OPINIÃO: Dados do IBGE para Pesquisa e Planejamento Estratégico das Indústrias

FIEG SESI SENAI IEL ICQ BRASIL

SENAI

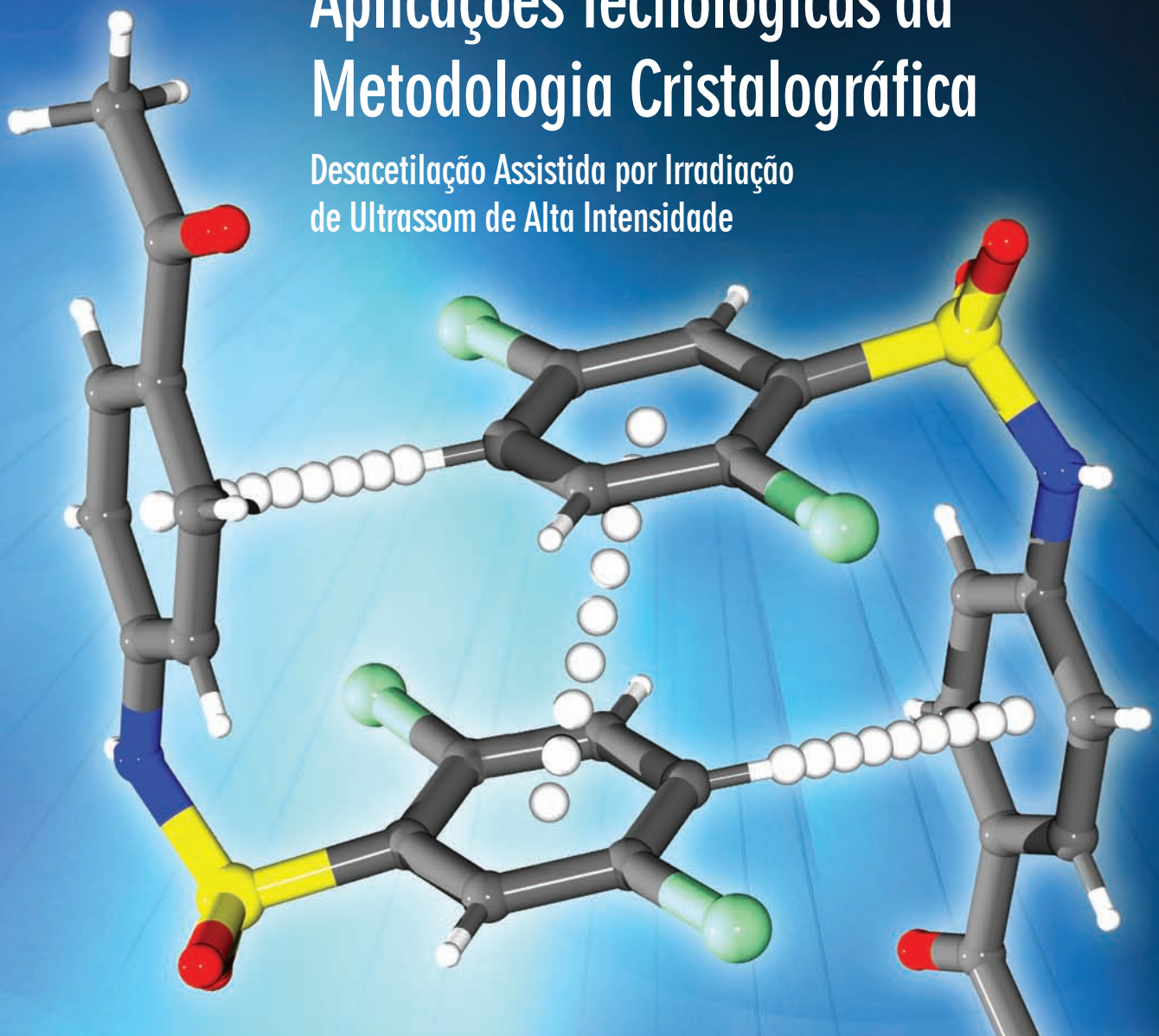
# REVISTA Processos Químicos

Revista científica da Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange

Ano 4
nº 7
Jan/Jun
2010

## Aplicações Tecnológicas da Metodologia Cristalográfica

### Desacetilação Assistida por Irradiação de Ultrassom de Alta Intensidade



ISSN 1981-8521

# REVISTA Processos Químicos

Revista Científica da Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange

FIEG SESI SENAI IEL ICQ BRASIL SENAI

Goiânia, v.4, n.7, ano 4, jan/jun 2010.

REVISTA Processos Químicos

Ano 4
nº 7
Jan/Jun
2010

**Pedro Alves de Oliveira**
Presidente do Conselho Regional do SENAI

**Paulo Vargas**
Diretor Regional do SENAI

**Manoel Pereira da Costa**
Diretor de Educação e Tecnologia

**Ítalo de Lima Machado**
Gerente de Educação Profissional

**Francisco Carlos Costa**
Diretor da Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange

**Joana Darc Silva Borges**
Coordenadora da Área de Química

## Corpo Editorial

Ademir João Camargo
Anselmo Eucana de Oliveira
Carlito Lariucci
Eurípedes de Almeida Ribeiro Júnior
Gilberto Lúcio Benedito Aquino
Guilherme Roberto de Oliveira
Hamilton Barbosa Napolitano
Joana Darc Silva Borges
José Daniel Gonçalves Vieira
Kleber Carlos Mundim
Manoel Pereira da Costa
Maria Assima Bittar Gonçalves
Roberta Signini
Solemar Silva Oliveira

FIEG SESI SENAI IEL ICO BRASIL SENAI

www.senaigo.com.br

Revista Processos Químicos / SENAI.
Departamento Regional de Goiás - v.4, n.7 (jan/jun, 2010). Goiânia: SENAI/DR. Gerência de Educação Profissional / Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange, 2010.
v.: il.

Semestral
Capa e diagramação: Lads Design.

ISSN 1981-8521

1. Educação Profissional - Periódicos. 2. Processos Químicos.
I. SENAI. Departamento Regional de Goiás

CDD - 540

Tiragem: 2.000 exemplares

**Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange**
Av. Engenheiro Roberto Mange, n° 239
Bairro Jundiaí - CEP 75113-630 - Anápolis-GO
Fone: (62) 3902-6200 - Fax: (62) 3902-6226
e-mail: revistapq.senai@sistemafieg.org.br

# Sumário

## ARTIGOS CONVIDADOS


09 *Desacetilação Assistida por Irradiação de Ultrassom de Alta Intensidade: Uma Nova Tecnologia para a Produção de Quitosana*
Sérgio P. Campana-Filho, Jorge A. M. Delezuk & Márcia B. Cardoso

19 *Aplicações Tecnológicas da Metodologia Cristalográfica*
William B. Fernandes, Hamilton B. Napolitano, Caridad Noda-Perez, Felipe T. Martins & Carlito Lariucci


## ARTIGOS GERAIS


33 *Um Procedimento Teórico-Experimental para a Estimativa da Difusividade e Condutividade Térmica de Alimentos em Pastas.*
Laís S. de Moura, Ana C. Teixeira, Nathália G. Cardoso, Orlene S. Costa, Valter H. C. Silva, José S. Sales & Heibbe C. B. de Oliveira.

39 *Aplicação de Indicadores Ácido-Base na Determinação Espectrofotométrica de Amônia em Água por Análise em Fluxo*
Edmar I. Melo, Nívia M. M. Coelho & Danilo A. Giarola

46 *Synthesis and Characterization of Polyvinyl Alcohol-Polyaniline-Glutaraldehyde Composite disc: a Probable Matrix for Protein Immobilization*
Samantha S. Caramori, Kátia F. Fernandes & Luiz B. Carvalho-Júnior

53 *Técnicas de Imobilização*
Kátia F. Fernandes, Claudinei S. Lima & Flavio M. Lopes

59 *Decomposição dos Antirretrovirais Lamivudina e Zidovudina pelo Processo Fotofenton Assistido no Efluente de Indústria Farmoquímica*
Sonia J. O. Souza, Tatiane M. Lobo, Alline L. O. Sabino, Sérgio B. Oliveira & Orlene S. Costa

# Sumário

68 *Cádmio, Chumbo e Solubilidade do Fósforo em Suplementos Minerais Bovinos Comercializados em Goiás*
José R. Gonçalves, Renata M. Gonçalves & Raniery M. Gonçalves

## RESUMO ESTENDIDO

78 *Avaliação Fisico - Química do Córrego das Antas*
Ari P. P. Júnior, Diego S. Silva, Wigney G. Costa & Taciano P. Ferreira

## OPINIÃO

84 *A sua empresa, como está?*
Cristiano Coelho, Edson R. Vieira & Emerson Wruck

# Apresentação

A Indústria Brasileira organizou um sistema de ensino, denominado Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI), que contribui de maneira expressiva para a evolução tecnológica da indústria brasileira, seja pela formação dos profissionais demandados pelos parque industrial, seja pelos serviços técnicos e tecnológicos, pela inovação e transferência de tecnologias que impulsionam a competitividade da indústria nacional. Entre as ações do SENAI em Goiás, voltadas para a transferência de tecnologias, destaca-se a Revista Processos Químicos (RPQ), implantada em 2007 pela Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange, em parceria com a Federação das Indústrias do Estado de Goiás.

A RPQ adentra em seu quarto ano de serviços prestados à difusão e à transferência de tecnologias para diversos segmentos produtivos, com especial ênfase aos setores alimentícios, sucroalcooleiro, químico, farmacêutico e de mineração. Neste período de existência, a RPQ conquistou sua indexação no programa *Qualis* da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a inserção no Banco de Recursos Didáticos do Departamento Nacional do SENAI.

O passo seguinte, almejado pelo Departamento Regional do SENAI em Goiás, é a sua inclusão no *Scientific Electronic Library* (Scielo). Agora, com uma tiragem de dois mil exemplares, a circulação da versão impressa sai de uma dimensão regional e alcança uma estatura nacional. Entre os protagonistas desta virtuosa trajetória, destacamos a dedicação acadêmica do Corpo Editorial, o compromisso institucional da Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange e do Departamento Regional em estimular a transferência de tecnologias e a inovação nas empresas de Goiás. Portanto, o sucesso da RPQ é conseqüência de uma ação orquestrada por vários agentes.

Neste sétimo volume, dois artigos convidados abordam temas como: (1) aplicações tecnológicas da metodologia cristalográfica e (2) novas tecnologias para a produção de quitosana. O primeiro tema tem como finalidade apresentar as principais etapas do trabalho cristalográfico, e o último aborda a desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade. Nos artigos gerais, são abordados temas como: (1) aplicação de indicadores ácido-base na determinação espectrofotométrica de amônia, (2) técnicas de imobilização de enzimas e (3) procedimento para a estimativa da difusividade e condutividade térmica de alimentos em pastas.

Finalmente, no artigo de opinião, a importância das pesquisas econômicas para o desenvolvimento de Goiás é o tema abordado. Todos os assuntos são de interesse do setor produtivo industrial. O Departamento Regional do SENAI Goiás deseja uma proveitosa leitura e o uso das informações tecnológicas para o desenvolvimento de novos produtos proprietários.

**Ítalo de Lima Machado**
Gerente de Educação Profissional
SENAI/DR/GO

# Desacetilação Assistida por Irradiação de Ultrassom de Alta Intensidade: Uma Nova Tecnologia para a Produção de Quitosana

Sérgio P. Campana-Filho, Jorge A. M. Delezuk & Márcia B. Cardoso

A Desacetilação Assistida por Irradiação de Ultrassom de Alta Intensidade (DAIUS) foi aplicada à beta-quitina visando à produção de quitosana. As características das quitosanas obtidas dependem da amplitude da irradiação de ultrassom, da duração e da temperatura do tratamento. Assim, em função desses parâmetros, os graus médios de acetilação e as massas molares médias viscosimétricas dos produtos variam nos intervalos 5%<GA<25% e 100.000 g/mol<Mv<700.000 g/mol, respectivamente. A comparação com os processos convencionais de desacetilação de quitina revela que o Processo DAIUS é inovador e apresenta grande potencial para suprir a demanda das indústrias por quitosanas com características e propriedades uniformes.

**Palavras-chave:** *quitina, quitosana, ultrassom.*

The high intensity ultrasound-assisted deacetylation was applied to beta-chitin aiming the production of chitosan. The amplitude of the ultrasound irradiation, the treatment duration and temperature, strongly affect the product´s characteristics. Thus, depending on these process parameters, the average degree of acetylation and viscosity average molecular weight range as 5%<DA<25% and 100,000 g/mol<Mv<700,000 g/mol, respectively. Comparing the USAD Process with the conventional processes employed to deacetylate chitin reveals that it is innovative and it has a great potential to attend the industrial demand for chitosan exhibiting uniform characteristics and properties.

**Keywords:** *chitin, chitosan, ultrasound.*

# Introdução

As últimas décadas registram o crescente interesse de pesquisadores e indústrias em quitina e especialmente em quitosana e suas aplicações. As razões mais fortes para esse interesse são, sem dúvida, as propriedades especiais apresentadas por esses polímeros e o fato de serem produzidos a partir de matéria-prima abundante, *i. e.* carapaças de crustáceos, tais como camarões e caranguejos, processados pela indústria pesqueira. A quitosana é aplicada nas indústrias cosmética[1] e alimentícia[2], no tratamento de efluentes aquosos[3,4], e apresenta potencial para a detecção e análise, concentração e recuperação de proteínas, lipídeos, pesticidas, corantes, íons metálicos e radioisótopos[5,6-7]. A quitosana também exibe atividade antimicrobiana, é atóxica, biocompatível e biodegradável, sendo por isso potencialmente aplicável na agricultura, em medicina, na odontologia e em formulações farmacêuticas[6-12]. Além disso, a quitosana pode ser processada como soluções, géis, filmes, membranas, microesferas, nanofibras e nanopartículas, o que amplia as possibilidades de aplicações. Assim, o interesse comercial em quitosana e suas aplicações produziu 8600 registros de patentes no período 1976-2009 apenas nos EUA, conforme o United States Patent and Trademark Office[13]. Entretanto, ainda são necessários investimentos em pesquisa e desenvolvimento de modo a superar as dificuldades encontradas para realizar o potencial de aplicações de quitosana. As principais dificuldades são o grau de pureza das preparações contendo quitina e quitosana, critério muito importante nas aplicações em saúde pública e alimentos[14], a falta de uniformidade estrutural desses polímeros e as conseqüentes variações em propriedades e funcionalidades[15].

Os preços médios de quitina e quitosana variam em amplo intervalo dependendo das características do produto, podendo atingir R$1176/5g (quitina purificada para a determinação de atividade de quitinase) e R$1928,00/500g (quitosana de média massa molar e GA<15%)[16]. Portanto, é também muito importante salientar que o processamento de cascas de camarões e carapaças de caranguejos visando à produção de quitina e quitosana agrega valor a resíduos abundantes e baratos que, adicionalmente, apresentam elevada demanda bioquímica de oxigênio e cujo descarte provoca sérios problemas ambientais[5, 6, 17]. Em 2005 a produção mundial de pescado foi superior a 140 milhões de toneladas (aproximadamente 2/3 originados da pesca extrativa e 1/3 da aqüicultura), sendo que no período 1995-2005 a pesca extrativa, responsável por aproximadamente 60% do consumo mundial de pescado, teve crescimento médio anual de 0,17% enquanto a aqüicultura cresceu 7,29%/ano[18]. Em 2006 a produção de pescado no Brasil superou 1 milhão de toneladas (aproximadamente 26% oriundos da aqüicultura) e dentre as regiões produtoras o Nordeste lidera com aproximadamente 110 mil toneladas produzidas, a maior parte devida à produção de camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*), responsável por aproximadamente 42% da pauta de exportação, enquanto a produção de camarões de água doce (*Macrobrachium rosenbergii*) pela aqüicultura nacional foi de aproximadamente 370 toneladas[19]. Não são encontrados dados consolidados e atualizados sobre a produção nacional de lulas (os gládios de lulas são ricos em quitina), mas foi registrada a produção de aproximadamente 335 toneladas no litoral paulista em 2005[20]. A produção mundial de rejeitos ricos em quitina é de aproximadamente 1,44 milhões de toneladas/ano, sendo que a contribuição estimada dos países produtores integrantes da Íbero-América é de aproximadamente 12%[6]. Assim, considerando um rendimento médio de 15% no processamento desses rejeitos, a capacidade potencial de produção de quitina pelos países que integram a Íbero-América se aproxima de 25 mil toneladas/ano, sendo que o potencial do Brasil representa aproximadamente 25-30% dessa estimativa. Embora o rendimento da conversão de quitina em quitosana seja variável em função da natureza da matéria-prima (alfa-quitina e beta-quitina, polimorfas mais abundantes de quitina possuem reatividades diferentes) e das condições de processamento, aproximadamente 80-90% da massa inicial de quitina pode ser recuperada como quitosana com GA≈25%, o que indica que a produção nacional de quitosana poderia atingir aproximadamente 5000-7000 toneladas/ano. A demanda atual de quitosana em nível mundial é de aproximadamente 10 mil toneladas/ano[6], mas a existência de demanda reprimida pode ser considerável visto o grande número de patentes registradas nos últimos 30-40 anos.

Considerando o que foi brevemente exposto, o relacionamento de aspectos ligados à composição

das matérias-primas, aos processos de produção e às características, propriedades e aplicações das quitosanas obtidas por desacetilação de quitina é destacado a seguir. Também é dado destaque à necessidade de serem desenvolvidas novas rotas para a produção eficiente e reprodutível de quitosanas com características e propriedades uniformes, adequadas para inserção em linhas de produção.

# Quitina e Quitosana

A quitina, importante componente dos exoesqueletos de invertebrados e de paredes celulares de alguns fungos e algas, é produzida por biossíntese nesses organismos e apresenta uma taxa de reposição na biosfera que é aproximadamente o dobro daquela da celulose[6,17]. A principal reação de derivatização de quitina é a desacetilação, hidrólise dos grupos acetamida da maioria (>60%) das unidades 2-acetamido2-desoxi-D-glicopiranose (GlcNAc), que resulta no biopolímero conhecido como quitosana. Tal reação pode ocorrer tanto pela via enzimática como química, sendo que a última é a mais comum e o tratamento de quitina em meio alcalino o processo mais empregado.

As indústrias pesqueiras nacionais processam anualmente toneladas de espécies marinhas e geram enormes volumes de resíduos os quais são ricos em quitina e também contém proteínas, sais minerais e lipídeos. Dados ilustrativos e referentes à produção de pescado no Estado de São Paulo são apresentados na Tabela 1. O descarte desses resíduos provoca graves problemas ambientais e de saúde pública e, assim, a extração de quitina dessa biomassa para a produção de quitina, e sua posterior conversão a quitosana, contribui para a preservação do ambiente e agrega valor a rejeitos da indústria pesqueira.

**Tabela 1.** Produção pesqueira marinha registrada, em toneladas, dos principais grupos que contém quitina, São Paulo, 2005[21].

| Grupo | Quantidade (t) | % em Relação à produção total (a) |
|---|---|---|
| Crustáceos | 3.970 | 16,7 |
| Moluscos | 1.100 | 4,6 |

(a) a produção total de espécimes marinhas em 2005 no Estado de São Paulo foi de 23,8 x $10^3$ t.

A quitina é um polímero linear cuja estrutura primária é composta por unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranose (GlcNAc) unidas por ligações glicosídicas do tipo β(1-4).

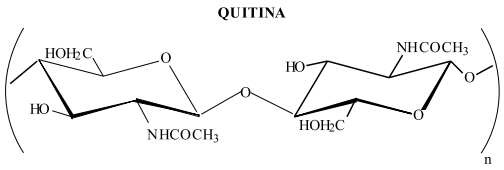



**Figura 1.** Representação da estrutura primária idealizada da quitina, onde n é o grau de polimerização.

A quitina apresenta três polimorfas, α, β e γ-quitina, que diferem quanto ao arranjo do polímero nos domínios cristalinos. As cadeias de quitina apresentam extremidades redutora e não-redutora e a disposição relativa das cadeias poliméricas nas folhas que formam os domínios cristalinos, é o que diferencia as polimorfas de quitina. Na α-quitina as cadeias estão dispostas de forma antiparalela favorecendo as interações por ligações hidrogênio, enquanto na β-quitina as cadeias estão dispostas paralelamente, o que desfavorece o estabelecimento dessas interações, e a γ-quitina ocorre como combinação dos arranjos da α- e da β-quitina (Figura 2)[5].

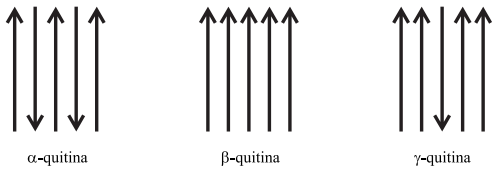



**Figura 2.** Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina, sendo que as setas representam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não-redutor para o redutor.

As principais fontes para a produção industrial de quitina são as cascas de camarões e carapaças de caranguejos, que possuem composições variadas quanto aos teores de proteínas (25-60%), sais de cálcio (fosfatos e carbonatos) (20-30%), lipídios (1-12%), pigmentos (≈1%) e quitina (20-45%) de acordo com o organismo considerado[6].

No processo de extração da alfa-quitina a partir de cascas de camarões e carapaças de caranguejos são executadas três etapas seqüenciais visando a

desmineralização, desproteinização e despigmentação da biomassa, e que resultam na eliminação de carbonatos e fosfatos de cálcio e magnésio, proteínas e pigmentos, respectivamente. Entretanto, estudos demonstraram que na extração da beta-quitina de gládios de lula apenas a etapa de desproteinização é necessária, pois os teores de sais minerais e pigmentos nesta biomassa são baixos[22].

Uma das principais reações da quitina, a hidrólise dos grupos acetamido das unidades GlcNAc, gera o polímero conhecido como quitosana, cuja estrutura primária possui predominantemente unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranose (GlcN). Geralmente a reação é realizada por tratamento da quitina com solução aquosa alcalina, um processo heterogêneo que apresenta como variáveis a concentração do álcali, a temperatura e o tempo de reação. O produto obtido da reação é denominado quitosana (Figura 3) somente se o conteúdo médio de unidades GlcN for igual ou superior a 60% e, principalmente, se for solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos, como ácido clorídrico e ácido acético[5,6,17]. Como a quitosana completamente desacetilada raramente é preparada, os produtos obtidos por desacetilação parcial de quitina são considerados copolímeros constituídos de unidades GlcN e GlcNAc. Assim, a composição das quitosanas é variável em função das condições empregadas na desacetilação de quitina, sendo definido o grau médio de acetilação (GA) como a fração média de unidades GlcNAc presentes nas cadeias.

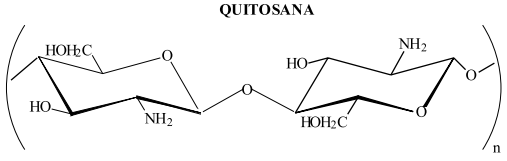



**Figura 3.** Representação da estrutura primária idealizada da quitosana, onde n é o grau de polimerização.

A massa molar média, o grau médio de acetilação (GA) e a distribuição das unidades GlcN e GlcNAc nas cadeias têm efeito marcante sobre as propriedades e aplicações da quitosana[3]. Assim, por exemplo, a solubilidade da quitosana em meios moderadamente ácidos está fortemente relacionada com GA, pois este expressa a quantidade de grupos amino ($-NH_2$) nas cadeias poliméricas que são protonados, gerando cargas ($-NH_3+$) que favorecem as interações polímero/solvente aquoso. Portanto, quanto maior o valor de GA maior o número de cargas geradas por protonação, mais importante a repulsão eletrostática entre as cadeias e maior a solubilidade do polímero. A distribuição de unidades GlcNac e GlcN também afeta a solubilidade de quitosana, sendo que a preparação de quitosana com GA=50% por via de acetilação homogênea gera um polímero com distribuição aleatória dessas unidades que é solúvel em ampla faixa de acidez e inclusive em meios neutros[23]. Entretanto, a quitosana com GA=50% preparada pela desacetilação heterogênea de quitina possui distribuição em blocos de unidades GlcNAc e GlcN e é solúvel apenas em meios de acidez moderada (pH<5,5). A massa molar média de quitosana e sua distribuição também afetam a sua solubilidade, pois as frações de massa molar mais elevada são menos solúveis, sendo este fato decorrente de interações polímero/solvente mais fracas à medida que a massa molar do polímero aumenta.

Outras propriedades da quitosana também são afetadas por essas características, incluindo a sua capacidade de interação com íons metálicos[24], a atividade anti-microbiana[25] e a ação em dispositivos para a liberação controlada de fármacos[26]. As características de quitosana, tais como a massa molar média, o grau médio de acetilação e a distribuição das unidades GlcN e GlcNAc, dependem fortemente das condições em que a reação de desacetilação da quitina foi realizada, e também da natureza da polimorfa e das condições empregadas em sua extração da biomassa. Assim, deve ser considerado que as polimorfas de quitina, pelo fato de adotarem diferentes arranjos no estado sólido, apresentam solubilidade, capacidade de intumescimento em solventes e reatividades, inclusive em relação à desacetilação, diferentes. De fato, a hidrólise alcalina dos grupos acetamido das unidades GlcNAc é mais favorecida no caso da β-quitina como conseqüência da maior acessibilidade aos sítios reativos nas cadeias dessa polimorfa[22,27,28].

# Obtenção de Quitosana

O processo mais empregado nos laboratórios de pesquisa e também nas indústrias para a produção de quitosana é o tratamento de quitina por várias horas

com soluções concentradas de hidróxido de sódio em temperaturas elevadas. Em tais condições apenas a hidrólise parcial dos grupos acetamido das unidades GlcNAc de quitina é alcançada, mas acentuada despolimerização ocorre simultaneamente se o tempo de reação for longo, gerando polímeros de baixa massa molar e elevada dispersividade. Além disso, como a reação se processa heterogeneamente, os produtos dessa reação não são uniformes em termos de suas características estruturais e propriedades. Assim, vários métodos têm sido propostos para aumentar a eficiência da reação, gerando produtos mais uniformes, e para minimizar a ocorrência de despolimerização. Dentre os principais métodos desenvolvidos com o propósito de minimizar a despolimerização estão a execução da reação em atmosfera inerte[29], a diluição com solventes[30], a introdução de mudanças nas condições de processamento com o uso de extrusão reativa[31], explosão de vapor (processo "flash")[32], irradiação de ultrassom[33] e microondas[34], o uso de agentes redutores[35] e a execução de tratamentos sucessivos de desacetilação[36].

Recentemente um novo processo foi proposto, conhecido como "freeze – pump out – thaw" ("FPT"), no qual a suspensão de quitina em solução aquosa concentrada de hidróxido de sódio é submetida a sucessivos ciclos de congelamento à temperatura do nitrogênio líquido, sucção com bomba de vácuo e aquecimento até atingir a temperatura ambiente[37]. Ao menos seis ciclos devem ser executados e então a suspensão de quitina é submetida à desacetilação em temperaturas no intervalo 80°C – 110ºC por tempos curtos (até 60 minutos). As quitosanas obtidas pela aplicação de ao menos três processos "FTP" consecutivos apresentam baixo grau médio de acetilação (GA <0,2%) e elevada massa molar (Mv ≈ $4{,}5 \times 10^5$ g/mol). Apesar disso o processo "FTP" pode ser considerado de difícil aplicabilidade no meio industrial devido à utilização de enormes quantidades de nitrogênio líquido e baixas pressões, fatores que elevam os custos de produção.

É conhecido o emprego de ultrassom de alta intensidade para acelerar a degradação de quitosana em meio ácido visando à produção de quitooligossacarídeos[38] e também para o tratamento prévio da quitina a ser desacetilada em solução aquosa de NaOH 40%, que resulta em maior eficiência da reação e permite a obtenção, com apenas uma etapa de reação, de quitosanas desacetiladas (GA<10%)[33]. Nesse último estudo também foi constatado que o tratamento prévio de quitina em suspensão aquosa com ultrassom de alta intensidade não parece afetar a cristalinidade do polissacarídeo, mas tem acentuado efeito sobre a morfologia da superfície do material particulado.

Estudos mais recentes[39-40] sobre o emprego direto de irradiação ultrassom de alta intensidade em suspensões de quitina em hidróxido de sódio 40% se mostraram muito atrativos, pois quitosanas de baixo grau de acetilação (GA ≈ 5%) e de elevada massa molar média viscosimétrica (Mv ≈ $7{,}0 \times 10^5$ g/mol) são obtidas em tempos mais curtos (30 minutos) e temperaturas mais brandas (60ºC) do que as empregadas nas reações de desacetilação de quitina já citadas. Tais resultados não têm equivalência na literatura e indicam o enorme potencial do processo de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade (Processo DAIUS)[41] e uma nova perspectiva para o processamento industrial de resíduos da atividade pesqueira visando à produção de quitosana. Neste trabalho são apresentados alguns resultados recentes da aplicação do Processo DAIUS, os efeitos da irradiação de ultrassom de alta intensidade sobre a morfologia das partículas de beta-quitina, a eficiência da reação de desacetilação do polissacarídeo e as características das quitosanas produzidas são discutidos. A comparação com alguns resultados da literatura recente é apresentada para destacar as principais potencialidades e vantagens do Processo DAIUS.

# Parte Experimental

## EXTRAÇÃO DE BETA-QUITINA

A beta-quitina foi extraída de gládios, também denominados penas ou plumas, de lulas de duas espécies: *Loligo plei.* e *Loligo sanpaulensis.*, cedidos pela Empresa Miami Pescados (Cananéia/SP). A remoção das proteínas presentes nos gládios foi realizada através do método descrito por Chaussard[38].

## PROCESSO DAIUS

A beta-quitina foi suspensa na solução de NaOH 40%, e a suspensão (0,044g/ml) foi transferida para reator cilíndrico de vidro, o qual foi disposto sobre agitador magnético no interior de caixa de isolamento acústico do

equipamento de ultrassom (BRANSON Sonifier modelo 450, ν=20kHz) (Figura 4). O sonotrodo (sonda de ½") foi imerso na suspensão, que foi mantida sob agitação magnética constante.

A amplitude da irradiação de ultrassom e a duração do tratamento foram variadas e a temperatura variou no intervalo 25-90°C, de acordo com os parâmetros acústicos, do início até o final do tratamento. A execução desses experimentos resultou nas amostras identificadas como NIAD, onde NI designa o processamento não-isotérmico da suspensão de quitina, A é a amplitude da irradiação do ultrassom de alta intensidade, ajustada como baixa=B (30%<Amax<50%), média=M (55%<Amax<70%) ou alta=A (75%<Amax<90%), sendo Amax a amplitude máxima disponível no equipamento de ultrassom, e D designa a duração do tratamento, ajustada como curta=C (10-30min), média=M (35-40min) e longa=L (50-60min). Em alguns experimentos, denominados como processamentos isotérmicos, a duração do tratamento foi de 30min, a amplitude de irradiação foi variável e a temperatura foi mantida constante (50, 60, 70 ou 80°C) e as quitosanas foram denominadas IACT, onde I designa o processamento isotérmico, A é a amplitude de irradiação, C é a duração do tratamento (curta) e T é a temperatura.

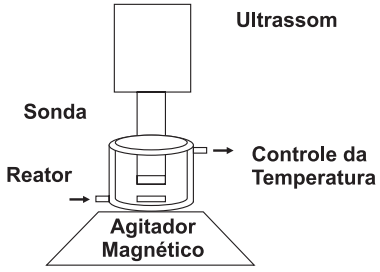



**Figura 4.** Esquema experimental empregado nas reações de desacetilação utilizando o ultrassom de alta intensidade.

# Caracterizações

As principais características das amostras de quitosanas geradas neste trabalho, o grau médio de acetilação (GA) e a massa molar média viscosimétrica (Mv), foram determinadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio RMN $^{1}H$ (ou titrimetria) e viscosimetria capilar, respectivamente. Na determinação de GA por espectroscopia RMN $^{1}H$ foi considerada a razão entre as áreas atribuídas aos núcleos de hidrogênio da metila do grupo acetamida (2 ppm) e do núcleo de hidrogênio na posição 2 do anel de glicosamino (3,2 ppm)[43].Os valores de massa molar média viscosimétrica foram obtidos através da viscosidade intrínseca das amostras, a qual foi obtida pela extrapolação da equação de Huggins[44]. Os arranjos no estado cristalino e a morfologia das amostras foram analisadas por difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura (MEV), respectivamente. Os modos de vibração característicos foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho. A cromatografia de exclusão por tamanho com multi-detecção foi utilizada na determinação da massa molar média ponderal (Mw) e do índice de polidispersividade (Ip).

# Resultados e Discussão

As alterações morfológicas provocadas pela irradiação de ultrassom de alta intensidade foram evidenciadas pelas análises de microscopia eletrônica de varredura (Figura 5), que mostram que as partículas de beta-quitina apresentam superfície relativamente lisa enquanto que as amostras obtidas pelo processo DAIUS são mais rugosas, apresentam dimensões médias mais reduzidas e maior área superficial.

As características morfológicas dos produtos DAIUS são atribuídas ao efeito da cavitação, decorrente da irradiação de ultrassom de alta intensidade, que resulta na diminuição de dimensões médias das partículas e aumenta a acessibilidade aos sítios reativos do polímero[33,39,40]. De fato, o tratamento das micrografias dos produtos DAIUS com o programa image J[45] mostra que as áreas médias das partículas se correlacionam diretamente com a amplitude e a duração da irradiação de ultrassom, sendo tanto menores quanto maior a amplitude da irradiação e a duração do tratamento da suspensão alcalina de beta-quitina[46]. Portanto, o efeito da cavitação favorece a fragmentação das partículas e é mais importante quanto maior a quantidade de energia fornecida durante o processamento ultrassônico.

A cavitação ocorre durante a propagação das ondas ultrassônicas em meios líquidos quando a energia fornecida provoca a ruptura das forças intermoleculares do líquido. Dessa maneira, bolhas cavitacionais são formadas, crescem até atingir um tamanho instável e colapsam violentamente[47]. De acordo com a teoria

conhecida como "Hot-Spot"[48,49], as bolhas cavitacionais colapsam em menos que $10^{-6}$s, gases e vapores nas cavidades são superaquecidos (≈ 5000ºC) e, ao mesmo tempo, submetidos a pressões elevadas (≈ 2000 atm), gerando jatos acelerados (400km/h) que provocam violentas colisões interpartículas.

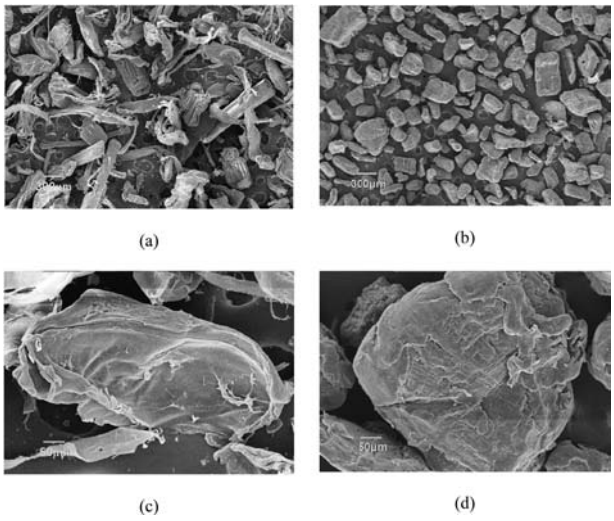



**Figura 5.** Microscopia eletrônica de varredura de beta-quitina (a, c) e do produto DAIUS (b, d) gerado por processamento não-isotérmico de curta duração com baixa amplitude de irradiação (NIMC).

Os produtos DAIUS, independentemente das condições empregadas em sua preparação, são polímeros solúveis em solução aquosa diluída de ácido acético e também possuem as características espectrais típicas de quitosanas. A comparação do espectro no infravermelho de beta-quitina (GA=81%) com aqueles dos produtos DAIUS identificados como NIBC (GA=25%), NIBM (GA=22%) e NIBL (GA=20,8%) na região em que ocorrem as bandas de amida I (1660 e 1630 $cm^{-1}$), amida II (1560 e 1550 $cm^{-1}$), amida III (1310 $cm^{-1}$) e de deformações angulares (1380 $cm^{-1}$) permite observar que a diminuição das intensidades dessas bandas ocorrem concomitantemente com o decréscimo de GA (Figura 6).

As análises por difração de raios X de beta-quitina e do produto DAIUS identificado como NIMC (Figura 7) também mostram que a reação de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade foi bem sucedida pois o difratograma de beta-quitina exibe dois picos intensos em 2θ≈8º e 2θ≈20º, referentes aos planos (010) e (020,110), respectivamente, enquanto o produto DAIUS exibe picos muito menos intensos e alargados, indicando a perda de cristalinidade. De fato, a diminuição na cristalinidade quando quitina é desacetilada gerando quitosana é relatada por diversos autores[6,17,32,43] e ocorre como conseqüência da hidrólise dos grupos acetamida das unidades GlcNAc, desfavorecendo o estabelecimento de ligações hidrogênio na quitosana quando comparada com a quitina de partida. Portanto, as análises por espectroscopia no infravermelho e difração de raios X confirmam que a aplicação do Processo DAIUS a suspensões de beta-quitina em solução aquosa de hidróxido de sódio produz quitosanas.

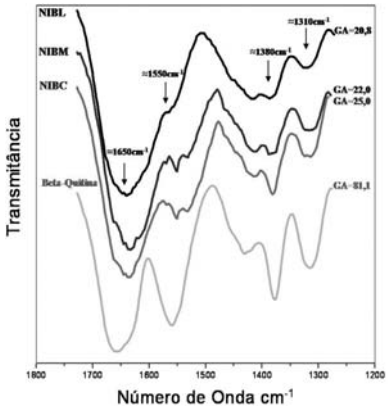



**Figura 6.** Espectros no infravermelho no intervalo 1800 – 1200 cm-1 de beta-quitina e das amostras NIBC, NIBM e NIBL geradas pela aplicação do Processo DAIUS não-isotérmico, baixa amplitude de irradiação e tratamentos de duração curta, média e longa, respectivamente.

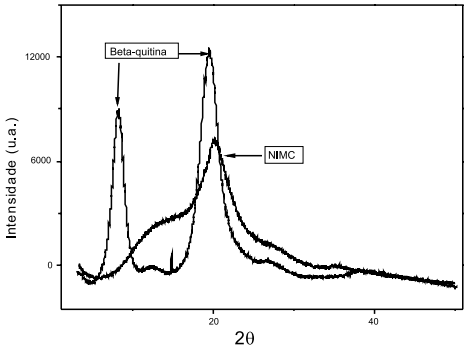



**Figura 7.** Difração de raios X de beta-quitina e da amostra NIMC, gerada pela aplicação do Processo DAIUS não-isotérmico, média amplitude de irradiação e tratamento de curta duração.

Também foi constatado que o rendimento do Processo DAIUS em termos da massa de quitosana produzida se insere no intervalo 70 – 85% e é pouco

afetado pelos parâmetros do processo (Figura 8). Entretanto, é observado que o aumento da amplitude e o prolongamento do tratamento resultam na diminuição do rendimento da reação, sendo a amplitude da irradiação o fator mais importante a afetar o rendimento do processo.

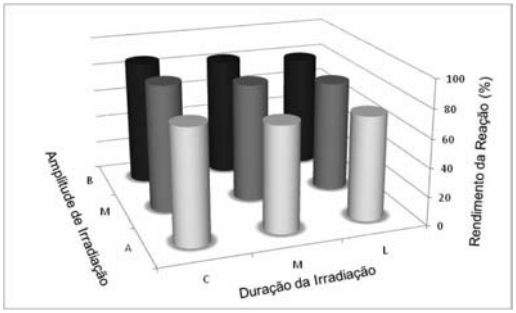



**Figura 8.** Variação do rendimento do Processo DAIUS em função da amplitude da irradiação de ultrassom de alta intensidade e da duração do tratamento.

O rendimento do Processo DAIUS foi determinado por diferença entre a massa inicial de beta-quitina e a massa recuperada após a reação, refletindo as perdas por manipulação, principalmente nas transferências e lavagens, e também aquelas associadas à formação de produtos de baixa massa molar. Nesse último caso se enquadram os íons acetato provenientes da hidrólise dos grupos acetamida das unidades GlcNAc de beta-quitina, que leva à formação de quitosana, e também os oligômeros formados via ruptura das ligações glicosídicas. Considerando que os procedimentos experimentais foram padronizados e cuidadosamente executados, é assumido que as perdas de massa por manipulação foram semelhantes em todas as reações. Por outro lado, foi constatado que a tendência de queda de rendimento do Processo DAIUS com o aumento da amplitude de irradiação e com o prolongamento do tratamento acompanha o decréscimo de grau médio de acetilação, que reflete a ocorrência de hidrólise dos grupos acetamida, e a diminuição de massa molar média viscosimétrica, que reflete a ocorrência de ruptura das ligações glicosídicas. De fato, a amplitude da irradiação e a duração do tratamento afetam ambas as características dos produtos do Processo DAIUS não-isotérmico e a maior eficiência da reação de desacetilação é acompanhada pela ocorrência de despolimerização[46]. Entretanto, os resultados da aplicação do Processo DAIUS isotérmico revelam que, apesar de ser executado em temperaturas mais baixas e por tempos mais curtos, este permite a produção de quitosanas mais desacetiladas e de massa molar mais elevada do que aquelas produzidas em outros processos descritos na literatura (Tabela 2).

