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm, para $t = 65\text{h}$ e $t = 86\text{h}$, das soluções $ AC _{\text{máx.}} = 700 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq \beta\text{CD} \leq 15\text{mM}$, após incubação, corrigidos pelo factor de diluição	102
Tabela B10. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm, para $t = 112\text{h}$ e $t = 136,5\text{h}$, das soluções $ AC _{\text{máx.}} = 700 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq \beta\text{CD} \leq 15\text{mM}$, após incubação, corrigidos pelo factor de diluição	102
Tabela B11. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm, para $t = 147,5\text{h}$, das soluções $ AC _{\text{máx.}} = 700 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq \beta\text{CD} \leq 15\text{mM}$, após incubação, corrigidos pelo factor de diluição	103
Tabela B12. Determinação da taxa de solubilização efectiva do AC para $t = 65\text{h}$ e $t = 86\text{h}$	103
Tabela C1. Resultados obtidos na medição das concentrações de oxigénio dissolvido nas soluções 1 a 8 com $ AC _{\text{máx.}} = 0,35 \text{mM}$ e $0\text{mM} \leq \beta\text{CD} \leq 7,5\text{mM}$ [mg/L O_2 dissolvido a 25°C]	105

Tabela C2. Evolução temporal da concentração de oxigénio dissolvido das soluções A3 ($ \beta\text{CD} \cong 0 \text{ mM}$ e $ \text{AC} \cong 0,5 \text{ mM}$) e A3 ($ \beta\text{CD} \cong 6 \text{ mM}$ e $ \text{AC} \cong 0,5 \text{ mM}$) [mg/L O_2 dissolvido a 25°C]	106
Tabela C3. Evolução temporal da concentração de oxigénio dissolvido das soluções 1 ($ \beta\text{CD} \cong 6 \text{ mM}$) e 2 ($ \beta\text{CD} \cong 6 \text{ mM}$ e $ \text{AC} \cong 0,5 \text{ mM}$) [mg/L O_2 dissolvido a 25°C]	107
Tabela D1. Resultados obtidos do crescimento microbiano para a solução 1A ($ \beta\text{CD} = 0 \text{ mM}$, $ \text{AC} _{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$) e respectivo tratamento de resultados	109
Tabela D2. Resultados obtidos do crescimento microbiano para a solução 2A ($ \beta\text{CD} = 3 \text{ mM}$, $ \text{AC} _{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$) e respectivo tratamento de resultados	111
Tabela D3. Resultados obtidos do crescimento microbiano para a solução 3A ($ \beta\text{CD} = 6\text{mM}$, $ \text{AC} _{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$) e respectivo tratamento de resultados	113
Tabela D4. Resultados obtidos do crescimento microbiano para a solução 4A ($ \beta\text{CD} = 9\text{mM}$, $ \text{AC} _{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$) e respectivo tratamento de resultados	115
Tabela D5. Resultados obtidos do crescimento microbiano para a solução 5A ($ \beta\text{CD} = 12\text{mM}$, $ \text{AC} _{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$) e respectivo tratamento de resultados	116
Tabela D6. Factores de transladação e valores para X 1ª ordem [mg SSV/L] transladados	119

LISTA DE ABREVIATURAS

AS	Ácido Sinápico
AC	Álcool Coniferílico
β CD	β -Ciclodextrina
rpm	Rotações por minuto
AS	Concentração de Ácido Sinápico
β CD	Concentração de Beta-Ciclodextrina
UV	Ultravioleta
t	Tempo
Abs	Absorvância
AS _{máx.}	Concentração teórica máxima inicial de Ácido Sinápico
vs	<i>Versus</i>
AC	Concentração de Álcool Coniferílico
AC _{máx.}	Concentração teórica máxima inicial de Álcool Coniferílico
ETAR	Estação de Tratamento de Água Residuais
SSV/L	Sólidos Suspensos Voláteis por volume de um Litro
SST/L	Sólidos Suspensos Totais por volume de um Litro
Sal	Concentração de Sal
~	Aproximadamente
OD	Oxigênio Dissolvido
Lamas	Concentração de lamas
X	Concentração de microrganismos
X0	Concentração de microrganismos inicial
μ	Taxa de crescimento microbiano
μ _{máx.}	Taxa de crescimento microbiano máxima
Ks	Constante de Monod

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO TEÓRICA

1.1. CONTEXTUALIZAÇÃO

O último século foi palco de um crescimento constante da industrialização, que apesar de proporcionar melhores condições económicas ao Homem, tem também implicado, ao longo dos tempos, o aumento da degradação do meio ambiente que nos rodeia. Actualmente, a problemática ambiental tem assumido uma importância cada vez maior, tornando-se uma das prioridades político-económicas, pelo que existe um esforço gradual e comum na sociedade de se tentar reverter a situação ambiental existente.

Entre as diversas formas de poluição existentes, a poluição ao nível dos efluentes líquidos assume grande importância, despertando o interesse e preocupação, não só de cientistas e ambientalistas, mas de toda a sociedade.

Os efluentes podem contaminar as águas superficiais e as águas subterrâneas, quer através de descargas ou da formação de lixiviados em aterros, podendo assim, ter implicação grave ao nível do abastecimento de água potável às populações, que deverá se encontrar sempre livre de contaminantes e nas melhores condições para o consumo.

A água é essencial á vida, como tal constitui um dos bens mais preciosos à disposição do Homem, que por se tratar de um bem escasso em inúmeras regiões do globo deve ser utilizado com racionalidade.

1.2. INDÚSTRIAS DE PAPEL E CELULOSE – EFLUENTES LÍQUIDOS

Um sector industrial que assume, actualmente, grande importância económica e ambiental são as indústrias de papel e celulose (pasta de papel), principalmente devido aos seus reflexos e impactos nas massas de água. Estas indústrias utilizam grandes volumes de água e como consequência também produzem uma enorme quantidade de efluentes líquidos.^[1]

Actualmente, este sector procura adequar-se às exigências legais no que concerne à protecção do ambiente, através de acções como a redução da produção de efluentes na fonte, recuperação e reaproveitamento de efluentes e desenvolvimento de tecnologias para tratamento externo.^[2]

Nestas indústrias, como anteriormente referido, são necessárias grandes quantidades de água, que são habitualmente provenientes de águas superficiais e, ocasionalmente, de águas subterrâneas. Uma grande parte da água captada volta posteriormente ao seu local de origem, sob a forma de efluente industrial.^[2]

Os efluentes líquidos das fábricas de pasta possuem, geralmente, uma carga poluidora muito mais elevada do que os provenientes das fábricas de papel.^[3] Normalmente, estes efluentes são divididos em função do estado físico, em matéria dissolvida e sólidos em suspensão.

Nas fábricas de produção de pasta, as águas residuais são essencialmente provenientes do conjunto das águas de lavagem, com os produtos químicos constituintes do licor de cozimento das fibras vegetais e são constituídas principalmente por fibras de celulose (principalmente lenhina) e substâncias orgânicas dissolvidas.

Os efluentes líquidos das fábricas de papel contêm essencialmente fibras, cola ou amido, tinta, corante, graxa, óleo e cloro residual proveniente da torre de branqueamento. Estes poluentes podem exercer efeitos nocivos sobre as massas de água, como a modificação do pH, coloração das águas (dificultando a penetração da luz solar, indispensável a algumas actividades fisiológicas dos seres aquáticos), consumo de oxigénio, produção de turbidez e ainda toxicidade.^[2]

Estudos realizados confirmam que os efeitos tóxicos destes poluentes na fauna incluem alterações reprodutivas, aumento do metabolismo e mudanças na estrutura das populações.^[4]

A maior problemática a nível ambiental, provocada pelos efluentes líquidos destas indústrias, reside principalmente no material em suspensão e nas substâncias orgânicas dissolvidas. Uma parte do material em suspensão trata-se de sólidos não sedimentáveis, que se encontram no estado coloidal, sendo que o seu principal constituinte são fibras (lenhinas processuais).

1.3. LENHINA – FIBRA DE CELULOSE

Falando em particular da descarga de efluentes líquidos que contêm compostos líquidos orgânicos na fase não aquosa (suspensões), estes têm elevado impacto ambiental e podem comprometer de forma substancial uma grande porção dos recursos de água. Entre os diversos compostos deste género existentes encontram-se as lenhinas. Na Figura 1.1. pode observar-se a derivação da via de biossíntese das lenhinas.

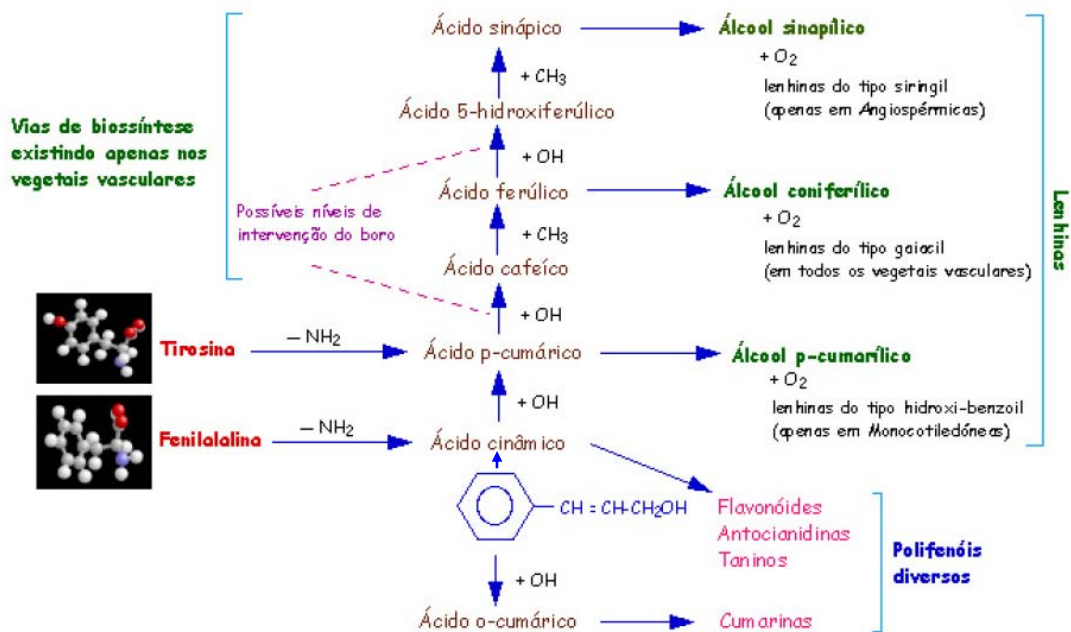


Figura 1.1. Derivação da via de biossíntese das lenhinas ^[5]

As lenhinas são polifenóis, constituídos por unidades de fenilpropano, apresentada na Figura 1.2.

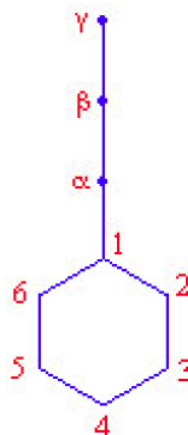


Figura 1.2. Representação de uma unidade fenilpropano ($\text{C}_6\text{-C}_3$) ^[5]

Esta unidade é responsável pela característica hidrofóbica das lenhinas. É geralmente aceite que as lenhinas podem ser obtidas através da polimerização de três monómeros: álcool cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, apresentados na Figura 1.3.

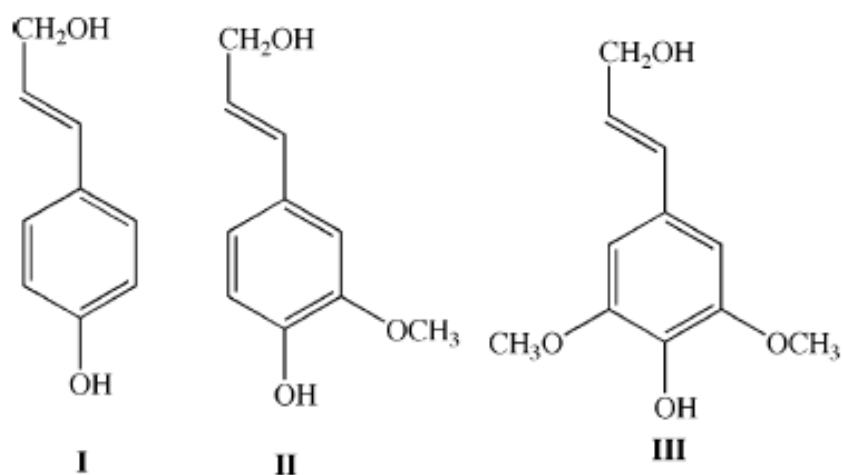


Figura 1.3. Representação do álcool cumarílico (I), álcool coniferílico (II) e álcool sinapílico (III) ^[6]

Estes compostos, que são de difícil biodegradação, encontram-se presentes nos efluentes líquidos das indústrias de papel e celulose, visto estes efluentes conterem lenhinas processuais, provenientes de reacções ocorridas na produção de celulose e papel.^[2]

A fraca eficiência de remoção deve-se principalmente à baixa solubilidade da grande maioria destes contaminantes orgânicos.^[8]

Desta forma, as técnicas disponíveis para o tratamento e remoção destes compostos apresentam um custo muito elevado pelo que para diminuir estas limitações financeiras actuais, encontram-se em estudo e desenvolvimento métodos inovadores e com uma relação custo/benefício mais atractiva.^[9]

Uma das metodologias utilizadas no aumento da capacidade de remoção destes contaminantes consiste no encapsulamento que resulta, em alguns casos, num aumento da solubilidade.

Um dos agentes que melhores resultados tem apresentado na melhoria da solubilidade de compostos (maioritariamente a nível farmacêutico) são as ciclodextrinas.

1.4. CICLODEXTRINAS

1.4.1. HISTÓRIA

As ciclodextrinas (CD) foram descobertas em 1891, quando *Villiers* reportou o seu aparecimento pela obtenção de uma pequena quantidade de material cristalino, aquando da degradação enzimática do amido da batata. *Villiers* nomeou o seu produto cristalino por “cellulosine”.

Em 1903, *Schardinger* foi capaz de isolar dois produtos cristalinos, dextrinas- α e β , que foram descritos no que se refere à sua falta de poder redutor. A estirpe bacteriana capaz de produzir estes produtos do amido não foi, infelizmente, conservada. Em 1904, *Schardinger* isolou um novo organismo capaz de produzir acetona e álcool etílico de açúcar e de um (qualquer) produto vegetal contendo amido. Posteriormente, descreveu esta estirpe, chamada *Bacillus macerans*, que também produz grandes quantidades de dextrinas (25-30%) a partir do amido.^[10]

Desta forma, as ciclodextrinas começaram a ser chamadas de dextrinas de *Schardinger*. Outras nomenclaturas pelas quais são conhecidas são cicloamilases ou ciclomaltoses.^[10, 11]

Apenas em 1935, *Schardinger* conseguiu isolar a dextrina γ . Foram também desenvolvidos vários sistemas de fraccionamento para a produção de ciclodextrinas.^[10]

Em 1938, *Freudenberg* confirmou a sua estrutura cíclica e a sua capacidade para formar complexos de inclusão.^[11] A estrutura circular das ciclodextrinas consiste num exterior hidrofílico e numa cavidade central hidrofóbica.

Só em 1942 é que foram determinadas as estruturas das α - e β - ciclodextrinas, por cristalografia de raios-x e em 1961, verificou-se a existência natural de outras ciclodextrinas.^[10]

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos formados por moléculas de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas alfa (1,4), obtidas através da degradação enzimática do amido.

As ciclodextrinas mais conhecidas são alfa, beta e gama constituídas por 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente, que adoptam a conformação de cadeira.^[12]

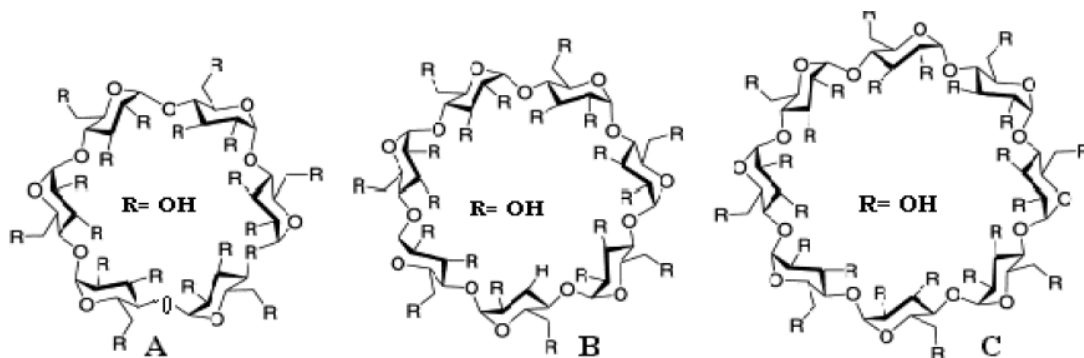


Figura 1.4. Estruturas de ciclodextrinas naturais:

A- α -ciclodextrina; B- β -ciclodextrina; C- γ -ciclodextrina ^[13]

1.4.2. INTERESSE

O principal interesse nas ciclodextrinas reside na sua capacidade de formar compostos de inclusão em solução aquosa, na qual moléculas de dimensões compatíveis são incluídas dentro da cavidade da ciclodextrina.

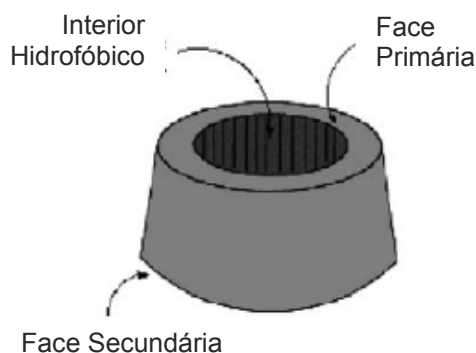


Figura 1.5. Representação da estrutura da ciclodextrina ^[adaptado de 10]

As ciclodextrinas são pois, como verificado através de diversos estudos efectuados recorrendo a ensaios raios-X sobre a sua estrutura, moléculas contendo uma superfície exterior com carácter hidrofílico, que permite a sua dissolução em água ao mesmo tempo que disponibilizam uma cavidade apolar, que proporciona uma matriz hidrofóbica, sendo capaz de formar complexos de inclusão com vários tipos de moléculas hóspedes, criando desta forma como que um “micro ambiente heterogéneo”.^[10]

Este “micro ambiente” proporcionado permite o estudo de diversos processos de encapsulamento de moléculas.

Uma ou mais moléculas, consoante a sua dimensão e peso molecular, podem ser encapsuladas na cavidade de uma, duas ou três ciclodextrinas.^[10]

1.4.3. PROPRIEDADES

As propriedades físicas e as dimensões moleculares das ciclodextrinas mais comuns apresentam-se discriminadas na Tabela 1. ^[14]

Tabela 1.1. Propriedades das ciclodextrinas ^[14]

Propriedade	α CD	β CD	γ CD
Número de unidades de glucose	6	7	8
Peso molecular (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade em água (g/100mL) 25 °C	14,5	1,85	23,2
Diâmetro Interno (Å)	4,9	6,2	7,9
Diâmetro Externo (Å)	14,6	15,4	17,5
Altura do cone (Å)	7,9	7,9	7,9
Volume da cavidade (Å ³)	176	346	510

A β -ciclodextrina é de entre os tipos de ciclodextrinas referidos, aquela que se encontra mais facilmente acessível, mais económica e, por esses motivos, a mais útil e a mais amplamente utilizada. ^[10]

Esta ciclodextrina é também a que apresenta menor solubilidade, em função do elevado número de ligações de hidrogénio intra-moleculares entre os grupos hidroxilo secundários existentes na molécula. Na α -ciclodextrina só quatro das suas seis possíveis ligações de hidrogénio podem ser estabelecidas, em virtude de uma unidade de glicose se encontrar em posição distorcida. A γ -ciclodextrina por ser uma molécula de estrutura mais flexível, é a mais solúvel das três ciclodextrinas conhecidas. ^[13]

Além destas ciclodextrinas criadas via processos naturais, muitas outras derivações têm vindo a ser sintetizadas. ^[15]

As moléculas de ciclodextrina possuem uma cavidade interna acessível para moléculas hóspedes de dimensões apropriadas de acordo com o diâmetro da ciclodextrina. Assim, dependendo da ciclodextrina em causa e, por sua vez, do tamanho da cavidade, estas são capazes de encapsular diferentes moléculas hóspedes. ^[16]

Devido à sua capacidade de se ligarem mutuamente de forma covalente ou não covalente, as ciclodextrinas podem também ser utilizadas como blocos unitários para a construção de complexos supramoleculares.

1.4.4. ENCAPSULAMENTO COM CICLODEXTRINAS

A mais importante característica das ciclodextrinas é a sua capacidade para formar complexos de inclusão, vulgo encapsulamento, com uma grande variedade de compostos líquidos, sólidos e até gasosos, por complexação molecular.^[10] Nestes complexos, tal como apresentado na Figura 1.6., a molécula hóspede é retida dentro da cavidade da molécula de ciclodextrina.

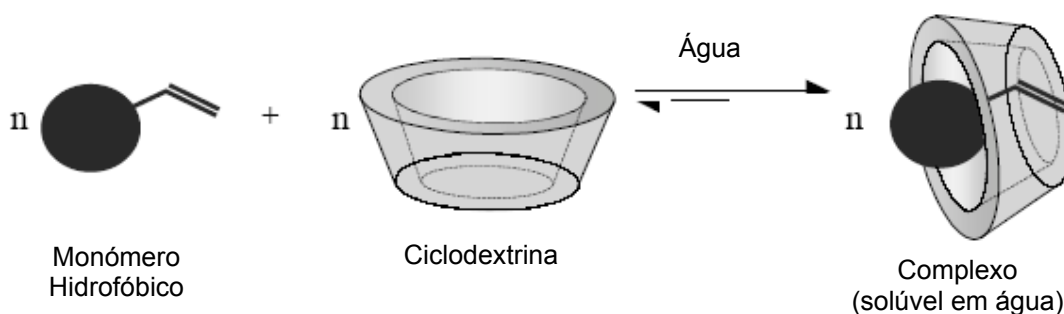


Figura 1.6. Representação esquemática da incorporação de um monómero na cavidade da ciclodextrina ^[adaptado de 17]

Esta formação de complexos é também uma relação de dimensões entre a molécula hóspede e a cavidade da ciclodextrina (molécula anfitriã).^[18]

Durante a formação dos complexos de inclusão, não ocorre a quebra ou formação de nenhuma ligação covalente.^[19]

As moléculas de água presentes no interior da cavidade da ciclodextrina, não conseguem satisfazer o potencial de ligações de hidrogénio desta e como tal apresentam uma entalpia mais elevada. A libertação de moléculas de água, com elevada entalpia, da cavidade da ciclodextrina, segundo um grande número de investigadores, constitui a principal força motora da complexação.^[10]

A energia global do sistema baixa, quando estas moléculas de água são substituídas pelas moléculas hóspedes hidrofóbicas que se encontram na solução, criando associações apolar-apolar e proporcionando à molécula de ciclodextrina um estado mais estável.

Contudo, existem outros mecanismos, apesar de menos preponderantes, que se encontram envolvidos na formação de complexos de inclusão, tais como interações de *van der Waals*, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogénio e efeitos de solvente.

Os complexos podem ser formados quer em solução, quer no estado cristalino, sendo que a água é o solvente de eleição, contudo a complexação por inclusão com ciclodextrinas pode ocorrer num sistema com outro co-solvente presente, bem como na presença de um solvente não aquoso.

Nem todos os compostos são passíveis de solubilizar em água, tornando a complexação uma tarefa muito demorada ou mesmo impossível de realizar. Nestes casos, a utilização de um solvente orgânico para dissolver o composto é desejável. O solvente utilizado deve poder ser removido facilmente por evaporação e não complexar com a ciclodextrina, sendo que o etanol e o éter dietílico são dois bons exemplos deste tipo de solventes.^[10]

A inclusão de um composto numa ciclodextrina, pode exercer profundas alterações nas propriedades físico-químicas desse composto, na medida em que este se encontra, pelo menos temporariamente, encapsulado na cavidade da ciclodextrina, dando origem a modificações benéficas do mesmo, que não seriam conseguidas de outra forma.^[10, 20]

Entre estas alterações de propriedades, salientam-se:

- A solubilidade e velocidade de dissolução de substâncias pouco solúveis podem ser significativamente aumentadas;
- Muitas substâncias podem ser protegidas contra hidrólise, oxidação, isomerização, foto-oxidação ou outros processos de decomposição;
- Compostos voláteis podem ser fixados, evitando-se a sua perda por evaporação;
- Compostos líquidos podem ser transformados em pós, para posterior incorporação em formas sólidas;
- Compostos incompatíveis podem ser misturados, quando um deles for complexado;
- O sabor e odor desagradáveis de algumas substâncias podem ser mascarados;
- Produtos facilmente solúveis para preparações injectáveis, podem ser obtidos por liofilização com ciclodextrinas;
- Melhoria da biodegradação do composto, devido ao efeito da complexação com ciclodextrinas, que consequentemente aumenta a velocidade de dissolução de substâncias pouco solúveis.

A lista de potenciais compostos passíveis de encapsulamento pelas ciclodextrinas é extensa e bastante variada, incluindo compostos como: hidrocarbonetos alifáticos, aldeídos, acetonas, álcoois, ácidos orgânicos, ácidos gordos, compostos aromáticos, gases e compostos polares como halogéneos, oxoácidos e aminas.^[21]

A capacidade das ciclodextrinas poderem formar complexos de inclusão com compostos hóspedes, depende de dois factores principais. Um deles é físico e depende do tamanho relativo da ciclodextrina face ao composto a ser encapsulado ou a determinados grupos funcionais desse composto. Se o composto não tiver a dimensão apropriada, não poderá ser incorporado correctamente na cavidade da ciclodextrina. O segundo factor crítico consiste nas interacções termodinâmicas entre os diferentes componentes do sistema em causa, nomeadamente a ciclodextrina, o composto a encapsular e o solvente. Para que o complexo se forme é necessário que exista uma força energética que atraia o composto hóspede para a cavidade da ciclodextrina.^[10]

Com base nas características apresentadas na Tabela 1.1. para os três tipos principais de ciclodextrinas, nomeadamente as dimensões do diâmetro interno da cavidade e o seu volume, a α -ciclodextrina complexa tipicamente moléculas de baixo peso molecular ou compostos com cadeias alifáticas, a β -ciclodextrina complexa principalmente compostos aromáticos e heterocíclicos e a γ -ciclodextrina pode encapsular moléculas maiores, como macrocíclicas e esteróides.

As associações efectuadas, entre as ciclodextrinas e os compostos hóspedes, não apresentam carácter permanente, mas sim um equilíbrio dinâmico, que depende da estabilidade do complexo criado bem como de interacções específicas, existentes localmente, entre os átomos de superfície.

Em geral, existem quatro interacções energeticamente favoráveis, que ajudam a alterar o equilíbrio para a formação dos complexos de inclusão:

- A libertação das moléculas polares de água da cavidade apolar da ciclodextrina;
- O aumento do número de ligações de hidrogénio formadas, proporcionadas pela libertação das moléculas de água;
- A redução das interacções repulsivas entre o composto hóspede hidrofóbico e o ambiente aquoso circundante;
- O aumento das interacções hidrofóbicas enquanto o composto hóspede é encapsulado na cavidade apolar da ciclodextrina.

Na formação do complexo, o equilíbrio inicial pode ser rapidamente atingido, contudo o equilíbrio final pode demorar a ser conseguido. Uma vez dentro da cavidade, o composto hóspede realiza ajustes de estrutura para tirar o máximo partido das fracas forças de *van der Waals* existentes.

Normalmente, o encapsulamento com ciclodextrinas ocorre devido a um fenómeno estequiométrico, em que geralmente apenas uma molécula hospede é incluída na cavidade da ciclodextrina. Contudo, no caso de compostos com baixo peso molecular, podem ser encapsuladas mais do que uma molécula e no caso de compostos de elevado peso molecular pode ser necessária mais do que uma molécula de ciclodextrina para realizar o encapsulamento. Por princípio, apenas uma porção do composto hóspede necessita de ser incluído na cavidade para ocorrer a formação de um complexo. Desta forma, as relações molares 1:1 nem sempre são obtidas, especialmente com compostos de baixo ou elevado peso molecular.^[10]

Existem diversas condicionantes que podem afectar a capacidade de encapsulamento da ciclodextrina, mediante determinado composto.

A temperatura apresenta mais que um efeito nos complexos formados com ciclodextrinas. O aquecimento pode aumentar tanto a solubilidade da ciclodextrina como do composto hóspede, pelo que pode aumentar a probabilidade de ocorrência de complexação. Contudo, ao mesmo tempo, também pode destabilizar o complexo formado, pelo que estes efeitos normalmente necessitam de ser estudados.

Se a quantidade de água ou outro solvente for aumentada, a solubilidade da ciclodextrina e do composto hóspede aumenta, pelo que a complexação ocorre mais facilmente. Contudo, à medida que a quantidade de solvente é aumentada progressivamente, a ciclodextrina e o composto hóspede podem-se tornar tão diluídos, que a reacção de complexação se torne menos extensa. Uma das condições que necessita, então, de ser optimizada é a quantidade de ciclodextrina para determinada quantidade de composto.

A complexação ocorre mais rapidamente quando o composto hóspede se encontra na forma solúvel ou disperso sob a forma de pequenas partículas.

1.4.5. ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DO ENCAPSULAMENTO

Uma das técnicas mais comumente utilizadas, para a avaliação da ocorrência de encapsulamento pela ciclodextrina conseguido com determinado composto e por consequência do equilíbrio de complexação, é o método da solubilidade na fase aquosa, descrito por *Higuchi e Connors*.^[22]

A análise da solubilidade na fase aquosa implica o estudo do efeito da ciclodextrina (solubilizador) no composto em estudo que se deseja ser encapsulado (substrato), que para tal é solubilizado.

Experimentalmente, o composto em causa é colocado em vários matrizes e adiciona-se um volume de água constante, contendo sucessivamente maiores concentrações de ciclodextrina. As soluções são agitadas, a temperatura aproximadamente constante, até que o equilíbrio se estabeleça, o que frequentemente pode demorar de alguns dias até uma semana. Posteriormente, o restante composto na fase sólida é removido e a solução analisada quanto à concentração total de substrato.^[10]

Constrói-se um diagrama de solubilidade, representando a concentração do substrato em função da respectiva concentração de ciclodextrina adicionada.

Este método permite não só avaliar qualitativamente os complexos formados, mas também pode ser utilizado para a determinação das constantes de equilíbrio do sistema.

A complexação com ciclodextrinas pode ser realizada com uma grande variedade de técnicas, que são utilizadas consoante as características do material activo, a cinética de equilíbrio, etc. Contudo, independentemente da técnica utilizada, esta depende da água para a promover, nem que se trate de uma pequena quantidade.

Entre as técnicas utilizadas para promover o encapsulamento de compostos nas ciclodextrinas encontram-se a mistura a seco, mistura em soluções e suspensões, a preparação de pastas e diversas técnicas termo-mecânicas.

Existem diversas técnicas para efectuar a avaliação do encapsulamento promovido pela ciclodextrina à molécula hóspede, nomeadamente

- Espectrofotometria de UV-Vísivel;
- Espectrofluorimetria (análise da fluorescência);^[16]
- Ressonância magnética nuclear de hidrogénio - permite a caracterização da formação do complexo, em solução, em termos de estequiometria e geometria. É uma das mais poderosas ferramentas para a interpretação de associações supramoleculares em solução aquosa;^[23]

- Ensaio electroquímico; [24]
- Microscopia de Força Atómica (AFM); [25]
- Microscopia de Varrimento por Efeito Túnel (STM); [25]
- Cromatografia líquida (ex.: HPLC), espectroscopia de massa – capazes de fornecer informação qualitativa e quantitativa sobre os complexos formados; [15]
- Detecção do índice de refração. [15]

1.4.6. APLICAÇÕES

Ao longo das últimas três décadas as ciclodextrinas passaram de uma curiosidade química para uma classe multi-funcional de compostos com inúmeras aplicações nas indústrias alimentares, farmacêuticas, protecção ambiental, agricultura, química analítica, alimentação, indústria cosmética e indústria têxtil. [26, 10]

As ciclodextrinas têm o seu êxodo de aplicação na indústria farmacêutica, principalmente para melhorar a solubilidade de drogas moderadamente solúveis. Outras vantagens incluem o disfarce de gostos ou odores desagradáveis, estabilização de compostos sensíveis à degradação causada por exemplo pela temperatura, oxidação, hidrólise ou luz, melhorando, desta forma, a sua biodegradação.

As ciclodextrinas têm a capacidade para estabilizar compostos contra a degradação. No entanto, estas também podem demonstrar capacidade de catalisador por forma a acelerar reacções químicas, por exemplo, reacções de hidrólise. Além disso, podem ser consideradas como alguns dos mais importantes blocos de construção de estruturas supramoleculares e unidades funcionais em química supramolecular e nanotecnologias. [15]

Como foi referido anteriormente, as ciclodextrinas são usadas com finalidades muito diversas. São aplicadas em produtos farmacêuticos, alimentícios, cosméticos, pesticidas, produtos químicos e química analítica. [20]

Nas aplicações mencionadas, as ciclodextrinas podem ser usadas para estabilizar emulsões, espumas e materiais que sejam sensíveis à luz, oxigénio ou calor. Podem ser utilizadas no controlo da volatilidade e potenciais aromáticos de especiarias ou podem aumentar a solubilidade de substâncias hidrofóbicas. Apresentam habilidade para modificar o sabor, aroma, a textura ou cor, aumentando o espectro de usos de diversas substâncias. [11]

1.5. BIODEGRADABILIDADE E CRESCIMENTO MICROBIANO

1.5.1. LAMAS ACTIVADAS E COMUNIDADE DE BIOMASSA

Os princípios inerentes ao processo de lamas activadas não são muito complexos e difíceis de compreender. De facto, até há algumas décadas atrás, alguns autores consideravam que se dominava tudo o que alguma vez se iria saber sobre este assunto e que estudos extra se iriam revelar sem sentido, sendo comum a afirmação: “*the bugs eat the waste*”, que mais é então necessário saber? ^[27]

Nos dias de hoje, a atitude de alguns investigadores encontra-se completamente revertida, sentindo que o processo de lamas activadas é demasiado complexo para ser compreendido de forma suficientemente clara, e como tal, poder ser controlado eficazmente de forma a tratar o efluente atingindo o tipo de qualidade, em termos ambientais, requerida actualmente. ^[27]

Ambas as atitudes descritas, fornecem impressões exageradas em ambos os sentidos e erradas sobre o processo em causa. A realidade sobre o processo de lamas activadas encontra-se algures entre estes pontos de vista extremos. ^[27]

Actualmente, o processo de lamas activadas tem sido utilizado para o tratamento de efluentes líquidos com características bastante diversas, incluindo aqueles que contêm substâncias tóxicas. ^[27]

Os processos de tratamento com recurso a lamas activadas são considerados, hoje em dia, como o método mais eficiente para o tratamento biológico dos efluentes líquidos, quer industriais, quer municipais. ^[28]

O processo de lamas activadas é baseado no desenvolvimento de uma comunidade microbiológica heterogénea, numa base aeróbia, que permite que o sistema seja consideravelmente flexível a ligeiras flutuações na composição do efluente líquido. ^[28]

Os processos de tratamento de efluentes com lamas activadas são caracterizados pelo facto de, na generalidade, a comunidade de biomassa se encontrar sob a forma de suspensão no efluente. Esta biomassa suspensa pode-se encontrar na forma de células individuais ou pequenos aglomerados (condição dispersa), ou sob a forma de grandes flocos (condição floculada). É esta última condição que surge normalmente como situação dominante para a comunidade de biomassa, nos processos de lamas activadas, denominando-se de biomassa suspensa floculada. ^[29]

1.5.2. BIODEGRADABILIDADE E RESPIROMETRIA

A biodegradação dos efluentes, ou seja, a degradação dos compostos poluentes conseguida com a comunidade de biomassa existente nos processos de lamas activadas, é um elemento essencial para uma correcta compreensão e execução do sistema de tratamento de efluentes, permitindo uma correcta gestão do mesmo. Como tal, o seu estudo deverá ser efectuado de uma forma rigorosa e completa.

Como é compreensível, a comunidade de biomassa representa um papel crítico muito importante na biodegradação do efluente nos processos de tratamento com lamas activadas e consequentemente no seu estudo.

A actividade e concentração da população de biomassa (microrganismos) é crucial para o funcionamento efectivo do sistema, e a presença de determinadas substâncias inibitórias em concentrações elevadas poderá resultar na redução da actividade dos microrganismos presentes. A existência de compostos cujas propriedades são potencialmente tóxicas, para os microrganismos das lamas activadas, é uma das principais causas de diminuição de eficiência do tratamento biológico.^[28]

Uma das formas mais utilizadas actualmente para avaliar a possibilidade de tratamento biológico do efluente, bem como prever os resultados obtidos com o seu tratamento, recorrendo a processos de lamas activadas, é a respirometria.

A respirometria consiste na medição das taxas de consumo de oxigénio da comunidade de biomassa existente, ou seja, pelos microrganismos presentes nas lamas activadas, e pode ser utilizado como um indicador credível da actividade microbiológica em meios aeróbios.^[28]

Como foi referido anteriormente, as lamas activadas são uma mistura flocular de microrganismos, constituída maioritariamente por bactérias que degradam múltiplos substratos para crescer. O crescimento destes organismos activos na biomassa de um processo de lamas activadas, encontra-se dependente da presença de hidratos de carbono, proteínas, ácidos nucleicos e lípidos, no efluente a tratar.^[28]

Os microrganismos requerem a presença de oxigénio dissolvido para procederem à oxidação do alimento orgânico e para fornecer carbono orgânico de forma a que estes possam sintetizar os compostos necessários à sua reprodução. Este consumo de oxigénio é denominado de respiração e encontra-se intimamente ligado ao crescimento

da comunidade de biomassa nas lamas activadas e conseqüentemente à biodegradação do efluente residual.^[28]

A relação existente entre a respiração, crescimento da biomassa e o consumo total de carbono orgânico, que corresponde à biodegradação, encontra-se representado na Figura 1.7.

