

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE TUNGSTATO DE
FERRO (FeWO_4) E TUNGSTATO DE ZINCO (ZnWO_4)
PARA APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ERIC DA CRUZ SEVERO

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE TUNGSTATO DE FERRO (FeWO₄) E TUNGSTATO DE ZINCO (ZnWO₄) PARA APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS

Eric da Cruz Severo

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos, Área de Concentração em Desenvolvimento de Processos Industriais e Ambientais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito principal para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia de Processos.**

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Foletto

Coorientador: Prof. Dra. Raquel Cristine Kuhn

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Cruz Severo, Eric
Síntese e Caracterização de Tungstato de Ferro (FeWO₄)
e Tungstato de Zinco (ZnWO₄) para aplicações tecnológicas
/ Eric Cruz Severo.-2015.
73 p.; 30cm

Orientador: Edson Luiz Foletto
Coorientador: Raquel Cristine kuhn
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Processos, RS, 2015

1. tungstato 2. foto-Fenton 3. enzima 4. inulinase I.
Luiz Foletto, Edson II. Cristine kuhn, Raquel III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
PROCESSOS**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE TUNGSTATO DE FERRO
(FeWO₄) E TUNGSTATO DE ZINCO (ZnWO₄) PARA APLICAÇÕES
TECNOLÓGICAS**

Elaborada por
Eric da Cruz Severo

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Engenharia de Processos

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Edson Luiz Foletto, (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Prof. Guilherme Luiz Dotto, Dr. (UFSM)

Prof. Tito Roberto Sant'Anna Cadaval Junior, Dr. (FURG)

Santa Maria, 2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por estar no meu lado todos os dias e por sempre me dar forças.

A minha família, em especial meus pais Marioney e Maria Eunice, meus irmãos Ariane e Lucas e a minha avó Iara por sempre estarem do meu lado nos melhores e piores momentos da minha vida, me incentivando, me dando forças e iluminando minha vida.

Aos amigos de Bagé por todo o apoio, carinho, amizade e companheirismo. Em especial para minha amiga Vanessa Dias que sempre me incentivou na realização dos meus sonhos, mesmo nos momentos que nem eu acreditei em mim e por todo o suporte para a realização desse mestrado.

Ao meu primo Ighor Pozzer, pela eterna amizade, por acreditar em mim, por incentivar os meus estudos de forma que outras pessoas nunca fariam. A Lia Guterres que tem sido praticamente a minha segunda mãe em Santa Maria. A Caroline, Denise, Ederson, Simara e Susanne pessoas que tornaram meus dias em Santa Maria muito mais felizes, pessoas que sempre que eu precisei de ajuda tanto acadêmica como pessoal sempre estiveram ao meu lado, a vocês também dedico este título obtido.

Aos demais colegas de mestrado pelo tempo de convívio, risadas e boas conversas na sala de estudos e também por todo o apoio acadêmico.

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Foletto por todo o apoio na realização deste trabalho, pela amizade, confiança, paciência em responder todos os meus questionamentos e pela excelente orientação.

À Prof. Dra. Raquel Cristine Kuhn pela orientação, pela paciência e compreensão, pela amizade e por sempre estar de portas abertas sempre quando eu mais precisei.

Ao Prof. Dr. Márcio Antônio Mazutti por sempre ser um grande parceiro dentro da pesquisa e pelo apoio na infraestrutura para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Jahn pelos ensinamentos acadêmicos e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Hoffmann pela amizade, companheiro de churrascos e por nos ensinar a pensar como verdadeiros engenheiros.

À Química Mariana Bassaco do DEQ/UFSM, pelo apoio na realização das análises e por sempre se esforçar ao máximo para ajudar os acadêmicos do PPGEPro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos da UFSM e aos demais professores e funcionários que contribuíram direta e indiretamente para a obtenção deste título.

A CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos
Universidade Federal de Santa Maria

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE TUNGSTATO DE FERRO (FeWO₄) E TUNGSTATO DE ZINCO (ZnWO₄) PARA APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS

AUTOR: ERIC DA CRUZ SEVERO

ORIENTADOR: EDSON LUIZ FOLETTO

Data e Local da Defesa: Santa Maria 7, de agosto de 2015.

Neste trabalho, dois óxidos a base de tungstênio, tungstato de ferro (FeWO₄) e tungstato de zinco (ZnWO₄), foram sintetizados pelos métodos hidrotérmico assistido por micro-ondas e solvo-hidrotérmico, respectivamente. O tungstato de ferro foi utilizado como catalisador na reação heterogênea de foto-Fenton para remoção do corante orgânico Amarantho, enquanto que o tungstato de zinco foi utilizado como suporte para imobilização da inulinase pelo processo de adsorção. Ambos os materiais produzidos foram caracterizados pelas técnicas tais como difração de raios-X (DRX), análise de adsorção-dessorção de nitrogênio pelo método de Brunauer-Emmett-Teller (BET), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e análise de distribuição do tamanho de partículas por difração a *laser*. Para a reação foto-Fenton heterogênea, um planejamento experimental foi empregado a fim de estudar os efeitos das variáveis pH, concentração de peróxido e de corante sobre a eficiência de degradação do corante amarantho. A imobilização de inulinase sobre o óxido ZnWO₄ foi investigada em duas temperaturas. De acordo com os resultados da caracterização, ambos os materiais sintetizados apresentaram uma estrutura porosa e com alta cristalinidade. O óxido FeWO₄ demonstrou uma satisfatória habilidade para degradar o amarantho, sendo que nas condições ótimas de reação, 97 % de descoloração e 58% de mineralização foram obtidos. Além disso, a eficiência e estabilidade desse catalisador foram mantidas elevadas após cinco ciclos de reuso. O óxido ZnWO₄ apresentou uma satisfatória adsorção de inulinase, onde o melhor resultado encontrado foi de 605 U.g⁻¹ na temperatura de 30 °C.

Palavras-chave: Tungstato de ferro. Tungstato de zinco. Síntese. Micro-ondas. Solvotérmico. Foto-Fenton. Imobilização. Inulinase.

ABSTRACT

Dissertation for the degree of Master Science
Graduate Program in Process Engineering
Federal University of Santa Maria

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF IRON TUNGSTATE (FeWO₄) AND ZINC TUNGSTATE (ZnWO₄) FOR TECHNOLOGICAL APPLICATIONS.

AUTHOR: ERIC DA CRUZ SEVERO
ADVISOR: EDSON LUIZ FOLETTO
Santa Maria, August 7, 2015.

In this study, two tungsten-based oxides, iron tungstate (FeWO₄) and zinc tungstate (ZnWO₄), were synthesized by the routes microwave-assisted hydrothermal and solvo-hydrothermal, respectively. The iron tungstate oxide was used as a catalyst in heterogeneous photo-Fenton reaction for removal of Amaranth dye, whereas the zinc tungstate was used as a support for the immobilization of inulinase by adsorption process. Both materials produced were characterized by techniques such as X-ray diffraction (XRD), nitrogen adsorption-desorption analysis by Brunauer-Emmett-Teller method (BET), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and particle size distribution analysis by laser diffraction. For heterogeneous photo-Fenton reaction, an experimental design was used to study the effect of variables such as pH, hydrogen peroxide concentration and dye concentration on the degradation efficiency of Amaranth dye. The inulinase immobilization on the ZnWO₄ oxide was investigated in two temperatures. According to the characterization results, both synthesized material has a porous structure and high crystallinity. The FeWO₄ oxide showed a satisfactory ability to degrade amaranth dye, and under the optimum reaction conditions, 97% decolorization and 58% mineralization were obtained. Furthermore, the efficiency and stability of this catalyst were maintained high after five cycles of reuse. The ZnWO₄ oxide showed a satisfactory inulinase adsorption, where the best result was found to be 605 U.g⁻¹ at 30 °C.

Keywords: Iron tungstate. Zinc tungstate. Synthesis. Microwave. Solvothermal. Photo-Fenton. Immobilization. Inulinase.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 01 - Técnicas de imobilização de enzimas: (a) Adsorção ou ligação covalente; (b) Ligação cruzada entre a enzima e o suporte; (c) Microcápsulas e (d) Matriz polimérica sintéticas e naturais.....	30
--	----

CAPÍTULO 3

3.1. ARTIGO 1

Figure 1 - (a) Chemical structure of Amaranth dye, and (b) three-dimensional chemical structure of Amaranth dye.....	45
Figure 2 - (a) XRD pattern, (b) FTIR spectrum, (c) Particle size distribution plot, and (d) N ₂ adsorption-desorption isotherms for the FeWO ₄ oxide. The insert image in Fig. 2d shows the pore size distribution.....	47
Figure 3 - Pareto chart for the decolorization efficiency as a function of the independent variables.....	49
Figure 4 - Changes of UV-vis spectra with reaction time of dye solution by photo-Fenton process under optimum operating conditions. Inset: The image of samples for different reaction times.....	50
Figure 5 - Stability of the FeWO ₄ catalyst for the amaranth degradation.....	52

3.2. ARTIGO 2

Figure 1- XRD pattern of ZnWO ₄ powders prepared by solvo/hydrothermal crystallization. Inset at figure: ZnWO ₄ according to JCPDS card No. 73-544.....	60
Figure 2 - (a) Nitrogen adsorption-desorption isotherms and (b) pore size distribution of the ZnWO ₄ support.....	62
Figure 3 - Particle size distribution plot for zinc tungstate prepared by the solvo-hydrothermal route.....	63
Figure 4 - FTIR spectra of (a) ZnWO ₄ support, (b) immobilized enzyme on the ZnWO ₄ support and (c) free enzyme.....	64
Figure 5 - Adsorption capacity (U.g ⁻¹) of inulinase on ZnWO ₄ particles at (□) 30 °C and(■)50°C.....	65

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 01 – Rotas de síntese para o ZnWO ₄;	15
Tabela 02 - Potencial oxidativo-redutivo de alguns oxidantes.....	18
Tabela 03 – Tipos de processos oxidativos avançados.....	19
Tabela 04 – Condições de processos para degradação de compostos poluentes a partir da reação de foto-Fenton.....	23
Tabela 05 - Suportes utilizados industrialmente destacados quanto à composição química.....	28

CAPÍTULO 3

3.1. ARTIGO 1

Table 1 - Real values (in parentheses) of coded levels and results of heterogeneous photo-Fenton degradation of Amaranth.....	48
---	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	10
1.1 Introdução.....	10
1.2 Objetivos.....	11
1.2.1 Objetivo geral.....	11
1.2.2 Objetivos específicos.....	11
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Usos e Métodos de Preparação de Tungstato de Ferro.....	13
2.2 Usos e Métodos de Preparação de Tungstato de Zinco.....	14
2.3 Efluentes da Indústria Farmacêutica e Tratamentos empregados.....	15
2.4 Processos Oxidativos Avançados.....	17
2.4.1. Reação Heterogênea Fenton e foto-Fenton.....	20
2.5 Imobilização de Enzimas	26
REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS	39
3.1. Art I: Elimination of hazardous pharmaceutical dye by heterogeneous photo-Fenton process using $FeWO_4$ oxide prep. by microwave irradiation.....	40
3.2. Art II: Preparation of Zinc Tungstate ($ZnWO_4$) Particles by Solvo hydrothermal Technique and their Application as Support for Inulinase Immobilization.....	56
CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES GERAIS	71
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	72

CAPÍTULO 1

1.1. Introdução

Tungstatos metálicos fazem parte de uma classe de materiais cerâmicos que possuem geralmente uma fórmula do tipo MWO_4 , onde M representa um cátion metálico bivalente ($M = Fe, Zn, Ba, Ca, Sr, \text{etc.}$), e são extensamente estudados devido as suas excelentes propriedades ópticas e eletrônicas.

Nessa pesquisa, procurar-se-á demonstrar que o tungstato de ferro ($FeWO_4$), sintetizado pela rota hidrotérmica assistida por micro-ondas, apresenta propriedades desejáveis para aplicação como catalisador Fenton na degradação do corante farmacêutico Amaranth. Além disso, procurar-se-á demonstrar que o tungstato de zinco ($ZnWO_4$), preparado pelo método solvo-hidrotérmico, apresenta propriedades desejáveis para aplicação como suporte para imobilização da enzima inulinase.

A indústria farmacêutica tem um alto potencial poluidor devido à alta quantidade de matéria orgânica e coloração dos efluentes. Várias tecnologias têm sido empregadas no tratamento de efluentes farmacêuticos tais como tratamentos biológicos, floculação, coagulação, tecnologias envolvendo membranas e adsorção. Entretanto, os processos oxidativos avançados (POAs) têm surgido como uma técnica alternativa e eficiente para a degradação de poluentes orgânicos presentes em soluções aquosas, como por exemplo, os corantes. Dentre os POAs, especificamente a reação heterogênea de Fenton é um das técnicas mais promissoras, o qual utiliza catalisadores à base de ferro para o tratamento do efluente. Diversos catalisadores tais como Fe_3O_4 , Fe_2O_3 , $ZnFe_2O_4$, dentre outros, têm sido usados nessa reação, entretanto, o uso de $FeWO_4$ tem sido pouco explorado e reportado na literatura.