**Tabela 2.** Características das quitosanas obtidas pela aplicação do Processo DAIUS isotérmico e por outros processos descrito na literatura.

| Características da quitosana produzida | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Processo** | **Ref.** | **Quitina** | **T(0C)** | **t(min)** | **GA (%)** | **Mvx10-5 g/mol** |
| Chang et al. | 50 | alfa | >130 | 120 | 30 | 2-4 |
| Tsaih et al. | 51 | alfa | 140 | 60 | 27 | 2 |
| Kurita et al. | 52 | beta | 60 | (2x)180 | 11 | n.i. |
| Tolomaite et al. | 53 | beta | 80 | (2x)180 | 3 | 5 |
| DAIUS | 41, 46 | beta | 50-60 | 20-60 | 14,1 | 7,1 |
| DAIUS | 41-46 | beta | 50-60 | 20-60 | 6,2 | 4,8 |
| DAIUS | 41-46 | beta | 60-70 | 20-60 | 7,2 | 6,6 |
| DAIUS | 41-46 | beta | 70-80 | 20-60 | 12,2 | 6,1 |

# Conclusões

A demanda por quitosana com características e propriedades uniformes para a inserção desse biopolímero nas linhas de produção das indústrias cosmética, alimentícia e farmacêutica, entre outras, não vem sendo suprida pelas empresas que processam os rejeitos da indústria pesqueira para produção de quitina e quitosana. Entretanto, conforme discutido neste trabalho, estudos recentes têm sugerido processos inovadores, dentre eles a desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade, Processo DAIUS, que podem suprir as citadas necessidades. Assim, de acordo com nossos estudos mais recentes, o Processo DAIUS possibilita a produção de quitosana com características estruturais, grau médio de acetilação e massa molar média, que são determinadas pela correta escolha dos parâmetros do processamento, *i.e.* a amplitude da irradiação, a duração e a temperatura do tratamento. Adicionalmente, também foi demonstrado que o Processo DAIUS é executado em temperaturas mais baixas e por tempos mais curtos do

que aqueles empregados nos processos convencionais de desacetilação de quitina visando à produção de quitosana, sugerindo um grande potencial para aplicação em escala industrial. A adequação do Processo DAIUS para aplicação à desacetilação de alfa-quitina extraída de cascas de camarões vem sendo desenvolvida em nossos laboratórios com resultados promissores.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro, à Miami Pescados (SP) pelo fornecimento dos gládios de lulas empregados na extração de beta-quitina e ao Prof. Dr. Wagner V. Cotroni (CAUNESP) pelo fornecimento de cascas de camarões *Macrobrachium rosenbergii*.

## Referências

1. Damour, A.; Gueugniard, P. Y.; Berthin-Maghit, M.; *Clincal Matter* **1994**, *15*, 273.
2. Wadstein, J.; Thom, E.; Heldman, S., Gudmunsson, S.; Lilja, B.; Em *Chitosan per os: from dietary supplement to drug carrier*, R. A. A. Muzzarelli ed., Atec., Grottamare: Italia, **2000**, p. 65.
3. Campana Filho, S. P.; Desbrières, J.; Chitin, chitosan and derivatives. Em: *Natural Polymers, Derivatives and Composites: Fundamentals, Properties and Recent Advances*; A. L. Leão; L. H. C. Mattoso & E. Frollini ed., **2000**, cap. 10, p.41.
4. Bough, W. A.; *J. Food Sci.* **1975**, *40*, 297.
5. Campana-Filho, S. P.; Britto D.; Curti E.; Abreu F. R.; Cardoso M. B.; Battisti M. V.; Sim P. C.; Goy R. C.; Signini R.; Lavall, R. L.; *Quím. Nova* **2007,** *30*(3), 644.
6. Abram, A. P.; Higuera, I.; Em *Quitina y quitosano: obtencion, caracterizacion y aplicaciones*, A. P. Abram ed., Programa Cyted 2004, - Pontificia Universidad Catolica del Peru/Fondo Editorial: Lima, **2004**.
7. Campana-Filho, S. P.; Signini, R.; Cardoso, M. B.; *Revista Processos Químicos* **2007**, *1*(2), 9.
8. Muzzarelli, R.A. A.; Chitin. Em *Encyclopedia of Polymers Science Engineering*, 2nd *ed.* Mark, H. F; Bikales, N.M.; Overberger, C.G.; Mendes, G.; eds., John Wiley: New York, **1985**, v.3, p.430.
9. Li, Q.; Dunn, E. T.; Grandmaison, M. F. A.; Goose, M.F.A.; *J. Bio.Comp. Polym.* **1992**, *7*, 370.
10. Onishi, H.; Nagal, T.; Machida, Y.; Em *Applications of Chitin and Chitosan*, Goosen, M. F. A. ed., Technomic: Lancaster, **1997**, p.205.
11. Synowiecki, J.; Al-Khateeb, N. A.; *Critical Rev. Food Sci. Nut.* **2003**, *43*(2), 145.
12. Khor, E.; Lim, L. Y. *Biomaterial* **2003,** *24*, 2339.
13. http://www.uspto.gov/patft/index.html. Acessado em nov. 2009.
14. http://www.fda.gov/Food/default.htm. Acessado em mar. 2010.
15. Khor, E.; *Curr. Op. Sol. St. Mat. Sci.* **2002**, *6*, 313.
16. http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html. Acessado em nov. 2009.
17. Roberts, G. A. F. Chitin Chemistry. Mc Millan Press: London, **1992**. p. 350.
18. The State of World Fisheries and Aquaculture. http://www.fao.org/fishery/sofia/en;, **2007**. Acessado em jul. 2007.
19. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Rentáveis (IBAMA). *Estatística da Pesca 2006. Brasil: Grandes Regiões e Unidades da Federação***.** Brasília, Ibama, **2008**, 174p.
20. Ávila-da –Silva, A.O.; Carneiro, M. H.; Mendonça, J. T.; Servo, G. J. M.; Bastos, G. C. C.; Batista, P. A.; *Produção Pesqueira Marinha do Estado de São Paulo no ano de 2005***.** Série de Relatórios Técnicos, São Paulo **2007**, *26*, 44p.
21. http://www.pesca.sp.gov.br/estatística. Acessado em mar. 2010.
22. Lavall, R. L.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, **2003**.
23. Kurita, K.; Kamiya, M.; Nishimura, S.; *Carbohydr. Polym.* **1991**, *16*, 83.
24. Guibal, E. ; *Sep. Purif.Technol***. 2004**, *38*, 43.
25. Wang, X.; Du, Y.; Fan, L.; Liu, H.; Hu, Y. ; *Polym. Bull.* **2005**, *55*, 105.
26. Wang, L.Y.; Gu, Y-H ; Su, Z-G ; Ma, G-H. ; *Int. J. Pharm.* **2006**, *311*(1-2), 187.
27. Lavall, R. L.; Assis, B. G. O.; Campana-Filho, S. P.; *Biores. Technol.* **2007**, *98*, 2465.
28. Chen, C.; Wang, F.; Ou, Z.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *93*, 2416.
29. - Campana-Filho, S. P.; Signini, R.; *Polímeros* **2001**, *11*, 169.
30. Sannan, T.; Kurita, K.; Iwakura, Y.; *Die Makromolekulare Chemie* **1975**, *176*, 3589.
31. Rogovina, S. Z.; Akopova, T. A.; Vikhoreva, G. A.; *J. Appl. Polym. Sci.* **1998**, *70*, 927.
32. Focher, B.; Beltrame, P. L.; Naggi, A.; Torri, G.; *Carbohydr. Polym.* **1990**, *12*, 405.
33. Cardoso, M. B.; Signini, R.; Campana-Filho, S. P.; *Polym. Bull.* **2001**, *47*, 183.
34. Goycoolea, F. M.; Higuera-Ciapara, I.; Hernandes, G.; Lizardi, J.; Garcia, K. D.; Em *Advances in Chitin Science*, A. Domard, G. A. F. Roberts, K. M. Vårum eds.; Jacques André Publisher, Lyon, France, **1997**.
35. Campana-Filho, S. P.; Signini, R.; *Int. J. Polym. Mater.* **2002**, *51*, 701.

36. Roberts, G. A.; Wood, F. A.; Em *Advances in Chitin Science*, M. G. Peter, A. Domard e R. A. A. Muzzarelli eds.; Potsdam : Universitat Potsdam, **2000**, *4*, 34.

37. Lamarque, G.; Cretenet, M.; Viton, C.; Domard, A.; *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1380.

38. Popa-Nita, S.; Lucas, J-M.; Ladavière, C.; David, L.; Domard, A.; *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1203.

39. Cardoso, M. B.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, **2008**.

40. Delezuk, J. A. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, **2009**.

41. Universidade de São Paulo. Campana-Filho, S. P.; Delezuk, J. A. M.; Cardoso, M. B.; Domard, A. *P. I. 0.901.825-5*, **2009**.

42. Chaussard, G.; Domard, A. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 559.

43. Campana-Filho, S. P.; Cavalheiro, É. T. G.; Santos, J. E.; Soares, J. P.; Dockal, E. R.; *Polímeros* **2003**, *3*(4), 242.

44. Signini, R.; Desbrières, J.; Campana-Filho, S. P.; *Carbohydr. Polym.* **2000**, *43*, 351.

45. http://rsbweb.nih.gov/ij. Acessado em mar. 2010.

46. Campana-Filho, S. P.; Domard, A.; Delezuk, J. A. M.; Cardoso, M. B.; Em: 9th International Conference of the European Chitin Society, Veneza, EUCHIS 2009. ACME, **2009**, 1.

47. Mason, T. J.; *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 443.

48. Suslick, K. S., Hammerton, D.A. e Cline Junior, R. E.; *J. Amer. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5641.

49. Peters, D.; *J. Mater.Chem.* **1996**, *6*(10), 1605.

50. Chang, K.L.B.; Tsai, G.; Lee, J.; Fu, W-R.; *Carbohydr. Res.* **1977**, *303*, 327.

51. Tsai, M.L.; Cheb, R.H.; *Polym. Sci*, **2003** 88 ,2917.

52. Kurita, K.; Tomita, K.; Tada, T.; Ishii, S.; *J. Appl. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.* **1993**, *31*, 485.

53. Tolomaite, A.; Desbrières, J.; Rhazi, M.; Alagui, A.; Vincendon, M.; Vottero, P.; *Polymer* **2000**, *41*, 2463.

Sérgio P. Campana-Filho[1]*, Jorge A. M. Delezuk[1] & Márcia B. Cardoso[1].

[1]Instituto de Química de São Carlos, USP. Av. Trabalhador Sãocarlense, 400, Caixa Postal 780, CEP 13560-970, São Carlos, SP.

*e-mail: scampana@iqsc.usp.br

# Aplicações Tecnológicas da Metodologia Cristalográfica

William B. Fernandes, Hamilton B. Napolitano, Caridad Noda-Perez, Felipe T. Martins & Carlito Lariucci

Com o intuito de se conhecer a estrutura molecular e cristalina dos compostos químicos para posteriores análises físico-químicas e estudos de aplicação, lança-se mão da cristalografia como metodologia científica, que permite conhecer a estrutura de qualquer composto químico cristalino sem nenhuma informação a priori. Esta metodologia está baseada em conceitos como difração de raios X por materiais cristalinos, simetria, lei de Bragg e transformada de Fourier. O presente trabalho tem como finalidade apresentar as principais etapas do trabalho cristalográfico, desde a coleta de dados em monocristais, solução e refinamento da estrutura até as etapas de análise e validação do modelo cristalográfico obtido e posterior depósito no banco de dados apropriados.

**Palavras-chave:** *estrutura molecular, difração de raios X, interações intermoleculares.*

In order to know the molecular and crystalline structure of chemical compounds for further physical-chemical analysis and application studies, launches hand of crystallography as a scientific methodology that allows knowing the structure of any crystalline chemical compound without any *a priori* information. This methodology is based on concepts such as X-ray diffraction by crystalline materials, symmetry, Bragg's law and Fourier transform. This work aims to present the main steps of crystallographic methodology, since the data collection from a single crystal, solution and refinement of structures until the steps of analysis and validation of crystallographic model, and deposit in appropriate crystallographic database.

**Keywords:** . *molecular structure, X-ray diffraction, intermolecular interactions.*

# Introdução

O conhecimento do arranjo dos átomos em uma molécula (estrutura molecular) e da posição relativa de todas as moléculas em um cristal (estrutura cristalina) para substâncias obtidas tanto sinteticamente como isolados de fontes naturais, é extremamente útil para o entendimento das propriedades químicas, físico-químicas e biológicas dos compostos para os mais variados ramos da ciência[1,2]. Na Física e na Ciência dos Materiais, é fundamental a relação entre propriedades físicas e a estrutura interna dos sólidos; em Química as características estéricas de novos compostos ou complexos só podem, em muitos casos, serem conhecidas através da determinação de sua estrutura; em Biologia e Bioquímica a atividade funcional de uma biomolécula está intimamente relacionada com sua estrutura tridimensional; em Medicina e Farmacologia a ação de certos fármacos envolve interações entre fármaco-receptor e a maneira como isto acontece é determinada pela estrutura de ambos componentes[1,3,4].

Com o interesse em conhecer a matéria a nível atômico, torna se necessário o desenvolvimento de ferramentas que possibilitem a obtenção de informações a este nível de resolução. Entretanto, poucas são as metodologias rotineiramente disponíveis quando se faz necessário saber a distribuição espacial relativa dos átomos constituintes de uma dada molécula. Estas metodologias incluem: Difração de Raios X (DRX) por Monocristais, Difrações de Nêutrons, Ressonância Magnética Nuclear, Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo (SAXS), Microscopia Eletrônica, Modelagem Teórica e outros. Dentre estas, o método cristalográfico apresenta-se como o mais adequado devido à alta resolução com que se pode descrever a densidade eletrônica[2,5]. Este método está baseado no fenômeno da difração, e fornece o conhecimento da disposição tridimensional dos átomos na estrutura molecular para compostos no estado cristalino quando expostos a radiação X, não necessitando de nenhum conhecimento a respeito do composto *a priori*[3,4].

Os dados obtidos através de experimentos de difração de raios X consistem apenas nas intensidades e as posições dos feixes difratados, a partir dos quais se pode obter a amplitude dos fatores de estrutura |F(h)|. Toda informação explícita das fases dos fatores de estrutura, $\varphi(\mathbf{h})$, é perdida durante o experimento, o que impossibilita a determinação analítica da estrutura a partir das intensidades medidas. As posições atômicas são determinadas pelos valores máximos da função de densidade eletrônica $\rho(\mathbf{r})$ (Eq. (1))[3,6], onde $V$ é o volume da cela unitária e F(**h**) é o fator de estrutura na forma complexa, sendo seu módulo |F(**h**)| proporcional à intensidade da reflexão medida para direção *hkl*. A quantidade **h.r** corresponde ao produto escalar entre o vetor espalhamento no espaço recíproco **h** e o vetor posição no espaço direto **r**.

$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{V}\sum_{\mathbf{h}} F(\mathbf{h})\exp[-2\pi i(\mathbf{h}.\mathbf{r})] = \frac{1}{V}\sum_{\mathbf{h}} |F(\mathbf{h})|\exp[-2\pi i(\mathbf{h}.\mathbf{r}) + i\varphi(\mathbf{h})] \qquad (1)$$

Para que essa função seja conhecida, torna-se necessário o conhecimento dos fatores de estrutura *F(***h***)* (amplitude e fase) de cada reflexão coletada. Nesse sentido, o trabalho de caracterização estrutural da amostra cristalina é a construção da densidade eletrônica a partir das amplitudes e fases dos fatores de estrutura. Uma vez que estas informações são obtidas, e as posições dos átomos precisamente conhecidas, são calculadas as distâncias interatômicas, os ângulos de ligação, ângulos conformacionais, e as características moleculares de interesse, como por exemplo, a planaridade, estabilidade de um grupo particular de átomos e informações estéreo-químicas e estruturais desejadas[7,8]. São calculadas ainda as interações intermoleculares envolvidas no empacotamento molecular do cristal, sendo este, um ramo da ciência conhecido como Química Supramolecular[9]. Frequentemente surgem problemas durante o refinamento de uma estrutura, tais como coleta de cristais geminados (*twinning*) e problemas de desordem cristalográfica, e alguns procedimentos e avaliações no sentido de modelar e resolver estes problemas necessitam ser executados[10]. Desta forma, o trabalho de elucidação estrutural por cristalografia de raios X em monocristais, é um trabalho interativo e multidisciplinar, e envolve as seguintes etapas: coleta, processamento e redução dos dados; solução e refinamento da estrutura; validação e análise do modelo cristalográfico; depósito no banco de dados apropriados[2,3].

# A Difração de Raios X por Cristais

A difração pode ser definida como o fenômeno de

perturbação do deslocamento de uma onda devido à interação com um obstáculo. Mais especificamente, a DRX pode ser entendida como a alteração da direção de propagação, amplitude e fase da radiação eletromagnética cujo comprimento de onda (λ) varia entre 0,1 Å e 100 Å como consequência da interação com centros espalhadores eletrônicos periodicamente arranjados em um cristal. Para que haja DRX por um cristal, raios X espalhados devem estar em fase para interferirem construtivamente e terem suas amplitudes resultantes regidas pelo princípio de superposição de ondas. Para estarem em fase, a diferença de percurso entre os feixes difratados por centros espalhadores deve equivaler a um número inteiro *n* de comprimentos de onda ($n\lambda$). O termo *n* representa a ordem de difração, o qual deve ser obrigatoriamente um número inteiro. A construção geométrica que relaciona esta observação com o ângulo de difração θ e a distância *d* entre os centros espalhadores periodicamente arranjados é conhecida como Lei de Bragg e é dada por:

$$2\,d\,\mathrm{sen}\theta = n\lambda. \qquad (2)$$

Uma vez satisfeita esta condição, o que necessariamente implica que os centros espalhadores e a radiação espalhada possuem grandezas espaciais de magnitude similar, ondas refletidas a partir de centros espalhadores periodicamente ordenados estarão todas em fase e resultarão em feixes difratados. A função matemática que descreverá tais feixes difratados dependerá da natureza e estrutura dos centros espalhadores. Portanto, quando difratados, raios X informam quais e como os átomos espalhadores estão periodicamente arranjados no espaço, o que permite a determinação da estrutura intramolecular e intermolecular, e também as dimensões da cela unitária cristalográfica.

Quando há uma relação de fase definida entre o vetor do campo elétrico incidente $E_{in}$ de uma radiação eletromagnética e a aceleração causada em um elétron devido à interação com esta radiação, qualquer elétron de carga *e* e massa *m* é acelerado com uma aceleração *a*:

$$a = \frac{e}{m} E_{\mathrm{in}}. \qquad (3)$$

Por sua vez, o elétron acelerado atuará como uma fonte emissora de radiação sob desaceleração. Este é o princípio do espalhamento Thomson, em que uma onda interage com uma partícula e é espalhada com a mesma frequência e comprimento de onda da radiação incidente. O espalhamento Thomson é referenciado também como espalhamento coerente e é aquele observado no fenômeno de DRX por cristais, embora o espalhamento Compton incoerente também ocorra como parte da radiação espalhada de fundo. Entretanto, o espalhamento Compton, caracterizado pela colisão entre duas partículas (fóton e elétron) com alteração na frequência e comprimento de onda da radiação espalhada, não resulta no padrão discreto de DRX, pois não há uma relação de fase bem definida neste evento de interação partícula-partícula.

A radiação espalhada será caracterizada por um vetor de campo elétrico $E_{esp}$ que poderá se orientar em qualquer direção no plano normal à direção de propagação da radiação eletromagnética. Esta aleatoriedade da direção de $E_{esp}$ se deve ao fato do feixe incidente também não ser polarizado. Considerando que a polarização parcial *p* de $E_{esp}$ é uma função do ângulo de difração θ, $\varepsilon_0$ é uma constante eletromagnética fundamental da ordem de $8{,}854.10^{-12}$ F $m^{-1}$, *c* é a velocidade de propagação da radiação eletromagnética e *r* é a distância entre o elétron e o ponto de detecção da radiação espalhada, $E_{esp}$ será dado por:

$$E_{\mathrm{esp}} = \frac{e^2}{4\pi\varepsilon_0 rmc^2} \frac{[1+\cos^2(2\theta)]}{2} E_{\mathrm{in}}. \qquad (4)$$

Se definirmos a habilidade de um elétron em espalhar a radiação eletromagnética como o fator de espalhamento eletrônico $f_e$:

$$f_e = \frac{e^2}{4\pi\varepsilon_0 rmc^2}, \qquad (5)$$

temos uma nova expressão para a amplitude da radiação espalhada $E_{esp}$:

$$E_{\mathrm{esp}} = f_e \frac{[1+\cos^2(2\theta)]}{2} E_{\mathrm{in}}. \qquad (6)$$

Correções devidas à polarização parcial do vetor de campo elétrico da radiação espalhada devem ser realizadas, principalmente quando cristais monocromadores são utilizados para seleção de determinado comprimento

de onda dos raios X. A polarização parcial induzida pelo cristal monocromador afetará o espalhamento subsequente pelo cristal em estudo, comprometendo a magnitude da radiação espalhada. Neste caso, o termo referente à polarização *p* deve ser reescrito como:

$$p = \frac{[1 + K\cos^2(2\theta)]}{1 + K}, \quad (7)$$

onde *K* é razão entre os feixes paralelo e normal à superfície do plano espalhador da radiação na fonte monocromática. Estes dois feixes são derivados da decomposição do vetor de campo elétrico em dois componentes, um paralelo à superfície do plano espalhador, dependente apenas da densidade eletrônica no plano (feixe π ou $I_{\parallel}$), e outro perpendicular a esta superfície (feixe σ ou $I_{\perp}$), o qual depende tanto da densidade eletrônica no plano quanto do ângulo de difração θ. Este último componente é responsável pelo decréscimo da radiação espalhada devido ao fator de polarização. Sua completa anulação e, consequentemente, a anulação de metade da radiação espalhada decomposta nos dois componentes $I_{\parallel}$ e $I_{\perp}$ de mesma magnitude ocorre quando 2θ = 90°. Considerando o ângulo de difração $\theta_m$ do cristal monocromador, uma aproximação muito utilizada para o valor de *K* é:

$$K = \cos(2\theta_m). \quad (8)$$

Uma vez aplicada correção devida à polarização parcial da radiação espalhada, podemos expressar a radiação espalhada $E_{esp}$ por um elétron como:

$$E_{esp} = f_e \; E_{in}. \quad (9)$$

Para uma distribuição discreta de *n* elétrons, a radiação espalhada $E_{esp}$ total relativa à radiação incidente $E_{in}$ será dada por:

$$\frac{E_{esp}}{E_{in}} = \sum_n f_e \; e^{i\phi n}, \quad (10)$$

onde o termo exponencial se refere à relação de fase definida como o número ou frações de comprimentos de onda que separam os elétrons discretamente distribuídos no espaço.

Enquanto a habilidade de um elétron em espalhar a radiação eletromagnética é definida como $f_e$, a habilidade de uma distribuição eletrônica contínua, como aquela de átomos reais, em espalhar a radiação eletromagnética pode ser entendida como:

$$f_e \rho(\mathbf{r})\, d(\mathbf{r}), \quad (11)$$

onde o produto $\rho(\mathbf{r})\, d(\mathbf{r})$ é o número médio de elétrons confinados no elemento de volume $d(\mathbf{r})$. Portanto, $\rho(\mathbf{r})$ pode ser referenciada como a função de densidade eletrônica de uma distribuição eletrônica.

Agora, reescrevendo a equação da radiação espalhada $E_{esp}$ total relativa à radiação incidente $E_{in}$ para uma distribuição contínua de elétrons em que a habilidade de um centro espalhador em espalhar a radiação será dada pela equação anterior, e expressando a fase relativa no termo exponencial em função do vetor de espalhamento $\Delta\mathbf{k}$ e do centro espalhador $\mathbf{r}$ como $e^{i\phi n} = e^{i\Delta\mathbf{k}\,\mathbf{r}}$, temos:

$$\frac{E_{esp(\Delta\mathbf{k})}}{E_{in}} = \int_{\mathbf{r}} f_e \; \rho(\mathbf{r})\, e^{i\Delta\mathbf{k}\,\mathbf{r}}\, d(\mathbf{r}). \quad (12)$$

Agora, a radiação espalhada é função do vetor de espalhamento $\Delta\mathbf{k}$, cuja direção de espalhamento é dada pelos índices *hkl*. Uma vez que a integração não é sobre a variável *r* embutida em $f_e$, nós podemos extrair este termo da integral. Em adição, a expressão

$$\frac{E_{esp(\Delta\mathbf{k})}}{E_{in} f_e}, \quad (13)$$

representa a habilidade relativa dos centros espalhadores de uma cela unitária em espalhar radiação eletromagnética quando comparada com a habilidade de um único elétron. Esta expressão especifica a amplitude da difração em uma dada direção de espalhamento indexada por *hkl*. Então, podemos definir a expressão anterior como o fator de estrutura $F_{hkl}$ de um máximo de difração correspondente ao ponto da rede recíproca definido pelos integradores *hkl*.

Através da substituição da representação vetorial $\mathbf{r}$ dos centros espalhadores no termo exponencial por coordenadas fracionárias *xyz* e vetores cristalográficos *abc*, representando o ponto $\mathbf{r}$ como:

$$x\,\mathrm{a} + y\,\mathrm{b} + z\,\mathrm{c}, \quad (14)$$

e o volume $d\mathbf{r}$ em função do volume *V* da cela unitária como:

$$V\,dx\,dy\,dz, \qquad (14)$$

e, por fim, assumindo a proporcionalidade entre o vetor de espalhamento $\Delta\mathbf{k}$ e o vetor de rede recíproca $G_{hkl}$ como sendo:

$$\Delta\mathbf{k} = 2\,p\,G_{hkl}, \qquad (15)$$

onde $G_{hkl}$ pode ser definido em termos de vetores cristalográficos da rede recíproca a* b* c* como:

$$G_{hkl} = d_{hkl}^{-1} = h\,a^* + k\,b^* + l\,c^*, \qquad (16)$$

temos o fator de estrutura $F_{hkl}$ como:

$$F_{hkl} = V \int_{x=0}^{x=1} \int_{y=0}^{y=1} \int_{z=0}^{z=1} \rho(x\,y\,z)\, e^{2\pi i\,(hx + ky + lz)}\, dx\;\; dy\;\; dz. \qquad (17)$$

A integração sobre a função de densidade eletrônica através das coordenadas da cela unitária deve ser realizada sobre todo o conteúdo da mesma, o que justifica os limites da integração indo de zero a um. Desta forma, a função de densidade eletrônica, outrora representada na forma vetorial por $\rho(\mathbf{r})$, é também expressa agora como função das coordenadas fracionárias *xyz*.

Fatores de estrutura $F_{hkl}$ podem ser expressos em função de fatores de espalhamento atômico. Considerando que um elétron isolado espalha raios X com uma determinada intensidade definida pelo fator de espalhamento Thomson, um átomo contendo Z elétrons espalharia raios X com intensidade igual ao produto entre Z e a intensidade de um único elétron isolado, conforme descrito anteriormente. Entretanto, devido às distâncias entre os átomos serem da ordem de grandeza do comprimento de onda dos raios X, as ondas que os elétrons espalham interferem umas com as outras, de forma que só haverá uma dada intensidade correspondendo a todos os elétrons de um átomo na direção de incidência dos raios X. Para o espalhamento em outras direções observa-se interferência parcialmente destrutiva devido ao distanciamento entre os elétrons de um átomo culminar em diferenças de percurso da radiação espalhada. Assim, a amplitude total do feixe espalhado por um átomo, a qual recebe contribuições de todos os seus elétrons, ou seja, é proporcional ao número atômico e dependente dos espaçamentos intereletrônicos, decresce com o aumento do ângulo de espalhamento. Esta habilidade de um átomo em espalhar os raios X é definida como o fator de espalhamento atômico $f_j$ e constitui a amplitude espalhada pela distribuição de elétrons de um átomo normalizada em relação à amplitude espalhada por um elétron isolado, sob condições idênticas. Fatores de espalhamento atômico podem assumir como valor máximo Z (número atômico do átomo) na ocasião dos elétrons espalharem a radiação em fase, na direção de incidência do feixe de raios X ($2\theta = 0$). Para os feixes espalhados na direção da incidência, os raios X estarão em fase e a amplitude resultante deriva do principio de sobreposição de ondas. Quando o ângulo de difração é diferente de zero, as trajetórias dos raios espalhados são diferentes e a diferença de fase resulta em interferência. Considerando uma molécula, a onda total espalhada por todos os átomos é dada pela soma vetorial das contribuições individuais de cada átomo.

Em prática, o fator de espalhamento atômico significa a tendência de um átomo para espalhar a radiação X, a um dado ângulo e certo $\lambda$. Assim, valores tabelados são encontrados para razões de $\mathrm{sen}\theta/\lambda$, expressos como o quociente entre a amplitude da onda espalhada por um átomo sobre a amplitude da onda espalhada por um elétron. De maneira similar ao fator de espalhamento atômico, o fator de estrutura é um quociente de duas amplitudes: a amplitude da onda espalhada por todos os átomos da cela unitária e a amplitude da onda espalhada por um elétron isolado, onde a magnitude deste fator depende unicamente da posição relativa de todos os átomos na cela unitária e de seus respectivos fatores de espalhamento. Então, é conveniente expressar os fatores de estrutura $F_{hkl}$ em função dos valores de $f_j$ de cada átomo, o qual embute a função de densidade eletrônica do átomo em um certo volume determinado pelo seu raio atômico. Então, a equação anterior é reescrita como:

$$F_{hkl} = \sum_j f_j\, e^{2\pi i\,(hx_j + ky_j + lz_j)}, \qquad (18)$$

onde o somatório deve ser efetuado sobre todos os átomos da cela unitária. Uma vez que os átomos da cela unitária podem estar relacionados por elementos de simetria do grupo espacial, a equação anterior pode ser simplificada. Os fatores de espalhamento atômico devem também ser

corrigidos em função da temperatura. Em um modelo isotrópico de deslocamento, em que as vibrações térmicas são esfericamente simétricas em todas as direções, o fator de temperatura $T_{j,\theta}$ de um átomo para qualquer conjunto de planos de rede (*hkl*) dependerá do espaçamento interplanar e da magnitude de vibração perpendicular aos planos. Então, o fator de espalhamento atômico corrigido $(f_j)_T$ em função da temperatura será dado por:

$$(f_j)_T = f_j\, T_{j,\theta}, \tag{19}$$

onde $T_{j,\theta}$ é dado por:

$$T_{j,\theta} = e^{-B_j\,(sen^2\theta\,/\,\lambda^2)}, \tag{20}$$

e $B_j$ assume a grandeza:

$$8\,p^2 \langle u^2 \rangle, \tag{21}$$

onde $\langle u^2 \rangle$ representa o deslocamento quadrático médio do átomo *j*.

Em cristais moleculares, os átomos estão ligados covalentemente uns aos outros e, portanto, forças atrativas e repulsivas sobre ligações químicas distorcem a distribuição da densidade eletrônica de tal forma que um modelo isotrópico de deslocamento atômico deve ser aperfeiçoado para um modelo anisotrópico de vibração térmica. Neste modelo, os átomos têm diferentes liberdades de deslocamento em três direções ortogonais (mutuamente perpendiculares). Então, neste modelo mais realístico de deslocamento térmico, um único parâmetro térmico isotrópico $B_j$ é substituído por seis parâmetros térmicos anisotrópicos $U_{ij}$, três deles definindo a forma da representação elipsoidal do átomo *j* e três especificando sua orientação. Neste caso, a expressão para o fator de temperatura anisotrópico $T_{j,\theta}$ será dada por:

$$T_{j,\theta} = e^{[-2\pi^2(U_{11}h^2a^{*2} + U_{22}k^2b^{*2} + U_{33}l^2c^{*2} + 2U_{12}h\,ka^*b^* + 2U_{13}hl\,a^*c^* + 2U_{23}kl\,b^*c^*)]}, \tag{22}$$

A função de densidade eletrônica ρ(*xyz*) varia periodicamente de uma cela unitária a outra através do cristal, como consequência do ordenamento periódico dos átomos no estado cristalino. Devido a esta periodicidade, ρ(*xyz*) pode ser descrita por uma série de Fourier tridimensional. Portanto, o padrão de DRX é a transformada de Fourier ***T*** da função de densidade eletrônica. Pelo teorema de Fourier, a função de densidade eletrônica será a transformada inversa $\boldsymbol{T^{-1}}$ do padrão de DRX, como exemplificado abaixo:

$$F_{hkl} = T\rho(x\,y\,z), \tag{23}$$

$$\rho(x\,y\,z) = T^{-1}F_{hkl}. \tag{24}$$

A partir do padrão de DRX, composto pela amplitude e fase intrínseca dos fatores de estrutura $F_{hkl}$ difratados em direções de espalhamento discretas e definidas, a função de densidade eletrônica pode ser então calculada para cada ponto da cela unitária através de suas coordenadas fracionárias por meio da síntese de Fourier dada pela relação:

$$\rho(x\,y\,z) = V^{-1}\sum_{h=-\infty}^{h=+\infty}\sum_{k=-\infty}^{k=+\infty}\sum_{l=-\infty}^{l=+\infty} F_{hkl}\, e^{-2\pi i(hx + ky + lz)}. \tag{25}$$

Como mencionado anteriormente, o padrão de DRX é discreto e não contínuo, sendo caracterizado por fatores de estrutura $F_{hkl}$ em posições indexadas. Por esta razão, a integral tripla se degenera dentro de somatórios na equação anterior sobre todos os valores possíveis de índices dos vetores de espalhamento. A intensidade da radiação espalhada é uma função inversamente proporcional ao ângulo de difração θ, sendo que, para um dado comprimento de onda λ da radiação incidente, somente os pontos da rede recíproca caracterizados pelo vetor de rede recíproca $G_{hkl}$ cujas magnitudes satisfazem a relação:

$$G_{hkl} \leq 2\,\lambda^{-1}, \tag{26}$$

poderão ser detectados em um experimento de DRX. O termo $2\,\lambda^{-1}$ é o raio da esfera limite, a qual representa uma construção geométrica originada da rotação do cristal sobre a esfera de Ewald. Este valor é equivalente ao diâmetro da esfera de reflexões ou esfera de Ewald, construção geométrica que estabelece uma esfera de raio $\lambda^{-1}$ cujos pontos de rede recíproca devem atravessá-la para satisfazerem a Lei de Bragg e, portanto, ser observado o fenômeno da DRX. A esfera limite restringe o conjunto de pontos da rede recíproca que podem atravessar a esfera

de Ewald. Portanto, todo conjunto de dados de DRX será sempre finito, e a equação da síntese de Fourier pode ser escrita para os valores limites dos índices *hkl* como:

$$\rho(x\ y\ z) = V^{-1} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl}\, e^{-2\pi i(hx + ky + lz)}. \qquad (27)$$

Experimentalmente, quando um monocristal de um dado composto é irradiado com raios X, tipicamente com um l dentro da faixa compreendida entre 0,7 Å a 2,0 Å, ele se comporta como uma rede de difração tridimensional e produz um padrão de difração constituído de um arranjo tridimensional de intensidades difratadas. As intensidades destas reflexões estão intimamente relacionadas à densidade eletrônica dos átomos espalhadores, uma vez que o padrão de difração é a transformada de Fourier da densidade eletrônica da estrutura e, inversamente, a densidade eletrônica da estrutura é a transformada de Fourier do padrão de difração. Isto pode ser evidenciado através da relação anterior. Desta forma, através das intensidades e direções das reflexões difratadas é possível determinar a densidade eletrônica da estrutura.

Uma vez conhecidos os fatores de estrutura $F_{hkl}$, a densidade eletrônica ρ(*xyz*) pode ser calculada para cada ponto *xyz* na cela unitária, viabilizando a construção de mapas de densidade eletrônica de uma molécula em um cristal por um procedimento de cálculo conhecido como síntese de Fourier. Quando um mapa de densidade eletrônica com resolução em torno de 1,0 Å ao longo dos eixos cristalográficos é calculado, os picos de densidade eletrônica podem ser atribuídos aos centros espalhadores atômicos e, consequentemente, às suas posições. Todavia, o cálculo desses mapas envolve a obtenção das fases intrínsecas $\alpha_{hkl}$ dos fatores de estrutura, uma vez que:

$$F_{hkl} = |F_{hkl}|\, e^{i\alpha_{hkl}}. \qquad (28)$$

## COLETA, PROCESSAMENTO E REDUÇÃO DOS DADOS

A coleta de dados é o procedimento de medida das intensidades das ondas difratadas. Depois de um número convencional de reflexões, um computador acoplado ao difratômetro calcula os parâmetros da melhor cela unitária e da matriz de orientação, baseada em reflexões centradas e indexadas, seguindo a estratégia que dá um conjunto de dados completos e uma multiplicidade observada (*MoO*) alta que é melhor conseguido com a tecnologia do detector bidimensional tipo *Charge Coupled Device* CCD[8,10]. A partir da matriz orientação, um programa de coleta de dados é iniciado de forma automática, sendo obtido um conjunto de imagens, em geral pelo método de rotação do cristal que, depois de integradas e processadas, levam a um conjunto de reflexões que fornecem tanto a direção *hkl* quanto a intensidade de cada feixe difratado[8]. A partir do padrão de distribuição das intensidades obtidas, é possível se determinar os parâmetros de rede e a métrica que possibilitará a obtenção dos dados de simetria.

O próximo passo é a redução dos dados, uma vez que as intensidades das reflexões que foram medidas por difração de raios X, estão afetadas por uma série de fatores que dependem do arranjo experimental utilizado. São obtidos, então, os módulos dos fatores de estrutura, $|F(\mathbf{h})|$, a partir das intensidades observadas experimentalmente, corrigidas pelos diversos fatores que os afetam que é executado por programas que aplicam várias correções como Lorentz, polarização, absorção, extinção primária e secundária, e determina os valores de "incerteza padrão" (σ) para cada reflexão[8,10].

Assim,os dados obtidos em um experimento de DRX são as intensidades espalhadas $I_{hkl}$ em direções definidas, as quais podem ser relacionadas apenas à amplitude dos fatores de estrutura e, portanto, aos seu módulos, através da relação:

$$I_{hkl} = \frac{I_{in}}{\omega} K\, L_{hkl}\, p_{hkl}\, A_{hkl}\, e'_{hkl} \left|(F_{hkl})_T\right|^2 V_{\text{crist}}, \qquad (29)$$

em que $I_{in}$ é a intensidade do feixe incidente de raios X, ω é a velocidade angular de rotação do cristal, *K* é o fator de escala que converte os módulos dos fatores de estrutura em valores relativos para grandezas absolutas (definimos o fator de estrutura $F_{hkl}$ de um máximo de difração pela equação

$$\frac{E_{\text{esp}(hkl)}}{E_{\text{in}} f_e}, \qquad (30)$$

a qual nos permite concluir que tais fatores de estrutura $F_{hkl}$ são grandezas relativas, normalizadas em relação ao produto $E_{\text{in}}\, f_e$, então, para levar $F_{hkl}$ para um valor absoluto devemos multiplicá-lo tanto por $E_{\text{in}}$ ($I_{in} = E_{\text{in}}^2$)

quanto por $f_e$, termo este embutido no fator de escala $K$ ($K = f_e^2 N^2$, onde $N$ é o número total de celas unitárias contidas dentro do volume $V_{crist}$ do cristal)), $L_{hkl}$ é o fator de Lorentz que corrige as diferentes oportunidades temporais e geométricas que diferentes pontos da rede recíproca têm para difratar em função da intersecção com a esfera de Ewald ($L_{hkl}$ = 1/sen 2θ), $p_{hkl}$ é o fator de polarização discutido anteriormente, $A_{hkl}$ é o termo que corrige o efeito da absorção dos raios X e assume a forma de $e^{-\mu x}$, onde μ é o coeficiente de absorção linear do cristal e $x$ é trajetória total cursada pelos feixes incidente e espalhado, $e'_{hkl}$ corrige os efeitos de extinção primária (reflexões múltiplas por planos de Bragg fortemente espalhadores dos raios X) e secundária (decréscimo da radiação incidente dentro do interior do cristal devido à difração por planos mais externos) e é função do número de planos perfeitamente paralelos dentro do cristal, entre outras variáveis. Por fim, o quadrado do módulo presente na equação que corrige as intensidades dos máximos de difração de raios X considera o fator de estrutura já corrigido em função da temperatura, em que:

$$(F_{hkl})_T = \sum_j (f_j)_T \, e^{2\pi i (hx_j + ky_j + lz_j)}. \qquad (31)$$

Na prática, o processamento das intensidades experimentais de DRX é feito usando programas como o HKL Denzo-Scalepack[11]. Além dos fatores físicos e geométricos descritos anteriormente, este programa inclui outros parâmetros refináveis no cálculo do fator de escala geral das reflexões coletadas usando difratômetros com geometria Kappa[12].

## SOLUÇÃO E REFINAMENTO DA ESTRUTURA

A etapa de solução da estrutura está associada à obtenção da fase $\varphi(\mathbf{h})$ de cada reflexão medida, de forma que seja possível a construção dos mapas de densidade eletrônica $\rho(\mathbf{r})$. Ainda que não exista uma solução geral para o problema da fase, foram descobertas certas relações matemáticas entre fatores de estrutura a partir das quais certo conjunto de fases pode ser encontrado diretamente, os conhecidos Métodos Diretos[3,8]. O uso destas relações e outras levaram aos mais sofisticados códigos de resolução de estruturas, como sejam os desenvolvidos por George Sheldrick (SHELXS-97)[13] e por Altomare e colaboradores (SIR-92)[14] presentes no pacote de programas de resolução e análises cristalográficas WinGX[15].

Além dos Métodos Diretos, que é amplamente utilizado na solução do problema da fase para pequenas moléculas sendo também um método promissor para a cristalografia de proteínas, existe outro método amplamente utilizado na determinação da posição de átomos pesados na cela unitária, conhecido como Método de Patterson[16,17]. Este método pode ser muito efetivo na localização do ponto de partida para a solução da estrutura, fornecendo informações sobre distâncias interatômicas a partir das quais é possível, eventualmente derivar as posições dos átomos sem que seja preciso informação acerca das fases. A solução de Patterson geralmente contém somente a sub-estrutura enquanto que os Métodos Diretos frequentemente dão as posições de quase todos os átomos não hidrogenóides, no entanto o Método de Parterson é mais rápido e os átomos remanescentes são encontrados geralmente na síntese Fourier diferença após alguns ciclos de refinamento[3,6,16]. Algumas estruturas que não podem ser resolvidas com os Métodos Diretos convencionais são resolvidas rapidamente com programas baseados nos algorítimos de espaço dual, como por exemplo, a implementação dos programas Shake and Bake ou SHELXD[18]. A escolha do melhor destes métodos vai depender do problema individual (tamanho da estrutura, presença de átomos pesados, presença de espalhamento anômalo, resolução máxima, e outros)[10].