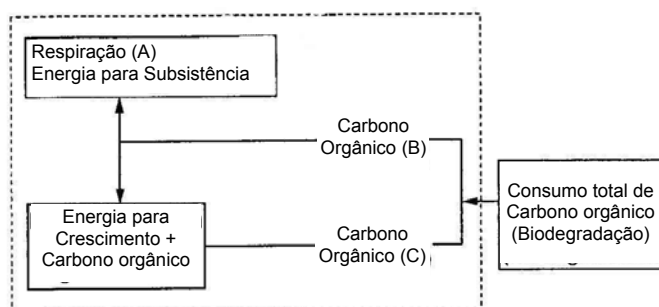


Figura 1.7. Relacionamento entre respiração, crescimento e biodegradação ^[adaptado de 28]

Através da medição da taxa de respiração (A), é possível determinar a quantidade de carbono orgânico utilizado para fornecer energia (B), bem como prever a energia utilizada para o crescimento e conseqüentemente determinar a quantidade de carbono orgânico utilizado para este efeito (C), visto que pode ser assumido que existe uma relação directamente proporcional entre esta energia e a quantidade de carbono orgânico utilizado para o crescimento (C). Como tal, a medição da taxa de respiração (A), permite a subsequente determinação da taxa de biodegradação.^[28]

Devido à estreita relação existente entre a respiração, crescimento e respectiva biodegradação, torna-se evidente que, se o crescimento da biomassa é inibido, as necessidades de energia diminuem e a taxa de respiração é reduzida. Desta forma, como é necessária uma menor quantidade de carbono para a respiração, a taxa de consumo de carbono e a correspondente biodegradação diminuem.^[27]

A maior parte dos métodos de respirometria são baseados na medição do oxigénio presente no efluente em tratamento, através da utilização de um sensor de oxigénio dissolvido. Têm sido desenvolvidos diversos tipos de sensores respirométricos, entre os quais se destacam os do tipo *flowing gas-static liquid*. Estes sensores possuem a vantagem de poderem ser utilizados em concentrações de lamas relativamente elevadas (2000-4000 mg SSV/L), devido à contínua introdução de oxigénio. Neste caso, o coeficiente de transferência de oxigénio e a concentração de saturação de oxigénio dissolvido necessitam de ser conhecidos para a determinação da taxa de respiração.^[28, 30]

1.5.3. MODELOS DE AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO

Nos ensaios de crescimento de microrganismos realizados em reactor “batch” verificam-se, normalmente, as seguintes fases de crescimento, caso sejam recolhidas amostras ao longo do tempo para quantificação do crescimento dos microrganismos: ^[31]

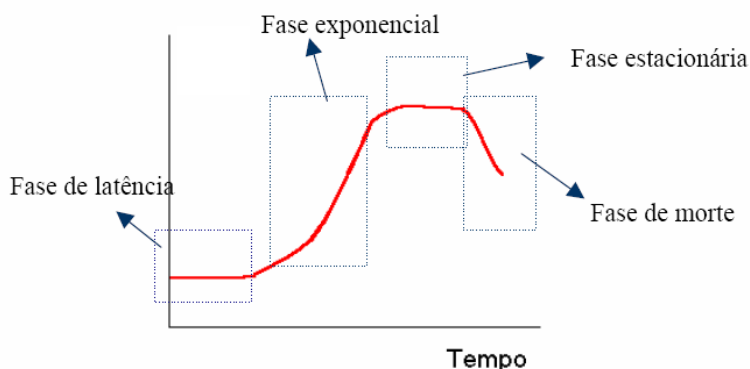


Figura 1.8. Fases de metabolismo no crescimento de microrganismos ^[31]

1. Fase de latência ou fase *lag*: fase que só ocorre quando os microrganismos não estão adaptados ao meio. A taxa de crescimento é praticamente nula, ou seja, o número de células não aumenta;
2. Fase de crescimento exponencial: as células crescem a uma taxa constante e máxima e sintetizam reservas de alimentos para serem utilizadas quando houver pouco ou nenhum alimento;
3. Fase estacionária: o número de células novas é praticamente igual ao número de células que morrem, de modo que a densidade populacional não muda (fase de velocidade de crescimento nula).
4. Fase de decaimento: fase em que a taxa de morte excede a taxa de crescimento. Esta fase também é conhecida como fase de respiração endógena, pois em condições de falta de substrato uma proporção considerável de células sobrevive utilizando as suas reservas internas para manutenção e sobrevivência.

1.5.3.1. MODELO DE MONOD

O modelo de Monod é utilizado para reacções com as mesmas fases de metabolismo citadas anteriormente, não existindo, no entanto, a fase de decaimento.

O modelo de Monod é um modelo microbiológico clássico, com aplicação na avaliação de processos de biodegradação^[32], que foi desenvolvido por Monod em 1942 como um modelo empírico para descrever o crescimento microbiótico.^[33]

Este distingue-se de modelos de crescimento clássico, tais como os propostos por Gompertz (1825), Verhulst (1845, 1847) ou Richards (1959), devido à introdução do conceito de nutriente limitante. Um nutriente é definido como limitante quando existe uma relação causa-efeito entre o seu consumo e o terminus do crescimento. Este aspecto determinístico do modelo de Monod pode ser uma das razões do seu sucesso.^[32]

O modelo de Monod tem sido, durante mais de 60 anos, um dos modelos mais frequentemente utilizados em microbiologia.^[33]

Uma das muitas aplicações práticas importantes do modelo de Monod é a avaliação da cinética de biodegradação de poluentes orgânicos em sistemas ambientais (Blok, 1994; Blok, Struys, 1996).^[34, 35]

O modelo de Monod descreve o crescimento dos microrganismos com base em três parâmetros:

- taxa específica de crescimento máxima (μ_m);
- constante de meia saturação ou de Monod (K_s);
- concentração do substrato limitante (S).^[33; 36]

No caso da cinética de biodegradação, estes parâmetros podem ser utilizados como critério para a avaliação da biodegradabilidade dos poluentes orgânicos de um determinado efluente.^[33]

A taxa específica de crescimento máxima representa a taxa máxima de crescimento obtida para condições não limitantes. A constante de Monod (K_s) é a concentração do nutriente limitante para a qual a taxa de crescimento é metade da taxa de crescimento máxima e representa a afinidade do organismo face aos nutrientes existentes.

Os valores de μ_m e K_s dependem do microrganismo, do nutriente limitante, do meio e de factores como temperatura e pH.^[36]

O modelo de Monod é descrito pela equação apresentada seguidamente:^[32]

$$\frac{1}{X} \times \frac{dX}{dt} = \mu = \frac{\mu_m \times S}{K_s + S} \quad (\text{equação 1.})$$

Em que μ é a taxa específica de crescimento microbiano e X representa a concentração de microrganismos.

Na Figura 1.9. é representada a relação entre μ e S , prevista pelo modelo de Monod, uma hipérbole que representa μ_m como valor assintótico.^[31]

Em condições de abundância de substrato, os microrganismos crescem com velocidade máxima (μ_m). Quando o substrato deixa de se encontrar em abundância no meio, μ diminui, até atingir o valor de zero quando a concentração de substrato se esgotar completamente.^[31]

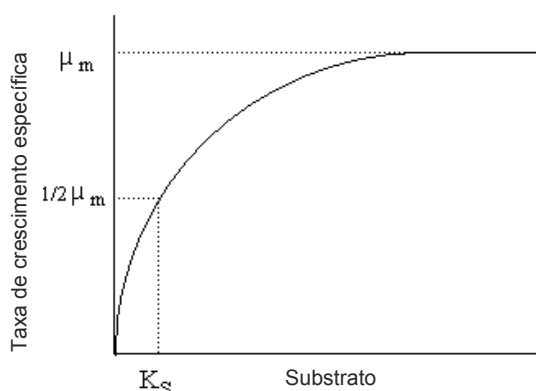


Figura 1.9. Relação entre μ e S prevista pelo modelo de Monod ^[adaptado de 36]

Os objectivos desta dissertação são o estudo do encapsulamento de monómeros da lenhina pela β -ciclodextrina, tendo em vista a sua aplicação e utilização no tratamento de efluentes das indústrias do papel e celulose.

Os complexos foram avaliados quimicamente por forma a avaliar a sua influência na solubilidade dos monómeros em estudo: ácido sinápico e álcool coniferílico. Foi igualmente avaliada e comparada a biodegradabilidade dos monómeros livres ou quando encapsulados pela β -ciclodextrina.

CAPÍTULO 2. ESTUDO QUÍMICO DO ENCAPSULAMENTO DO ÁCIDO SINÁPICO E DO ÁLCOOL CONIFERÍLICO

Durante este capítulo apresenta-se o estudo químico de compostos modelo da lenhina. O álcool sinápico encontra-se disponível comercialmente a preços muito elevados pelo que, com o objectivo de sistematizar e otimizar os estudos de solubilidade e de complexação, se optou por utilizar um precursor deste álcool, o Ácido Sinápico (AS) que é de mais fácil obtenção. Simultaneamente, o estudo deste ácido é igualmente relevante uma vez que também se encontra habitualmente presente nos efluentes.

Posteriormente, efectuaram-se ensaios com um outro composto modelo, o Álcool Coniferílico (AC).

2.1. PARTE EXPERIMENTAL

2.1.1. ÁCIDO SINÁPICO

2.1.1.1. MATERIAIS

- β -Ciclodextrina (β CD) [Fórmula molecular: $C_{42}H_{70}O_{35}$; Peso molecular: 1134,88 g/mol; Sigma-Aldrich]
- Ácido Sinápico [Fórmula molecular: $C_{11}H_{12}O_5$; Peso molecular: 224,21 g/mol; Sigma-Aldrich]
- Água desionizada
- Filtros de seringa [Schleicher & Schuell]
- Micropipetas automáticas [Eppendorf Research]
- Banho de ultra-sons [VWR USC100TH]
- Incubadora [IVYMEN 200D]
- Espectrofotómetro de UV-Visível [UV-1700 PharmaSpec Shimadzu]
- Balança analítica [Precisa 205A SuperBal-series]
- Vórtex [B.Braun, Certomat[®] MV]

2.1.1.2. MÉTODOS

Para a optimização da metodologia, as soluções foram preparadas de duas formas distintas: preparação de soluções a partir de uma solução-mãe ou preparação directa das soluções à concentração requerida, através da introdução da quantidade de composto necessária. A conjugação deste procedimento para os dois compostos (AS e β CD) permitiu a aplicação de três métodos distintos.

Foram preparadas soluções em AS de várias concentrações, nomeadamente 15, 30, 50, 60 e 100 μ M (concentração teórica máxima). A concentração das soluções de β CD variou entre 0 e 21 mM. Posteriormente à preparação das soluções conjugadas (soluções com AS e β CD), estas foram incubadas (300 rpm; 25 °C).

O tempo de incubação foi, também, um parâmetro em estudo, variando de 48h a 88h. Após incubação, as soluções foram filtradas (filtros de porosidade igual a 0,45 μ M) e analisadas por espectrofotometria de UV-Visível, na gama de comprimento de onda entre 190nm e 420nm, utilizando cuvetes de quartzo.

2.1.1.2.1. MÉTODO A

Preparou-se uma solução-mãe de AS por pesagem rigorosa de uma quantidade apropriada e posterior dissolução em 100,00 mL. A solução foi colocada num banho de ultra-sons durante 5 minutos. Colocou-se o volume necessário desta solução-mãe de AS em cada balão volumétrico onde já se encontrava a β CD. Por fim, perfez-se cada balão volumétrico com água desionizada. Obteve-se assim, soluções com as concentrações desejadas de β CD e AS.

Os dados experimentais usados na preparação da experiência resumem-se na Tabela 2.1. Após preparação das soluções estas foram incubadas (300 rpm; 25 °C) durante 48h.

Tabela 2.1. Preparação das soluções com β CD e AS utilizando o método A

Solução	V _{final} solução[L]	m(β CD) [g]	\mathbf{\beta}CD [mM]	V _{solução-mãe AS} [mL]	m(AS) [g]	\mathbf{AS} _{máx.} ⁽¹⁾ [\mathbf{\mu}M]
1	0,010000	0,0000	0,00	0,150	3,62E-05	16,1
2	0,010000	0,0297	2,62	0,150	3,62E-05	16,1
3	0,010000	0,0582	5,13	0,150	3,62E-05	16,1
4	0,010000	0,0881	7,76	0,150	3,62E-05	16,1
5	0,010000	0,1176	10,36	0,150	3,62E-05	16,1
Solução	V _{final} solução[L]	m(β CD) [g]	\mathbf{\beta}CD [mM]	V _{solução-mãe AS} [mL]	m(AS) [g]	\mathbf{AS} _{máx.} ⁽¹⁾ [\mathbf{\mu}M]
6	0,010000	0,0000	0,00	0,300	7,23E-05	32,2
7	0,010000	0,0313	2,76	0,300	7,23E-05	32,2
8	0,010000	0,0593	5,22	0,300	7,23E-05	32,2
9	0,010000	0,0886	7,81	0,300	7,23E-05	32,2
10	0,010000	0,1174	10,34	0,300	7,23E-05	32,2
Solução	V _{final} solução[L]	m(β CD) [g]	\mathbf{\beta}CD [mM]	V _{solução-mãe AS} [mL]	m(AS) [g]	\mathbf{AS} _{máx.} ⁽¹⁾ [\mathbf{\mu}M]
11	0,010000	0,0000	0,00	0,600	1,45E-04	64,5
12	0,010000	0,0298	2,63	0,600	1,45E-04	64,5
13	0,010000	0,0602	5,30	0,600	1,45E-04	64,5
14	0,010000	0,0886	7,81	0,600	1,45E-04	64,5
15	0,010000	0,1175	10,35	0,600	1,45E-04	64,5

A concentração referenciada com ⁽¹⁾ traduz uma concentração teórica máxima, correspondente à quantidade de AS que existe na solução inicial.

2.1.1.2.2. MÉTODO B

Pesou-se rigorosamente uma quantidade apropriada de AS (Tabela 2.2.) para cada balão volumétrico. Paralelamente, preparou-se uma solução-mãe de β CD com concentração 0,0210 mol/L, a qual foi submetida a banho de ultra-sons durante o tempo necessário à completa solubilização da β CD. Colocou-se o volume necessário desta solução-mãe de β CD em cada balão volumétrico onde já se encontrava o AS. Por fim, fez-se cada balão volumétrico com água desionizada. Obtiveram-se, assim, soluções com as concentrações desejadas de β CD e AS. Resumem-se os dados experimentais usados na preparação da experiência na Tabela 2.2. Após preparação das soluções estas foram incubadas (300 rpm; 25 °C) durante 48h.

Tabela 2.2. Preparação das soluções com β CD e AS utilizando o método B

Solução	V _{final} solução [L]	[β CD] [mM]	V _{solução-mãe} β CD [mL]	m(AS) [g]	[AS] _{máx.} ⁽¹⁾ [μ M]
1	0,010000	0,00	0,00	2,60E-04	116
2	0,010000	3,00	1,42	2,60E-04	116
3	0,010000	6,00	2,85	2,30E-04	103
4	0,010000	9,00	4,27	2,00E-04	89,2
5	0,010000	12,00	5,69	2,80E-04	125

A concentração referenciada com ⁽¹⁾ traduz uma concentração teórica máxima, correspondente à quantidade de AS que existe na solução inicial.

2.1.1.2.3. MÉTODO C

Preparou-se uma solução-mãe de β CD com concentração aproximada a 0,025 mol/L, a qual foi colocada em banho de ultra-sons durante o tempo necessário à completa solubilização da β CD. Colocou-se um volume apropriado de solução-mãe de β CD em cada balão volumétrico.

Preparou-se uma solução-mãe de AS por pesagem rigorosa de uma quantidade apropriada de AS por forma à obtenção de uma solução com concentração teórica máxima de 0,001 mol/L. Após homogeneização da solução-mãe de AS em vórtex, colocou-se o volume adequado desta solução em cada balão volumétrico, por forma à obtenção das soluções com as concentrações desejadas, perfazendo-se com água desionizada. Obtiveram-se, assim, soluções com as concentrações desejadas de β CD e AS. Os dados experimentais usados na preparação da experiência resumem-se nas Tabelas 2.3. e 2.4.

Após a preparação das soluções descritas na Tabela 2.3., estas foram incubadas (300 rpm; 25 °C) durante 48h.

Após a preparação das soluções descritas na Tabela 2.4., estas foram incubadas (300 rpm; 25 °C), efectuando-se a sua análise diariamente, até um período total de incubação de 88h.

Tabela 2.3. Preparação das soluções com β CD e AS utilizando o método C

Solução	V _{final} solução [L]	V _{solução-mãe} β CD [mL]	\mathbf{\beta CD} [mM]	V _{solução-mãe} AS [mL]	m(AS) [g]	\mathbf{AS} _{máx.} ⁽¹⁾ [\mathbf{\mu M}]
1	0,010000	0,00	0,00	0,300	6,73E-05	30,0
2	0,010000	1,16	3,00	0,300	6,73E-05	30,0
3	0,010000	2,32	6,00	0,300	6,73E-05	30,0
4	0,010000	3,47	9,00	0,300	6,73E-05	30,0
5	0,010000	4,63	12,00	0,300	6,73E-05	30,0
6	0,010000	5,79	15,00	0,300	6,73E-05	30,0
7	0,010000	6,95	18,00	0,300	6,73E-05	30,0
8	0,010000	8,11	21,00	0,300	6,73E-05	30,0

Solução	V _{final} solução [L]	V _{solução-mãe} β CD [mL]	\mathbf{\beta CD} [mM]	V _{solução-mãe} AS [mL]	m(AS) [g]	\mathbf{AS} _{máx.} ⁽¹⁾ [\mathbf{\mu M}]
9	0,010000	0,00	0,00	0,50	1,12E-04	50,0
10	0,010000	1,16	3,00	0,50	1,12E-04	50,0
11	0,010000	2,32	6,00	0,50	1,12E-04	50,0
12	0,010000	3,47	9,00	0,50	1,12E-04	50,0
13	0,010000	4,63	12,00	0,50	1,12E-04	50,0
14	0,010000	5,79	15,00	0,50	1,12E-04	50,0
15	0,010000	6,95	18,00	0,50	1,12E-04	50,0
16	0,010000	8,11	21,00	0,50	1,12E-04	50,0

Solução	V _{final} solução [L]	V _{solução-mãe} β CD [mL]	\mathbf{\beta CD} [mM]	V _{solução-mãe} AS [mL]	m(AS) [g]	\mathbf{AS} _{máx.} ⁽¹⁾ [\mathbf{\mu M}]
17	0,010000	0,00	0,00	1,00	2,24E-04	100
18	0,010000	1,16	3,00	1,00	2,24E-04	100
19	0,010000	2,32	6,00	1,00	2,24E-04	100
20	0,010000	3,47	9,00	1,00	2,24E-04	100
21	0,010000	4,63	12,00	1,00	2,24E-04	100
22	0,010000	5,79	15,00	1,00	2,24E-04	100
23	0,010000	6,95	18,00	1,00	2,24E-04	100
24	0,010000	8,11	21,00	1,00	2,24E-04	100

A concentração referenciada com ⁽¹⁾ traduz uma concentração teórica máxima, correspondente à quantidade de AS que existe na solução inicial.

Tabela 2.4. Preparação das soluções com β CD e AS utilizando o método C

Solução	V _{final} solução [L]	V _{solução-mãe} β CD [mL]	\mathbf{\beta CD} [mM]	V _{solução-mãe} AS [mL]	m(AS) [g]	\mathbf{AS} _{máx.} ⁽¹⁾ [\mathbf{\mu M}]
1	0,02500	0,00	0,00	4,75	1,12E-03	100
2	0,02500	6,23	3,00	4,75	1,12E-03	100
3	0,02500	12,46	6,00	4,75	1,12E-03	100
4	0,02500	18,69	9,00	4,75	1,12E-03	100
5	0,02500	24,92	12,00	4,75	1,12E-03	100
6	0,02500	31,15	15,00	4,75	1,12E-03	100

A concentração referenciada com ⁽¹⁾ traduz uma concentração teórica máxima, correspondente à quantidade de AS que existe na solução inicial.

2.1.2. ÁLCOOL CONIFERÍLICO

2.1.2.1. MATERIAIS

- β -Ciclodextrina [Fórmula molecular: $C_{42}H_{70}O_{35}$; Peso molecular: 1134,88 g/mol ; Sigma-Aldrich]
- Álcool Coniferílico [Fórmula molecular: $C_{10}H_{12}O_3$; Peso molecular: 180,20 g/mol; Sigma-Aldrich]
- Água desionizada
- Hidróxido de Sódio 0,1 mol/L [Sigma-Aldrich]
- Papel de alumínio
- Parafilme
- Filtros de seringa [Schleicher & Schuell]
- Micropipetas automáticas [Eppendorf Research]
- Banho de ultra-sons [VWR USC100TH]
- Incubadora [IVYMEN 200D N/S 0020082]
- Espectrofotômetro de UV-Visível [UV-1700 PharmaSpec Shimadzu]
- Balança analítica [Precisa 205A SuperBal-series]
- Medidor de pH [Consort C831a]

2.1.2.2. MÉTODOS

2.1.2.2.1. AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO ÁLCOOL CONIFERÍLICO

Foram preparadas soluções com 700 μ M em AC (concentração teórica máxima) e com concentração em β CD a variar entre 0 e 15 mM.

As soluções preparadas foram cobertas com parafilme e papel de alumínio (uma vez que o AC é sensível ao ar e à luz) e incubadas (300 rpm; 25 °C) durante 147,5h. Posteriormente, as soluções foram filtradas (filtros de porosidade igual a 0,45 μ M) e analisadas por espectrofotometria de UV-Visível, na gama de comprimento de onda entre 190 nm e 350 nm, utilizando cuvetes de quartzo.

Para a preparação das soluções foi utilizado o “Método B” utilizado para os estudos de solubilidade do Ácido Sinápico.

A preparação das soluções foi efectuada pela introdução da massa apropriada de AC em cada balão volumétrico. Preparou-se uma solução-mãe de β CD com concentração de 0,024 mol/L, a qual foi colocada em banho de ultra-sons durante o tempo necessário à completa solubilização da β CD. Colocou-se o volume necessário desta solução-mãe de β CD em cada balão volumétrico onde já se encontrava o AC e perpez-se cada balão volumétrico com água desionizada. Obtiveram-se assim, soluções com as concentrações desejadas de β CD e AC. Os dados experimentais usados na preparação da experiência resumem-se na Tabela 2.5.

Tabela 2.5. Preparação das soluções com β CD e AC

Solução	V _{final} solução [L]	[β CD] [mM]	V _{solução-mãe} β CD [mL]	m(AC) [g]	AC _{máx.} ⁽¹⁾ [μ M]
1	0,05000	0,00	0,00	6,40E-03	710
2	0,05000	3,00	6,12	6,10E-03	677
3	0,05000	6,00	12,24	6,40E-03	710
4	0,05000	9,00	18,36	6,30E-03	699
5	0,05000	12,00	24,48	6,40E-03	710
6	0,05000	15,00	30,60	6,40E-03	710
7	0,05000	0,00	0,00	5,90E-03	655
8	0,05000	6,00	12,24	5,90E-03	655

A concentração referenciada com ⁽¹⁾ traduz uma concentração teórica máxima, correspondente à quantidade de AC que existe na solução inicial.

As soluções 7 e 8 foram preparadas para serem utilizadas como controlo nos ensaios de biodegradabilidade.

2.1.2.2.2. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO ÁLCOOL CONIFERÍLICO

Efectuou-se um estudo por forma a avaliar e comparar a estabilidade do AC na forma livre e quando encapsulado pela β CD.

Preparou-se uma solução de β CD com concentração 12 mM, a qual foi submetida a banho de ultra-sons durante o tempo necessário à completa solubilização da β CD. Paralelamente, pesou-se para cada um de 2 balões volumétricos, uma quantidade rigorosa de AC. Perpez-se um dos balões volumétricos com água desionizada (Solução 1)

enquanto que o outro com solução de β CD (Solução 2). Resumem-se os dados experimentais usados na preparação da experiência na Tabela 2.6. As soluções foram protegidas ao abrigo da luz e do ar e incubadas (300 rpm; 25 °C) durante 72h.

Tabela 2.6. Preparação das soluções com β CD e AC

Solução	V _{final} solução[L]	m(β CD) [g]	\mathbf{\beta}CD [mM]	m(AC) [g]	\mathbf{AC} _{\text{máx.}}^{(1)} [mM]
1	0,10000	-----	-----	0,0185	1,03
2	0,10000	1,3633	12,012	0,0185	1,03

A concentração referenciada com ⁽¹⁾ traduz uma concentração teórica máxima, correspondente à quantidade de AC que existe na solução inicial.

No final da incubação, efectuou-se a preparação das soluções de acordo com a Tabela 2.7.

Tabela 2.7. Preparação e concentrações das soluções A-D

Gobelé	Solução 1	Solução 2	Água Desionizada	\mathbf{\beta}CD [mM]	\mathbf{AC} _{\text{máx.}}^{(1)} [mM]
A	20 mL	-----	20 mL	0,0	0,5
B	-----	20 mL	20 mL	6,0	0,5
C	20 mL	-----	20 mL	0,0	0,5
D	-----	20 mL	20 mL	6,0	0,5

A concentração referenciada com ⁽¹⁾ traduz uma concentração teórica máxima, correspondente à quantidade de AC que existe na solução inicial.

Mediu-se o pH das 4 soluções (A-D) e acertou-se, com hidróxido de sódio 0,1M, a pH 7,2. Imediatamente após o acerto do pH, efectuou-se a análise espectrofotométrica das 4 soluções (A-D), no comprimento espectral entre 190nm e 350nm.

As soluções C e D foram protegidas ao abrigo da luz e do ar e incubadas (300 rpm; 25 °C) durante 24h. As soluções A e B, foram alvo de acertos de pH, filtração e análises espectrofotométricas a t = 50min, t = 90min, t = 130min.

No final das 24h, efectuou-se o acerto de pH, filtrou-se e analisou-se espectrofotometricamente as 4 soluções (A-D).

2.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1. ÁCIDO SINÁPICO

2.2.1.1. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA POR UV-VISÍVEL DO ÁCIDO SINÁPICO

Com o objectivo da análise da formação do complexo por espectrofotometria de UV-Visível e determinação quantitativa do AS presente em solução, traçou-se o espectro de UV-Visível no intervalo espectral entre 190 nm e 420 nm, de uma solução de AS de concentração 50 μ M (Figura 2.1.). Verificou-se o aparecimento de dois 2 máximos: um a 228 nm e outro a 308 nm.

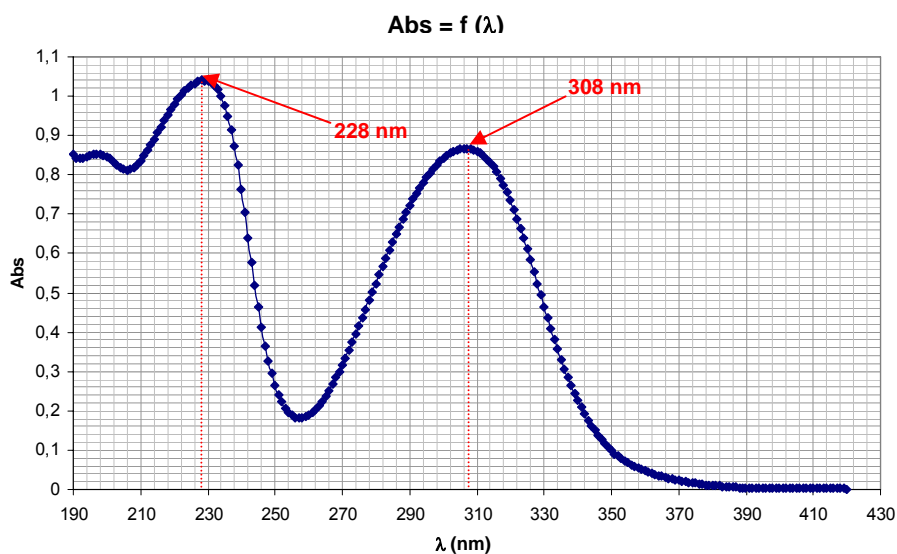


Figura 2.1. Espectro do Ácido Sinápico na zona do UV-Visível (190 nm a 420 nm)

Com a intenção de desenvolver um método quantitativo rápido para a determinação do AS, fez-se um estudo da zona linear de resposta por espectrofotometria de UV-Visível. Prepararam-se padrões de AS com água desionizada e traçou-se a sua curva de calibração ao comprimento de onda 308nm, com concentrações compreendidas entre 0 e 500 μ M.

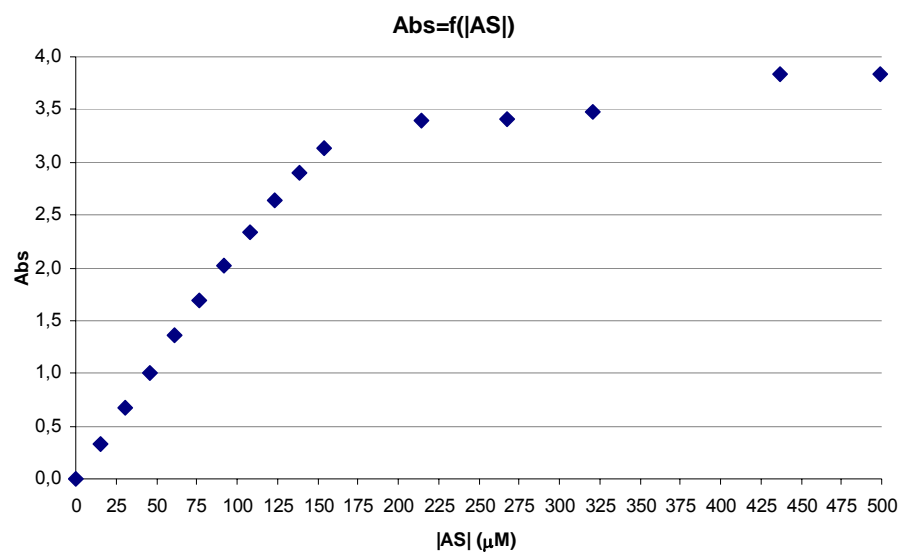


Figura 2.2. Curva de calibração do Ácido Sinápico com concentrações compreendidas entre 0 e 500 μM

Para os estudos seguintes optou-se por trabalhar na gama de concentrações compreendida entre 0 μM e 123 μM .

Na Figura 2.3. apresenta-se uma recta de calibração típica para esta gama de concentrações.

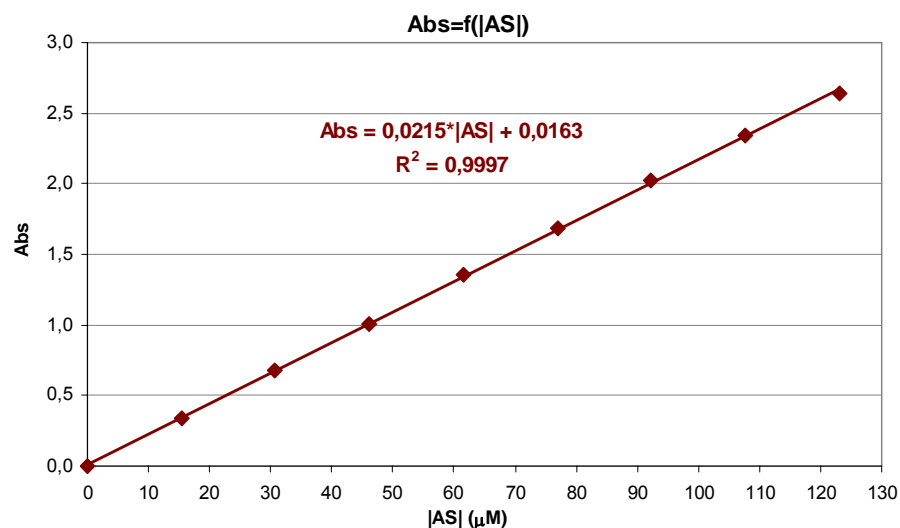


Figura 2.3. Recta de calibração do Ácido Sinápico com concentrações compreendidas entre 0 μM e 123 μM

2.2.1.2. AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO ÁCIDO SINÁPICO

Foram realizados estudos de solubilidade pelo método A (*vide* secção 2.1.1.2.1) usando concentrações de AS de 16, 32 e 65 μM (concentrações teóricas máximas) e de βCD entre 0 e 10 mM. Esta análise permite a avaliação da quantidade de AS, presente em solução, que foi solubilizada. Os resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a comprimento de onda 308nm apresentam-se na Tabela A1. no Anexo A. A representação gráfica destes resultados apresenta-se na Figura 2.4.

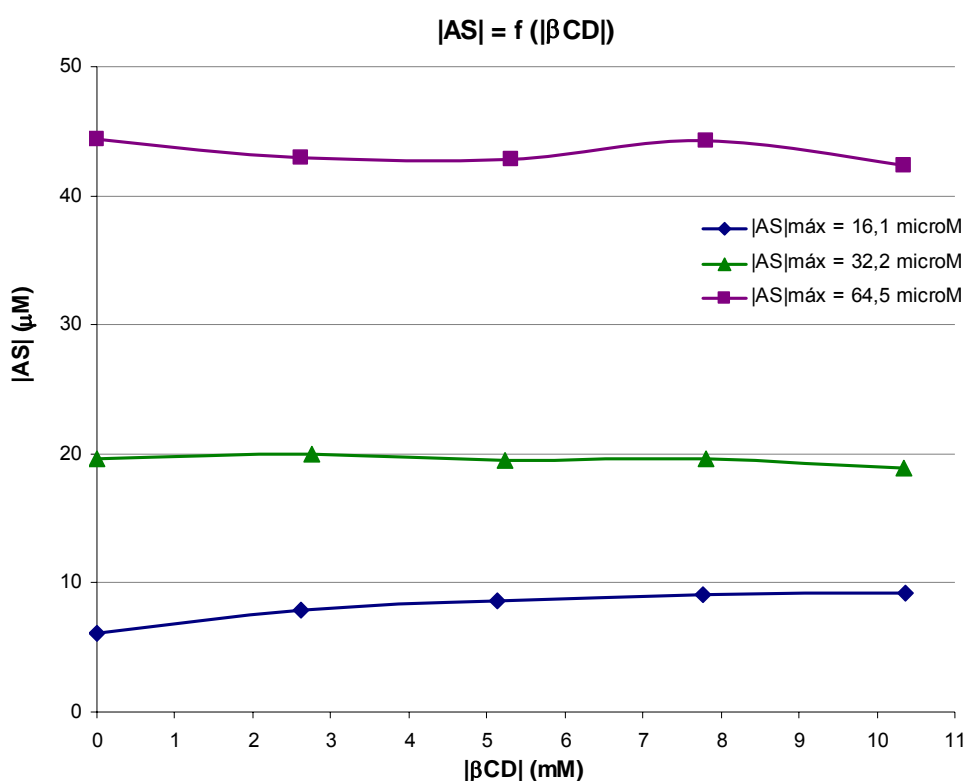


Figura 2.4. Resultados obtidos para a solubilização do AS em função de concentrações crescentes de βCD

Os resultados obtidos na Figura 2.4. mostram que o aumento da concentração de βCD não se traduz num aumento da solubilidade do composto AS. Verifica-se, no entanto, um aumento gradual da concentração de AS solubilizado com o aumento da concentração de βCD para $|\text{AS}|_{\text{máx.}} = 16,1\mu\text{M}$, enquanto que para os restantes a concentração de AS mantém-se praticamente constante com a variação da concentração de βCD .

Para avaliar a **taxa de solubilização efectiva** do AS, subtraiu-se à quantidade de AS solubilizado o valor obtido para a concentração zero em β CD (solução controlo), para todas as concentrações de β CD (com este procedimento exclui-se a solubilização do composto sem a interferência da β CD). Efectuou-se a divisão dos valores obtidos pela quantidade inicial de composto e multiplicou-se por 100 (percentagem). A taxa de solubilização efectiva é dada pela equação 1.

$$\text{Taxa de solubilização} = [m(\text{AS})_{\text{tempo } t} - m(\text{AS})_{\text{tempo } t | \beta\text{CD}=0}] / m(\text{AS})_{\text{tempo } 0} * 100 \quad (\text{equação 2.})$$

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela A2. no Anexo A e graficamente na Figura 2.5.

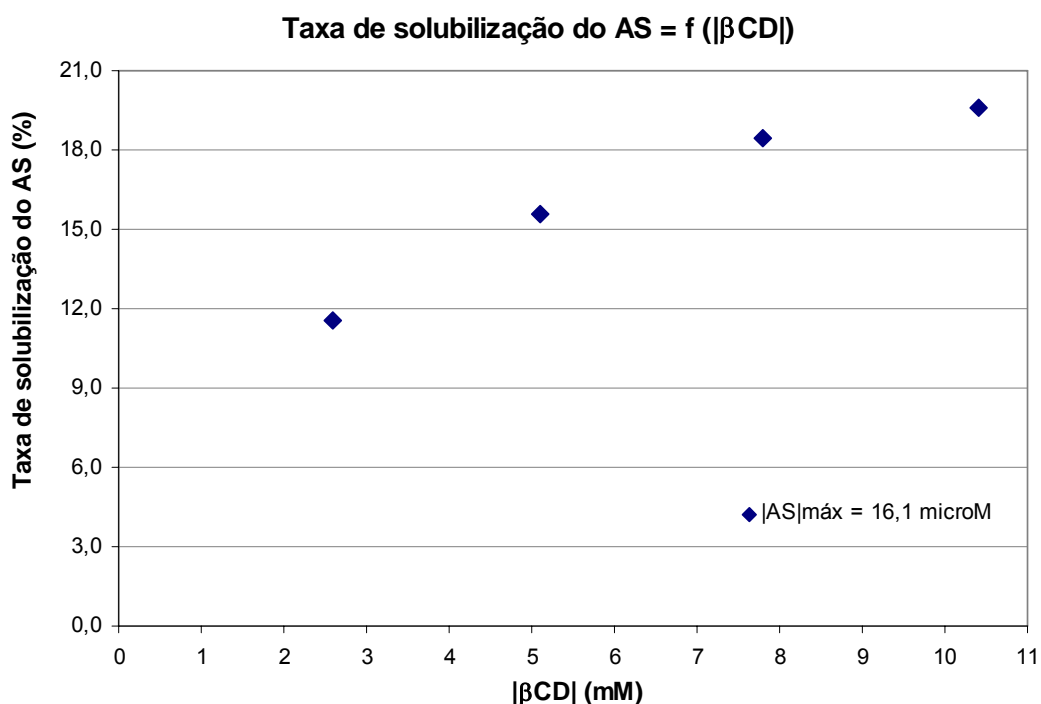


Figura 2.5. Resultados obtidos para a taxa de solubilização de AS sob a influência de concentrações crescentes de β CD

Se avaliarmos a taxa de solubilização do AS (Figura 2.5.) para o caso das soluções com concentração teórica máxima em AS de $16,1 \mu\text{M}$, verifica-se que a taxa de solubilização do composto aumenta com o aumento da concentração de β CD.