O uso de enzimas no campo industrial tem aumentado nos últimos anos devido à ampla faixa de aplicações tais como produção de alimentos, na medicina, na indústria têxtil e farmacêutica. As enzimas têm sido imobilizadas sobre diversos materiais sólidos por diferentes técnicas a fim de facilitar a sua separação após o processo enzimático. Dentre as enzimas, a inulinase tem sido utilizada para produção de açúcares e de outras substâncias de interesse industrial. Entretanto, o

uso de tungstato de zinco (ZnWO_4) como suporte para a imobilização dessa enzima ainda não tem sido explorado.

Com base no exposto, partículas de tungstato de ferro (FeWO_4) e de tungstato de zinco (ZnWO_4) foram sintetizadas e suas propriedades foram avaliadas frente à descontaminação de efluente sintético pelo processo foto-Fenton e como suporte para imobilização de inulinase, respectivamente.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo preparar os materiais tungstato de ferro (FeWO_4) e tungstato de zinco (ZnWO_4) e avaliar o seu potencial tecnológico em diferentes áreas. O tungstato de ferro foi aplicado como catalisador para degradação de corante orgânico pela reação de foto-Fenton, enquanto que o tungstato de zinco foi aplicado como suporte para imobilização da inulinase.

1.2.2. Objetivos Específicos

Com a finalidade de atender ao objetivo geral deste trabalho, faz-se necessário o cumprimento dos seguintes objetivos específicos.

1.2.2.1. Objetivos específicos relacionados à preparação e uso do óxido FeWO_4

- a) Sintetizar partículas de FeWO_4 pelo método hidrotérmico assistido por micro-ondas;

- b) Caracterizar o material através das técnicas de DRX (Difração de Raios-X), método BET e espectroscopia de infravermelho (FTIR);
- c) Otimizar o processo foto-Fenton heterogêneo para a degradação do corante amarantho através de um planejamento experimental.
- d) Estudar a reutilização do catalisador na reação foto-Fenton.

1.2.2.2. Objetivos específicos relacionados à preparação e uso do óxido ZnWO₄

- a) Sintetizar partículas de ZnWO₄ pelo método solvo-hidrotérmico;
- b) Caracterizar o material através das técnicas de DRX (Difração de Raios- X), método BET, espectroscopia de infravermelho (FTIR) e distribuição do tamanho de partículas;
- c) Realizar ensaios de adsorção em diferentes temperaturas a fim de avaliar a eficiência na imobilização da inulinase.

CAPÍTULO 2

2. Revisão Bibliográfica

Neste capítulo serão abordados os usos e métodos de preparação dos materiais tungstato de ferro e do tungstato de zinco, bem como, sobre as aplicações tecnológicas. É feita uma revisão sobre tratamento de efluentes contendo corantes e as técnicas usadas para o seu tratamento. Um tópico dá enfoque especial à remoção de moléculas poluentes em soluções aquosas a partir do uso do processo heterogêneo de foto-Fenton. Por último, comenta-se principalmente sobre a imobilização de enzimas sobre suportes para aplicação tecnológica.

2.1. Usos e Métodos de Preparação de Tungstato de Ferro

A fotocatalise é reconhecida devido a seu potencial para remoção de poluentes orgânicos (AHMED *et al.*, 2014). O dióxido de titânio é o fotocatalisador mais utilizado devido a seu baixo custo, fácil obtenção, estabilidade química e por não ser tóxico. Entretanto, o mesmo possui uma alta energia de *bandgap* ($E_g = 3,2$ eV) e para ocorrer a ativação do mesmo é necessária somente luz UV, o que no caso da energia solar corresponde a 5% do espectro. Devido a esses fatores, é necessário o estudo de novos fotocatalisadores que tenham sua atividade fotocatalítica ativada na faixa de luz visível, para isso novos materiais estão sendo estudados e também modificações na estrutura do TiO_2 (DEVI E KAVITHA, 2013).

O desenvolvimento de novos catalisadores a base de luz visível se tornou um importante tópico na fotocatalise. O interesse no estudo do tungstato de ferro se deve ao fato do mesmo possuir atividade fotocatalítica em luz visível (GUO *et al.* 2012).

Zhou *et al.* (2009) reportaram em seus estudos que o tungstato de ferro foi sintetizado pelo método solvotérmico e obteve excelente eficiência na remoção do corante Rodamina B sobre luz UV e luz visível.

Guo *et al.* (2012) reportaram a síntese de partículas monodispersas do mesmo material pelo método hidrotérmico. A energia de *bandgap* deste fotocatalisador está na faixa de $E_g = 2,17$ eV. O mesmo mostrou eficiência de remoção de fotodegradação de 74% em 30 minutos em comparação a 56% de eficiência no mesmo tempo de processo com TiO_2 , mostrando que catalisadores alternativos ao TiO_2 podem representar melhores eficiências processuais.

Chen *et al.* (2010) sintetizaram partículas de FeWO_4 pelo método de calcinação e aplicaram com catalisador para degradação de poluente orgânico, obtendo melhores resultados de remoção sobre luz solar do que sobre luz visível. Entretanto, a síntese pela rota de calcinação requer altas temperaturas.

Recentemente, partículas de FeWO_4 foram sintetizadas pelo método hidrotérmico assistido por um sistema de micro-ondas doméstico, operando a 443 K durante 60 min (ALMEIDA *et al.* 2012). Esse material foi submetido à estudos da determinação de suas propriedades eletrônicas e magnéticas.

Nessa pesquisa foi abordada a síntese de partículas de FeWO_4 usando um sistema de micro-ondas específico para síntese de materiais sólidos.

2.2. Usos e Métodos de Preparação de Tungstato de Zinco

O tungstato de zinco oferece uma ampla faixa de aplicações tecnológicas por apresentar propriedades interessantes tais como características fotoluminescentes, propriedades para produção de fibras ópticas, propriedades magnéticas e também pode ser aplicado na conversão de energia solar em painéis solares (ZHAO *et al.*, 2006).

O tungstato de zinco possui diversas formas de síntese. Na Tabela 1, estão abordadas algumas rotas de síntese deste material.

Tabela 1 – Rotas de síntese para o ZnWO₄

Rota de síntese	Descrição da metodologia	Referência
Hidrotérmica	É utilizada água como solvente principal, colocado em autoclave de teflon, por 12h a 180 °C	Gao <i>et al.</i> , 2012
Micro-ondas	Colocado em um forno micro-ondas doméstico na potência de 800 W, por 40 min. Após o produto sólido é calcinado a 200 °C, por 2h.	Garadkar <i>et al.</i> , 2013
Co-precipitação	A solução de reagentes é colocada em um banho de ultra-som por 30 min para facilitar o processo de precipitação. Após, o precipitado é seco e calcinado de 400 a 700 °C	Huang e Zhu, 2007
Sol-Gel	Mistura dos reagentes em NaOH até a formação do xero-gel; depois, calcinação em temperaturas que variam de 400 a 700 °C com o intuito de desenvolver materiais de diferentes tamanhos de partícula e cristalinidade.	Wu <i>et al.</i> , 2007.

Nessa pesquisa, o tungstato de zinco foi utilizado de uma forma ainda não reportada na literatura, isto é, como suporte na imobilização da inulinase.

2.3. Efluentes da Indústria Farmacêutica e Tratamentos empregados

Os problemas ambientais relacionados com as indústrias têxtil e farmacêutica são numerosos e bem documentados. Além dos problemas associados ao elevado volume de resíduos e à sua elevada carga orgânica, surgem os inconvenientes

relacionados com a liberação de corantes não fixados e não-degradados nos processos convencionais de tratamento. A presença desses corantes representa um elevado impacto ambiental, não apenas em função da toxicidade associada, mas também em relação à interferência em processos fotossintéticos. Além disso, estudos têm mostrado que os azo-corantes e seus subprodutos podem ser carcinogênicos e/ou mutagênicos (KUNZ E PERALTA-ZAMORA, 2002).

A indústria farmacêutica gera efluentes de formulação heterogênea. Esses resíduos possuem uma grande carga de material tóxico, o que torna seu tratamento mais difícil. Esses efluentes são ricos em corantes, faixa de pH não constante, temperatura elevada, considerável quantidade de metais pesados (ex. Cr, Ni ou Cu), compostos orgânicos clorados e surfactantes (CISNEROS *et al.*, 2002).

As indústrias que utilizam corantes movimentam grandes volumes de água para o processamento dos seus produtos. Os reagentes químicos utilizados são diversos quanto a composição química, variando a partir de compostos orgânicos, inorgânicos e polímeros para produtos biológicos. A presença de até mesmo concentrações muito baixas de corantes em lençóis freáticos, rios e lagos é altamente indesejável. Existem mais de 100.000 corantes disponíveis comercialmente com mais de um milhão de toneladas de corantes produzidos anualmente (CHRISTIE, 2007).

De acordo com Durán *et al.* (2000), os corantes possuem dois grupos principais: o grupo cromóforo, responsável pela cor que absorve a luz solar, e o grupo funcional que permite a fixação nas fibras do tecido. Existem vários tipos de grupos cromóforos, tais como antraquinona, nitro e azo. No entanto, o grupo mais largamente utilizado pertence à família dos azocorantes (60 %), que se caracterizam por apresentarem um ou mais grupamentos $-N=N-$ ligados a anéis aromáticos. A fixação da molécula do corante é feita em solução aquosa e pode envolver basicamente quatro tipos de ligações: ligação iônica, de hidrogênio, de van der Waals e covalentes.

Corantes como o Amarantho são corantes do tipo azo (correspondem a 60% dos corantes) e podem ser degradados em aminas aromáticas, que são muito prejudiciais à saúde. Estes corantes são cancerígenos, mutagênicos, podem causar hipersensibilidade em crianças e reações alérgicas.

Os métodos convencionais utilizados para o tratamento de efluentes da indústria são adsorção por carvão ativado, floculação, precipitação, entre outros. Entretanto, essas técnicas não são eficientes para remoção de todos os tipos de poluentes e também, não são capazes de destruir a molécula poluente, mas sim transferi-la de uma fase para outra (SALGADO *et al.*, 2009). Com objetivo de encontrar novas alternativas para o tratamento de efluentes a base de corantes, diversos estudos vem sendo realizados recentemente. Uma alternativa emergente para a remoção deste tipo de poluente são os processos oxidativos avançados (POAs), que tem sido largamente utilizados nos últimos anos, os quais serão posteriormente descritos.

2.4. Processos Oxidativos Avançados

Devido ao grande aumento da produção industrial, cada vez mais se faz necessário o estudo de novas tecnologias para o tratamento de efluentes. Como citado anteriormente neste capítulo, sabe-se que já existem diversas formas de remoção desses efluentes, porém tais formas somente transferem o efluente de uma fase para outra e, por isso, esses tratamentos não solucionam totalmente o problema. Com base nesses conhecimentos, é necessária uma alternativa que seja capaz de destruir a molécula poluente. Para isso, cada vez mais se busca novas tecnologias para destruição dos mesmos, onde o estudo na área de Processos Oxidativos Avançados (POA's) tem sido alvo de uma grande gama de novos trabalhos científicos.

Um dos fatores que tem levado ao aumento do estudo dos POA's é a crescente demanda por tecnologias "verdes", onde essa demanda tem facilitado o desenvolvimento de rotas alternativas que evitem o consumo em excesso de produtos químicos e, também, minimizam a produção de resíduos tóxicos após o tratamento. Os POA's também são utilizados para completa mineralização de componentes de difícil degradação, tais como pesticidas, fenol e corantes orgânicos em solução aquosa (ZHOU E SMITH, 2002). Porém, o custo para a completa oxidação é muito alto, devido ao fato de que durante o processo de oxidação ocorre a formação de produtos intermediários que tendem a ser mais resistentes à

degradação completa. Além disso, esses processos consomem energia (radiação, ozônio) e reagentes químicos (catalisadores, oxidantes) e com o aumento do tempo de reação tem-se o aumento do custo operacional do processo (MUÑOZ *et al*, 2005).

Devido ao seu alto custo, os POA's tem sido uma alternativa viável para a realização do pré-tratamento de moléculas orgânicas para converter grandes moléculas em moléculas intermediárias, o que facilita a remoção por processos alternativos, como por exemplo, os processos biológicos (OLLER, MALATO E PÉREZ, 2005).

No tratamento de efluentes aquosos, a degradação oxidativa de poluentes orgânicos é obtida através do potencial oxidante dos íons hidroxila ($\text{HO}\cdot$) que podem ter seu potencial de mineralização aumentado quando combinado com processos de ozonização (O_3), luz visível (Vis), luz ultravioleta (UV), fotocalisador semicondutor, peróxido de hidrogênio, emissão de ondas de ultra-som ou pelo processo Fenton (SUZUKI, ARAKI E YAMAMOTO, 2015).