O que se obtém da resolução são os mapas de densidade eletrônica que são calculados utilizando o melhor conjunto de fases como indicados pelas figuras de mérito. Estes mapas resultam da síntese de Fourier usando como coeficientes da série, os fatores de estrutura normalizados $E(\mathbf{h})$. Os máximos num mapa de $E$ devem corresponder as posições atômicas, mas, por causa dos erros sistemáticos nas fases, podem existir picos residuais onde não existem átomos, ou faltar picos onde deveria ter devido a presença de algum átomo. O programa SHELXS-97[13] faz uma lista de picos, colocando-os em forma decrescente. Em seguida o operador deve tentar resolver a estrutura da molécula a partir deste mapa, através de critérios estéreo-químicos para identificação de fragmentos moleculares. Em alguns casos, boa parte das moléculas pode ser visualizada, porém, o mais comum é achar alguns picos e então usar,

por exemplo, uma síntese Fourier Diferença que é uma síntese de Fourier na qual se utilizam como coeficientes a diferença entre os módulos dos fatores de estrutura observados $|F(\mathbf{h})|_{obs}$ e calculados $|F(\mathbf{h})|_{cal}$ conforme a Eq. (32), sendo $\alpha_{cal}$ as fases calculadas a partir do modelo, e *k* um fator de escala[6,8].

$$\Delta\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{V}\sum_{\mathbf{h}}(k|\mathrm{F}(\mathbf{h})|_{obs} - |\mathrm{F}(\mathbf{h})|_{cal})\exp(i\alpha_{cal})\exp(-2\pi i\mathbf{h}.\mathbf{r}), \quad (32)$$

este método é feita a diferença entre a densidade eletrônica observada $\rho(\mathbf{r})_{obs}$ e a densidade eletrônica calculada $\rho(\mathbf{r})_{cal}$, em que $\Delta\rho(\mathbf{r}) = \rho(\mathbf{r})_{obs} - \rho(\mathbf{r})_{cal}$. A partir da Eq. (32) pode ser construído um mapa de densidade eletrônica do qual podem ser observados novos picos que podem ser atribuídos a átomos leves que não haviam sido incluídos no modelo inicial. Para estruturas contendo um ou mais átomos bem mais pesados em relação aos outros mais leves, os picos correspondentes a estes átomos mais leves ficam confundidos com as flutuações de fundo, aparecendo somente os picos correspondentes aos átomos pesados, conforme apresentado na Figura 1.

Na diferença das densidades eletrônicas estas flutuações anulam-se, pois são praticamente as mesmas em ambos e, portanto é possível localizar outros átomos. Em certos casos favoráveis é possível localizar, mediante esta síntese, a posição dos átomos de hidrogênio[6,8]. As posições atômicas da estrutura molecular inicial, obtidas da primeira solução, não são resultado direto do experimento de difração, mas uma interpretação da função densidade eletrônica calculada a partir da medida das intensidades e dos ângulos de fase de alguma forma determinados inicialmente. Novas fases $\varphi(\mathbf{h})$ mais acuradas podem ser calculadas para as posições atômicas, que permitem uma re-determinação da função de densidade eletrônica $\rho(\mathbf{r})$ com uma precisão maior. Novos átomos podem ser introduzidos e algumas vezes, precisam ser removidos do modelo para o melhor ajuste da função $\rho(\mathbf{r})$. Quando o modelo atômico está completo, os átomos podem ser descritos como elipsóides (refinamento anisotrópico) e as posições de átomos de hidrogênio podem ser determinadas ou calculadas geometricamente[6,10].

Todas as etapas desde a obtenção do modelo inicial até a obtenção do modelo acurado é chamado de refinamento. Proporcionalmente as intensidades coletadas, se obtêm os fatores estrutura denominados observados $|F(\mathbf{h})|_{obs}$. Baseado em transformadas de Fourier, um conjunto completo de fatores de estrutura denominados calculado $|F(\mathbf{h})|_{cal}$ é obtido a partir do modelo atômico. O refinamento é o procedimento de minimização da discordância entre os módulos dos fatores de estrutura observados $|F(\mathbf{h})|_{obs}$ e calculado $|F(\mathbf{h})|_{cal}$, realizando pequenas modificações nos parâmetros atômicos (portanto das fases $\varphi(\mathbf{h})$ calculadas) determinados para a estrutura aproximada[3,6,19]. O princípio utilizado é o dos Mínimos Quadrados[10] em que a soma dos erros ao quadrado é minimizada através da função *M* dada pela Eq. (33), onde *w* é o peso atribuído a cada reflexão, inversamente proporcional ao desvio padrão $\sigma_{\mathbf{h}}$ que está associado à medida da reflexão **h**. As intensidades calculadas são então comparadas com as intensidades medidas, e o melhor modelo é aquele que minimiza *M*.

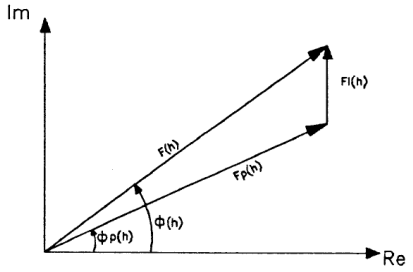



**Figura 1.** O fator estrutura *F*(h) de fase $\varphi$(h) e suas componentes devido a átomos leves $F_p$(h) e pesados $F_l$(h).

$$M = \sum_{\boldsymbol{h}} w_{\boldsymbol{h}}\left[|F(\boldsymbol{h})|^2_{obs} - |F(\boldsymbol{h})|^2_{cal}\right]^2. \quad (33)$$

O refinamento é um processo interativo na construção do modelo cristalográfico, guiado pela convergência e pela consistência química do modelo obtido[2,10]. Um dos programas mais utilizados para o refinamento de pequenas moléculas é o SHELXL[13], cuja rotina está baseada no esquema da Figura 2**.**

Para utilizar o SHELXL somente dois arquivos de entrada (*input*) são necessários: o arquivo de instrução *name.ins* que contém os dados do cristal, as instruções de refinamento e as coordenadas dos átomos; e o arquivo com os dados de reflexão *name.hkl* que contém as coordenadas das reflexões medidas no espaço recíproco *hkl* e as intensidades $F^2$ com suas incertezas associadas

$\sigma(F^2)$. Todos os arquivos aqui citados estão no formato de arquivos de texto do tipo ASCII. Após alguns ciclos de refinamento com o SHELXL, são gerados dois arquivos principais. Um arquivo *name.res* com as novas coordenadas fracionárias e parâmetros de deslocamento atômicos obtidos, juntamente com os índices estatísticos utilizados na validação do modelo. O outro arquivo obtido é o *name.lst* que contém informações mais detalhadas do refinamento. Novos parâmetros podem ser incluídos ou ajustados no arquivo *name.res*, que poderá ser salvo na extensão *name.ins*, recomeçando todo o ciclo até a obtenção do modelo esperado[10,13].

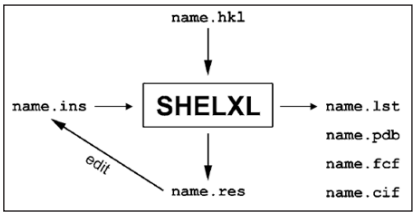



**Figura 2.** Organização da rotina de refinamento de estrutura utilizando o SHELXL.

Esperava-se que com a evolução da informática e dos equipamentos de coleta de dados fossem criadas estratégias automatizadas de refinamento de estruturas, mas um número crescente de estruturas tem requerido a intervenção e a percepção humana. Se o refinamento de uma estrutura não converge de um jeito normal, algumas possíveis ações podem ser executadas. Problemas durante o refinamento aparecem quando os fatores R crescem incontrolavelmente, e os parâmetros de deslocamento atômicos assumem valores absurdos, ou mudanças de parâmetros fazem a estrutura irreconhecível. Nos últimos estágios isto pode significar a extinção de alguns parâmetros ou ainda que algum parâmetro de deslocamento se torne significativamente negativo. Exclusão de átomos válidos é geralmente menos prejudicial do que a inclusão de falsos, e em qualquer caso, os átomos válidos reaparecem em mapas posteriores[6,10,18].

A estrutura cristalográfica é a média espacial de todas as moléculas sobre o volume de um cristal em um determinado momento. Em muitos casos, partes da molécula são encontradas em mais de uma orientação cristalográfica. Essa situação pode ser ocasionada pela existência de mais de uma molécula na unidade assimétrica, a ocorrência de geminação ou ainda de desordem. Moléculas desordenadas possuem fragmentos que apresentam duas ou mais orientações, ou seja, dois ou mais conjuntos de coordenadas para cada átomo. Um indicativo de estrutura desordenada são valores muito altos os chamados parâmetros de deslocamento anisotrópico, $U_{anis}$. Os principais tipos de desordem são: substitucional e posicional, esta última podendo ser dinâmica ou estática. Na desordem substitucional, um mesmo sítio em duas celas unitárias, é ocupado por dois tipos diferentes de átomos. Na desordem posicional, um átomo ocupa dois ou mais sítios, podendo ser em uma mesma cela unitária (desordem dinâmica) ou em duas ou mais celas unitárias diferentes (desordem estática). Na desordem estática a média do conteúdo da cela unitária é obtida medindo todo o espaço sobre diferentes celas unitárias. A desordem dinâmica pode ser distinguida da desordem estática realizando a coleta de dados em duas temperaturas distintas, visto que a vibração térmica diminui quando a temperatura se reduz. Um caso especial de desordem, chamado *mess*, ocorre quando grandes vazios ou cavidades no interstício molecular são preenchidos por moléculas do solvente, orientadas de maneira randômica, que não contribuem no padrão de difração já que seu espalhamento é difuso. A introdução de desordem no modelo aumenta consideravelmente o número de parâmetros a serem refinados. Portanto a fim de melhorar o refinamento pode-se utilizar *restraints* e *constraints*[3,10,18].

*Constraints* são equações que relacionam ou atribuem valores numéricos fixos a dois ou mais parâmetros reduzindo o número de parâmetros independentes a serem refinados. *Restraints* são ferramentas que permitem ao cristalógrafo introduzir informações químicas e físicas provenientes de outras fontes que não o experimento de difração de raios X, no processo de refinamento. Os *restraints* são utilizados a fim de assegurar que certos parâmetros geométricos e de deslocamento térmico estejam dentro da normalidade, restringindo distâncias, ângulos de ligação e ângulos torsionais a certos valores. Estruturas desordenadas são freqüentemente tratadas e modeladas utilizando os softwares SHELXL-97[13] e PLATON[20], ambos integrantes do pacote WinGX[15].

## VALIDAÇÃO, ANÁLISE DO MODELO E DEPÓSITO NO BANCO DE DADOS CRISTALOGRÁFICO

Por ser a cristalografia uma metodologia estrutural, ocorre durante as etapas de determinação estrutural, uma série de erros que interferem na validade do resultado obtido. A análise destes possíveis erros é feita durante a etapa de validação que irá avaliar a exatidão e a precisão desses resultados sendo de grande importância para a qualidade e confiabilidade das estruturas resolvidas. Outra preocupação está associada à qualidade da análise, e depende, entre outros fatores, da qualidade do cristal, da coleta de dados, da experiência do cristalógrafo e dos programas utilizados. Os critérios analisados são: coerência química na estrutura, o conjunto dos dados, a precisão nas distancias e ângulos de ligação, a qualidade dos índices estatísticos, a vibração térmica dos átomos, as interações intermoleculares, a desordem no cristal e a completeza do espaço tridimensional cristalino. Índices estatísticos são utilizados para avaliar a diferença entre o conjunto de dados teóricos $\Sigma|F(\mathbf{h})|_{cal}$, gerado para o modelo construído, e o conjunto de dados experimentais $\Sigma|F(\mathbf{h})|_{obs}$ medido a partir do cristal que contém o erro randômico[2,3].

Uma avaliação estatística fazendo uso dos conjuntos $\Sigma|F(\mathbf{h})|_{obs}$ e $\Sigma|F(\mathbf{h})|_{cal}$ pode ser feita com Figuras de Mérito, que são índices estatísticos que indicam a qualidade de uma estrutura cristalográfica, sempre obtidos pela comparação entre os fatores de estrutura medidos experimentalmente e aqueles calculados teoricamente. O grau com que a distribuição das diferenças entre os conjuntos $\Sigma|F(\mathbf{h})|_{obs}$ e $\Sigma|F(\mathbf{h})|_{cal}$ se ajusta aos valores esperados, afetados pelos erros randômicos, pode ser avaliado através do teste do $X^2$ (chi-quadrado)[3,21], dado pela expressão do *Goodness of Fit* (*Goof*) ou simplesmente *S* (para o SHELXL-97),

$$Goof = \left[ \sum w \left( |F(\mathbf{h})|^2_{obs} - |F(\mathbf{h})|^2_{cal} \right)^2 / m - n \right]^{1/2}, \qquad (34)$$

onde *m* corresponde ao número de observações e *n* ao número de parâmetros independentes refinados (*G* ou fator de escala, posições atômicas, parâmetros de ocupação e outros) utilizados no refinamento pelo métodos dos Mínimos Quadrados. *Goof* > 5 indica algum problema com um dos conjuntos $\Sigma|F(\mathbf{h})|_{obs}$ ou $\Sigma|F(\mathbf{h})|_{cal}$ e *Goof*, significativamente menor do que a unidade sugere que o modelo é melhor do que os dados e, portanto, não tem significado físico. A unidade é seu valor ideal[10]. O grau de precisão do modelo cristalográfico construído e a estrutura real pode ser avaliado pelos índices de discordância (*residual factors*), calculado a partir do quantitativo total desviado entre os conjuntos $\Sigma|F(\mathbf{h})|_{obs}$ e $\Sigma|F(\mathbf{h})|_{cal}$, dado pela Eq. (35).

$$R = \sum \left| |F(\mathbf{h})|_{obs} - |F(\mathbf{h})|_{cal} \right| / \sum |F(\mathbf{h})|_{obs} . \qquad (35)$$

Para uma estrutura confiável, o valor de *R* deve estar entre 0,02 e 0,06 após o refinamento. Elevados ao quadrado todos os fatores de estrutura associados, os correspondentes às reflexões mais intensas têm um peso maior em relação aos correspondentes às reflexões fracas, sendo obtida assim a Eq. (36) com os índices de discordância ponderados $R_w$ ou $wR_2$.

$$R_w = \left[ \sum w \left( |F(\mathbf{h})|^2_{obs} - |F(\mathbf{h})|^2_{cal} \right)^2 / \sum w \left( |F(\mathbf{h})|^2_{obs} \right)^2 \right]^{1/2} . \qquad (36)$$

Finalizado o trabalho de construção do modelo estrutural, todas as informações cristalográficas podem ser armazenadas num arquivo texto comum, respeitando o padrão *Crystallographic Information File* (CIF), adotado em 1991 pela *International Union of crystallography* (IUCr). Esse formato de arquivo armazena cada informação cristalográfica através de um código para o item no formato ASCII. O senso químico de uma estrutura cristalina deve ser prioritário sobre todos os métodos estatísticos[2,10,18].

Obtido o modelo cristalográfico validado e com sentido químico, são realizadas análises da geometria molecular (distâncias e ângulos entre átomos, e ângulos diedrais), além de estudos supramoleculares analisando como as moléculas se organizam no cristal (estrutura cristalina), em decorrência das interações intermoleculares. Estas interações são mais fracas do que as ligações intramoleculares (interações entre átomos em uma mesma molécula que podem ser iônica, covalente ou metálica). As interações intermoleculares incluem interações eletrostáticas fortes (entre íons ou entre íons dipolo), forças de Van der Waals e dentre estas as forças de dispersão (forças de London), ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e outras interações envolvendo sistemas π deslocalizados ou anéis aromáticos[9,22].

Com exceção das interações eletrostáticas fortes, as ligações de hidrogênio são as interações de maior energia (4-60 kj/mol) em cristais moleculares afetando a maneira com que as moléculas são empacotadas[9]. A ligação de hidrogênio é por si só a mais relevante interação intermolecular na natureza, sendo o principal fator na determinação da estrutura da água, enovelamento de proteínas e emparelhamento das bases no DNA. Esta interação consiste em um átomo de hidrogênio que fica entre dois átomos eletronegativos, e um par de elétrons isolados, especificamente nitrogênio (*N*), oxigênio (*O*) ou halogênios (*F, Cl, Br*). As ligações de hidrogênio são altamente direcionais e a energia eletrostática geralmente é o termo de maior contribuição para a sua estabilidade. As ligações de hidrogênio chamadas clássicas incluem os sistemas *O-H...O*, *N-H...O* e *O-H...N*. As chamadas não clássicas são: *C-H...O*, *O-H...π,* e *C-H...π.* Enquanto que as liagações de hidrogênio *O-H...O*, *N-H...O* vem sendo estudadas por décadas, o mesmo não pode ser dito para as interações não clássicas como *C-H...O*, *O-H...π,* que somente a algum tempo vem ganhando aceitação de ser uma genuína ligação de hidrogênio[23,24]. As ligações *C-H...O* fazem contribuições energeticamente favoráveis para a estabilidade do empacotamento das moléculas.

Para a identificação destas interações é necessário a utilização de critérios tais como distância doador *D* / aceptor *A* e o ângulo *D-H...A.* A distância *D...A* é um dos atributos importantes para determinar a existência deste tipo de ligação e deve ser menor que a soma dos raios de Van der Walls do átomo doador e do átomo aceptor. Assim, para uma ligação de hidrogênio entre átomos de carbono e oxigênio, se o raio de Van der Walls do átomo de oxigênio é 1,40 Å e do átomo de carbono ligado ao hidrogênio é de 1,84 Å, então a distância *C...O* deve ser menor que 3,25 Å para ter uma interação deste tipo. A distância D/A é uma condição necessária, mas não suficiente, pois como mencionado estas interações são direcionais de forma que o ângulo ao redor do átomo de hidrogênio deve ser o mais linear possível[9]. Nestas interações a variação do ângulo aceita está entre 100° e 180°.

As ligações de hidrogênio são classificadas de acordo com sua topografia como intramolecular, intermolecular ou bifurcada, e de acordo com sua energia, como fraca, moderada e forte. Além das ligações de hidrogênio intramoleculares, embora menos comum e muitas vezes mais fraca do que as ligações de hidrogênio intermoleculares, também podem exercer um impacto considerável sobre as propriedades moleculares. Elas incluem a estabilidade relativa dos isômeros estruturais, a distribuição de cargas nas moléculas, a reatividade e outros. Em uma típica ligação de hidrogênio *D-H···A* o átomo de hidrogênio é ligado covalentemente a um átomo eletronegativo *D*, e não-covalentemente a um átomo eletronegativo *A*. Por causa de sua longa série de interações, as ligações de hidrogênio também são encontradas entre um doador e dois aceptores, ou entre um aceptor e dois doadores. O primeiro tipo é normalmente conhecido como bifurcada[9,24].

As interações *C-H...π* são outro tipo de ligações de hidrogênio não clássicas que são frequentemente encontradas no arranjo supramolecular de proteínas e pequenas moléculas orgânicas contendo elétrons $\pi$ deslocalizados ou anéis aromáticos. Em uma análise das interações *C-H...π* em estruturas depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) foi observado que a maioria delas apresentava uma distância *d* (mostrada na Figura 3A) de 3,6 Å entre o átomo doador e o centro de massa da ligação $\pi$ ou centro de massa de um anel aromático $C_g$ (centróide) sendo observado ainda que para incluir 96% de todos os dados encontrados essa distância deveria ser ampliada a 4,5 Å[23,24]. Como no caso das outras interações envolvendo átomos de hidrogênio, o ângulo *C-H...*$C_g$ é importante e o valor mínimo aceito é 120°.

Ultimamente, vem ganhando atenção e destaque outro tipo interação que ocorre em sistemas aromáticos: o empilhamento $\pi$-$\pi$ também conhecido como *π-stacking* (Figura 3B e 3C). Por definição, as interações $\pi$-$\pi$ são contatos hidrofóbicos que ocorrem entre dois sistemas $\pi$ deslocalizados. De acordo com estudos sobre a natureza das interações $\pi$-$\pi$, ressalta-se que a energia de interação entre as moléculas resulta do somatório de várias energias que podem ser observadas na Eq. (37)[25]

$$E_{Total} = E_{\text{eletrostático}} + E_{\text{indução}} + E_{\text{dispersão}} + E_{\text{repulsão}} . \quad (37)$$

A maior contribuição sobre a geometria dessas interações é devido aos efeitos eletrostáticos, decorrentes do quanto deslocado estará o sistema de anéis e quais são os anéis interagentes[25]. Como pode ser observado na equação, também existem outros fatores que contribuem energeticamente. Ressalta-se que pelas informações

cristalográficas não se pode ter acesso a essas energias, mas a distância que separa as moléculas pode ser um parâmetro que forneça uma idéia do quão forte é a interação.

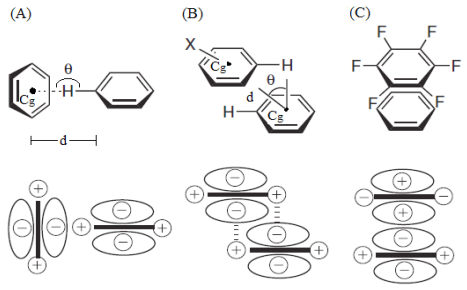



**Figura 3.** Geometria das interações entre anéis aromáticos. (A) interação vértice-face ou forma T. (B) Empilhamento face a face deslocada. (C) Empilhamento face a face.

Uma das distâncias que podem ser utilizadas para identificar uma interação $\pi$-$\pi$ é à distância interplanar, ou seja, a distância entre dois planos que são formados por sistemas aromáticos. Como pode ser observado na 4B, as moléculas não se arranjam de maneira alinhada uma sobre a outra, pois isto resultaria em uma repulsão entre elétrons $\pi$. Assim as moléculas estão ligeiramente deslocadas, sendo que este deslocamento apresenta um ângulo aproximado de 20°. Com isto, outro parâmetro é a distância entre centróides $C_g$, é comumente utilizado para estudar as interações $\pi$-$\pi$. O fato deste não ser um contato perpendicular implica que sua distância sempre seja maior do que a encontrada por um contato interplanar[9]. Geralmente as distâncias $C_g$...$C_g$ apresentam um intervalo de 3,4 a 3,8 Å. Porém esta faixa de distâncias intecentróides pode assumir limiter inferiores e superiores diferentes destes valores[9,25].

Após toda a etapa de validação e análise de dados, o modelo cristalográfico no formato CIF, pode ser depositado no banco de dados apropriado. Para pequenas moléculas geralmente se utiliza o *Cambridge Structural Database* CSD mantido pelo *Cambridge Crystallographic Data Centre* (CCDC). O *Protein Data Bank* (PDB) é utilizado para proteínas e macromoléculas biológicas.

# Considerações finais

A cristalografia por difração de raios X apresenta-se como uma ferramenta de alta aplicabilidade no trabalho de caracterização de compostos cristalinos, permitindo o entendimento da relação entre a estrutura e as propriedades físico-químicos dos compostos. Através dessa metodologia podem-se determinar as posições relativas de todos os átomos que constituem a molécula (estrutura molecular) e a posição relativa de todas as moléculas que constituem a cela unitária e o cristal (estrutura cristalina). Pode-se, portanto, estabelecer os ângulos e as distâncias interatômicas da estrutura cristalina, bem como as interações intermoleculares (Van der Waals, dipolo-dipolo, ligação de hidrogênio, entre outras interações não-covalentes). Em casos complexos, assim como estruturas com desordem, pseudo-simetria ou geminação, o conhecimento cristalográfico, habilidades de refinamento e experiência são de vital importância para obter estruturas cristalinas de alta qualidade.

# Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES pelo apoio financeiro.

# Referências

1. Jensen, W. P.; Palenik, G. J.; Suh, I. H.; *"The history of molecular structure determination viewed through the nobel prizes"*. J. Chem. Edu., **2003**, v. 80, p. 753.
2. Napolitano, H. B.; Camargo, A. J.; Vencato, I.; Lariucci, C.; Ellena, J.; Cunha, S.; *"Caracterização de Fármacos Polimórficos"*. Revista Estudos, **2005**, v. 32, p. 2021-2046.
3. Giacovazzo, C; Monaco, H. L.; Viterbo, D.; Scordari, F.; Gilli, G.; Zanotti, G.; Catti, M.; *"Fundamentals of Crystallography"*. ed. Giacovazzo, Oxford: IUCR - Oxford University Press, 2ª ed., **2002**.
4. Hammond, C.; *"The Basics of Crystallography and Diffraction"*. Oxford: IUCr - Oxford University Press, 3ª ed., **2009**.
5. Drenth, J.; *"Principles of Proteins X-Ray Crystallography"*. New York: Springer Verlag, **1994**.
6. Clegg, W.; *"Crystal Structure Analysis: Principle and Pratices"*. New York: IUCr - Oxford University Press, 2ª ed., **2009**.
7. Glusker, J. P.; Lewis, M.; RossI, M.; *"Crystal Structure Analysis for Chemists and Biologists"*. Oxford: VCH, 2ª ed., **1994**.
8. Stout, G. H.; Jensen, L. H.; *"X-Ray Structure Determination"*. New York: Wiley-Interscience, 2ª ed., **1989**.
9. Steed, J. W.; Atwood, L. J.; *"Supramolecular Chemistry"*. Weinhein: Wiley-VHC, **2009**.
10. Müller, P.; Irmer, R. H.; Spek, A. L.; Schneider, T. R.; Sawaya, M. R.; *"Crystal Structure Refinement: A Crystallographer's Guide to SHELXL"* New York: IUCr - Oxford University Press, **2006**.

11. Otwinowski, Z.; Minor, W. *"Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode."* In: Carter Junior, C. W.; Sweet, R. M. (Eds.). *"Methods in Enzymology: macromolecular crystallography"*. New York: Academic Press, **1997**. v. 276, parte A. p. 307–326.

12. Otwinowski, Z.; Borek, D.; Majewski, W.; Minor, W. *"Multiparametric scaling of diffraction intensities."* Acta Crystallogr. Sect. A, **2003**, v. 59, p. 228-234.

13. Sheldrick, G. M.; *"A short history of SHELX"*. Acta Crystallographica Section A, **2008**, v. 64, p. 112-122.

14. Altomare A. A.; Cascarano, G.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; *"SIR92 - A program for crystal structure solution"*. J. Appl. Cryst., **1993**, v. 26, p. 343-350.

15. Farrugia, L. J.; *"WinGX - suite for small molecule single crystal crystallography"*. J. Appl. Cryst., **1999**, v. 32, p. 837-838.

16. Shmueli, U.; *"Theories and Techniques of Crystal Structure Determination"*. New York: Oxford University Press - IUCr, **2007**.

17. Usón, I.; Sheldrick, G. M.; *"Advances in direct methods for protein crystallography"*. Biophysical Methods, **1999**, v. 9, p. 643-648.

18. Müller, P.; *"Practical suggestions for better crystal structures"*. Crystallography Reviews, **2009**, v. 15, p. 57-83.

19. Sheldrick, G.M. *"The SHELX-97 Tutorial"*. **1997**.

20. Spek, A. L.; *"Platon / Pluton"*. Acta Cryst. A, **1990**, v. 46.

21. Schwarzenbach, D. *"Crystallography"*. Chichester: J. Wiley e Sons, **1996**.

22. LI, W.; Cheng, J.; Gong, B.; Sun, J.; *"Effect of methyl group on the cooperativity between cation–π interaction and NH...O hydrogen bonding"*. Journal of Molecular Structure, **2008**, v. 867, p. 107-110.

23. Brandl, M.; Weiss, M. S.; Jabs, A.; Sühnel, J.; Higenfeld, R.**;** *"C-H...π in proteins"*. J. Mol Biol., **2001**, 307, p. 357.

24. Desiraju, G. R.; *"The C-H…O hydrogen bond in crystals: what is it?"*. Acc. Chemical Res., **1991**, v. 24, p. 290.

25. Hunter, C. A.; Sanders, J. K. M.**;** *"The nature of π-π interactions"*. Journal of Americal Chemical Society, **1990**, n. 14, v. 112, p. 5525-5534.

William B. Fernandes[1]*, Hamilton B. Napolitano[1], Caridad Noda-Perez[2], Felipe T. Martins[2] & Carlito Lariucci[3].

[1]Ciências Exatas e Tecnológicas, UEG, Caixa Postal 459, CEP 75001-970, Anápolis, GO.

[2]Instituto de Química, UFG, Caixa Postal 131, CEP 74001-970, Goiânia, GO.

[3]Instituto de Física, UFG, Caixa Postal 131, CEP 74001-970, Goiânia, GO.

*e-mail: william.fernandes@ueg.br

# Um Procedimento Teórico-Experimental para a Estimativa da Difusividade e Condutividade Térmica de Alimentos em Pastas

Laís S. de Moura, Ana C. Teixeira, Nathália G. Cardoso, Orlene S. Costa, Valter H. C. Silva, José S. Sales & Heibbe C. B. de Oliveira

O conhecimento das propriedades térmicas é de grande importância para simulação da variação da temperatura em sistemas de transporte, estocagem e dimensionamento industrial, principalmente na indústria de alimentos. Neste trabalho nós propomos uma metodologia teórica-experimental para a predição da difusividade e condutividade térmica de alimentos baseada em um procedimento híbrido entre um aparato experimental muito simples e o método de otimização Levenberg-Marquardt. Para validar esta metodologia nós utilizamos pasta de tomate comercial. A difusividade e a condutividade térmica obtidas foram 0,093cm$^2$/min e 0,544 W/m.K, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com a literatura.

**Palavras-chave:** *pasta de tomate, difusividade térmica, condutividade térmica.*

The knowledge of thermal properties is very important for simulation of temperature variation in transport, storage system and industrial sizing, mainly in food industry. In this work we propose a theoretical-experimental methodology for prediction of thermal diffusivity and conductivity of foods based on hybrid procedure between a very simple experimental apparatus and the Levenberg-Marquardt optimization method. To validate this procedure we used commercial tomato paste. The diffusivity and conductivity thermal obtained were $1.55.10^{-7}$m$^2$/s e 0.544 W/m.K, respectively. These results are in close agreement with literature data.

**Keywords:** *tomato paste, thermal diffusivity, thermal conductivity.*

# Introdução

As propriedades térmicas são essenciais para a eficiência e controle das operações de processamento de alimentos que envolvem transferências de calor. Essas propriedades são necessárias para simular a temperatura durante tratamentos, transporte, estocagem e distribuição. Entre elas pode-se citar a difusividade térmica, condutividade térmica, calor específico e massa específica. Essas propriedades variam de acordo com a composição química, umidade e porosidade, por exemplo, do material analisado (Betta *et al*, 2009; Sousa, 2009)[1-16]. O conhecimento da difusividade térmica é importante quando se deseja determinar a evolução temporal em sistemas submetidos às transformações térmicas. Essa propriedade está intimamente ligada à dinâmica de penetração de calor em alimentos. Ela pode ser determinada por várias metodologias, como por exemplo: i) soluções numéricas; ii) aproximação analítica; e iii) método de Sweat, que faz a aplicação direta da equação:

$$\alpha = \frac{k}{\rho c_p}, \qquad (1)$$

onde a difusividade térmica (α) está em função da condutividade térmica (*k*), calor específico a pressão constante ($c_p$) e massa específica ($\rho$) (Carbonera *et al.*, 2003[5]; Baïri *et al.*, 2007[1,2]; Huang e Liu, 2009[11]; Carciofi *et al.*, 2002[6]; Garrote *et al*, 2000[10]; Erdoğdu, 2005[8]; Silans *et al.*, 2006[15]).

O conhecimento da condutividade térmica também é relevante e encontra aplicação em quase todas as áreas de processamento de alimentos, como por exemplo, a secagem, a aeração e o resfriamento de grãos (Park *et al.*, 1997)[14]. Se há um gradiente de temperatura entre duas superfícies através do qual o calor flui, a quantidade de calor (q) que irá fluir em uma unidade de tempo (t) por certa espessura (L), através de uma unidade de área (A), é chamada de condutividade térmica, denominada por k, definida como segue:

$$q = -K\left(\frac{A}{L}\right)\left(\frac{dt}{dx}\right). \qquad (2)$$

Por outro lado, ela pode ser determinada mais facilmente utilizando-se a Equação 1.

A determinação da difusividade térmica é possível a partir da solução da seguinte equação íntegro-diferencial:

$$\nabla^2 T + \frac{q}{k} = \frac{1}{\alpha}\frac{\partial T}{\partial t}, \qquad (3)$$

a qual é originária de um balanço de energia proveniente da Lei de Fourier para transferência de calor por condução. Na Equação 3, o primeiro termo expressa o gradiente de temperatura, o segundo a fonte térmica interna do sistema e o terceiro representa a variação temporal da temperatura. Neste trabalho, propomos um procedimento híbrido teórico-experimental para a estimativa da difusividade e condutividade térmica em alimentos baseada na equação de transferência de calor longitudinal a qual é resolvida pelo método de regressão não-linear de Levenberg – Marquardt (LM)[12,13].

# Material e métodos

Este trabalho consistiu em quatro etapas distintas: 1) construção e montagem do sistema de transmissão de calor; 2) ensaio de transferência de calor; 3) definição do modelo matemático representativo da transferência de calor por condução; 4) ajuste computacional do modelo matemático aos dados experimentais; e 5) estimativa dos erros entre os dados experimentais e os dados previstos pelo modelo matemático.

## CONSTRUÇÃO E MONTAGEM DO SISTEMA DE TRANSMISSÃO DE CALOR

Um tubo de PVC (policloreto de vinila) de 3,5 cm diâmetro e 19,0 cm de comprimento foi perfurado com quatro furos, equidistantes 4,0 cm, constituindo as seguintes posições longitudinais da base até o topo: $Z_1$ = 4,0 cm, $Z_2$ = 8,0 cm, $Z_3$ = 12,0 cm; e $Z_4$ = 16,0 cm, como demonstrado na Figura 1.

A base do tubo de PVC foi vedada com papel alumínio e sua lateral foi revestida com uma camada de cortiça de quatro milímetros de espessura a fim de isolá-lo termicamente. A base de papel alumínio teve o objetivo de conter o material a ser introduzido no tubo e permitir a transferência de calor com baixa resistência térmica. Tanto a base de papel alumínio quanto o revestimento de cortiça tiveram a finalidade de promover a transmissão de calor na direção longitudinal.

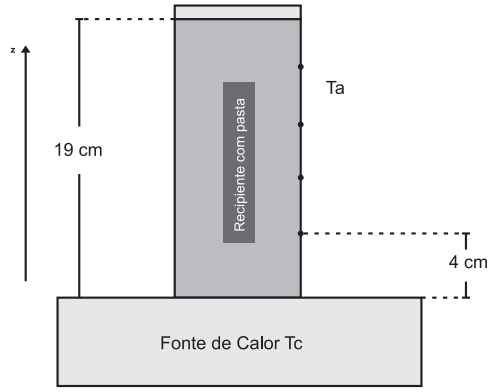



**Figura 1.** Desenho esquemático do sistema de transferência de calor.

A pasta de tomate comercial foi pesada em um volume pré-estabelecido a fim de se determinar sua massa específica. Em seguida, sem nenhum tratamento prévio, a pasta de tomate foi introduzida no tubo até total preenchimento. Uma tampa de isopor foi colocada no topo, como o objetivo de evitar a condensação de vapores. Logo após, todo o tubo foi recoberto com papel alumínio para minimizar os efeitos da radiação térmica. Finalmente, quatro termômetros digitais foram instalados nos furos dispostos ao longo do tubo.

## ENSAIO DE TRANSFERÊNCIA DE CALOR

Inicialmente, registraram-se as temperaturas medidas pelos quatro termômetros acoplados ao tubo contendo pasta de tomate comercial e a temperatura do ar. O ensaio de transferência de calor por condução unidimensional e em regime transiente foi conduzido colocando-se a superfície da base do tubo, com papel alumínio, em contato com um banho termostatizado, mantido a uma temperatura de 50ºC (Figura 2). A partir deste instante mediu-se a variação de temperatura durante 125 minutos em intervalos de 5 minutos.

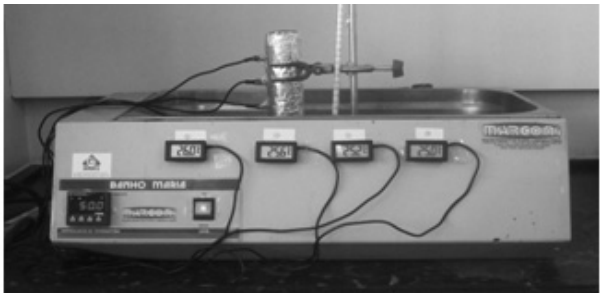



**Figura 2.** Esquema do experimento

## DEFINIÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO REPRESENTATIVO DA TRANSFERÊNCIA DE CALOR POR CONDUÇÃO

Como o sistema de transferência de calor por condução apresenta um volume de controle cilíndrico, uma área de transmissão de calor de seção circular e o fluxo de transporte de calor ocorrem em regime transiente. Assim a Equação (3) pode ser re-escrita tridimensionalmente em coordenadas cilíndricas, conforme:

$$\frac{1}{R}\frac{\partial}{\partial R}\left(R\frac{\partial T}{\partial R}\right)+\frac{1}{R^2}\frac{\partial^2 T}{\partial \varphi^2}+\frac{\partial^2 T}{\partial z^2}+\frac{q}{k}=\frac{1}{\alpha}\frac{\partial T}{\partial t}. \quad (4)$$

Por sua vez, como o volume cilíndrico é isolado termicamente nas laterais, forçando a condução de calor unidirecional no eixo z, e assumindo que não existe uma fonte térmica interna ao sistema, a Equação (4) é simplificada para:

$$\frac{\partial^2 T}{\partial z^2}=\frac{1}{\alpha}\frac{\partial T}{\partial t}, \quad (5)$$

sendo T a temperatura, z a direção longitudinal, t o tempo e α a difusividade térmica.

A solução para a Equação (5) foi proposta por Fourier em seu tratado *Théorie Analytique de la Chaleur*, publicado em 1822[12]. Boyce e DiPrima (2000)[12,13] também apresentaram uma solução completa, expressa por:

$$T(z,t)=T_s+\sum_{n=1}^{\infty}c_n e^{-n^2\pi^2\alpha t/L^2}sen\left(\frac{n\pi z}{L}\right), \quad (6)$$

sendo $T_s$ a temperatura da fonte térmica e $c_n$ é o coeficiente de Fourier, que é baseado nas seguintes condições de contorno:

$$T(z,0)=T(0,t)=T_a. \quad (7)$$

Aplicando a transformada de Fourier, descobriu-se então o coeficiente $c_n$ é dado por:

$$c_n=\frac{2}{L}\int_0^L (T_a-T_s)sen\left(\frac{n\pi z}{L}\right)dx=\frac{4}{(2n+1)\pi}(T_a-T_s). \quad (8)$$

Finalmente, obteve-se a equação completa da distribuição de temperatura, conforme:

$$T(z,t)=T_s+\sum_{n=0}^{\infty}\left\{\frac{4}{(2n+1)\pi}(T_a-T_s)e^{-(2n+1)^2\pi^2\alpha t/L^2}sen\left[\frac{(2n+1)\pi z}{L}\right]\right\} \quad (9)$$

**AJUSTE COMPUTACIONAL DO MODELO MATEMÁTICO AOS DADOS EXPERIMENTAIS**

O modelo matemático não linear, representativo da distribuição de temperatura para transferência de calor por condução unidimensional e em regime transiente, expresso pela Equação (9), foi ajustado aos dados experimentais obtidos, onde se determinou o valor de α (difusividade térmica).

É importante pontuar que a difusividade térmica é o único parâmetro a ser obtido por essa técnica. Essa determinação é possível pelo uso do algoritmo de Levenberg-Marquardt. Conforme pode ser visto na Equação (9), a sua descrição matemática envolve uma quantidade infinita de termos. No entanto, para tratarmos o sistema real em questão é necessário truncar a série. Neste caso optamos por usar cinco, nove e doze termos. A partir do ajuste computacional do modelo matemático via método de Levenberg-Marquardt a difusividade térmica foi obtida e, conseqüentemente, a estimativa da condutividade térmica da pasta de tomate foi feita pelo método de Sweat.

Abaixo mostramos um pseudocódigo do procedimento computacional adotado neste trabalho durante o procedimento de minimização da função,

$$\chi^2 = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}\left(T(z,t)_{exp} - T(z,t)_{Teor}\right)^2:$$

**I** inicializa-se o procedimento com um valor para a difusividade térmica;

**ii** em seguida usa-se o método Levenberg-Marquardt para gerar um novo valor para a difusividade térmica;

**iii** calcula-se a Equação (9);

**iv** calcula-se o valor da função $\chi^2$ usando todos os pontos experimentais T(z,t),

**v** compara-se os valores de $\chi^2$ para os dois últimos conjuntos de parâmetros:

- se o $\chi^2$ para o último conjunto de parâmetros for menor do que a anterior, então se aceita este valor de α;

- caso contrário, mantém o valor de α como ponto de partida para gerar um novo α;

**vi** volta-se ao passo (ii) para gerar a nova função $\chi^2$;

**vii** assim, este procedimento entre os passos (ii) e (v) é repetido até atingir o valor mínimo do desvio quadrático médio, obedecendo a um dado critério de convergência, inicialmente pré-estabelecido.

**ESTIMATIVA DO ERRO ENTRE OS DADOS EXPERIMENTAIS E OS DADOS PREVISTOS**

Os erros relativos entre os dados experimentais da variação espacial e temporal da temperatura e os dados obtidos pelo modelo matemático, expressos pela Equação (9), para doze termos na construção deste modelo foram estimados e dispostos em gráficos em função do tempo, visando verificar o comportamento da dispersão dos erros. Os erros foram calculados usando a seguinte relação:

$$Erro\ Relativo = \left(\frac{T_{exp} - T_{teor}}{T_{exp}}\right). \qquad (10)$$

# Resultados e discussão

Os perfis de temperatura dos quatro termômetros digitais, ilustrado na Figura 3, retratam a dispersão da distribuição da temperatura em função do tempo para transferência de calor por condução em pasta de tomate comercial. Observa-se que quanto mais próximo o termômetro estiver da fonte aquecedora, maior é a curvatura do perfil de temperatura e mais brevemente ela tende a atingir a temperatura de equilíbrio.

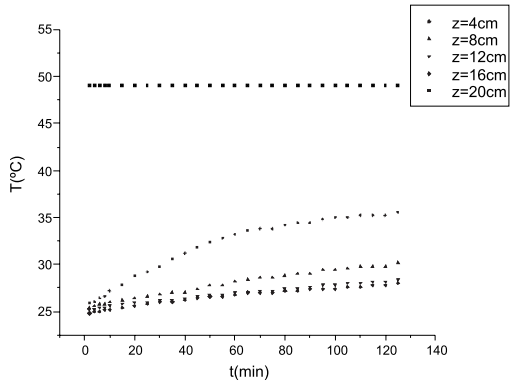



**Figura 3.** Variação espacial e temporal da temperatura em pasta de tomate comercial

Os valores da difusividade térmica preditos pelo ajuste do modelo matemático não linear estão apresentados na Tabela 1, para as simulações computacionais com cinco, nove e doze termos na construção da Equação (9).