Devido aos resultados obtidos não serem conclusivos, testou-se um outro método.

Foram realizados estudos de solubilidade pelo método B (vide secção 2.1.1.2.2) usando concentrações de AS entre 89 e 116 μM (concentrações teóricas máximas) e de βCD entre 0 e 12 mM. A partir dos valores de absorvância lidos e da curva de calibração determinou-se a quantidade de AS solubilizada. Os resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a comprimento de onda 308nm apresentam-se na Tabela A3 no Anexo A. A representação gráfica de $|\text{AS}|$ vs $|\beta\text{CD}|$ apresenta-se na Figura 2.6.

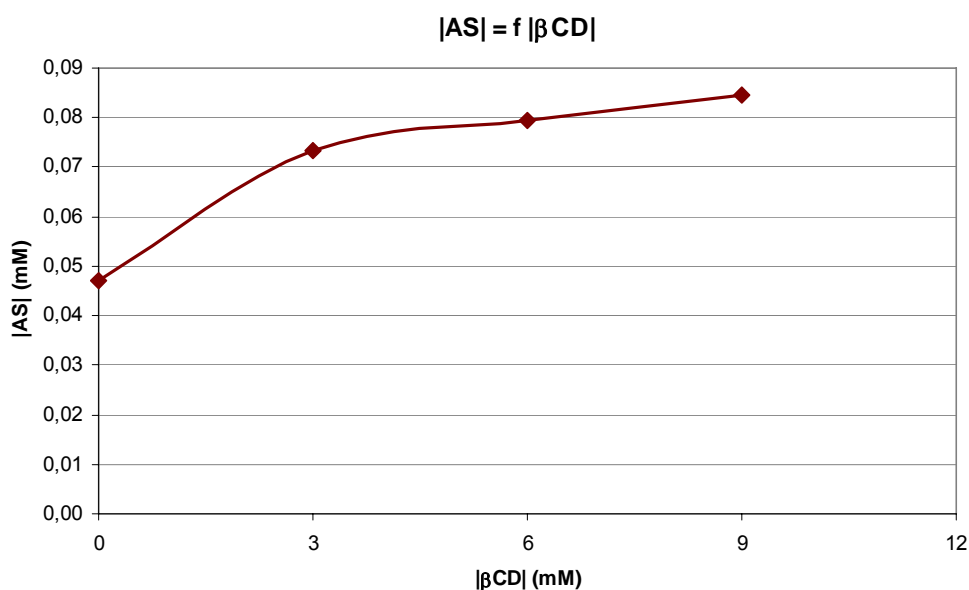


Figura 2.6. Resultados obtidos para uma solução de concentração teórica em AS aproximada a 100 μM sob a influência de concentrações crescentes de βCD

Os resultados obtidos na Figura 2.6. permitem observar um aumento da solubilidade do composto AS em função do aumento da concentração de βCD .

Efectuou-se a determinação da taxa de solubilização efectiva do AS, de acordo com a equação 2. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela A4. no Anexo A e apresentam-se graficamente na Figura 2.7.

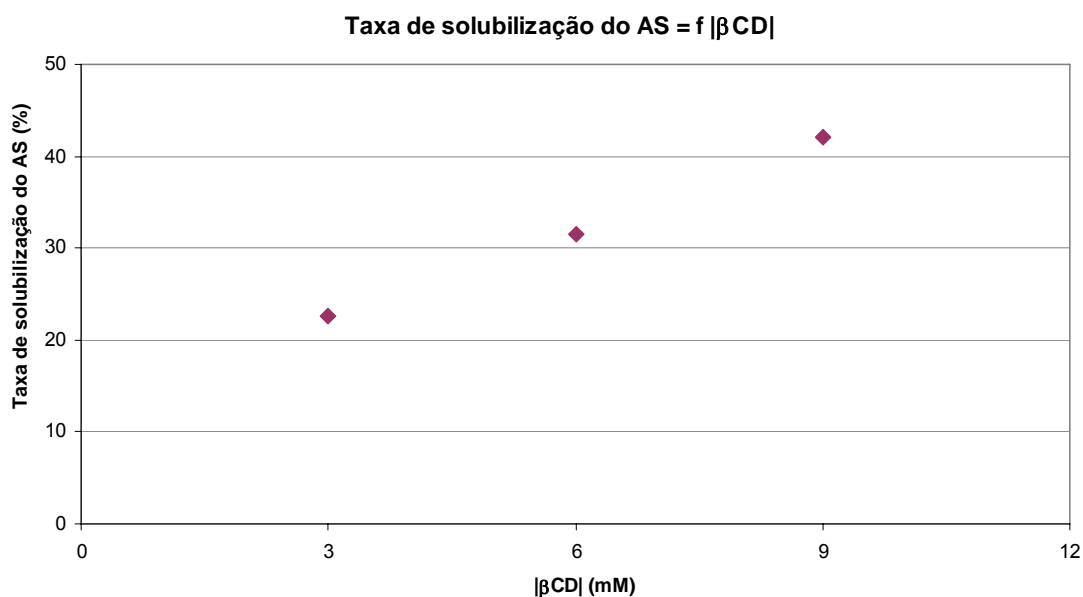


Figura 2.7. Resultados obtidos para a taxa de solubilização de AS sob a influência de concentrações crescentes de β CD

Pela avaliação da Figura 2.7. verifica-se que a taxa de solubilização do AS aumenta consideravelmente com o aumento da concentração de β CD.

No entanto, esta metodologia (Método B) está associada a um elevado erro experimental devido à pequena massa de AS utilizada ($\sim 2,30E-04$ g); Preparar solução de maior quantidade em AS implicaria aumentar a quantidade de β CD, que não é de fácil obtenção.

Assim, repetiu-se o estudo anterior, utilizando um outro método, o método C (*vide* secção 2.1.1.2.3) usando concentrações de AS de 30, 50 e 100 μ M (concentrações teóricas máximas) e β CD a variar entre 0 e 21 mM.

Neste ensaio efectuou-se também um outro estudo: traçaram-se os espectros de UV-Visível no intervalo de comprimento de onda entre 190nm e 420nm, por forma a avaliar se havia deslocamento dos comprimentos de onda relativos à máxima absorção. Os resultados obtidos apresentam-se nas Figuras 2.8., 2.9. e 2.10.

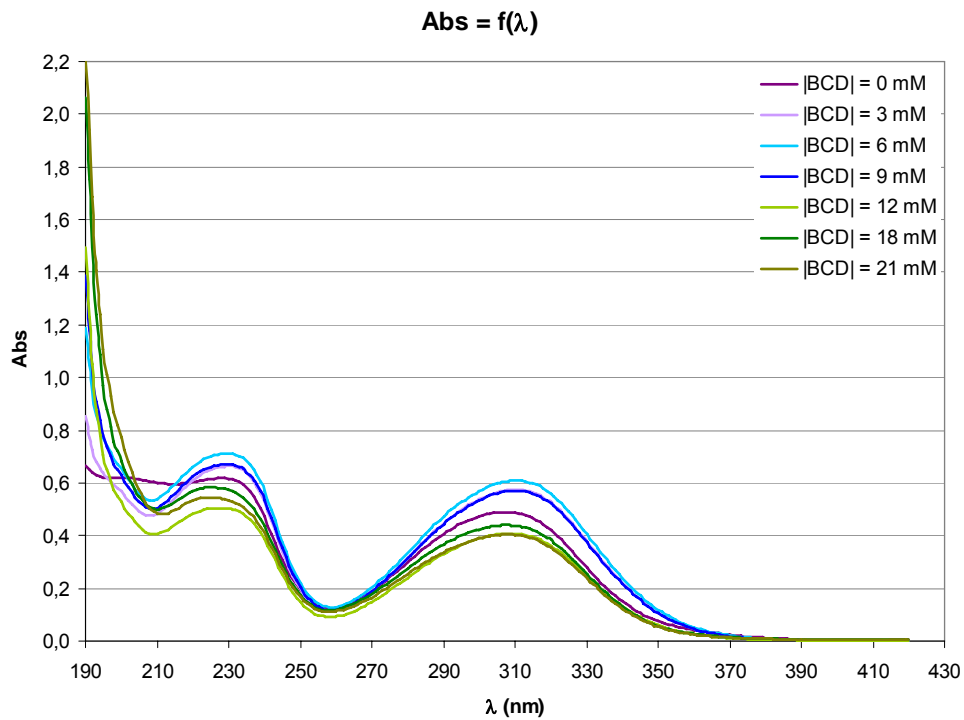


Figura 2.8. Espectros de UV-Visível das soluções de concentração teórica máxima em AS igual a 30 μ M sob a influência de concentrações crescentes de β CD

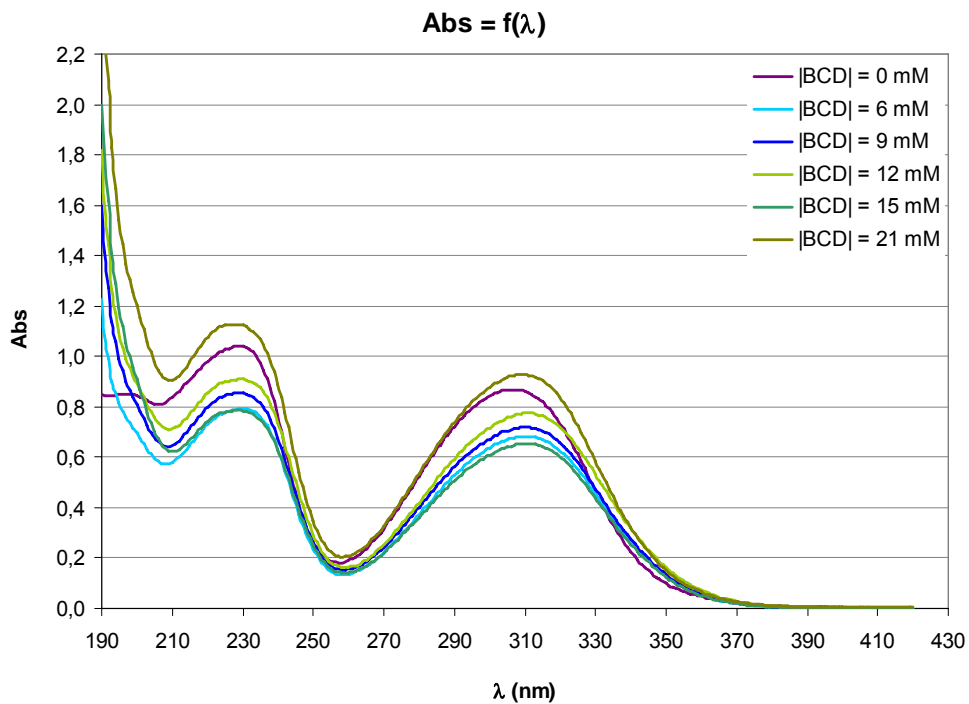


Figura 2.9. Espectros de UV-Visível das soluções de concentração teórica máxima em AS igual a 50 μ M sob a influência de concentrações crescentes de β CD

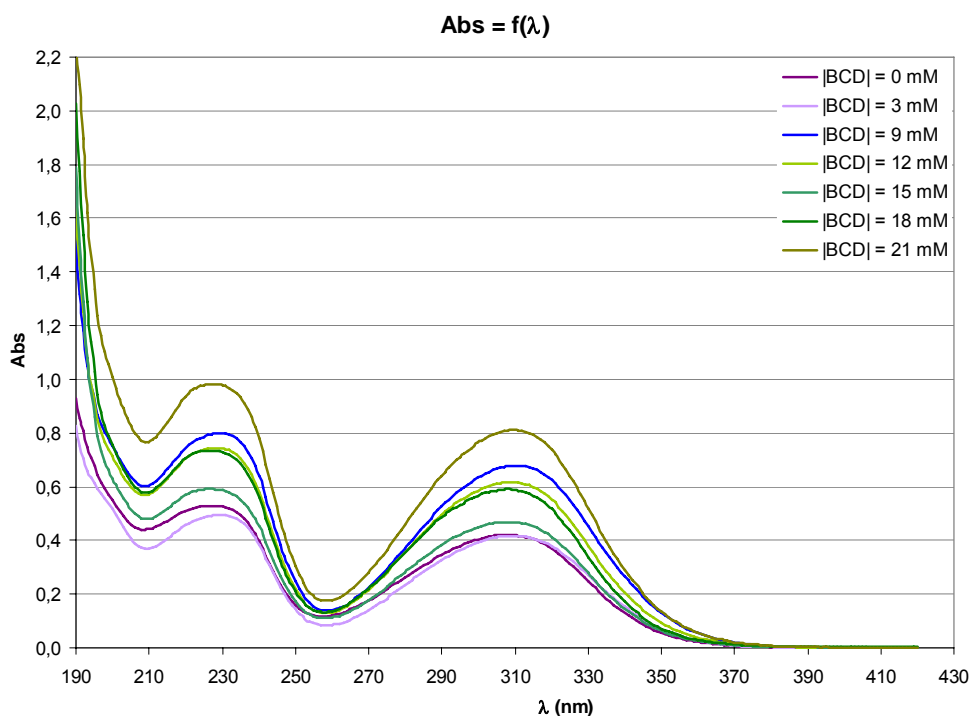


Figura 2.10. Espectros de UV-Visível das soluções de concentração teórica máxima em AS igual a $100 \mu\text{M}$ sob a influência de concentrações crescentes de βCD

Verifica-se, pela análise das três figuras anteriores, que não existe deslocamento dos comprimentos de onda relativos à absorvância máxima, pois estes mantêm-se em valores próximos de 308nm e 228nm .

Os resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a comprimento de onda 308nm apresentam-se na Tabela A5. no Anexo A e a representação gráfica de $|\text{AS}|$ vs $|\beta\text{CD}|$ apresenta-se na Figura 2.11.

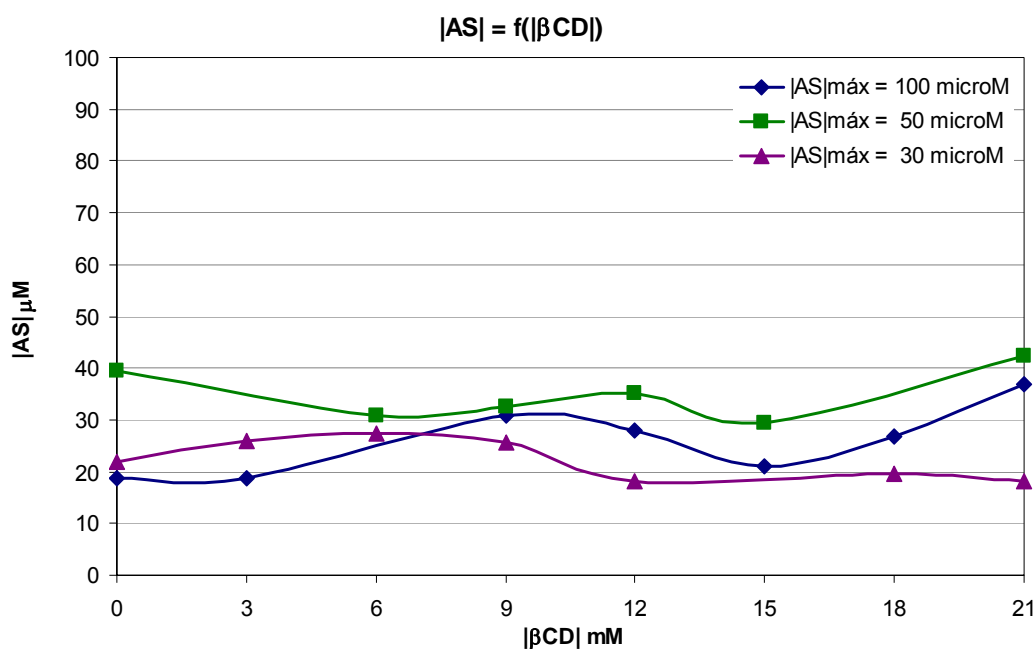


Figura 2.11. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 308 nm para a solubilização de AS sob a influência de concentrações crescentes de β CD e da concentração teórica máxima inicial de AS

Os resultados obtidos na Figura 2.11. mostram que o aumento da concentração de β CD não se traduz num aumento significativo da solubilidade do composto AS.

Foram realizados novos estudos de solubilidade analisando-se também um outro factor: o tempo de incubação. Para estes estudos seguiu-se o método C (*vide* secção 2.1.1.2.3) usando concentração de AS de 100 μM (concentração teórica máxima) e concentrações de β CD a variar entre 0 e 15 mM. Efectuou-se a análise espectrofotométrica ao final de 20, 42, 65 e 88 h (cerca de 4 dias), mantendo as soluções em incubação (300 rpm, 25°C) durante toda a experiência.

Neste ensaio efectuou-se novamente a análise no intervalo espectral entre 190 nm e 420 nm, por forma a avaliar se havia deslocamento dos comprimentos de onda relativos à absorvância máxima. Os resultados obtidos apresentam-se seguidamente, nas Figuras 2.12. a 2.17.

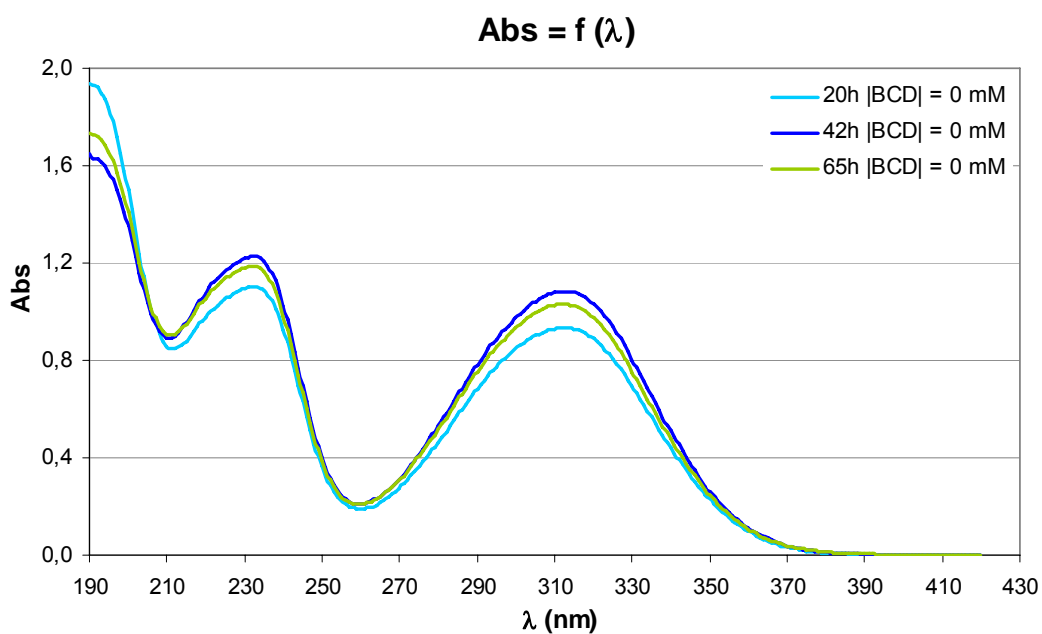


Figura 2.12. Espectros de UV-Visível de uma solução de [AS] = 100 μ M e [βCD] = 0 mM, ao longo do tempo de incubação (20h, 42h, 65h)

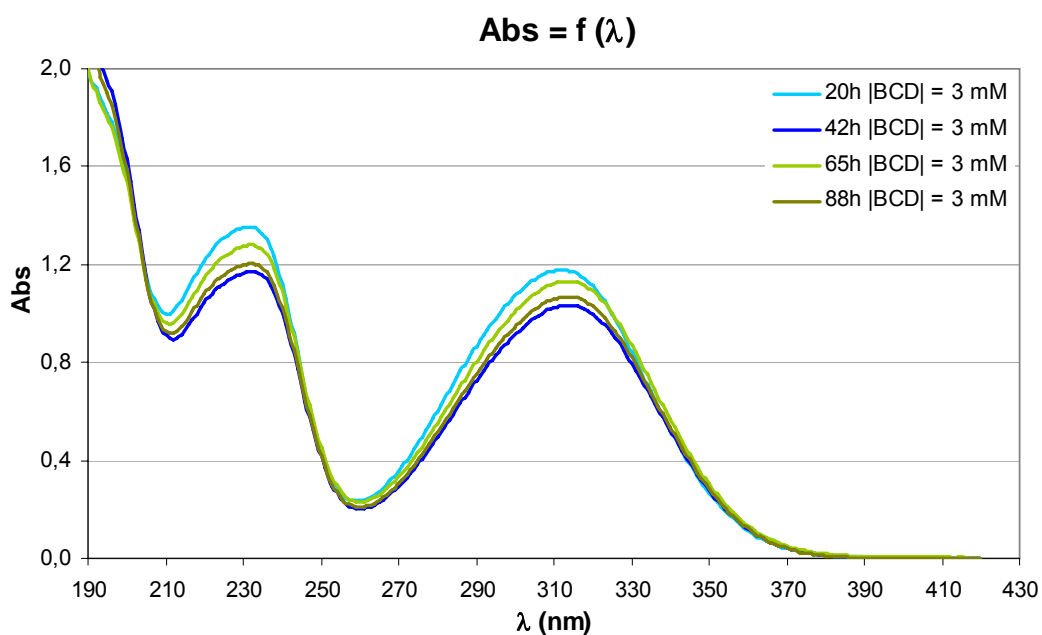


Figura 2.13. Espectros de UV-Visível de uma solução de [AS] = 100 μ M e [βCD] = 3 mM, ao longo do tempo de incubação (20h, 42h, 65h e 88h)

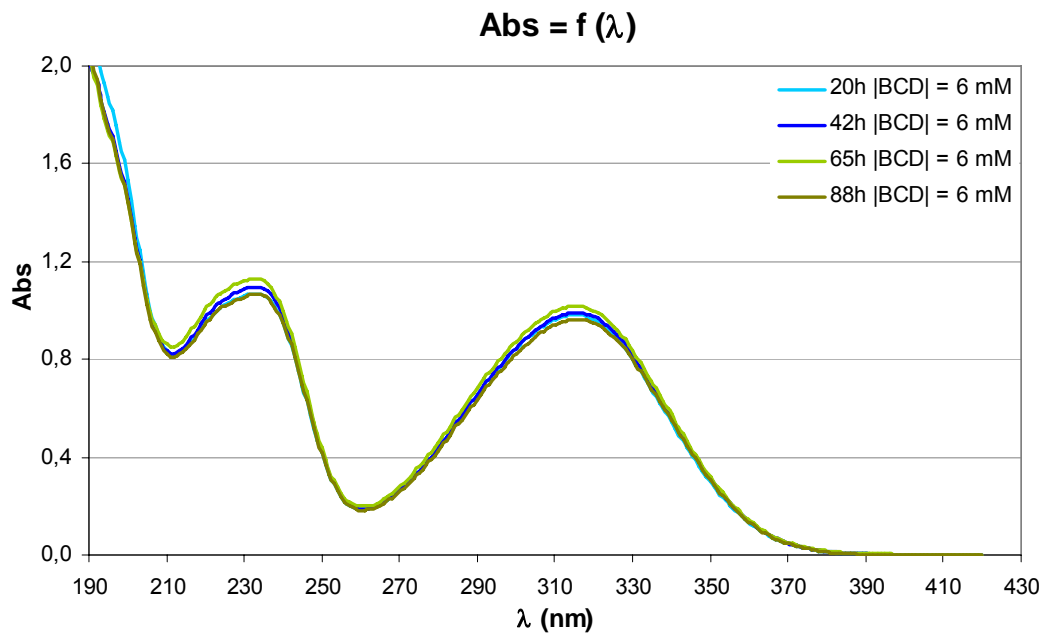


Figura 2.14. Espectros de UV-Visível de uma solução de $[AS] = 100 \mu\text{M}$ e $[\beta\text{CD}] = 6 \text{ mM}$, ao longo do tempo de incubação (20h, 42h, 65h e 88h)

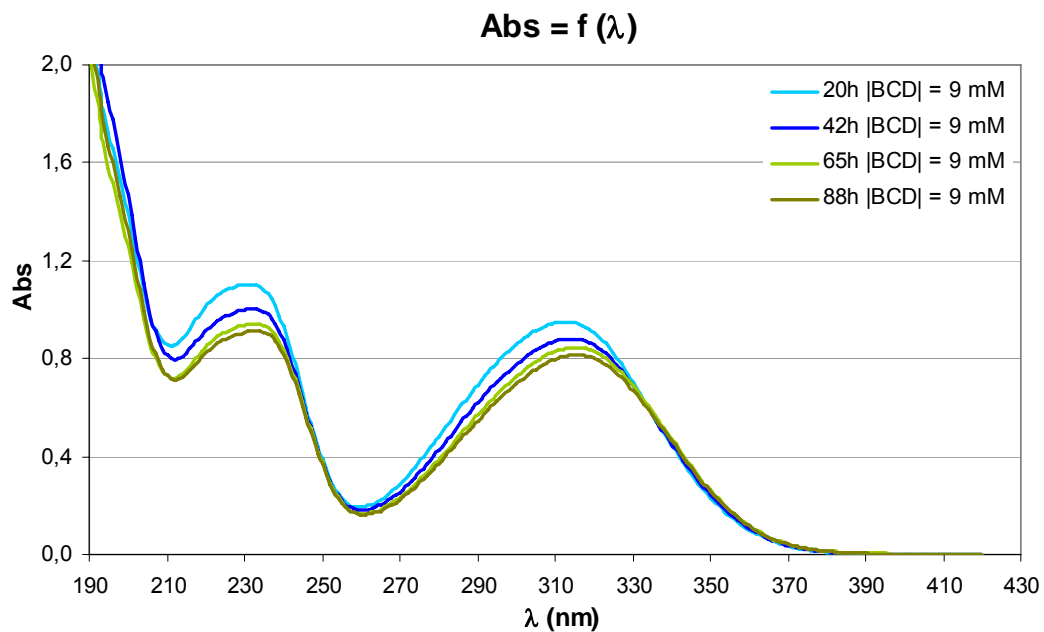


Figura 2.15. Espectros de UV-Visível de uma solução de $[AS] = 100 \mu\text{M}$ e $[\beta\text{CD}] = 9 \text{ mM}$, ao longo do tempo de incubação (20h, 42h, 65h e 88h)

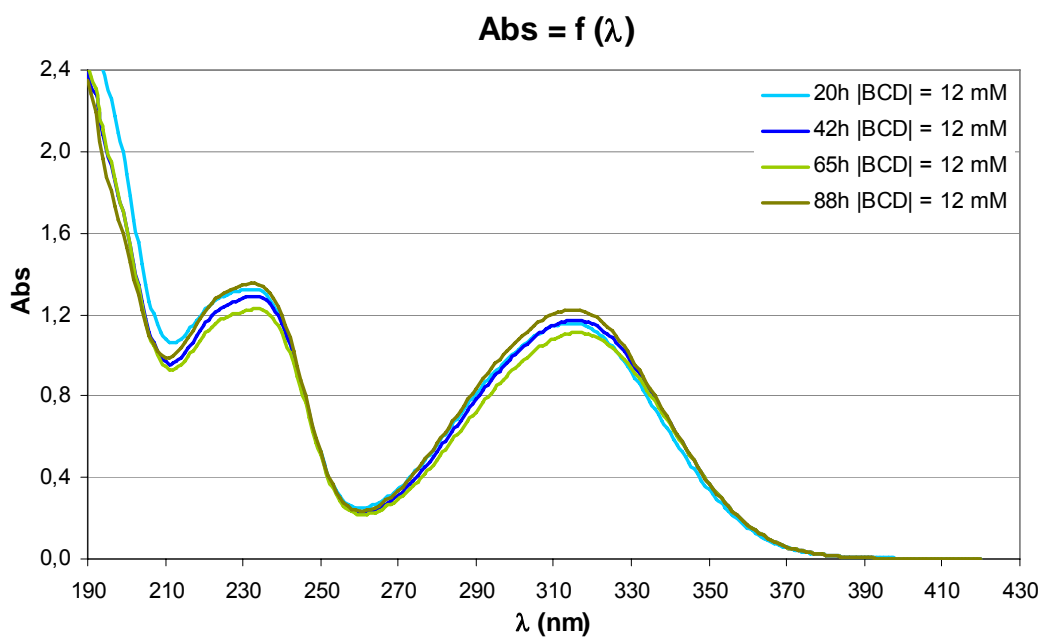


Figura 2.16. Espectros de UV-Visível de uma solução de $[AS] = 100 \mu\text{M}$ e $[\beta\text{CD}] = 12 \text{ mM}$, ao longo do tempo de incubação (20h, 42h, 65h e 88h)

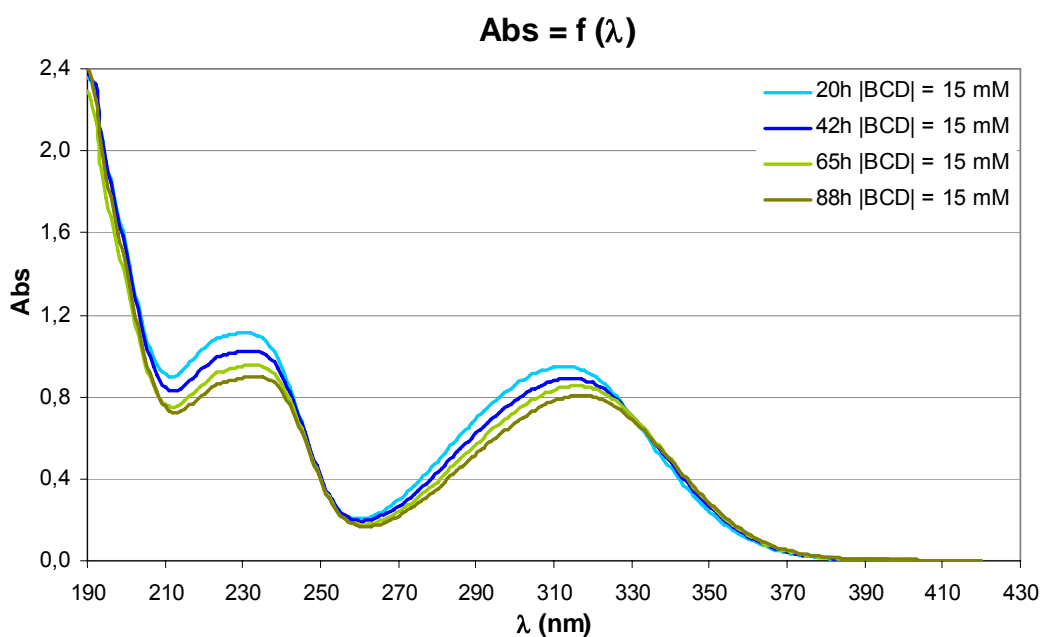


Figura 2.17. Espectros de UV-Visível de uma solução de $[AS] = 100 \mu\text{M}$ e $[\beta\text{CD}] = 15 \text{ mM}$, ao longo do tempo de incubação (20h, 42h, 65h e 88h)

Os resultados obtidos nas Figuras 2.12. a 2.17. mostram que efectivamente houve um deslocamento dos comprimentos de onda relativos à absorvância máxima, de 308 nm e 228 nm para 314 nm e 232 nm, respectivamente. O deslocamento, se bem que pequeno, poderá significar que houve formação de um complexo.

Efectuou-se a análise espectrofotométrica das soluções nos dois comprimentos de onda em causa: 232 nm e 314nm. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas A6. a A9. no Anexo A e apresentam-se graficamente nas Figuras 2.18. e 2.19.

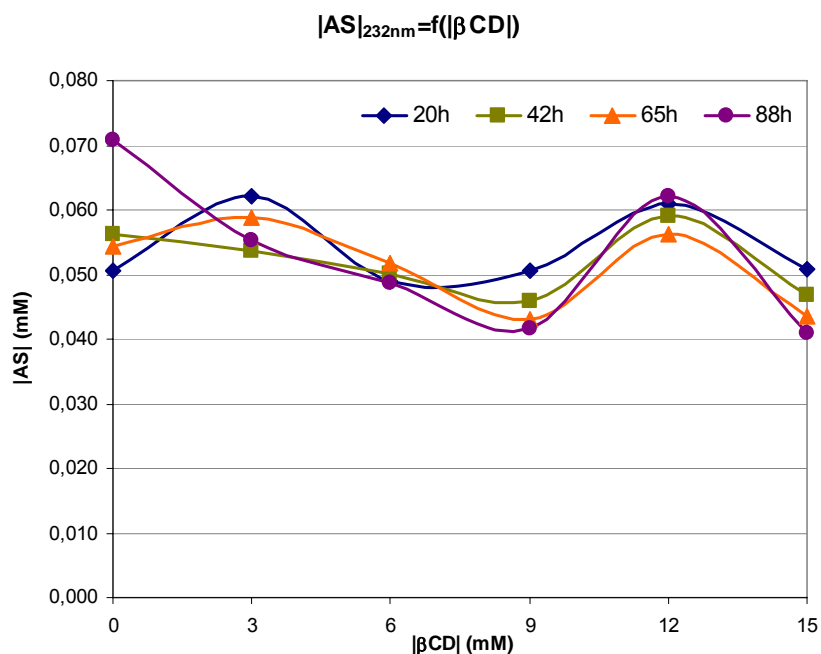


Figura 2.18. Resultados obtidos para a solubilização de AS sob a influência de concentrações crescentes de βCD e do tempo de incubação (resultados obtidos a 232nm).

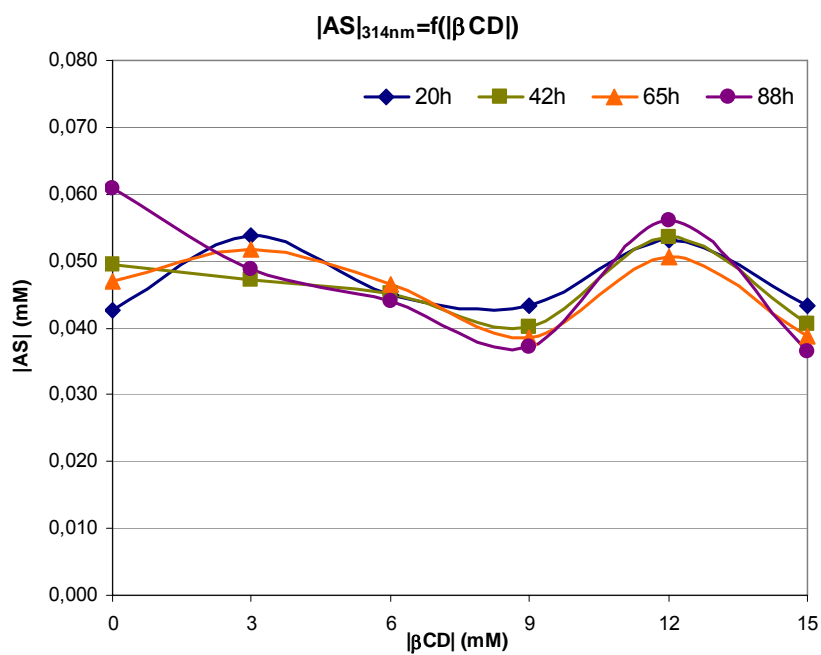


Figura 2.19. Resultados obtidos para a solubilização de AS sob a influência de concentrações crescentes de β CD e do tempo de incubação (resultados obtidos a 314nm).

Os resultados obtidos nas Figuras 2.18. e 2.19. mostram que o aumento da concentração de β CD e o aumento do tempo de incubação não se traduz numa variação da solubilidade do composto AS.

2.2.2. ÁLCOOL CONIFERÍLICO

2.2.2.1. DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA POR UV-VISÍVEL DO ÁLCOOL CONIFERÍLICO

Com o objectivo da análise da formação do complexo por espectrofotometria de UV-Visível e determinação quantitativa do AC presente em solução, traçou-se o espectro de UV-Visível no intervalo espectral entre 190 nm e 350 nm (Figura 2.20.). Preparou-se uma solução padrão de AC 150 μ M e verificou-se o aparecimento de dois 2 máximos: um a 212 nm e outro a 263 nm.

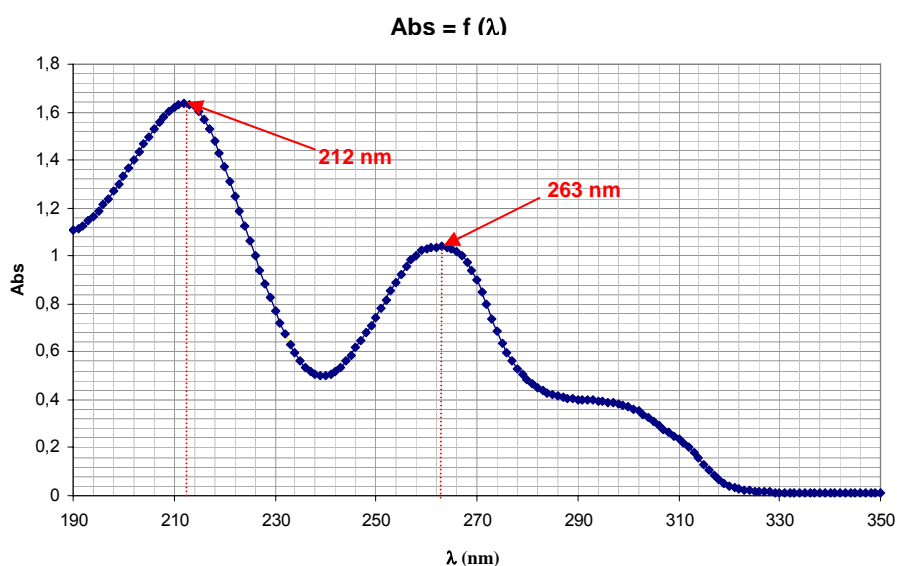


Figura 2.20. Espectro do Álcool Coniferílico na zona do UV

Tendo como objectivo o desenvolvimento e utilização nos estudos posteriores de um método espectrofotométrico para determinação quantitativa do AC, fez-se um estudo do intervalo de resposta linear entre a Absorvância e a concentração de AC ao comprimentos de onda de 263 nm. Assim, traçou-se uma recta de calibração usando padrões de AC com concentrações compreendidas entre 0 e 1250 μ M.