Na Tabela 2 estão apresentados alguns radicais oxidantes e seu potencial oxidativo-redutivo.

Tabela 2 – Potencial oxidativo-redutivo de alguns oxidantes.

Espécie	Potencial redox (eV)
Flúor	3,03
Radical hidroxila	2,80
Ozônio	2,07
Peróxido de hidrogênio	1,78
Ácido Hipocloroso	1,49
Cloro	1,36
Iodo	0,54

Fonte: MOYER e KOSTECKI, 2003.

Os radicais $\text{HO}\cdot$ são altamente reativos, e é teoricamente possível utilizá-los para a completa decomposição de quase todos os compostos orgânicos e inorgânicos, transformando-os em H_2O e CO_2 como produtos de reação. Além disso, os radicais hidroxila mesmo não ficam presentes na solução por muito tempo e são

extintos no meio ambiente, devido a isso o processo de destruição do poluente não requer um tratamento secundário para remoção desses radicais (LESKO, COLUSSI E HOFFMANN, 2006).

Na Tabela 3 estão apresentados os tipos de processos oxidativos mais utilizados para a degradação de poluentes diversos.

Tabela 3 – Tipos de processos oxidativos avançados.

SISTEMAS HOMOGÊNEOS	COM IRRADIAÇÃO
	O ₃ /UV
	H ₂ O ₂ /UV
	Feixe de Elétrons
	US
	H ₂ O ₂ /US
	UV/US
	SEM IRRADIAÇÃO
	O ₃ /H ₂ O ₂
	O ₃ /OH ⁻
H ₂ O ₂ /Fe ²⁺ (Fenton)	
SISTEMAS HETEROGÊNEOS	COM IRRADIAÇÃO
	TiO ₂ /O ₂ /UV
	TiO ₂ /H ₂ O ₂ /UV
	H ₂ O ₂ /Fe ²⁺ /VIS (Foto-Fenton)
	SEM IRRADIAÇÃO
Eletro-Fenton	

Fonte: HUANG *et al*, 1993

Os processos oxidativos avançados compreendem todas as formas citadas na Tabela 2. Embora estes processos utilizem diferentes sistema de reação, todos são caracterizados por utilizarem um semelhante agente oxidante, isto é, os radicais

hidroxila (HO•). Esses radicais possuem um alto potencial oxidante e não agridem o meio ambiente (KRISHNAKUMAR e SWAMINATHAN, 2011).

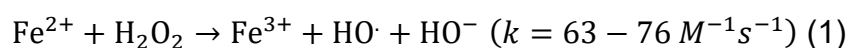
Em virtude da presente pesquisa estar focada no emprego do processo de Fenton usando o óxido FeWO_4 como catalisador para a degradação de um poluente orgânico, tal processo está abordado a seguir.

2.4.1. Reação Heterogênea Fenton e foto-Fenton

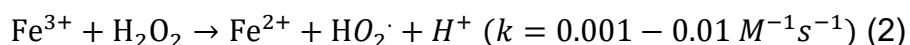
A reação de Fenton engloba a reação de peróxidos (geralmente peróxido de hidrogênio (H_2O_2)) com íons férricos para formação de espécies ativas de oxigênio que oxidam a molécula orgânica ou inorgânica em questão. A reação de Fenton foi descoberta por H.J.H. Fenton em 1894. Fenton relatou que o H_2O_2 poderia ser ativado por íons de ferro (Fe^{2+}) para a oxidação do ácido tartárico (FENTON, 1894).

Atualmente, mais de 1700 constantes de velocidade para reações em solução aquosa envolvendo o radical oxidante (HO•) tem sido documentada, mostrando assim a importância do estudo da reação de Fenton. A reação também tem sido foco de muitos trabalhos nos últimos anos, devido a sua eficiência para remoção de poluentes orgânicos de efluentes industriais de difícil mineralização (BAUSTISTA *et al.*, 2008)

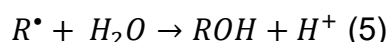
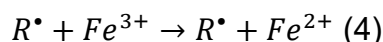
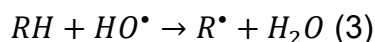
A reação de Fenton pode ser descrita através da equação abaixo (FENTON, 1894):



Outra reação também reportada por Fenton ocorre quando os íons férricos são reduzidos em uma reação com excesso de peróxido de hidrogênio que tem como produto de reação a formação de íons ferrosos e novamente, mais radicais, conforme mostrado na Equação 2 (FENTON, 1894):

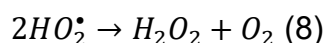
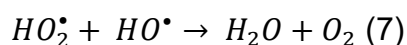
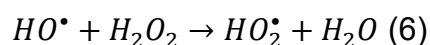


Os radicais hidroxila são capazes de mineralizar rapidamente os substratos orgânicos, acontecendo os fenômenos de abstração de H e adição eletrofílica da espécie oxidante (LUCAS E PERES, 2006). As equações 3, 4, e 5 demonstram as reações de ataque ao substrato.



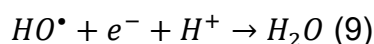
Na presença de um substrato orgânico (RH), o radical hidroxila abstrai um átomo de RH e gera um radical orgânico R•, que sofre uma série de transformações químicas para formar vários produtos de oxidação. Na ausência de qualquer radical competitivo (HO• ou R•), o excesso de Fe e H₂O₂ converterão completamente os compostos orgânicos em CO₂ e água (BAUTISTA *et al.*, 2008).

O peróxido de hidrogênio é uma variável chave no estudo da reação de Fenton. Em um meio com excesso de peróxido de hidrogênio podem ocorrer reações concorrentes a reação de Fenton, onde essas reações formam o radical hidroperoxila, que possui um menor potencial de oxidação (E° = 1,42 eV contra E° = 2,80 eV) e age de forma negativa para a cinética da reação. Além disso, os radicais HO• em um meio de excesso de peróxido tem a tendência de se recombinarem ou reagirem (DOMENECH *et al.*, 2001). As equações 6, 7 e 8 a seguir, demonstram o efeito nocivo do excesso de H₂O₂.



O pH é outra variável de extrema importância no estudo da reação de Fenton, afetando positiva ou negativamente a velocidade de mineralização dos compostos poluentes. A influência do pH foi estudada em diversas pesquisas e foi observado

que o mesmo funciona em pequenas faixas, entre 2,5 e 3,0, melhorando as eficiências de degradação. Para pH abaixo de 2,5, a velocidade de mineralização, devido as altas concentrações de H^+ , sequestrarem os radicais hidroxila (SPINKS E WOODS, 1990). Este efeito pode ser observado na equação 9.



Processos Fenton podem ser divididos em homogêneos e heterogêneos. Em questões de custo operacional, o processo de foto-Fenton homogêneo tem sido mais utilizado devido ao fato de ser um processo com baixo custo relativo e por possuir alta performance na geração de radicais (HO^{\bullet}) para decomposição orgânica. Porém, esse processo produz uma alta carga de lodo que contém íons férricos. Devido a isso, a reação homogênea requer um pós-tratamento para remoção desses íons, fazendo com que o custo operacional e o uso de reagentes químicos do processo aumentem, o que o torna inviável para ser utilizado em certos poluentes. Já na reação heterogênea de Fenton, isso não acontece, pois, o catalisador pode ser facilmente separado da solução aquosa, evitando assim tratamentos posteriores (FERNANDEZ *et al.*, 1998).

Na tabela 04, está apresentada uma breve revisão de condições de processos para degradação de compostos poluentes a partir da reação de foto-Fenton, usando diferentes tipos de catalisadores.

Tabela 04 – Condições de processos para degradação de compostos poluentes a partir da reação de foto-Fenton.

Poluente orgânico	Catalisador	Condição de Processo				Melhor rendimento experimental	Referência
		[H ₂ O ₂]	[Conc.de catalisador]	pH	T (°C)		
Azul de metileno 50 mg L ⁻¹	Cr-magnetita (15 mg)	0,3 g L ⁻¹	0,15 g L ⁻¹	6	25	A taxa de degradação aumentou quando se reduziu a quantidade de Cr; têm- se também o decaimento da taxa de COT e descolorização.	Magalhães <i>et al.</i> , 2007.
Rodamina 80 mg L ⁻¹	Fe-bentonita	0,3 g L ⁻¹	0,25 g L ⁻¹	4,2	25	A eficiência de descolorização foi de 93% e 71% de COT; o processo foi avaliado em conjunto (Adsorção + foto-Fenton).	Gao <i>et al.</i> , 2015.
Orange II 150 mg L ⁻¹	Fe ₃ O ₄	1,5 g L ⁻¹	0,65 g L ⁻¹	2,7	42	Com o emprego de um planejamento experimental, 100% de remoção foi obtido.	Chen <i>et al.</i> , 2014.
Acid Red B 100 mg L ⁻¹	~Fe ₂ O ₃ + fibra de carbono ativada	1,75 g L ⁻¹	3,34 g L ⁻¹	3	25	Com o estudo de dosagem de catalisador e dosagem de H ₂ O ₂ , obteve-se eficiência de remoção de cor de 100% e remoção de COT de 43%.	Lan <i>et al.</i> , 2015.
Vermelho Procion 65mg L ⁻¹	ZnFe ₂ O ₄	0,5 g L ⁻¹	10 mM	2	25	Obteve remoção total da cor e remoção de 60% de COT. Também ocorreu a estabilidade do catalisador à lixiviação de ferro e zinco.	Anchieta <i>et al.</i> , 2015.

Tabela 04 – Condições de processos para degradação de compostos poluentes a partir da reação de foto-Fenton. (Continua)

Bisphenol A	Fe ₃ O ₄ + suporte MWCNT	0,5 g L ⁻¹	4 mol/mol	3	50	Sob diferentes condições operacionais, obteve-se entre 97 e 100% de remoção de cor, e entre 32 e 100% de remoção de COT.	Cleveland <i>et al.</i> , 2014.
Inseticida – Tiaclopride	Fe+TiO ₂ (1,9, 7,2 e 13,9%w)	0,5 g L ⁻¹	45 mM	2,8	-	Eficiências de remoção do Tiaclopride superiores a 90% foram obtidas com o catalisador Fe/TiO ₂ .	Banic <i>et al.</i> , 2011
4- clorofenol	Ni _x Zn _{1-x} Fe ₂ O ₄	39,16 mM	20 g L ⁻¹	6,67 - 6,86	70	Remoção eficiente do 4-clorofenol de 99,1% de DQO.	Kurian e Nair, 2014
4-nitrofenol 20mg L ⁻¹	TiO ₂ (impregnado com 1,3,5 e 8% de Fe)	0,4 g L ⁻¹	4,9 mM	6,17	-	Remoção inicial de 67,53% de COT e degradação total após 60 min de reação. O catalisador se manteve estável durante 4 ciclos, mantendo a eficiência de degradação total.	Zhao <i>et al.</i> , 2010.
Ácido Acético 100 ppm	Fe-ZSM 5 (8.5% de Fe)	0.2 g L ⁻¹	8,5 mM	4	60	Foi observada uma remoção de 50.5% na melhor condição experimental estudada.	Cihanoglu <i>et al.</i> , 2015
Acid Blue 74	Fe-ZSM 5 (3% de Fe)	0,5 g L ⁻¹	21,4 mM	5	25	Foi removido 100% da cor e 57% de COT.	Kasiri <i>et al.</i> , 2008

Tabela 04 – Condições de processos para degradação de compostos poluentes a partir da reação de foto-Fenton. (Continua)

Vermelho HE-3B 100 ppm	Fe-lap-RD	1 g L ⁻¹	500 mg L ⁻¹	3	25	A degradação do corante foi totalmente observada após 30 min de reação. Em 240 min, foi observado 73% de remoção do COT.	Feng <i>et al.</i> , 2003.
Etileno clorado (PCE, TCE, cis1,2- DCE, 1,1, DCE) & benzeno, toluene, etilbenzeno em fase não aquosa (NAPLs)	Goetita (α- FeOOH)	0,01 e 0,5%	0,22 g – 4 g L ⁻¹ Fe	3,5	25	% de remoção do etilbenzeno > tolueno > benzeno; baixo percentual de remoção para compostos com alta solubilidade em água.	Yeh <i>et al.</i> , 2008
Diclofenaco 20 mg L ⁻¹	SG2157 – catalisador a base de Fe	5 g L ⁻¹	2,5 mL	6-7	20	Diclofenaco foi degradado pelo uso de dois catalisadores produzidos a base de ferro; foi observado uma total conversão do diclofenaco em outros compostos orgânicos.	Hofmann <i>et al.</i> , 2007
Inativação do Vírus coliphage MS2	Fe ₃ O ₄	0,1 a 1 g L ⁻¹	-	6, 7, e 8	-	O estudo mostrou a inativação completa do vírus, utilizando energia solar e quantidades mínimas necessárias de H ₂ O ₂ para formar os radicais hidroxila.	Ortega-Gomez <i>et al.</i> , 2015

2.5. Imobilização de Enzimas

2.5.1. Enzimas

As enzimas vêm sendo utilizadas em diferentes aplicações, dentre elas na indústria farmacêutica, química, de alimentos, entre outras. São consideradas

biocatalisadores de natureza proteica ou glicoproteica, que atuam de forma a acelerar uma reação bioquímica, diminuindo a energia de ativação, sem alterar o equilíbrio da reação. Por meio delas, a catálise é realizada em condições brandas, sendo geralmente sob pressão e temperaturas amenas.