A avaliação dos valores α obtidos pelo método computacional de Levenberg-Marquardt mostra que o aumento dos termos da Equação (9) não leva a

uma alteração significativa na difusividade térmica (α), isto é, cinco termos na construção da Equação (9) são suficientes para descrever a transferência de calor no sistema. O emprego desta nova metodologia determinou uma difusividade térmica para pasta de tomate comercial em torno de $1{,}55.10^{-7} m^2.s^{-1}$, com um valor médio para o $\chi^2$ de 1,86(ºC)$^2$. Este valor está de acordo com as seguintes literaturas[1-5]: 1) cujo valor de α foi obtido numa faixa de $1{,}30 – 1{,}63.10^{-7}$ $m^2.s^{-1}$; 2) que obtiveram o valor de $1{,}42.10^{-7}$ $m^2.s^{-1}$; e 3), sendo $\alpha = 2{,}10.10^{-7}$ $m^2.s^{-1}$. Estes resultados indicam que a metodologia proposta neste trabalho descreve bem o fenômeno de condução de calor em matérias pastosas ou cremosas, obtendo assim valores para a difusividade térmica em bom acordo com dados da literatura.

**Tabela 1.** Difusividade térmica (α) e o erro χ2 para o experimento obtido através do método de Levenberg – Marquardt.

| No. de Termos da Equação (9) | α, $m^2.s^{-1}$ (obtido via método de Levenberg-Marquardt) | $\chi^2$,ºC$^2$ |
|---|---|---|
| 5 | $1{,}550.10^{-7}$ | 1,84 |
| 9 | $1{,}555.10^{-7}$ | 1,88 |
| 12 | $1{,}553.10^{-7}$ | 1,87 |

A Figura 4 ilustra o diagrama de dispersão dos erros relativos entre dados obtidos experimentalmente e os dados teóricos, previstos pelo modelo da Equação (9) com doze termos.

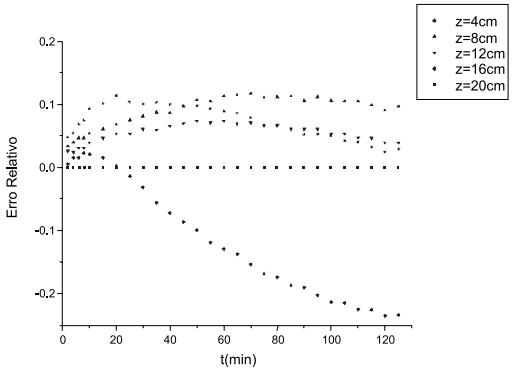



**Figura 4.** Diagrama de erros entre os dados experimentais e os dados obtidos por meio do modelo matemático.

A determinação da massa específica (ρ) da pasta de tomate comercial, igual a 1,062 $kg.m^{-3}$, possibilitou a estimativa da condutividade térmica (k) por meio da Equação (1). O calor específico ($c_p$) adotado para estimativa de k, foi o valor determinado por Drusas e Saravacos (1985), igual a 3,302 $J.kg^{-1}.K^{-1}$. Deste modo, o valor estimado da condutividade térmica foi igual a 0,544 $W.m^{-1}.K^{-1}$, valor em bom acordo com o encontrado na literatura equivalente[7] a 0,525 $W.m^{-1}.K^{-1}$.

# Conclusões

A metodologia proposta neste trabalho mostrou-se bastante viável, pois, além de simples, possui um baixo custo e é de fácil execução, além de ser também eficaz na determinação da difusividade térmica de pastas, já que os resultados obtidos foram próximos aos valores encontrados na literatura. O valor da difusividade térmica (α) estimado para pasta de tomate comercial foi igual a $1{,}55.10^{-7} m^2.s^{-1}$, muito próximo aos valores[5-7]: 1) Da faixa $1{,}30 – 1{,}63.10^{-7}$ $m^2.s^{-1}$; 2) $\alpha = 1{,}42.10^{-7}$ $m^2.s^{-1}$; e 3) $\alpha = 2{,}10.10^{-7}$ $m^2.s^{-1}$.

Por sua vez, a estimativa do valor da condutividade térmica (k) da pasta de tomate comercial também foi bem sucedida, já que esta depende do valor da difusividade térmica, apresentando um valor de 0,544 $W.m^{-1}.K^{-1}$, valor próximo ao disponibilizado por (DRUSAS e SARAVACOS, 1985)[7], que obteve k = 0,525 $W.m^{-1}.K^{-1}$ para massa de tomate. O sucesso desta aplicação metodológica é fortemente alicerçado pelo fato de que o erro relativo e o erro $\chi^2$ estarem em torno de 0,02097 e 1,86(ºC)$^2$, respectivamente.

# Agradecimentos

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PrP) da Universidade Estadual de Goiás (UEG) e a Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos (FINATEC).

# Referências bibliográficas

1. Baïri, A; Laraqi, N.; Gárcia De María, J. M. Determination of thermal diffusivity of foods using 1D Fourier cylindrical solution. Journal of Food Engineering, v.78, p.669-675, **2007**.

2. Baïri, A; Gárcia De María, J. M.; Laraqi, N. Thermal diffusivity measurements of building materials based on 2D models. Computational Materials Science, v.38, p.838-846, **2009**.

3. Betta, G.; Rinaldi, M.; Barbanti, D.; Massini, R. A quick method for thermal diffusivity estimation: Application to several foods. *Journal of Food Engineering*, v.91, p.34-41, **2009**.

4. Boyce, W.E.; Diprima, R.C. *Elementary Differential Equations and Boundary Value Problems*. New York, John Wiley & Sons, **2000**.

5. Carbonera, L.; Carciofi, B.M.; Huber, E.; Laurindo. Experimental determination of thermal diffusivity in commercial tomato paste. J. B. Braz. *J. Food. Technol.*, v.6, p.285-290, **2003**.

6. Carciofi, B.M.; Faistel, J.; Aragão, G.M.F; Laurindo. Determination of thermal diffusivity of mortadella using actual cooking process data. J.B. Journal of Food Engineering, v.55, p.89-94, **2002**.

7. Drusas, A.; Saravacos, G.D. Thermal conductivity of tomato paste. J. Food Engineering, v.4, p.157-168, **1985**.

8. Erdoğdu, F. Mathematical approaches for use of analytical solutions in experimental determination of heat and mass transfer parameters. *Journal of Food Engineering*, v.68, p.233-238, **2005**.

9. Fourier J. B. J.. Théorie Analytique de la chaleur. Cambridge, **1822**.

10. Garrote, R.; Silva, E.; Bertone, R. Effect of thermal treatment on steam peeled potatoes. *Journal of Food Engineering*, v.45, p.67-76, 2000.

11. Huang, L.; Liu, L. Simultaneous determination of thermal conductivity and thermal diffusivity of food and agricultural materials using a transient plane-source method. Journal of Food Engineering, v.95, p.179-185, **2009**.

12. Levenberg, K. A method for the solution of certain problems in least squares J. Numer. Anal., v.16, p.588-604, **1944**.

13. Marquardt, D. An algorithm for least squares estimation of nonlinear parameters J. Appl. Math., v.11, p.431-441, **1963**.

14. Park, K. J.; Murr, F. E. X.; SALVADEGO, M. Medição da condutividade térmica de milho triturado pelo método da sonda. *Ciência e tecnologia de alimentos*, v.17, n.3, p.242-247, **1997**.

15. Silans, A. L.; Da Silva, F. M.; Barbosa, F. A. R. R. Determinação in loco da difusividade térmica num solo da região de caatinga (PB). *Bras. Ci. Solo*, v.30, p.41-48, **2006**.

16. Sousa, T. N. Modelagem matemática para estimativa da difusividade térmica: Experimentação em pasta de pequi e massa de tomate. Anápolis, **2009**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Química Industrial). Universidade Estadual de Goiás (UEG).

Laís S. de Moura[1], Ana C. Teixeira[1], Nathália G. Cardoso[1], Orlene S. Costa[1], Valter H. C. Silva[1,2], José S. Sales[1] & Heibbe C. B. de Oliveira[2].

[1] Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, P.O. Box 459, 75001-970, Anápolis, GO, Brazil.

[2] Instituto de Química, Universidade de Brasília, 70919-970, Brasília, DF, Brazil.

*e-mail: fatioleg@ueg.br

# Aplicação de Indicadores Ácido-Base na Determinação Espectrofotométrica de Amônia em Água por Análise em Fluxo

Edmar I. Melo, Nívia M. M. Coelho & Danilo A. Giarola

O trabalho propõe o uso de indicadores ácido-base para detecção espectrofotométrica acoplada a análise por injeção em fluxo. O comportamento da banda de absorção da fenolftaleína em 552nm foi usado para monitorar o nitrogênio amoniacal total (N-$NH_3$ Total) e o comportamento da banda de absorção do púrpura de bromocresol, 440nm, foi proposto para detecção de espécies acidas. Amostras de água do rio Uberabinha (Uberlândia-MG) apresentaram índice de qualidade de água para ambientes aquáticos aceitáveis em 50% dos pontos avaliados, considerando o parâmetro N-$NH_3$ Total e os valores estabelecidos na resolução federal CONAMA 357.

**Palavras-chave:** *indicador ácido-base, amônia, injeção em fluxo.*

The work proposes the use of acid-base indicators for spectrophotometric detection coupled to flow injection analysis. The behavior of the absorption band of phenolphthalein at 552 nm was used to monitor the ammoniac nitrogen ($NH_3$-N) and the behavior of the absorption band of bromocresol purple, 440 nm, was proposed for detection of acidic species. Samples of water of the Uberabinha River in the city Uberlandia – MG showed index of water quality for aquatic environments acceptable in 50% of the points evaluated considering the parameter ammoniac nitrogen ($NH_3$-N) and the values established in the CONAMA resolution 357.

**Keywords:** *acid-base indicator, ammonia, flow injection.*

# Introdução

A amônia apresenta-se em ambientes aquáticos na forma molecular, amônia, $NH_3$, também conhecida como amônia não-ionizada, e na sua forma iônica, amônio, $NH_4$+. Devido à importância da amônia não-ionizada, tornou-se uma convenção na literatura científica expressar a toxicidade da amônia em termos desse composto. Critérios e padrões de qualidade da água seguiram essa convenção[1,2]. Neste estudo o termo amônia é genérico, utilizado para referir-se às formas $NH_3$ e $NH_4^+$ em água, indistintamente, sendo assim será adotada a seguinte terminologia: amônia ou amônia total ($NH_3$ e $NH_4^+$).

A amônia pode estar presente naturalmente em águas superficiais ou subterrâneas, sendo que usualmente sua concentração é muito baixa devido à sua fácil adsorção em partículas do solo ou sofrer oxidação formando nitrito e nitrato. Entretanto, a ocorrência de concentrações elevadas pode ser resultante de fontes de poluição, como oriunda do uso ou fabricação de fertilizantes, da refrigeração industrial. Uma fonte comum de contaminação da água com $NH_3$ é o esgoto doméstico *in natura* em áreas altamente povoadas[3].

O aspecto ambiental mais conhecido da $NH_3$ talvez seja como nutriente que juntamente com o fósforo, favorecem o fenômeno de eutrofização. Ela não representa uma substância de grande toxicidade para o ser humano, sendo inclusive adicionada à água potável para permitir um tempo de residência maior do cloro residual no sistema de distribuição[4,5]. Estudos têm mostrado que a presença de matéria orgânica e amônia são responsáveis em pela diminuição da qualidade destas águas, afetando o equilíbrio das comunidades aquáticas[6,7].

A forma não-ionizada é muito mais tóxica que a iônica, certamente graças a sua capacidade de difusão através da membrana epitelial dos organismos aquáticos. Estudos mais recentes sobre a toxicidade crônica da amônia em ambientes aquáticos, publicados pela Environmental Protection Agency (EPA)[1,2] são definidos em função do pH e da temperatura. A toxicidade da amônia adotada pela EPA foi incorporada pela Resolução Federal CONAMA 357, onde os valores máximos para águas de classe 1, 2 e 3 estão estabelecidos[1,8].

Os métodos mais utilizados para a determinação de Ntotal são o de Kjeldahl, que é essencialmente um procedimento de oxidação úmida e o método de Dumas, que é basicamente uma técnica de oxidação seca (combustão)[9,10]. Estas técnicas são mais adequadas para amostras sólidas como solo, sedimentos, alimentos e comparáveis quando a concentração de nitrogênio é de aproximadamente 200 mg $kg^{-1}$.

Entre os métodos espectrofotométricos mais sensíveis, está o método do indofenol que é utilizado principalmente para análise de águas. Este método se baseia na formação do composto azul de indofenol (reação de Berthelot), resultante da reação do íon amônio com um composto fenólico, na presença de um agente oxidante e de um catalisador[11]. É um método que apresenta altos desvios do branco, e na faixa de concentração micromolar, a precisão é raramente melhor que cerca de 10%[12].

A determinação de nitrogênio amoniacal em sistemas de análises em fluxo tem empregado principalmente potenciometria, espectrofotometria UV-Vis e condutimetria, envolvendo em geral difusão gasosa[13,14]. Métodos espectrofotométricos diretos, por exemplo, o do azul de indofenol, acoplados em sistemas de análises em fluxo tem sido usados[15,16]. O acoplamento da análise de injeção em fluxo por difusão gasosa e detecção espectrofotométrica, proporciona um método de análise que apresenta sensibilidade, freqüência analítica alta, limite de detecção e limite de quantificação, compatíveis com os valores estabelecidos na legislação[13].

O presente trabalho propõe o uso de dois indicadores ácido-base para detecção espectrofotométrica acoplada com analise por injeção em fluxo, onde a fenolftaleína foi usada para monitorar nitrogênio amoniacal total em água e o púpura de bromocresol foi proposto para monitorar espécies ácidas. Estes dois compostos são moléculas orgânicas cromóforas que absorvem na região do visível, cuja sensibilidade à concentração de íons $H^+$ permite indicar o grau de acidez do ambiente onde estão inseridos. Esta propriedade advém do fato deles próprios serem substâncias ácidas ou básicas fracas e que tem seu sistema cromóforo fortemente influenciado pelo grupamento ácido/básico, bem como podendo ser decorrente de modificações estruturais complexas[17].

# Parte Experimental

## INSTRUMENTAÇÃO

O sistema de fluxo empregado na determinação de amônia total está representado na figura 1.

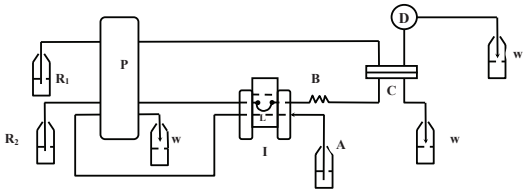



**Figura 1.** Sistema de fluxo proposto para determinação de amônia total. $\mathbf{R_1}$: solução de indicador ácido-base, $\mathbf{R_2}$: hidróxido de sódio 0,01 mol $L^{-1}$, **P**: bomba peristáltica, **W**: descarte, **L**: alça de amostragem de 250 µL, **I**: injetor comutador, **A**: amostra ou soluções padrões, **B**: bobina de reação de 25,0 cm, **C**: unidade de difusão gasosa, **D**: detector espectrofotométrico. **Vazão:** 3,6 mL/min.

As soluções são impulsionadas por uma bomba peristáltica Gilson, modelo Minipuls 3 com 8 canais, utilizando tubos de tygon® para bombeamento. Tubos de polipropileno de 1,0mm de diâmetro são usados para construção do sistema de fluxo. A unidade de comutação para a introdução das amostras e padrões é um injetor comutador circular[18,19]. Os espectros eletrônicos das soluções aquosas dos indicadores, foram obtidos em um Espectrofotômetro HACH DR-4000U. As leituras de absorbância no sistema em fluxo foram realizadas com Espectrofotômetro Femto modelo 600S Plus. Para separação da amônia foi utilizada uma unidade de difusão gasosa com membrana de teflon®[20].

## REAGENTE

Todos os reagentes utilizados neste trabalho são de grau analítico e foram empregados sem purificação prévia. Foi preparada uma solução estoque de sulfato de amônio (Merck) de 100 mg $L^{-1}$ usada no preparo das soluções padrões de 2, 4, 5, 10, 15, 20, 25 mg $L^{-1}$. Solução de fenolftaléina (Synth) 1,6 x $10^{-2}$ mol $L^{-1}$ e solução de púpura e de bromocresol (3',5"- Dibromo-o-Cresolsulfonoftaleína, Synth) 1 x 10-3 mol $L^{-1}$. Solução de hidróxido de sódio (Merck) 0,1 mol $L^{-1}$. Os demais compostos utilizados nas soluções foram: o fosfato de sódio dibásico heptahidratado (Cinética), ácido cítrico anidro (Isofar).

## AMOSTRAS

As amostras de água foram coletadas em frasco de polietileno, e acidificadas com solução de ácido sulfúrico 10% até pH 2,0. Foram acondicionadas sobre refrigeração numa temperatura de 4ºC até realização das análises, num prazo máximo de sete dias.

As amostras de água foram coletadas da bacia hidrográficas do rio Uberabinha no município de Uberlândia-MG (figura 2)

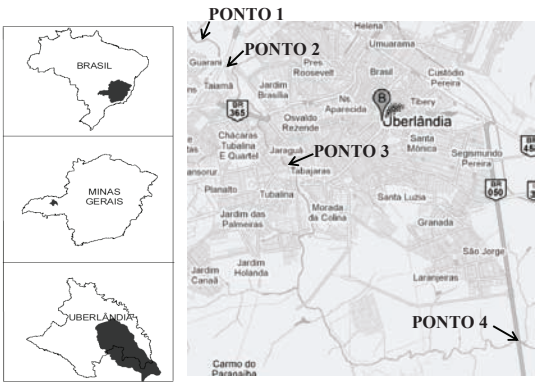



**Figura 2.** Mapa do município de Uberlândia com destaque para os pontos de coleta de amostra ao longo do Rio Uberabinha.

O ponto 4 se localiza sob a Br-050 (rodovia que liga o município às cidades de Uberaba-MG e Riberão Preto-SP). Este ponto encontra-se após a estação de tratamento e abastecimento de água do Sucupira e antes da área urbana, portanto sem recebimento de esgoto doméstico. O ponto 3 está localizado próximo ao centro da cidade, sob a ponte da avenida Getúlio Vargas. O ponto 2 está localizado sob o Anel Viário Ayrton Senna, próximo ao distrito Industrial. O ponto 1 está localizado na zona rural da cidade, após ter recebido a carga de efluentes domésticos, industriais e águas pluviais dos bairros próximos ao seu leito.

# Resultados e discussão

Um indicador é um par conjugado de ácido e base de Brønsted-Lowry cujo ácido apresenta uma coloração e a base outra, ou seja, apresentam bandas de absorção em comprimentos de onda diferentes na região UV – Visível. Algumas vezes uma das duas espécies é incolor, não absorve nesta região do espectro eletromagnético[21,22,23]. A conversão entre as duas espécies, pode ser representada

pelos equilíbrios da figura 3 (Púrpura de Bromocresol) e figura 4 (fenolftaleína).

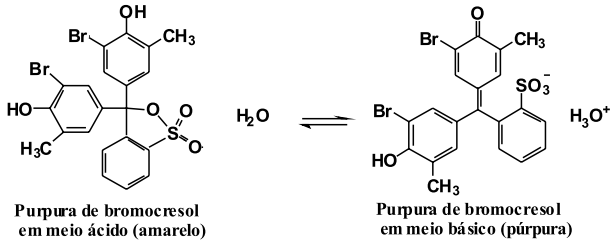



**Figura 3.** Equilíbrio ácido-base do indicador púrpura de bromocresol

O espectro de absorção para o púrpura de bromocresol obtido em pH 8,70 descrito na figura 5-f, apresenta uma banda em 590 nm ($\varepsilon \sim 2{,}1 \times 10^6$ mol$^{-1}$ L cm$^{-1}$), atribuída a transições $\pi$-$\pi^*$ da espécie aniônica (púrpura). A medida que o pH diminui essa banda desaparece e surge uma banda em 440nm ($\varepsilon \sim 0{,}7 \times 10^6$ mol$^{-1}$ L cm$^{-1}$) associada à formação da espécie neutra (amarela). A presença de um ponto isosbéstico em 446 nm confirma a existência de um equilíbrio simples conforme proposto na figura 3[24].

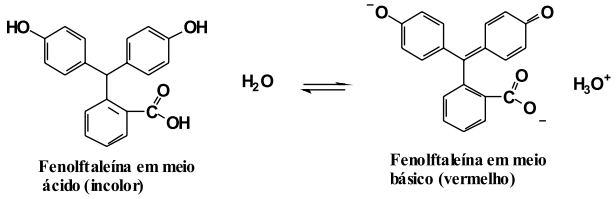



**Figura 4.** Equilíbrio ácido-base do indicador fenolftaleína

O comportamento da banda em 440 nm do púrpura de bromocresol, observado na figura 6, pode ser usado como proposta de detecção acoplada ao sistema de fluxo descrito na figura 1. A intensidade de absorção de luz a 440nm responde linearmente a variação de pH do meio, para valores de pH entre 4,5 a 7,5. Desta forma uma solução deste indicador com pH ajustado para aproximadamente 7,5 poderá ser usada para monitorar espécies ácidas que permeiam a membrana da unidade de difusão gasosa (figura 1). A espécie acida provoca o deslocamento do equilíbrio descrito na figura 3 no sentido de aumentar a concentração do indicador na forma neutra, causando um aumento na absorção, de forma proporcional à concentração da espécie ácida que permeia a membrana.

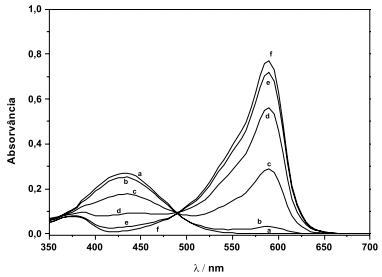



**Figura 5.** Espectro de absorção do indicador Púrpura de Bromocresol. [Indicador]= 1,0 x 10 $^{-4}$ mol L$^{-1}$; t = 28 º C; (a) pH= 3,20; (b) pH = 4,70; (c) pH = 5,97; (d) pH = 6,66; (e) pH = 7,40; (f) pH = 8,70.

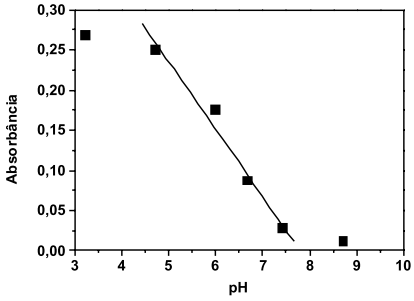



**Figura 6.** Intensidade de absorção do indicador púrpura de bromocresol a 440 nm em função do pH

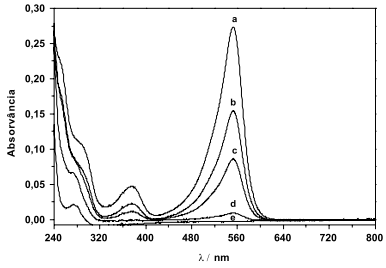



**Figura 7.** Espectro de absorção do indicador fenolftaleína. [Indicador]= 8,0 x 10 $^{-4}$ mol L$^{-1}$; t = 29 º C; (a) pH= 10,28; (b) pH = 9,93; (c) pH = 9,61; (d) pH = 8,83; (e) pH = 8,25.

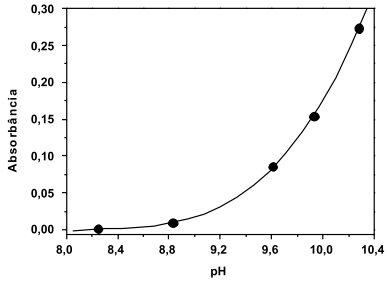



**Figura 8.** Intensidade de absorção do indicador fenolftaleína a 552 nm em função do pH

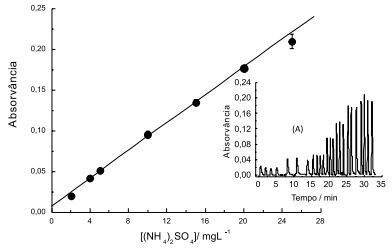



**Figura 9.** Curva analítica padrão .(A) Fiagrama referente às soluções padrões de sulfato de amônio (2, 4, 5, 10, 15, 20 e 25 mg $L^{-1}$); Detecção a 552 nm. Linearidade: Abs =0,00776 + 0,00853 [$N\text{-}NH_{3Total}$]; coeficiente de correlação = 0,99336 .

O espectro de absorção para fenolftaleína em pH 10,28 descrito na figura 7, apresenta uma banda em 552 nm ($\varepsilon \sim 2{,}7 \times 10^4$ $mol^{-1}$ L $cm^{-1}$), atribuída a transições $\pi$-$\pi$* da espécie aniônica(vermelho) e outra banda de menor intensidade em 375 nm ($\varepsilon \sim 0{,}5 \times 104$ $mol^{-1}$ L $cm^{-1}$). A media que o pH vai aumentando a banda em 552 nm aumenta sua intensidade devido ao deslocamento do equilíbrio descrito na figura 4, no sentido de aumentar a concentração do indicador na forma aniônica.

Este comportamento da banda em 552 nm foi usado como proposta de detecção acoplada ao sistema de fluxo descrito na figura 1. Observa-se pela figura 8 uma baixa sensibilidade entre pH 8,0 e 9,4 e uma alta sensibilidade entre pH 9,5 e a 10,4. Desta forma uma solução deste indicador com pH ajustado entre 8,0 e 10,5 poderá ser usada para monitorar espécies alcalinas que permeiam a membrana da unidade de difusão gasosa (figura 1). A espécie básica provoca o deslocamento do equilíbrio descrito na figura 4 no sentido de aumentar a concentração do indicador na forma aniônica. O aumento da absorção em 552 nm é proporcional à concentração da espécie alcalina que permeou na membrana. Para a determinação de amônia, foi construído curva analítica padrão usando soluções padrões de sulfato de amônio (figura 9). Usando uma solução de fenolftaleína de $8{,}0 \times 10^{-4}$ mol $L^{-1}$ e pH igual a 9,6, foi observado um coeficiente de correlação de 0,99336 confirmando uma correlação acima de 0,90 entre a resposta analítica e a concentração de nitrogênio amoniacal total ($N\text{-}NH_{3\ total}$). Nota-se na figura 9-A que a linha base possui desvio padrão baixo. As variações inerentes ao método, podem ter sido causadas pela difusão de outros gases como, por exemplo, $CO_2$, através da membrana, e sua inserção, com o passar do tempo, na solução de fenolftaleína, originado do ambiente. Esta oscilação na linha base não se mostrou uma barreira para a quantificação de amônia total. Observa-se que trabalhando com uma solução de fenolftaléina com pH ajustado para 9,6 obteve-se um limite de detecção de 0,2 mg $L^{-1}$, limite de quantificação de 0,5 mg $L^{-1}$, e uma sensibilidade de 0,00853 Abs/ $mgL^{-1}$, enquanto que trabalhando com uma solução de fenolftaleína com um pH ajustado para 8,6 o limite de detecção e quantificação aumentaram para 1,3 mg $L^{-1}$ e 3,9 mg $L^{-1}$, respectivamente. A sensibilidade diminuiu para 0,0079 Abs/ $mgL^{-1}$. Este aumento nos limites de detecção e quantificação e a diminuição na sensibilidade, estão em conformidade com o comportamento da fenolftaleína observados na figura 8, que para o valor de pH igual a 8,6 a resposta analítica não aumenta sensivelmente como em pH igual a 9,6.

Usando o módulo de análise descrito na figura 1, e solução de fenolftaleína com pH igual a 9,6 foram analisadas amostras de água do rio Uberabinha, coletadas em quatro ponto (Figura 2) e os resultados da intensidade de absorção e concentração de nitrogênio amoniacal total são mostrados na figura 10 e tabela 1, respectivamente.

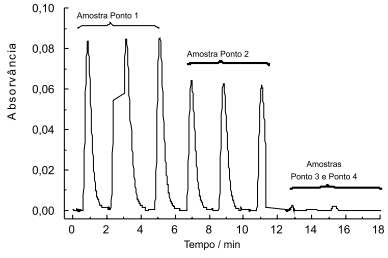



**Figura 10.** Fiagrama referente às amostras de água do rio Uberabinha

A portaria 518 de 25 de março de 2004, do Ministério da saúde, não coloca a NH3 entre as substâncias químicas que representam risco à saúde humana, mas dentro do contexto dos padrões de aceitação para consumo humano, ressalta seu efeito organoléptico. Desta maneira a portaria 518 estabeleceu o valor de 1,5 mg $L^{-1}$ de NH3 total. Por outro lado a amônia ganha relevância quando se trata dos ecossistemas aquáticos, cujo objetivo é a proteção aos elementos da flora e fauna aquática.

A Resolução Federal CONAMA 357 estabelece que corpos hídricos classe 2, como do rio Uberabinha devem manter como uma de suas funções ecológicas o equilíbrio das comunidades aquáticas. Em seu artigo 34,

parágrafo primeiro postula que "O efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeito tóxico aos organismos aquáticos no corpo receptor...".

**Tabela 1.** Concentração de nitrogênio amoniacal total em amostras de água coletadas em diferentes pontos do rio Uberabinha no município de Uberlândia-MG.

| Ponto de Coleta | [NH3]/ mg L-1 |
|---|---|
| P1 | 8,99 ± 0,07 |
| P2 | 6,46 ± 0,13 |
| P3 | **** |
| P4 | **** |

**** valor menor que o LD do método.

Este instrumento legal sustenta e abre caminho para um índice de qualidade das águas voltado para a proteção das comunidades aquáticas, pois além de explicitar a necessidade da manutenção da vida aquática, alerta para que este fato seja norteador do controle de fontes emissoras de poluentes.

Os resultados observados na tabela 1, apresentam valores de $N\text{-}NH_{3\ Total}$ abaixo de 0,2 mg $L^{-1}$ para os pontos 3 e 4 independentes do pH das amostras. Estes valores encontram-se abaixo do limite máximo estabelecido pela resolução 357, sendo assim estes pontos, segundo este parâmetro, são possuidores de um índice de qualidade de água aceitável para as comunidades aquáticas. No entanto o ponto 1 e 2 apresentaram valores de 8,99 e 6,46 mg $L^{-1}$ $N\text{-}NH_{3\ Total}$, repectivamente e um pH igual a 7,6, portanto acima do valor estabelecido pela resolução 357, não apresentando para este parâmetro um índice de qualidade de água para comunidades aquáticas aceitável.

# Conclusões

O uso dos indicadores ácido-base para detecção espectrofotométrica acoplada com Análise de Injeção em Fluxo por difusão gasosa, apresentou sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação, compatíveis com os limites estabelecidos na legislação. O comportamento da banda de absorção em 552nm da fenolftaleína se mostrou eficiente para monitorar níveis de nitrogênio amoniacal total em água. De forma semelhante o comportamento da banda de absorção em 440nm do púrpura de bromocresol surge como proposta de detecção para espécies ácidas, acoplado a análise de injeção em fluxo por difusão gasosa.

O índice de qualidade de água para proteção de comunidades aquáticas, considerando os níveis de nitrogênio amoniacal total, da bacia do rio Uberabinha, mostrou-se bom para os pontos 3 e 4, exceto para os pontos 1 e 2 onde deve ser feito um controle das fontes de poluição, para que valores deste parâmetro, nestes pontos do rio apresentem-se abaixo do limite máximo estabelecido na resolução CONAMA 357.

# Agradecimentos

Ao Instituto de Química da UFU e à FAPEMIG.

# Referências


1. Silva, G. S.; Jardim, W.F.; Quim. Nova, Vol. 29, (4), 689-694, **2006**.
2. Environmental Protection Agency of United State (USEPA); Update of ambient water quality criteria for ammonia – EPA 822-R-99-014, Washington, **1999**.
3. Brion, N.; Billen, G.; Wat.Res., 34 (12), 3213-3221, **2000**.
4. Regan, J.M.; Harrington, G.W.; Baribeau, h.; deleon, R. e Noguera, D.N.; Water Res., 37, 197-205, **2003**.
5. Batalha, B.H.L. & Parlatore, A.C.; CETESB, **1993**.
6. Silva, G. S.; Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, **2004**.
7. Comitê das Bacias Hídricas dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí; Relatório Zero, Piracicaba, **2000**.
8. Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA); Resolução no 357 de 15 de março de 2005. Brasília, DF, **2005**.
9. Bremner, J. M.; American Society of Agronomy Inc.: Publisher USA, p. 1149-1178, **1965**.
10. Keeney, D. R.; Bremner, J. M.; Soil Sci., 104, 358, **1967**.
11. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater; 20th ed., American Public Health Association: Washington, 4-99 e 4-1241, **1998**.
12. Yasuhara, T.; Nokihara, K.; J. Agric. Food Chem., 49, 4581, **2001**.
13. Faria, L.C.; Pasquini, C. Anal. Chim. Acta.; 245, 183-190, **1991**.
14. Reis, B.F.; Krug, F.J.; Vieira, J.A.; Giné, M.F.; J. Braz. Chem. Soc.; 8, 523-528, **1997**.
15. Searle, P.L. The Analyst, 109, p.549-568, **1984**.
16. VanStaden,J.F.;Taljaard,R.E.;Anal.Chim.Acta.;344,281-289,**1997**.

17. Baccan, N; Andrade, J.C.; Godinho, O.E.S.; Barone, J.S.; Química Analítica Quantitativa Elementar; 3ª edição. Editora Edagard Blücher Ltda: São Paulo, **2001**.

18. Miranda, C.E.S.; Reis, B.F. e Baccan, N.; Quím. Nova, 19, 623, **1996**.

19. Olsen S.; Pessenda, L.C.R.; Ruzicka, J.; Hansen, E.H.; Analyst, 108, 905, **1981**.

20. Araújo, C.S. T.; Carvalho, J. L.; Mota D. R.; Araújo,C.L.; Coelho, N.M.M.; Food chem. 92, 765–770, **2005**.

21. Harris, D. C.; Análise Química Quantitativa, 5ª ed. LTC Ed.: Rio de Janeiro, **2001**.

22. Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.; Fundamentals of Analytical Chemistry, 6a ed., Saunders College Pub.: Fort Worth, **1992**.

23. Atkins, P.W.; Físico-Química, 6a ed., LTC- Livros Técnicos e Científicos Ed. S.A. ; Rio de Janeiro, **1999**.

24. Espenson, J.; Chemicol Kinetics and Reaction Mechanisms. McGraw-Hill Book Co.: New York, **1981**.

Edmar I. Melo, Nívia M. M. Coelho & Danilo A. Giarola.

Universidade Federal de Uberlândia, CEP 38400.902, Uberlândia/MG

*e-mail: edmarisaias@yahoo.com.br

# Synthesis and Characterization of Polyvinyl Alcohol-Polyaniline-Glutaraldehyde Composite Disc: a Probable Matrix for Protein Immobilization

Samantha S. Caramori, Kátia F. Fernandes & Luiz B. Carvalho-Júnior

Neste trabalho são apresentados os resultados da síntese e caracterização de um compósito de álcool polivinílico-glutaraldeído-polianilina (PVAG-PANIG). O compósito foi analisado por espectros de infravermelho e absorção UV-visível e por análise termogravimétrica. As análises de microscopia eletrônica de varredura e da superfície dos poros demonstraram que o PVAG-PANIG é um material macroporoso. O material também apresentou condutividade elétrica em baixa temperatura. O compósito preservou características do PVA (hidrofilicidade, possibilidade de ser moldado à mão) e da PANI (propriedades eletrocrômicas). As propriedades encontradas neste material sugerem que possa ser utilizado como suporte em técnicas de imobilização de proteínas.

**Palavras-chave:** *PVA, PANI, imobilização de proteínas.*

This work presents the results from the synthesis and characterization of a composite of polyvinyl alcohol-glutaraldehyde-polyaniline-glutaraldehyde discs (PVAG-PANIG). The composite was analyzed through infrared spectra, UV-visible absorption and themogravimetric analysis. Scanning electron microscopy and surface porosity analysis showed that PVAG-PANIG is a macroporous material. Electrical conductivity was detected at low temperatures. The composite preserved some properties from the PVA (hydrophilicity, hand molding) and PANI (electrochromical properties). The properties found in this material suggest that it could be used as a support for protein-immobilization applications.

**Keywords:** *PVA, PANI, protein immobilization*.

# Introduction

Synthetic organic polymers are materials whose chemical diversity and versatility make them the most investigated compounds for biotechnological applications. Many properties of these polymers are exploited in industry. In the field of biochemical engineering for example, several synthetic polymers have been used to solve problems such as prosthesis implants, development of electrochemical cells, and support for enzyme immobilization in construction of biosensors or bioreactors.

Polyaniline (PANI) is a widely studied polymer and has received much attention from researchers in the last 30 years. There are many properties that make polyaniline a versatile material, such as its environmental stability, [1] electrochemical behavior,[2, 3] simple acid-base doping/de-doping chemistry,[4, 5] thermal stability, [6, 7] optical properties[8] and low cost of its synthesis. [9] Moreover, the property of electrical conductivity and the capacity to immobilize biomolecules have made polyaniline a component in biosensors.[10, 11, 12, 13, 14]

Nevertheless, polyaniline presents some disadvantages. PANI has been described by some authors to be intractable because of its high thermal stability and insolubility. [1, 15, 16] Moreover, the polymer resulting from the chemical synthesis process is a fine powder which is difficult to separate from the solvent because of its dispersibility property.[1]

To overcome these problems, preparation of PANI-based composites or blends is considered a very promising alternative in that both the functional properties of PANI and the mechanical properties of the matrix can be simultaneously preserved.[16]

One of the polymers frequently used as support in composite structures is polyvinyl alcohol (PVA). This organic polymeric material has great flexibility, hydrophilicity, transparency, crystalinity, biodegradability and biocompatibility properties, and can be shaped during its synthesis. Because of these properties PVA was used as a polymer stabilizer,[17, 18] as a remover of agricultural pesticides,[19] as a model of mass transfer,[20] as a chromatographic matrix gel[21] and as a matrix for protein immobilization.[22, 23]

In our research group amylase, xantine oxidase,[24] peroxidase,[25] glucoamylase[26] and some antigens of tropical diseases were covalently immobilized on PANI and PVA.[23, 27, 28] Here we present a synthesis and characterization of PVA-glutaraldehyde discs coated with polyaniline, named PVAG-PANIG. This material is based on the synthesis of the PVA-glutaraldehyde network followed by the chemical synthesis of polyaniline on the surface of the network. As a consequence, we obtained a composite which has a mixture of hydrophilic/hydrophobic groups, has electrochromic properties and the advantages of a few number of steps for synthesis as well as lower costs. Finally, PVAG-PANIG composite can be removed from the bulk of chemical reactions manually allowing them to have more precise control.

# Experimental

## SUPPORT SYNTHESIS

PVAG-PANIG discs were synthesized according to Araújo *et al*.[22] and Fernandes *et al*.[5] Briefly: PVA (Vetec Química Fina, Brazil; 200 mg) was dissolved in distilled water (10 mL) by heating at 65 ºC and 25% (v/v) of glutaraldehyde (Vetec Química Fina, Brazil; 1.5 mL) was added. This mixture was vigorously stirred for 50 min after which aliquots (20 µL) were introduced into flat wells of microplates (Mumc, Denmark) containing 3.0 mol $L^{-1}$ HCl (120 µL). The microplates containing the network of PVA cross-linked with glutaraldehyde (PVAG) were incubated for 24 h at 25 ºC. Afterwards, the discs (1.0 g) were treated with 0.61 mol $L^{-1}$ ammonium persulphate (Carlo Erba, Italy) prepared in 2.0 mol $L^{-1}$ HCl for 30 min. Then the treated discs (1.0 g) were incubated with 0.44 mol $L^{-1}$ aniline (Merck, Germany) for 60 min to allow the PANI to be formed. The PVAG-PANI discs (1.0 g) were thoroughly washed with 2.0 mol $L^{-1}$ HCl, incubated with 2.5% (v/v) glutaraldehyde at 60 ºC and finally washed five times in succession with 0.1 mol $L^{-1}$ sodium phosphate buffer, pH 7.6.[16] These discs (PVAG-PANIG) were kept at 4 ºC in a 0.1 mol $L^{-1}$ sodium phosphate buffer pH 7.6.

## PVAG-PANIG CHARACTERIZATION

### Spectrophotometry

PVA, PVAG and PVAG-PANIG discs were analyzed by infrared spectra (FT-IR; KBr method) in the spectral

range 400-4000 $cm^{-1}$ (Hartman & Braun MB series - Michelson). Visible-ultraviolet spectrophotometry analyses of the PVAG and PVAG-PANIG were carried out in the range of 250-900 nm with 2 nm intervals (Beckmann DU-70, Beckmann Instruments GmbH, Germany).

**Thermal gravimetry (TGA)**

Discs of PVAG-PANIG (15 mg) previously stored in phosphate buffer 0.1 mol $L^{-1}$ pH 7.0 were washed in distilled water, dried using filter paper (Whatman n. 1) and then transferred to a thermo-analyzer (Shimadzu DTG 60H). To avoid discs deformation no dehydration step was used in this procedure. The samples were heated from 23 ºC to 800 ºC using the following heating rates: 5 ºC $min^{-1}$ in the 23 ºC-250 ºC range; 2 ºC $min^{-1}$ in 251 ºC-700 ºC and 5 ºC $min^{-1}$ in the 701- 800 ºC.

**Surface Area Analysis**

The surface area measurements of the PVAG-PANIG discs were carried out by using an accelerated surface area and porosimetry analyzer (ASAP 2010, Micromeritics Corporate Headquarters, USA). The initial mass of the sample was 0.072 g with $P/P_0$ equal to 0.200 and the pore measurement capacity of 1.7 at 35 nm.

**Scanning electron microscopy**

The discs were first dehydrated in acetone solutions from 30% (v/v) to 100% (v/v) and dried at the critical point (Balzers, model CPD 030, England). Samples were fixed on stubs followed by metallization with gold in an argon atmosphere. Finally, they were analyzed by scanning electron microscopy (JEOL JSM-840A, Japan).

**Electrical conductivity**

PVAG-PANIG discs were submitted to electrical conductivity variation using a Keithley 602 electrometer at 40 V and the temperature ranging from -146 ºC to 18.7 ºC (126.6 K to 291.67 K).

# Results and Discussion

About 240 discs of 15 mg (PVAG-PANIG) were synthesized using the procedure described here (11.5 mL of the mixture and three microplates) and typical discs are shown in Figure 1, namely, PVAG disc (yellow, transparent) and PVAG-PANIG disc (dark green).