O padrão de concentração 300 μM atingiu o limite máximo de resposta do equipamento pelo que a análise se restringiu ao intervalo de concentrações entre 0 e 300 μM . Na Figura 2.21. apresenta-se a curva de calibração obtida.

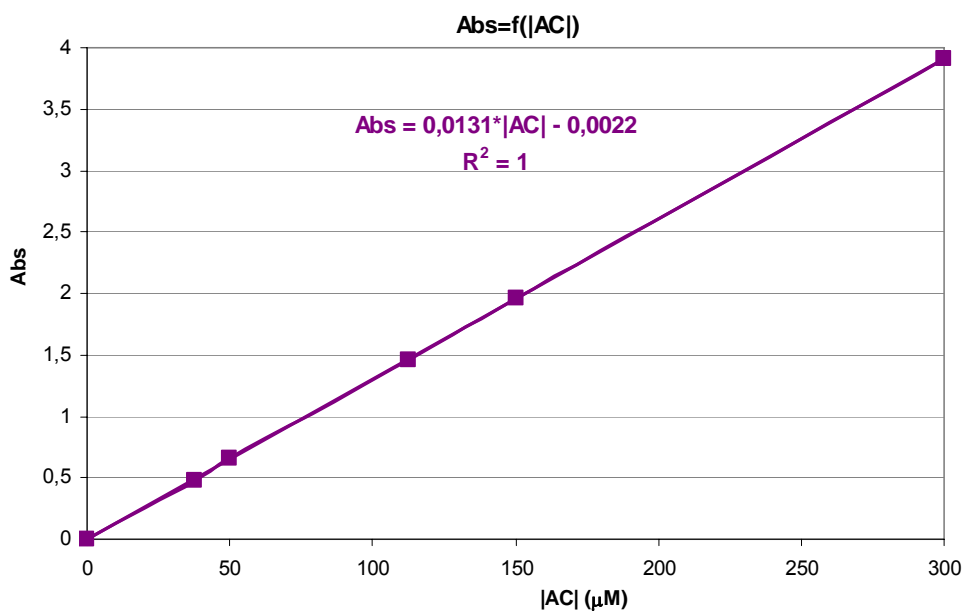


Figura 2.21. Recta de calibração do Álcool Coniferílico com concentrações compreendidas entre 0 e 300 μM , a 263 nm

2.2.2.2. AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO ÁLCOOL CONIFERÍLICO

No sentido de avaliar a variação da solubilidade do AC por formação de um complexo com β CD realizou-se um estudo ao longo de 7 dias. Para estes estudos utilizou-se o método B descrito nos estudos do Ácido Sinápico (*vide* secção 2.1.2.2.1) usando uma concentração teórica máxima de AC de 700 μ M e concentração de β CD a variar entre 0 e 15mM.

As razões para se preparar soluções com uma concentração teórica máxima de AC superior a 300 μ M prende-se com o facto de ser necessário uma solução saturada deste composto e, por outro lado, diminuir os erros experimentais na pesagem.

Durante os estudos efectuados verificou-se que as soluções preparadas apresentavam concentrações numa zona em que a *Lei de Beer* não é aplicável. Assim, nos estudos espectrofotométricos subsequentes foi efectuada uma diluição prévia das soluções de 1:5 com água desionizada.

Foram efectuadas leituras por espectrofotometria de UV-Visível a tempos de incubação diferentes, nomeadamente às 20, 42, 65, 86, 112, 136,5 e 147,5h, ao comprimento de onda 263 nm.

Efectuou-se a análise no intervalo espectral entre 190 nm e 350 nm, por forma a avaliar a influência de concentrações crescentes de β CD nos comprimentos de onda onde ocorre absorvância máxima no espectro do AC. O deslocamento dos comprimentos de onda relativos à absorvância máxima foi também estudada. Os resultados obtidos apresentam-se seguidamente, nas Figuras 2.22. a 2.25.

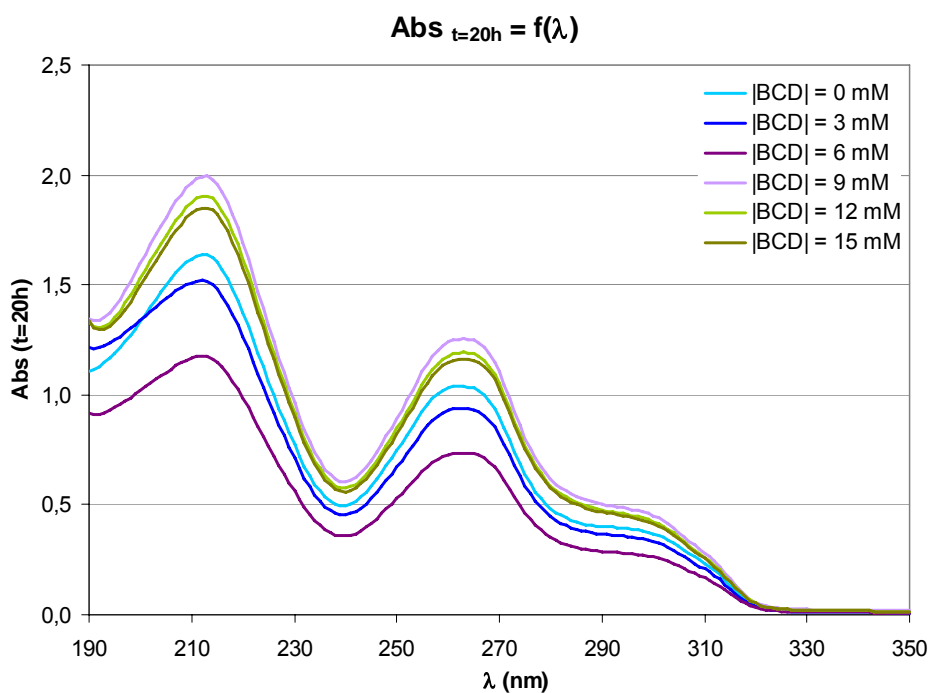


Figura 2.22. Resultados espectrofotométricos da análise espectral das soluções de concentração teórica máxima inicial de AC 700 μ M pela influência de concentrações crescentes de β CD (soluções sujeitas a diluição 1:5), para t = 20h.

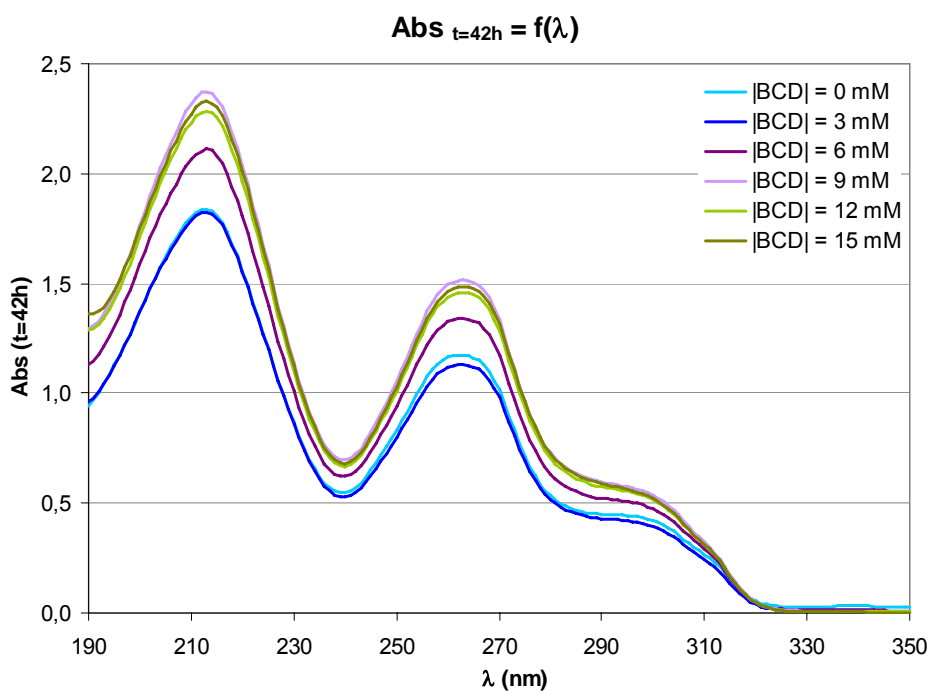


Figura 2.23. Resultados espectrofotométricos da análise espectral das soluções de concentração teórica máxima inicial de AC 700 μ M pela influência de concentrações crescentes de β CD (soluções sujeitas a diluição 1:5), para t = 42h.

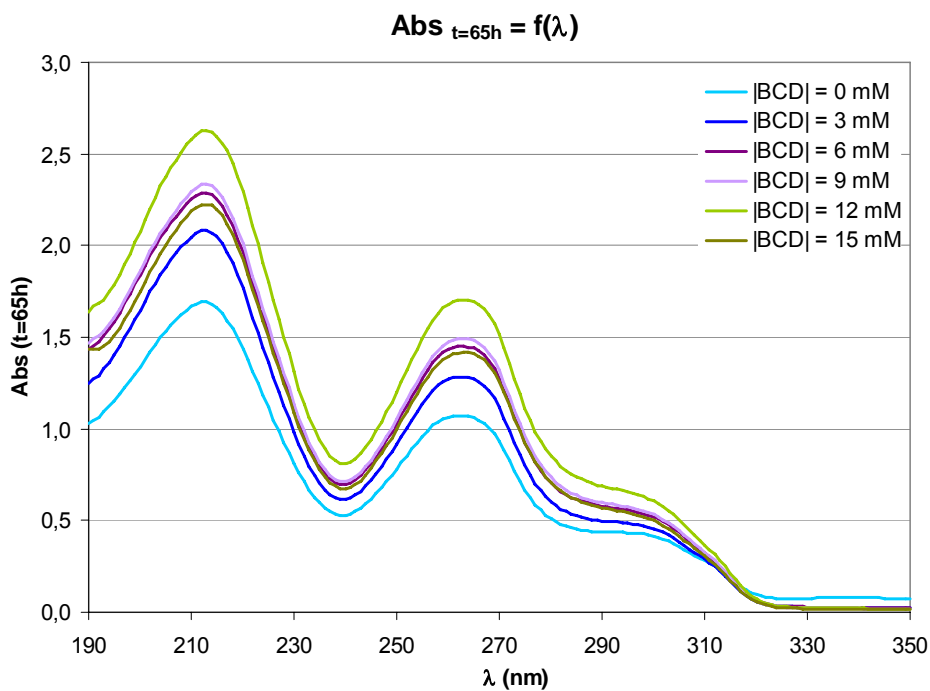


Figura 2.24. Resultados espectrofotométricos da análise espectral das soluções de concentração teórica máxima inicial de AC 700 μ M pela influência de concentrações crescentes de β CD (soluções sujeitas a diluição 1:5), para t = 65h.

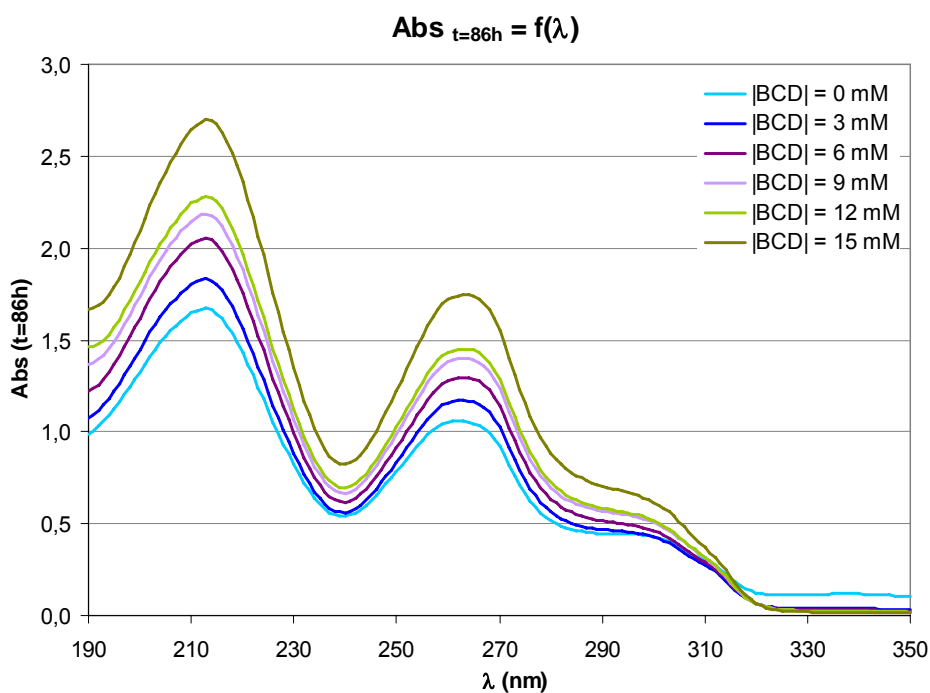


Figura 2.25. Resultados espectrofotométricos da análise espectral das soluções de concentração teórica máxima inicial de AC 700 μ M pela influência de concentrações crescentes de β CD (soluções sujeitas a diluição 1:5), para t = 86h.

A análise dos dados obtidos, em especial os correspondentes a um tempo de incubação de 86 h, permitem verificar que ocorre um aumento da solubilidade do AC com o incremento da concentração de β CD. Simultaneamente, verificou-se não existir um deslocamento significativo dos comprimentos de onda relativos à absorvância máxima.

Os resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm das soluções de concentração teórica máxima inicial de AC 700 μ M pela influência de concentrações crescentes de β CD, após incubação e sujeitas a diluição 1:5, apresentam-se nas Tabelas B1. a B7. no Anexo B. Os resultados após correcção pelo factor de diluição apresentam-se nas Tabelas B8. a B11. no Anexo B e, graficamente, na Figura 2.26.

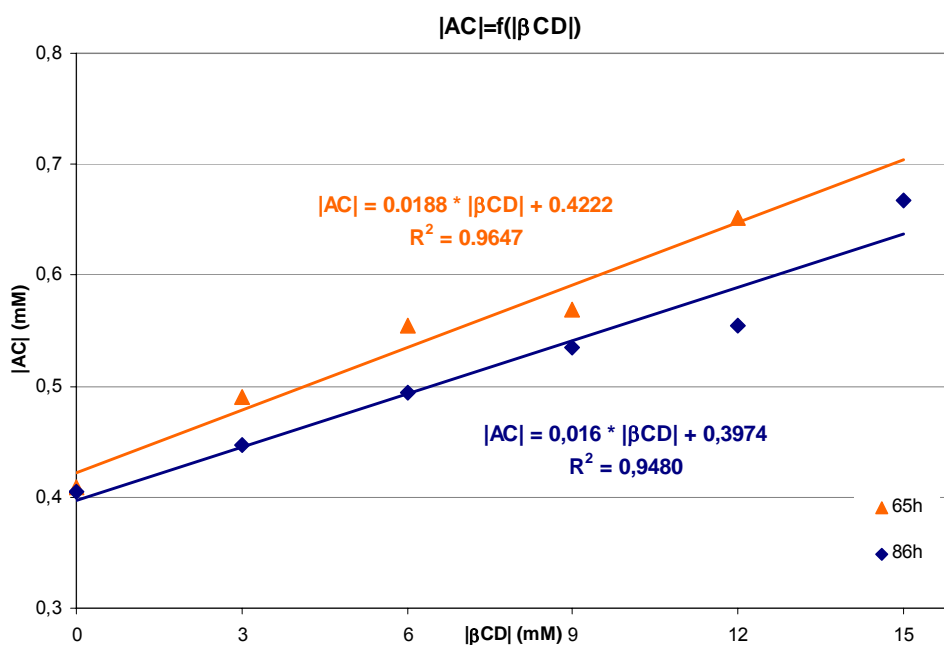


Figura 2.26. Resultados obtidos para a solubilização do AC em função de concentrações crescentes de β CD e do tempo de incubação, para t = 65h e t = 86h

Os dados obtidos permitem inferir que o AC é encapsulado pela β CD na proporção 1:1. De facto, segundo Higuchi e Connors^[22] a obtenção de uma relação linear de declive inferior à unidade entre a concentração do composto hóspede e a concentração de β CD indicia que o complexo formado é 1:1, ou seja uma molécula de β CD encapsula uma molécula hóspede.

A avaliação da taxa de solubilização efectiva do AC foi determinada de acordo com a equação 3.

$$\text{Taxa de solubilização} = [m(\text{AC})_{\text{tempo } t} - m(\text{AC})_{\text{tempo } t | \beta\text{CD}=0}] / m(\text{AC})_{\text{tempo } 0} * 100 \quad (\text{equação 3.})$$

Os resultados obtidos para a taxa de solubilização efectiva do AC estão apresentados na Tabela B12. no Anexo B e apresentam-se graficamente na Figura 2.27.

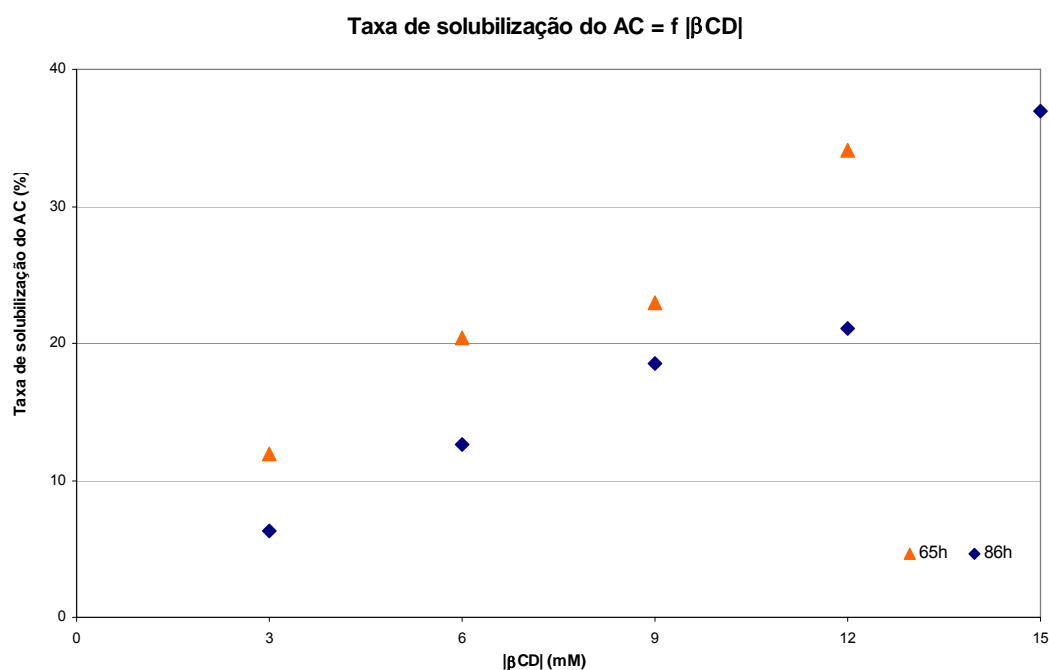


Figura 2.27. Resultados obtidos para a taxa de solubilização do AC em função de concentrações crescentes de β CD, para $t = 65\text{h}$ e $t = 86\text{h}$.

Se avaliarmos a taxa de solubilização do AC (Figura 2.27.), considerando os tempos de incubação de 65h e 86h, verifica-se que a taxa de solubilização aumenta linearmente com o aumento da concentração de β CD.

2.2.2.3. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO ÁLCOOL CONIFERÍLICO

Por forma a avaliar e comparar a estabilidade do AC livre relativamente ao AC encapsulado pela β CD, procedeu-se à realização do estudo que se descreve seguidamente. Para este estudo utilizou-se o método B descrito nos estudos do Ácido Sinápico (*vide* secção 2.1.2.2.2).

As condições experimentais usadas neste estudo apresentam-se resumidas na Tabela 2.8.

Tabela 2.8. Condições experimentais do estudo da estabilidade do AC

Solução	$ \beta\text{CD} $ [mM]	$ \text{AC} _{\text{máx.}}^{(1)}$ [mM]	Descrição
A	0,0	0,5	Solução exposta a condições laboratoriais de luz e ar durante cerca de 130 minutos
B	6,0	0,5	Solução exposta a condições laboratoriais de luz e ar durante cerca de 130 minutos
C	0,0	0,5	Solução protegida ao abrigo da luz e do ar
D	6,0	0,5	Solução protegida ao abrigo da luz e do ar

A concentração referenciada com ⁽¹⁾ traduz uma concentração teórica máxima, correspondente à quantidade de AC que existe na solução inicial.

As Figuras 2.28. e 2.29. apresentam os resultados espectrofotométricos obtidos, após 24h de incubação, para as soluções A e C e para as soluções B e D, respectivamente.

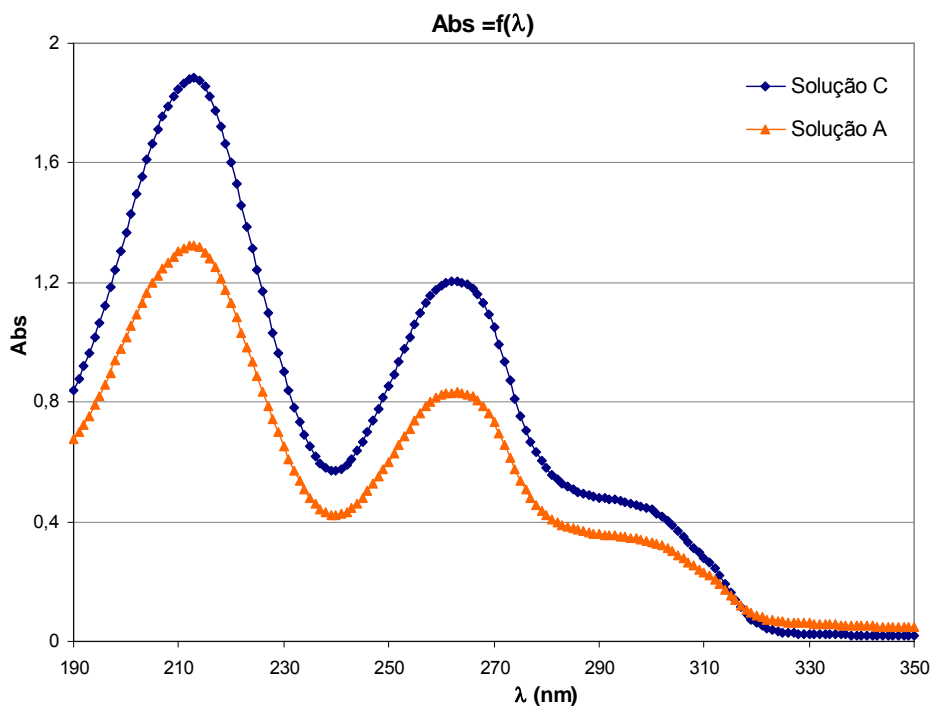


Figura 2.28. Resultados espectrofotométricos obtidos após 24h para: uma solução em AC exposta às condições laboratoriais durante 130 minutos (solução A) e uma solução em AC protegida (solução C)

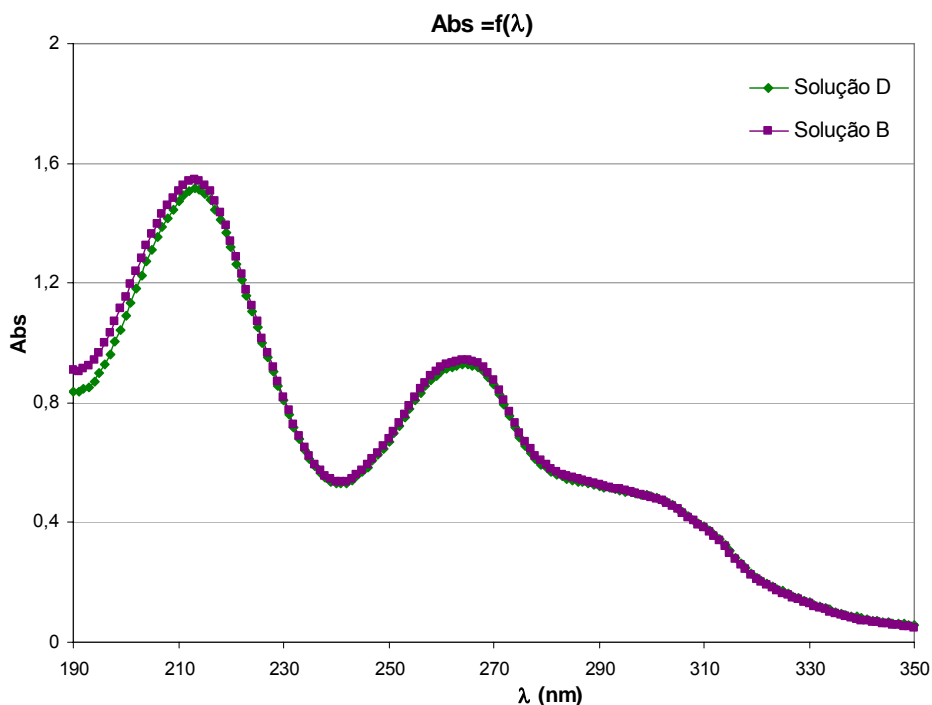


Figura 2.29. Resultados espectrofotométricos obtidos após 24h para: uma solução com AC e β CD, exposta às condições laboratoriais durante 130 minutos (solução B) e uma solução com AC e β CD, protegida (solução D)

Os resultados obtidos na Figura 2.28. permitem concluir que existe uma diminuição na Absorvância da solução A, solução esta que esteve sujeita a condições laboratoriais de luz e ar durante cerca de 130 minutos, face à solução C, que foi protegida ao abrigo da luz e ar. As soluções A e C são constituídas por AC em água desionizada.

A diminuição observada indicia que o AC poderá ser instável quando sujeito a condições de luz e ar. Esta instabilidade é confirmada pela ficha de segurança do produto.^[37]

Pela análise dos resultados obtidos na Figura 2.29. não se verificou uma variação significativa para a absorvância de ambas a soluções. Tal facto poderá dever-se à estabilização provocada pelo encapsulamento do AC pela β CD que, mesmo em condições desfavoráveis de ar e luz, promove a estabilidade do composto.

Efectuou-se o estudo do comportamento do pH, com o objectivo de avaliar a sua influência na solubilidade do AC e respectivo encapsulamento pela β CD. Os resultados deste estudo apresentam-se na Tabela 2.9.

Tabela 2.9. Resultados do estudo do pH das soluções A, B, C e D.

pH	Solução A	Solução B	Solução C	Solução D
pH inicial	7,12	6,90	6,91	6,84
Acerto pH	7,20	7,20	7,20	7,20
pH a t=0	7,64	6,90	7,24	7,18
pH a t=50min	7,60	6,96	-----	-----
pH a t=90min	7,53	7,00	-----	-----
pH a t=130min	7,37	7,03	-----	-----
pH a t=24h	7,24	6,96	7,11	6,90

Pela análise dos resultados obtidos na Tabela 2.9. verifica-se que o pH das soluções sofreu variações muito pequenas não tendo, aparentemente, importância significativa no processo.

2.3. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no estudo da concentração da β CD com a variação da solubilidade do AS não são conclusivos considerando as diferentes metodologias aplicadas.

No entanto, não é de excluir o facto de ter ocorrido complexação, dado que para alguns casos houve um pequeno aumento de solubilidade com o aumento da β CD e se ter observado alterações no espectro de UV-Visível, nomeadamente dos comprimentos de onda correspondentes aos máximos de absorção.

De facto, os diversos estudos em curso, por Calorimetria Diferencial de Varrimento e RAMAN, têm evidenciado que o AS forma um complexo estável com a β CD.^[38]

Neste sentido, seria importante futuramente repetir a experiência descrita no ponto 2.1.1.2.2 - Método B, utilizando volumes maiores de solução, por forma a aumentar a quantidade de AS a pesar e assim diminuir os erros experimentais. Seria também importante efectuar esse estudo com um maior tempo de incubação.

De igual modo, poderá ser igualmente relevante avançar com ensaios de biodegradação.

Relativamente ao AC, verifica-se um aumento de absorvância no seu espectro pela influência de concentrações crescentes de β CD, o que confirma a melhoria da solubilidade do AC pelo aumento da concentração de β CD em solução. Verifica-se, também, que a taxa de solubilização do AC aumenta consideravelmente com o aumento da concentração de β CD.

Pelos resultados obtidos, é possível concluir que o complexo formado é 1:1, ou seja uma molécula de β CD encapsula uma molécula de AC.

O estudo da estabilidade permitiu verificar que o AC é instável quando sujeito a condições desfavoráveis de ar e luz. Os resultados obtidos com a β CD sugerem que o encapsulamento promove a estabilização do composto e, portanto, pode ser uma alternativa viável quando este composto se encontra disperso no meio ambiente.

Dado o interesse que estes resultados poderão ter em termos de aplicação ambiental, prosseguiram-se os estudos com o AC de modo a avaliar a biodegradação do composto.

CAPÍTULO 3. ESTUDOS DE BIODEGRADAÇÃO DO ÁLCOOL CONIFERÍLICO E RESPECTIVO COMPLEXO

Durante este capítulo apresentam-se os estudos de biodegradação do Álcool Coniferílico (AC).

3.1. PARTE EXPERIMENTAL

3.1.1. MATERIAIS

- β - Ciclodextrina [Fórmula molecular: $C_{42}H_{70}O_{35}$; Peso molecular: 1134,88 g/mol ; Sigma-Aldrich 28707];
- Álcool coniferílico [Fórmula molecular: $C_{10}H_{12}O_3$; Peso molecular: 180,20 g/mol; Sigma-Aldrich 223735];
- Aldeído coniferílico [Fórmula molecular: $C_{10}H_{10}O_3$; Peso molecular: 178,18 g/mol; Sigma-Aldrich];
- Água desionizada
- Hidróxido de Sódio 0,1M [Sigma-Aldrich]
- Filtros de seringa [Schleicher & Schuell]
- Papel de Filtro [Sterlitech Corporation]
- Micropipetas automáticas [Eppendorf Research]
- Incubadora [IVYMEN 200D]
- Espectrofotómetro de UV-Visível [UV-1700 PharmaSpec Shimadzu]
- Balança analítica [Precisa 205A SuperBal-series]
- Medidor de Oxigénio [Consort C532]
- Medidor de pH [Consort C831a]
- Centrífuga [Sorvall, SS-3 Automatic]
- Sistema de arejamento
- Sistemas de filtração [Buchner e Millipore]
- Solução de Lamas

3.1.2. MÉTODOS

3.1.2.1. SOLUÇÃO DE LAMAS

Os microrganismos utilizados para os estudos de biodegradação estão presentes numa solução de lamas provenientes de uma Estação de Tratamento de Água Residuais (ETAR). Durante a manutenção desta solução em laboratório promoveu-se o seu arejamento e a fonte de carbono adicionada foi leite. A vista ao microscópio ocular (Figura 3.1.) da solução de lamas, permitiu observar um conjunto de microrganismos que se envolvem numa bolha de ar ou gás produzido pelos próprios.

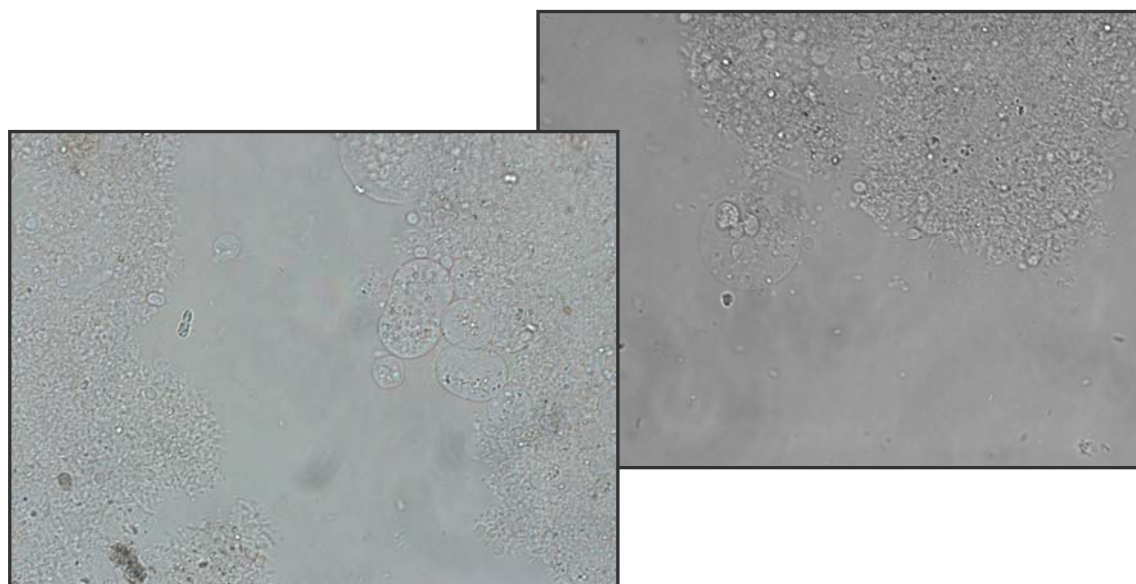


Figura 3.1. Imagens ao microscópio da solução de lamas proveniente da ETAR (ampliação 100x)

A preparação da solução de lamas, em cada ensaio, obedeceu ao descrito seguidamente:

- Retirou-se a quantidade necessária de solução de lamas do reactor e colocou-se em cone *imhoff*;
- Lavou-se esta solução com água desionizada, deixou-se decantar e rejeitou-se o sobrenadante;
- Repetiu-se o procedimento anterior 4 vezes;

- Para se obter uma concentração de 3000 mg SSV/L na solução de lamas, efectuou-se a determinação dos Sólidos Suspensos Totais (SST) (2*15 mL de solução foram filtrados em 2 filtros de porosidade 1,2 μ m, que seguidamente foram colocados em estufa a 105 °C durante 1h. Após 20 minutos no excicador foram pesados. A média das diferenças entre a pesagem final e inicial, dividida pelo volume de solução filtrada, permitiu calcular o valor de SST). Os Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) foram considerados cerca de 90% dos SST;
- Com o valor dos SSV e tendo em consideração a concentração da solução de lamas que se pretendia, efectuou-se a diluição (com água desionizada) ou a concentração (por decantação).

3.1.2.2. ESTUDO DE BIODEGRADAÇÃO EM MEIO NÃO TAMPONADO COM RECURSO À MEDIÇÃO DA TAXA DE CONSUMO DE OXIGÉNIO E CONTROLO ESPECTROFOTOMÉTRICO

O primeiro ensaio do estudo da biodegradação por medição da taxa de consumo de oxigénio foi realizado utilizando as soluções provenientes do estudo químico do encapsulamento do Ácido Coniferílico (AC) (vide 2.1.2.2.1.).

Na Tabela 3.1. resumem-se as quantidades e concentrações usadas na preparação da experiência.

Como se pode verificar na tabela, adicionaram-se 25 mL de solução de lamas (3000 mg SSV/L) a cada um dos Matrizes de 1 a 7, com a excepção do Matraz 8 uma vez que se trata do ensaio de controlo às lamas. O Matraz 7 servirá também como controlo, uma vez que será protegido ao abrigo da luz e do ar ao longo dos ensaios posteriores.

Procedeu-se ao arejamento das soluções existentes nestes 8 matrizes durante 30 minutos e, após 3 minutos de estabilização, à medição do oxigénio dissolvido durante cerca de 4/5 minutos por forma a se poder determinar a taxa de consumo de oxigénio. Posteriormente, efectuou-se a análise das soluções por espectrofotometria de UV-Visível no intervalo de comprimentos de onda entre 190 nm e 350 nm.

Tabela 3.1. Concentrações das soluções após introdução das lamas

Matraz	$ \beta\text{CD} $ [mM] ⁽¹⁾	m(AC) [g]	$ \text{AC} $ [μM] ⁽²⁾	[Lamas] [mg SSV/L]
1	0,0	6,40E-03	182	1500
2	1,5	6,10E-03	213	1500
3	3,0	6,40E-03	185	1500
4	4,5	6,30E-03	232	1500
5	6,0	6,40E-03	180	1500
6	7,5	6,40E-03	263	1500
7	0,0	5,90E-03	-----	1500
8	3,0	5,90E-03	-----	---

A concentração referenciada com ⁽¹⁾ corresponde à concentração de βCD (valores obtidos da Tabela 2.5.) corrigida pela diluição provocada pela introdução da solução de lamas. O valor ⁽²⁾ corresponde à concentração de AC solubilizada (valores obtidos da Tabela B11. para 147,5h, no Anexo B) corrigida pela diluição provocada pela introdução da solução de lamas.

Os resultados obtidos levantaram questões sobre possíveis reacções químicas a ocorrer em solução (eventual presença de compostos redutores que promovessem a oxidação química do composto). Assim, foi efectuado um novo ensaio por forma a esclarecer estas dúvidas, comparando-se os resultados espectrofotométricos obtidos em solução de lamas filtrada e em solução de lamas.

Este ensaio foi, então, iniciado com a preparação de duas soluções: uma apenas com AC (solução A) e outra com AC e βCD (solução B). Para a preparação das soluções foi utilizado o “Método B” (vide secção 2.1.1.2.2) descrito nos estudos de solubilidade do Ácido Sinápico. A Tabela 3.2. apresenta as quantidades e concentrações utilizadas na preparação destas soluções.

Tabela 3.2. Quantidades e concentrações das soluções A e B

Solução	V_{final} solução [L]	$V_{\text{solução-mãe } \beta\text{CD}}$ [mL]	$ \beta\text{CD} $ [mM]	m(AC) [g]	$ \text{AC} _{\text{máx.}}$ [μM] ⁽¹⁾	$V_{\text{Água Desionizada}}$ [mL]
A	0,100	0,00	0,00	0,0185	1027	100,00
B	0,100	100,00	12,01	0,0185	1027	0,00

A concentração referenciada com ⁽¹⁾ traduz uma concentração teórica máxima, correspondente à quantidade de AC que existe na solução inicial.