Industrialmente, as enzimas apresentam propriedades notáveis com relação aos catalisadores químicos, devido à especificidade por um determinado substrato e pela promoção de apenas uma reação bioquímica, o que permite a síntese de um produto específico, sem a formação de co-produtos indesejados (COELHO *et al.*, 2008).

O uso de enzimas se torna interessante quando permite que quantidades pequenas sejam suficientes para catalisar reações específicas devido a sua grande eficiência em condições brandas. A capacidade catalítica e a seletividade das enzimas dependem da manutenção da sua estrutura terciária e, para alguns casos, também da quaternária. Alterações nessas estruturas causadas por agentes como pH, temperatura e solventes hidrofóbicos podem causar a inativação da enzima (VIEIRA *et al.*, 2009).

O uso de enzimas tem aumentado nos últimos anos devido à ampla faixa de aplicações (DAOUD *et al.*, 2010). Entretanto, as enzimas são frágeis operacionalmente, pois a funcionalidade original delas prevê que as mesmas atuem no ambiente intracelular, sendo que as alterações no meio provocam a sua inativação. Assim, as enzimas são geralmente comercializadas na presença de aditivos que protegem a estrutura das mesmas (ZANIN *et al.*, 2004), ou na forma imobilizada (LADERO *et al.*, 2006).

2.5.2. Imobilização de Enzimas

Devido à desvantagem da baixa estabilidade das enzimas na forma solúvel, muitos processos industriais são realizados utilizando as enzimas na forma imobilizada, onde diferentes suportes sólidos produzidos por diferentes métodos têm sido amplamente empregados para sua imobilização e, por conseguinte, na utilização para a produção de alimentos, produtos farmacêuticos e outros produtos biologicamente importantes. A seguir são citadas algumas vantagens do uso de enzimas imobilizadas:

- A reutilização do biocatalisador;
- A fácil purificação do produto sem contaminação pelo catalisador, tendo como base que a enzima imobilizada não é solúvel no meio de reação;
- A redução do volume de reação, pois a enzima imobilizada pode ser utilizada em alta concentração em um menor volume de reator;
- A facilidade de controle operacional.

Há, entretanto, a restrição da mobilidade da enzima pelo fato de ela estar ligada a um suporte. Isso implica em uma aparente redução da atividade, provocado pelas limitações do acesso do substrato ao sítio ativo devido à presença da matriz sólida (PESSELA *et al.*, 2007).

A seleção adequada do suporte é considerada de enorme relevância para um processo industrial. Anteriormente ao uso de determinado suporte para a imobilização de uma enzima, estudos são realizados a fim de avaliar a adequação do mesmo com a enzima. Na seleção do suporte, avaliam-se as propriedades físicas e químicas, bem como aquelas relativas à possibilidade de regeneração do material.

A estrutura do suporte deve ser considerada, pois essa deve ter alta porosidade, que implica em uma grande área superficial para a imobilização da enzima, e poros com diâmetro suficiente para permitir o fácil acesso da enzima e substrato. Outra característica a ser considerada ao suporte é a sua estabilidade térmica, pois pode sofrer distorção ou destruir o sítio ativo da enzima sob expansão ou contração quando submetido a variações de temperatura (KENNEDY, 1987).

Deve ser levada em consideração a natureza hidrofílica do suporte, que é mais desejável devido a se obter uma boa difusividade do substrato, além de permitir a estabilização da enzima. Os suportes de natureza hidrofóbica geralmente diminuem a estabilidade e a atividade da enzima imobilizada por um mecanismo semelhante à desnaturação das enzimas em solventes orgânicos (KENNEDY, 1987). Ainda pode se destacar, que a possibilidade de regeneração bem como a reutilização da matriz deve ser levada em conta na avaliação econômica do sistema com enzima imobilizada.

Os suportes são classificados quanto à composição química em orgânicos (naturais e sintéticos) e inorgânicos (minerais e fabricados), como apresentado na Tabela 5.

Tabela -5 - Suportes utilizados industrialmente destacados quanto à composição química.

Suporte	Característica	Exemplos
Orgânicos	Naturais	Polissacarídeos: celulose, agar, quitina, quitosana, amido. Proteínas: colágeno, albumina, gelatina, glúten, seda.
	Sintéticos	Poliestireno, poliacrilato, polivinílico, náilon.
Inorgânicos	Minerais	Areia, bentonita, hernebleda, pedra-pomes
	Fabricados	Vidro, cerâmica, sílica, aluminossilicatos, óxido de ferro, óxido de níquel, aços inoxidáveis.

Fonte: KENNEDY, 1987

Industrialmente, tem-se o uso mais apropriado dos suportes inorgânicos por apresentarem elevada resistência mecânica e a solventes orgânicos, boa estabilidade térmica, e resistência ao ataque por micro-organismos. Apresentam boa rigidez da matriz, com estabilidade em uma ampla faixa de pressões, temperaturas e pH (RODRIGUES *et al.*, 2008).

2.5.3. Métodos de Imobilização

Os métodos para imobilização de enzimas podem ser classificados em duas categorias básicas: imobilização por ligação em suportes e encapsulamento (BUCHHOLZ *et al.*, 2005).

Os métodos de encapsulamento consistem em “confinar” a enzima em um polímero insolúvel ou em um micro-cápsula, com a criação de uma cela artificial que é delimitada por uma membrana porosa. Assim, moléculas grandes como as enzimas, não são capazes de se difundir através da membrana porosa, enquanto que as pequenas como substrato e produtos, se difundem (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

A imobilização por ligação em suportes pode ser realizada através da ligação da enzima ao suporte por adsorção, onde a enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia, tais como interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras; ligação covalente, onde as enzimas são covalentemente ligadas ao suporte através de grupos funcionais nas enzimas, que não são essenciais para a atividade catalítica (D’SOUZA, 1999). A imobilização também pode ocorrer através de ligação cruzada, onde é realizada a ligação cruzada intermolecular de enzimas, por meio de reagentes bifuncionais ou multifuncionais (FABER, 1997).

A adsorção é o método mais comum para imobilização, por causa da sua facilidade e porque possui um menor custo. Alguns suportes utilizados são materiais argilosos ou cerâmicos, e porosos, que facilitam a fixação da enzima ao suporte, como a celita, que consiste de terra diatomácea altamente porosa composta de sílica e outros óxidos inorgânicos (CHANG *et al.*, 2007). A Figura 1 apresenta uma representação esquemática das principais técnicas de imobilização de enzimas.

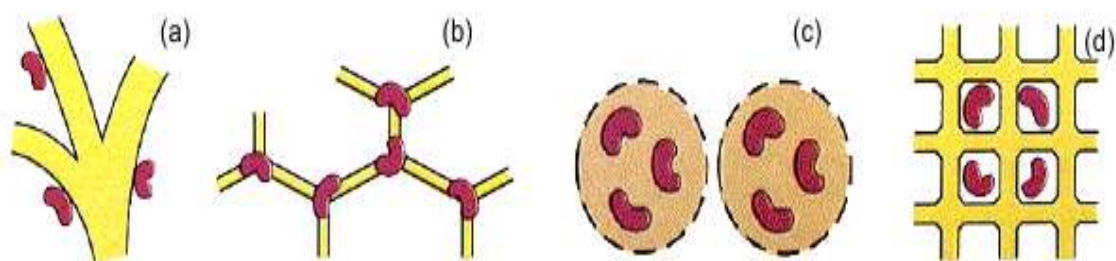


Figura 1. Técnicas de imobilização de enzimas: (a) Adsorção ou ligação covalente; (b) Ligação cruzada entre a enzima e o suporte; (c) Microcápsulas e (d) Matriz polimérica sintéticas e naturais. Fonte: http://www.agen.ufl.edu/~chyn/age4660/lect/lect_21/lect_21.htm

2.5.4. Inulinase

A aplicação da inulinase está relacionada à produção de xarope com alto teor de frutose. A indústria utiliza-se de grande quantidade de polissacarídeos naturais, e novas fontes têm sido procuradas com o intuito de suprir a demanda. Assim, a utilização das inulinases apresenta-se como uma alternativa para sua obtenção (SAID et al., 2004). As inulinases também são aplicadas na produção de inulo-oligossacarídeos, bem como na produção de ácido glicônico, pululana e acetona butanol. Porém, a produção de xaropes de frutose através destas enzimas continua a alternativa mais promissora, principalmente quando comparada às outras formas de obtenção destes produtos. Devido à sua demanda, advém a necessidade de reutilizar a inulinase para o aumento da viabilidade econômica do processo. Para isso, muitos pesquisadores vêm estudando a imobilização dessa enzima em diferentes suportes.

2.5.5. Imobilização da Inulinase

A imobilização de inulinases deve ser considerada devido a sua similaridade com as invertases, as quais têm sido imobilizadas com sucesso. A seguir, são aboroados alguns trabalhos que tratam da imobilização de inulinase sobre suportes.

Kim *et al.* (2007) imobilizaram a inulinase em Tygon e aminoetilcelulose pelo método de ligação covalente, resultando em uma baixa estabilidade térmica da enzima imobilizada. Estes autores obtiveram uma eficiência de 55% da hidrólise de extratos de Alcachofra de Jerusalém, ao utilizar a inulinase imobilizada de *Aspergillus ficuum* em quitina, usando reatores tubulares de leite fluidizado. Nakamura *et al.* (1995) imobilizaram uma preparação enzimática parcialmente purificada de *Aspergillus niger* mutante 817 em amino-cellulofine, obtendo uma eficiência de imobilização de 96%. Kochhar *et al.* (1998) imobilizaram a inulinase *Aspergillus versicolor* em quitina e caseína, utilizando glutaraldeído e celulose, por ligação metálica. Ettalibi *et al.* (2001) obtiveram alta estabilidade térmica após a imobilização da inulinase de *Aspergillus ficuum* em vidro poroso, por ligação covalente, utilizando reagentes de silanização e reticulação, apresentando valores entre 29 e 71% de proteínas aderidas ao suporte e, mantendo 77 % da atividade da enzima imobilizada..

REFERÊNCIAS

AHMED, A. Y.; KANDIEL, T.A.; IVANOVA, I.; BAHNEMANN, D. **Photocatalytic and photoelectrochemical oxidation mechanisms of methanol on TiO₂ in aqueous solution**, Applied Surface Science, vol. 319, p. 44-4915, 2014.

ALMEIDA, M. A. P.; CAVALCANTE, L. S.; MORILLA-SANTOS, C.; LISBOA-FILHO P. N.; BELTRÁN, A.; ANDRÉS, J.; GRACIA, L.; LONGO, E. **Electronic structure and magnetic properties of FeWO₄ nanocrystals synthesized by the microwave-hydrothermal method**. Materials Characterization, vol. 73, p. 124-129, 2012.

ANCHIETA, C.G.; SEVERO, E.C.; RIGO, C.; MAZUTTI, M.A.; KUHN, R.C.; MULLER, E.I.; FLORES.; MOREIRA, R.F.P.M.; FOLETTO, E.L. **Rapid and facile preparation of zinc ferrite (ZnFe₂O₄) oxide by microwave solvothermal technique and its catalytic activity in heterogeneous photo-Fenton reaction**. Materials Chemistry and Physics, v. 160, p. 141-147, 2015.

BANIC, N.; ABRAMOVIC, B.; KRSTIC, J.; SOJIC, D.; LONCAREVIC, D.; CHERKEZOVA-ZHELEVA, Z.; GUZSVANY, V. **Photodegradation of thiacloprid using Fe/TiO₂ as a heterogeneous photo-Fenton catalyst**. Applied Catalysis B:Environmental, v. 107, p. 363-371, 2011.

BAUTISTA, P.; MOHEDANO, A.F.; CASAS, J.A.; ZAZO, J.J.; RODRIGUEZ, A., **An overview of the application of Fenton oxidation to industrial wastewaters treatment**. J. Chem. Technol. Biotechnology, v. 83, p. 1323–1338, 2008.

BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U.T. **Biocatalysts and Enzyme Technology**. Weinheim: Wiley – VHC, 2005.

CHANG, S.; CHANG, S.; YEN, Y.; SHIEH, C. **Optimum immobilization of Candida rugose on Celite by RSM**. Applied Clay Science, v. 37, p. 67-73, 2007.