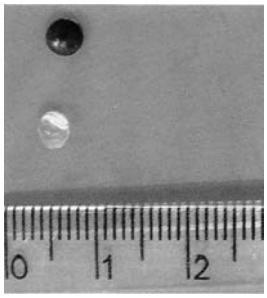



**Figure 1.** Discs of PVAG (yellow) and PVAG-PANIG (dark green).

The synthesis of PVAG-PANIG was monitored by infrared spectra in the three stages: PVA, PVAG and PVAG-PANIG (Figure 2) and the pattern of the bands from polyvinyl alcohol, glutaraldehyde and polyaniline were observed. It is possible to observe peaks at the region of the 3400 $cm^{-1}$ in all the stages, related to the stretching of -OH from the PVA.[29, 30] Figure 2C shows a band at 2942 $cm^{-1}$, related to the presence of $-CH_2$ groups.[30] Another band from PVA was found at 1429 $cm^{-1}$ related to the -OH deformation (Figures 2A-C). Additionally, the spectrum of PVA (Figure 2A) indicates an elevated isotacticity degree in the sample used in this work (1140 $cm^{-1}$). Carbonyl bands from glutaraldehyde were observed at the 1700 $cm^{-1}$ region in Figures 2B and 2C[31, 32, 33] and at 2840 $cm^{-1}$. Mansur *et al.*[32] explained the presence of the carbonyl bands in PVA-glutaraldehyde preparations as an incomplete reaction of the glutaraldehyde with –OH groups from PVA during the crosslinking network formation. This can be an advantage for covalent immobilization processes, when a glutaraldehyde arm is necessary to link support and immobilize enzymes.

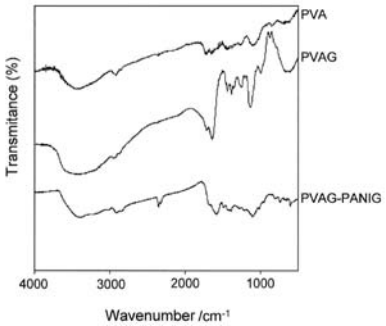



**Figure 2.** Infrared spectra of the PVA, PVAG and PVAG-PANIG. Samples were prepared using KBr pellet technique.

The bands from polyaniline in Figure 2C revealed a predominance of 1577 $cm^{-1}$ under 1500 $cm^{-1}$. This finding, according to Melo *et al*.,[31] indicates that the polyaniline content in the PVAG-PANIG disc appears in the reduced form, named leucoemeraldine. These authors explain that this feature is based on the hypothesis of redox interactions occurring between glutaraldehyde and polyaniline, yielding the aldehyde groups from the first compound to carboxyl radicals and the quinoid structures from polyaniline to benzenoid groups (leucoemeraldine).

*In situ* visible-ultraviolet spectra (Table 1) showed peaks from PVA and PVAG-PANIG. In 250-300 nm there is a region correspondin g to the chemical groups from polyaniline. Tang *et al*.,[33] studying optical properties from polyaniline and some derivatives, related a peak at 208 nm and suggest it as a $\pi$–$\pi^*$ electron transition within the benzenoid segments. According to these authors, a peak at 300 nm is originated from the charged cationic species known as polarons. Other peak at 320 nm in PVAG-PANIG spectrum confirms this finding.[18]

One band identified in PVAG spectra was at 280-300 nm, generally found when glutaraldehyde is present.[34] It was not possible to observe peaks at 280 nm or 330 nm, related to carbonyl functionality of PVA.[17] We believe this is a consequence of the crosslinking action of glutaraldehyde.

**Table 1**. In situ visible-ultraviolet spectrophotometry of the PVAG and PVAG-PANIG. Samples were prepared using one solid disc of PVAG or PVAG-PANIG.

| | **Bands/Peaks** | **Reference** |
|---|---|---|
| PVAG | 280-300 nm | [34] |
| PVAG-PANIG | 250-300 nm | [33, 34] |
| | 320 nm | [18] |

Thermal gravimetry analysis of the PVAG-PANIG is presented in Figure 3. Weight loss was observed in the ranges 50-100 ºC, 200-300 ºC and 400-450 ºC. The first one (64.04% of weight loss) was attributed to water evaporation from the composite. The hydrophilic behavior of PVA, due to its high hydroxyl content, makes it a polymer able to interact with water molecules. Since PVAG-PANIG samples used in this procedure were washed and stored in a phosphate buffer environment we believe this high water content is also due to the presence of the buffer in the pores of the discs. Phosphate buffer was chosen, in this case, to preserve the support surface and to avoid glutaraldehyde oxidation that occurs in the oxygen atmosphere.

The second loss between 200-300 ºC (72.51-75.32 % of weight loss) was attributed to the chemical alterations of the PVA structure, according to Helen *et al*.,[35] and to Holland and Hay.[36] These authors compared the TG pattern with the infrared bands in the TA-FTIR spectroscopy analysis. According to them the thermal degradation of PVA between 260 and 290 ºC showed keto-enol tautomerization (1705 $cm^{-1}$) and the formation of small amounts of alkyne units (2050 $cm^{-1}$). In this range (200-300 ºC) there is a lost reported to HCl evaporation[7] used in PANI-doping.

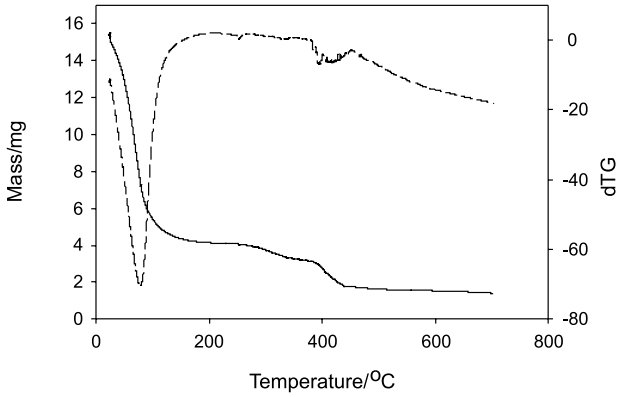



**Figure 3.** Thermal gravimetry analysis of the PVAG-PANIG. Straight line represents weight loss (mg) and dash line shows the resulting derivative transformation for thermogravimetry.

The weight loss above 400 ºC is related to the thermal decomposition of the carbon backbone of PVA and PANI, according to Gangopadhyay *et al*.,[18] Helen *et al*.,[35] and Wei and Hsueh.[7] Finally, at the end of the thermal treatment 10% of residues did not presented any weight loss. This is according to some PANI TGA analyses, and show that the presence of the buffer did not alter the inorganic composition of the PVAG-PANIG discs.[18, 37]

Figure 4 presents the results from the porosity analysis of the PVAG-PANIG. Under the analysis condition (0-40 nm), PVAG-PANIG discs presented a small number of pore sizes from 5 to 35 nm in diameter (mesopores

range). The major adsorbed volume was attributed to the number of pores with a diameter greater than 35 nm. Pore volume capacity varied from 0.9 x $10^{-4}$ $cm^3$ $g^{-1}$ to 3.58 x $10^{-4}$ $cm^3$ $g^{-1}$.

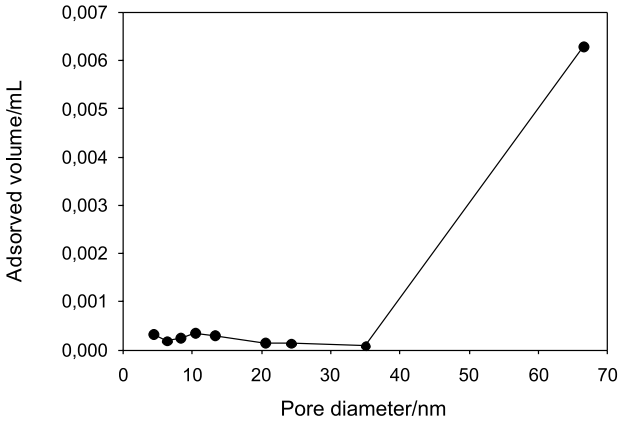



**Figure 4.** Pore distribution for PVAG-PANIG.

PVAG-PANIG adsorption analysis (Figure 5) displayed a behavior comparable to the isotherms of type IV (pore size greater than 50 nm in diameter) proposed by Brunauer in 1938.[38, 39] On the other hand, the pore area measurement of the PVA has been reported to be type I (microporous materials) according to Zhang *et al*.[29] We hypothesize that polymerization of aniline during support preparation had covered PVA's micropores.

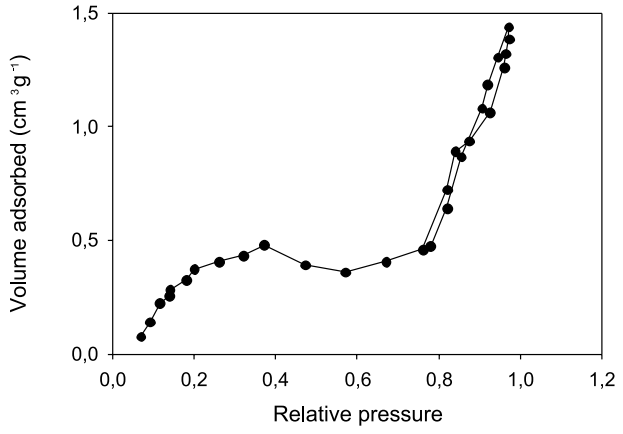



**Figure 5.** PVAG-PANIG adsorption isotherm.

The absence of micropores in the PVAG-PANIG can also be confirmed by the scanning electron microscopy (Figure 6) that shows the presence of depressions and protuberances 500 nm apart from each other. According to Gregg and Sing[37] this is a characteristic of the macroporous structure (pore size greater than 50 nm). This feature can be an advantage when an enzyme which recognizes voluminous substrate/product is immobilized at the surface of the disc of PVAG-PANIG. A macroporous structure permits the transit of a substrate from the bulk of the reaction to the microenvironment of an immobilized enzyme, with less mass transfer limitations.

Figure 7 presents data related to the influence of temperature on the electrical resistance of the PVAG-PANIG. No change in the electrical conductivity/resistance was observed in the 120-240 K range (-153 to -73 ºC). After that, a dramatic decrease occurred yielding a resistance equal to about 106 Ω. Similar conductivity variation influenced by the temperature has been reported for PVA and PANI.[14, 35, 40] This phenomenon observed for PANI is explained by the HCl evaporation responsible for the conductivity properties of the polymer.[6, 7, 14] Moreover, the use of glutaraldehyde as a chemical arm may cause an increase in the benzoid content in the PANI structure,[31] promoting a decrease in the conductivity by decreasing the quinoid-benzoid pair at the polymer. Finally, the incubation of the PVAG-PANIG discs in alkaline buffer solution could enhance the counter ion dissociation and hence, reduce the conductivity of the composite produced in this work.

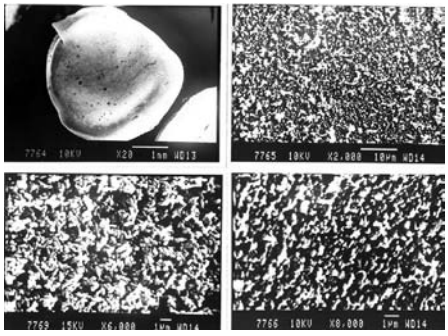


**Figure 6.** Scanning electronic microscopy of PVAG-PANIG.

# Conclusions

PVAG-PANIG composite discs were synthesized via a glutaraldehyde network. Properties from PVA and PANI could be identified by infrared and UV-Vis spectra, and by

TG analysis. At room temperature, PVAG-PANIG appears to be a hydrophilic and non-conductive macroporous composite. The SEM surface studies indicated that PANI recovered the PVA matrix. The properties of the composite produced in this work, namely hydrophilicity, the presence of reactive groups and macroporosity are very interesting, and suggest that this material is a promising support for protein immobilization.

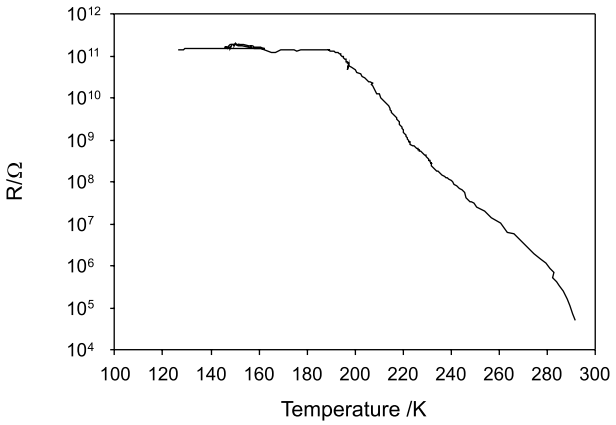



**Figure 7.** The influence of the temperature on the electrical resistance of the PVAG-PANIG.

# Acknowledgements

The authors are thankful to the Brazilian National Research Council (CNPq) for financial support, to the Instituto de Química (Universidade Federal de Goiás) and the Laboratório de Microscopia Eletrônica (Universidade de Brasília) for equipments employed in this work.

# References

1. Wang, Y.; Jing, X.; *Mater. Sci. Eng., B* **2007**, *138*, 95.
2. MacDiarmid, A. G.; Chiang, J. C.; Halpern, M.; Huang, W. S.; Um, S. L.; Somasiri, N. L. D.; Wu, W.; Yaniger, S.; *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1985**, *121*, 173.
3. Asturias, G. E.; MacDiarmid, A. G.; Maccall, R. P.; Epstein, A. J.; *Synth. Met.* **1989**, *29*, E157.
4. Avlyanov, J. K.; Min, Y.; MacDiarmid, A. G.; Epstein, A. J.; *Synth. Met.* **1995**, *72*, 65.
5. Fernandes, K. F.; Lima, C. S.; Pinho, H.; Collins, C. H.; *Process Biochem.* **2003**, *38*, 1379.
6. Hagiwara, T.; Yamaura, M.; Iwata, K.; *Synth. Met.* **1988**, *25*, 243.
7. Wei, Y.; Hsueh, K. F.; *J. Polym. Sci., Part A: Polymer Chemistry* **1989**, *27*, 4351.
8. Dutta, K.; De, S. K.; *Mater. Lett.* **2007**, *61*, 4967.
9. Azevedo, W. M.; Souza, J. M.; Melo, J. V.; *Synth. Met.* **1999**, *100*, 241.
10. Arora, K.; Prabhakar, N.; Chand, S.; Malhotra, B. D.; *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *23*, 613.
11. Singh, S.; Solanki, P. R.; Pandey, M. K.; Malhotra, B. D.; *Sens. Actuators, B* **2006**, *115*, 534.
12. Fernandes, K. F.; Lima, C. S.; Lopes, F. M.; Collins, C. H.; *Process Biochem.* **2005**, *40*, 3441.
13. Purcena, L. L. A.; Caramori, S. S.; Mitidieri, S.; Fernandes, K. F.; *Mater. Sci. Eng., C* **2009**, *29*, 1077.
14. Ramanathan, K.; Ram, M. K.; Malhotra, B. D.; Murthy, A. S. N.; *Mater. Sci. Eng., C* **1995**, *3*, 159.
15. Qiang, J.; Yu, Z.; Wu, H.; Yun, D.; *Synth. Met.* **2008**, *158*, 44.
16. Caramori, S. S.; Fernandes, K. F. *Mater. Sci. Eng., C* **2008**, *28*, 1159.
17. Jayasekara, R.; Harding, I.; Bowater, I.; Christie, G. B. Y.; Lonergan, G. T. *Polym. Test.* **2004**, *23*, 17.
18. Gangopadhyay, R.; De, A.; Ghosh, G.; *Synth. Met.* **2001**, *123*, 21.
19. Alemzadeh, I.; Vossoughi, M.; *Chem. Eng. Process.* **2002**, *41*, 707.
20. Han, M.; Zhao, B.; Zhang, X. M.; Zhang, W. J.; *Chem. Eng. Process.* **2008**, *47*, 245.
21. Sawatsubashi, T.; Tsukahara, C.; Baba, K.; Ohi, E.; Shinoda, A.; Miura, N.; *J. Chromatogr., A* **2008**, *1177*, 138.
22. Araújo, A. M.; Neves Jr, M. T.; Azevedo, W. M.; Oliveira, G. G.; Ferreira Jr, D. L.; Coelho, R. A. L.; Figueiredo, E. A. P.; Carvalho Jr, L. B.; *Biotechnol. Techniques* **1996**, *112*, 67.
23. Barbosa, G. H. T. S.; Santana, E. M.; Almeida, A. M. P.; Araujo, A. M.; Fatibello, O.; Carvalho Jr, L. B.; *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2000**, *33*, 823.
24. Nadruz Jr, W.; Marques, E. T. A.; Azevedo, W. M.; Lima-Filho, J. L.; Carvalho Jr, L. B.; *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1996**, *29*, 347.
25. **Fernandes,** K. F.; Lima, C. S.; Lopes, F. M.; Collins, C. H.; *Process Biochem.* **2004,** *39*, 957.
26. Silva, R. N.; Asquieri, E. R.; Fernandes, K. F.; *Process Biochem.* **2005**, *40*, 1155.
27. Carvalho Jr, L. B.; Araujo, A. M.; Almeida, A. M. P.; Azevedo, W. M.; *Sens. Actuators, B* **1996**, *35-36*, 427.
28. Araujo, A. M.; Barbosa, G. H. T. S.; Diniz, J. R. P.; Malagueno, E.; Azevedo, W. M.; Carvalho Jr, L. B.; *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **1997**, *39*, 155.
29. Zhang, S. J.; Yu, H. Q.; Feng, H. M.; *Carbon* **2006**, *44*, 2059.
30. Bhat, N. V.; Nate, M. M.; Kurup, M. B.; Bambole, V. A.;

Sabharwal, S.; *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* **2005**, *237*, 585.

31. Melo, J. V.; Bello, M. E.; Azevedo, W. M.; Souza, J. M.; Diniz, F. B.; *Electrochim. Acta* **1999**, *44*, 2405.
32. Mansur, H. S.; Sadahira, C. M.; Souza, A. N.; Mansur, A. A. P.; *Mater. Sci. Eng., C* **2008**, *28*, 539.
33. Tang, Q.; Wu, J.; Sun, H.; Lin, J.; Fan, S.; Hu, D.; *Carbohydr. Polym.* **2008**, *74*, 215.
34. Margel, S.; Rembaum, A.; *Macromolecules* **1980**, *13*, 19.
35. Helen, M.; Viswanathan, B.; Murthy, S. S.; *J. Power Sources* **2006**, *163*, 433.
36. Holland, B. J.; Hay, J. N.; *Polymer* **2001**, *42*, 6775.
37. Thangarathinavelu, M.; Tripathi, A. K.; Goel, T. C.; Varma, I. K.; *J. Appl. Polym. Sci.* **1994**, *51*, 1347.
38. Gregg, S. J.; Sing, K. S. W.; *Adsorption, Surface Area and Porosity*, Academic Press: London, 1982.
39. Teixeira, V. G.; Coutinho, F. M. B.; Gomes, A. S.; *Quím. Nova* **2001**, *24*, 808.
40. Yang, C. C.; Lin, S. J.; Hsu, S. T.; *J. Power Sources* **2003**, *122*, 210.

Samantha S. Caramori[1,3]*, Kátia F. Fernandes[2] & Luiz B. Carvalho-Júnior[3].

[1]Universidade Estadual de Goiás, Caixa Postal 459, BR 153 Km 98, 75132-903 Anápolis-GO.

[2]Universidade Federal de Goiás, Caixa Postal 131, 74001-970 Goiânia-GO.

[3]Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Morais Rego, Campus Universitário, 50670-910, Recife-PE.

*e-mail: samantha.salomao@ueg.br

# Técnicas de Imobilização de Enzimas

Kátia F. Fernandes, Claudinei S. Lima & Flavio M. Lopes

A imobilização de enzimas constitui uma das áreas da tecnologia enzimática que reúne um conjunto de técnicas através das quais esses catalisadores podem ser utilizados repetida e continuamente. O principal objetivo de se imobilizar enzimas é obter maiores vantagens no uso de enzimas em contraposição às desvantagens de alto custo e baixa estabilidade das preparações. Vários métodos de imobilização são conhecidos, e neste trabalho, alguns métodos clássicos são descritos e analisados.

**Palavras-chave:** *enzimas, imobilização de enzimas, estabilidade enzimática.*

Enzyme immobilization is a field of the enzymatic technology that utilizes techniques which permit enzymes to be repeatedly and continuously used. The principal interest in enzyme immobilization is to increase the advantages inherent in the use of these catalysts while decreasing the disadvantage of high cost and low stability. There are several methods used for enzyme immobilization and those more widely applied are described.

**Keywords:** *enzymes, enzyme immobilization, enzyme stability.*

# Introdução

A história de enzimologia, a ciência que estuda as enzimas, se confunda com a historia da bioquímica. Ambas tiveram seu início no século dezenove, com as investigações pioneiras sobre os processos de fermentação e digestão. A primeira *Teoria Geral de Catálise Química* foi postulada pelo químico Jacob J. Berzelius, em 1835, partindo da observação de que extratos de malte, chamados na época de "diastase" e que hoje se sabe contém uma mistura de amilases, catalisava a hidrólise de amido mais eficientemente do que ácido sulfurico[1].

Quase dois séculos depois, a química continua a ser o sustentáculo para a elucidação dos mecanismos envolvidos na catálise enzimática. Por outro lado, a complexidade e grande número de reações ocorrendo simultaneamente nos sistemas vivos fazem da bioquímica um instrumento essencial para a compreensão das implicações biológicas dessas reações. A expansão do conhecimento e aplicações desse tipo de catálise nos dias atuais, com todas as vantagens que lhe são inerentes, tem convocado a participação cada vez mais efetiva daqueles que detêm o conhecimento das ciências químicas e bioquímicas, para solução de alguns problemas.

Por definição, enzimas são proteínas que tem, por característica funcional, a capacidade de catalisar reações. Estes catalisadores biológicos que apresentam uma alta especificidade pela reação que catalisam. Tal característica, aliada ao fato de que enzimas operam em condições de reação amenas, tais como pH neutro, pressão atmosférica e temperaturas próximas à do ambiente, desde longa data atraíram a atenção de muitos pesquisadores e industriais para o desenvolvimento de processos utilizando esses catalisadores[2]. No entanto, um dos entraves para o seu uso disseminado reside no custo de obtenção e purificação, assim como na baixa estabilidade das enzimas em solução, o que encarece o processo e, portanto, o produto final. Recentemente, a busca por tecnologias utilizando enzimas vem recebendo novo impulso, no intuito de atender às normas ISO 9000 e 14000, que estabelecem padrões de qualidade para produtos e dão ênfase ao menor consumo energético e baixo impacto ambiental dos processos[2].

Neste contexto, uma das técnicas poderosas, que vêm sendo empregadas no sentido de explorar as vantagens da catálise enzimática e de minimizar suas desvantagens, é a imobilização de enzimas.

Uma das definições mais abrangentes de enzimas imobilizadas é a que considera imobilizadas "enzimas que estão fisicamente confinadas, ou localizadas em certa região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser usadas repetidamente e continuamente"[3].

Como descrito por Kennedy e White[4], o primeiro relato sobre a imobilização de enzimas foi de Nelson e Griffin que, em 1916, verificaram que invertase adsorvida em carvão ativado mantinha sua atividade e não era retirada com as lavagens. Desde esta época, vários métodos de imobilização foram desenvolvidos. É preciso ter em mente o sistema onde a enzima imobilizada será utilizada no momento da escolha do método de imobilização, uma vez que cada método traz em si limitações que precisam ser consideradas. A ligação de enzimas a suportes insolúveis é o método mais antigo e mais utilizado para imobilização[4] e, apesar de existir atualmente uma diversidade muito grande de métodos, a presente revisão enfatizará os métodos mais clássicos.

**Métodos para imobilização de enzimas**

Há vários meios de se classificar os métodos utilizados para imobilizar enzimas. Kennedy & White[4] propuseram uma classificação que combina a natureza da interação responsável pela imobilização com a natureza do suporte utilizado (Figura 1). Nessa classificação, o termo enzimas solúveis designa os métodos em que a enzima permanece na mesma fase em que estão os substratos (reagentes) e os produtos da reação, enquanto o termo enzimas insolúveis designa aquelas que, após imobilização em material sólido, passam a constituir fase diferente do meio de reação, geralmente líquido.

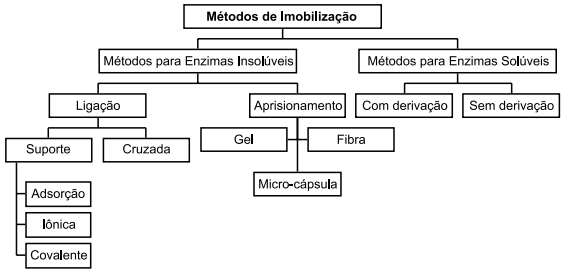



**Figura 1.** Classificação dos Métodos de Imobilização[4].

**Métodos para imobilização de enzimas solúveis**

Nestes métodos, as enzimas mantêm sua solubilidade inalterada e são separadas do restante da solução por membranas semipermeáveis, fibras porosas ou membranas de ultrafiltração. De modo geral, neste processo ocorre a contenção da enzima livre em uma câmara ou compartimento, através do qual o substrato (reagente) passa e é convertido em produto. Deste modo, é possível utilizar continuamente a enzima, na sua forma nativa, por períodos prolongados de tempo. As membranas utilizadas neste tipo de imobilização variam muito em sua composição química e tamanho de poro, podendo ser de natureza química bem simples como as de policarbonato[5] (Figura 2) ou mais complexas como as de compósitos de óxido de alumínio/polietilenoimina/polianilina[6].

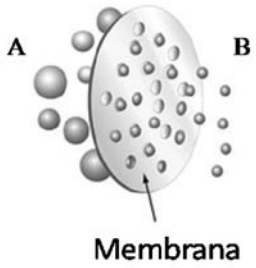



**Figura 2.** Membrana de Policarbonato fazendo a separação de compartimento – Compartimento A: Enzima e substrato; Compartimento B: saída do produto[5].

**Imobilização sem modificação química da enzima**

Neste método a enzima nativa é aprisionada em uma câmara por uma membrana ou fibra, que são impermeáveis à molécula de enzima, mas são amplamente permeáveis às moléculas de substrato ou produto[4]. Trata-se de uma técnica extremamente simples, em que a enzima não sofre qualquer alteração em seu micro-ambiente. No entanto, há algumas restrições a sua ampla aplicação, uma vez que os produtos da reação devem ser moléculas pequenas, capazes de passar através dos poros do sistema.

**Imobilização com modificação química da enzima**

Este método consiste primariamente em modificar quimicamente a molécula de enzima, através da ligação de compostos de massa molar variada sem, no entanto, alterar a solubilidade da enzima nativa ou sua atividade catalítica. Deste modo, a enzima modificada adquire massa molar e diâmetro maior, permitindo a sua retenção com o uso de membranas com porosidade elevada, as quais facilitam o processo de difusão entre os ambientes, seja do substrato, seja do produto.

**Métodos para Preparação de Enzimas Insolúveis**

Nos métodos de enzima insolúvel, a enzima sofrerá modificação em sua solubilidade, passando a operar em fase diferente daquela do solvente, onde estarão presentes os substratos e para onde, via de regra, deverão retornar os produtos da reação. Nestes métodos, a molécula de enzima sofre tanto modificação química como no seu microambiente.

**Aprisionamento**

O método de aprisionamento consiste em aprisionar ou enclausurar a molécula de enzima dentro de uma matriz polimérica, de forma que seja possível a entrada do substrato e saída do produto, mas não da enzima. O método se subdivide, de acordo com o material utilizado, em aprisionamento em gel, onde são usados materiais tais como o ágar[7], poliacrilamida[8,9], gelatina[10,11] e alginato[8,11,12] (Figura 3), e aprisionamento em fibra (Figura 4) em que o acetato de celulose é um exemplo típico[13,14]. Uma terceira subdivisão diz respeito ao aprisionamento em nano/microcápsulas[15] (Figura 5), onde as enzimas são retidas dentro de membranas poliméricas, preparadas à partir de material semi-permeável que permitem a difusão do substrato e do produto[16,17].

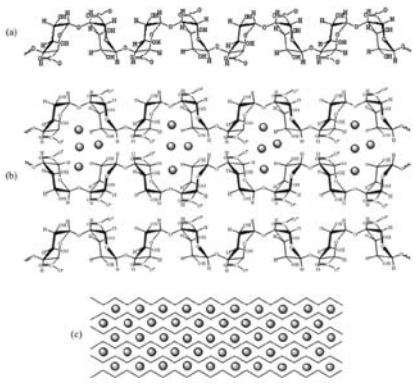


**Figura 3.** Formação do gel de alginato de cálcio: (a) homopolímeros de unidade de ácido gulurônico em solução; (b) ligação entre as cadeias homopoliméricas através dos íons cálcio situados entre os grupos com carga negativa aprisionando a enzima no interior da matriz; (c) formação da rede de gel com cadeias homopoliméricas com enzimas aprisionadas[12].

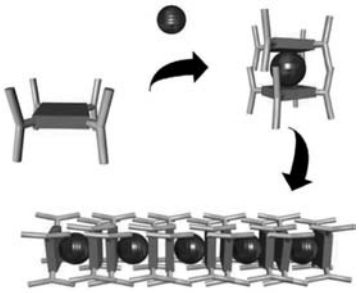


**Figura 4.** Aprisionamento em fibras[14].

### Ligação ao suporte

O método consiste na ligação da enzima a suportes insolúveis, gerando assim uma segunda fase diferente do meio reacional, onde a enzima se encontra fixada, e pode ser subclassificado de acordo com o tipo de ligação da enzima com o suporte.

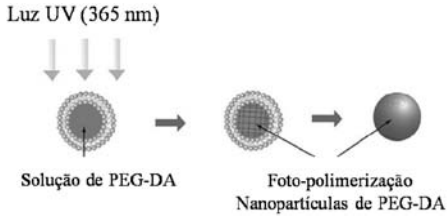



**Figura 5.** Preparação de nanopartículas de hidrogel. Nanopartículas contendo solução de Poli(etileno glicol) - Diacrilato (PEG-DA)[5].

### Ligação ao suporte por adsorção

Neste método de imobilização, grupos superficiais do suporte interagem com grupos de superfície da enzima, através de atrações eletrostáticas ou dipolares (forças de van der Waals) ou ainda pontes de hidrogênio[18]. O tipo predominante de interação depende da natureza química e propriedades superficiais do suporte e da enzima em questão[18]. A técnica, relativamente simples, consiste basicamente na mistura do suporte insolúvel à solução de enzima, sob condições apropriadas, seguida da separação do suporte contendo a enzima adsorvida do meio de reação.

Considerando as forças envolvidas no processo de adsorção, podemos inferir que a eficiência deste método depende de variáveis tais como pH, força iônica do meio e a natureza do solvente empregado, bem como da relação entre a concentração da enzima e do suporte. Assim sendo, após imobilização é necessário um cuidado especial para que as condições ótimas de imobilização sejam mantidas, para que o sistema se mantenha inalterado, o que, de certa forma, limita a aplicação destes sistemas[19]. Apesar disto, a simplicidade e rapidez desta técnica preserva seu uso nos dias atuais com vastos exemplos de enzimas imobilizadas por adsorção[20-24].

### Ligação Iônica

No método de imobilização por força iônica, o suporte possui grupos funcionais ionizáveis característicos, os quais irão interagir especificamente com grupos da enzima. No processo, é possível que algum tipo de adsorção ocorra simultaneamente. Entretanto, a força da interação iônica é maior do que a de adsorção e, portanto, prevalece.

Para se obter o máximo de eficiência neste método, é necessário cuidado na escolha da solução iônica com propriedades tamponantes que será o meio para a enzima a ser ligada, de forma que seja compatível com o suporte e favoreça a substituição dos íons deste pelos grupos ionizados da enzima[18].

De modo semelhante ao que ocorre com as preparações de enzimas imobilizadas por adsorção, as condições ótimas de imobilização devem ser continuamente monitoradas a fim de se preservar a integridade do sistema, em especial o pH e força iônica do meio onde a preparação será utilizada, o que também serve como limitante para a aplicação destes sistemas[25-28].

Este método tem sido frequentemente utilizado na construção de biossensores em que a polianilina atua como polímero condutor depositado sobre o eletrodo (carbono vítreo, platina, ouro). A síntese de polianilina feita eletroquimicamente resulta em polímero carregado positivamente. Assim, a enzima poderá interagir ionicamente com o polímero em valores de pH abaixo do valor do pI[29] (Figura 6).

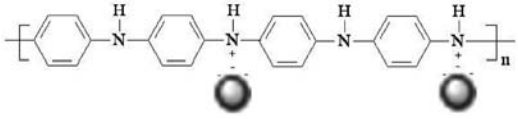


**Figura 6.** Imobilização por interação iônica em polianilina negativamente carregada[29].

### Ligação covalente ao suporte

A imobilização de enzimas através da formação de ligações covalentes entre um grupo ligante da enzima e o suporte insolúvel é um dos métodos mais largamente

utilizados e investigados[28,30]. Este método emprega os mais variados tipos de ligação, sendo possível imobilizar uma enzima através de qualquer um de seus grupos superficiais reativos. Assim sendo, há uma gama imensa de reações que podem ser utilizadas para imobilização via ligação covalente[31-39].

Cuidado especial deve ser tomado para que grupos importantes para o desempenho da atividade catalítica não sejam envolvidos na formação da ligação covalente entre enzima e suporte, o que teria como conseqüência uma enzima retida desprovida de atividade.

Inconvenientes desta técnica incluem as condições mais drásticas e maior número de etapas de reação e, conseqüentemente, mais tempo para sua realização. No entanto, uma vez imobilizada adequadamente, essas preparações apresentam grande estabilidade, de forma que somente alterações muito drásticas no meio serão capazes de interferir neste tipo de ligação[4].

Um dos métodos mais largamente utilizados para imobilização por ligação covalente é o uso de vidro ou materiais derivados de sílica. Nestes materiais é comum o tratamento para ampliação da quantidade de grupos reativos através de silanização, seguida de introdução do braço espaçador de glutaraldeído que atuará como ponto de ligação para e enzima[40] (Figura 7).

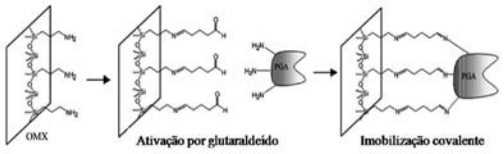



**Figura 7.** Imobilização covalente de Xerogel Organicamente Modificado (OMX) por multipontos[40].

### Ligação Cruzada ou *Cross-linking*

A insolubilização de enzimas por este método envolve a formação de ligação covalente entre moléculas de enzima e reagentes bifuncionais de baixa massa molar, formando agregados unidos por ligações intermoleculares. Vários meios distintos são disponíveis para o preparo de derivados insolúveis de enzimas por ligação cruzada, usando reagentes bifuncionais de baixa massa molar[41-43]. O sucesso da reação depende das condições experimentais e varia de acordo com a enzima e o reagente escolhido. Dentre os diversos reagentes bifuncionais existentes, destacamos o glutaraldeído como o reagente de primeira escolha, que continua a ser freqüentemente utilizado nos dias atuais em função de sua rápida reação com os grupos amino superficiais na molécula de enzima[38,41]. Outro reagente muito utilizado é a carbodiimida em função de sua fácil reação com grupos carboxilas[44,45]. O caráter reversível ou não das reações de imobilização por ligação cruzada e, portanto, a estabilidade da ligação obtida, depende do tipo de reagente bifuncional[31].

Um aspecto importante a ser ressaltado é o fato de que o método de ligação cruzada, tal qual descrito aqui, não envolve a associação da enzima com um suporte sólido. O produto da ligação de várias moléculas de enzimas através de reagentes bifuncionais é que se torna insolúvel e precipita, formando um agregado sólido cataliticamente ativo (Figura 8).

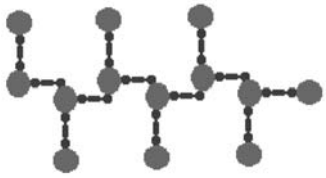


**Figura 8.** Imobilização por ligação cruzada "Cross-linking"

### A Escolha do Método de Imobilização

A escolha do método de imobilização a ser utilizado para a imobilização de uma determinada enzima passa, necessariamente, por uma análise da aplicação a que se destina o sistema contendo a enzima imobilizada. Uma vez definida a aplicação e, portanto, as condições operacionais onde a enzima deverá atuar, podem-se então avaliar, dentre as técnicas disponíveis, aquela que melhor se adeque às necessidades exigidas. Isso posto, é importante avaliar o tempo e os custos necessários para se viabilizar o método de imobilização escolhido, uma vez que tais parâmetros irão se refletir no processo e, portanto, nos custos do produto final.

## Referências


1. Voet, D.; Voet, J.G.; *Biochemistry*, Wiley: New York, **1995**, p. 332.
2. Bom, E.; Em: *Tecnologia Enzimática*. Bom, E.; Pereira Jr.; Fundação Biblioteca Nacional: Rio de Janeiro, **1999**, p. 17.
3. Chibata, I.; Tosa, T.; Sato, T.; Mori, T.; Em: *Immobilized Enzymes - Research and Development*. Chibata, I.; Wiley: New York, **1978**, p.1.

4. Kennedy, J. F.; White, C. A.; Em: *Handbook of Enzyme Biotechnology*. Wiseman: New York, **1986**, p. 147.

5. Se Yong An, S. Y.; Bui, M. N.; Nam, Y. J.; Han, K. N.; Li, C. A.; Choo, J.; Lee, E. K.; Katoh, S.; Kumada, Y.; Seong, G. H.; *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *331*, 98.

6. Oliveira, G.B.; Lima-Filho, J.l.; Chaves, M.E.C.; Azevedo, W.M.; Carvalho-Jr, L.B.; *Reactive and Functional Polymers*, **2008**, *68*, 27.

7. Tuoping, L.; Suhong, L; Na, W; Lirui, T. *Food Chem.* **2008**, *109*,703.

8. Lee, S. Y.; Min, B. H.; Hwang, S. H.; Koo, Y. M.; Lee, C. K.; Song, S. W.; Oh, S. Y.; Lim, S. M.; Kim, S. L.; Kim, D. I.; *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 1033.

9. Kumarl, S.; Dwevedi, A.; Kayastha, A.M.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *58*, 138.

10. Habibi-Moini, S.; D'mello, A. P.; *Int. J. Pharmaceut.* **2001**, *215*, 185.

11. Emregul, E.; Sungur, S.; Akbulut, U.; *Food Chem.* **2006**, *97*, 591.

12. Kawaguti, H. Y.; Sato, H. H.; *Quim. Nova*. **2008,** *31*, 134.

13. Kurokawa, Y.; Suzuki, K.; Tamai, Y.; *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *59*, 651.

14. Shirakawa, M.; Fujita, N.; Shimakoshi, H.; Hisaeda, Y.; Shinkai, S.; *Tetrahedron*. **2006**, *62*, 2016.

15. Seong, G.H.; Zhan, W; Crooks, R.M.; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3372.

16. Crecchio, C.; Ruggiero, P.; Pizzigallo, M. D. R.; *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *48*, 585.

17. Parthasarathy, R. V.; Martin, C. R.; *Nature*. **1994**, *369*, 301.

18. Vichenewski, W.; Em: *Introdução a Métodos Cromatográficos.* Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S.; 6.ed.; Editora da UNICAMP: Campinas, **1995**, p. 59.

19. Messing, R. A.; *Meth. Enzymol.* **1976**, *44*, 148.

20. Kirkor, E. S.; Scheeline, A.; *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 6278.

21. Yang, Y.; Um, S.; *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *432*, 71.

22. Ruzgas, T.; Gorton, L.; Emnéus, J.; Marko-Varga, G.; *J. Electroanal. Chem.* **1995**, *391*, 41.

23. Tatsuma, T.; Ariyama, K.; Oyama, N.; *Anal. Chem. Acta*. **1996**, *318*, 297.

24. Silva, L. R. D.; Gushiken, Y.; Kubota, L. T.; *Coll. Surf. B: Biointerfaces* **1996**, *6*, 309.

25. Lim, S.; Lee, K. Y.; Lee, Y. B.; Song, K. B.; *Biotechnol Lett.* **2001**, *23*, 1335.

26. Jang, K. H.; Song, K. B.; Kim, J. S.; Kim, C. H.; Chung, B. H.; Rhee, S. K.; *Bioprocess. Eng.* **2000**, *23*, 89.

27. Ivanova, V.; Dobreva, E.; Legoy, M. D.; *Acta Biotechnol.* **1998**, *18*, 339.

28. Abdel-Naby, M. A.; Ismail, A. M. S.; Ahmed, S. A.; Fattah, A. F. A.; *Biores. Technol.* **1998**, *64*, 205.

29. Chen, C.C.; Gu, Y.; *Biosensor and Bioelectronics*, **2008**, *23*, 765.

30. Kennedy, J. F.; Cabral, J. N.; *Meth. Enzymol.* **1987**, *135*, 117.

31. Zaborski, O. Em: *Immobilized Enzymes*; Weast, R. C.; CRC Press:Cleveland, **1974**, p. 62.

32. Nahar, P.; Wali, N. M.; Gandhi, R. P.; *Anal. Biochem.* **2001**, *294*, 148.

33. Wang, P.; Daí, S.; Waezsada, S. D.; Tsao, A. Y.; Davison, B. H.; *Biotechnol Bioeng.* **2001**, *74*, 249.

34. Arica, M. Y.; Yavuz, H.; Denizli, A.; *J. Appl. Polymer Sci.* **2001**, *81*, 2702.

35. Dessouki, A. M.; Issa, G. I.; Atia, K. S.; *J. Chem. Technol. Biotechno.* **2001**, *76*, 700.

36. Balcao, V. M.; Mateo, C.; Fernandez-Lafuente, R.; Malcata, F. X.; Guisan, J. M.; *Biotechnol. Prog.* **2001**, *17*, 537.

37. Silva, K. F. F.; *Tese de Doutorado*, Universidade de Campinas, Brasil, **2000**.

38. Wada, S.; Ichikawa, H.; Tatsumi, K.; *Biotechnol. Bioeng*; **1993**, *42*, 854.

39. Lopes, F.M.; Miidieri, S.; Fernandes, K.F.; *Revista Processos Químicos*, **2008**, *4*, 83.

40. Basso, A.; De Martin, L.; Ebert, C.; Gardossi, L.; Linda, P.; Sibilla, F.; *Tetrahedron Let.* **2003,** *44*, 5889.

41. Tyagi, R.; Gupta, M. N.; *Biochemistry-Moscow*; **1998**, *63*, 334.

42. Yang, Z.; Williams, D.; Russell, A.; *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *45*, 10.

43. Billiar, K.; Murray, J.; Laude, D.; Abraham, G.; Bachrach, N.; *J Biomed. Mat. Res.* **2001**, *56*, 101.

44. Dijkstra, P. J.; Zeeman, R.; Feijen, J.; *Macromolec. Symp*. **2001**, *172*, 11.

45. Palmisano, F.; Quinto, M.; Rizzi, R.; Zambonin; *Analyst* **2001**, *126*, 866.



Kátia F. Fernandes[1], Claudinei S. Lima[2,3] & Flavio M. Lopes[1,2,3]*.

[1]Universidade Federal de Goiás, Cx. Postal 131, 74001-970 Goiânia, GO.