As soluções A e B foram incubadas (300 rpm; 25 °C) durante 72h e após esse período foram realizados os seguintes ensaios:

- *Estudo espectrofotométrico com adição de solução de lamas filtrada (Tabela 3.3.);*
 - Transferiu-se 20 mL de cada uma das soluções A e B para dois gobelés de 50 mL, mediu-se o pH, filtrou-se e efectuou-se a análise espectral (190 - 350 nm);
 - Mediu-se o pH da solução de lamas filtrada previamente em sistema Millipore com filtro de porosidade 0,22 μ m;
 - Adicionou-se, a cada uma das soluções A e B, 20 mL da solução de lamas filtrada;
 - Mediu-se o pH, filtrou-se e efectuou-se a análise espectral (190 - 350 nm) ao longo do tempo: t=0, t=50min; t=90min, t=130min, t=24h.

Tabela 3.3. Preparação das soluções A1 e B1

	V_{final} solução [L]	Solução A	Solução B	Solução de lamas filtrada	\(\betaCD [mM]
Solução A1	0,040	20 mL		20 mL	0,00
Solução B1	0,040		20 mL	20 mL	6,01

- *Estudo espectrofotométrico com adição de solução de lamas (Tabela 3.4.);*
 - Transferiu-se 20 mL de cada uma das soluções A e B para dois gobelés de 50 mL;
 - Mediu-se o pH da solução de lamas;
 - Adicionou-se, a cada uma das soluções A e B, 20 mL da solução de lamas;
 - Mediu-se o pH, filtrou-se e efectuou-se a análise espectral (190 - 350 nm) ao longo do tempo: t=0, t=50min; t=90min, t=130min, t=24h.

Tabela 3.4. Preparação das soluções A2 e B2

	V_{final} solução [L]	Solução A	Solução B	Solução de lamas	\(\betaCD [mM]
Solução A2	0,040	20 mL		20 mL	0,00
Solução B2	0,040		20 mL	20 mL	6,01

- *Estudo da taxa de consumo de oxigénio (Tabela 3.5.);*
 - Transferiu-se 20 mL de cada uma das soluções A e B para dois gobelés de 50 mL;
 - Adicionou-se, a cada uma das soluções A e B, 20 mL da solução de lamas;
 - Promoveu-se o arejamento da solução durante 30 minutos;
 - Introduziu-se o eléctrodo de oxigénio dissolvido e esperou-se 3 minutos para estabilização do sinal;
 - Efectuou-se a medição do oxigénio dissolvido durante 15 minutos.

Tabela 3.5. Preparação das soluções A3 e B3

	V_{final} solução [L]	Solução A	Solução B	Solução de lamas	$ \beta\text{CD} $ [mM]
Solução A3	0,040	20 mL		20 mL	0,00
Solução B3	0,040		20 mL	20 mL	6,01

3.1.2.3. ESTUDO DE BIODEGRADAÇÃO EM MEIO MINERAL TAMPONADO COM RECURSO AO CONTROLO ESPECTROFOTOMÉTRICO E ANÁLISE DO CRESCIMENTO BACTERIANO

Ainda com o objectivo de estudar a biodegradação do AC realizou-se um ensaio com este ácido complexado com βCD e a utilização de um meio mineral tamponado adequado ao crescimento bacteriano. O meio mineral contém os macronutrientes necessários ao crescimento bacteriano e um tampão fosfato capaz de evitar a diminuição do pH provocada pela produção metabólica de CO_2 .

Este estudo foi iniciado com a preparação de soluções de acordo com “Método B” (*vide secção 2.1.1.2.2*). descrito nos estudos de solubilidade do Ácido Sinápico.

A Tabela 3.6. resume a preparação das soluções.

Tabela 3.6. Preparação de 25 mL de soluções com β CD e AC

Solução	$ \beta\text{CD} $ [mM]	m(AC) [g]
1	0,00	5,30E-03
2	6,00	5,40E-03
3	12,00	5,40E-03
4	18,00	5,40E-03
5	24,00	5,50E-03

Após a preparação, as soluções foram incubadas (300 rpm; 25 °C) durante um período 72h.

A preparação do meio mineral teve por base qualitativa e quantitativa a publicação da *Environmental Protection Agency (EPA), Ecological Effects Test Guidelines*.^[30] O meio foi preparado de acordo com a Tabela 3.7., e adicionou-se 10 mL deste às soluções anteriores após a incubação.

Tabela 3.7. Preparação do meio mineral

Sal	$V_{\text{final solução}}$ [L]	m [g]	$ \text{Sal} $ [mg/L]
NaCl	0,100	0,0120	120
CaCl ₂		0,0052	52
MgSO ₄		0,0016	16
K ₂ HPO ₄		0,0466	466
KH ₂ PO ₄		0,0503	503
(NH ₄) ₂ SO ₄		0,0292	292

Antes do início do ensaio efectuou-se uma análise espectrofotométrica entre 500 nm e 700 nm da solução de lamas. Os resultados obtidos permitiram observar a ocorrência de um máximo de absorção a 650 nm.

A este comprimento de onda realizou-se uma recta de calibração (SSV vs Abs), utilizando diluições da solução-mãe de lamas (3000 mg SSV/L) em água desionizada.

Esta informação é importante, na medida em que, para se realizar um crescimento bacteriano deve-se utilizar uma absorvância inicial, a 650 nm, de 0,05.^[39]

Cada solução da Tabela 3.6. (1, 2, 3, 4 e 5) foi transferida, respectivamente, para 5 gobelés de 100 mL, e adicionaram-se 10 mL do meio mineral preparado de acordo com a Tabela 3.7. e 15 mL da solução de lamas.

Após a preparação das novas soluções (1A, 2A, 3A, 4A e 5A), procedeu-se ao estudo espectrofotométrico ao comprimento de onda de máxima absorção para a solução de lamas, 650 nm, por forma a avaliar o crescimento bacteriano. Este estudo foi realizado ao longo do tempo (200 h).

Efectuou-se também a análise espectral entre 190 a 350 nm (após diluição 1:5 e filtração das soluções) por forma a avaliar possíveis variações no espectro do AC ao longo do tempo (50h) e pela influência de concentrações crescentes de β CD.

3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1. ESTUDO DE BIODEGRADAÇÃO EM MEIO NÃO TAMPONADO COM RECURSO À MEDIÇÃO DA TAXA DE CONSUMO DE OXIGÉNIO E CONTROLO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Para o ensaio de biodegradação em meio não tamponado recorreu-se à ETAR para recolha da solução de lamas e após análise da mesma, obteve-se um valor de 2097 mg SST/L (ou 1887 mg SSV/L). Foi, então, necessário lavar e centrifugar as lamas para obter o valor de 3000 mg SSV/L.

Este estudo teve como objectivo a análise da taxa de consumo de oxigénio de microrganismos, uma vez que esta é uma medida indirecta da actividade metabólica destes, ou seja, da biodegradação de um composto.

A cada uma das soluções 1 a 7, foi acrescentado 25 mL da solução de lamas obtendo as concentrações em AC, β CD e lamas indicadas na tabela seguinte.

Tabela 3.8. Composição das soluções após introdução das lamas

Matraz	$ \beta\text{CD} $ ⁽¹⁾ [mM]	m(AC) [g]	AC ⁽²⁾ [μM]	m(AC) ⁽³⁾ [g]	Lamas mg SSV/L]
1	0,0	6,40E-03	181	3,27E-03	1500
2	1,5	6,10E-03	213	3,85E-03	1500
3	3,0	6,40E-03	185	3,33E-03	1500
4	4,5	6,30E-03	232	4,18E-03	1500
5	6,0	6,40E-03	180	3,25E-03	1500
6	7,5	6,40E-03	263	4,75E-03	1500
7	0,0	5,90E-03	-----	-----	1500
8	3,0	5,90E-03	-----	-----	----

A concentração referenciada com ⁽¹⁾ corresponde à concentração de β CD (valores obtidos da Tabela 2.5.) corrigida pela diluição provocada pela introdução da solução de lamas. O valor ⁽²⁾ corresponde à concentração de AC solubilizada (valores obtidos da Tabela B11. para 147,5h, no Anexo B) corrigida pela diluição provocada pela introdução da solução de lamas. A quantidade de AC que se encontra solubilizada está referenciada com ⁽³⁾.

Promoveu-se arejamento durante 30 minutos a todas as soluções e os resultados obtidos para as concentrações de oxigénio dissolvido ao longo do tempo estão apresentados nas Figuras 3.2. e 3.3. (os valores experimentais encontram-se na Tabela C1. do Anexo C).

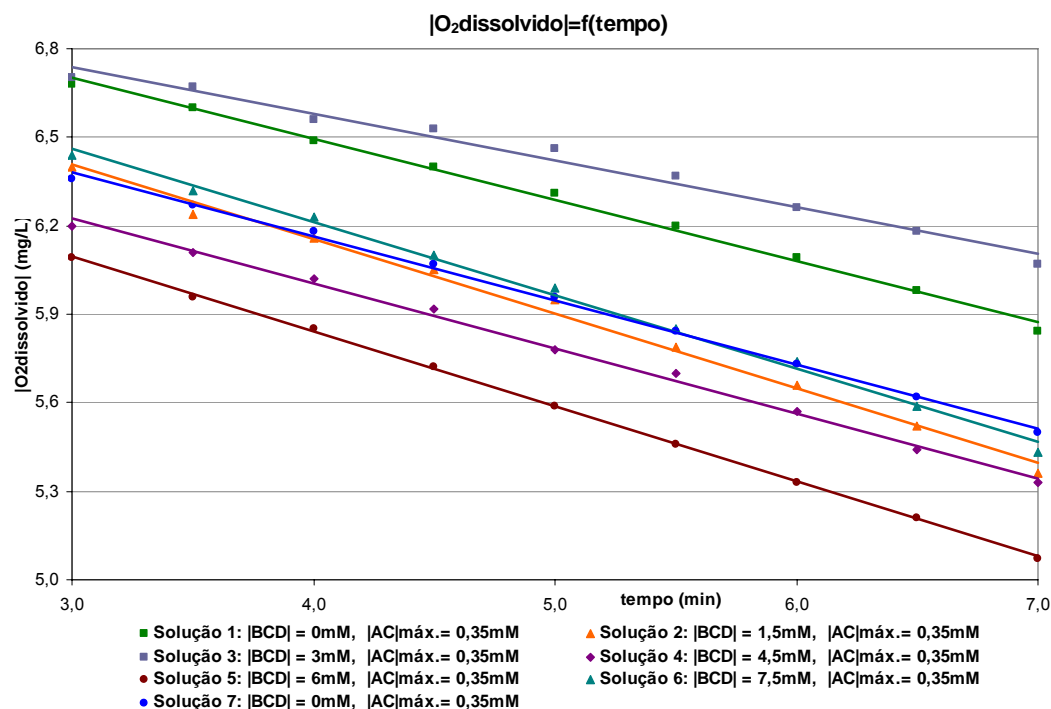


Figura 3.2. Evolução temporal da concentração de oxigénio dissolvido para soluções com diferentes concentrações de β CD em meio não tamponado [mg/L O_2 dissolvido a 25°C]

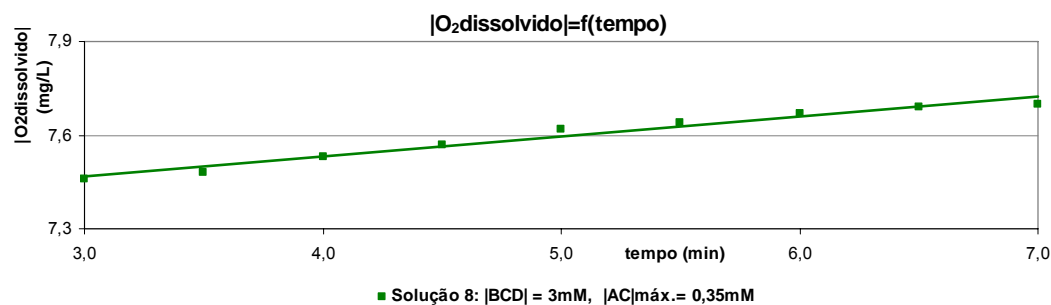


Figura 3.3. Evolução temporal da concentração de oxigénio dissolvido para a solução controlo nº8 (sem solução de lamas) em meio não tamponado [mg/L O_2 dissolvido a 25°C]

Os resultados obtidos nas Figuras 3.2. e 3.3. permitem verificar que a concentração de oxigénio dissolvido diminui ao longo do tempo em todas as soluções, excepto na solução 8 (solução controlo, na qual não foi introduzida a solução de lamas). A Tabela 3.9. resume as taxas de consumo de oxigénio para as soluções em estudo.

Tabela 3.9. Taxa de consumo de oxigénio para as soluções concentração teórica máxima de AC 0,35 mM pela influência de concentrações crescentes de β CD

Solução	$ \beta\text{CD} $ (mM)	Taxa de Consumo de O_2 (mg O_2 / L/min)
1	0,0	0,2073
2	1,5	0,2527
4	4,5	0,2203
5	6,0	0,2543
6	7,5	0,2487
7	0,0	0,2173

Os resultados obtidos para a taxa de consumo de oxigénio permitem concluir que a existência de β CD provoca um aumento da taxa de consumo de oxigénio.

As taxas de consumo de oxigénio nas soluções 1 e 7 (soluções sem β CD, apenas com AC) foram relativamente semelhantes (variação inferior a 5%), embora a primeira tenha estado sujeita ao retiro de aliquotas para análises espectrofotométricas e a segunda tenha ficado protegida, por forma a servir de controlo.

Os resultados da análise das soluções por espectrofotometria de UV-Visível no intervalo de comprimentos de onda entre 190 nm e 350 nm apresentam-se seguidamente, na Figura 3.4.

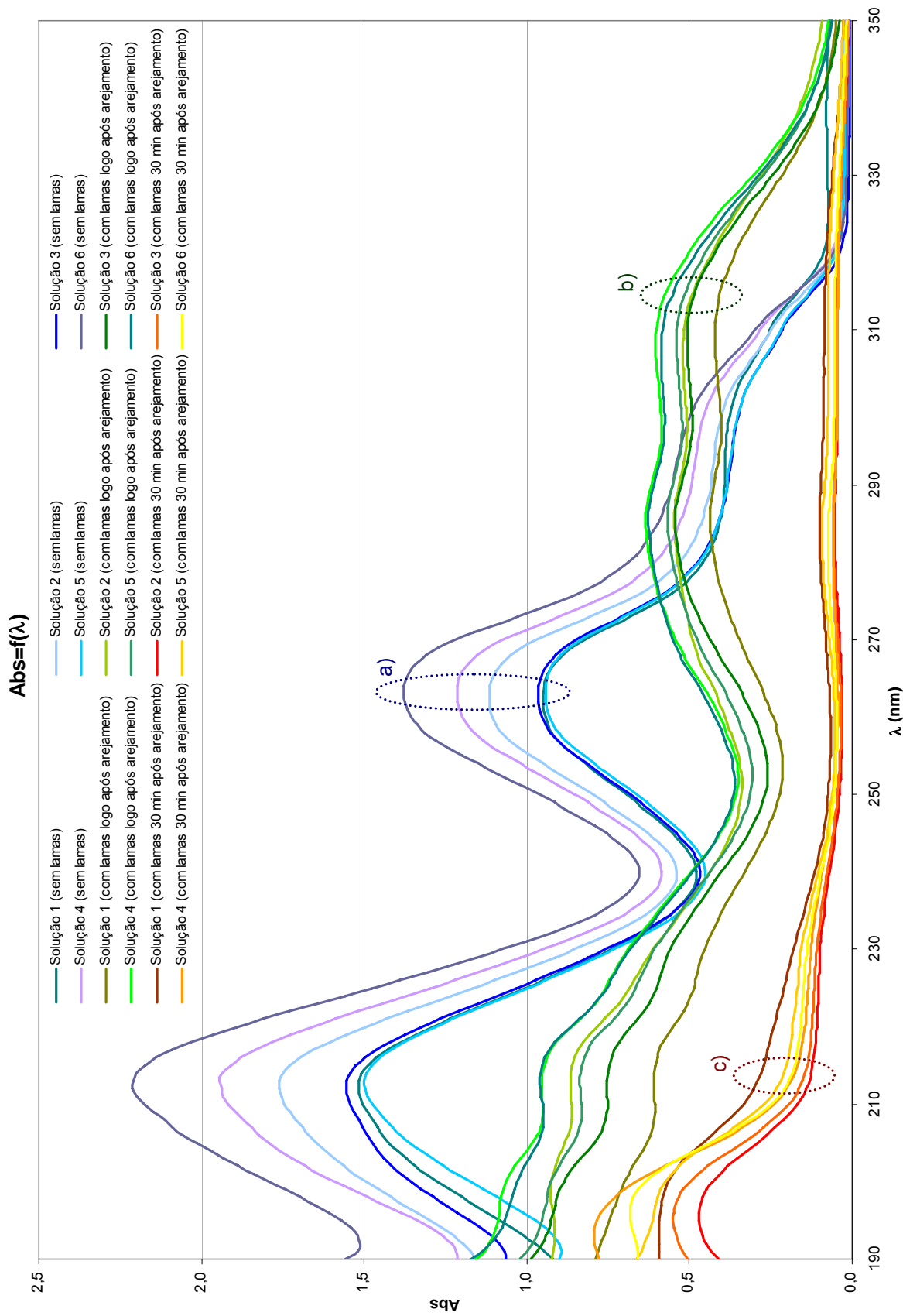


Figura 3.4. Resultados da análise espectral das soluções 1-6. Soluções com quantidade constante de AC e quantidades crescentes de β CD: a) antes da introdução das lamas; b) após introdução das lamas e logo após arejamento; c) após introdução das lamas e 30 min após arejamento.

O estudo espectrofotométrico permitiu verificar uma alteração completa do espectro do AC após a introdução da solução de lamas e do arejamento. Dois picos de absorvância existentes, um a ~210 nm e outro ~260 nm, desaparecem após introdução da solução de lamas para dar origem a outros três, um ~320 nm, outro a ~280 nm e finalmente o último a ~200 nm (este último pico foi o único que permaneceu após 30 min de arejamento).

Esta alteração do espectro indicia que houve formação de um ou mais compostos intermediários resultantes do metabolismo das bactérias existentes nas lamas. De acordo com a literatura consultada, colocou-se a hipótese da formação do aldeído coniferílico. Por este motivo efectuou-se a análise espectrofotométrica de uma solução padrão de aldeído coniferílico a 100 μ M e os resultados obtidos são apresentados na Figura 3.5.

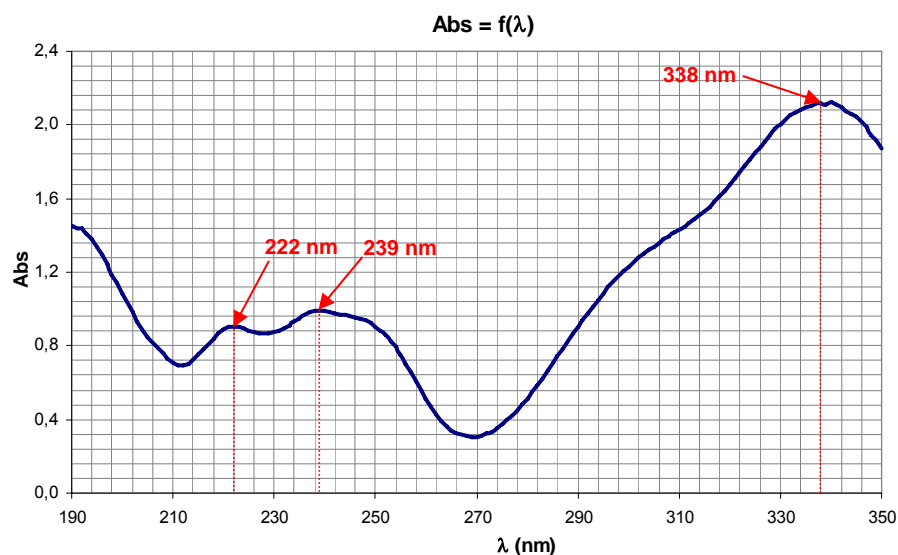


Figura 3.5. Resultados espectrofotométricos (190 a 350 nm) da solução padrão de Aldeído Coniferílico

A análise das Figuras 3.4.b) e 3.5. e dos máximos de absorvância representados permite concluir que o composto formado poderá não ser o Aldeído Coniferílico.

Considerando a alteração completa do espectro do AC após a introdução das lamas e do arejamento, colocou-se em hipótese que estivessem a ocorrer, em solução, reacções químicas de degradação do AC e β CD. Assim, o estudo seguinte foi realizado no sentido de esclarecer esta dúvida.

As soluções A3 e B3 foram analisadas no sentido de se comprovar os resultados do estudo anterior, nomeadamente no que concerne à taxa de consumo de oxigénio.

Considerando a preparação das soluções descritas nas Tabelas 3.2. a 3.5., realizou-se um novo ensaio.

Foi necessária solução concentrada de lamas a 3000 mg SSV/L para 4 das 6 soluções a preparar e a Tabela 3.10. resume essa preparação.

Tabela 3.10. Concentrações das soluções A1, B1, A2, B2, A3, B3

Solução ⁽²⁾	~ β CD (mM)	~ AC _{máx.} ⁽¹⁾ (mM)	~ Lamas (mg SSV/L)
A1	0,0	0,5	0
B1	6,0	0,5	0
A2	0,0	0,5	1500
B2	6,0	0,5	1500
A3	0,0	0,5	1500
B3	6,0	0,5	1500

Nota:

⁽¹⁾ é uma concentração teórica máxima.

⁽²⁾ soluções A2, B2, A3 e B3 foram preparadas com 50% em volume de solução de lamas, enquanto que as soluções A1 e B1 foram preparadas com 50% em volume de solução de lamas filtrada.

Os resultados obtidos na análise espectral das soluções A1 e B1 são apresentados seguidamente, nas Figuras 3.6. e 3.7.

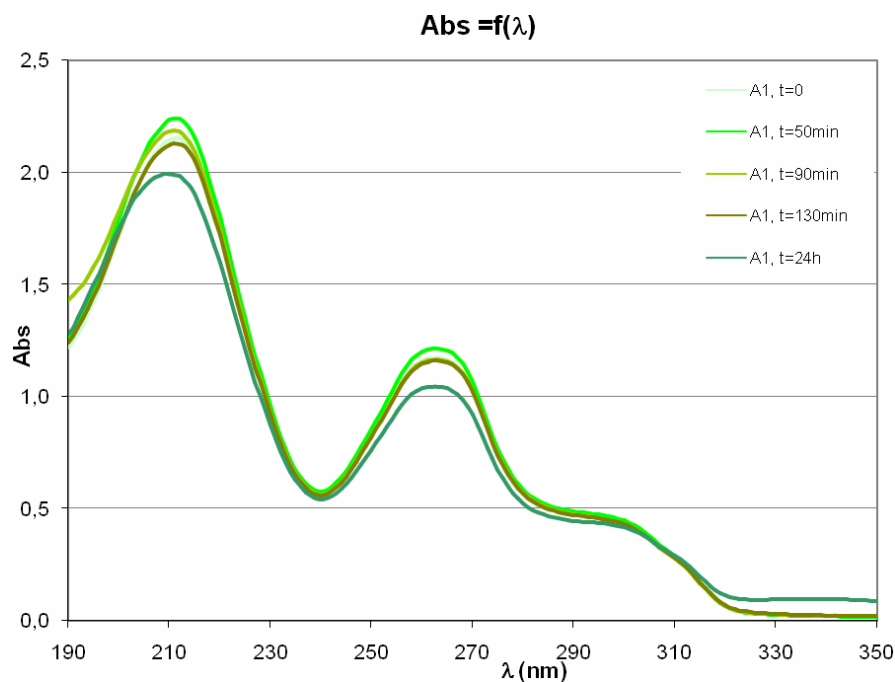


Figura 3.6. Resultados espectrofotométricos da solução A1 ($[\beta\text{CD}] \cong 0 \text{ mM}$, $[\text{AC}] \cong 0,5 \text{ mM}$, $[\text{Lamas}] \cong 0 \text{ mg SSV/L}$) para $t=0$, $t=50\text{min}$, $t=90\text{min}$, $t=130\text{min}$ e $t=24\text{h}$ (solução sujeita a diluição 1:5)

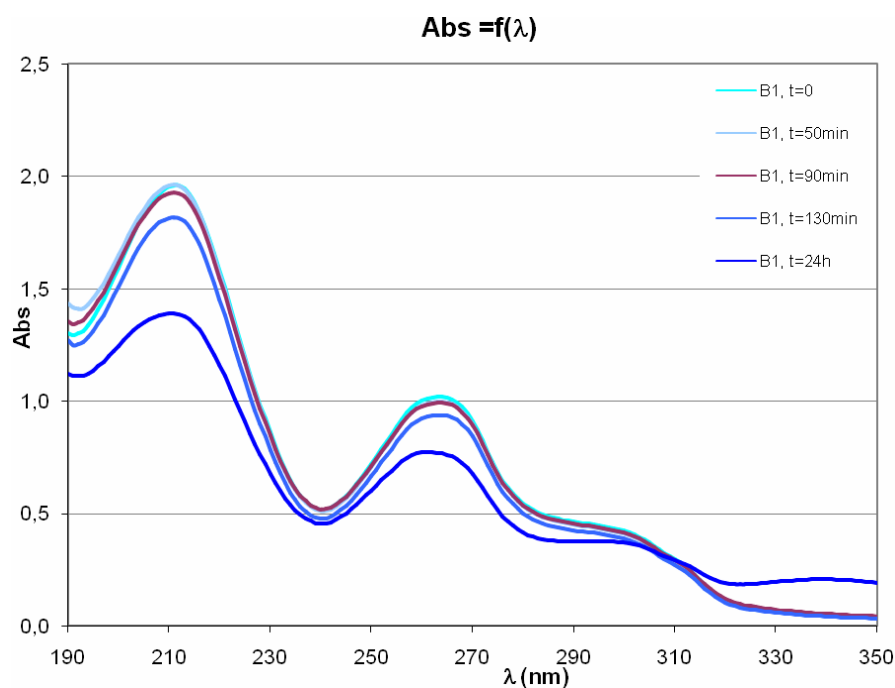


Figura 3.7. Resultados espectrofotométricos da solução B1 ($[\beta\text{CD}] \cong 6 \text{ mM}$, $[\text{AC}] \cong 0,5 \text{ mM}$, $[\text{Lamas}] \cong 0 \text{ mg SSV/L}$) para $t=0$, $t=50\text{min}$, $t=90\text{min}$, $t=130\text{min}$ e $t=24\text{h}$ (solução sujeita a diluição 1:5)

O estudo realizado com as soluções A1 e B1 teve como objectivo avaliar possíveis reacções químicas de degradação do AC e β CD. Pela análise dos resultados obtidos nas Figuras 3.6. e 3.7. verifica-se que não houve alterações espectrais significativas ao longo do tempo, tanto para a solução A1 como para a solução B1. Por este motivo conclui-se que as alterações verificadas nos estudos anteriores são devidas apenas à biodegradação, decorrente das bactérias, existentes na solução de lamas.

Os resultados obtidos na análise espectral das soluções A2 e B2 são apresentados seguidamente, nas Figuras 3.8. e 3.9.

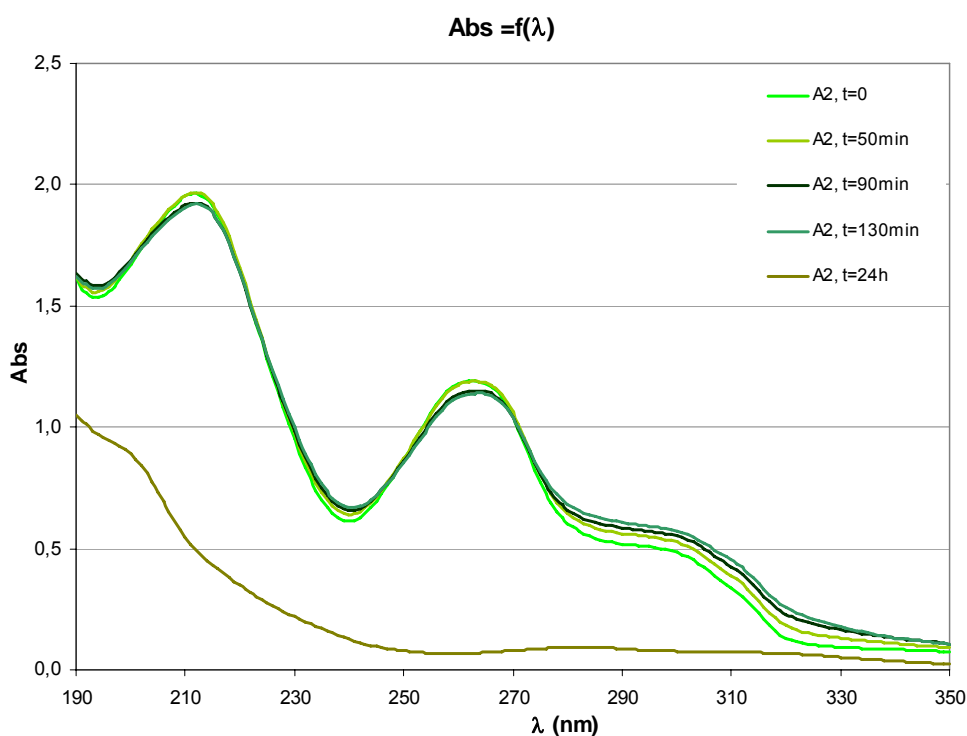


Figura 3.8. Resultados espectrofotométricos da solução A2 ($[\beta\text{CD}] \cong 0 \text{ mM}$, $[\text{AC}] \cong 0,5 \text{ mM}$, $[\text{Lamas}] \cong 1500 \text{ mg/L}$) para $t=0$, $t=50\text{min}$, $t=90\text{min}$, $t=130\text{min}$ e $t=24\text{h}$ (solução sujeita a diluição 1:5)

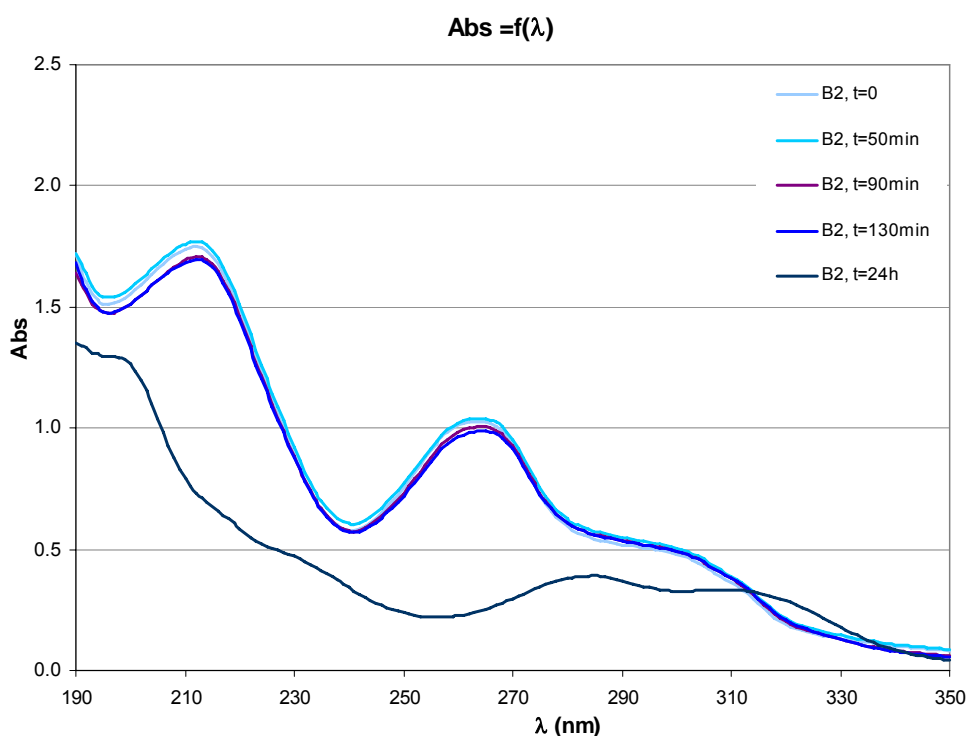


Figura 3.9. Resultados espectrofotométricos da solução B2 ($[\beta\text{CD}] \cong 6 \text{ mM}$, $[\text{AC}] \cong 0,5 \text{ mM}$, $[\text{Lamas}] \cong 1500 \text{ mg/L}$) após a introdução das lamas a $t=0$, $t=50\text{min}$, $t=90\text{min}$, $t=130\text{min}$ e $t=24\text{h}$ (solução sujeita a diluição 1:5)

A análise espectrofotométrica das soluções A2 e B2 mostrou, tal como se verificou em resultados anteriores, a formação ou excreção de produtos resultantes do metabolismo e/ou degradação das bactérias com absorvâncias a ~ 200 , ~ 280 e $\sim 320 \text{ nm}$ ao final de 24h.

Efectuou-se a comparação entre a Figura 3.4., especificamente sobre os resultados de absorvância para a solução 5 ($\beta\text{CD} \cong 6 \text{ mM}$, $[\text{AC}] \cong 0,35 \text{ mM}$, $[\text{Lamas}] \cong 1500 \text{ mg/L}$) após esta ter sido sujeita a 30 minutos de arejamento, com os resultados obtidos para a solução B2 na Figura 3.9. ($[\beta\text{CD}] \cong 6 \text{ mM}$, $[\text{AC}] \cong 0,5 \text{ mM}$, $[\text{Lamas}] \cong 1500 \text{ mg/L}$) e concluiu-se que o arejamento foi capaz de acelerar a degradação microbiana. Sem arejamento a biodegradação foi mais lenta pois só se obteve resultados de absorvância semelhantes após 24h. Esta comparação pode ser observada na Figura 3.10.

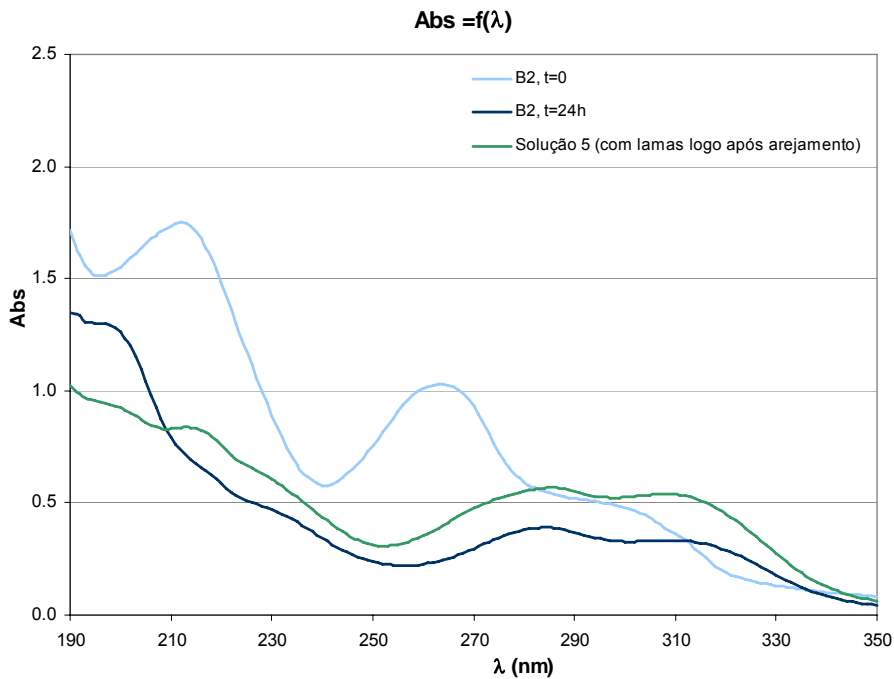


Figura 3.10. Comparação entre o espectro de absorvância (Figura 3.4.) para a solução 5 (β CD \cong 6 mM, |AC| \cong 0,35 mM, |Lamas| \cong 1500 mg/L) com arejamento e o espectro (Figura 3.9.) para a solução B2 (β CD| \cong 6 mM, |AC| \cong 0,5 mM, |Lamas| \cong 1500 mg/L)

Os valores de oxigénio dissolvido para as soluções A3 e B3 são apresentados na Figura 3.11. (os valores experimentais encontram-se na Tabela C2. do Anexo C).

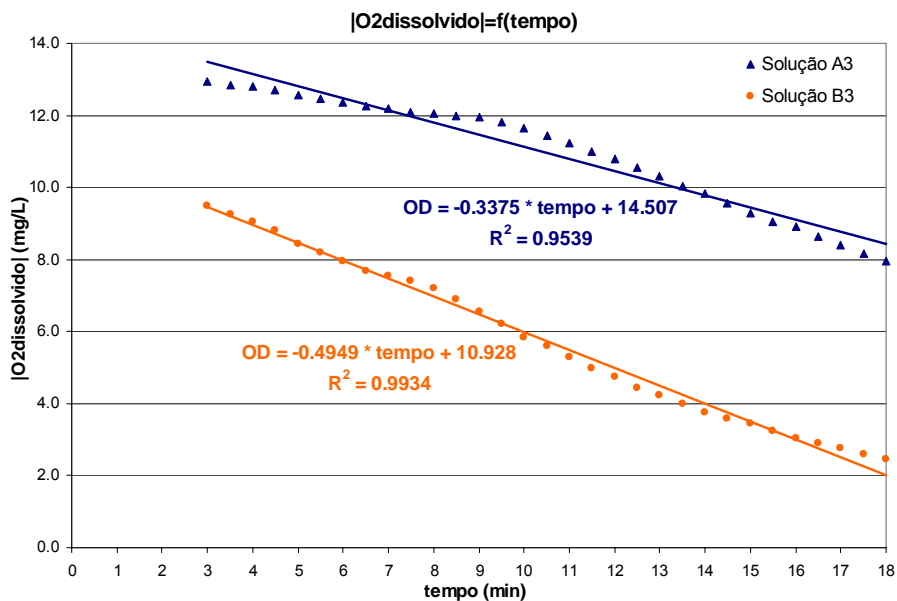


Figura 3.11. Evolução temporal da concentração de oxigénio dissolvido nas soluções A3 (β CD| \cong 0 mM, |AC| \cong 0,5 mM, |Lamas| \cong 1500 mg/L) e B3 (β CD| \cong 6 mM, |AC| \cong 0,5 mM, |Lamas| \cong 1500 mg/L) [mg/L O₂ dissolvido a 25°C]

Pela análise dos resultados obtidos na Figura 3.11. verifica-se que a solução B3 ($|\beta\text{CD}| \cong 6 \text{ mM}$, $|\text{AC}| \cong 0,5 \text{ mM}$) que contém βCD para além do AC tem uma taxa de consumo de oxigénio 47% superior à da solução A3 ($|\beta\text{CD}| \cong 0 \text{ mM}$, $|\text{AC}| \cong 0,5 \text{ mM}$). Este resultado vai de encontro ao já verificado nos ensaios anteriores em que se verifica um aumento da taxa de consumo de oxigénio pela existência de βCD em solução.