CHEN, K.; CHUANG-HUA, W.; WENG-BING, L.; DONG, W.; QIN, H. LU-LU, L. **Application of response surface methodology for optimization of Orange II removal by heterogeneous Fenton-like process using Fe₃O₄ nanoparticles**. Chinese Chemical Letters, v. 25, p. 1355-1460, 2014.

CHIANOGLU, A.; GUNDUZ, G.; DUKKANCI, M. **Degradation of acetic acid by heterogeneous Fenton-like oxidation over iron-containing ZSM-5 zeolites**. Applied Catalysis, v. 165, p. 687-699, 2015.

CHRISTIE, R.M. **Environmental Aspects of Textile Dyeing**. CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 2007.

CISNEROS, R. L.; ESPINOZA, A. G.; LITTER, M.I.; **Chemosphere**, 48, 393, 2002.

CLEVELAND, V.; BRINGHAM, J.; KAN, E. **Heterogeneous Fenton degradation of bisphenol A by carbon nanotube-supported Fe₃O₄**. Separation and Purification Technology, v. 133, p. 388-395, 2014.

COELHO, M.A.Z.; SALGADO, A.M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática**. Livro, EPUB, 2008.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.D.G.; SOLDI, V. **Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros**. Química Nova, v. 27, p. 623-630, 2004.

DAOUD, F.B.O.; KADDOUR, S.; SADOUN, T. **Adsorption of cellulose Aspergillus niger on a commercial activated carbon: Kinetics and equilibrium studies**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 75, p. 93-99, 2010

DEVI, L.G.; KAVITHA, R. **A review on non metal ion doped titânia for the photocatalytic degradation of organic pollutants under UV/solar light: role of photogenerated charge carrier dynamics in enhancing the activity**. Applied Catalysis B: Environmental, v. 140-141, o. 559-587, 2013.

DOMÈNECH, X.; JARDIM, W.F.; LITTER, M.I. **Procesos avanzados de oxidación para La eliminación de contaminantes**. In: CYTED. Eliminacion de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea, 2001.

D'SOUZA, S.F. **Immobilized enzymes in bioprocess**. Current Science, v. 77, p. 69-79, 1999.

DURÁN, N.; MORAIS, S.G.; FREIRE, R.S. **Degradation and toxicity reduction of textile effluent by combined photocatalytic and ozonation processes**. Chemosphere v.40, p.369-373, 2000.

ETTALIBI, M.; BARATTI, J.C. **Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from Aspergillus ficuum**. Enzyme and Microbial Technology, v. 28, p. 596-601, 2001.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. Berlin: Springer-Verlag; 1997.

FENG, J.; HU, X.; YUE, P.; ZHU, H.; LU, G. **Discoloration and mineralization of Reactive Red HE-3B by heterogeneous photo-Fenton reaction**. *Water Research*, v. 37, p. 3776-3784, 2003.

FENTON, H.J.H. **Oxidation of tartaric acid in presence of iron**. *Journal of the Chemical Society*, v. 65, p. 899-910, 1894.

FERNANDEZ, J.; BANDARA, J.; KIWI, J.; LOPEZ, A.; ALBERS, P. **Efficient photo-assisted Fenton catalysis mediated by Fe ions on Nafion membranes active in the abatement of non-biodegradable azo-dye**. *Chemical Communications*, v. 14, p. 1493-1494, 1998.

GAO, B.; FAN, H.; ZHANG, X.; SONG, L. **Template-free hydrothermal synthesis and high photocatalytic activity of ZnWO₄ nanorods**. *Materials Science and Engineering: B*, v. 177, p. 1126-1132, 2012.

GAO, Y.; WANG, Y.; ZHANG, H. **Removal of Rhodamine B with Fe-supported bentonite as heterogeneous photo-Fenton catalyst under visible irradiation**. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 178, p. 29-36, 2015.

GARADKAR, K.M.; GHULE, L.A.; SAPNAR, K.B.; DHOLE, S.D. **A facile synthesis of ZnWO₄ nanoparticles by microwave assisted technique and its application in photocatalysis**. *Materials Research Bulletin*, v. 48, p. 1105-1109, 2013.

GUO, J.X.; ZHOU, X.Y.; LU, Y.B.; ZHANG, X.; KUANG, S.P.; HOU, W.G. **Monodisperse spindle-like FeWO₄ nanoparticles: controlled hydrothermal synthesis and enhanced optical properties**. *Journal of Solid State Chemistry*, v. 196, p. 550-556, 2012.

HOFMANN, J.; FREIER, U.; WECKS, M.; HOHMANN, S. **Degradation of diclofenac in water by heterogeneous catalytic oxidation with H₂O₂**. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 70, p. 447-451, 2007.

HUANG, C.P.; DONG, C.; TANG, Z. **Advanced chemical oxidation: its present role and potencial future in hazardous waste treatment**. *Waste Management*, v. 13, p. 361-377, 1993.

HUANG, G.; ZHU, Y. **Synthesis and photocatalytic performance of ZnWO₄ catalyst.** Materials Science and Engineering: B, v. 139, p. 201-208, 2007.

KASIRI, M.B.; ALEBOYEH, H.; ALEBOYEH, A. **Degradation of Acid Blue 74 using Fe-ZSM 5 zeolite as a heterogeneous photo-Fenton catalyst.** Applied Catalysis, v. 84, p. 9-15, 2008.

KENNEDY, J.F. **Enzyme Technology.** Weinheim: VHC, v.7, 1987

KIM, D.H.; RHEE, S.K. **Fructose production from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on chitin.** Biotechnology Letters, v. 11, p. 201-206, 1989.

KIM, W.Y.; BYUN, S.M.; NAHM, B.H. **Production of fructose from Jerusalem artichoke by enzymatic hydrolysis.** Korean Journal of Food Science Technology, v.11, p. 238-249, 1979.

KOBYLEWSKI, S; & JACOBSON, M. F. **Food Dyes a Rainbow of Risks.** Center for Science in the Public Interest, Washington, USA, 2010.

KOCHHAR, A.; KAUR, N.; GUPTA, A.K. **Inulinase from Aspergillus versicolor. A potente enzyme for producing fructose from inulinase.** Journal of Scientific and Industrial Research, v.56, p.721-726, 1998.

KRISHNAKUMAR, B.; SWAMINATHAN, M. **Influence of operational parameters on photocatalytic degradation of a genotoxic azo dye Acid Violet 7 in aqueous ZnO suspensions.** Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc. v. 81, p. 739-744, 2011.

KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P. **Novas técnicas no tratamento de efluentes têxteis.** Química Nova, v. 25, p. 78 – 82, 2002.

KURIAN, M.; NAIR, D. S. **Heterogeneous Fenton behavior of nano nickel zinc ferrite catalysts in the degradation of 4-chlorophenol from water under neutral conditions.** Journal of Water Process Engineering, inpress, 2014

LADERO, M. **Thermal and pH inactivation of an immobilized thermostable Beta-galactosidase from Thermus sp. strain T2: Comparison to the free enzyme.** Biochemical Engineering Journal, v.31, p.14-24, 2006.

LAN, H.; WANG, A.; LIU, R.; LIU, H.; QU, J. **Heterogeneous photo-Fenton degradation of acid red B over Fe₂O₃ supported on activated carbon fiber.** Journal of Hazardous Materials, v. 285, p. 167-172, 2015.

LESKO, T.; COLUSSI, AGUSTIN.; HOFFMANN, M. **Sonochemical Decomposition of Phenol: Evidence for a Synergistic Effect of Ozone and Ultrasound for the Elimination of Total Organic Carbon from Water.** Environmental Science and Engineering, v.40, p. 6813-6823, 2006.

LUCAS, M.S.; PERES, J.A. **Decolorization of the azol dye Reactive Black 5 by Fenton and photo-Fenton oxidation.** Dye and Pigments, v. 71, p. 236-244, 2006.

MAGALHÃES, F.; PEREIRA, M.C.; BOTREL, S.E.C.; FABRIS, J.D.; MACEDO, W.A.; MENDONÇA, R.; LAGO, R.M.; OLIVEIRA, L.C.A. **Cr-containing magnetites Fe_{3-x}Cr_xO₄: the role of Cr³⁺ and Fe²⁺ on the stability and reactivity towards H₂O₂ reactions.** Applied Catalysis A: General, v. 332, p. 115 – 123, 2007.

MOYER, E.; KOSTECKI, P. **Remediation Handbook.** Springer, USA, p.223-241, 2003.

MUÑOZ, I.; RIERADEVALL, J.; TORRADES, FRANCESC.; PERAL, J.; DOMÈNECH, X. **Environmental assessment of diferente solar driven advanced oxidation processes.** Solar Energy. v. 79, p. 369-375, 2005.

NAKAMURA, T.; OGATA, Y.; SHITARA, A.; NAKAMURA, A.; OHTA, K. **Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from Aspergillus niger mutant 817.** Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 80, p. 164-169, 1995.

ORTEGA-GOMEZ, E.; BALLESTEROS MARTÍN, M.M.; CARRATALÀ, A.; IBAÑEZ,P.F.; SÁNCHEZ PÉREZ, J.A.; PULGARÍN, C. **Principal parameters affecting virus inactivation by the solar photo-Fenton process at neutral pH and µM concentrations of H₂O₂ and Fe^{2+/3+}.** Applied Catalysis B: Environmental, v. 174-175, p. 395-402, 2015.

PESELA, B.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; BETANCOR, L.; FUENTES, M.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. **Modulation of the catalytic properties of multimeric beta-galactosidase from E-coli by using diferente immobilization protocols.** Enzyme and Microbial Technology, v.40, p. 310-315, 2000.

RODRIGUES, D.S.; MENDES, A.A.; ADRIANO, W.S.; GONÇALVES, L.R.B, GIORDANO, R.L.C. **Multipoint covalente immobilization of microbial lipase on**

chitosan and agarose activated by different methods. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 51, p. 100-109, 2008.

SAID, S.; PIETRO, R.; CONTIERO, J. **Inulinases. Capítulo: Enzimas como Agentes Biotecnológicos.** Editora Legis Summa LTDA, 2004.

SALGADO, B.C.B.; NOGUEIRA, M.I.C.; RODRIGUES, K.A.; SAMPAIO, G.M.M.S.; BUARQUE, H.L.B.; ARAÚJO, R.S. **Descoloração de efluentes aquosos sintéticos e têxtil contendo corantes índigo e azo via processos Fenton e foto-assistidos (UV e UV H₂O₂).** Engenharia Sanitária e Ambiental, v.14, p. 1-8, 2009.

SPINKS, J.W.T.; WOODS, R. J. **An Introduction to Radiation Chemistry**, 3rd ed. John Wiley & Sons: Nova York, 1990

SUZUKI, H.; ARAKI, S.; YAMAMOTO, H. **Evaluation of advanced oxidation processes (AOP) using O₃, UV, and TiO₂ for the degradation of phenol in water.** Journal of Water Process Engineering, v.7, p. 54-60, 2015.

UHM, T.; CHUNG, M.; LEE, S.; GOURRONC, F.; HOUSEN, I.; BEEUMEN, J.; HAYE, B.; VANDENHAUTE, J. **Purification and Characterization of *Aspergillus ficuum* endoinulinase.** Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v.63, 1999.

VERACHTERT, H.; DE MOT, R. **Biotechnology and Biocatalysis.** Decker, 1990.

VIEIRA, D.C. **Imobilização da enzima beta-galactosidade de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação.** Dissertação de Mestrado, São Carlos, UFSCAR, 2009.

WU, W.; ZHANG, S.; ZHANG, L.; ZHU, Y. **Photocatalytic Activity of Nanosized ZnWO₄ prepared by the Sol-gel method.** Chemical Research in Chinese Universities, v. 23, p. 465-468, 2007.

YEH, C.K. J.; HSU, C. Y.; CHIU, C. H.; HUANG, K. L. **Reaction efficiencies and rate constants for the goethite-catalyzed Fenton-like reaction of NAPL-form aromatic hydrocarbons and chloro ethylenes.** Journal of Hazardous Materials, v. 151, p. 562 - 569, 2008.

ZANIN, G.M. **Enzimas como agentes biotecnológicos.** Seção do livro, Ribeirão Preto, 2004.

ZHAO, B.; MELE, G.; PIO, I.; LI, J.; PALMISANO, L.; VASOPOLLO, G. **Degradation of 4-nitrophenol (4-NP) using Fe-TiO₂ as a heterogeneous photo-Fenton catalyst.** Journal of Hazardous Materials, v. 176, p. 569-574, 2010.

ZHAO, X.; YAO, W.; WU, Y.; ZHANG, S.; YANG, H.; ZHU, Y.; **Fabrication and photoelectrochemical properties of porous ZnWO₄ film.** Journal of Solid State Chemistry, v. 179, p. 2562-2570, 2006.

ZHOU, Y.X.; YAO, H.B.; GONG, J.Y.; LIU, S.J.; YU, S.H. **Hierarchical FeWO₄ microcrystals: solvothermal synthesis and their photocatalytic and magnetic properties.** Inorganic Chemistry, v.48, p. 1082-1090, 2009.