[2]Universidade Estadual de Goiás - Br 153 nº 3.105 - Fazenda Barreiro do Meio - Caixa Postal:459, Anápolis, GO.

[3]Faculdade Anhanguera de Anápolis, Anhanguera Educacional S.A. Av. Universitária, 683, Centro CEP: 75080-150 Anápolis, GO.

*e-mail: flaviomarx@hotmail.com

# Decomposição dos Antirretrovirais Lamivudina e Zidovudina pelo Processo Fotofenton Assistido no Efluente de Indústria Farmoquímica

Sonia J. O. Souza, Tatiane M. Lobo, Alline L. O. Sabino, Sérgio B. Oliveira & Orlene S. Costa

Os princípios ativos utilizados na formulação de medicamentos compõem os contaminantes presentes na estação de tratamento de indústria farmacêutica. Visando alternativas que levem a soluções eficazes, os processos oxidativos avançados (POA) têm atraído grande interesse da comunidade científica e industrial. Foram realizadas degradações dos antirretrovirais (lamivudina - 3TC e zidovudina - AZT), por oxidação, fotodegradação e foto-oxidação, presentes em efluentes de uma indústria farmoquímica do Estado de Goiás. A investigação da decomposição do 3TC e AZT foi realizada por HPLC. O POA por Fotofenton assistido é uma alternativa aos tratamentos convencionais que reforça sua importância tecnológica, ambiental e econômica.

**Palavras-chave:** *efluente, lamivudina, zidovudina.*

The active ingredients used in the formulation of drugs make up the contaminants in wastewater treatment of pharmaceutical industry. Seeking alternatives that lead to effective solutions, the advanced oxidation processes (AOP) has attracted great interest from the scientific community and industry. Were performed degradation of antiretrovirals (lamivudine (3TC) and zidovudine (AZT)), by oxidation, photodegradation and photo-oxidation, present in the effluent of a pharmaceutical chemistry industry in the State of Goiás. The investigation of the decomposition of AZT and 3TC was performed by HPLC. The AOP by photo-assisted Fenton is an alternative to conventional treatments that reinforces the importance of technological, environmental and economic.

**Keywords:** *wastewater, lamivudine, zidovudine.*

# Introdução

Os antirretrovirais são drogas que inibem a reprodução do HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) no sangue. A combinação desses medicamentos para fins terapêuticos é popularmente conhecida como "coquetel", ou tecnicamente, como terapia antirretroviral. Esta terapia conta atualmente, segundo informação do Ministério da Saúde[1], com dezessete medicamentos, dividida em quatro classes de inibidores: 1) transcriptase reversa análogos de nucleosídeos ou nucleotídeos (ITRN); 2) transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN); 3) protease (IP); e 4) fusão (IF).

Souza e Storpirtis[2] reportam que os esquemas posológicos combinados têm se mostrado mais eficazes na supressão da replicação viral. Isto foi publicado em estudos comparando vários tratamentos associando as seguintes combinações: 2 ITRN, 2 ITRN + IP, 2 ITRN + ITRNN. Estes estudos demonstraram que o uso da terapia tripla (três drogas) contendo antirretrovirais proporcionou decréscimo plasmático de ácido ribonucléico do HIV 1 em níveis abaixo do limite de detecção. Além disso, a terapêutica antirretroviral utilizando apenas um fármaco ocasiona, frequentemente, a seleção de cepas resistentes.

A dupla de análogos de primeira escolha para compor o sistema triplo é a associação lamivudina + zidovudina (3TC + AZT), porque possui maior potencial de adesão, menor toxicidade, promove aumento da supressão viral, previne a resistência aos fármacos e tem posologia mais simples, segundo o Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmitidas (DST) e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) do Ministério da Saúde[1].

A lamivudina e a zidovudina são classificados como inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (Figura 1). A lamivudina, ou 3TC, é uma das grandes descobertas na área dos nucleosídeos antivirais, sendo que, os L-nucleosídeos podem ter uma atividade biológica extraordinária por serem seletivos contra certos vírus, minimizando os efeitos colaterais graves. Já a zidovudina ou AZT, um azido nucleosídeo derivado da timidina, foi o primeiro agente anti-HIV do tipo 2-3 dideoxinucleosídio aprovado em 1987 pelo FDA (*Food and Drug Admistration*), seu efeito colateral mais comum é a anemia, cujos sintomas são palidez, cansaço e tonteiras[3,4].

Assim, a indústria farmacêutica vem disponibilizando no mercado substâncias com propósito terapêutico, isto tem se tornado um grave problema ambiental, deixando em alerta as agências controladoras do ambiente[5]. Tanto os princípios ativos quanto os insumos utilizados na formulação de medicamentos, como a lamivudina e zidovudina, compõem os contaminantes presentes na estação de tratamento de efluente (ETE) de uma indústria farmacêutica.

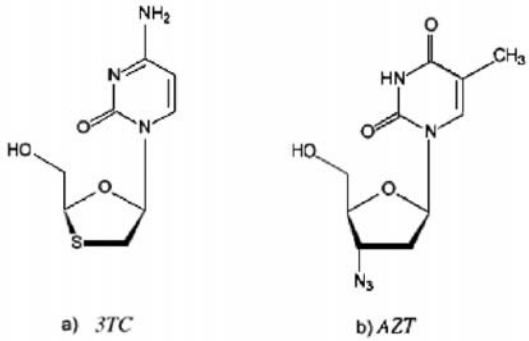



**Figura 1.** Estruturas moleculares: (a) lamivudina e (b) zidovudina[3]

As sobras resultantes no preparo fabril de lamivudina e zidovudina são definidas como resíduos de medicamentos perigosos (RMP) e são classificadas como resíduos:

1) do Grupo B, pela Resolução nº 5 de 1993 do Conselho Nacional de Meio Ambiente, por apresentarem características químicas de risco potencial à saúde pública e ao meio ambiente;

2) da Classe B2, de acordo com a NBR 12.808 de 1993 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, por serem resíduos químicos e farmacêuticos (medicamento não utilizado);

3) do Grupo D, pelo sistema britânico, como resíduos farmacêuticos; e

4) do Grupo B1, conforme a classificação adotada pela Resolução RDC nº 33 de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, como resíduos de medicamentos ou dos insumos farmacêuticos, quando impróprios para consumo e que oferecem risco[6-11].

Nota-se uma tendência crescente por parte das empresas produtoras de fármacos, a busca de alternativas que levem à soluções cada vez mais eficazes no que diz respeito ao destino dos contaminantes gerados nos seus processos fabris[12].

A maior conscientização dos riscos iminentes à saúde humana e a necessidade de conservação dos recursos naturais tem motivado esforços para minimizar o problema de contaminação. Alguns exemplos são a imposição de legislações mais restritivas, que visem à redução da quantidade e toxicidade das emissões e também a utilização de tecnologias de tratamento de efluentes e de recuperação de ambientes já contaminados, que satisfaçam as restrições impostas[13].

A presença de fármacos em efluentes de ETE é reflexo da baixa eficiência de remoção dos mesmos pelos processos convencionais de tratamento e leva à contaminação de águas superficiais. Tal situação tem incentivado a busca de métodos mais eficientes, capazes de promover a mineralização desses contaminantes, ou pelo menos sua transformação em produtos que não apresentem efeitos adversos ao ambiente. Neste contexto, os processos oxidativos avançados (POA's) têm atraído grande interesse tanto da comunidade científica como industrial[14].

Os POA's são caracterizados por sua capacidade de oxidação total ou parcial do poluente, resultando, em último caso, na redução do conteúdo orgânico e/ou melhora na sua biodegradabilidade[15].

De todos os possíveis agentes de oxidação flúor, cloro, ozônio, entre outros, o peróxido de hidrogênio, geralmente, é escolhido devido ao seu baixo custo e alto poder oxidante (Tabela 1). Pode ser facilmente manuseado e não gera subprodutos. Sua escolha também se dá devido à baixa cinética de oxidação, alta reatividade e geração de radicais hidroxila, que são os agentes oxidantes. Este pode ser usado em qualquer uma das técnicas conhecidas[15].

Das diferentes tecnologias disponíveis atualmente, uma que se apresenta bastante promissora para o pré-tratamento de águas residuais é a oxidação com reagente de Fenton (mistura de peróxido de hidrogênio e íons ferro II ou III, atuando este último como catalisador), num reator que opera à pressão atmosférica e a temperatura ambiente. Pode ser aplicado em diferentes composições de águas residuais, lama ou mesmo na remediação de solos contaminados[16].

**Tabela 1.** Potencial Padrão de algumas substâncias.

| Oxidantes | Potencial de Oxidação (eV) |
|---|---|
| Flúor, F2 | +3,06 |
| OH• | +2,77 |
| Oxigênio nascente, O | +2,42 |
| Ozônio, O3 | +2,07 |
| Peróxido de hidrogênio, H2O2 | +1,77 |
| Permanganto, MnO4- | +1,67 |
| Hipoclorito, ClO4- | +1,43 |
| Cloro, Cl2 | +1,36 |
| Cr (VI) | +1,33 |
| Oxigênio,O2 | +1,23 |
| •HO2 | -0,30 |
| •O2- | -1,09 |
| ehid | -2,90 |

O peróxido de hidrogênio, quando usado de forma isolada, pode também atuar como sequestrador de radical hidroxila (•OH), formando o radical hidroperoxila ($HO_2$•), como demonstrado na Reação (1). Isto significa que o sistema reacional tende a um menor potencial de redução, diminuindo a concentração de •OH, prejudicando o processo de degradação, pois reduziria a eficiência do processo por diminuição da sua ação[14].

$$H_2O_2 + \bullet OH \rightarrow H_2O + HO_2. \quad (1)$$

De acordo com De Julio *et al.*[17], os íons ferrosos ($Fe^{2+}$) servem de catalisadores para decomposição do peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$), em meio ácido, gerando radical hidroxila (Reação 2), extremamente reativo, capaz de oxidar efetivamente grande parte da matéria orgânica presente no efluente em uma demanda de tempo de apenas alguns minutos. Portanto, a acidificação do meio garante o deslocamento do equilíbrio da reação no sentido de gerar maior quantidade de íon ferroso ($Fe^{2+}$), uma vez que, a reatividade entre o íon férrico ($Fe^{3+}$) e $H_2O_2$ é baixa.

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + 2\ \bullet OH^-. \quad (2)$$

Segundo Gromboni *et al.* [18], a combinação de peróxido de hidrogênio e íons $Fe^{2+}$ ou $Fe^{3+}$ com radiação ultravioleta (UV), denominado processo Fotofenton Assistido (Reação 3), produz mais radicais hidroxilas quando comparado ao método Fenton convencional ($Fe^{2+}$/$H_2O_2$) ou a simples fotólise, aumentando a eficiência na degradação de poluentes orgânicos, atribuída principalmente à foto-redução de $Fe^{3+}$ para $Fe^{2+}$.

$$FeOH^{2+} + h\nu \rightarrow Fe^{2+} + {\bullet}OH^{-}. \qquad (3)$$

Durante a reação Fotofenton Assistido podem ser citadas as seguintes etapas do mecanismo: fotorredução de íons $Fe^{3+}$ formando íons $Fe^{2+}$, que reagem com $H_2O_2$; aumento da decomposição de $H_2O_2$ pela absorção da luz UV e fotólise de complexos orgânicos de $Fe^{3+}$ gerados durante a decomposição. Além destes fatores, a fotólise de hidroxo-complexos de $Fe^{3+}$ é uma fonte adicional de $\bullet OH$[18].

A maior vantagem associada ao processo Fotofenton é a simplicidade na operação podendo-se operar em condições normais de temperatura e pressão, havendo ainda possibilidade do uso de energia solar, o que pode acarretar em uma redução de custos no processo, principalmente quando se opera em larga escala[13].

A indústria farmoquímica sob estudo produz lamivudina (3TC), zidovudina (AZT) e a associação 3TC e AZT, todos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo-nucleotídeo. Com a finalidade de reduzir a persistência da lamivudina, o 3TC, e da zidovudina, o AZT, no corpo hídrico receptor, investigou-se o processo de decomposição da associação dos antirretrovirais 3TC e AZT por meio de processo de oxidação avançada do tipo Fotofenton Assistido como tratamento alternativo do efluente de uma indústria farmoquímica do estado de Goiás. Visto que não há legislação específica e é um tratamento inédito para a realidade de Goiás e é a única que fornece produz esse tipo de medicamento no Estado.

# Material e Métodos

As investigações de degradação da lamivudina (3TC) e zidovudina (AZT) por oxidação com Fotofenton foram desenvolvidas nas seguintes etapas: 1) Preparo da solução-teste contendo 3TC e AZT; 2) Degradação dos antirretrovirais, presentes na solução-teste, com peróxido de hidrogênio, reagente de Fenton e Fotofenton; 3) Determinação dos fármacos 3TC e AZT na solução-teste, por cromatografia líquida, antes e depois da degradação; e 4) Aplicação do tratamento de degradação, mais eficiente da solução-teste, ao efluente da indústria farmoquímica sob estudo.

A degradação por oxidação foi realizada em reatores com impulsores rotativos utilizando um reator de radiação ultravioleta (UV). Inicialmente, os testes de decomposição dos antirretrovirais foram realizados em soluções-teste contendo 3TC e AZT, com a finalidade de simular o efluente industrial, e posteriormente, a melhor reposta de degradação do 3TC e AZT com as soluções-teste foi aplicada ao efluente da indústria farmoquímica sob investigação.

**Preparo da solução-teste contendo 3TC e AZT**

Solução-teste foi preparada com o objetivo de simular um efluente de indústria farmoquímica contendo antirretrovirais. Esta solução, com 100 mg/L de concentração de antirretrovirais, foi utilizada nos testes de decomposição por oxidação, fotodegradação e foto-oxidação. O preparo da solução-teste consistiu na mistura de 150 mg de amostra contendo lamivudina (22,1 %) e zidovudina (44,5 %) em comprimidos triturados; 0,15 mL de detergente aniônico (tensoativo empregado na limpeza dos equipamentos) e água. O pH da mistura foi ajustado próximo de 3,5 com solução de ácido sulfúrico ($H_2SO_4$) 3,0 mol/L, pelo fato de que faixas de pH baixo favorecem a degradação de compostos orgânicos, aumentando a velocidade da reação, de acordo com Nogueira *et al.* [13].

**Instrumental para degradação por oxidação e por radiação ultravioleta**

A decomposição da lamivudina e zidovudina por oxidação foi realizada em equipamento *jar test* da marca Turb-Floc/2C da Polilab, contendo cinco reatores dotados com impulsores rotativos (Figura 2). Cada reator possuia capacidade máxima de 2 L. As velocidades de rotação variavam de 40 a 200 rpm. As condições de ensaios no *jar test* foram fixadas para um volume de 1 L de solução-teste; velocidade de rotação de 60 rpm; dois intervalos de tempo de reação, um de 30 min e outro de 60 min de duração; temperatura da solução na faixa de 32 $^{o}$C e pH entre 3 a 4.

A decomposição dos antirretrovirais por fotodegradação foi realizada em um reator anular fotoquímico com capacidade máxima de 1,5 L, como ilustrado na Figura 3 (a). A fonte de radiação ultravioleta consistiu em uma lâmpada de vapor de mercúrio, da marca Philips, de 125 W e comprimento de onda gerado na região UV de aproximadamente 254 nm. O tubo de descarga da lâmpada de vapor de mercúrio, Figura 3 (b), era posicionado no eixo central do reator de vidro encamisado. Na camisa, também de vidro, circulava fluido do sistema de refrigeração, cuja temperatura constante era mantida em torno de 38 °C. As condições de fotodegradação foram fixadas para um volume de 1 L de solução; temperatura de 38 °C, pH da solução ou efluente industrial igual a 3,5 e intervalos de exposição à radiação de 30 e 60 minutos.

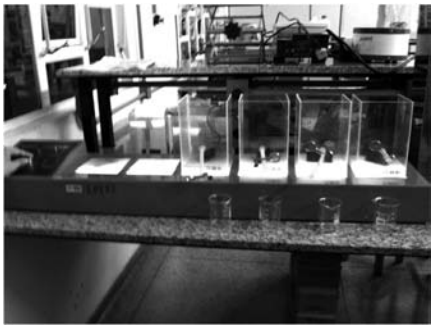


**Figura 2.** Equipamento jar test.

**Degradação do 3TC e AZT com peróxido de hidrogênio**

Cinco recipientes do equipamento *jar test* foram preenchidos com 1 L da solução-teste. Em cada recipiente, adicionaram-se, consecutivamente, alíquotas de 0,22; 0,30; 0,37; 0,44; e 0,60 mL de solução de peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$) 30 % p/v e massa específica 1,13 g/mL, obtendo-se as seguintes concentrações: 75,0; 100,0; 125,0; 150,0 e 200,0 $mg.L^{-1}$, respectivamente. Em seguida, as soluções-testes contidas nos jarros foram homogeneizadas sob uma velocidade de rotação de 60 rpm. Após 30 min de reação, foram coletados 15,0 mL, de cada jarro, das soluções-testes tratadas. Na seqüência, a reação de oxidação foi prorrogada por mais 30 min nas mesmas soluções-testes, repetindo-se o procedimento de amostragem, agora para um tempo de 60 min de reação.

a) b)

**Figura 3.** a) Reator para degradação fotoquímica. b) Esquema do tubo de descarga da lâmpada utilizado no reato[19].

**Degradação do 3TC e AZT com reagente de Fenton**

Em cada um dos cinco reatores do equipamento *jar test*, adicionou-se 1L de solução-teste e submeteu-se à agitação de 60 rpm. Às soluções-teste foi adicionado o reagente de Fenton numa composição de peróxido de hidrogênio e sulfato ferroso ($H_2O_2/Fe^{2+}$), na razão mássica de 5:1, como prescrito por Souza[19]. As concentrações de $[H_2O_2]$ e $[Fe^{2+}]$ foram 200 $mg.L^{-1}$ e 40 $mg.L^{-1}$, respectivamente. Após 30 min de reação coletou-se a primeira amostra de 15,0 mL e depois de 60 min, coletou-se a segunda amostra de mesma quantidade.

**Degradação do 3TC e AZT por radiação ultravioleta**

Preencheu-se o reator com 1 L de solução-teste e submeteu-se a zidovudina e a lamivudina à decomposição por radiação UV durante 30 e 60 min. Amostras de 15,0 mL foram coletas para ambos os tempos de reação.

**Degradação do 3TC e AZT com Fotofenton Assistido**

No tratamento com Fotofenton ($UV/H_2O_2/Fe^{2+}$), as concentrações de peróxido de hidrogênio (200 $mg.L^{-1}$) e $Fe^{2+}$ (40 $mg.L^{-1}$) foram mantidas na proporção 5:1, como descrita anteriormente. O comprimento de onda da radiação UV foi de aproximadamente 254 nm e temperatura constante de 38 °C, aproximadamente. Após 30 e 60 minutos de reação coletaram-se 15,0 mL das amostras.

**Determinação dos fármacos 3TC e AZT por cromatografia líquida**

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*) foi a técnica

analítica empregada na determinação da zidovudina e lamivudina contidas nas amostras coletadas nos ensaios de degradação dos antirretrovirais. O cromatógrafo HPLC, da marca Perkin Elmer modelo Séries 200, composto de um injetor automático com um volume de injeção ajustado para 20 µL, uma bomba peristáltica e um detector UV.

As amostras foram filtradas em membrana 0,45 µm para retirada das partículas em suspensão. A coluna cromatográfica utilizada Spheri-10 RP-18 empacotada com octadelsilano ($C_{18}$) quimicamente ligado à sílica, comprimento 250 mm, diâmetro interno de 4,6 mm e espessura do filme de 10µm própria para análise desse medicamento. A proporção da fase móvel foi 95 % tampão acetato 0,1 mol/L e 5 % metanol, pH 3,8, com fluxo 1,0 $mL.min^{-1}$ e comprimento de onda de 270 nm[20].

O limite de detecção do HPLC para esta técnica, foi estipulado em 0,03 $mg.L^{-1}$ para o 3TC e 0,10 $mg.L^{-1}$ para o AZT. Visto que, foram as mínimas concentrações que puderam ser detectadas com confiabilidade, sob as condições experimentais estabelecidas através de análises de cinco concentrações diferentes de cada substância feitas em triplicata e cada uma dessas analisadas em triplicata também. Foi construída a curva de calibração para analisar a precisão do método. As equações da reta obtida para o 3TC e para o AZT estão mostradas, respectivamente, nas Equações 1 e 2. O coeficiente de correlação de 0,9950 para o 3TC e 0,9935 para o AZT demonstra linearidade do método.

$$y=99920x + 1034 \quad (4)$$

$$y=44636x + 1784 \quad (5)$$

**Amostragem do Efluente da Indústria Farmoquímica**

O efluente da indústria farmoquímica sob estudo foi coletado na entrada da estação de tratamento de efluentes (ETE), imediatamente após a unidade de gradeamento. A amostragem foi do tipo composta, sendo coletadas cinco amostras de 200 mL durante o período de lavagem das máquinas, cerca de uma hora e meia, em intervalos de 20 minutos. As amostras eram armazenadas em garrafa de 1L com vidro âmbar e tampa de teflon, conservada à temperatura de 10 °C por um período máximo de 20 horas. Esta amostra, de efluente industrial, foi utilizada para o ensaio de melhor resposta de degradação das soluções-teste.

# Resultados e discussão

A análise qualitativa dos picos foi feita utilizando um padrão externo com concentração e tempo de retenção dos ativos conhecidos, possibilitando a identificação, como consta na Figura 4.

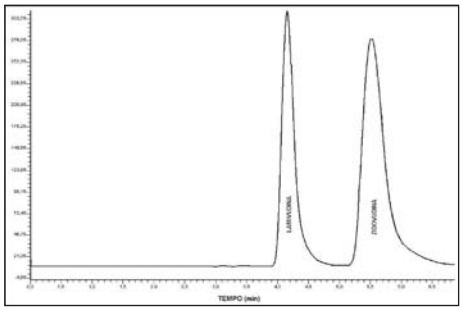



**Figura 4.** Cromatograma do padrão de lamivudina e zidovudina.

Os ensaios de decomposição da lamivudina e zidovudina, presentes em solução-teste na proporção de 33,2 $mg.L^{-1}$ de lamivudina e 66,8 $mg.L^{-1}$ de zidovudina, compreenderam cinco tipos de tratamento: 1) Oxidação com peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$); 2) Radiação UV; 3) Oxidação com peróxido de hidrogênio associada com radiação UV ($H_2O_2$/UV); 4) Oxidação com reagente Fenton ($H_2O_2/Fe^{2+}$); e 5) Oxidação com reagente de Fenton associada com radiação UV ($H_2O_2/Fe^{2+}$/UV). Os resultados finais obtidos ao longo dos ensaios constam na Tabela 2.

**Tabela 2.** Resultados obtidos nos ensaios de tratamento realizados após 60 min

| Tipo Tratamento | % Degradação 3TC | % Degradação AZT |
|---|---|---|
| $H_2O_2$ | 9,2 | 6,9 |
| Radiação UV | 89,6 | 99,5 |
| $H_2O_2$/UV | 99,3 | 99,8 |
| $H_2O_2/Fe^{2}$+ | 99,8 | 99,7 |
| $H_2O_2/Fe^{2+}$/UV | 99,9 | 99,8 |

**Decomposição de 3TC e AZT com $H_2O_2$**

As Tabelas 3 e 4 apresentam os resultados da decomposição do 3TC e AZT por oxidação em presença de peróxido de hidrogênio com 30 e 60 min de reação, respectivamente.

Observou-se que a eficiência de decomposição dos

antirretrovirais por oxidação com peróxido de hidrogênio alcançou eficiências melhores para concentrações de $H_2O_2$ mais elevadas (200,0 mg.L$^{-1}$), sendo 9,2 % para o 3TC e 6,9 % para o AZT. Entretanto, maiores concentrações de $H_2O_2$ aumentariam os custos de tratamento e tornaria o efluente concentrado em peróxido de hidrogênio.

**Decomposição de 3TC e AZT com radiação UV**

Os resultados da decomposição de 3TC e AZT por fotólise direta, empregando radiação ultravioleta, estão apresentados na Tabela 5. Nota-se uma elevada eficiência na decomposição de 3TC e AZT no tempo de 60 minutos. No entanto, analisando os registros cromatográficos (Figura 5), observa-se o aparecimento de um terceiro pico com concentração semelhante à somatória das concentrações dos compostos adicionados ao efluente sintético, indicando, portanto, apenas uma decomposição parcial dos compostos, com formação de outro composto não identificado. Para o 3TC nota-se que esse processo de decomposição apresenta uma menor eficiência, podendo-se inferir que a estrutura molecular desse composto é mais resistente à exposição de radiação UV. Além disso, o tempo de 60 minutos de reação para alcançar uma boa eficiência não é interessante para um processo industrial.

**Tabela 3.** Decomposição de 3TC e AZT na solução-teste por oxidação com $H_2O_2$ com 30 min de reação.

| | Solução-Teste Tratada | | | |
|---|---|---|---|---|
| Amostra | [3TC] | Eficiência | [AZT] | Eficiência |
| | mg.L$^{-1}$ | % | mg.L$^{-1}$ | % |
| 1 | 32,7 | 1,4 | 65,6 | 1,8 |
| 2 | 32,6 | 1,9 | 65,9 | 1,3 |
| 3 | 31,4 | 5,5 | 62,9 | 5,9 |
| 4 | 31,4 | 5,4 | 63,5 | 5,0 |
| 5 | 30,4 | 8,5 | 62,4 | 6,7 |

Concentração inicial de 3TC = 33,2 mg.L$^{-1}$; Concentração inicial de AZT = 66,8 mg.L$^{-1}$.

**Decomposição de 3TC e AZT com $H_2O_2$/UV**

As concentrações de 3TC e AZT da solução-teste após oxidação com peróxido de hidrogênio associada com radiação ultravioleta estão apresentados na Tabela 6. Devido à alta eficiência de decomposição, supõe-se que o uso do peróxido combinado à UV favorece a decomposição dos compostos, comprovado pela não detecção de outro composto pelo método no HPLC.

**Tabela 4.** Decomposição de 3TC e AZT na solução-teste por oxidação com $H_2O_2$ com 60 min de reação.

| | Solução-Teste Tratada | | | |
|---|---|---|---|---|
| Amostra | [3TC] | Eficiência | [AZT] | Eficiência |
| | mg.L$^{-1}$ | % | mg.L$^{-1}$ | % |
| 1 | 32,2 | 3,1 | 63,0 | 5,7 |
| 2 | 32,6 | 1,8 | 65,7 | 1,6 |
| 3 | 31,7 | 4,5 | 64,8 | 2,9 |
| 4 | 31,0 | 6,5 | 63,4 | 5,0 |
| 5 | 30,1 | 9,2 | 62,2 | 6,9 |

Concentração inicial de 3TC = 33,2 mg.L$^{-1}$; Concentração inicial de AZT = 66,8 mg.L$^{-1}$.

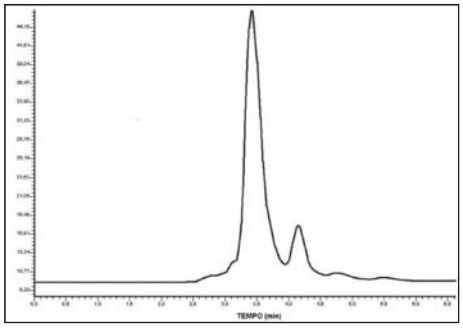



**Figura 5.** Cromatograma da decomposição dos antirretrovirais por radiação UV em 60min.

**Decomposição de 3TC e AZT com reagente de Fenton ($H_2O_2$/$Fe^{2+}$)**

Os resultados da decomposição do 3TC e AZT por oxidação com reagente de Fenton, uma combinação de peróxido de hidrogênio (200 mg.L$^{-1}$) e $Fe^{2+}$ (40 mg.L$^{-1}$), estão apresentados na Tabela 7. Tanto o 3TC quanto o AZT apresentaram eficiências elevadas de degradação.

**Decomposição de 3TC e AZT por Fotofenton Assistido ($H_2O_2$/$Fe^{2+}$/UV)**

A oxidação dos antirretrovirais sob irradiação UV na presença de íon férrico, peróxido de hidrogênio e em meio ácido foi verificada por cromatografia líquida e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 8.

**Tabela 5**. Decomposição do 3TC e AZT na solução-teste por radiação UV.

| | | Solução-Teste Tratada | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Amostra | Tempo (min) | 3TC ($mg.L^{-1}$) | Eficiência (%) | AZT ($mg.L^{-1}$) | Eficiência (%) |
| 6 | 30 | 27,49 | 17,2 | 3,38 | 94,9 |
| 6 | 60 | 3,44 | 89,6 | 0,30 | 99,5 |

Concentração inicial de 3TC = 33,2 $mg.L^{-1}$; Concentração inicial de AZT = 66,8 $mg.L^{-1}$.

**Tabela 6.** Resultado da decomposição do 3TC e AZT por oxidação com $H_2O_2$/UV.

| | | Solução-Teste Tratada | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Amostra | Tempo (min) | 3TC ($mg.L^{-1}$) | Eficiência (%) | AZT ($mg.L^{-1}$) | Eficiência (%) |
| 7 | 30 | 0,32 | 99,0 | 0,63 | 99,0 |
| 7 | 60 | 0,21 | 99,3 | 0,15 | 99,8 |

Concentração inicial de 3TC = 33,2 $mg.L^{-1}$; Concentração inicial de AZT = 66,8 $mg.L^{-1}$.

**Tabela 7.** Resultado da decomposição do 3TC e AZT por oxidação com $H_2O_2/Fe^{2+}$ (Fenton).

| | | Solução-Teste Tratada | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Amostra | Tempo (min) | 3TC ($mg.L^{-1}$) | Eficiência (%) | AZT ($mg.L^{-1}$) | Eficiência (%) |
| 8 | 30 | 0,08 | 99,7 | 0,90 | 98,6 |
| 8 | 60 | 0,07 | 99,8 | 0,21 | 99,7 |

Concentração inicial de 3TC = 33,2 $mg.L^{-1}$; Concentração inicial de AZT = 66,8 $mg.L^{-1}$.

**Tabela 8.** Decomposição do AZT e 3TC por Fotofenton.

| | | Solução-Teste Tratada | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Amostra | Tempo (min) | [3TC] $mg.L^{-1}$ | Eficiência % | [AZT] $mg.L^{-1}$ | Eficiência % |
| 9 | 30 | 0,05 | 99,8 | 0,19 | 99,7 |
| 9 | 60 | 0,03 | 99,9 | 0,10 | 99,8 |

Concentração inicial de 3TC = 33,2 $mg.L^{-1}$; Concentração inicial de AZT = 66,8 $mg.L^{-1}$.

A degradação dos antirretrovirais por radiação UV na presença de reagente de Fenton apresentou elevada eficiência para ambos os fármacos, após 60 minutos de exposição (Tabela 7). Os contaminantes mostraram-se sensíveis ao tratamento combinado de fotodegradação com Fenton (Fotofenton Assistido). Embora os valores não tenham sido muitos maiores quando comparado com a decomposição com reagente de Fenton, apenas, mas é importante considerar que a presença de luz pode favorecer o processo de degradação, no sentido de diminuir a utilização de ferro.

Vale ressaltar que as dosagens de ferro em tratamentos de efluentes são orientadas pela legislação e deve-se trabalhar com baixas concentrações. Segundo a Resolução CONAMA 357[21], a concentração residual máxima desse poluente em lançamentos de efluentes é de 15 $mg.L^{-1}$ e que o pré-tratamento por Fenton produz um efluente que sofrerá o efeito da diluição quando misturado a outras correntes de efluentes no equalizador, enquanto que para UV não há restrição e o custo é relativamente baixo. No decorrer das análises notou-se maior susceptibilidade do 3TC em ser decomposto pelo peróxido e do AZT em ser decomposto pela radiação UV, assim a ação conjunta desses dois agentes de degradação garante uma eficiência maior e mais uniforme na decomposição de ambos os compostos.

**Degradação aplicada ao efluente industrial farmoquímico contendo antirretrovirais**

Como a resposta mais promissora à degradação dos compostos antirretrovirais o efluente industrial farmoquímico coletado na entrada da ETE foi tratado pelo processo oxidativo de Fotofenton Assisitido. Os resultados estão dispostos na Tabela 9. Sendo que, a concentração inicial de AZT no efluente bruto igual a 6,29 $mg.L^{-1}$ e a concentração inicial de 3TC no efluente bruto igual a 3,28 $mg.L^{-1}$. O registro cromatográfico mostrou que após 30 minutos de reação já não houve a detecção dos picos de 3TC e AZT.

**Tabela 9.** Decomposição do AZT e 3TC por ($H_2O_2/Fe^{2+}$/UV) no efluente industrial.

| | | Efluente Industrial Tratado | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Amostra | Tempo (min) | [3TC] mg/L | Eficiência % | [AZT] mg/L | Eficiência % |
| EIT | 30 | < 0,03 | > 98,9 | < 0,10 | > 98,4 |

Concentração inicial de AZT no efluente bruto 6,29 $mg.L^{-1}$; Concentração inicial de 3TC no efluente bruto 3,28 $mg.L^{-1}$; [$H_2O_2$] = 200 $mg.L^{-1}$; [Fe2+]= 40 $mg.L^{-1}$; EIT = amostra de efluente industrial tratado.

Assim, de acordo com o limite de quantificação estipulado entende-se que os compostos, após 30 minutos de tratamento por Fotofenton, estão numa concentração menor do 0,03 $mg.L^{-1}$ para o 3TC e 0,10 $mg.L^{-1}$ para o AZT.

# Conclusões

Testes preliminares de degradação, com preparação de solução-teste simulando a água residuária da industrial farmoquímica sob investigação, revelaram-se uma importante ferramenta no tratamento químico do efluente industrial de empresas produtoras de antirretrovirais. Esse tipo de planejamento experimental permitiu avaliar melhor as condições de tratamento do efluente. Assim, entre os cinco tipos de tecnologia de processos oxidativos avançados (oxidação com peróxido de hidrogênio, radiação UV, oxidação com peróxido de hidrogênio e radiação UV, oxidação com reagente Fenton e oxidação por Fotofenton assistido) testados como tratamento alternativo em água residuária contendo zidovudina (AZT) e lamivudina (3TC), a oxidação por Fotofenton Assistido mostrou-se bastante promissora para um tempo mínimo de reação de 30 minutos, com eficiência de degradação maior do que 98,9 % para o 3TC e 98,4 % para o AZT.

O POA por Fotofenton assistido surge como uma alternativa real a tratamentos convencionais, visto que, promove a redução na geração de lodo. O tratamento foi eficiente para remoção das substâncias estudadas, uma vez que as concentrações dos analitos estavam abaixo dos limites de detecção e quantificação da técnica. Portanto, recomendam-se estudos mais aprofundados, com a finalidade de determinar os limites de detecção e quantificação mais baixos, assim como, testar detectores mais sensíveis, como por exemplo, o espectrofotômetro de massas, além de outros tempos de reação para otimização da técnica, possibilidade de ativação por luz solar e testar concentrações menores de ferro requerida para o tratamento.

# Referências


1. Ministério da Saúde. Aprenda sobre HIV e AIDS. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/ Pages/LUMISF86565C9PTBRIE.htm>. Acessado em novembro de **2008**.
2. Souza, J., Storpirtis, S.; *Rev. Bras. Ciên. Farm.* **2004**, *40*(1), 40.
3. Beck, R. C. R., Cardoso, S. G., Athayde, M. L. et al.; *Quím. Nova* **2007,** *30* (5), 1225.
4. Rabi, J. A.; *Quím. Nova* **2007,** *30* (6), 1420.
5. Garric, J.; Tilghman, a; Cogoluègnes, A; In : *European Conference on Human & Veterinary Pharmaceuticals in the Environment (Envirpharma)*, Lyon. **Final Report:** Summary of the Scientific. Lyon: [S.n.], **2003**.
6. Associação Brasileira de Normas Técnicas ANVISA. *Norma Técnica NBR 12.807* – Resíduos de Serviço de Saúde – Classificação, Rio de Janeiro, **1993**.
7. Conama, Resolução CONAMA nº 5, de 5 de agosto de 1993, estabelece os procedimentos mínimos para o gerenciamento dos resíduos gerados nos portos, aeroportos, terminais ferroviários e rodoviários e estabelecimentos prestadores de serviço de saúde. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 31 ago. **1993**.
8. Oliveira, A. R.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Brasil, **2005**.
9. Ribeiro, V.; Em *VII Simpósio de Biossegurança e de Descarte de Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Pesquisa e Ensino*. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, **2007,** 51.
10. Anvisa, *Resolução RDC 33*, de 25 de fevereiro de 2003. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Diário Oficial da União **2003.**
11. Anvisa, *Resolução RE nº 899*, de 29 de maio de 2003. A diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprova o Guia para a Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Diário Oficial da União, **2003**.
12. Texeira, C. P. A. B.; Jardim, W. F.; *Caderno temático*, v.3, Campinas, LQA/IQ/UNICAMP, **2004**.
13. Nogueira R. F. P., A. G., Silva M. R. A., Villa R. D.; *Quím. Nova* **2007**, *30* (2), 400.
14. Nogueira, R. F. P., Trovó A. G., Melo S. A. S., Bautitz, I. R.; *Quím. Nova* **2009**, *32* (1), 188.
15. Vieria, A. J. R.; Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil, **2006**.
16. Moreira R. F. P. M.; *3ª Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão. UFSC*. **2003**.
17. De Julio, M., Neves, E. F. A., Trofino, J. C., Di Bernardo, L.; *Rev. Eng. Sanit. Amb.* **2006,** *11* (3), 260.
18. Gromboni C. F., Ferreira A. G., Kamogawa, M. Y., Nogueira A. R.A.; *Quím. Nova* **2007**, *30* (2), 264.
19. Souza, K. R.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil, **2005**.
20. Farmacopéia Brasileira; 4. ed., Atheneu: São Paulo, **2003**.
21. Conama, *Resolução Conama 357/2005*. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências, **2005**.



Sonia J. O. Souza[1]*, Tatiane M. Lobo[2], Alline L. O. Sabino[3], Sérgio B. Oliveira[4] & Orlene S. Costa[2].

[1]Faculdade Uniao de Goyazes, CEP 75380-000, Trindade, GO.

[2]Universidade Estadual de Goiás, Caixa Postal 459, CEP 75001-970, Anápolis, GO.

[3]Laboratório da Indústria Química do Estado de Goiás, Av. Anhangüera nº 56, CEP 74453-390, Goiânia, GO.

[4]Instituto Federal de Goiás, Rua 75, n. 46, Setor Central, CEP 74055-110. Goiânia, GO.

*e-mail: soniajuliagyn@yahoo.com.br

# Cádmio, Chumbo e Solubilidade do Fósforo em Suplementos Minerais Bovinos Comercializados em Goiás

José R. Gonçalves, Renata M. Gonçalves & Raniery M. Gonçalves

Visando baratear custos, algumas indústrias de sal mineral utilizam matérias-primas inferiores. Assim, algumas formulações podem estar contaminadas, necessitando controle constante. Objetivou-se determinar cádmio, chumbo e solubilidade do fósforo em amostras das mesorregiões de Goiás, no laboratório do Centro de Pesquisas em Alimentos - UFG. Utilizou-se espectrofotometria de absorção atômica nas análises. Não houve diferença significativa entre chumbo e a solubilidade do fósforo nesses suplementos, ao contrário do cádmio. Os suplementos minerais encontraram-se com concentrações de chumbo e cádmio superiores às normas vigentes. A baixa solubilidade do fósforo na maioria dos suplementos sugere uso de fontes não convencionais deste elemento.

**Palavras-chave:** *absorção atômica, metais pesados, sal mineral.*

Aiming to lower costs, some industries using mineral raw materials lower. Thus, some formulations may be contaminated, requiring a constant control. The objective was to determine cadmium and lead solubility of phosphorus in samples mesoregion of Goias, in the laboratory of the Research Center for Food - UFG. We used atomic absorption spectrophotometry in the analysis. There was no significant difference between lead and the solubility of phosphorus in these supplements, unlike cadmium. Mineral supplements are concentrations of cadmium and lead to higher standards. The low solubility of phosphorus in most supplements suggests use of unconventional sources of this element.

**Keywords:** *atomic absorption, heavy metals, mineral supplement.*

# Introdução

O Estado de Goiás, localizado no Planalto Central do Brasil, possui uma população de bovinos de quase 21 milhões de animais[1], a maioria gado para corte, o que propicia um atraente campo de negócios para os que sobrevivem da cria, recria e engorda dos animais. Entretanto, grande parte do solo goiano é pobre em elementos minerais, particularmente fósforo, cobre e cobalto. Isto obriga os fazendeiros a suplementarem seus animais durante o ano com misturas de suplementos minerais. Por esta razão, a comercialização de formulações minerais é muito intensa, constituindo-se em um mercado altamente competitivo.

Visando baratear custos para ganhar mercado e garantir suas vendas, algumas indústrias produtoras e/ou misturadoras de sal mineralizado para bovinos, utilizam fontes de matérias-primas escolhidas em função do menor preço. Assim, acredita-se que algumas formulações minerais possam estar contaminadas por elementos tóxicos, sobretudo metais pesados e substâncias radioativas que prejudicam inclusive o meio ambiente. Essa suspeita, aliada ao fato de que o governo brasileiro no ano de 2000 por meio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)[2] liberou o uso de fontes alternativas de fósforo a partir de fosfatos de rochas, fez perceber a necessidade de se monitorar as misturas minerais destinadas ao consumo animal revendidas em qualquer estado do país, incluindo Goiás.

Do ponto de vista econômico, diferentes autores destacam que os metais pesados quando presentes em suplementos alimentares para animais, podem causar alterações orgânicas importantes, prejudicando o desempenho dos animais[3,4]. Segundo Marçal *et al.*[5], suplementos minerais com controle restrito de qualidade por parte dos fabricantes, fosfatos de rocha e fosfatos agrícolas, podem conter concentrações de metais pesados suficientes para causarem alterações clínicas importantes em bovinos, principalmente de ordem reprodutiva, como é o caso do cádmio que pode causar degeneração testicular ou aciclia quando em concentrações elevadas no aparelho reprodutor.

O chumbo foi considerado por muitos estudiosos como o elemento químico inorgânico de maior risco à saúde dos animais de criação, particularmente a espécie bovina[5-8], o que também representa riscos à saúde pública. O cádmio nos alimentos, de maneira geral, apresenta-se em menor concentração, todavia é extremamente nocivo e cumulativo a exemplo do chumbo[9].