Para se confirmar os resultados anteriores relativos à fraca variação do pH durante a incubação, efectuou-se nova análise ao longo deste estudo, tendo agora em atenção a introdução da solução de lamas ou da solução de lamas filtrada. Os resultados da análise sobre a influência do pH apresentam-se nas Tabelas 3.11. e 3.12.

Tabela 3.11. Valores de pH nas soluções iniciais A, B, A1, B1, A2, B2.

Solução	Solução A	Solução B	Solução de lamas filtrada (a adicionar em A1 e B1)	Solução de lamas (a adicionar em A2 e B2)
pH	5,90	5,44	7,86	7,40

Tabela 3.12. Evolução temporal do valor de pH das soluções A1, B1, A2, B2 na incubação a 25°C.

Solução	Solução A1	Solução B1	Solução A2	Solução B2
pH a t=0	7,57	7,49	7,37	7,28
pH a t=50min	7,60	7,57	7,26	7,19
pH a t=90min	7,63	7,63	7,21	7,11
pH a t=130min	7,62	7,61	7,17	7,03
pH a t=24h	7,76	7,74	7,51	7,10

Verifica-se, pela análise das Tabelas 3.11. e 3.12., que o pH das soluções ao longo do tempo sofreu oscilações muito pequenas. Este resultado permite concluir que a variação deste factor não tem aparentemente importância significativa no processo de biodegradação.

Realizou-se um novo ensaio para efectuar a comparação das taxas de consumo de oxigénio de duas soluções, uma apenas com βCD e uma outra com βCD e AC.

Prepararam-se duas soluções: uma solução só com β CD (Solução 1: $|\beta$ CD| \cong 12 mM) e uma outra com AC e β CD (Solução 2: $|\text{AC}| \cong$ 1 mM) e β CD ($|\beta$ CD| \cong 12 mM). As soluções foram incubadas (300 rpm; 25 °C) durante 72h e no final, acrescentou-se igual volume de solução de lamas (3000 mg SSV/L) e promoveu-se o arejamento durante 30 minutos.

Posteriormente, efectuou-se a medição do oxigénio dissolvido durante 15 minutos e os resultados obtidos para a taxa de consumo de oxigénio são indicados na Figura 3.12. (os valores experimentais encontram-se na Tabela C3. do Anexo C).

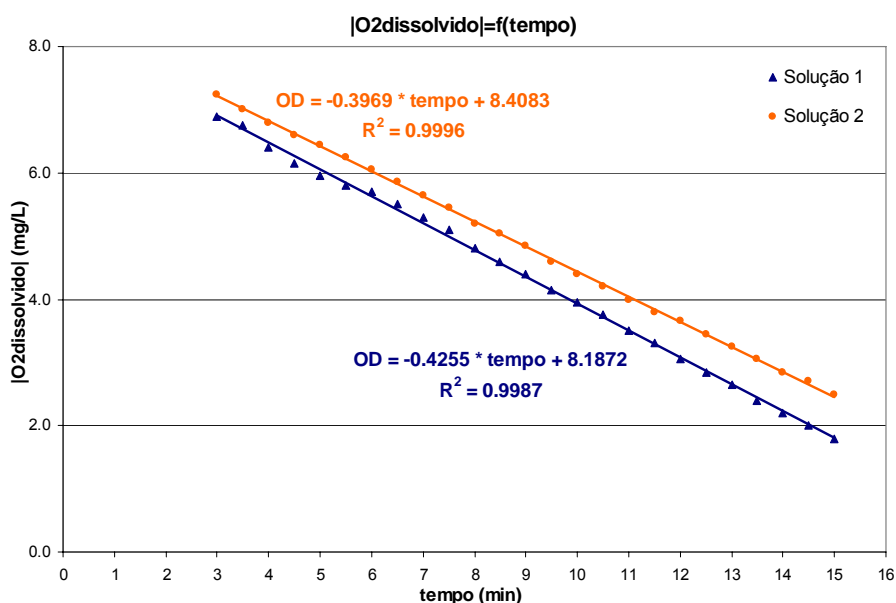


Figura 3.12. Evolução temporal da concentração de oxigénio dissolvido das soluções 1 ($|\beta$ CD| \cong 6 mM) e 2 ($|\beta$ CD| \cong 6 mM e $|\text{AC}| \cong$ 0,5 mM) [mg/L O₂ dissolvido a 25°C]

Pela análise dos resultados obtidos na Figura 3.12. verifica-se que a concentração de oxigénio dissolvido diminui ao longo do tempo nas duas soluções de uma forma linear. Verifica-se pois que a biodegradação é semelhante nas duas soluções com β CD, no entanto com um ligeiro aumento na solução sem AC.

Efectuando uma comparação entre os resultados obtidos na Figura 3.12. para a solução 2 com os resultados obtidos na Figura 3.11. para a solução B3, verifica-se que estes últimos têm uma taxa de consumo de oxigénio superior. A explicação para este facto poderá residir na idade das lamas. As lamas adicionadas à solução B3 tinham idade inferior às adicionadas à solução 2 e por este motivo a actividade das lamas da solução B3 é ligeiramente superior.

3.2.2. ESTUDO DE BIODEGRADAÇÃO EM MEIO MINERAL TAMPONADO COM RECURSO AO CONTROLO ESPECTROFOTOMÉTRICO E ANÁLISE DO CRESCIMENTO BACTERIANO

A recta de calibração da solução de lamas função da absorvância é apresentada na Figura 3.13. Esta recta foi determinada a comprimento de onda 650 nm, já que foi o comprimento de onda onde se obtiveram valores máximos de absorvância.

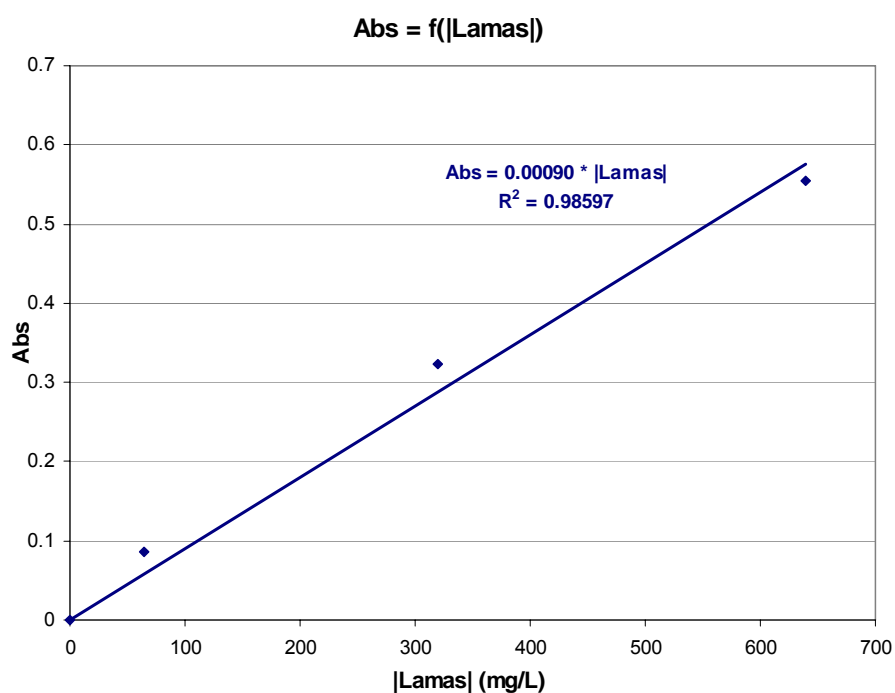


Figura 3.13. Correspondência da Absorvância obtida com a concentração da solução de lamas

As soluções utilizadas no ensaio que permite analisar o crescimento bacteriano foram preparadas de acordo com as Tabelas 3.6. e 3.7.

Para se realizar um crescimento bacteriano deve-se utilizar uma absorvância inicial, a 650 nm, de 0,05 que, atendendo à recta de calibração, corresponde a 55,56 mg SSV/L. Como 15 mL de solução de lamas é sujeita à diluição com 10 mL meio mineral e 25 mL de solução (AC + β CD) então, a solução stock a utilizar na preparação das soluções deverá ter a concentração de $(55,56 * 50/15 =)$ 184,8 mg SSV/L

Após o período de incubação das soluções, efectuou-se a preparação das soluções de acordo com a Tabela 3.13.

Tabela 3.13. Composição das soluções 1A-5A

Solução	$ \beta\text{CD} $ [mM]	$ \text{AC} _{\text{máx.}}^{(1)}$ [μM]	V (mL) solução de lamas	V (mL) meio mineral
1A	0,00	588	15	10
2A	3,00	599	15	10
3A	6,00	599	15	10
4A	9,00	599	15	10
5A	12,00	610	15	10

A concentração referenciada com ⁽¹⁾ traduz uma concentração teórica máxima, correspondente à quantidade de AC que existe na solução inicial.

Neste ensaio efectuou-se a análise espectral no intervalo entre 190 e 350 nm, por forma a avaliar possíveis variações no espectro do AC ao longo do tempo (50h) e pela influência de concentrações crescentes de βCD . Os resultados obtidos apresentam-se seguidamente nas Figuras 3.14. a 3.18.

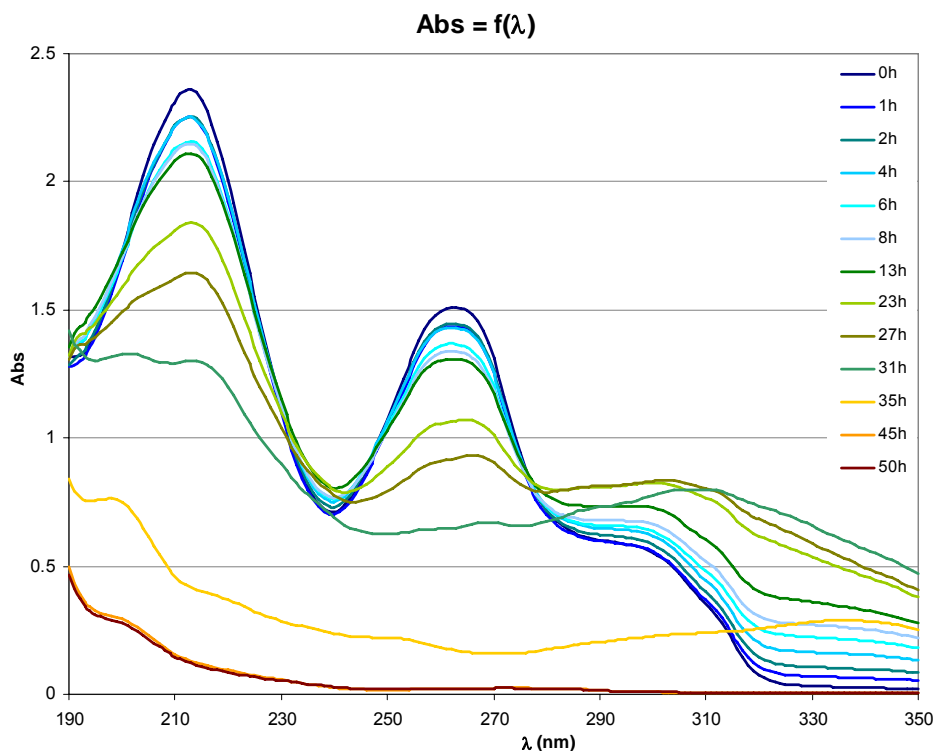


Figura 3.14. Resultados espectrofotométricos da solução 1A ($|\beta\text{CD}| \cong 0$ mM, $|\text{AC}| \cong 0,6$ mM, $|\text{Lamas}| \cong 56$ mg/L) ao longo das 50 h do crescimento bacteriano, (solução sujeita a diluição 1:5)

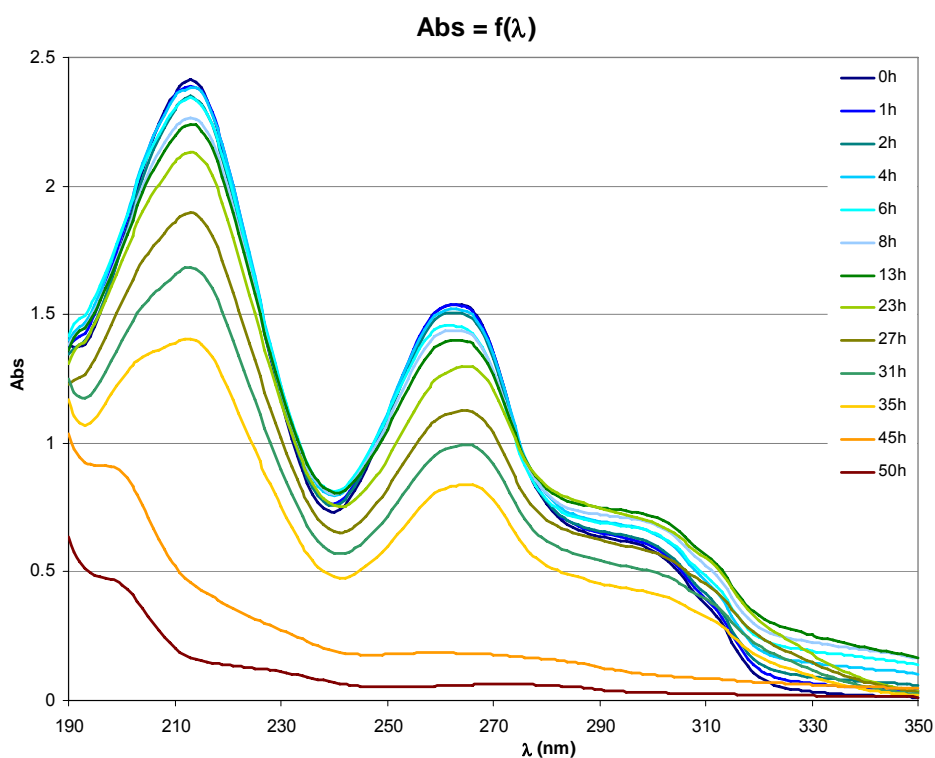


Figura 3.15. Resultados espectrofotométricos da solução 2A ($|\beta\text{CD}| \cong 3 \text{ mM}$, $|\text{AC}| \cong 0,6 \text{ mM}$, $|\text{Lamas}| \cong 56 \text{ mg/L}$) ao longo das 50h do crescimento bacteriano (solução sujeita a diluição 1:5)

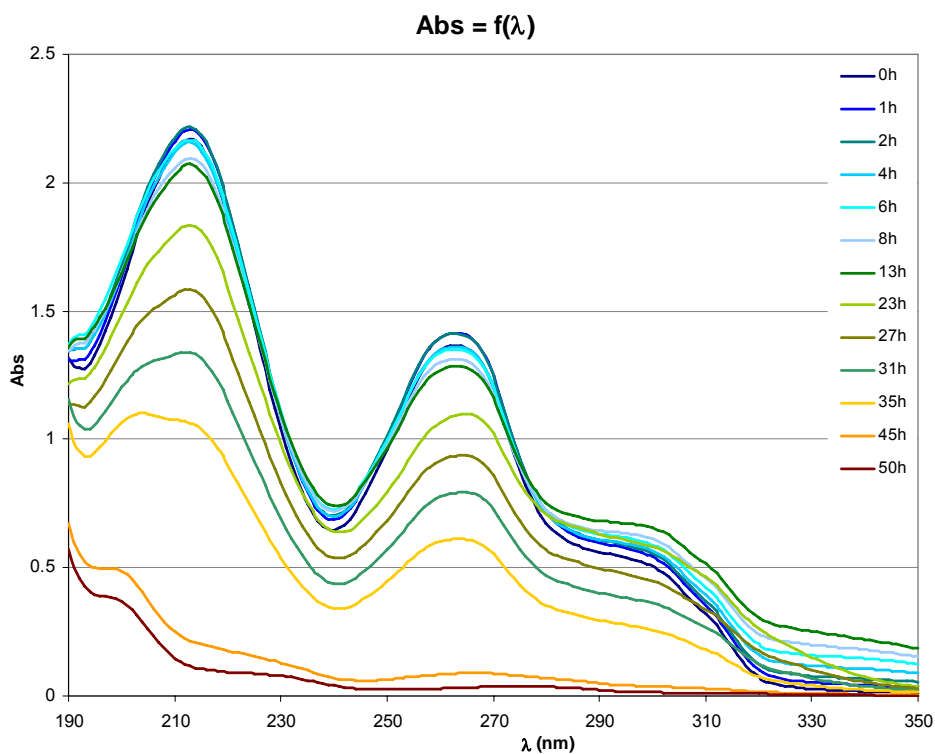


Figura 3.16. Resultados espectrofotométricos da solução 3A ($|\beta\text{CD}| \cong 6 \text{ mM}$, $|\text{AC}| \cong 0,6 \text{ mM}$, $|\text{Lamas}| \cong 56 \text{ mg/L}$) ao longo das 50h do crescimento bacteriano (solução sujeita a diluição 1:5)

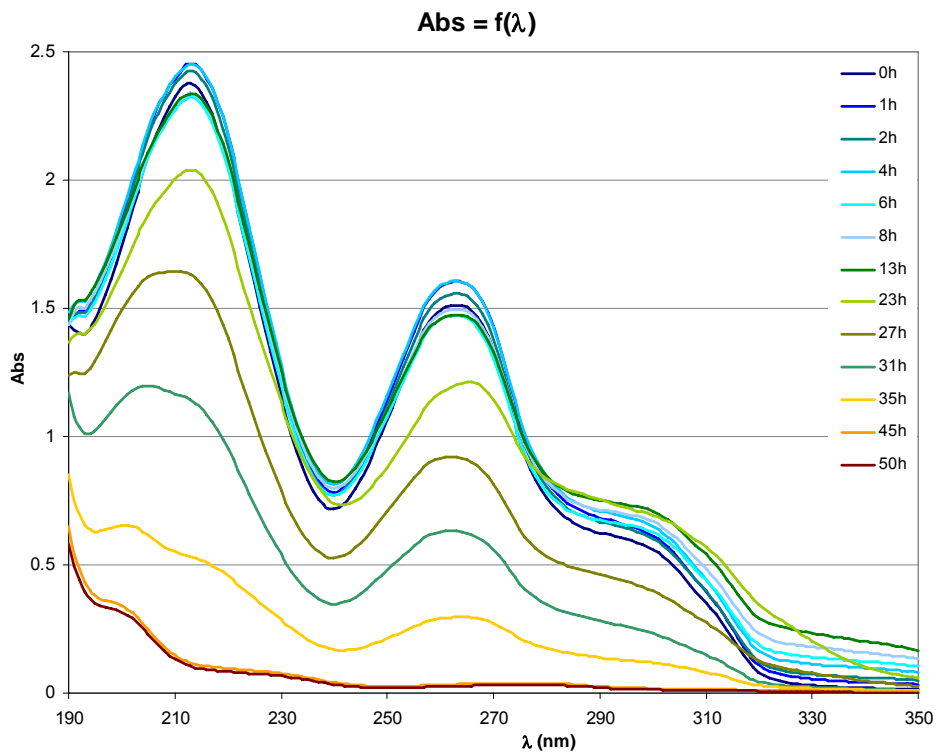


Figura 3.17. Resultados espectrofotométricos da solução 4A ($[\beta\text{CD}] \cong 9 \text{ mM}$, $[\text{AC}] \cong 0,6 \text{ mM}$, $[\text{Lamas}] \cong 56 \text{ mg/L}$) ao longo das 50h do crescimento bacteriano (solução sujeita a diluição 1:5)

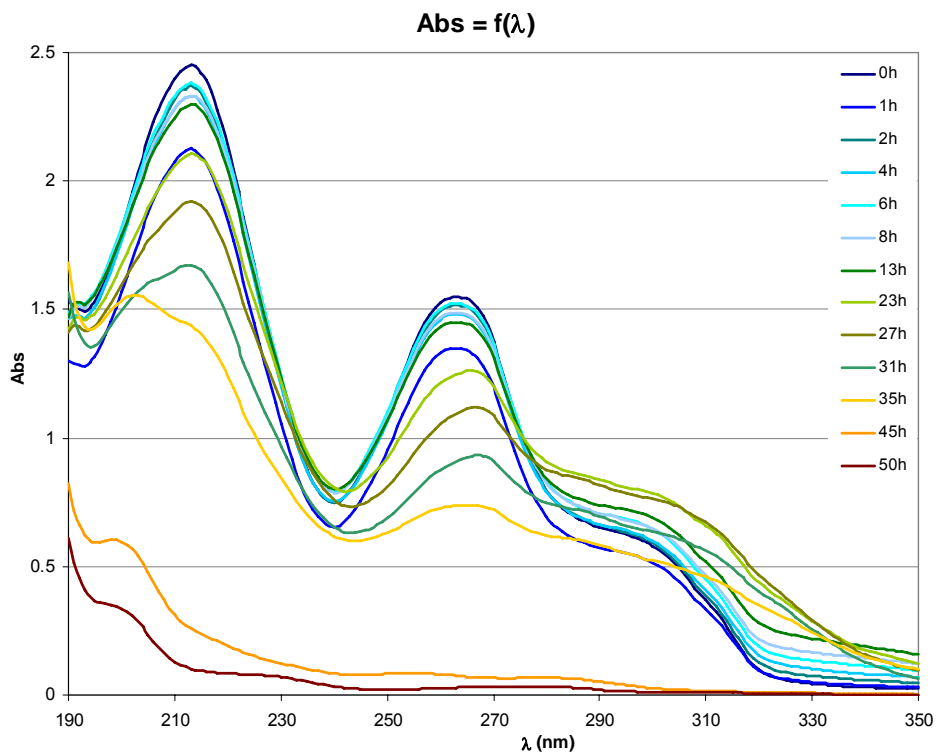


Figura 3.18. Resultados espectrofotométricos da solução 5A ($[\beta\text{CD}] \cong 12 \text{ mM}$, $[\text{AC}] \cong 0,6 \text{ mM}$, $[\text{Lamas}] \cong 56 \text{ mg/L}$) ao longo das 50h do crescimento bacteriano (solução sujeita a diluição 1:5)

Pela análise das Figuras 3.14. a 3.18. verifica-se, para todas as soluções, um decréscimo da absorvância ao longo do tempo de crescimento bacteriano, e realça-se uma acentuada diminuição de absorvância e modificação do espectro entre as 35 e 45h.

A análise do crescimento bacteriano nas soluções 1A-5A foi realizada a 650 nm conforme indicado anteriormente e durante 200 h. Os resultados são apresentados na Figura 3.19.

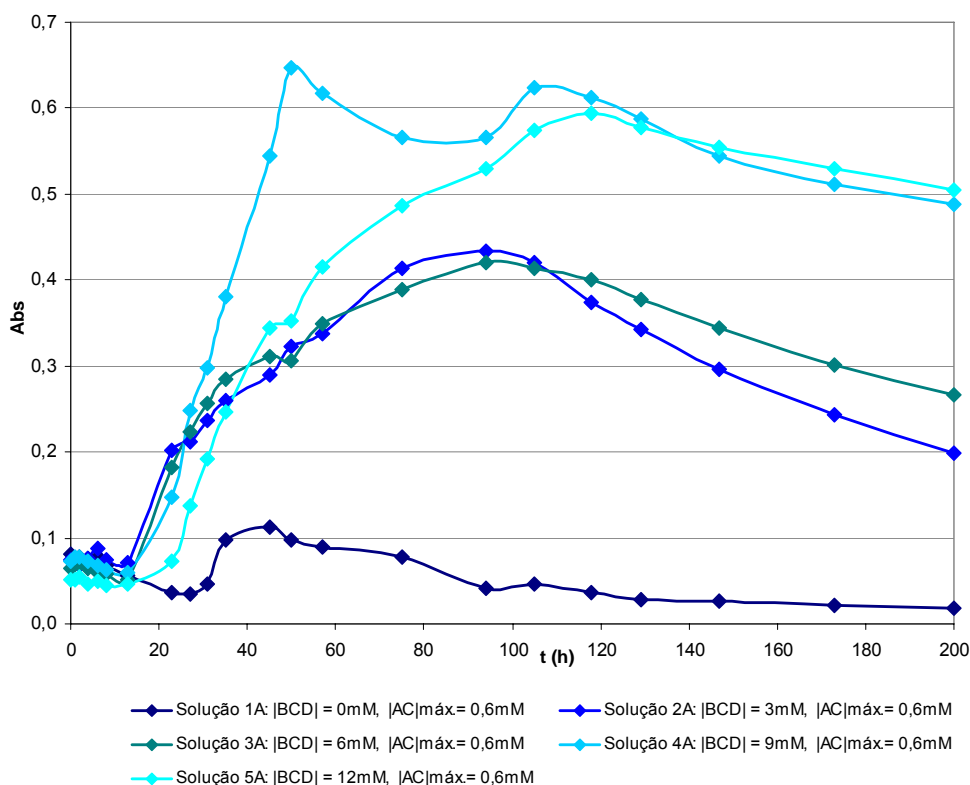


Figura 3.19. Evolução temporal da absorvância obtida a 650 nm para as soluções 1A a 5A

Para a determinação da taxa de crescimento microbiano nas soluções 1A-5A efectuou-se a representação gráfica de $\ln(X/X_0)$ em função do tempo incubação. Os resultados obtidos para a solução 4A encontram-se na Figura 3.20. (Resultados idênticos foram observados para as restantes soluções, consultar Anexo D).

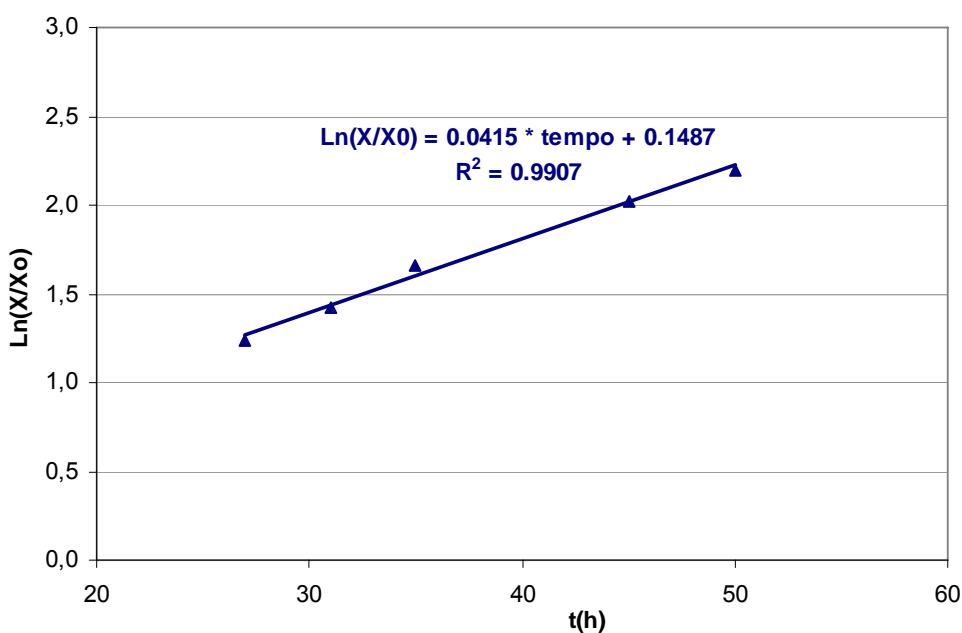


Figura 3.20. Representação da relação entre $\text{Ln}(X/X_0)$ ao longo do tempo para a solução 4A ($|\beta\text{CD}| = 9\text{mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6\text{ mM}$)

As taxas de crescimento microbiano para as soluções 1A a 5A apresentam-se na Tabela 3.14.

Tabela 3.14. Taxa de crescimento microbiano (μ) para as soluções 1A a 5A

Solução	$ \beta\text{CD} $ [mM]	$\sim \text{AC} _{\text{máx.}}$ [mM]	μ
1A	0,00	0,6	0,0142
2A	3,00	0,6	0,0171
3A	6,00	0,6	0,0371
4A	9,00	0,6	0,0415
5A	12,00	0,6	0,0737

Pela análise da tabela anterior verifica-se que a taxa de crescimento microbiano aumenta 5,2 vezes com o aumento de βCD em solução até 12 mM.

Para analisar o crescimento bacteriano foi adoptado um modelo cinético de 1ª ordem e a expressão aplicada é a seguinte:

$$X = X_{i_0} * \exp[m * (t - t_i)] \quad (\text{equação 4.})$$

Em que:

- X_{ti} - corresponde à concentração de SSV experimental para um dado tempo, t_i ;
- m - corresponde à taxa de crescimento bacteriano (declive da recta que relaciona $\ln(X/X_0)$ com o tempo incubação);

Atendendo à duplicação da concentração microbiana pode-se dizer que o tempo diminui de 48,8 para 9,4 horas à medida que se aumenta a concentração de β CD de 0 mM até 12 mM.

Comparando os resultados experimentais obtidos com os resultados provenientes da aplicação da cinética de 1ª ordem à solução 4A, obtém-se a Figura 3.21. (Resultados idênticos foram observados para as restantes soluções, consultar Anexo D). Efectuou-se a aplicação dum modelo cinético de 1ª ordem aos resultados experimentais e posteriormente efectuou-se uma extrapolação para os valores iniciais.

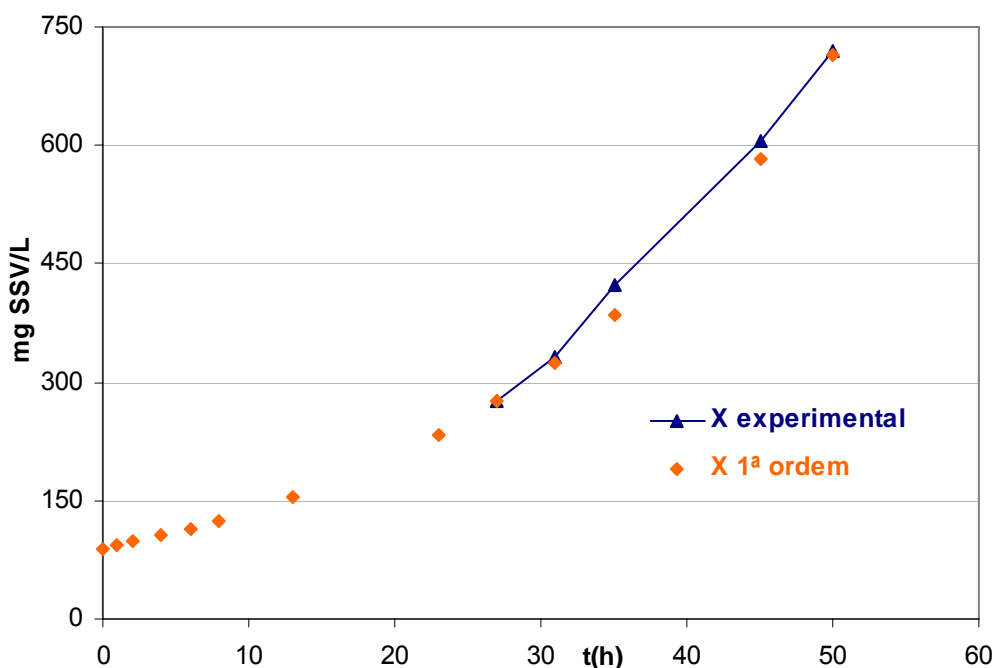


Figura 3.21. Evolução temporal de SSV obtidos experimentalmente e pelo modelo cinético de 1ª ordem para a solução 4A ($[\beta\text{CD}] = 9\text{mM}$, $[\text{AC}]_{\text{máx.}} \cong 0,6\text{ mM}$)

Para uma melhor comparação entre o crescimento microbiano e o aumento da concentração em β CD efectuou-se uma transladação dos valores obtidos para a mesma concentração inicial de 55,56 mg SSV/L (X_0). Para este efeito considerou-se que a

evolução do crescimento microbiano não sofre alteração com a sua concentração inicial, ou seja, que as taxas de crescimento máximo ($\mu_{\text{máx.}}$) mantêm-se constantes.

Os factores de transladação e os valores obtidos para a concentração de SSV nestas condições encontram-se na Tabela D6. do Anexo D. A evolução temporal da concentração de SSV prevista pelo modelo de 1ª ordem para as soluções 1A a 5A, após transladação apresentam-se graficamente na Figura 3.22.

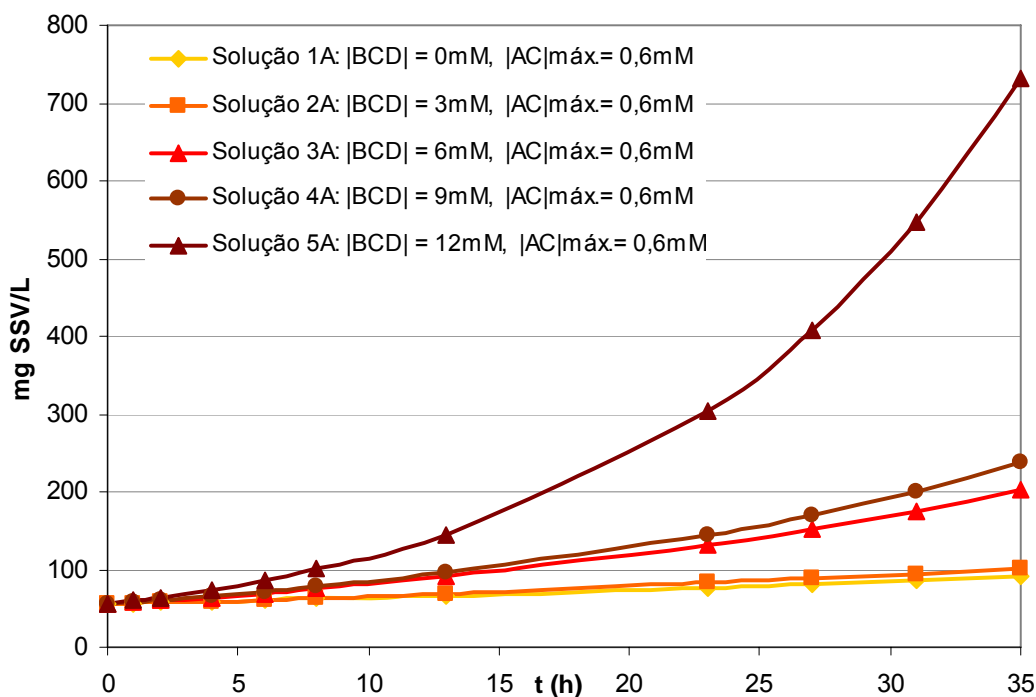


Figura 3.22. Evolução temporal da concentração de SSV prevista pelo modelo de 1ª ordem para as soluções 1A a 5A, após transladação para $X_0 = 55,56$ mg SSV/L

Pela avaliação da Figura 3.22. verifica-se que quanto maior for a quantidade de β CD existente, maior é a taxa de crescimento microbiana, chegando a ser 5,2 vezes maiores para a concentração de 12 mM.

Aplicando o modelo de Monod consegue-se determinar a constante K_s de 150,7 mM ou seja a concentração de β CD para a qual a taxa de crescimento é metade da taxa de crescimento máxima ($0,883 \text{ h}^{-1}$).

3.3. CONCLUSÕES

Os estudos realizados permitem verificar um aumento da taxa de consumo de oxigénio de 47% para um aumento de 0 mM a 12 mM na concentração de β CD.

Os estudos realizados permitem verificar que a taxa de consumo de oxigénio foi semelhante em duas soluções com a mesma composição mas sujeitas a condições distintas: uma sujeita a condições de laboratório de ar e luz, e a outra protegida ao abrigo do ar e da luz, o que leva a concluir que houve encapsulamento do AC pela β CD, garantindo a sua estabilidade e consequente biodegradação.

Pelos resultados obtidos verificou-se que a taxa de consumo de oxigénio numa solução só com β CD e numa outra com β CD e AC foram relativamente semelhantes, o que sugere que a biodegradação é promovida de forma análoga nas mesmas.

Os estudos realizados permitem verificar uma alteração completa do espectro do AC na análise de soluções com quantidade constante de AC e quantidades crescentes de β CD, após a introdução da solução de lamas. Após arejamento de 30 minutos a estas soluções, verificou-se nova alteração de espectro. Estas alterações sugerem que houve formação ou excreção de produtos resultantes do metabolismo e/ou degradação bactérias existentes nas lamas.

Do estudo efectuado para avaliar possíveis reacções químicas, em solução, de degradação do AC e β CD, concluiu-se que as alterações verificadas são devidas à biodegradação provocada pelas bactérias existentes na solução de lamas.

Os resultados obtidos permitem concluir que o arejamento promove o aceleração da degradação provocada pelas bactérias no AC.

Verificou-se que a taxa de crescimento microbiano aumenta com o aumento de β CD. Estes resultados são confirmados pela aplicação do modelo cinético de 1ª ordem.

A aplicação do modelo de Monod permitiu determinar a constante de Monod, K_s igual a 150,7 mM, ou seja a concentração de β CD para a qual a taxa de crescimento é metade da taxa de crescimento máxima ($0,883 \text{ h}^{-1}$).

Devido à solubilidade da β CD não é possível preparar soluções com este nível de concentração, conclui-se assim que este modelo não é o mais adequado, sendo restrita a sua aplicação às concentrações estudadas.

CAPÍTULO 4. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTURO

Com este trabalho pretendeu-se estudar o encapsulamento de monómeros da lenhina, especificamente o ácido sinápico e o álcool coniferílico, pela β -ciclodextrina, utilizando diferentes concentrações desta última, tendo em vista a sua aplicação e utilização no tratamento de efluentes das indústrias do papel e da celulose.