ZHOU, H.; SMITH, D.W. **Advanced technologies in water and wastewater treatment.** Journal of Environmental Engineering and Science, v.1, p. 247-264, 2002.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

Os resultados dessa pesquisa são apresentados a seguir, sob a forma de dois artigos. Os mesmos estão estruturados de acordo com a formatação de cada periódico ao qual foi submetido.

3.1. Artigo I: Elimination of hazardous pharmaceutical dye by heterogeneous photo-Fenton process using FeWO₄ oxide prepared by microwave irradiation

O presente artigo foi submetido à revista Water Science and Technology.

Eric da Cruz Severo, Chayene Gonçalves Anchieta, Raquel Cristine Kuhn, Marcio Antonio Mazutti and Edson Luiz Foletto

Department of Chemical Engineering, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, Brazil

ABSTRACT

FeWO₄ particles were synthesized by a simple, rapid and facile microwave technique and their catalytic properties in heterogeneous photo-Fenton reaction were evaluated. This material was employed in the degradation of a hazardous pharmaceutical dye molecule (Amaranth). Individual and interactive effects of operational parameters such as pH, dye concentration and H₂O₂ dosage on the decolorization efficiency of Amaranth dye were evaluated by 2³ central composite design. According to characterization techniques, a porous material and a well-crystallized phase of FeWO₄ oxide was obtained. Regarding the photo-Fenton reaction assays, highest results were 97% color removal and 58% carbon organic total removal. In addition, the application of the photo-Fenton process catalysed with FeWO₄ particles exhibited efficacy over five reuse cycles. These results showed strong catalyst stability in this process. Therefore, the results reveal that FeWO₄ oxide is a promising photo-Fenton catalyst for the treatment of pharmaceutical industry wastewater.

Key words | photo-Fenton, FeWO₄, microwave, dye, amaranth

INTRODUCTION

Dye-containing effluents from pharmaceutical industrial segment can cause various environmental impacts, due to their high toxicity and carcinogenic aspects (Combes & Haveland-Smith 1982). Specifically amaranth, a synthetically prepared carcinogenic azo dye is widely used in food and cosmetic industries (Combes & Haveland-Smith 1982; Kobylewski & Jacobson 2010). Discharge of amaranth into the water bodies can cause environmental degradation. Therefore, the search for alternative routes to remove the dye is necessary. The most frequently methods used for dyes removal include physical adsorption, chemical oxidation and biological degradation (González-Martínez *et al.* 2010; Weber *et al.* 2014; Anchieta *et al.* 2015). Furthermore, advanced oxidation processes (AOPs) have been widely applied to wastewater treatment because are characterized by the formation of highly oxidizing species (i.e., HO[•] radicals), which are able to degrade organic compounds (Pignatello 1992). Among all the technologies based on the AOPs, the heterogeneous Fenton reaction has been successfully employed for the degradation of several chemical compounds (Benzaquén *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2014; Anchieta *et al.* 2015). The Fenton technology applies the combination of H₂O₂ and Fe²⁺ in an acidic aqueous medium (pH ≤ 3) producing highly oxidative radicals (HO[•]) (Pignatello 1992), leading to mineralization of pollutant molecules. In the presence of a light source (well-known as photo-Fenton reaction), the degradation rate substantially increases (Soon & Hameed 2013; Anchieta *et al.* 2015). The advantages of this technique include easy operation, no sludge formation, low process cost and running under mild conditions (Duarte *et al.* 2013; Li *et al.* 2014). In addition, after heterogeneous Fenton reaction, the iron-based catalyst can be easily separated from the solution by a field magnetic for further reutilization, thus avoiding secondary pollution by metal ions (Anchieta *et al.* 2015).

Several iron-based materials could be applied as heterogeneous Fenton catalysts (Munoz *et al.* 2015), however the use of iron tungstate oxide (FeWO_4) for this application is scarce. Due to their electronic structure and magnetic properties, FeWO_4 have been studied in different applications (Almeida *et al.* 2012). Particularly on the environmental field, FeWO_4 oxide and Fe_3O_4 - FeWO_4 heterostructures were evaluated as photocatalysts for degradation of Rhodamine B, methyl orange and methylene blue dyes under UV light (Zhou *et al.* 2009; Guo *et al.* 2012; Cao *et al.* 2014). FeWO_4 -graphene composites and ZnO - FeWO_4 heterojunctions, and their photocatalytic activities toward the degradation of Rhodamine B under visible light have been investigated (He *et al.* 2015; Ma *et al.* 2015). Some techniques were developed for the synthesis of iron tungstate such as hydrothermal (He *et al.* 2015), thermal evaporation (Qian *et al.* 2014), self-propagating high-temperature synthesis (Chanadee *et al.* 2012), recrystallization (Yu *et al.* 1993) and microwave-hydrothermal (Almeida *et al.* 2012). However, the use of microwave route for the preparation of this material has been poorly applied. Recently, FeWO_4 nanocrystals were synthesized using a domestic microwave system operating at 443 K for 60 min (Almeida *et al.* 2012). In our work, a specific microwave system for solids synthesis was used for obtaining the FeWO_4 oxide.

Hence, the purpose of this work was to prepare FeWO_4 particles via microwave route and to evaluate their catalytic properties for the amaranth dye degradation by photo-Fenton process. The effects of some operational parameters on the amaranth degradation were assessed via an experimental design while the recyclability of the catalyst was examined.

MATERIALS AND METHODS

Preparation and characterization of FeWO_4 catalyst

FeWO_4 catalyst was prepared by microwave-assisted hydrothermal method. Sodium tungstate ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) and ferrous sulfate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) were used as starting materials. Sodium tungstate (0.33g) was dissolved in deionized water (50 mL) under magnetic stirring. The same procedure was taken to the ferrous sulfate (0.14 g dissolved in 50 mL of water). The sodium tungstate solution was added into the ferrous sulfate solution under magnetic stirring. The pH of final solution was then

adjusted to 7.0 using NaOH solution (4M). Then the resulting homogeneous solution was transferred into to a high-pressure Teflon reaction vessel and submitted to microwave irradiation (MARS 6 Microwave, ESP 1500 plus, USA) under the following conditions: temperature: (180 °C), power (600 W) and time (20 min). The solids obtained were collected and washed with deionized water and ethanol for several times, and then dried at 110 °C for 12 h.

FeWO₄ oxide was characterized by X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy (FTIR), BET surface area measurement and particle-size distribution. X-ray diffraction pattern was obtained using a Rigaku Miniflex 300 diffractometer. The X-ray source was Cu-K α radiation ($\lambda = 1.54051 \text{ \AA}$), powered at 30 kV and 10 mA. Data were collected over the 2θ range 10–55° with a step size of 0.03° and a count time of 0.9 s per step. By means of infrared spectroscopy (FTIR), spectrum of sample pressed into KBr pellet (10 mg iron tungstate/300 mg KBr) was obtained by a Shimadzu IR-Prestige-21 spectrometer in the range 4000-500 cm⁻¹. Nitrogen adsorption–desorption isotherms were obtained from nitrogen adsorption isotherms at 77 K, carried out on an ASAP 2020 apparatus at a relative pressure (P/P_0) ranging from 0 to 0.99. The particle-size distribution of sample was measured using a laser particle size analyzer (Mastersizer 2000)

Photo–Fenton assays

Amaranth (CAS number: 915-67-3; chemical formula: C₂₀H₁₁N₂Na₃O₁₀S₃; molecular weight: 604.47 g mol⁻¹; chemical structure is shown in Figure 1) was used as target pollutant. The catalytic activity of the produced solid was evaluated through the amaranth dye degradation reaction under visible light irradiation (wavelength > 400 nm). All experiments were conducted in a glass batch reactor (100 mL capacity, 6 cm inner length, 5 cm inner diameter) open to the atmosphere and irradiated by a spiral commercial fluorescent lamp (85 W, Empalux). The lamp was placed vertically at 10 cm from aqueous solution. A filter to cut any light below the wavelength of 400 nm was used. The operational parameters such as dye concentration, pH value and hydrogen peroxide concentration were studied according to the experimental design shown in Table 1. In order to study the photo-Fenton process, 50 mg of catalyst was dispersed into an aqueous solution of amaranth (50 mL) and kept under magnetic

stirring in dark to attain the adsorption equilibrium. After the adsorption stage, an aliquot of hydrogen peroxide (H_2O_2) was added to the solution to initiate the reaction. Then the suspension was irradiated by the lamp, and aliquots were collected at set time intervals, followed by suspension filtration using PVDF membrane ($0.45\ \mu m$). All experiments were carried out at room temperature. The dye concentration in filtered solution was determined by the absorbance reading on an UV-vis spectrophotometer (Shimadzu, UV-2600) at a maximum wavelength of 520 nm. Thus, the dye removal efficiency in terms of decolorization was defined by Equation 1:

$$\text{Decolorization efficiency (DE, \%)} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

(1)

Where A_0 is the initial dye concentration and A is the dye concentration at reaction time t .

Mineralization efficiency of Amaranth was monitored in order to evaluate the remaining total organic carbon (TOC) in solution. The TOC measurements were carried out by using a TOC-L CPH/CPN analyzer (Shimadzu). Thus, dye removal efficiency in terms of mineralization was calculated by Equation 2:

$$\text{Mineralization efficiency (\%)} = \frac{TOC_0 - TOC}{TOC_0} \times 100$$

(2)

Where TOC_0 and TOC are the values at reaction time 0 and t , respectively.

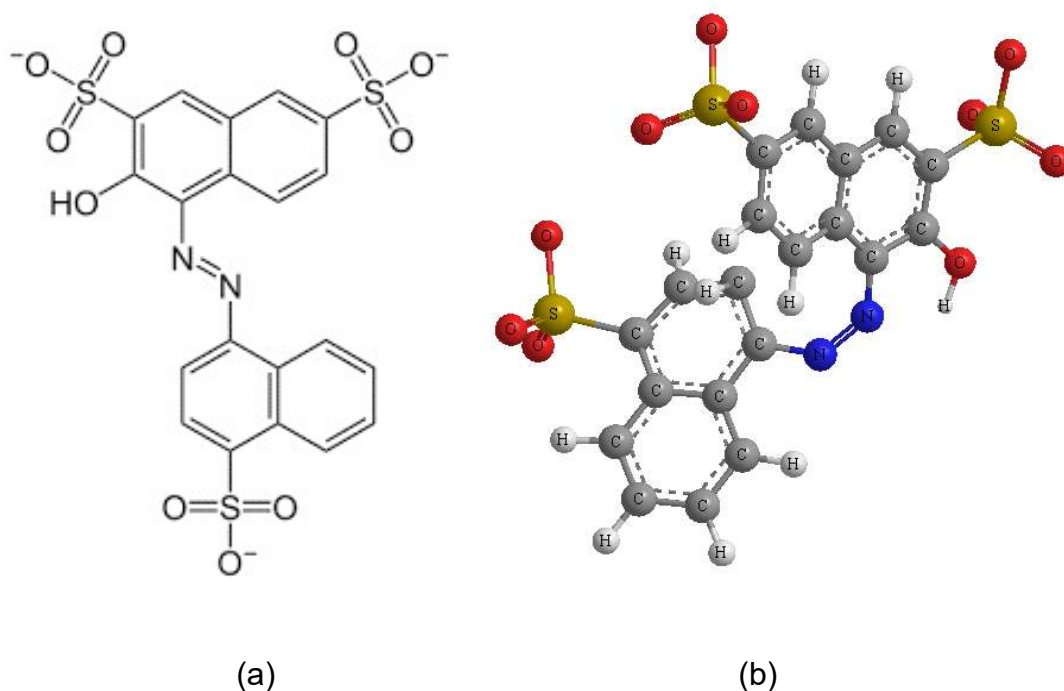


Figure 1 | (a) Chemical structure of Amaranth dye, and (b) three-dimensional chemical structure of Amaranth dye (obtained by the ChemBio 3D Ultra version 11.0 program).

The Fe content in the filtrate was analyzed by atomic absorption spectroscopy (Agilent Technologies, 200 series AA), and the residual H_2O_2 in the end of reaction, by using the MQuant peroxide test strips. To evaluate the stability and recyclability of the catalyst, FeWO_4 was reused five times to degrade the amaranth dye.