Problemas nutricionais, como deficiência, toxicidade e desequilíbrio mineral, causam anualmente elevados prejuízos à pecuária nacional. Em qualquer região, um dos principais problemas do desenvolvimento da pecuária é o suprimento contínuo de uma boa alimentação dos animais, que requer cuidado constante[10]. Os nutrientes requeridos pelos ruminantes podem ser agrupados nas seguintes categorias: água, energia, proteína, vitaminas e minerais. Todavia, deficiências minerais ou desequilíbrio no solo e nas forrageiras, em muitas regiões, têm sido responsáveis pela baixa reprodução e inadequada produtividade de diversas regiões brasileiras, incluindo Goiás[11]. Bovinos em pastagens com severa deficiência em fósforo podem apresentar perdas superiores àquelas observadas em animais que estão em pastagens deficientes em energia ou proteína[8].

Pesquisas realizadas sobre a importância da suplementação mineral em regiões tropicais têm mostrado aumento de 20% a 100% na porcentagem de nascimento de bezerros, de 10% a 25% na taxa de crescimento e redução significativa do índice de mortalidade. Existem pelo menos 15 minerais essenciais para a nutrição dos bovinos: sete macro-nutrientes (cálcio, fósforo, potássio, sódio, cloro, magnésio e enxofre) e oito micronutrientes (ferro, cobre, zinco, iodo, manganês, cobalto, molibdênio e selênio), sendo que em qualquer região poderá haver concentrações consideradas tóxicas e deficiência notória de fósforo, causando redução na produção e produtividade do animal[5]. Ressalta-se que um fosfato com o mesmo nível de fósforo determinado em análises químicas, pode não suprir a mesma quantidade de fósforo do ponto de vista biológico. A diferença em valor biológico entre vários compostos minerais pode ser numericamente medida, e os valores podem ser aplicados ao cálculo das misturas minerais[12].

Nunes *et al.*[13] afirmaram que quando a absorção intestinal é baixa, o nível de fósforo na urina se reduz. Para manter a concentração no sangue ocorre aumento na reabsorção de fósforo nos túbulos renais, chegando próximo a 99%.

Assim, torna-se necessário analisar as várias fontes

de suplementos minerais para macro e microelementos, não só sob o ponto de vista de sua composição, mas também em relação à sua biodisponibilidade, haja vista a expressiva diferença de custos entre as fontes de baixa e alta disponibilidade[14]. A inclusão de fosfatos com altos teores de flúor na dieta animal resulta em menor ganho de peso, menor ingestão de alimentos, pior conversão alimentar e comprometimento da mineralização óssea e da resistência óssea às fraturas. Já os fosfatos "feed-grade" apresentam alto grau de pureza química e alta biodisponibilidade de fósforo[15].

Cálcio e fósforo estão intimamente correlacionados, chegando ao ponto em que a deficiência ou o excesso de um pode interferir na utilização do outro. Quando cálcio e fósforo são fornecidos para ruminantes em proporções adequadas, ou seja, 2:1(Ca/P), e em formas eficientemente aproveitáveis, tem-se então uma ótima utilização dos dois elementos. Aproximadamente 99% do cálcio existente no organismo encontram-se nos ossos e nos dentes. Portanto, o cálcio é um elemento essencial na constituição de todas as células vivas e quando há deficiência de cálcio, os animais em crescimento apresentam problemas como deformações ósseas e fraturas[16].

Em contraste com o fósforo, que é o segundo elemento mineral encontrado em maior concentração no organismo animal, a deficiência de cálcio em gado de corte é raramente observada. Mais de 80% do fósforo se encontra associado ao cálcio nos ossos (na forma de hidroxiapatita, fluoroapatita) e nos dentes, enquanto cerca de 20% localiza-se nos tecidos moles do corpo[17]. Daí se percebe a importância de suplementação dos dois minerais citados.

O fósforo tem função importante no metabolismo energético, na formação dos fosfolipídios e está presente nas células vivas, na microbiota do rúmen, participando na conversão do caroteno para vitamina A e em vários outros processos orgânicos importantes do bovino. Em casos de deficiência, os animais desenvolvem uma condição conhecida como "apetite depravado", com várias consequências, desde a fragilidade óssea, até a diminuição da fertilidade e produtividade - tanto de carne quanto de leite[18].

Os ossos também são reservas de cálcio e fósforo que podem ser mobilizados ocasionalmente quando a assimilação desses minerais é inadequada para atender às necessidades do organismo. No caso do animal produtivo receber dietas deficientes, as glândulas paratireóides através do paratormônio mobilizam estes elementos dos ossos para suprir as necessidades. Essa condição poderá se agravar quando o animal estiver recebendo dieta de suplementos minerais com alta concentração de impurezas, a exemplo do chumbo, cádmio e outros, podendo interagir com os mesmos, deslocando-os do sitio de atividade biológica[11].

Sabe-se que óxido de zinco, óxido de magnésio, óxido de ferro e calcário dolomítico são fontes potenciais de chumbo e cádmio, além de possuírem baixa biodisponibilidade. E deve ser considerado o percentual utilizado desses suplementos nas misturas minerais em relação ao fósforo, que é utilizado em maior concentração se comparado às fontes de microelementos[19].

Voltada para a produção de proteína animal destinada à alimentação humana, a nutrição animal torna-se um elo importantíssimo do agronegócio[20]. Vale lembrar que os componentes mais importantes no cálculo de uma mistura mineral estão relacionados com os níveis de suplementação utilizados de cada mineral a ser oferecida por animal[21].

A ausência de planejamento urbano adequado tem ocasionado o crescimento desordenado em alguns estados brasileiros, como em Goiás, com consequências indesejáveis aos animais de exploração pecuária, afetando a absorção de nutrientes através do consumo e contato com o ambiente poluído com substâncias tóxicas diversas, a exemplo do cádmio e chumbo. Localidades rurais que anteriormente serviam somente como habitats para criação de animais de produção, hoje dividem espaço com fábricas e indústrias que poluem o ar, o solo, as plantas e os mananciais hídricos, tornando os seres vivos vulneráveis à toxidade de seus efluentes[18]. Percebe-se a importância do meio ambiente isento de contaminações e a necessidade de um controle maior dos produtos obtidos, para resultar em uma qualidade de vida saudável aos seres vivos em geral, incluindo os bovinos e o homem.

Nesse aspecto, reforça-se que as pesquisas com metais pesados cádmio, chumbo e suplementos minerais em Goiás e no país ainda são escassas, o que se percebe pela literatura científica reduzida e desatualizada. Por isso, constituiu-se objetivo principal deste estudo determinar os teores de cádmio, chumbo e a solubilidade

do fósforo em ácido cítrico a 2% e observar a proporção de fontes alternativas do fósforo em suplementos minerais destinados à formulação e elaboração de sais minerais e misturas prontas de diferentes marcas comerciais para o consumo bovino.

# Material e métodos

**Amostragem**

Um total de 50 amostras de suplementos e misturas minerais foi colhido ao acaso, diretamente do estoque disponível em estabelecimentos comerciais, além de propriedades rurais colaboradoras pertencentes aos municípios localizados nas cinco mesorregiões de Goiás (Noroeste, Norte, Centro, Leste e Sul), de acordo com o Anuário Estatístico do Estado de Goiás[22]. Cada amostra com quantidade em torno de 200 g, de marca e tipo diferentes de suplementos minerais, foi acondicionada em recipiente transparente de polietileno previamente lacrado e identificado. As análises foram efetuadas no Laboratório do Centro de Pesquisa em Alimentos – CPA, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás e no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO-GO) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Goiás (MAPA).

**Métodos analíticos**

Na metodologia analítica empregada para a determinação do cádmio e chumbo em sal mineralizado e suplementos minerais, as amostras foram previamente submetidas a secagem a 60ºC por aproximadamente 12 horas. A digestão e a solubilização foram realizadas com ácido nítrico, perclórico e clorídrico, fazendo-se a filtração em papel de filtro, filtração média, diâmetro 12,5 cm para balão volumétrico de 50 mL e diluições apropriadas, de acordo com a curva padrão específica para cada elemento em estudo. Foi feita determinação do cádmio e chumbo por espectrometria de plasma induzido, empregando-se um equipamento modelo ICP-AES (Vista-MPX) Varian SP de alta sensibilidade no LANAGRO-GO/MAPA. O cádmio e o chumbo foram separados da amostra por concentração com pirrolidinaditiocarbamato de amônia (ADPC), P. A. com pH 2,3 $\pm$ 0,1[9,23,24].

Todas as análises foram realizadas em duplicatas. Para a análise estatística dos dados, utilizou-se o SAS/BASIC Program[25].

**Preparo para as análises de chumbo e cádmio**

O preparo da solução padrão para a construção da curva padrão, utilizando-se chumbo e cádmio metálico Merck, grau de pureza EAA (99,99%), foi realizado da seguinte forma: dissolveu-se separadamente 1,0 g de chumbo e cádmio metálico em ácido nítrico 50%, completando-se o volume com água destilada deionizada para 1000 mL, para obter concentração de 1000mg/L. Desta solução, fez-se outra intermediária de 50 mg/L como estoque. A partir desta solução intermediária, prepararam-se diluições para a curva padrão de ajuste do equipamento nas concentrações de 1,0 mg/L; 2,0 mg/L; 3,0 mg/L para o chumbo e 0,20 mg/L; 0,40 mg/L; 0,80 mg/L para o cádmio em balões volumétricos de 50 mL, completando-se o volume com ácido clorídrico 0,5 N, de maneira que padrões e amostras tivessem as mesmas condições finais de concentração e pH no momento da leitura. As condições do equipamento para procedimento da leitura de padrões e amostras estão na Tabela 1.

**Tabela 1.** Condições para determinação de chumbo e cádmio em Espectrômetro de Absorção Atômica, modelo GBC AA 932, Estado de Goiás.

| Elemento / Condições do Aparelho | Chumbo | Cádmio |
|---|---|---|
| Comprimento de onda (nm) | 217,0 | 228,8 |
| Tempo de leitura (s) | 0,5 | 0,5 |
| Fenda (nm) | 1,0 | 0,5 |
| Fluxo de acetileno (mL/min) | 13 | 13 |
| Fluxo de ar (mL/min) | 30 | 30 |
| Corretor de background | sim | sim |
| Chama estequiométrica | Oxidante | Oxidante |
| Sensibilidade típica (mg/L) | 0,016 | 0,007 |
| Corrente da lâmpada (mA) | 5,0 | 3,0 |

**Procedimentos**

As amostras foram preparadas e homogeneizadas com um quarteador tipo Jones de oito saídas. Ao separar uma porção menor, procedeu-se nova homogeneização utilizando moinho tipo Willey e peneira com granulometria de 0,50 mm, ambos em aço inoxidável, obtendo-se amostra homogênea e isenta de contaminantes metálicos. As amostras assim preparadas foram analisadas em conformidade com a metodologia proposta em Métodos de Análise de Resíduos Biológicos em alimentos para uso animal, também adotado pelo

Departamento de Agricultura dos Estados Unidos e a Associação Nacional dos Fabricantes de Rações e suplementos minerais ANFAR/MAPA[26].

**Digestão das amostras**

Após o preparo e homogeneização, as amostras foram completamente mineralizadas por tratamento pela via úmida. Para tanto, pesou-se em torno de 5,0 g de amostra em becker de vidro de 125 mL, adicionou-se 10 mL de ácido nítrico P. A. e submeteu-se a fervura em chapa aquecedora a temperatura controlada de 200º C até o desprendimento de fumos amarelados. Em seguida, acrescentou-se 2,0 mL de ácido perclórico P. A., aqueceu-se até a completa destruição da matéria orgânica por 20 minutos aproximadamente. Procedeu-se o abaixamento da temperatura e filtrou-se quantitativamente em balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com água destilada deionizada. Posteriormente, foram preparadas as diluições específicas para cada elemento a ser determinado. As diluições obtidas foram analisadas por espectroscopia de plasma induzido ICP-OES.

Paralelamente, foram realizados testes de recuperação e branco. A curva padrão específica dos elementos em análise foi obtida, o espectrômetro foi otimizado, e as leituras do branco, dos padrões e das amostras foram realizadas.

Quando necessário, as amostras foram diluídas para que se obtivessem leituras dentro da faixa ótima de trabalho. As alíquotas foram diluídas em solução de ácido clorídrico 0,5 N, para manter as mesmas condições de pH e viscosidade.

Simultaneamente, a cada grupo de amostra analisada foi efetuado o teste de recuperação e branco, fortificando-se uma amostra com teor conhecido do elemento pesquisado. Preparou-se uma curva padrão específica para os elementos analisados e otimizou-se o equipamento, fazendo a leitura do branco, dos padrões e das amostras. Foram calculados os resultados das amostras, bem como a porcentagem de recuperação e o coeficiente de correlação (r) para verificar a exatidão do método. Para verificar interferências químicas e/ ou espectrais, usou-se regressão linear[27].

**Vidrarias e reagentes**

Utilizou-se vidraria de uso comum em laboratório, as quais passaram pelas seguintes etapas de limpeza e desmineralização de elementos contaminantes: banho com solução de hipoclorito de sódio, alta pureza, concentração 1:2000 (v/v); lavagem com detergente neutro, grau de pureza AA a 2% e água deionizada, seguida por enxágüe com água deionizada; banho em solução de ácido clorídrico grau AA a 0,5 N (v/v) e finalmente, enxágue com água deionizada.

Foram utilizados reagentes usuais para ICP-OES (espectrometria de plasma induzida), tais como ácido nítrico e ácido clorídrico Spectrosol de qualidade para análise, padrões próprios de cada elemento e ampolas de titrisol, grau de pureza ICP-OES.

**Procedimento para determinação do fósforo total e da solubilidade do fósforo em ácido cítrico a 2%**

Procedeu-se a determinação da porcentagem do fósforo total e da solubilidade do fósforo em ácido cítrico a 2% por espectrofotometria UV, na faixa do visível, empregando-se um equipamento modelo Perkin Elmer/Lambda 25, duplo feixe de alta sensibilidade, pertencente ao Centro de Pesquisas em Alimentos - CPA/UFG. A extração do fósforo nas amostras foi realizada conforme metodologia ANFAR/MAPA[26]. Após preparo e homogeneização, a matéria orgânica da amostra foi completamente destruída por tratamento pela via úmida com ácido nítrico. Para tanto, pesou-se em torno de 1,0 g de amostra em Becker de vidro de 125 mL, adicionou-se 10 mL de ácido nítrico P. A. e submeteu-se a fervura em chapa aquecedora a temperatura controlada de 200º C até o desprendimento de fumos amarelados. Em seguida, acrescentou-se 2,0 mL de ácido perclórico P. A. e aqueceu até a completa destruição da matéria orgânica por 20 minutos aproximadamente. Procedeu-se o abaixamento da temperatura e filtrou-se quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com água destilada deionizada. Posteriormente, foram preparadas diluições específicas para o elemento a ser determinado. As diluições obtidas foram analisadas por espectrofotometria de UV na faixa do visível, utilizando-se comprimento de onda na faixa de 420 nm.

Para a extração do fósforo solúvel, utilizou-se 100 mL de ácido cítrico P. A. a 2%, nas quantidades de 100 mL por amostra sob agitação controlada de 30 rpm – 40 rpm em agitador tipo Wagner por 30 minutos. Após a

extração, fez-se a filtração da amostra quantitativamente em balão volumétrico de 200 mL. A seguir, tomou-se uma alíquota de 1,0 mL e verteu-se em balão volumétrico de 50 mL conforme o teor esperado de fósforo na amostra. Posteriormente adicionou ao balão volumétrico de 50mL, 10mL da mistura de partes iguais de solução de molibdato de amônio 5% e metavanadato de amônio 0,25%, completando-se o volume com água destilada deionizada e deixando a solução em repouso por 10 minutos para reação. Preparou-se um branco e padrões nas concentrações de 4,0 mg/L, 8,0 mg/L, 12,0 mg/L e 16,0 mg/L. Fez-se a leitura do branco e dos padrões e construiu a curva de calibração para calcular a equação de regressão linear. A leitura das absorbâncias das amostras e padrões foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda regulado a 420 nm. Os resultados das concentrações de fósforo e da percentagem de solubilidade foram calculados em relação às diluições e a massa da amostra, comparando-as com a curva de calibração, usando a equação de regressão linear para calcular a concentração final.

**Análise Estatística**

Foram calculados os parâmetros de tendência central (média e mediana) e de dispersão, desvio padrão, coeficiente de variação, valores máximo e mínimo dos teores de cádmio e chumbo, e a porcentagem de solubilidade do fósforo em suplementos minerais de cada mesorregião. Os teores médios entre as mesorregiões foram comparados pelo teste de Tukey (P<0,05%).

A regressão linear foi aplicada entre as leituras dos padrões, com o intuito de verificar a exatidão em relação às leituras das amostras, estabelecendo a dispersão das médias e desvio padrão em relação à curva de calibração específica para cada elemento em estudo[28].

# Resultados e discussão

Os resultados da análise de variância, empregando o delineamento inteiramente ao acaso para três variáveis, ou seja, os teores de chumbo e cádmio e a solubilidade de fósforo em sal mineral estão na Tabela 2. Observou-se que apenas a variável cádmio apresentou diferença significativa entre as mesorregiões.

A não significância para o chumbo e a solubilidade de fósforo entre as mesorregiões indica uma homogeneidade em relação à mistura mineral utilizada na alimentação de bovinos. Ressalta-se que a qualidade dos suplementos minerais está normalmente distribuída em todas as mesorregiões do Estado de Goiás, ou seja, pode existir uma padronização em relação à alimentação do rebanho bovino entre as regiões Goianas, à variável chumbo e à solubilidade de fósforo.

**Tabela 2**. Análise de variância segundo o delineamento inteiramente ao acaso para os teores de chumbo, cádmio e solubilidade de fósforo em sal mineral das cinco mesorregiões do Estado de Goiás.

| FV | GL | Quadrado Médio | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Cd | Pb | Solubilidade de P |
| Mesorregião | 4 | 27,5035* | 11267,2309ns | 119,7288ns |
| Resíduo | 45 | 8,9908 | 1084,8810 | 277,2202 |

ns: Não significativo a 5% de probabilidade. * Significativo a 5% de probalidade.

Os dados relativos aos teores médios de chumbo, cádmio e solubilidade do fósforo determinados em suplementos e misturas minerais para bovinos no Estado de Goiás, encontram-se nas Tabelas 3, 4 e 5.

**Tabela 3.** Teores de chumbo (mg/Kg) em suplementos minerais para bovinos comercializados, Estado de Goiás.

| Parâmetro * | Mesorregião | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Noroeste | Norte | Centro | Leste | Sul |
| Média | 38,8*a | 30,33*a | 45,23*a | 40,07*a | 112,7*a |
| Desvio padrão | 11,4 | 19,0 | 36,0 | 16,4 | 30,0 |
| CV (%)b | 71,9 | 76,0 | 75,9 | 51,2 | 61,9 |
| Mediana | 25,6 | 24,8 | 48,0* | 32,5* | 77,2* |
| Amplitude total | 46,2* | 46,5* | 240,0* | 18,0 | 153,6* |
| Mínimo | 2,50 | 1,55 | 0,33 | 22,94* | 0,38 |
| Máximo | 48,7* | 48,0* | 240,0* | 41,0* | 154,0* |

*Teores acima do LMR[4,7]. [a]Em uma mesma linha, valores seguidos de uma mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey, p < 0,05). [b]CV = coeficiente de variação.

**Chumbo**

Nota-se a partir da Tabela 3, que não houve diferença significativa (P>0,05) entre as médias de chumbo em suplementos minerais comercializados em Goiás. Os níveis médios encontrados nas mesorregiões Centro, Leste e Sul Goiano estão acima do LMR (Limite Máximo

de Resíduos) estabelecido pelo NRC[7], que é de 30,0 mg/Kg. Mas em relação ao recomendado por Maletto[3], que é 10,0 mg/Kg, os teores médios de todas as mesorregiões estão acima. Ao se comparar os resultados deste estudo com os apresentados por Marçal *et al.*[11], ficou evidente que as misturas de sal mineralizado utilizadas para alimentação de bovinos encontram-se contaminadas com substâncias inorgânicas, chumbo e cádmio em concentrações superiores àquelas citadas na literatura e estabelecidas na Legislação Internacional.

A mediana também apresentou resultado elevado, semelhante ao teor médio entre os municípios amostrados. Por outro lado, o maior valor obtido em duas amostras, sendo uma na mesorregião Centro Goiano 240,0 mg/Kg e outra no Sul Goiano 154,0 mg/Kg, revelaram-se teores elevados, mas abaixo dos níveis obtidos por outro estudo[29], que encontraram valores variando de 16,0 mg/kg a 625,0 mg/Kg para valores mínimo e máximo, respectivamente. No presente estudo os teores de chumbo variaram de 0,33 mg/Kg, valor mínimo, a 449,0 mg/Kg, valor máximo.

Segundo Gonçalves[9], a suspeita da presença de metais pesados recai sobre as fontes de macro e microelementos incorporados às misturas minerais, especialmente fósforo, tendo em vista que este mineral representa o maior custo na composição de um sal mineral. Por isso, alguns fabricantes buscam esse elemento essencial em fontes alternativas, de menor custo e de baixa solubilidade, a exemplo dos fosfatos naturais de rochas e fosfatos agrícolas, misturando-os em diferentes proporções, como demonstraram os dados do presente estudo. Isso pode ser observado ao analisar os resultados que apresentaram baixo teor médio de solubilidade do fósforo nos suplementos minerais analisados. Coincidentemente, essas foram amostras que apresentaram maiores teores de metais pesados, notadamente o chumbo.

Dentre as mesorregiões estudadas, a Centro e Sul Goianos, foram as que apresentaram os maiores teores de chumbo nos suplementos minerais comercializados em Goiás (Tabela 3). Essa constatação sugere que os suplementos minerais comercializados nessas mesorregiões possuem em suas formulações ingredientes ricos em impurezas e de baixa qualidade. Além das fontes de fósforo com baixa biodisponibilidade utilizadas em maior proporção na elaboração das misturas, há que se considerar a questão das fontes de zinco (óxido de zinco), ferro (óxido de ferro), magnésio (óxido de magnésio) e manganês (óxido de manganês), apesar de utilizadas em menores proporções na formulação das misturas, que podem ser fontes potenciais de chumbo e cádmio, e são largamente utilizadas em substituição aos sulfatos de zinco e outros, em função de seu menor custo para baratear o produto final[30].

Das 50 amostras de suplementos minerais analisadas, 52,0% apresentaram valores de chumbo acima dos 30 mg/kg recomendados por Maletto[3] e estabelecidos pelo NRC[7]. Comparando-se esses resultados com os obtidos por Marçal *et al.*[11] em amostras de suplementos minerais no Paraná, que variaram de 16,0 mg/kg a 625,0 mg/kg, verifica-se que o autor também obteve valores elevados e muito próximos aos desta pesquisa. Nesse sentido, há que se considerar que existem suplementos minerais contaminados com metais pesados sendo consumidos por bovinos não só no Estado de Goiás, mas em outros estados do país.

Isso é preocupante, pois esses metais se acumulam nos organismos dos animais produtivos, e pode ser repassado ao homem posteriormente por meio da cadeia alimentar. Além disso, deve-se ressaltar a contaminação itinerante das pastagens por meio das fezes dos bovinos, tendo em vista que grande parte dos contaminantes, especialmente o chumbo, elimina-se pelas fezes, e também acumulam no organismo.

**Cádmio**

Na tabela 4, verifica-se que houve diferença significativa ($P<0,05$) entre as médias de cádmio em suplementos minerais comercializados em Goiás. Embora o cádmio em suplementos minerais e em outros produtos possua a tendência de ser encontrado em menores concentrações que o chumbo, acredita-se que o teor mínimo e máximo são preocupantes, visto o fato de ser cumulativo no organismo humano e animal. Ao contrastar os dados com os obtidos em outro estudo[11], nota-se que as misturas de sal mineralizado utilizadas para alimentação de bovinos acham-se contaminadas por substâncias inorgânicas nocivas à saúde animal, especialmente chumbo e cádmio em concentrações acima do máximo citado na literatura - 30,0 mg/Kg para chumbo, e 0,5 mg/Kg para o cádmio[4,7].

**Tabela 4.** Teores de cádmio (mg/Kg) em suplementos minerais para bovinos comercializados, Estado de Goiás.

| Parâmetro* | Mesorregião | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Noroeste | Norte | Centro | Leste | Sul |
| Média | 1,731*ab | 0,906*a | 1,061*a | 1,356*ab | 4,905*b |
| Desvio padrão | 0,92 | 0,88 | 5,37 | 2,10 | 1,23 |
| CV (%)c | 62,0 | 59,0 | 160,0 | 159,0 | 87,0 |
| Mediana | 1,73* | 1,45* | 12,17* | 1,31* | 2,24* |
| Amplitude total | 2,30* | 1,90* | 21,65* | 1,10* | 3,47* |
| Mínimo | 0,56 | 0,50 | 0,35 | 0,79 | 0,63 |
| Máximo | 2,86* | 2,40* | 22,0* | 1,87* | 3,97* |

*Teores acima do LMR[4,7]. [a,b]Em uma mesma linha valores seguidos de uma mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey, $p < 0,05$). [c]CV= coeficiente de variação.

A mediana também apresentou resultado elevado semelhante ao teor médio entre as amostras colhidas nos municípios. Por outro lado, o valor máximo obtido em duas amostras, sendo uma na mesorregião Centro Goiano 22,0 mg/Kg e outra no Sul Goiano 5,5 mg/Kg, revelaram teores abaixo dos obtidos por Marçal *et al.*[11], que encontraram valores que variavam de 2,0 mg/kg a 57,0 mg/Kg para o cádmio. Os valores encontrados para cádmio variaram de 0,50 mg/Kg (menor valor) a 22,0 mg/Kg (maior valor). Devido à alta toxicidade do cádmio, os níveis de ação citados na literatura e estabelecidos na legislação são sempre menores que os do chumbo, mesmo porque a concentração de cádmio possui tendência de ser em menor teor[9].

Das mesorregiões em estudo, a do Sul Goiano foi a que apresentou o maior teor de cádmio nos suplementos minerais. Há evidências de que os suplementos minerais comercializados nas regiões que apresentaram maior concentração de resíduos tóxicos são exatamente os que foram produzidos, utilizando ingredientes de origem mineral com alto teor de impureza e de baixa qualidade.

Das 50 amostras de suplementos minerais analisadas, 79% apresentaram valores de cádmio acima de 0,5 mg/kg recomendado por Maletto[3]. O menor valor obtido foi 0,072 mg/kg, e o maior, 20,0 mg/kg. Comparando estes resultados com os obtidos por Marçal *et al.*[11] em amostras de suplementos minerais no Paraná, que variaram de 2,0 mg/kg a 57,0 mg/kg, verifica-se que houveram valores mais elevados que os resultados encontrados neste estudo.

**Solubilidade do fósforo em ácido cítrico**

A Tabela 5 contém os dados relativos à porcentagem de solubilidade do fósforo em ácido cítrico a 2% em suplementos e misturas minerais para bovinos no Estado de Goiás. Percebeu-se que não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre as médias de solubilidade do fósforo em suplementos minerais comercializados em Goiás.

**Tabela 5.** Teores da porcentagem de solubilidade do fósforo em ácido cítrico a 2% em suplementos minerais para bovinos comercializados, Estado de Goiás.

| Parâmetro* | Mesorregião | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Noroeste | Norte | Centro | Leste | Sul |
| Média | 81,0*a | 78,9*a | 83,6*a | 81,8*a | 74,6*a |
| Desvio padrão | 5,84 | 15,64 | 13,3 | 2,13 | 20,0 |
| CV (%)b | 5,70 | 19,55 | 16,9 | 2,73 | 25,97 |
| Mediana | 91,0 | 80,0* | 72,0* | 79,0* | 76,5* |
| Amplitude total | 98,0 | 96,0 | 98,0 | 90,0 | 99,0 |
| Mínimo | 84,0* | 64,0* | 50,0* | 75,0* | 49,0* |
| Máximo | 98,0 | 96,0 | 98,0 | 90,0 | 99,0 |

*Teores abaixo do padrão mínimo (90%)[31]. [a]Em uma mesma linha valores seguidos de uma mesma letra não diferem significativamente entre si (Tukey, $p < 0,05$). [b]CV = coeficiente de variação.

Observou-se que as amostras de suplemento e sal mineralizado mostraram de modo geral, percentuais de solubilidade abaixo do mínimo estabelecido de 90% pelo MAPA[31], revelando um aspecto interessante para esta pesquisa, porque sinaliza uma tendência evidente e rotineira do uso de fontes alternativas para o fósforo, tentando minimizar os custos dessas formulações, com o intuito de garantir vendas. Mas isso traz como consequências, prejuízos para a saúde e produtividade animal, devido à baixa qualidade em termos de impurezas e disponibilidade do elemento fósforo. Esta tendência torna-se importante sob o ponto de vista sanitário e de produtividade, pois aproximadamente 80% dos custos com a suplementação mineral bovina são atribuídas ao fósforo, devido a sua larga utilização para suprir as deficiências de pastagens em nosso Estado.

Entre as amostras analisadas das mesorregiões citadas, as do Sul Goiano foram as que apresentaram menores porcentagens de fósforo solúvel nos suplementos minerais. Fundamentado neste resultado, pode-se perceber

que os suplementos minerais nessa mesorregião foram os que apresentaram maiores indícios de contaminação com elevados teores de chumbo e cádmio, exatamente porque foram produzidos utilizando ingredientes com alto teor de impurezas e de baixa qualidade.

Os resultados demonstraram a necessidade de monitoramento junto aos fabricantes e comerciantes, pois algumas misturas minerais podem ser eminentemente perigosas, devido aos efeitos cumulativos tóxicos dos metais pesados cádmio e chumbo aos bovinos.

# Conclusões

Nas condições deste estudo e em função dos resultados obtidos, conclui-se que a maior parte dos teores médios de cádmio e chumbo em suplementos minerais para bovinos em Goiás, estão acima do LMR encontrado nas literaturas citadas e estabelecido na legislação. Em relação ao chumbo, quase metade das amostras das mesorregiões estudadas apresentaram teores médios acima do regulamentado, e para o cádmio mais da metade das amostras estavam em desacordo com a literatura. Isso evidencia a presença de resíduos tóxicos acima do aceitável para os bovinos, bem como para a saúde humana, visto que os homens podem se alimentar desta carne em seu dia a dia.

A baixa solubilidade do fósforo na maioria dos suplementos sugere uso frequente de fontes não convencionais deste elemento na elaboração das misturas. Assim, o rebanho pode obter uma alimentação deficiente em nutrientes de forma geral, com presença residual de contaminantes, o que não é recomendável. Essa situação seria um quadro favorável apenas aos fabricantes dos produtos que poderão ganhar lucros por fornecerem material com menor custo, e consequentemente com baixa qualidade.

# Referências


1. IBGE. Calendário Oficial de Exposições e Feiras Agropecuárias. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária. *Efetivo Pecuário do Estado de Goiás*. Brasília, **2008**.
2. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria SRD nº 20 de 06 de julho de 1997. Liberou o uso de fontes alternativas de fósforo a partir de fosfatos de rochas. Brasília. **1997**.
3. Maletto, S. Correlação da nutrição mineral e a sanidade. In: SEMINÁRIO SOBRE NUTRIÇÃO MINERAL, São Paulo. *Anais*... São Paulo, **1986**.
4. Association of American Feed Control Officials Incorporated. *Official guidelines for contaminant levels permitted in mineral feed ingredients*. Indiana: AOAC. **2001**.
5. Marçal, W.S.; Gaste, L.; Liboni, M.; Pardo, P.E.; Nascimento, M.R.; Hisasi, C.S. Lead Concentration in mineral salt mixtures used in beef cattle food supplementation in Brazil. *Vet. Arch.*, **1999**, 69, 6.
6. Marçal, W.S.; Campos Neto, O.; Nascimento, M.R.L. Valores sanguíneos de chumbo em bovinos Nelore suplementados com sal mineral naturalmente contaminado por chumbo. *Ciênc. Rural*., Santa Maria, **1998**, 28, 1.
7. NRC. National Research Council. *Subcommittee on Mineral Toxicity in Animals Nutrient requirements of beef cattle*. Washington: National Academy of Science, **1996**.
8. Andrigueto, J. M.; Perly, L.; Minardi, I.; Gemael, A.; Fleming, J. S.; Souza, G. A.; Bona Filho, A. Os princípios nutritivos e suas finalidades. In: *Nutrição animal*. 4 ed. São Paulo: Nobel, **1990**. p. 189-255.
9. Gonçalves, J. R. *Determinação de metais pesados em leite integral pasteurizado no Estado de Goiás*. **1999**. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
10. Allen, J.D. Minerals in animal feed. *Industrial Minerals*. London, 292, p. 35-39. **1992**.
11. Marçal, W.S.; Sousa, A. M.; Nascimento, M.R.I.; Carvalho, M.C. Valores de chumbo inorgânico em suplementos minerais para bovinos comercializados no Estado de Goiás. *Arq. Inst. Biol.*, **2004**, 71, 1.
12. Junqueira, O. M. Metais pesados contaminam carne. *Avicultura & Suinocultura Industrial*, São Paulo, **1993**, 38.
13. Nunes, R. C.; Kronka, R. N; Sobestiansky, J; Lopes, E. L.; Gonçalves, J. R. Retirada dos suplementos micromineral e/ ou vitamínico da ração de suínos em fase de terminação. Desempenho, níveis de minerais nos metacarpos e custo de ração. *Ciência Animal Brasileira*, **2002**, 3, 1.
14. Campos Neto, O.; Marçal, W.S. Os fosfatos na nutrição mineral de ruminantes. *Revista dos Criadores*, **1996**, 793.
15. Lobão, A. O. Mineralização de bovinos de corte. In: Simpósio Sobre Pecuária de Corte, Presidente Prudente. *Anais*... Jaboticabal: UNESP, **1977**.
16. Pansard, N. T. *Informações sobre fiscalização em suplementos minerais pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*. Londrina, **2002**.
17. Villegas-Navarro, A.; Elena Bustos, O.D.M.; R Eyes Raymond, A.; Dieck, T.A.; Reyes, J.L. Determination of lead in paired samples of blood and synovial fluid of bovines. *Experimenthal and Toxicologic Pathology*, **1993**.

18. Marçal, W.S. *Valores sanguíneos de bovinos nelore em pastejo de Brachiaria decumbens, suplementados com sal mineral naturalmente contaminado por chumbo*. **1996**. 92 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

19. Rosa, I. V. Fosfato natural como suplemento de fósforo para bovinos. In: VALLE, E.R. *et al. Coletânea de seminários técnicos 1986/88*. Campo Grande: Embrapa, **1989**.

20. Butolo, J. E. *Qualidade de Ingredientes na Alimentação Animal*. Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. **2002**.

21. Maracek, I.; Lazar, L.; Dietzova, I.; Korenekova, B.; Choma, J.; David, V. Residues of heavy metals in cow reproductive organs and morbidity of cattle in the fallout region of a metallurgical plant. *Vet. Med.*, **1998**, 43, 9.

22. Goiás. *Anuário Estatístico do Estado de Goiás*. Seplan. Goiânia, **2006**.

23. American Society for Testing and Materials. *Annual book of ASTM Standards*. Philadelphia: ASTM, **1980**.

24. Eaton, C.L.S.; Greenberg, A.E.; Trussell, R.R. (Eds.). *Standard methods for the examination of water and wastewater.* Washington: APHA, **1995**.

25. SAS. *Statistical Analysis System*. System for Windows, release 6.12. Cary, NC: 01 CD-ROM, **2002**.

26. Brasil. Sindirações. Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal/Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. *Métodos analíticos de controle de alimentos para uso animal*. São Paulo. **2009**.

27. Leite, F. *Validação em análise química*. 2. ed. Campinas: Editora Átomo, **1998**. 124 p.

28. Radostits, O. M.; Gay, C. C.; Blood, D. C.; Hinchcliff, K. W. Doenças causadas por substâncias químicas inorgânicas e produtos químicos utilizados nas fazendas. In: Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Blood, D.C.; Hinchcliff, K.W. *Clínica veterinária*: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, **2000**.

29. Buture, I. O.; Marçal, W. S. Teores de chumbo e cádmio em suplementos minerais para bovinos comercializados no Estado do Paraná. *Archives of Veterinary Science*, **2005**, 10, 1.

30. Viana, J. A. C. Fontes de sais minerais para bovinos e o desafio de suplementos de fósforo no Brasil. In: Simpósio Sobre Nutrição De Bovinos, 3. Piracicaba. *Anais*... Piracicaba: FEALQ, **1985**.

31. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 08 e 20 de 13 de dezembro de 1988. *Estabelece os padrões para misturas minerais para bovinos*. Brasília. **1988**.

José R. Gonçalves[1,2], Renata M. Gonçalves[3]* & Raniery M. Gonçalves[2].

[1]Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange, Rua Engenheiro Roberto Mange, n. 239, Bairro Jundiaí, CEP 75113-630, Anápolis, GO.

[2]Laboratório Nacional Agropecuário do Estado de Goiás. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Rua da Divisa s/n, Setor Jaó, CEP 74674-025, Goiânia, GO.

[3]Faculdade Anhanguera de Anápolis, Avenida Universitária, 683, Centro, CEP 75080-150, Anápolis, GO.

*e-mail: renata.nut@gmail.com

# Avaliação Fisico-Química do Córrego das Antas

Ari P. P. Júnior, Diego S. Silva, Wigney G. Costa & Taciano P. Ferreira

A água do Ribeirão das Antas é pouco utilizada pela população anapolina, apenas em alguns trechos da nascente, para banho e atividades de irrigação. Os parâmetros físico-químicos determinam a qualidade da água, verificando a poluição despejada, que ocasiona a degradação do manancial. Foram feitas as análises de dureza da água, turbidez, pH, sólidos dissolvidos, sólidos suspensos, sólidos totais, condutividade e alcalinidade físico-químicas que atendem as normas da ABNT, para estabelecer alguns parâmetros que caracterizam o corpo d'água a fim de estipular dados sobre a qualidade da água de um dos principais mananciais da cidade.

**Palavras chave:** *ribeirão, poluição, físico-química.*

The water of river Antas is little used by the population of city of Anápolis, only in some portions of the spring for bathing and irrigation activities. The physical and chemical parameters determine the water quality, checking the pollution evicted, leading to degradation of wealth. Were analyzed water hardness, turbidity, pH, dissolved solids, suspended solids, total solids, conductivity and alkalinity physical-chemical properties that meet the standards of ABNT, to establish some parameters that characterize the body of water in order to provide data on the water quality of one of the main sources of the city.

**Keywords:** *river, pollution, physical chemistry.*

# Introdução

A história de Anápolis começa No início do século XIX, viajantes percorriam o vale do Araguaia e o roteiro de Vianópolis/Corumbá de Goiás, entre eles, a cabeceira do Ribeirão das Antas, conhecido também por Campos Ricos, graças a excelência de seu solo e à abundância e variedade de caças existentes no local. Enfatiza-se a contribuição do Sr. Manoel Rodrigues dos Santos, que fazia realizar em sua fazenda, novenas e orações, aglomerando, já em 1859, um total de 15 casas e uma escola. Conta à tradição que, por esta época, D. Ana das Dores, quando trafegava pela região, perdeu um de seus animais, justo o que transportava uma imagem de Nossa Senhora de Santana. Quando encontrado, o animal estava deitado e os tropeiros não conseguiram levantar a caixa que continha a imagem, o que foi interpretado como sendo o desejo da Santa em permanecer no local. D. Ana prometeu doá-la à primeira capela que se erguesse ali, o que foi feito por seu filho Gomes de Souza Ramos, em 1870 [1].

O município está situado no Planalto Central, em uma posição estratégica para implantação de indústrias, visto a proximidade das capitais federal e goiana. Em função de sua localização privilegiada para o comércio do Centro-Oeste, ainda é o principal centro de comercialização de grãos do Estado, bem como o principal fornecedor de produtos hortifrutigranjeiros para a Central de Abastecimentos de Goiás-Ceasa [1].

O Ribeirão das Antas – que já deu nome ao município centenário – tem seis tributários na cidade, que abriga as nascentes de todos. São eles João Cesário, Monjolo, Ipiranga, Riboleira, Água Fria e dos Felizardos. Outra bacia, a do Catingueiro, ficou famosa recentemente por ter seu principal curso d'água (assoreado) destruído a ponte sobre a rua Jornalista Arlindo Cardoso. Sozinho, possui nada menos que 60 nascentes. A quarta centralizada pelo córrego João Cesário é aquela que margeia o Carrefour. Tem 2,5 km de extensão e duas nascentes. A última micro-bacia, formada pelo rio Padre Sousa, é a única que deságua no rio Tocantins, que pertence à bacia do Amazonas [1].

A água do Ribeirão das Antas é pouco utilizada pela população anapolina, apenas em alguns trechos da nascente, para banho e atividades de irrigação. A água para ser consumida pelo homem não pode conter substâncias dissolvidas em níveis tóxicos e nem transportar em suspensão microrganismos patogênicos que provocam doenças. A forma de avaliar a sua qualidade é através das análises físico-químicas e microbiológicas realizadas por laboratórios especializados. No Brasil, existem padrões de potabilidade regidos por portarias e resoluções legais, que dão subsídios aos laboratórios na expedição de seus laudos. A água utilizada na irrigação e na indústria também precisa ser de boa qualidade. Na irrigação a água não pode conter sais em excesso para não prejudicar as plantas e o solo, e nem conter substâncias dissolvidas que possam causar danos aos equipamentos. Na indústria, dependendo de algumas características físico-químicas, a água quando não submetida ao devido tratamento pode ocasionar incrustação e corrosão dos equipamentos, diminuindo sua vida útil [1].

**VARIÁVEIS DO PROCESSO**

Dentre as principais análises realizadas temos pH, cor, alcalinidade, sólidos totais dissolvidos, condutividade elétrica e dureza [2-4]. A análise de cor é uma medida que indica a presença na água de substâncias dissolvidas, ou finamente divididas (material em estado coloidal). Assim como a turbidez, a Cor é um parâmetro de aspecto de aceitação ou rejeição do produto. De acordo com a Portaria 518/04 do Ministério da Saúde o valor máximo permissível de Cor na água distribuída é de 15,0 N.T.U.[2-4].

A análise de pH é uma medida que estabelece a condição ácida ou alcalina de uma água. É um parâmetro que não tem risco sanitário associado diretamente à sua medida. De acordo com a Portaria 518/04 do Ministério da Saúde a faixa recomendada de pH na água distribuída é de 6,0 a 9,5 [2-4]. A alcalinidade da água é representada pela presença dos íons hidróxido, carbonato e bicarbonato. A importância do conhecimento das concentrações deste íon permite a definição de dosagens de agentes floculantes, fornece informações sobre as características corrosivas ou incrustantes da água analisada. Todos os íons causadores da alcalinidade têm características básicas, sendo assim reagente quimicamente com soluções ácidas, ocorrendo a reação de neutralização [2-4].