Este estudo foi dividido em duas partes essenciais: o estudo químico, por forma a avaliar a influência dos complexos formados na solubilidade do composto, e o estudo da biodegradação, em que se pretendeu avaliar e comparar a biodegradabilidade dos monómeros livres e quando encapsulados pela β -ciclodextrina.

Os resultados obtidos na avaliação da influência da concentração da β -ciclodextrina na solubilidade do ácido sinápico não foram conclusivos; no entanto, não é de excluir o facto de ter ocorrido complexação, dado que para alguns casos houve um pequeno aumento de solubilidade com o aumento da concentração de β -ciclodextrina.

Neste sentido, seria importante futuramente repetir os estudos de avaliação da solubilidade e complexação do composto, utilizando tomadas mássicas e maior quantidade de ácido sinápico, por forma a comprovar a existência de complexação. De igual modo, poderá ser igualmente relevante avançar com ensaios de biodegradação.

Verificou-se um aumento da solubilidade do álcool coniferílico pelo aumento da concentração de β -ciclodextrina em solução. Pelos resultados obtidos, foi possível concluir que o complexo formado é 1:1, ou seja, uma molécula de β -ciclodextrina encapsula uma molécula de álcool coniferílico.

O estudo da estabilidade sugere que o encapsulamento promove a estabilização do álcool coniferílico, composto este que é instável quando exposto à luz e ao ar, e portanto, pode ser uma alternativa viável quando este composto se encontra no meio ambiente.

Os estudos de biodegradação realizados (apenas com o álcool coniferílico), permitem verificar um aumento da taxa de consumo de oxigénio à medida que se aumenta a concentração de β -ciclodextrina, o que confirma a melhoria da biodegradação provocada pelos microrganismos ao composto em estudo, o álcool coniferílico. Verificou-se também que o encapsulamento do álcool coniferílico pela β -ciclodextrina, garante a sua estabilidade e conseqüente biodegradação.

É possível concluir, pelos resultados obtidos, que o arejamento promove o aceleração da degradação provocada pelos microrganismos no álcool coniferílico.

Verificou-se que a taxa de crescimento microbiano aumenta com a presença de β -ciclodextrina. Estes resultados são confirmados pela aplicação do modelo cinético de 1ª ordem. A aplicação do modelo de Monod permitiu determinar a constante de Monod, K_s igual a 150,7 mM, ou seja, a concentração de β -ciclodextrina para a qual a taxa de crescimento é metade da taxa de crescimento máxima ($0,883 \text{ h}^{-1}$). Devido à solubilidade da β -ciclodextrina não é possível preparar soluções com este nível de concentração, conclui-se assim que este modelo não é o mais adequado, sendo restrita a sua aplicação às concentrações estudadas.

Após serem bem conhecidas as capacidades da β -ciclodextrina com estes compostos, seria ainda interessante estudar as outras ciclodextrinas α e γ , e β -ciclodextrina substituída.

Como trabalho futuro será também importante o estudo dos outros dois monómeros: álcool sinápico e álcool p-cumarílico e, numa fase posterior, o estudo do polímero.

De forma a se confirmar o tipo de complexo que se forma entre a β -ciclodextrina e o ácido sinápico ou o álcool coniferílico seria interessante efectuar estudos de RMN e de Espectroscopia RAMAN.

CAPÍTULO 5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Frizzo, D. M., Foelkel, C. E., *Tratamentos Alternativos do Efluente de uma Indústria de Celulose Branqueada e Papel*, Ciência Florestal, Santa Maria, v.8, n.1, p. 93-107, 1998;
- [2] Fonseca, J. A. et al., *Tratamento de Efluentes Líquidos de Indústria de Papel e Celulose*, III Fórum de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas, Brasil, 2003;
- [3] Grieco, V. M., *Tratamento de Efluentes Líquidos Industriais*, São Paulo, 1995 Apud Fonseca, J. A. et al., *Tratamento de Efluentes Líquidos de Indústria de Papel e Celulose*, III Fórum de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas, Brasil, 2003;
- [4] Vieira, J. A., *Tratamento de Efluentes*, Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico, Universidade de Brasília, Brasil, 2007;
- [5] Carrapiço, F., *A Estratégia Evolutiva de Ocupação do Meio Aéreo e o Aparecimento de Novas Vias Bioquímicas*, Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Portugal, 2001;
- [6] Ekeberg, D., et al., *Characterisation of lignosulphonates and kraft lignin by hydrophobic interaction chromatography*, Analytica Chimica Acta, 565(1): p. 121-128, 2006;
- [7] Hinrichs R. M., *Post Monitoring of a Cyclodextrin Remediated Chlorinated Solvent Contaminated Aquifer*, Faculty of the Louisiana State University and the College of Basic Science, EUA, 2004;
- [8] Russell, K.T., Rabideau, A.J., *Decision analysis for pump-and-treat design: Ground Water Monitoring and Remediation*, v. 20, p. 159-168, 2000; McCray, J.E., Bryan, K., Cain, R., Johnson, G., Blanford, B., Brusseau, M., *Field test of cyclodextrin for enhanced in-situ flushing of immiscible organic liquids: Comparison to water flushing*, *Innovative Subsurface Remediation: Field Testing of Physical, Chemical, and Characterization Technologies*, Washington, D.C., American Chemical Society, p.136-152, 1999, Apud Hinrichs R. M., *Post Monitoring of a Cyclodextrin Remediated Chlorinated Solvent Contaminated Aquifer*, Faculty of the Louisiana State University and the College of Basic Science, 2004;
- [9] Mackay, D. M., and Cherry, J. A., *Groundwater Contamination - Pump-and-Treat Remediation .2: Environmental Science & Technology*, v. 23, p. 630-636, 1989, Apud Hinrichs R. M., *Post Monitoring of a Cyclodextrin Remediated Chlorinated Solvent Contaminated Aquifer*, Faculty of the Louisiana State University and the College of Basic Science, 2004;
- [10] Del Valle, E.M.M., *Cyclodextrins and their uses: a review*, Process Biochemistry, 39(9): p. 1033-1046, 2004;
- [11] Aguiar, C. L., *Cliclodextrina Glicosiltransferase, Produção, Ação e Aplicação*, B.CEPPA, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 119-138, 2001;
- [12] Banerjee, A., et al., *Encapsulation of Prodan in beta-cyclodextrin environments: A critical study via electronic spectroscopy and molecular mechanics*, Journal of Molecular Structure, 794(1-3): p. 181-189, 2006;

- [13] Silva, M. R., *Formulação Líquida Oral do Acetato de Hidrocortisona Incluso em Ciclodextrina: Desenvolvimento e Validação da Metodologia Analítica*, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2005;
- [14] Boogaard, M., *Cyclodextrin-containing Supramolecular Structures, from pseudo-polyrotaxanes towards molecular tubes, insulated molecular wires and topological networks*, University of Groningen, The Netherlands, 2003;
- [15] Larsen, K.L. and Zimmermann, W., *Analysis and characterisation of cyclodextrins and their inclusion complexes by affinity capillary electrophoresis*, Journal of Chromatography A, 836(1): p. 3-14, 1999;
- [16] Mallick, A., B. Haidar, and N. Chattopadhyay, *Encapsulation of norharmane in cyclodextrin: formation of 1 : 1 and 1 : 2 inclusion complexes*, Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, 78(3): p. 215-221, 2005;
- [17] Flosbach, C., et al. *Cyclodextrin-assisted polymerization - a new way to synthesize powder coat resins*, Athens Conference on Organic Coatings and Technology, Athens, Greece: Elsevier Science Sa, 2002;
- [18] Muñoz-Botella S., del Castillo B., Martyn M.A., *Cyclodextrin properties and applications of inclusion complex formation*, Ars Pharm 36:187-98, 1995, Apud Del Valle, E.M.M., *Cyclodextrins and their uses: a review*, Process Biochemistry, 39(9): p. 1033-1046, 2004;
- [19] Schneiderman, E. and A.M. Stalcup., *Cyclodextrins: a versatile tool in separation science*, Analytical Separations Symposium, Vaals, Netherlands: Elsevier Science Bv. 2000;
- [20] *Biociencia*, Centro de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Brasil [<http://www.puccamp.br/centros/ccv/Graduacao/Biologia/aulas/BIOTECNOLOGIABIOLÓGIA2005.pdf>];
- [21] Schmid G., *Cyclodextrin glucanotransferase production: yield enhancement by overexpression of cloned genes*, Trends Biotechnol 7:244-8, 1989, Apud Del Valle, E.M.M., *Cyclodextrins and their uses: a review*, Process Biochemistry, 39(9): p. 1033-1046, 2004;
- [22] Higuchi, T., Connors, K. A., *Phase-solubility techniques*, Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation, 117-212, 1965;
- [23] Fernandes, C.M., et al., *Multimodal molecular encapsulation of nifedipine hydrochloride by beta-cyclodextrin, hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and triacetyl-beta-cyclodextrin in solution, Structural studies by H-1 NMR and ROESY experiments*, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 18(5): p. 285-296, 2003;
- [24] Raj, C.R. and R. Ramaraj, *Electrochemical study of the cyclodextrin encapsulation of a macrocyclic nickel complex*, Electrochimica Acta, 44(16): p. 2685-2691, 1999;
- [25] Botella, S.M., et al., *Analytical applications of retinoid-cyclodextrin inclusion complexes .1. Characterization of a retinal-beta-cyclodextrin complex*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 14(8-10): p. 909-915, 1996;
- [26] Doziuk, H., *Properties and Applications of Cyclodextrins: Cyclodextrins and Their Complexes*, Wiley-VCH: Weinheim, 2006;

- [27] Rozich, A. F., Gaudy, A. F., *Design and Operation of Activated Sludge Processes Using Respirometry*, Lewis Publishers, Chelsea, MI, *Fundamentals of Biokinetics for Activated Sludge Systems*, 1992;
- [28] Samaras P., *Evaluation of Toxic Properties of Industrial Wastewater Using On-Line Respirometry*, Water Encyclopedia, Volumes 1-5, John Wiley & Sons, 2005;
- [29] Cao, Y. S. and Alaerts G. J., *A model for oxygen consumption in aerobic heterotrophic biodegradation in dual-phase drainage systems*, Water Research, 30(4): p. 1010-1022, 1996;
- [30] *Modified Activated Sludge, Respiration Inhibition Test for Sparingly Soluble Chemicals*, Ecological Effects Test Guidelines, Environmental Protection Agency, United States, 1996;
- [31] Cammarota, M. C., *Engenharia do meio ambiente*, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007;
- [32] Lobry, J.R., et al., *Monods Bacterial-Growth Model Revisited*, Bulletin of Mathematical Biology, 54(1): p. 117-122, 1992;
- [33] Strigul, N., Dette, H., Melas, V., *A practical guide for optimal designs of experiments in the Monod model*, Ruhr-Universität Bochum, 2006;
- [34] Blok, J., *Classification of biodegradability by growth kinetic parameters // Ecotoxicol. Environ. Saf.* 27, p. 294–305, 1994, Apud Strigul, N., Dette, H., Melas, V., *A practical guide for optimal designs of experiments in the Monod model*, Ruhr-Universität Bochum, 2006;
- [35] Blok, J., Struys, J., *Measurement and Validation of Kinetic Parameter Values for Prediction of Biodegradation Rates in Sewage Treatment // Ecotoxicol. And Environ. Saf.*, 33, 3, 217–227, 1996, Apud Strigul, N., Dette, H., Melas, V., *A practical guide for optimal designs of experiments in the Monod model*, Ruhr-Universität Bochum, 2006;
- [36] Costa, M. E., *Modelos não estruturados e coeficientes de rendimento, Tecnologia de Biorreatores*, Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais, Universidade do Algarve, 2006;
- [37] Sigma-Aldrich, *Material Safety Data Sheet - Coniferyl Alcohol*, 2008;
- [38] Martins, M., Vale, E., Garrido, E.M., Silva, P., Marques, M.P., Borges, F., Garrido, J., *Structural Analysis of Sinapic Acid- β -cyclodextrin Inclusion Complex*, V Congresso Ibérico de Espectroscopia, XXI Reunión Nacional de Espectroscopia, Murcia, 9-11 de Septiembre de 2008.
- [39] Sá, C., *Degradação Biológica de Fenol num Leito Percolador com Bactérias Imobilizadas num Suporte de Poros Largos*, Tese de mestrado em Tecnologia do Ambiente, Universidade do Minho, 1998.

ANEXOS

ANEXO A. AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO ÁCIDO SINÁPICO

Os resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a comprimento de onda 308nm das soluções com $|AS|_{\text{máx.}} = 16,1\mu\text{M}$, $32,2\mu\text{M}$ e $64,5\mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 10\text{mM}$, preparadas de acordo com o Método A, após incubação apresentam-se na Tabela A1.

Tabela A1. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a comprimento de onda 308nm das soluções com $|AS|_{\text{máx.}} = 16,1\mu\text{M}$, $32,2\mu\text{M}$ e $64,5\mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 10\text{mM}$, após incubação

Solução	m(β CD) [g]	\mathbf{\beta}CD [mM]	m(AS) [g]	AS _{máx.} ⁽¹⁾ [\mathbf{\mu}M]	Abs a 308nm ⁽²⁾	AS (\mathbf{\mu}M) ⁽³⁾	m(AS) [g] ⁽⁴⁾
1	0,0000	0,00	3,62E-05	16,1	0,147	6,1	1,36E-05
2	0,0297	2,62	3,62E-05	16,1	0,187	7,9	1,78E-05
3	0,0582	5,13	3,62E-05	16,1	0,201	8,6	1,93E-05
4	0,0881	7,76	3,62E-05	16,1	0,211	9,1	2,03E-05
5	0,1176	10,36	3,62E-05	16,1	0,215	9,2	2,07E-05
Solução	m(β CD) [g]	\mathbf{\beta}CD [mM]	m(AS) [g]	AS _{máx.} ⁽¹⁾ [\mathbf{\mu}M]	Abs a 308nm ⁽²⁾	AS (\mathbf{\mu}M) ⁽³⁾	m(AS) [g] ⁽⁴⁾
6	0,0000	0,00	7,23E-05	32,2	0,437	19,6	4,39E-05
7	0,0313	2,76	7,23E-05	32,2	0,447	20,0	4,49E-05
8	0,0593	5,22	7,23E-05	32,2	0,436	19,5	4,38E-05
9	0,0886	7,81	7,23E-05	32,2	0,439	19,7	4,41E-05
10	0,1174	10,34	7,23E-05	32,2	0,422	18,9	4,23E-05
Solução	m(β CD) [g]	\mathbf{\beta}CD [mM]	m(AS) [g]	AS _{máx.} ⁽¹⁾ [\mathbf{\mu}M]	Abs a 308nm ⁽²⁾	AS (\mathbf{\mu}M) ⁽³⁾	m(AS) [g] ⁽⁴⁾
11	0,0000	0,00	1,45E-04	64,5	0,970	44,4	9,95E-05
12	0,0298	2,63	1,45E-04	64,5	0,939	42,9	9,62E-05
13	0,0602	5,30	1,45E-04	64,5	0,936	42,8	9,59E-05
14	0,0886	7,81	1,45E-04	64,5	0,969	44,3	9,94E-05
15	0,1175	10,35	1,45E-04	64,5	0,927	42,4	9,50E-05

A concentração referenciada com ⁽¹⁾ traduz uma concentração de AS máxima teórica. A Absorvância obtida na leitura por UV-Visível no comprimento de onda de 308 nm está referenciada com ⁽²⁾. O valor ⁽³⁾ corresponde à concentração de AS solubilizada, obtida por interpolação gráfica da curva de calibração. Calculou-se a quantidade de AS que se encontra solubilizada que está referenciada com ⁽⁴⁾.

Os resultados da determinação da taxa de solubilização efectiva do AS para $|AS|_{\text{máx.}} = 16,1\mu\text{M}$, de acordo com a equação 2, são apresentados na Tabela A2.

Tabela A2. Determinação da taxa de solubilização efectiva da solução com $|AS|_{\text{máx.}} = 16,1\mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 10\text{mM}$

Solução	$ \beta\text{CD} $ [mM]	m(AS) (g) tempo=0	m(AS) (g) tempo=t	m(AS) (g) solubilizada pela influência da βCD	Taxa de solubilização (%)
1	0,00	3,62E-05	1,36E-05	0,00E+00	0,0
2	2,62	3,62E-05	1,78E-05	4,17E-06	11,5
3	5,13	3,62E-05	1,93E-05	5,63E-06	15,6
4	7,76	3,62E-05	2,03E-05	6,67E-06	18,5
5	10,36	3,62E-05	2,07E-05	7,09E-06	19,6

Os resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a comprimento de onda 308nm das soluções com $89,20\mu\text{M} \leq |AS|_{\text{máx.}} \leq 115,96\mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 12\text{mM}$, preparadas de acordo com o Método B, após incubação apresentam-se na Tabela A3.

Tabela A3. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a comprimento de onda 308nm das soluções com $89,20\mu\text{M} \leq |AS|_{\text{máx.}} \leq 115,96\mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 12\text{mM}$

Solução	$V_{\text{final}}^{\text{solução}}$ [L]	$ \beta\text{CD} $ [mM]	$V_{\text{solução-mãe}}^{\beta\text{CD}}$ [mL]	m(AS) [g]	$ AS _{\text{máx.}}^{(1)}$ [μM]	Abs a 308nm ⁽²⁾	$ AS ^{(3)}$ [μM]	m(AS) [g] ⁽⁴⁾
1	0,0100	0	0,00	2,60E-04	115,96	1,031	47,2	1,06E-04
2	0,0100	3	1,42	2,60E-04	115,96	1,596	73,5	1,65E-04
3	0,0100	6	2,85	2,30E-04	102,58	1,725	79,5	1,78E-04
4	0,0100	9	4,27	2,00E-04	89,20	1,837	84,7	1,90E-04
5	0,0100	12	5,69	2,80E-04	124,88	<u>2,747</u>	<u>127,0^(*)</u>	<u>2,85E-04</u>

(*) – valor overline: desprezado.

A concentração referenciada com ⁽¹⁾ traduz uma concentração de AS máxima teórica. A Absorvância obtida na leitura por UV-Visível no comprimento de onda de 308 nm está referenciada com ⁽²⁾. O Valor ⁽³⁾ corresponde à concentração de AS solubilizada, obtida por interpolação gráfica da curva de calibração. Calculou-se a quantidade de AS que se encontra solubilizada que está referenciada com ⁽⁴⁾.

Os resultados para a determinação da taxa de solubilização efectiva do AS para $89,20\mu\text{M} \leq |\text{AS}|_{\text{máx.}} \leq 115,96\mu\text{M}$, de acordo com a equação 2, são apresentados na Tabela A4.

Tabela A4. Determinação da taxa de solubilização efectiva da solução com $89,20\mu\text{M} \leq |\text{AS}|_{\text{máx.}} \leq 115,96\mu\text{M}$

Solução	$ \beta\text{CD} $ [mM]	m(AS) (g) tempo=0	m(AS) (g) tempo=t	m(AS) (g) solubilizada pela influência da βCD	Taxa de solubilização (%)
2	3,00	2,60E-04	1,65E-04	5,89E-05	22,7
3	6,00	2,30E-04	1,78E-04	7,24E-05	31,5
4	9,00	2,00E-04	1,90E-04	8,41E-05	42,0

Os resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a comprimento de onda 308nm das soluções com concentração teórica máxima inicial de 30, 50 e 100 μM com concentração de βCD a variar entre 0 e 21 mM, preparadas de acordo com o Método C, após incubação apresentam-se na Tabela A5.

Tabela A5. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a comprimento de onda 308nm das soluções com $|AS|_{\text{máx.}} = 30\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$ e $100\mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 21\text{mM}$

Solução	V _{final} solução[L]	V _{solução- mãe} β CD [mL]	\betaCD [mM]	V _{solução- mãe} AS [mL]	m(AS) [g]	AS _{máx.} ⁽¹⁾ [\muM]	Abs a 308nm ⁽²⁾	AS (\muM) ⁽³⁾	m(AS) [g] ⁽⁴⁾
1	0,010000	0,00	0,00	0,300	6,73E-05	30,0	0,490	22,0	4,94E-05
2	0,010000	1,16	3,00	0,300	6,73E-05	30,0	0,573	25,9	5,81E-05
3	0,010000	2,32	6,00	0,300	6,73E-05	30,0	0,607	27,5	6,16E-05
4	0,010000	3,47	9,00	0,300	6,73E-05	30,0	0,569	25,7	5,76E-05
5	0,010000	4,63	12,00	0,300	6,73E-05	30,0	0,408	18,2	4,08E-05
6	0,010000	5,79	15,00	0,300	6,73E-05	30,0	<u>0,817</u>	<u>37,2^(*)</u>	<u>8,35E-05</u>
7	0,010000	6,95	18,00	0,300	6,73E-05	30,0	0,440	19,7	4,42E-05
8	0,010000	8,11	21,00	0,300	6,73E-05	30,0	0,404	18,0	4,04E-05
Solução	V _{final} solução[L]	V _{solução- mãe} β CD [mL]	\betaCD [mM]	V _{solução- mãe} AS [mL]	m(AS) [g]	AS _{máx.} ⁽¹⁾ [\muM]	Abs a 308nm ⁽²⁾	AS (\muM) ⁽³⁾	m(AS) [g] ⁽⁴⁾
9	0,010000	0,00	0,00	0,50	1,12E-04	50,0	0,867	39,6	8,87E-05
10	0,010000	1,16	3,00	0,50	1,12E-04	50,0	<u>1,547</u>	<u>71,2^(*)</u>	<u>1,60E-04</u>
11	0,010000	2,32	6,00	0,50	1,12E-04	50,0	0,680	30,9	6,92E-05
12	0,010000	3,47	9,00	0,50	1,12E-04	50,0	0,716	32,5	7,30E-05
13	0,010000	4,63	12,00	0,50	1,12E-04	50,0	0,770	35,1	7,86E-05
14	0,010000	5,79	15,00	0,50	1,12E-04	50,0	0,650	29,5	6,61E-05
15	0,010000	6,95	18,00	0,50	1,12E-04	50,0	<u>1,156</u>	<u>53,0^(*)</u>	<u>1,19E-04</u>
16	0,010000	8,11	21,00	0,50	1,12E-04	50,0	0,926	42,3	9,49E-05
Solução	V _{final} solução[L]	V _{solução- mãe} β CD [mL]	\betaCD [mM]	V _{solução- mãe} AS [mL]	m(AS) [g]	AS _{máx.} ⁽¹⁾ [\muM]	Abs a 308nm ⁽²⁾	AS (\muM) ⁽³⁾	m(AS) [g] ⁽⁴⁾
17	0,010000	0,00	0,00	1,00	2,24E-04	100	0,422	18,9	4,23E-05
18	0,010000	1,16	3,00	1,00	2,24E-04	100	0,417	18,6	4,18E-05
19	0,010000	2,32	6,00	1,00	2,24E-04	100	<u>1,367</u>	<u>62,8^(*)</u>	<u>1,41E-04</u>
20	0,010000	3,47	9,00	1,00	2,24E-04	100	0,677	30,7	6,89E-05
21	0,010000	4,63	12,00	1,00	2,24E-04	100	0,617	27,9	6,26E-05
22	0,010000	5,79	15,00	1,00	2,24E-04	100	0,469	21,1	4,72E-05
23	0,010000	6,95	18,00	1,00	2,24E-04	100	0,591	26,7	5,99E-05
24	0,010000	8,11	21,00	1,00	2,24E-04	100	0,810	36,9	8,28E-05

(*) – valor overline: desprezado.

A concentração referenciada com ⁽¹⁾ traduz uma concentração de AS máxima teórica. A Absorvância obtida na leitura por UV-Visível no comprimento de onda de 308 nm está referenciada com ⁽²⁾. O valor ⁽³⁾ corresponde à concentração de AS solubilizada, obtida por interpolação gráfica da curva de calibração. Calculou-se a quantidade de AS que se encontra solubilizada que está referenciada com ⁽⁴⁾.

Estudou-se o tempo de incubação das soluções. Efectuou-se, então, a análise espectrofotométrica ao final de 20, 42, 65 e 88 h (cerca de 4 dias), mantendo as soluções em incubação (300 rpm, 25°C) durante toda a experiência.

Os resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a comprimento de onda 232nm e 314nm das soluções com $|AS|_{\text{máx.}} = 100 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 15\text{mM}$, preparadas de acordo com o Método C, após incubação apresentam-se nas Tabelas A6. a A9.

Tabela A6. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível, para $t = 20\text{h}$, das soluções $|AS| = 100 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 15\text{mM}$, após incubação

Solução	$ \beta\text{CD} $ (mM)	m(AS) [g]	$ AS _{\text{máx.}}^{(1)}$ [μM]	$\lambda = 232\text{nm}$			$\lambda = 314\text{nm}$		
				Abs ₍₂₎	$ AS $ (μM) ₍₃₎	m(AS) [g] ₍₄₎	Abs ₍₂₎	$ AS $ (μM) ₍₃₎	m(AS) [g] ₍₄₎
1	0	1,12E-03	100	1,105	51	5,68E-04	0,931	43	4,77E-04
2	3	1,12E-03	100	1,354	62	6,98E-04	1,173	54	6,03E-04
3	6	1,12E-03	100	1,069	49	5,49E-04	0,982	45	5,04E-04
4	9	1,12E-03	100	1,103	51	5,67E-04	0,949	43	4,86E-04
5	12	1,12E-03	100	1,325	61	6,82E-04	1,156	53	5,94E-04
6	15	1,12E-03	100	1,109	51	5,70E-04	0,946	43	4,85E-04

Tabela A7. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível, para $t = 42\text{h}$, das soluções $|AS| = 100 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 15\text{mM}$, após incubação

Solução	$ \beta\text{CD} $ (mM)	m(AS) [g]	$ AS _{\text{máx.}}^{(1)}$ [μM]	$\lambda = 232\text{nm}$			$\lambda = 314\text{nm}$		
				Abs ₍₂₎	$ AS $ (μM) ₍₃₎	m(AS) [g] ₍₄₎	Abs ₍₂₎	$ AS $ (μM) ₍₃₎	m(AS) [g] ₍₄₎
1	0	1,12E-03	100	1,227	56	6,31E-04	1,082	50	5,56E-04
2	3	1,12E-03	100	1,172	54	6,03E-04	1,033	47	5,30E-04
3	6	1,12E-03	100	1,096	50	5,63E-04	0,989	45	5,07E-04
4	9	1,12E-03	100	1,005	46	5,16E-04	0,881	40	4,51E-04
5	12	1,12E-03	100	1,288	59	6,63E-04	1,169	54	6,01E-04
6	15	1,12E-03	100	1,025	47	5,26E-04	0,89	41	4,56E-04

Tabela A8. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível, para t = 65h, das soluções $|\text{AS}| = 100 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 15\text{mM}$, após incubação

Solução	$ \beta\text{CD} $ (mM)	m(AS) [g]	$ \text{AS} _{\text{máx.}}^{(1)}$ [μM]	$\lambda = 232\text{nm}$			$\lambda = 314\text{nm}$		
				Abs ⁽²⁾	$ \text{AS} $ (μM) ⁽³⁾	m(AS) [g] ⁽⁴⁾	Abs ⁽²⁾	$ \text{AS} $ (μM) ⁽³⁾	m(AS) [g] ⁽⁴⁾
1	0	1,12E-03	100	1,187	54	6,10E-04	1,027	47	5,27E-04
2	3	1,12E-03	100	1,28	59	6,59E-04	1,131	52	5,81E-04
3	6	1,12E-03	100	1,128	52	5,80E-04	1,015	46	5,21E-04
4	9	1,12E-03	100	0,944	43	4,84E-04	0,844	38	4,32E-04
5	12	1,12E-03	100	1,225	56	6,30E-04	1,106	51	5,68E-04
6	15	1,12E-03	100	0,953	44	4,88E-04	0,851	39	4,35E-04

Tabela A9. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível, para t = 88h, das soluções $|\text{AS}| = 100 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 15\text{mM}$, após incubação

Solução	$ \beta\text{CD} $ (mM)	m(AS) [g]	$ \text{AS} _{\text{máx.}}^{(1)}$ [μM]	$\lambda = 232\text{nm}$			$\lambda = 314\text{nm}$		
				Abs ⁽²⁾	$ \text{AS} $ (μM) ⁽³⁾	m(AS) [g] ⁽⁴⁾	Abs ⁽²⁾	$ \text{AS} $ (μM) ⁽³⁾	m(AS) [g] ⁽⁴⁾
1	0	1,12E-03	100	1,537	71	7,93E-04	1,323	61	6,81E-04
2	3	1,12E-03	100	1,204	55	6,19E-04	1,067	49	5,48E-04
3	6	1,12E-03	100	1,064	49	5,46E-04	0,962	44	4,93E-04
4	9	1,12E-03	100	0,914	42	4,68E-04	0,814	37	4,16E-04
5	12	1,12E-03	100	1,351	62	6,96E-04	1,223	56	6,29E-04
6	15	1,12E-03	100	0,897	41	4,59E-04	0,801	36	4,09E-04

A concentração referenciada com ⁽¹⁾ traduz uma concentração de AS máxima teórica. A Absorvância obtida na leitura por UV-Visível no comprimento de onda de 308 nm está referenciada com ⁽²⁾. O valor ⁽³⁾ corresponde à concentração de AS solubilizada, obtida por interpolação gráfica da curva de calibração. Calculou-se a quantidade de AS que se encontra solubilizada que está referenciada com ⁽⁴⁾.

ANEXO B. AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO ÁLCOOL CONIFERÍLICO

Os resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm das soluções de concentração teórica máxima inicial de AC 700 μ M pela influência de concentrações crescentes de β CD, após incubação, apresentam-se nas Tabelas B1. a B7.

Tabela B1. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm, para $t = 20$ h, das soluções $|AC|_{\text{máx.}} = 700 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 15\text{mM}$, após incubação (soluções sujeitas a diluição 1:5)

Solução	$ \beta\text{CD} $ [mM]	m(AC) [g]	$ AC _{\text{máx.}}$ ⁽¹⁾ [μM]	t = 20h		
				Abs a 263nm ⁽²⁾	$ AS $ (μM) ₍₃₎	m(AS) [g] ⁽⁴⁾
1	0	6,40E-03	710,3	1,039	79,5	7,16E-04
2	3	6,10E-03	677,0	0,938	71,8	6,47E-04
3	6	6,40E-03	710,3	0,737	56,4	5,08E-04
4	9	6,30E-03	699,2	1,254	95,9	8,64E-04
5	12	6,40E-03	710,3	1,193	91,2	8,22E-04
6	15	6,40E-03	710,3	1,163	88,9	8,01E-04

Tabela B2. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm, para $t = 42$ h, das soluções $|AC|_{\text{máx.}} = 700 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 15\text{mM}$, após incubação (soluções sujeitas a diluição 1:5)

Solução	$ \beta\text{CD} $ [mM]	m(AC) [g]	$ AC _{\text{máx.}}$ ⁽¹⁾ [μM]	t = 42h		
				Abs a 263nm ⁽²⁾	$ AS $ (μM) ₍₃₎	m(AS) [g] ⁽⁴⁾
1	0	6,40E-03	710,3	1,172	89,6	8,08E-04
2	3	6,10E-03	677,0	1,129	86,4	7,78E-04
3	6	6,40E-03	710,3	1,340	102,5	9,23E-04
4	9	6,30E-03	699,2	1,516	115,9	1,04E-03
5	12	6,40E-03	710,3	1,457	111,4	1,00E-03
6	15	6,40E-03	710,3	1,485	113,5	1,02E-03

Tabela B3. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm, para $t = 65\text{h}$, das soluções $|AC|_{\text{máx.}} = 700 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 15\text{mM}$, após incubação (soluções sujeitas a diluição 1:5)

Solução	βCD [mM]	m(AC) [g]	AC _{máx.} ⁽¹⁾ [μM]	t = 65h		
				Abs a 263nm ⁽²⁾	AS (μM) ⁽³⁾	m(AS) [g] ⁽⁴⁾
1	0	6,40E-03	710,3	1,070	81,8	7,37E-04
2	3	6,10E-03	677,0	1,282	98,0	8,83E-04
3	6	6,40E-03	710,3	1,450	110,9	9,99E-04
4	9	6,30E-03	699,2	1,490	113,9	1,03E-03
5	12	6,40E-03	710,3	1,704	130,2	1,17E-03
6	15	6,40E-03	710,3	1,417	108,3	9,76E-04

Tabela B4. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm, para $t = 86\text{h}$, das soluções $|AC|_{\text{máx.}} = 700 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 15\text{mM}$, após incubação (soluções sujeitas a diluição 1:5)

Solução	βCD [mM]	m(AC) [g]	AC _{máx.} ⁽¹⁾ [μM]	t = 86h		
				Abs a 263nm ⁽²⁾	AS (μM) ⁽³⁾	m(AS) [g] ⁽⁴⁾
1	0	6,40E-03	710,3	1,058	80,9	7,29E-04
2	3	6,10E-03	677,0	1,169	89,4	8,06E-04
3	6	6,40E-03	710,3	1,293	98,9	8,91E-04
4	9	6,30E-03	699,2	1,398	106,9	9,63E-04
5	12	6,40E-03	710,3	1,451	110,9	9,99E-04
6	15	6,40E-03	710,3	1,746	133,5	1,20E-03

Tabela B5. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm, para $t = 112\text{h}$, das soluções $|AC|_{\text{máx.}} = 700 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 15\text{mM}$, após incubação (soluções sujeitas a diluição 1:5)

Solução	βCD [mM]	m(AC) [g]	AC _{máx.} ⁽¹⁾ [μM]	t = 112h		
				Abs a 263nm ⁽²⁾	AS (μM) ⁽³⁾	m(AS) [g] ⁽⁴⁾
1	0	6,40E-03	710,3	1,126	86,1	7,76E-04
2	3	6,10E-03	677,0	1,444	110,4	9,95E-04
3	6	6,40E-03	710,3	1,369	104,7	9,43E-04
4	9	6,30E-03	699,2	1,583	121,0	1,09E-03
5	12	6,40E-03	710,3	1,595	121,9	1,10E-03
6	15	6,40E-03	710,3	1,424	108,9	9,81E-04

Tabela B6. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm, para $t = 136,5\text{h}$, das soluções $|\text{AC}|_{\text{máx.}} = 700 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 15\text{mM}$, após incubação (soluções sujeitas a diluição 1:5)

Solução	$ \beta\text{CD} $ [mM]	m(AC) [g]	$ \text{AC} _{\text{máx.}}^{(1)}$ [μM]	t = 136,5h		
				Abs a 263nm ⁽²⁾	$ \text{AS} ^{(3)}$ (μM)	m(AS) [g] ⁽⁴⁾
1	0	6,40E-03	710,3	0,984	75,3	6,78E-04
2	3	6,10E-03	677,0	1,231	94,1	8,48E-04
3	6	6,40E-03	710,3	1,109	84,8	7,64E-04
4	9	6,30E-03	699,2	1,412	108,0	9,73E-04
5	12	6,40E-03	710,3	1,502	114,8	1,03E-03
6	15	6,40E-03	710,3	1,633	124,8	1,12E-03

Tabela B7. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm, para $t = 147,5\text{h}$, das soluções $|\text{AC}|_{\text{máx.}} = 700 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 15\text{mM}$, após incubação (soluções sujeitas a diluição 1:5)

Solução	$ \beta\text{CD} $ [mM]	m(AC) [g]	$ \text{AC} _{\text{máx.}}^{(1)}$ [μM]	t = 147,5h		
				Abs a 263nm ⁽²⁾	$ \text{AS} ^{(3)}$ (μM)	m(AS) [g] ⁽⁴⁾
1	0	6,40E-03	710,3	0,948	72,5	6,54E-04
2	3	6,10E-03	677,0	1,116	85,4	7,69E-04
3	6	6,40E-03	710,3	0,965	73,8	6,65E-04
4	9	6,30E-03	699,2	1,214	92,8	8,36E-04
5	12	6,40E-03	710,3	0,943	72,2	6,50E-04
6	15	6,40E-03	710,3	1,378	105,4	9,49E-04

A concentração referenciada com ⁽¹⁾ traduz uma concentração de AC teórica máxima. A Absorvância obtida na leitura por UV-Visível no comprimento de onda 263 nm está referenciada com ⁽²⁾. O valor ⁽³⁾ corresponde à concentração de AC solubilizada, obtida por interpolação gráfica da curva de calibração. Calculou-se a quantidade de AC que se encontra solubilizada que está referenciada com ⁽⁴⁾.

As Tabelas B8. a B11. apresentam os resultados das Tabelas B1. a B7., corrigidos pelo factor de diluição.