Experimental design

In the present study, the central composite design was employed for the optimization of photo-Fenton process. In order to evaluate the influence of operating parameters on the decolorization efficiency of amaranth, three main factors were chosen: initial dye concentration (X_1), initial pH (X_2) and H_2O_2 concentration (X_3). Eleven experiments were employed in this work, including $2^3 = 8$ cube points and 3 replications of the center point. The time reaction was fixed at 60 min and the catalyst loading was fixed at 1.0 g L^{-1} . Experimental data were analyzed using the Statistica 10 software (Statsoft, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of FeWO₄ oxide

Characterization results of FeWO₄ oxide prepared by microwave technique are shown in Figure 2. Figure 2(a) showed that all reflection peaks from XRD pattern can be indexed to a pure, well-crystallized, monoclinic phase of FeWO₄ with lattice parameters of $a = 4.73 \text{ \AA}$, $b = 5.703 \text{ \AA}$, $c = 4.952 \text{ \AA}$, which consists with the reported values of the Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS), card n^o 74-1130. As shown in Figure 2(a), no characteristic peak of impurity was detected on the XRD pattern, meaning that the material exhibit a high degree of purity and single phase. According to FTIR transmittance spectrum of the FeWO₄ showed in Figure 2(b), stretching modes of W–O bonds were detected at 813 and 868 cm⁻¹ (Gesheva *et al.* 2003), whereas the Fe-O stretching was detected at 640 cm⁻¹ (Cornell & Schwertmann 2003). These findings confirm the formation of FeWO₄ structure, corroborating to the results from XRD analysis. From particle size distribution curve (Figure 2(c)), the particle size ranged between 1.25 μm and 45.70 μm , resulting in an average particle size of 18 μm . The N₂ adsorption-desorption isotherms and corresponding pore size distribution curve for the FeWO₄ particles are shown in Figure 2(d). The N₂ adsorption-desorption isotherms are of type IV according to the IUPAC classification, characteristic of predominantly mesoporous structures. The pore size distribution curve (illustrated in the inset of Figure 2(d)) is mainly distributed in the range of 2–50 nm, and is in agreement with a mesoporous structure. Furthermore, the maxima at the initial stage of pore size distribution curve (pore size < 2 nm) implies the existence of some micropores (Gao *et al.* 2013). According to our findings, the values of (BET) surface area, average pore size and total pore volume of the ZnWO₄ oxide were 15.5 m² g⁻¹, 24 nm and 0.08782 cm³ g⁻¹, respectively.

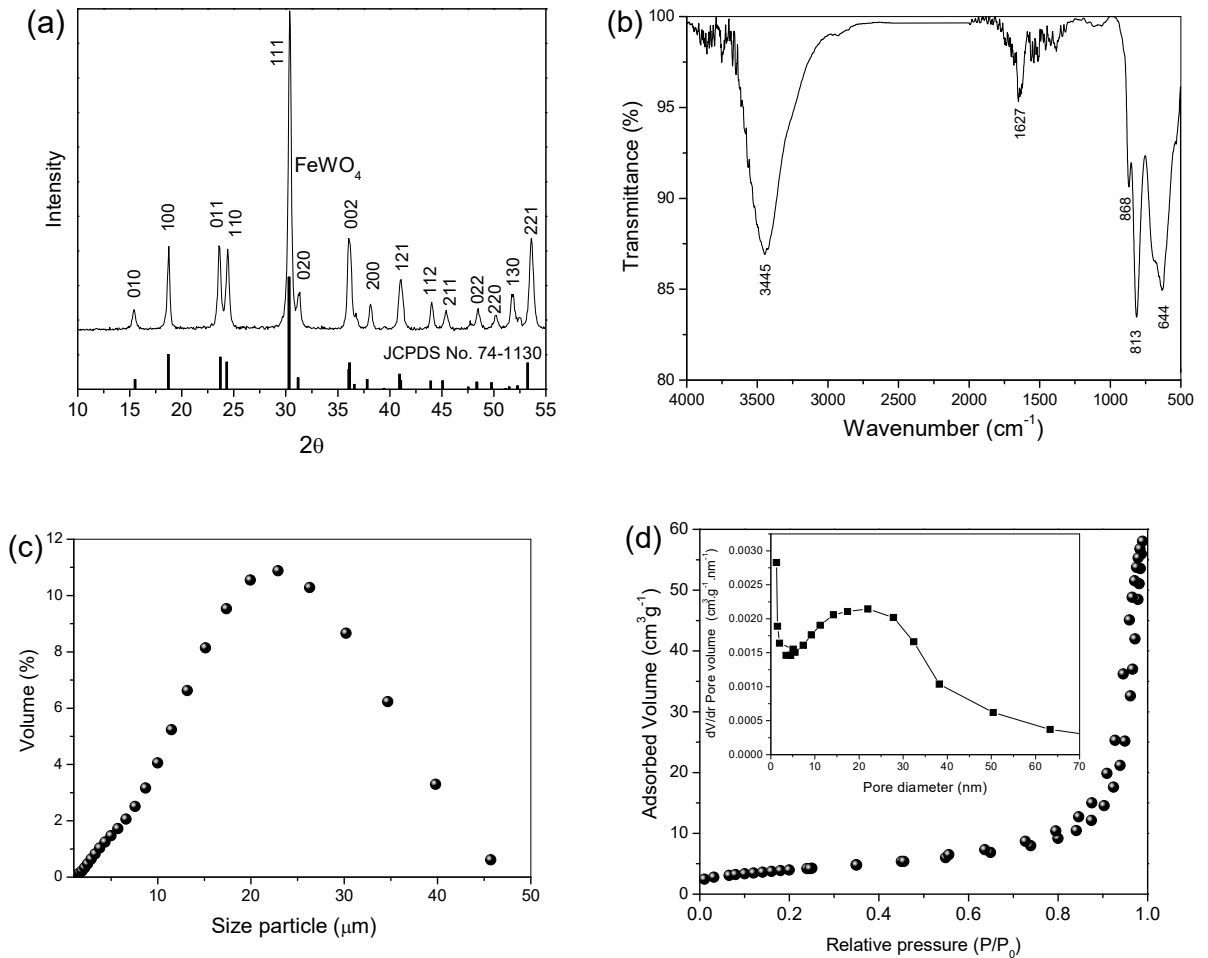


Figure 2 | (a) XRD pattern, (b) FTIR spectrum, (c) Particle size distribution plot, and (d) N₂ adsorption-desorption isotherms for the FeWO₄ oxide. The insert image in Fig. 2d shows the pore size distribution.

Central composite design

The Table 1 shows the results obtained in 2³ experimental design to evaluate the individual and interactive effects of the independent variables such as dye concentration, pH and H₂O₂ dosage on the decolorization efficiency of Amaranth dye.

Table 1 | Real values (in parentheses) of coded levels and results of heterogeneous photo-Fenton degradation of Amaranth.

Run	[Dye]/(mg L ⁻¹)	pH	[H ₂ O ₂]/(mM)	DE (%)
1	-1 (25.0)	-1 (2.50)	-1 (5.00)	77.63
2	1 (75.0)	-1 (2.50)	-1 (5.00)	32.01
3	-1 (25.0)	1 (3.50)	-1 (5.00)	12.71
4	1 (75.0)	1 (3.50)	-1 (5.00)	4.72
5	-1 (25.0)	-1 (2.50)	1 (15.00)	97.03
6	1 (75.0)	-1 (2.50)	1 (15.00)	60.51
7	-1 (25.0)	1 (3.50)	1 (15.00)	17.87
8	1 (75.0)	1 (3.50)	1 (15.00)	9.17
9	0 (50.0)	0 (3.00)	0 (10.00)	37.38
10	0 (50.0)	0 (3.00)	0 (10.00)	38.17
11	0 (50.0)	0 (3.00)	0 (10.00)	38.68

Based on the results presented in Table 2, a Pareto chart (Figure 3) was utilized in order to verify the individual and interactive effects of the process variables on the dye removal efficiency in terms of decolorization. Figure 3 shows that all independent variables were significant ($p < 0.05$) in relation to the decolorization efficiency, except the interaction between dye and H₂O₂ concentrations. Pareto chart shows that pH value had the highest influence on the dye removal efficiency, presenting a negative effect, which means that the decolorization efficiency decreases as the solution pH increases. This effect could be observed by the comparison of assays 5 and 7 in Table 1, being the removal efficiencies of 97.03 % and 17.87 % at pH 2.5 and 3.5, respectively, with 25 mg L⁻¹ dye and 15 mM H₂O₂. This may be attributed to the increased amount of generated HO[•] radicals at lower pH value (Zhang *et al.* 2014). The H₂O₂ concentration also had a positive effect on removal efficiency. The H₂O₂ is also an important parameter on photo-Fenton process efficiency. It can be seen through the runs 1 and 5 that the decolorization efficiency increased with the increasing of H₂O₂ dosage from 5 to 15 mM, leading to an increase of efficiency from 77.63 % to 97.03 %, respectively, with 25 mg L⁻¹ dye and pH 2.5. So, in the present study, a higher H₂O₂ dosage improved the rate of dye decolorization, and it may be

attributed to a higher production of reactive hydroxyl radicals (HO^\bullet) (Gao *et al.* 2013). According to Figure 3, the dye concentration also showed a positive effect on removal efficiency, implying that the decolorization efficiency decreased with the increase of initial dye concentration, as can be observed by the comparison between the runs 5 and 6. At higher dye concentration, a smaller number of active sites available on the catalyst surface occurs, leading to a decrease in the formation of HO^\bullet radicals (Xu *et al.* 2013). According to interactive effects among the process variables displayed in Figure 3, it can be concluded that the correlation between the pH and dye concentration had a more significant effect on decolorization efficiency. Therefore under the limited experimental conditions employed in this work, the highest decolorization efficiency was obtained to lower pH value and dye concentration, and higher dosage of hydrogen peroxide.

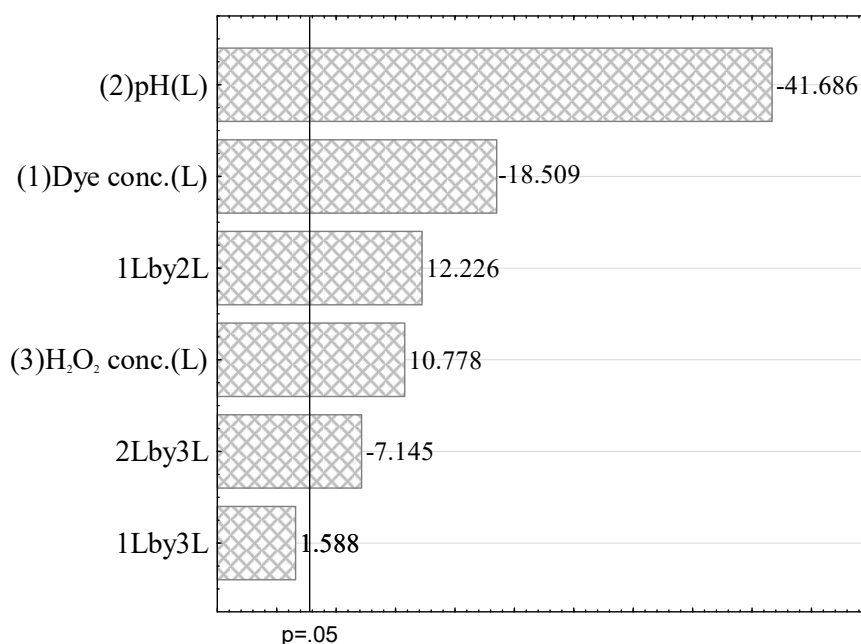


Figure 3 Pareto chart for the decolorization efficiency as a function of the independent variables.

Preliminary experiments in presence of catalyst in the dark but without H_2O_2 (catalyst/dark), without catalyst (H_2O_2 /light), without H_2O_2 (catalyst/light) and without visible light (catalyst/ H_2O_2) showed that the decolorization efficiency of Amaranth was

lower than 15% for all conditions. Therefore, the effective dye degradation is attributed to the synergetic effect of the FeWO_4 catalyst, H_2O_2 and the visible light irradiation. Figure 4 illustrates the changes in the UV–vis spectra of Amaranth by photo-Fenton process under optimum operating conditions (according to Run 5 shown in Table 1: $C_0 = 25 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{pH} = 2.5$, H_2O_2 dosage = 15 mM) until 60 min of reaction period. The rapid decrease of absorption peak at 520 nm indicates that the dye was substantially removed from the aqueous solution, reaching 97.03 % at 60 min of reaction. This implies that $-\text{N}=\text{N}-$ bonds of the dye molecules were destroyed and consequently, the solution color disappears. (Soon & Hameed 2013). This result demonstrates a high catalytic ability of FeWO_4 in heterogeneous Fenton oxidation of Amaranth.