A medição da condutividade é um procedimento muito sensível para a medição de concentrações iônicas, mas deve ser usada com cautela, pois qualquer espécie com carga elétrica presente numa solução, contribuirá para a condutância total. A monitorização condutimétrica

é empregada em laboratórios para acompanhar a operação de unidades de troca iônicas semelhantes nos processos que exigem o uso de água muito pura [4-6].

Dureza é um parâmetro característico da qualidade de águas de abastecimento industrial e doméstico sendo que do ponto de vista da potabilização são admitidos valores máximos relativamente altos, típicos de águas duras ou muito duras. A despeito do sabor desagradável que referidos níveis podem suscitar elas não causam problemas fisiológicos. No Brasil, o valor máximo permissível de dureza total fixado pelo padrão de potabilidade, ora em vigor, é de 500mg$CaCO_3$/l [4-6].

**Resolução do CONAMA**

O dispositivo legal em vigor no Brasil é a Resolução n. 20 do Conselho Nacional do Meio Ambiente, de 18.06.86, que classifica as águas de acordo com seus usos preponderantes (Tabela 1), estabelecendo limites e/ou condições para os diferentes usos. Essa Resolução atribui valores a aproximadamente 70 parâmetros, para as cinco diferentes classes[6].

**Tabela 1.** Classificação segundo o CONAMA[6]

| Classe | Destinação |
|---|---|
| Especial | • Abastecimento doméstico sem prévia ou com simples desinfecção<br>• Preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas |
| Classe 1 | • Abastecimento doméstico após tratamento simplificado<br>• Proteção das comunidades aquáticas<br>• Recreação de contato primário: esqui aquático, natação e mergulho<br>• Irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que crescem rente ao solo e são ingeridas cruas sem remoção de película<br>• Criação natural e/ou intensiva (aqüicultura) de espécies destinadas à alimentação humana |
| Classe 2 | • Abastecimento doméstico após tratamento convencional<br>• Proteção de comunidades aquáticas<br>• Recreação de contato primário: esqui aquático, natação e mergulho<br>• Irrigação de hortaliças e plantas frutíferas<br>• Criação natural e intensiva (aqüicultura) de espécies destinadas à alimentação humana |
| Classe 3 | • Abastecimento doméstico após tratamento convencional<br>• Irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras<br>• Dessedentação de animais |
| Classe 4 | • Navegação<br>• Harmonia paisagística<br>• Usos menos exigentes |

Neste trabalho pretende-se avaliar as características físico-químicas da água do Córrego das Antas com o objetivo de classificá-la para possível utilização, segundo padrões estabelecidos pela Resolução 357 do CONAMA[6].

# Metodologia

As amostras foram coletadas no Córrego das Antas, localizado na cidade de Anápolis, Goiás, em três pontos distintos durante o mês de Outubro de 2008. Em cada campanha, a amostragem foi realizada em três pontos do córrego, sendo a primeira coleta em sua nascente, que fica localizada na zona rural no bairro São João próximo a fonte Água Cristalina, Figura 1. A segunda coleta foi realizada próximo ao Central Park no bairro Vila Góis, Figura 2. A terceira coleta, foi realizada na saída do córrego da cidade, na entre os bairros São Carlos e bairro Santa Maria[7], Figura 3 A distância entre os pontos 1 e 3 de coleta é de15,24 Km.

**Figura 1.** Ponto de coleta 1

**Figura 2.** Ponto de coleta 2

**Figura 3.** Ponto de coleta 3

**Procedimento para amostragem da água**

As amostras foram coletadas em frascos de 2 litros de polietileno de alta densidade, que passaram previamente por um rigoroso processo de limpeza. Os frascos foram inicialmente lavados com detergente e água desionizada. Em seguida, passavam um dia com uma solução de $HNO_3 – H_2O$ (1:5, v/v) e depois lavados e guardados com água desionizada até o momento de utilização. Posteriormente, esses frascos foram lavados por três vezes pela própria água no local de amostragem. A coleta realizada foi do tipo composta, ou seja, o frasco era preenchido por diferentes alíquotas coletadas em um raio de 1 a 2 m e cerca de 5 cm abaixo da superfície. Durante a coleta, as amostras foram mantidas dentro de caixa de isopor com gelo e imediatamente após a chegada ao laboratório da Unievangélica foram colocadas em geladeira (4ºC)[7]. As amostras coletadas foram fracionadas e direcionadas para a realização das análises de dureza da água, turbidez, pH, sólidos dissolvidos, sólidos suspensos, sólidos totais, condutividade e alcalinidade [3,7].

Para a análise de determinação de dureza total na água foram utilizadas três amostras com 100mL tituladas com EDTA, segundo o procedimento da ABNT NBR 12621. Posteriormente realizou–se a análise de turbidez no equipamento *Turbidímetro TB1000***,** em seguida as amostras foram submetidas à análise de pH com o equipamento *pHmetro k400a maca15*. As análises de condutividade e sólidos dissolvidos foram realizadas no equipamento *Condutivímetro marca Lutron YK-22CT*, as análises de sólidos em suspensão e sólidos totais foram realizados no Laboratório da UEG por filtração a vácuo segundo o procedimento da ABNT NBR 10664. Foi realizado o teste de alcalinidade segundo o procedimento da ABNT NBR 13736 [5-10].

# Resultados e discussão

Os dados obtidos para as análises físico-químicas, estão expostos nas Figuras 4-10.

A Figura 4 apresenta os resultados das análises de condutividade para a amostra coletada no início são de 21,89 CD.µS/mL, para a amostra coletada no centro da cidade foi de 135,3 CD.µS/mL, e a amostra coletada na saída de 168,1 CD.µS/mL. O aumento na condutividade deve-se ao fato dos poluentes despejados alteram o pH da água, aumentando também a quantidade de íons e, consequentemente, aumenta a condutividade [3,4,8].

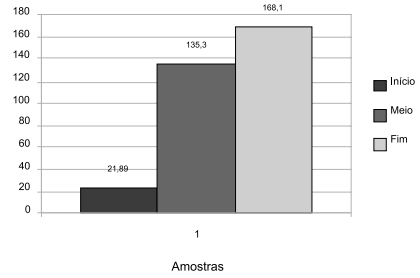



**Figura 4.** Análise de condutividade

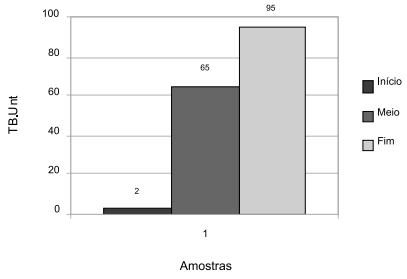



**Figura 5.** Análise de turbidez

A medida de turbidez demonstrada Figura 5 e nota-se que durante a trajetória no perímetro urbano, a turbidez aumenta. No início, a medida foi de 2,0 UNT, no centro da cidade a turbidez chega a 65 UNT e na saída da cidade é de 95 UNT. Á medida que vai adentrando a cidade o Ribeirão é cada vez mais poluído, e a quantidade de materiais em suspensão aumenta [3,4,8.]

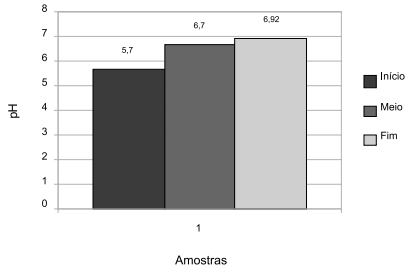



**Figura 6.** Análise de pH

A análise de pH da água, apresentada na Figura 6, indica que medida que o ribeirão percorre a cidade e o

despejo de poluentes aumenta o pH da água vai ficando cada vez mais básico. No início foi de 5,7, no centro 6,7 e já no final é de 6,92 [3,4,7].

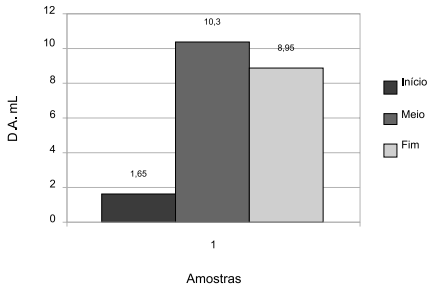



**Figura 7.** Análise de dureza total

Na Figura 7 observa-se que a concentração de dureza na água apresenta valores baixos no primeiro ponto de coleta, aumentando nos dois últimos. Os resultados obtidos no início são: 3,3mg($Ca^{2+}$)/L de $H_2O$, no centro da cidade são: 20,6mg($Ca^{2+}$)/L de $H_2O$ e no final do ribeirão é: 17,9mg($Ca^{2+}$)/L de $H_2O$ [3,4,8].

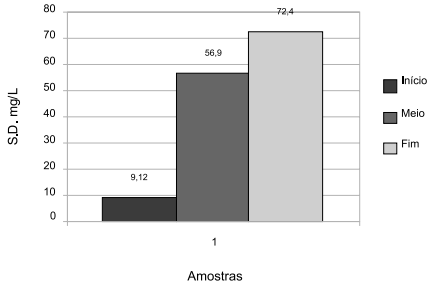



**Figura 8.** Análise de sólidos dissolvidos

Dos resultados da determinação de sólidos dissolvidos apresentados na Figura 8 observa-se que a quantidade no início foi de 9,12mg/L, no centro da cidade a quantidade é de 56,9mg/L e no final é de 72,4mg/L. Verifica-se que à medida que o Ribeirão entra na cidade a quantidade de sólidos dissolvidos aumenta devido a quantidade de poluentes despejados [3,4,7].

Na Figura 9 apresenta os resultados para sólidos em suspensão, sendo que a quantidade no início foi de 6 mg/L, no centro da cidade foi de 24mg/L e no final foi de 124mg/L. Em comparação com os sólidos dissolvidos verificou-se que a quantidade de sólidos em suspensão é maior no final da cidade, enquanto que a quantidade de sólidos dissolvidos é maior no centro da cidade devido ao fato de que até o centro [3,4,7].

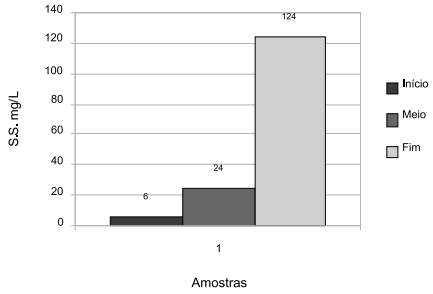



**Figura 9.** Análise de sólidos suspensos

Na determinação de sólidos totais é feita pela soma de sólidos dissolvidos e em suspensão, e mostra que a partir do centro da cidade é que o ribeirão apresenta maior quantidade de substâncias poluidoras (Figura 10)[3,4,7].

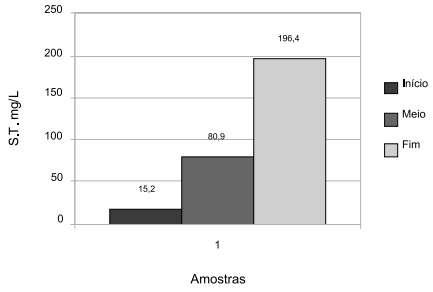



**Figura 10.** Análise de sólidos totais

Verificou-se que a água do Ribeirão das Antas ao entrar na cidade de Anápolis, de acordo com a Resolução do CONAMA, apresentou características físico-químicas que se enquadram na classe 1, podendo ser destinada ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado; à proteção das comunidades aquáticas e à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, sendo de conformidade para a irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película. Contudo, a amostra coletada no centro da cidade e na saída do córrego da cidade, verificou-se que a água se enquadram na classe 2 da Resolução do CONAMA, que pode ser destinada, ao abastecimento para consumo humano, após tratamento

convencional; à proteção das comunidades aquáticas e a recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho.

# Conclusão

As análises físico-químicas da água permitem verificar sua qualidade. Segundo a classificação do CONAMA, identificou-se a classe que o Ribeirão das Antas pertence, sendo que no início pertence a Classe 1 e no meio e final da cidade pertence a Classe 2. De acordo com os resultados observou-se que no inicio da cidade a água poderia ser utilizada para o abastecimento após tratamento simplificado, enquanto no meio e saída da cidade, torna-se necessário um tratamento convencional, além de não ser adequado para irrigação de frutas rasteiras e verduras que são consumidas crua.

# Referências


1. *Freitas, R. A.; Anápolis, Passado e Presente - História, Geografia e Economia.* http://www.ahistoriadeanapolis.com.br/anapolis_aspectos_geograficos.php#hidrgrafia. Acessado em Set. **2008**.
2. Macedo, J. A. B.; Água & Água. 2.ed., CRQ-MG:Belo Horizonte, **2004**.
3. Mendham, J.; Denney, R.C.; Barnes, J.D.; Thomas, M.; *Análise Química Quantitativa*. 6.ed., Editora LTC: Rio de Janeiro, **2002**.
4. Harris, D. C.; *Análise Química Quantitativa*. 5.ed., Livros Técnicos Científicos: Rio de Janeiro, **2001**.
5. Mendham, J.; Denney, R.C.; Barnes, J.D.; Thomas, M.; *Análise Química Quantitativa*. 6.ed., Livros Técnicos Científicos: Rio de Janeiro, **2002**.
6. Conama. *Resolução Conama 357/2005*: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências, 2005. http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res_conama_357_05.pdf. Acessado em nov. **2008**.
7. Richter, E.M.; Fornaro, A.; Lago, C.L.; Angnes, L.; *Quim. Nova* **2007**, *30*(5), 1147. http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/2007/vol30n5/17-AR06261.pdf. Acessado em dez. 2008.
8. Associação Brasileira de Normas Técnicas; *NBR13736/96*: Água – Determinação de alcalinidade – Métodos potenciométricos e titolométricos, Rio de Janeiro, **1996**.
9. Associação Brasileira de Normas Técnicas; *NBR12621/89*: Águas - Determinação da dureza total - Método titulométrico do EDTA-Na, Rio de Janeiro, **1989**.
10. Associação Brasileira de Normas Técnicas; *NBR12621/89*: Águas - Determinação de resíduos (sólidos) - Método gravimétrico, Rio de Janeiro,**1989**.



Ari P. P. Júnior[1], Diego S. Silva[1], Wigney G. Costa[1] & Taciano P. Ferreira[1,2]*.

[1]Instituto de Educação Superior, UniEvangélica, Anápolis, GO.

[2]Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange, CEP 75113-630, Anápolis, GO.

*e-mail: taciano@hotmail.com

# A sua empresa, como está?

## O uso dos dados do IBGE para pesquisa e planejamento estratégico das indústrias dos setores químico e farmacêutico de Goiás

No ambiente cada vez mais globalizado e competitivo em que as empresas se inserem na atualidade, para aumentar sua competitividade, ou mesmo para se manter no mercado, é preciso reavaliar constantemente as práticas gerenciais adotadas e situar-se em relação ao mercado. Para tanto, ter e saber utilizar as informações disponíveis sobre a economia e sobre seu setor de atividade é fundamental. Segundo o IBGE[1] (2010), de 2007 para 2008 sobreviveram 78% das empresas ativas em 2007. Esta porcentagem foi de 68% para empresas sem pessoal ocupado e de 89% para empresas com até nove funcionários. De acordo com o SEBRAE[2], a taxa de sucesso de uma empresa está relacionada diretamente a análises prospectivas relacionadas à viabilidade econômica do negócio. Um estudo realizado com 1961 empresas de São Paulo entre 1999 e 2003 mostrou que a sobrevivência das empresas investigadas no estado se relacionou principalmente com práticas gerenciais adotadas pelas mesmas. Estas práticas gerenciais, por sua vez,. envolvem principalmente o estabelecimento de objetivos e metas, a busca de informações e a antecipação de acontecimentos, de acordo com os objetivos estabelecidos O estudo revela ainda que, em geral, as maiores empresas são as que mais adotam esse tipo de prática gerencial e, não por acaso, são as que têm maior taxa de sobrevivência.

Ao estabelecer objetivos e metas, não é incomum a realização de estudos de viabilidade econômica para a implantação de uma empresa ou de uma nova unidade de uma empresa. De fato, várias empresas de consultoria vendem serviços dessa natureza a empresas que queiram se estabelecer, se restabelecer em outras regiões ou mesmo expandir suas atividades. Os serviços disponíveis variam da pura análise demográfica, que envolve aspectos sociais que focam na mão de obra disponível, nas regiões foco da empresa contratante, até os estudos de geomarketing. Um serviço mais completo envolve a avaliação de possibilidades de incentivos fiscais, qualificação da mão de obra, parcerias, etc.

Nesta perspectiva, os dados coletados pelo IBGE podem ser de extrema utilidade pois, além do Censo Demográfico e da contagem populacional realizados a cada dez anos, as pesquisas do IBGE fornecem acompanhamento um contínuo da estrutura do setor produtivo, como receitas, gastos, despesas, salários (como as pesquisas anuais de indústrias, serviços, comércio e indústria da construção); de receitas e despesas da administração pública federal, estadual e municipal; de índices de preços e vendas no comércio varejista e produção industrial, coletados mensalmente; além de pesquisas de orçamento familiares e de estruturas domiciliares, saneamento básico, inovação tecnológica, dentre outros. Em conjunto, fornecem o retrato mais amplo e, ao mesmo tempo, pormenorizado, da nossa realidade, permitindo entender as variações sociais e econômicas ocorridas em nosso país ao longo dos anos.

Para se ter uma ideia disso, basta ter em mente que uma breve pesquisa em buscadores na internet com o termo IBGE (excluindo-se o próprio site do IBGE) retorna mais de 1.500.000 páginas, o que mostra que estes dados tem sido utilizados e indica que isto pode ter papel decisivo para as empresas ao fornecer diferenciais competitivos. Por isso gostaríamos de salientar dois pontos: 1) como os dados obtidos pelo IBGE podem ser utilizados para a realização de análises de viabilidade econômica? 2) após o estabelecimento da empresa, como o empresário pode acompanhar a evolução de sua empresa em relação a outras do mesmo ramo, seja na sua região, seja em outros locais. Que dados podem ser utilizados pelas empresas, onde eles estão?

Para direcionar esta questão e mostrar como esses dados podem contribuir para avaliação e planejamento estratégico das empresas, apresentaremos uma breve análise da evolução do setor industrial de Goiás em relação ao Centro-Oeste e ao Brasil, enfatizando as variações de receita e despesas do setor químico e farmacoquímico de Goiás entre 2007 e 2008, conforme a Pesquisa Industrial Anual[4,5]. Serão ainda, apresentados alguns dados referentes à Pesquisa Industrial Mensal-Produção Física Regional[6] para o período de março de 2009 a março de 2011.

**A Indústria Goiana no período recente**

A indústria goiana concentrava em 2008, 1165 unidades locais industriais, englobando indústrias extrativas e indústrias de transformação. Este número correspondia a cerca de 3% do total de unidades do Brasil e 51,8% do total do Centro-Oeste. Estes dados são apresentados na Tabela 1, que mostra também os valores de Pessoal Ocupado (PO) em 31 de dezembro (2,49% e 51,3%, em comparação ao Brasil e ao Centro-Oeste, respectivamente), salários (1,69% e 50,99%), custos e despesas gerais (2,64% e 52,09%) e despesas industriais (2,73% e 49,96%), receita líquida de vendas industriais (2,4% e 51,35%), consumo de matérias-primas (2,88% e 50,09%) e Valor da Transformação Industrial – VTI (1,89% e 51,51%).

**Tabela 1.** Dados Gerais da Indústria Goiana em Relação ao Brasil e ao Centro-Oeste - 2008

| Variáveis | Totais | %GO_ BR_2008 | %GO_ CO_2008 |
|---|---|---|---|
| Número de unidades locais (UL) | 1165 | 2,97 | 51,80 |
| Pessoal ocupado em 31.12 (PO) | 29458 | 2,49 | 51,34 |
| Salários, retiradas e outras remunerações (SAL) | 280503 | 1,69 | 50,99 |
| Custos e despesas (DESP) | 3759123 | 2,64 | 52,09 |
| Receita líquida de vendas industrial (REC IND) | 3250853 | 2,40 | 51,35 |
| Custos das operações industriais (CUSTOS IND) | 2215363 | 2,73 | 49,96 |
| Consumo de matérias-primas, materiais auxiliares e componentes (MAT) | 2033627 | 2,88 | 50,09 |
| Valor da transformação industrial (VTI) | 1353411 | 1,89 | 51,51 |

Fonte: IBGE (2010). Pesquisa Industrial Anual.

Quanto à relação entre os dados de PO e salários, observamos que os 51,34% do pessoal ocupado em Goiás em relação ao Centro-Oeste são responsáveis por 50,99% dos salários da região, o que indica uma média salarial na indústria abaixo do Centro-Oeste. Quando comparada com o Brasil, a queda nas médias salariais é ainda maior, visto que 2,49% do PO alocado nas indústrias em Goiás representa apenas 1,69% dos salários pagos na indústria brasileira. Certamente, essas diferenças têm relação com o tipo de indústria em cada região. Contudo, é importante observarmos um dado como este, visto que pode repercutir diretamente sobre a captação e fixação de mão de obra no Estado, notadamente aquela com maior qualificação.

Apesar destes salários e do baixo índice relativo de custos e despesas industriais, conjugado ao baixo consumo de matérias-primas relativamente à porcentagem de ULs, verificamos que o VTI estadual em relação ao nacional apresenta um valor relativamente baixo. Estes dados podem representar diversas relações, como baixo aproveitamento de matérias-primas, pouca racionalização nos gastos/alocação de despesas, baixo nível de produção ou a necessidade de praticar preços mais competitivos como forma de ultrapassar os problemas derivados de questões logísticas. Há ainda que se observar a possível relação disso com custos operacionais como transporte (de insumos, matérias-primas ou dos produtos industrializados).

**Os setores químico, farmacoquímico e farmacêutico de Goiás nos últimos anos – análise estrutural**

Além dos dados referentes ao setor industrial como um todo, o IBGE fornece acompanhamento anual e mensal da indústria extrativa e dos diversos setores da indústria de transformação, como fabricação de produtos químicos e fabricação de produtos farmacoquímicos farmacêuticos. Ao longo dos anos, podemos observar como a estrutura destes setores se configura quanto à sua participação em relação às indústrias de transformação em Goiás e também no tocante aos respectivos setores no Brasil.

Com esses dados em mão as variações observadas no estado (crescimento ou retração) podem ser analisadas à luz das variações gerais da indústria de transformação localmente indicadas, enquanto as variações nos respectivos setores podem ser avaliadas quanto às variações em nível nacional. Mensalmente, índices de receitas, salários e produção proveem indicadores dessas variações em comparações a curto prazo, médio prazo ou longo prazo .

E, certamente, de posse de dados próprios e dados gerais como os aqui apresentados, uma determinada indústria pode se localizar em relação às demais indústrias do ramo e avaliar sua estrutura, suas receitas, seus gastos e, se necessário, rever suas próprias práticas gerenciais. Aqui, vale lembrar da importância da revisão periódica das práticas gerenciais apontada no estudo supracitado.

Para ilustrar como as análises podem ser feitas, vamos inicialmente fazer uma comparação entre as indústrias de Goiás entre 2007 e 2008. Foi apontada acima a participação das indústrias de Goiás em relação ao Centro-Oeste e ao Brasil. Abaixo, a Figura 1 apresenta como variaram em Goiás as porcentagens de Unidades Locais (UL), Pessoal Ocupado (PO), Salários, Receita Industrial, Custos Industriais e VTI. Estas variações são apresentadas para o setor industrial como um todo, para as indústrias de transformação, para o setor de fabricação de produtos químicos e, por último, fabricação de farmacoquímicos e farmacêuticos (IBGE, 2009, IBGE, 2010).

Com relação às ULs, pode-se ver que o número aumentou em torno de 4% tanto para a indústria em geral quanto para as indústrias de transformação. Por outro lado, no mesmo período houve, no estado, diminuição no total de ULs de indústrias do setor químico e do setor farmacoquímico/farmacêutico. Esta diminuição foi mais acentuada para o setor farmacoquímico/farmacêutico, que teve uma redução de 13% nas ULs. Os dados indicam que, enquanto o setor industrial de Goiás se expandiu no período, os setores de fabricação de produtos químicos e de fabricação de produtos farmacoquímicos/farmacêuticos sofreram retração em relação ao número de ULs.

Para os demais dados apresentados, todos os setores apresentaram aumento na comparação entre 2007 e 2008, conforme será visto a seguir. O crescimento de PO e Salários das indústrias químicas e farmacoquímicas/farmacêuticas foi menor que o crescimento das indústrias em geral e das indústrias de transformação em Goiás. Enquanto para a indústria em geral e as indústrias de transformação o PO e os salários pagos tiveram aumento de 10% e 26%, respectivamente, os crescimentos do PO foram de 6% (químico) e 5% (farmacoquímico/farmacêutico), e os de salários foram de 19% e 14% para os mesmos setores.

De 2007 para 2008 houve um crescimento médio de 19% na receita industrial das indústrias de transformação de Goiás. Com relação às indústrias químicas e farmacoquímicas/farmacêuticas, podemos observar tendências diferentes. Enquanto o setor químico apresentou 29% de crescimento na receita industrial, o setor farmacoquímico/farmacêutico teve aumento médio na receita de 14%, ligeiramente abaixo dos dados da indústria geral e metade do crescimento do setor químico. Em contrapartida, neste período o setor químico apresentou aumento de 68% nos custos industriais, quase três vezes maior que a média das indústrias de Goiás, que foi de 25%, enquanto o setor farmacoquímico/farmacêutico teve aumento de 19% nos custos.

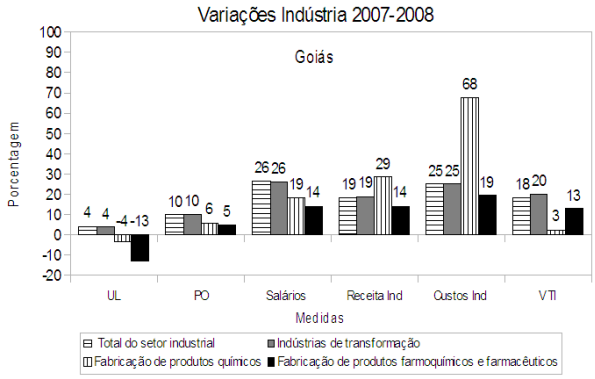



**Figura 1.** Variações em Unidades Locais (ULs), Pessoal Ocupado (PO), Salários, Receitas Industriais, Custos Industriais e VTI em Goiás para o setor industrial, para as indústrias de transformação e para fabricação de produtos químicos e farmacoquímicos/farmacêuticos de 2007 a 2008. Fonte: IBGE. Pesquisa Industrial Anual (2007) e (2008).

Juntamente a outras medidas, estes dados tiveram implicações para as diferenças no aumento do VTI no período em que as indústrias de transformação de Goiás teve um aumento no VTI de 20% em 2008, em comparação com 2007. Os aumentos nos VTIs dos setores químicos e farmacoquímicos/farmacêuticos foram de 3% e 13%, menores que o crescimento percentual médio das indústrias de transformação de Goiás se relacionam diretamente ao baixo aumento nas receitas industriais para o setor farmacoquímico/farmacêutico, e o aumento muito acima da média nos custos industriais para o setor químico.

Apesar de ter crescido de 2007 para 2008, os dados para o setor farmacoquímico/farmacêutico apresentam ligeira expansão no número de ULs relativamente ao Centro-Oeste, mas uma diminuição no PO, nos Salários, receita e custos industriais no período. Estes dados fizeram com que o setor, responsável por quase 100% do

valor de transformação industrial do Centro-Oeste em 2007, passasse a representar menos de 80% em 2008.

**A produção física do setor químico de 2009 a 2011**

Os dados referentes à estrutura geral das indústrias, conforme disponibilizados na publicação da Pesquisa Industrial Anual, tem uma grande amplitude e permitem um entendimento mais geral dos setores investigados. Além desses dados, mensalmente temos indicadores sobre a produção industrial no Brasil e regionalizada para 13 unidades da federação e região nordeste, divulgados pela PIM-PF (Pesquisa Industrial Mensal – Produção Física), que permitem acompanhar a produção de cada setor em relação ao mês anterior, ao mesmo mês do ano anterior, ao longo de 12 meses em relação aos 12 meses imediatamente anteriores e no ano corrente. O indicador que compara o mês de referência com o mesmo mês do ano anterior pode, por exemplo, ser acompanhado ao longo de um período, de forma a se saber como a produção variou em vários meses em relação aos respectivos meses do ano anterior. Para exemplificar, a Figura 2 apresenta a comparação da produção de produtos químicos para os estados do Amazona, Ceará, Pernambuco, Bahia e Goiás ao longo de um período de 25 meses, iniciando em março de 2009 até março de 2011. A medida base é 100, que indica que a produção do mês em análise foi igual à produção no mesmo mês do ano anterior. Valores acima de 100 implicam em uma maior produção, ao passo que valores abaixo dessa medida indicam que a produção do mês em questão foi menor que no mesmo mês do ano anterior.

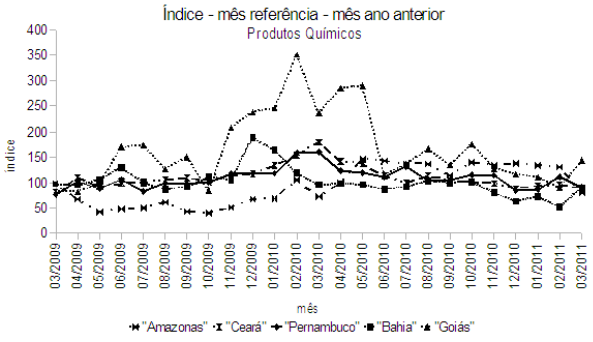



**Figura 2.** Índice de Produção Física na comparação do mês de referência com o mesmo mês do ano anterior para as indústrias de fabricação de produtos químicos nos estados do Amazonas, Ceará, Pernambuco, Bahia e Goiás para o período de março de 2009 a março de 2011. Fonte: IBGE PIM-PF Regional, publicações mensais - abril de 2009 a abril de 2011

Pode-se observar que a produção no mês de março de 2009 ficou abaixo de 100 para todos os estados citados, o que representa uma produção menor que a observada no mesmo mês de 2008. O estado do Amazonas apresenta produções ainda mais baixas que nos respectivos meses do ano anterior quando analisados os índices obtidos de abril de 2009 a março de 2010. Após este período, o setor apresenta um aumento na produção mensal em relação ao mesmo mês do ano anterior. Para Ceará e Pernambuco, há uma manutenção na produção ao longo dos meses, com produção ligeiramente maior que a do respectivo mês do ano anterior para a maior parte do período. A produção do setor na Bahia concentra-se na maior parte do período abaixo dos meses de referência do ano anterior, exceto pela produção dos meses de outubro de 2009 a fevereiro de 2010.

Quanto a Goiás, a produção mensal apresenta crescimentos significativamente maiores em comparação aos respectivos meses do ano anterior do que os observados para as unidades da federação com dados disponíveis apresentadas acima. Ao longo do tempo, a produção comparada com os respectivos meses dos anos anteriores foi maior, em alguns casos mais que o dobro, como no período que compõe os meses de novembro de 2009 a maio de 2010. Produção inferior ao mês correspondente do ano anterior, de acordo com esta medida, ocorreu apenas apenas nos meses de março, abril, maio e outubro de 2009, e fevereiro de 2011.

# Considerações Finais

Podemos retornar agora à nossa questão inicial: E sua empresa, como está? Ela tem crescido, tem tido retração? Este crescimento ou retração é comparável ao que foi apresentado para as indústrias de Goiás e, mais especificamente, para os setores de fabricação de produtos químicos e de fabricação de produtos farmacoquímicos/farmacêuticos? Em alguns casos, as mudanças ocorridas em uma empresa são decorrentes de fatores externos a ela, como aspectos econômicos ou sociais no país. Como falamos ao início, muitas vezes as empresas avaliam estes aspectos ao implantar suas unidades, mas deixam de acompanhá-los após esta fase. Mas como as mudanças nesses aspectos são dinâmicas, acompanhá-las é fundamental para o estabelecimento de estratégias.

O presente trabalho fornece dados importantes para serem considerados pelas indústrias e, mais especificamente, pelas empresas dos ramos químicos e farmacoquímicos/farmacêuticos. Eles mostram que o nível de eficiência (medido pelo VTI) das ULs de Goiás é comparável ao do Centro-Oeste, mas está abaixo do nacional. Em relação mais especificamente ao setor químico, a diminuição de ULs de 2007 para 2008 não representou diminuição na produção em relação ao Centro-Oeste. Mais ainda, Goiás tem mantido produção crescente, quando comparada com os respectivos meses dos anos anteriores e principalmente quando comparado a outras Unidades da Federação. Devemos observar ainda que, no estado, o crescimento do VTI nos dois setores analisados de 2007 para 2008 foi menor que o crescimento industrial geral, o que pode indicar um desaquecimento.

A brevidade das análises aqui apresentadas objetiva levar o setor produtivo a atentar para esses pontos. Certamente que há muito mais a considerar, pois a produção é afetada por diversos fatores. Ao se pensar em diferencial competitivo a empresa pode considerar, por exemplo, alternativas , utilização de métodos para racionalização da produção, análises logísticas, qualificação de pessoal. Cada empresa tem acesso a seus próprios relatórios e pode utilizar os dados disponíveis no IBGE e em outros órgãos, conforme suas necessidades. A grande vantagem de ter dados comparativos é exatamente poder compreender se estamos crescendo tanto quando poderíamos, ou se estamos nos retraindo mais do que deveríamos.

Às vezes empresários pensam que o retorno de pesquisas como estas é muito baixo ou que favorece apenas o Governo. Não há como discordar que esses dados devem favorecer o Governo, mas como forma de subsidiar ações em prol dos diversos setores da sociedade. Mas, como mostramos acima, não é apenas ele que pode se beneficiar dessas informações. Pelo contrário, há diversos dados disponíveis, não apenas nas pesquisas aqui apresentadas, mas nas diferentes pesquisas sociais e econômicas, como indicamos ao início deste trabalho, o que permite ao IBGE fornecer o retrato mais completo do Brasil. Esses dados são construídos com a participação efetiva da própria sociedade, a partir de sua população e das empresas dos diferentes setores. O fornecimento de informações precisas e constantes ao órgão são assim, ponto fundamental para que os informantes possam obter os melhores benefícios.

## Referências


1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Demografia das Empresas **2008***. Rio de Janeiro: IBGE.
2. SEBRAE. Boletim estatístico de micro e pequenas empresas. Observatório SEBRAE 1º semestre 2005. **2005**, p. 1 - 80.
3. Mizumoto, F. M.; Artes, R.; Lazzarini, S. G.; Hashimoto, M.; Bedê, M. A.. A sobrevivência de empresas nascentes no Estado de São Paulo: um estudo sobre capital humano, capital social e práticas gerenciais. *Revista de Administração da USP, **2010**, 45*, 4, 343-355.
4. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Industrial Anual – **2008**. *Pesquisa industrial, Rio de Janeiro, 27*, 1: 1-186.
5. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Pesquisa Industrial Anual – **2007**. Pesquisa industrial, 26*, 1: 1-198.
6. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). *Indicadores IBGE: Pesquisa Industrial Mensal – Produção Física – Regional. **2011** (abril)*, p. 1.



Cristiano Coelho, Edson R. Vieira & Emerson Wruck.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, UE-GO.

# Instruções para envio de artigos para a Revista Processos Químicos

**Prezado(a) autor(a),**

Para que seu artigo possa entrar em nosso processo de avaliação para possível publicação na revista Processos Químicos, o mesmo deverá satisfazer as seguintes condições:

► Utilizar somente o editor Microsoft Word, numerando todas as páginas;

► Conter no máximo 40 laudas, incluindo Figuras, Tabelas, Esquemas etc;

► Conter Resumo e Abstract, ambos com até 100 palavras;

► Conter Palavras-chave e Keywords, ambos com até 3 palavras;

► Título com no máximo 20 palavras;

► Titulação do autor (créditos). Dados pessoais do autor: endereço, telefone, e-mail;

► As figuras, tabelas, esquemas etc devem ser colocadas após as referências e devidamente identificadas. Se escaneadas, devem ser em alta resolução (800 dpi/ bitmap para traços) com extensão TIF ou JPEG. As fotos ou desenhos com cor (300 dpi/grayscale) devem ser enviadas com extensão tif/jpg, para não termos problemas ao aplicá-las no padrão da Revista. Outras extensões possíveis: CDR, EPS ou CDX. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente. Considerar que as figuras deverão ter largura máxima de uma coluna (8,5 cm) ou, excepcionalmente, de 2 colunas (17,5 cm).

► As figuras (gráficos, esquemas, etc.) deverão ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco).

► A primeira página deverá conter o título do trabalho, nome e endereço dos autores (para a revista, a menor unidade é o departamento). Havendo autores com diferentes endereços estes deverão se seguir imediatamente ao nome de cada autor. Os autores devem ser agrupados por endereço. Indicar com asterisco(*) o autor para correspondência, colocando seu e-mail no rodapé desta página (um só e-mail). A segunda página deverá conter o título, o resumo e o abstract do trabalho;

► As referências bibliográficas deverão ser numeradas e todas citadas no final do artigo. Será utilizada a abreviatura da revista como definida no *Chemical Abstracts Service Source Index* (ver *http://www.cas.org/sent.html*). Caso a abreviatura autorizada de uma determinada revista não puder ser localizada e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo. Exemplos de citações:

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, *67*, 518.
2. Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zadev.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, *19*, 708.
3. Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, *7*, 123;
4. Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 473.
5. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.
6. Cotton, F.A.: Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

► Espaço duplo entre linhas;

► Fonte: *Times New Roman* 12;

► Enviar uma cópia do artigo, acompanhada de carta de encaminhamento à Editoria da Revista Processos Químicos, para o seguinte endereço eletrônico: *revistapq.senai@sistemafieg.org.br*;

# SENAI Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial

## SENAI

**Faculdade de Tecnologia Senai Ítalo Bologna**
R. Armogaste J. Silveira, n° 612, Setor Centro-Oeste
CEP 74560-020 - Goiânia-GO
Fone: (62) 3226-4500 - Fax: (62) 3226-4504
e-mail: fatecib.senai@sistemafieg.org.br

**Núcleo de Confecção de Trindade**
Rua 7, esquina com Rua 8, Quadra 10, n° 939
Setor Guarujá Parque
CEP 75380-000 - Trindade-GO
Fone: (62) 3505-1293

**Núcleo de Confecção de Jaraguá**
Av. Cristóvão Colombo de Freitas, Quadra 4
Lotes 1 e 2, Setor Aeroporto
CEP 76330-000 - Jaraguá-GO
Fone/Fax: (62) 3326-3737

**Faculdade de Tecnologia Senai Roberto Mange**
Rua Engenheiro Roberto Mange, n° 239
Bairro Jundiaí - CEP 75113-630 - Anápolis-GO
Fone: (62) 3902-6200 - Fax: (62) 3902-6226
e-mail: fatecrm.senai@sistemafieg.org.br

**Núcleo de Educação Profissional Senai Luziânia**
Rua Bahia, s/n, Parque Viegas - Luziânia-GO
CEP 72800-000 - Fone: (61) 3622-1103

**Núcleo Sesi/Senai Formosa**
Rua Antonio Dutra, Qd. 94, s/n - Centro - Formosa-GO
CEP 73801-200 - Fone: (61) 3981-1075

**Centro de Formação Profissional Bairro Filostro Machado**
Rua Antonio de Souza Ramos, s/n - Anápolis-GO
CEP 75000-000 - Fone: (62) 3902-6200 - Fax: (62) 3902-6226

**Faculdade de Tecnologia Senai de Desenvolvimento Gerencial**
Rua 227-A, n° 95, Setor Leste Universitário
CEP 74610-060 - Goiânia-GO
Fone: (62) 3269-1200 - Fax: (62) 3269-1233
e-mail: fatesg.senai@sistemafieg.org.br

**Escola Senai Itumbiara**
Rua Olívia Garcia Fagundes, n° 32
Bairro Paranaíba - CEP 75503-970 - Itumbiara-GO
Fone/Fax: (64) 3404-2002

**Escola Senai Vila Canaã e Unidades Móveis**
Rua Prof. Lázaro Costa, n° 348, Vila Canaã
CEP 74415-420 - Goiânia-GO
Fone/Fax: (62) 3235-8100
e-mail: canaa.senai@sistemafieg.org.br

**Escola Senai Catalão**
Av. Dr. Lamartine P. Avelar, n° 1.400
Setor Universitário - CEP 75704-020 - Catalão-GO
Fone/Fax: (64) 3411-1065
e-mail: catalao.senai@sistemafieg.org.br

## SESI SENAI

**Unidade Integrada Sesi Senai Rio Verde**
Av. Guanabara, n° 217, Setor Pausanes
CEP 75902-740 - Rio Verde-GO
Fone/Fax: (64) 3612-1110
e-mail: senaifb@sistemafieg.org.br

**Unidade Integrada Sesi Senai Aparecida de Goiânia**
**(Centro de Atividades Prof. Venerando de Freitas Borges)**
Rua dos Pirineus, Quadra 1, Lote 1
Residencial Village Garavelo
CEP 74912-260 - Aparecida de Goiânia-GO
Fone/Fax: (62) 3283-1300
e-mail: aparecida.sesi@sistemafieg.org.br

**Unidade Integrada Sesi Senai Niquelândia**
Av. Brasil, Quadras 26 e 27,
Conjunto Habitacional Codemin, Jardim Atlântico, 1ª etapa
CEP 76420-000 - Niquelândia-GO
Fone/Fax: (62) 3354-1802 / (62) 3354-1750
e-mail: misclay.senai@sistemafieg.org.br

**Núcleo Integrado Sesi Senai Barro Alto**
Rua Américo Borges, Centro - CEP 76390-000
Barro Alto-GO - Fone: (62) 3347-6150
Fax: (62) 3354-1750

**Unidade Integrada Sesi Senai Sama**
Mina Cana Brava, Caixa Postal 04 - Minaçu-GO
CEP 76450-000 -Fone: (62) 3379-1039
Fax: (62) 3379-7012
e-mail: sama.senai@sistemafieg.org.br

edital

# senai sesi de inovação

Se a inovação está no DNA da sua empresa, nós ajudamos suas idéias a nascer.

## COMO PARTICIPAR

**SENAI** - (62) 3219-1429
**SESI** - (62) 3219-1392
inovacao@sistemafieg.org.br

**www.editaldeinovação.com.br**
**Não perca essa oportunidade.**

CNPq
Ministério da Ciência e Tecnologia
GOVERNO FEDERAL BRASIL PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA
CNI SESI SENAI IEL
SESI SENAI