Tabela B8. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm, para $t = 20\text{h}$ e $t = 42\text{h}$, das soluções $|\text{AC}|_{\text{máx.}} = 700 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 15\text{mM}$, após incubação, corrigidos pelo factor de diluição

Solução	βCD [mM]	m(AC) [g]	AC _{máx.} ⁽¹⁾ [μM]	t = 20h		t = 42h	
				AC (μM) ⁽³⁾	m(AC) [g] ⁽⁴⁾	AC (μM) ⁽³⁾	m(AC) [g] ⁽⁴⁾
1	0	6,40E-03	710,3	397,4	3,58E-03	448,2	4,04E-03
2	3	6,10E-03	677,0	358,9	3,23E-03	431,8	3,89E-03
3	6	6,40E-03	710,3	282,1	2,54E-03	512,3	4,62E-03
4	9	6,30E-03	699,2	479,5	4,32E-03	579,5	5,22E-03
5	12	6,40E-03	710,3	456,2	4,11E-03	556,9	5,02E-03
6	15	6,40E-03	710,3	444,7	4,01E-03	567,6	5,11E-03

Tabela B9. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm, para $t = 65\text{h}$ e $t = 86\text{h}$, das soluções $|\text{AC}|_{\text{máx.}} = 700 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 15\text{mM}$, após incubação, corrigidos pelo factor de diluição

Solução	βCD [mM]	m(AC) [g]	AC _{máx.} ⁽¹⁾ [μM]	t = 65h		t = 86h	
				AC (μM) ⁽³⁾	m(AC) [g] ⁽⁴⁾	AC (μM) ⁽³⁾	m(AC) [g] ⁽⁴⁾
1	0	6,40E-03	710,3	409,2	3,69E-03	404,7	3,65E-03
2	3	6,10E-03	677,0	490,2	4,42E-03	447,0	4,03E-03
3	6	6,40E-03	710,3	554,3	4,99E-03	494,4	4,45E-03
4	9	6,30E-03	699,2	569,5	5,13E-03	534,4	4,82E-03
5	12	6,40E-03	710,3	651,2	5,87E-03	554,7	5,00E-03
6	15	6,40E-03	710,3	541,7	4,88E-03	667,3	6,01E-03

Tabela B10. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm, para $t = 112\text{h}$ e $t = 136,5\text{h}$, das soluções $|\text{AC}|_{\text{máx.}} = 700 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 15\text{mM}$, após incubação, corrigidos pelo factor de diluição

Solução	βCD [mM]	m(AC) [g]	AC _{máx.} ⁽¹⁾ [μM]	t = 112h		t = 136,5h	
				AC (μM) ⁽³⁾	m(AC) [g] ⁽⁴⁾	AC (μM) ⁽³⁾	m(AC) [g] ⁽⁴⁾
1	0	6,40E-03	710,3	430,6	3,88E-03	376,4	3,39E-03
2	3	6,10E-03	677,0	552,0	4,97E-03	470,7	4,24E-03
3	6	6,40E-03	710,3	523,4	4,72E-03	424,1	3,82E-03
4	9	6,30E-03	699,2	605,0	5,45E-03	539,8	4,86E-03
5	12	6,40E-03	710,3	609,6	5,49E-03	574,1	5,17E-03
6	15	6,40E-03	710,3	544,4	4,90E-03	624,1	5,62E-03

Tabela B11. Resultados obtidos por espectrofotometria de UV-Visível a 263 nm, para $t = 147,5\text{h}$, das soluções $|\text{AC}|_{\text{máx.}} = 700 \mu\text{M}$ e $0\text{mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 15\text{mM}$, após incubação, corrigidos pelo factor de diluição

Solução	βCD [mM]	m(AC) [g]	AC _{máx.} ⁽¹⁾ [μM]	t = 147,5h	
				AC (μM) ⁽³⁾	m(AC) [g] ⁽⁴⁾
1	0	6,40E-03	710,3	362,7	3,27E-03
2	3	6,10E-03	677,0	426,8	3,85E-03
3	6	6,40E-03	710,3	369,2	3,33E-03
4	9	6,30E-03	699,2	464,2	4,18E-03
5	12	6,40E-03	710,3	360,8	3,25E-03
6	15	6,40E-03	710,3	526,8	4,75E-03

A concentração referenciada com ⁽¹⁾ traduz uma concentração de AC teórica máxima. O valor ⁽³⁾ corresponde à concentração de AC solubilizada corrigida pelo factor de diluição. Calculou-se a quantidade de AC que se encontra solubilizada que está referenciada com ⁽⁴⁾.

Os resultados da determinação da taxa de solubilização efectiva do AC para concentração teórica máxima inicial de AC $700 \mu\text{M}$ pela influência de concentrações crescentes de βCD , para $t = 65\text{h}$ e $t = 86\text{h}$, de acordo com a equação 3, são apresentados na Tabela B12.

Tabela B12. Determinação da taxa de solubilização efectiva do AC para $t = 65\text{h}$ e $t = 86\text{h}$

Solução	βCD [mM]	m(AC) (g) t=0	m(AC) (g) t = 65h	m(AS) (g) solubilizada pela influência da βCD	Taxa de solubilização (%)
2	3	6,10E-03	4,42E-03	7,29E-04	12,0
3	6	6,40E-03	4,99E-03	1,31E-03	20,4
4	9	6,30E-03	5,13E-03	1,44E-03	22,9
5	12	6,40E-03	5,87E-03	2,18E-03	34,1
Solução	βCD [mM]	m(AC) (g) t=0	m(AC) (g) t = 86h	m(AS) (g) solubilizada pela influência da βCD	Taxa de solubilização (%)
2	3	6,10E-03	4,03E-03	3,82E-04	6,3
3	6	6,40E-03	4,45E-03	8,08E-04	12,6
4	9	6,30E-03	4,82E-03	1,17E-03	18,6
5	12	6,40E-03	5,00E-03	1,35E-03	21,1
6	15	6,40E-03	6,01E-03	2,37E-03	37,0

**ANEXO C. ESTUDO DE BIODEGRADAÇÃO EM MEIO NÃO TAMPONADO
COM RECURSO À MEDIÇÃO DA TAXA DE CONSUMO DE
OXIGÉNIO E CONTROLO ESPECTROFOTOMÉTRICO**

A Tabela C resume os resultados obtidos para as concentrações de oxigénio dissolvido ao longo do tempo, que se encontram apresentados graficamente nas Figuras 3.2. e 3.3.

Tabela C1. Resultados obtidos na medição das concentrações de oxigénio dissolvido nas soluções 1 a 8 com $|AC|_{\text{máx}} = 0,35 \text{ mM}$ e $0 \text{ mM} \leq |\beta\text{CD}| \leq 7,5 \text{ mM}$ [mg/L O₂ dissolvido a 25°C]

tempo (min)	Solução 1 βCD = 0,0 mM	Solução 2 βCD = 1,5 mM	Solução 3 βCD = 3,0 mM	Solução 4 βCD = 4,5 mM	Solução 5 βCD = 6,0 mM	Solução 6 βCD = 7,5 mM	Solução 7 βCD = 0,0 mM	Solução 8 βCD = 6,0 mM
3,0	6,68	6,40	6,70	6,20	6,09	6,44	6,36	7,46
3,5	6,60	6,24	6,67	6,11	5,96	6,32	6,27	7,48
4,0	6,49	6,16	6,56	6,02	5,85	6,23	6,18	7,53
4,5	6,40	6,05	6,53	5,92	5,72	6,10	6,07	7,57
5,0	6,31	5,95	6,46	5,78	5,59	5,99	5,96	7,62
5,5	6,20	5,79	6,37	5,70	5,46	5,85	5,84	7,64
6,0	6,09	5,66	6,26	5,57	5,33	5,74	5,73	7,67
6,5	5,98	5,52	6,18	5,44	5,21	5,59	5,62	7,69
7,0	5,84	5,36	6,07	5,33	5,07	5,43	5,50	7,70

A Tabela seguinte resume os resultados obtidos para as concentrações de oxigénio dissolvido ao longo do tempo, que se encontram apresentados graficamente na Figura 3.11.

Tabela C2. Evolução temporal da concentração de oxigénio dissolvido das soluções A3 ($|\beta\text{CD}| \cong 0$ mM e $|\text{AC}| \cong 0,5$ mM) e A3 ($|\beta\text{CD}| \cong 6$ mM e $|\text{AC}| \cong 0,5$ mM) [mg/L O₂ dissolvido a 25°C]

tempo (min)	Solução A3	Solução B3
3	12,95	9,50
3,5	12,85	9,25
4	12,80	9,05
4,5	12,70	8,80
5	12,55	8,45
5,5	12,45	8,20
6	12,35	7,95
6,5	12,25	7,70
7	12,20	7,55
7,5	12,10	7,40
8	12,05	7,20
8,5	12,00	6,90
9	11,95	6,55
9,5	11,80	6,20
10	11,65	5,85
10,5	11,45	5,60
11	11,25	5,30
11,5	11,00	5,00
12	10,80	4,75
12,5	10,55	4,45
13	10,30	4,25
13,5	10,05	4,00
14	9,85	3,75
14,5	9,55	3,60
15	9,30	3,45
15,5	9,05	3,25
16	8,90	3,05
16,5	8,65	2,90
17	8,40	2,75
17,5	8,15	2,60
18	7,95	2,45

A Tabela seguinte resume os resultados obtidos para as concentrações de oxigénio dissolvido ao longo do tempo, que se encontram apresentados graficamente na Figura 3.12.

Tabela C3. Evolução temporal da concentração de oxigénio dissolvido das soluções 1 ($|\beta\text{CD}| \cong 6$ mM) e 2 ($|\beta\text{CD}| \cong 6$ mM e $|\text{AC}| \cong 0,5$ mM) [mg/L O₂ dissolvido a 25°C]

tempo (min)	Solução 1	Solução 2
3	6,90	7,25
3,5	6,75	7,00
4	6,40	6,80
4,5	6,15	6,60
5	5,95	6,45
5,5	5,80	6,25
6	5,70	6,05
6,5	5,50	5,85
7	5,30	5,65
7,5	5,10	5,45
8	4,80	5,20
8,5	4,60	5,05
9	4,40	4,85
9,5	4,15	4,60
10	3,95	4,40
10,5	3,75	4,20
11	3,50	4,00
11,5	3,30	3,80
12	3,05	3,65
12,5	2,85	3,45
13	2,65	3,25
13,5	2,40	3,05
14	2,20	2,85
14,5	2,00	2,70
15	1,80	2,50

**ANEXO D. ESTUDO DE BIODEGRADAÇÃO EM MEIO MINERAL
TAMPONADO COM RECURSO AO CONTROLO
ESPECTROFOTOMÉTRICO E ANÁLISE DO CRESCIMENTO
BACTERIANO**

A Tabela D1. resume os resultados obtidos para o crescimento microbiano para a solução 1A ($|\beta\text{CD}| = 0 \text{ mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$) e o respectivo tratamento de resultados.

Tabela D1. Resultados obtidos do crescimento microbiano para a solução 1A ($|\beta\text{CD}| = 0 \text{ mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$) e respectivo tratamento de resultados

t (h)	Abs	X ⁽¹⁾ [mg SSV/L]	Ln (X/X0)	X _{1ª ordem} ⁽²⁾ [mg SSV/L]
0	0,081	90,0	0,00	66,2
1	0,071	78,9	-0,13	67,2
2	0,078	86,7	-0,04	68,2
4	0,076	84,4	-0,06	70,1
6	0,078	86,7	-0,04	72,1
8	0,068	75,6	-0,17	74,2
13	0,057	63,3	-0,35	79,7
23	0,037	41,1	-0,78	91,8
27	0,035	38,9	-0,84	97,2
31	0,046	51,1	-0,57	102,9
35	0,098	108,9	0,19	108,9
45	0,113	125,6	0,33	125,5

⁽¹⁾ – Valor obtido recorrendo à recta de calibração relativa à correspondência da Absorvância com a concentração da solução de lamas (mg SSV/L).

⁽²⁾ – Concentração da solução de lamas utilizando o modelo cinético de 1ª ordem.

A Figura D1. apresenta a representação gráfica de $\text{Ln}(X/X_0)$ em função do tempo incubação para a solução 1A, o que permite determinar a taxa de crescimento microbiano na solução (declive da recta apresentada).

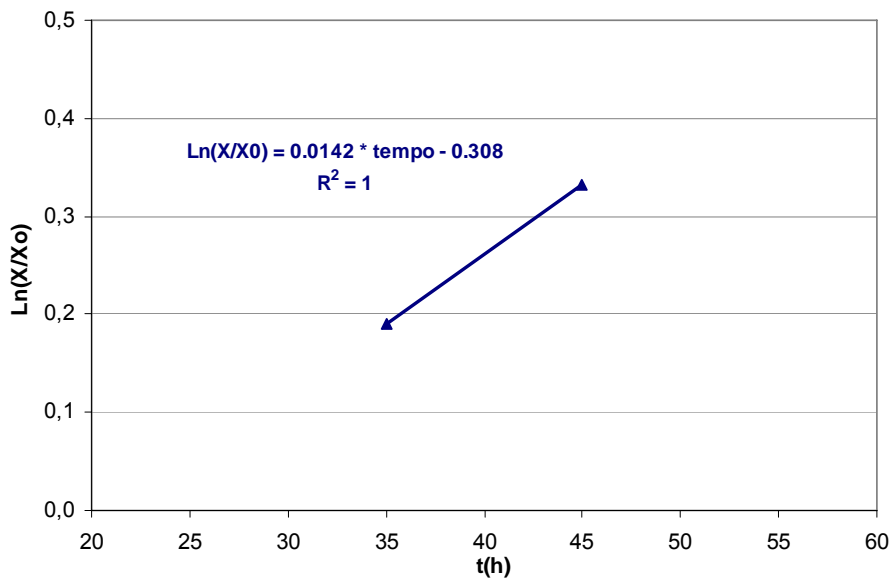


Figura D1. Representação da relação entre $\ln(X/X_0)$ ao longo do tempo para a solução 1A ($|\beta\text{CD}| = 0 \text{ mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$)

A Figura D2. apresenta a evolução temporal de SSV obtidos experimentalmente e pelo modelo cinético de 1ª ordem para a solução 1A ($|\beta\text{CD}| = 0 \text{ mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$).

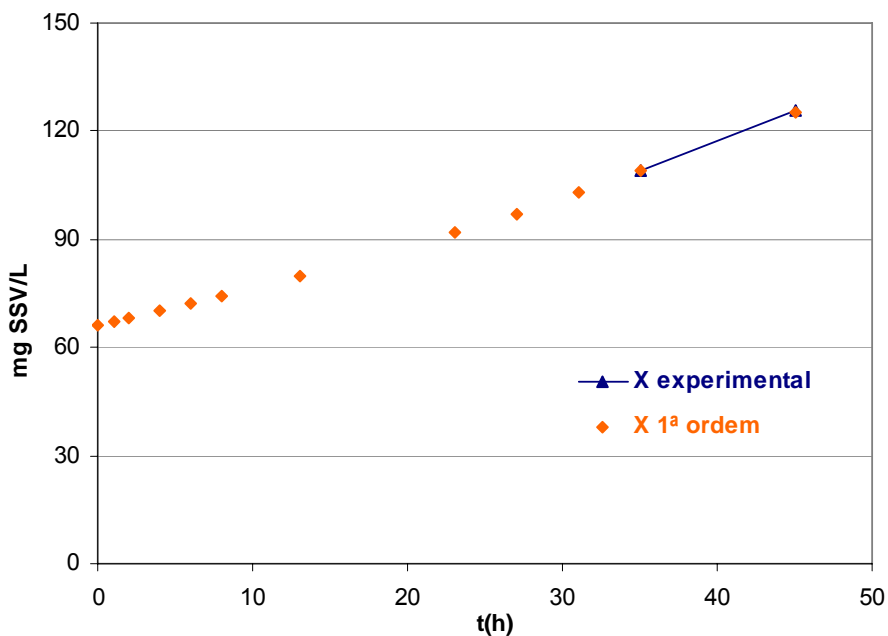


Figura D2. Evolução temporal de SSV obtidos experimentalmente e pelo modelo cinético de 1ª ordem para a solução 1A ($|\beta\text{CD}| = 0 \text{ mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$)

A Tabela D2. resume os resultados obtidos do crescimento microbiano para a solução 2A ($|\beta\text{CD}| = 3 \text{ mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$) e o respectivo tratamento de resultados.

Tabela D2. Resultados obtidos do crescimento microbiano para a solução 2A ($|\beta\text{CD}| = 3 \text{ mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$) e respectivo tratamento de resultados

t (h)	Abs	X ⁽¹⁾ [mg SSV/L]	Ln (X/X0)	X _{1ª ordem} ⁽²⁾ [mg SSV/L]
0	0,074	82,2	0,00	151,5
1	0,074	82,2	0,00	154,1
2	0,068	75,6	-0,08	156,7
4	0,076	84,4	0,03	162,2
6	0,088	97,8	0,17	167,8
8	0,074	82,2	0,00	173,7
13	0,071	78,9	-0,04	189,2
23	0,202	224,4	1,00	224,4
27	0,212	235,6	1,05	240,3
31	0,236	262,2	1,16	257,3
35	0,260	288,9	1,26	275,6
45	0,289	321,1	1,36	327,0
50	0,323	358,9	1,47	356,1

⁽¹⁾ – Valor obtido recorrendo à recta de calibração relativa à correspondência da Absorvância com a concentração da solução de lamas (mg SSV/L).

⁽²⁾ – Concentração da solução de lamas utilizando o modelo cinético de 1ª ordem.

A Figura D3. apresenta a representação gráfica de $\text{Ln}(X/X_0)$ em função do tempo incubação para a solução 2A, o que permite determinar a taxa de crescimento microbiano na solução (declive da recta apresentada).

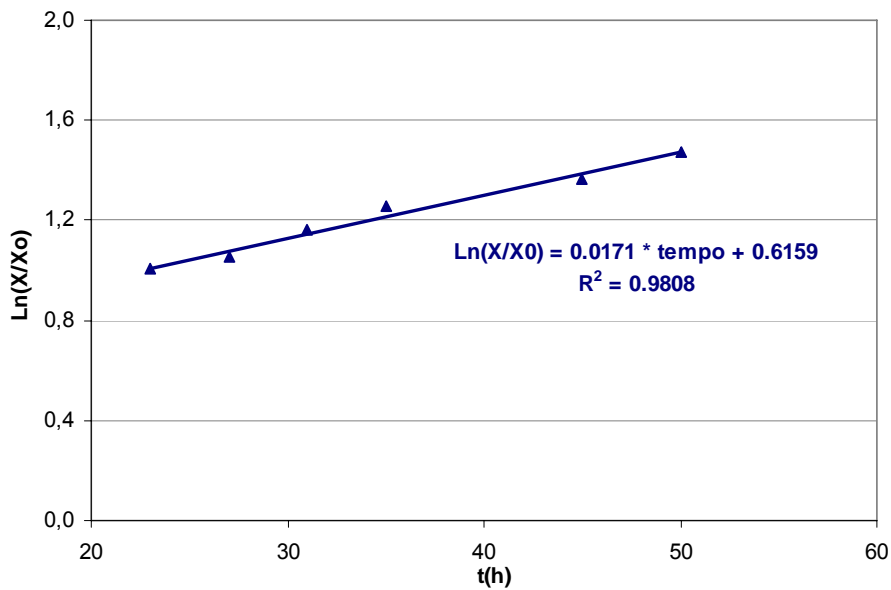


Figura D3. Representação da relação entre $\ln(X/X_0)$ ao longo do tempo para a solução 2A ($[\beta\text{CD}] = 3 \text{ mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$)

A Figura D4. apresenta a evolução temporal de SSV obtidos experimentalmente e pelo modelo cinético de 1ª ordem para a solução 2A ($[\beta\text{CD}] = 3 \text{ mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$).

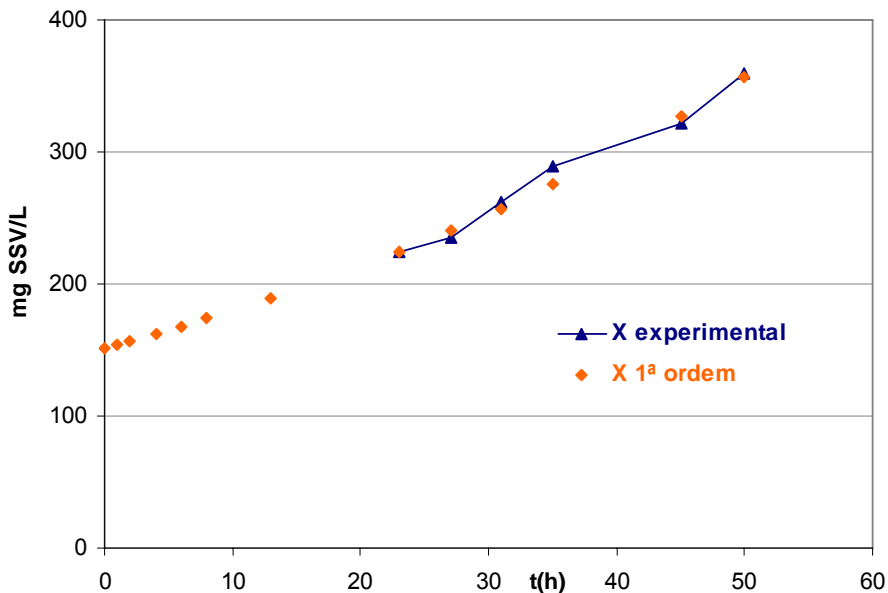


Figura D4. Evolução temporal de SSV obtidos experimentalmente e pelo modelo cinético de 1ª ordem para a solução 2A ($[\beta\text{CD}] = 3 \text{ mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$)

A Tabela D3. resume os resultados obtidos do crescimento microbiano para a solução 3A ($|\beta\text{CD}| = 6 \text{ mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$) e o respectivo tratamento de resultados.

Tabela D3. Resultados obtidos do crescimento microbiano para a solução 3A ($|\beta\text{CD}| = 6\text{mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$) e respectivo tratamento de resultados

t (h)	Abs	X ⁽¹⁾ [mg SSV/L]	Ln (X/X0)	X _{1a ordem} ⁽²⁾ [mg SSV/L]
0	0,065	72,2	0,00	86,1
1	0,069	76,7	0,06	89,4
2	0,069	76,7	0,06	92,8
4	0,065	72,2	0,00	99,9
6	0,059	65,6	-0,10	107,6
8	0,058	64,4	-0,11	115,9
13	0,052	57,8	-0,22	139,5
23	0,182	202,2	1,03	202,2
27	0,223	247,8	1,23	234,6
31	0,256	284,4	1,37	272,1
35	0,285	316,7	1,48	315,6

⁽¹⁾ – Valor obtido recorrendo à recta de calibração relativa à correspondência da Absorvância com a concentração da solução de lamas (mg SSV/L).

⁽²⁾ – Concentração da solução de lamas utilizando o modelo cinético de 1^a ordem.

A Figura D5. apresenta a representação gráfica de $\text{Ln}(X/X_0)$ em função do tempo incubação para a solução 3A, o que permite determinar a taxa de crescimento microbiano na solução (declive da recta apresentada).

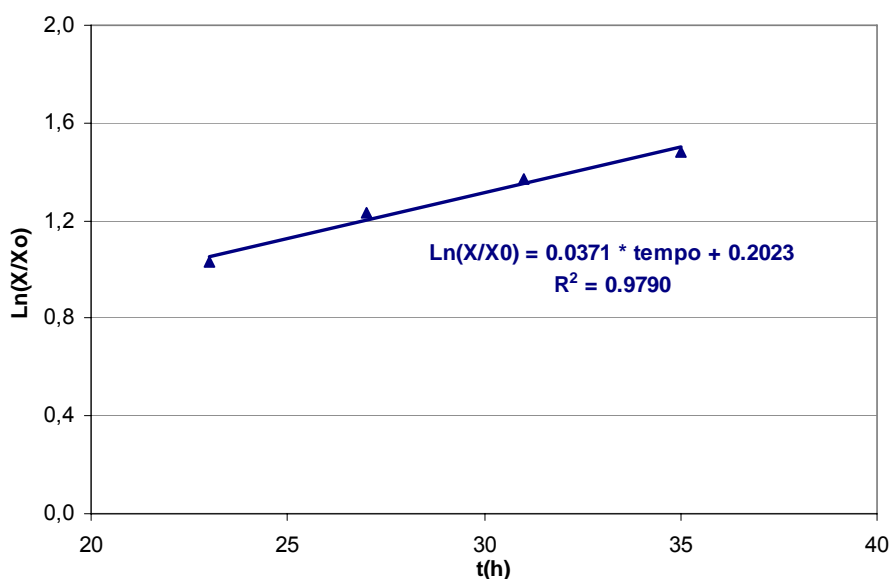


Figura D5. Representação da relação entre $\text{Ln}(X/X_0)$ ao longo do tempo para a solução 3A ($|\beta\text{CD}| = 6\text{mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6\text{mM}$)

A Figura D6. apresenta a evolução temporal de SSV obtidos experimentalmente e pelo modelo cinético de 1ª ordem para a solução 3A ($|\beta\text{CD}| = 6\text{mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6\text{mM}$).

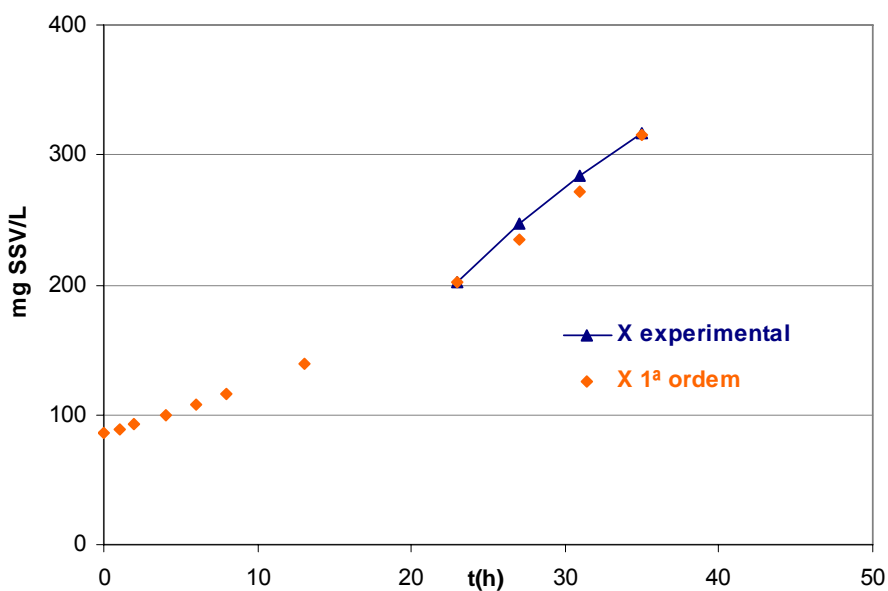


Figura D6. Evolução temporal de SSV obtidos experimentalmente e pelo modelo cinético de 1ª ordem para a solução 3A ($|\beta\text{CD}| = 6\text{mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6\text{mM}$)

A Tabela D4. resume os resultados obtidos do crescimento microbiano para a solução 4A ($|\beta\text{CD}| = 9 \text{ mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$) e o respectivo tratamento de resultados.

Tabela D4. Resultados obtidos do crescimento microbiano para a solução 4A ($|\beta\text{CD}| = 9\text{mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$) e respectivo tratamento de resultados

t (h)	Abs	X ⁽¹⁾ [mg SSV/L]	Ln (X/X ₀)	X _{1a ordem} ⁽²⁾ [mg SSV/L]
0	0,072	80,0	0,00	89,9
1	0,078	86,7	0,08	93,7
2	0,077	85,6	0,07	97,6
4	0,073	81,1	0,01	106,1
6	0,068	75,6	-0,06	115,3
8	0,063	70,0	-0,13	125,2
13	0,060	66,7	-0,18	154,1
23	0,147	163,3	0,71	233,4
27	0,248	275,6	1,24	275,6
31	0,298	331,1	1,42	325,3
35	0,380	422,2	1,66	384,1
45	0,545	605,6	2,02	581,6
50	0,647	718,9	2,20	715,7

⁽¹⁾ – Valor obtido recorrendo à recta de calibração relativa à correspondência da Absorvância com a concentração da solução de lamas (mg SSV/L).

⁽²⁾ – Concentração da solução de lamas utilizando o modelo cinético de 1ª ordem.

A Tabela D5. resume os resultados obtidos do crescimento microbiano para a solução 5A ($|\beta\text{CD}| = 12 \text{ mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$) e o respectivo tratamento de resultados.

Tabela D5. Resultados obtidos do crescimento microbiano para a solução 5A ($|\beta\text{CD}| = 12\text{mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6 \text{ mM}$) e respectivo tratamento de resultados

t (h)	Abs	X ⁽¹⁾ [mg SSV/L]	Ln (X/X0)	X _{1ª ordem} ⁽²⁾ [mg SSV/L]
0	0,051	56,7	0,00	20,8
1	0,052	57,8	0,02	22,4
2	0,054	60,0	0,06	24,1
4	0,047	52,2	-0,08	27,9
6	0,050	55,6	-0,02	32,4
8	0,045	50,0	-0,13	37,5
13	0,047	52,2	-0,08	54,2
23	0,072	80,0	0,34	113,4
27	0,137	152,2	0,99	152,2
31	0,192	213,3	1,33	204,4
35	0,247	274,4	1,58	274,5

⁽¹⁾ – Valor obtido recorrendo à recta de calibração relativa à correspondência da Absorvância com a concentração da solução de lamas (mg SSV/L).

⁽²⁾ – Concentração da solução de lamas utilizando o modelo cinético de 1ª ordem.

A Figura D7. apresenta a representação gráfica de $\text{Ln}(X/X_0)$ em função do tempo incubação para a solução 5A, o que permite determinar a taxa de crescimento microbiano na solução (declive da recta apresentada).

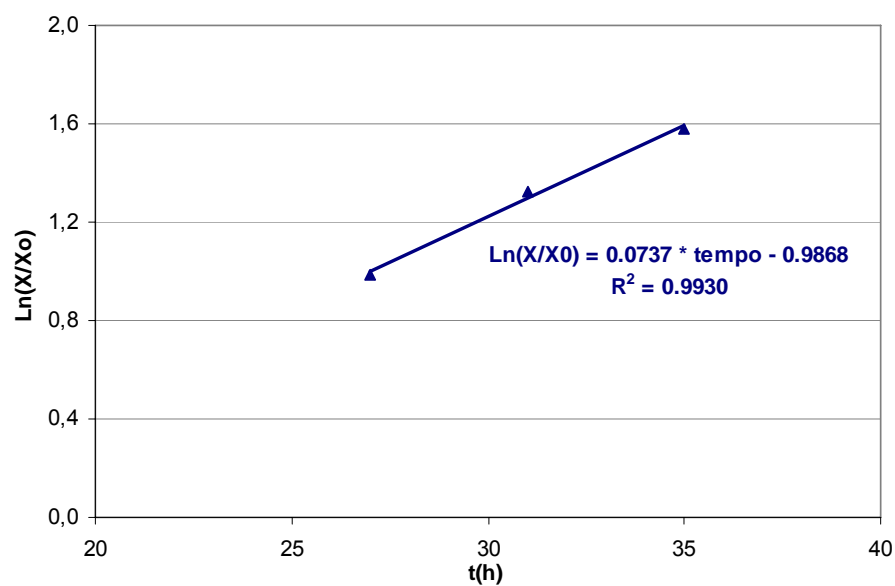


Figura D7. Representação da relação entre $\ln(X/X_0)$ ao longo do tempo para a solução 5A ($|\beta\text{CD}| = 12\text{mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6\text{ mM}$)

A Figura D8. apresenta a evolução temporal de SSV obtidos experimentalmente e pelo modelo cinético de 1ª ordem para a solução 5A ($|\beta\text{CD}| = 12\text{ mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6\text{ mM}$).

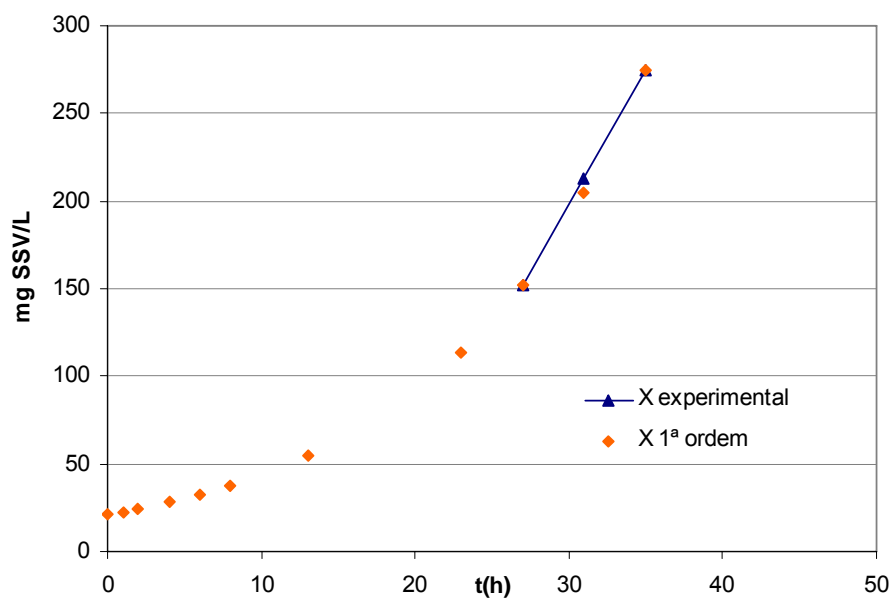


Figura D8. Evolução temporal de SSV obtidos experimentalmente e pelo modelo cinético de 1ª ordem para a solução 5A ($|\beta\text{CD}| = 12\text{mM}$, $|\text{AC}|_{\text{máx.}} \cong 0,6\text{ mM}$)

A Figura D9. apresenta a evolução temporal de SSV obtidos experimentalmente e pelo modelo cinético de 1ª ordem para as 5 soluções em estudo.

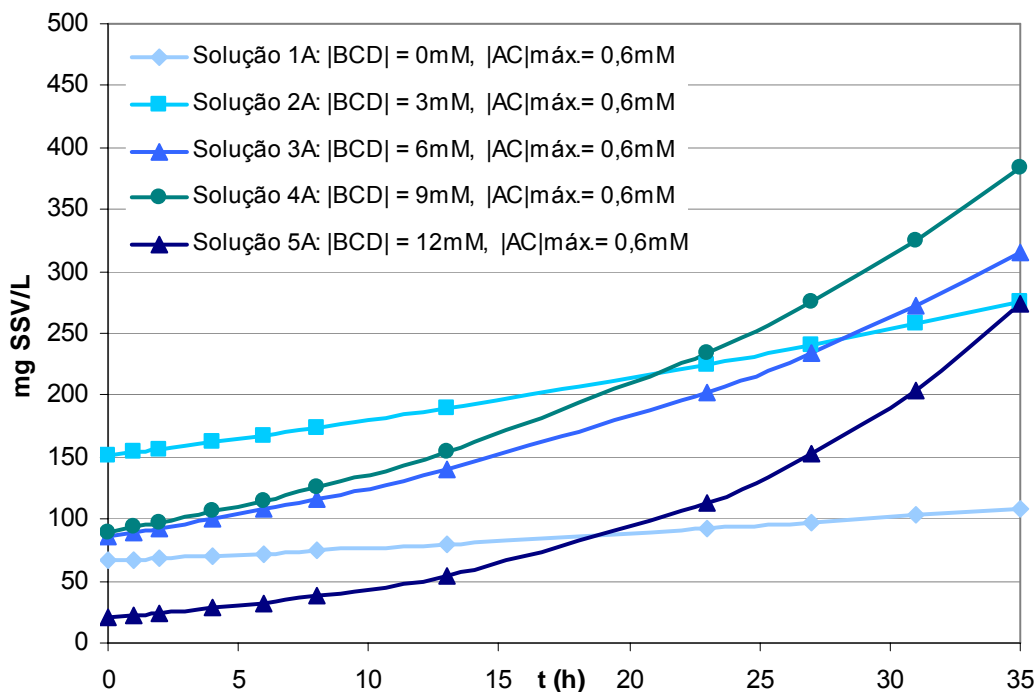


Figura D9. Evolução temporal de SSV obtidos experimentalmente e pelo modelo cinético de 1ª ordem para as soluções 1A a 5A (sem transladação)

Considerando os resultados obtidos pela adopção do modelo cinético de 1ª ordem a este estudo, efectuou-se uma transladação dos valores obtidos com este modelo, por forma a que as 5 soluções tivessem $X_0 = 55,56$ mg SSV/L.

Os factores de transladação e os valores obtidos para a concentração de SSV nestas condições encontram-se seguidamente na Tabela D6.

Tabela D6. Factores de transladação e valores para X 1ª ordem [mg SSV/L] transladados

Factor de transladação	1,19	2,73	1,55	1,62	0,37
Solução	1A	2A	3A	4A	5A
tempo (h)					
0	55,56	55,56	55,56	55,56	55,56
1	56,35	56,52	57,66	57,91	59,81
2	57,16	57,49	59,84	60,37	64,38
4	58,81	59,49	64,45	65,59	74,61
6	60,50	61,56	69,41	71,27	86,46
8	62,24	63,71	74,76	77,44	100,19
13	66,82	69,39	90,00	95,29	144,83
23	77,02	82,33	130,42	144,31	302,65
27	81,52	88,16	151,28	170,37	406,41
31	86,29	94,40	175,49	201,13	545,75
35	91,33	101,09	203,56	237,45	732,87

Para a aplicação do modelo de Monod a este estudo, utilizou-se a equação 1, descrita no Capítulo 1. Efectuando a sua linearização, obtém-se a equação 5. que, aplicada aos resultados experimentais obtidos, origina a Figura D10. De referir que S é a concentração de substrato, neste caso, β CD.

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_m} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_m} \quad (\text{equação 5.})$$

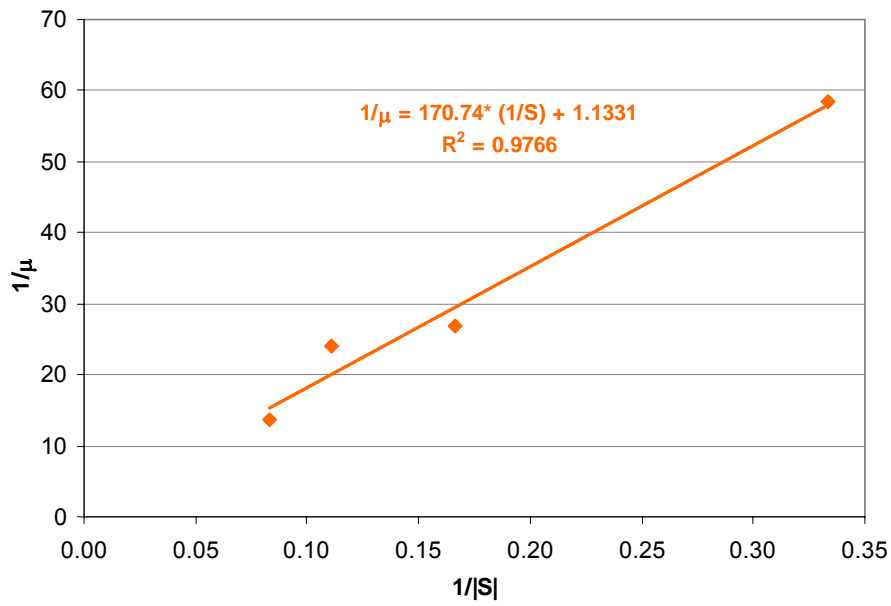


Figura D10. Aplicação do modelo de Monod aos resultados experimentais obtidos

Da Figura anterior tem-se que:

$$\frac{1}{\mu_m} = 1,1331 \Rightarrow \mu_m = 0,883h^{-1}$$

$$\frac{K_s}{\mu_m} = 170,74 \Rightarrow K_s = 150,7mM$$