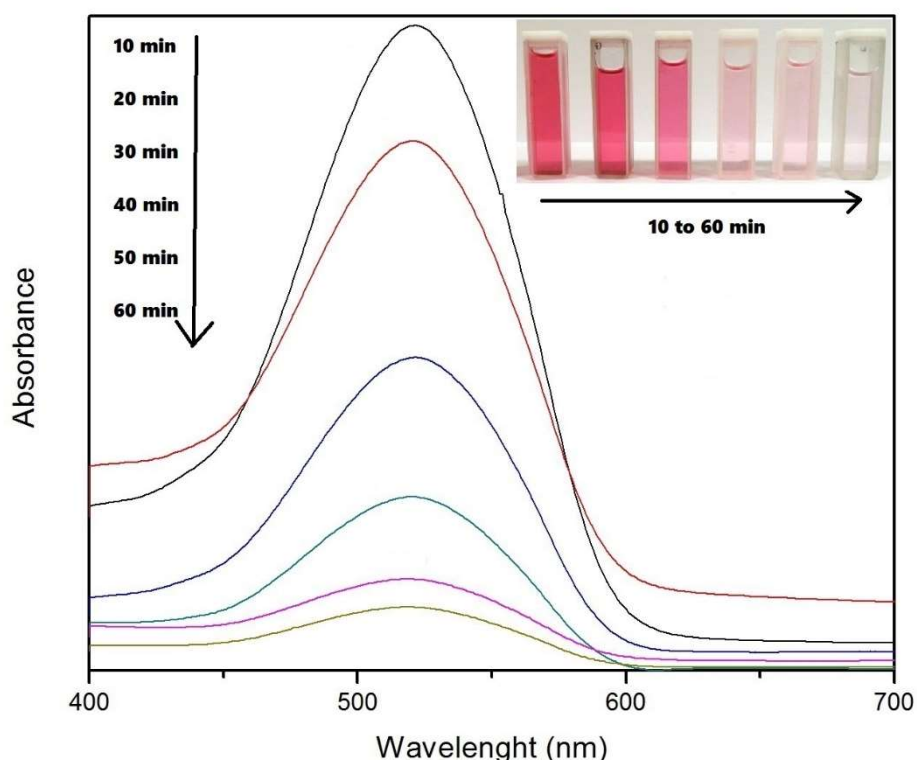


Figure 4 | Changes of UV–vis spectra with reaction time of dye solution by photo-Fenton process under optimum operating conditions. Inset: The image of samples for different reaction times.

TOC removal and reusability of the FeWO₄ catalyst

Reusability of catalyst is a very important parameter that can be used to measure its stability and activity. The condition chosen to carry out the tests of reusing were the best conditions found in the experimental design, as listed in run 5 (Table 1). In these conditions, assays for TOC removal were also realized, however, at 240 min of reaction time. At this time, a complete elimination of residual hydrogen peroxide was detected. The recycling procedure of used FeWO₄ catalyst in the reaction is described as follows: FeWO₄ catalyst that remained in the first reaction was separated by centrifugation, washed with deionized water and ethanol for several times, and then dried at 100 °C for 12 h. Thus the dried powder was used as catalyst again. This procedure was repeated for five cycles, as shown in Figure 5. At the end of the fifth cycle, the decolorization efficiency of the catalyst was of 93 %. The TOC removal was around 58% in the first cycle, declining to 47 % in the fifth cycle. In addition, an iron content of 2.25 ppm was detected at the end of the first assay, declining to 0.80 ppm after the fifth cycle. This level is below those established by the Brazilian environmental legislation (CONAMA) for discharge into any body of water. Therefore, these results indicate a strong stability in the catalyst and high efficiency.

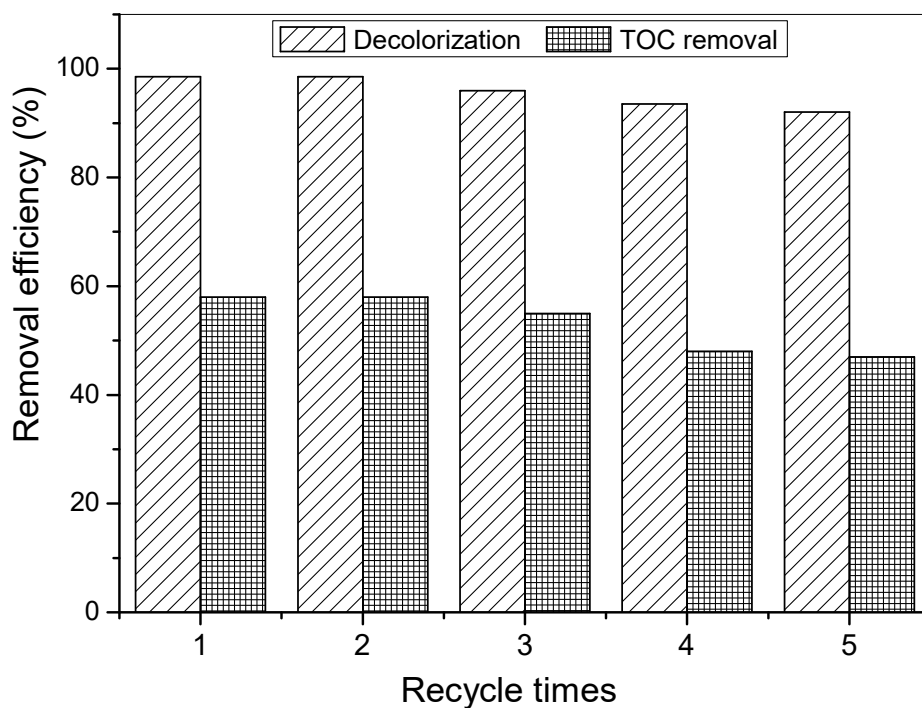


Figure 5 | Stability of the FeWO₄ catalyst for the amaranth degradation.

CONCLUSIONS

FeWO₄ catalyst has been successfully prepared using an efficient synthesis procedure via a microwave technique. The produced material presents high crystallinity and a mesoporous structure, which are essential characteristics for catalytic purposes. Heterogeneous photo-Fenton process using FeWO₄ oxide as a catalyst demonstrated a satisfactory ability for decolorization and mineralization of the amaranth dye from aqueous solution. Under the best reaction conditions, around 97 % decolorization and 58% mineralization were achieved. The efficiency and stability of the FeWO₄ catalyst was maintained high after the fifth cycle of reuse, which demonstrate that the catalyst could be applied to degrade pharmaceutical organic pollutant before be discharged to the aquatic environmental.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank CAPES (The Brazilian Federal Agency for Support of Postgraduate Education) for their financial support.

REFERENCES

- Combes, R. D. & Haveland-Smith, R. B. 1982 A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. *Mutation Research* **98**, 101-248
- Kobylewski, S. & Jacobson, M. F. 2010 *Food Dyes a Rainbow of Risks*. Center for Science in the Public Interest, Washington, USA.
- González-Martínez, S., Piña-Mondragón, S. & González-Barceló, Ó. 2010 Treatment of the azo dye direct blue 2 in a biological aerated filter under anaerobic/aerobic conditions. *Water Science and Technology* **61** (3), 789–796.
- Weber, C. T., Collazzo, G. C., Mazutti, M. A., Foletto, E. L. & Dotto, G. L. 2014 Removal of hazardous pharmaceutical dyes by adsorption onto papaya seeds. *Water Science and Technology* **70** (1), 102–107.
- Anchieta, C. G., Severo, E. C., Rigo, C., Mazutti, M. A., Kuhn, R. C., Muller, E. I., Flores, E. M. M., Moreira, R. F. P. M. & Foletto, E. L. 2015 Rapid and facile preparation of zinc ferrite (ZnFe₂O₄) oxide by microwave-solvothermal technique and its catalytic activity in heterogeneous photo-Fenton reaction. *Materials Chemistry and Physics* **160**, 141-147.
- Pignatello, J. J. 1992 Dark and photoassisted Fe³⁺ catalyzed degradation of chlorophenox herbicides by hydrogen peroxide. *Environmental Science and Technology* **26** (5), 944- 951.
- Benzaquén, T. B., Benzzo, M. T., Isla, M. A. & Alfano, O. M. 2013 Impact of some herbicides on the biomass activity in biological treatment plants and biodegradability enhancement by a photo-Fenton process. *Water Science and Technology* **67** (1), 210–216.
- Zhang, X., Ding, Y., Tang, H., Han, X., Zhu, L. & Wang, N. 2014 Degradation of bisphenol A by hydrogen peroxide activated with CuFeO₂ microparticles as a

- heterogeneous Fenton-like catalyst: Efficiency, stability and mechanism. *Chemical Engineering Journal* **236**, 251–262.
- Soon, A. N. & Hameed, B. H. 2013 Degradation of Acid Blue 29 in visible light radiation using iron modified mesoporous silica as heterogeneous photo-Fenton catalyst. *Applied Catalysis A: General* **450**, 96–105.
- Duarte, F. Maldonado-Hódar, F. J. & Madeira, L. M. 2013 New insight about orange II elimination by characterization of spent activated carbon/Fe Fenton-like catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental* **129**, 264–272.
- Li, Z. J., Ali, G., Kim, H. J., Yoo, S. H. & Cho, S. O. 2014 LiFePO₄ microcrystals as an efficient heterogeneous Fenton-like catalyst in degradation of rhodamine 6G. *Nanoscale Research Letters* **9** (1): 276.
- Munoz, M., Pedro, Z. M., Casas, J. A. & Rodriguez, J. J. 2015 Preparation of magnetite-based catalysts and their application in heterogeneous Fenton oxidation – A review. *Applied Catalysis B: Environmental* **176–177**, 249–265.
- Almeida, M. A. P., Cavalcante, L. S., Morilla-Santos, C., Lisboa-Filho P. N., Beltrán, A., Andrés, J., Gracia, L. & Longo, E. 2012 Electronic structure and magnetic properties of FeWO₄ nanocrystals synthesized by the microwave-hydrothermal method. *Materials Characterization* **73**, 124-129.
- Zhou, Y. X., Yao, H. B., Zhang, Q., Gong, J. Y., Liu, S. J. & Yu, S. H. 2009 Hierarchical FeWO₄ microcrystals: solvothermal synthesis and their photocatalytic and magnetic properties. *Inorganic Chemistry* **48**, 1082-1090.
- Guo, J., Zhou, X., Lu, Y., Zhang, X., Kuang, S. & Hou, W. 2012 Monodisperse spindle-like FeWO₄ nanoparticles: Controlled hydrothermal synthesis and enhanced optical properties. *Journal of Solid State Chemistry* **196**, 550–556.
- Cao, X., Chen, Y., Jiao, S., Fang, Z., Xu, M., Liu, X., Li, L., Pang, G. & Feng, S. 2014 Magnetic photocatalysts with a p–n junction: Fe₃O₄ nanoparticle and FeWO₄ nanowire heterostructures. *Nanoscale* **6**, 12366–12370.
- He, G. L., Chen, M. J., Liu, Y. Q., Li, X., Liu, Y. J. & Xu, Y. H. 2015 Hydrothermal synthesis of FeWO₄-graphene composites and their photocatalytic activities under visible light. *Applied Surface Science* **351**, 474-479.

- Ma, Y., Guo, Y., Jiang, H., Qu, D., Liu, J., Kang, W., Yi, Y., Zhang, W., Shi, J. & Han, Z. 2015 Preparation of network-like ZnO–FeWO₄ mesoporous heterojunctions with tunable band gaps and their enhanced visible light photocatalytic performance. *New Journal of Chemistry* DOI: 10.1039/C5NJ00900F
- Qian, J., Peng, Z., Wu, D., & Fu, X. 2014 FeWO₄/FeS core/shell nanorods fabricated by thermal evaporation. *Materials Letters* **122**, 86–89
- Chanadee, T., Niyomwas, S. & Wannasin, J. 2012 Novel Synthesis of tungsten alloys from metal oxide by self-propagating high-temperature synthesis reaction. *Procedia Engineering* **32**, 628–634.
- Gesheva, K., Szekeres, A. & Ivanova, T. 2003 Optical properties of chemical vapor deposited thin films of molybdenum and tungsten based metal oxides. *Solar Energy Materials and Solar Cells* **76** (4), 563–576.
- Cornell, R. M. & Schwertmann, U. 2003 The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses. 2nd, Completely Revised and Extended Edition, Wiley-VCH Publishers, Weinheim, Germany.
- Gao, Y., Gan, H., Zhang, G. & Guo, Y. 2013 Visible light assisted Fenton-like degradation of rhodamine B and 4-nitrophenol solutions with a stable poly-hydroxyl-iron/sepiolite catalyst. *Chemical Engineering Journal* **217**, 221–230.
- Xu, T., Liu, Y., Ge, F., Liu, L. & Ouyang, Y. 2013 Application of response surface methodology for optimization of azocarmine B removal by heterogeneous photo-Fenton process using hydroxy-iron-aluminum pillared bentonite. *Applied Surface Science* **280**, 926–932.
- CONAMA - National Council on Environmental, Brazil. Available online: <http://www.mma.gov.br/port/conama> (accessed on 22 June 2015).

3.2. Artigo II: Preparation of Zinc Tungstate (ZnWO₄) Particles by Solvo-hydrothermal Technique and their Application as Support for Inulinase Immobilization

O presente artigo foi submetido à revista Materials Research.

Eric da Cruz Severo, Ederson R. Abaide, Chayene Gonçalves Anchieta, Vitória S. Foletto, Caroline T. Weber, Tais B. Garlet, Gabriela C. Collazzo, Raquel Cristine Kuhn, Marcio Antonio Mazutti and Edson Luiz Foletto

Department of Chemical Engineering, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, Brazil

Abstract

ZnWO₄ particles were synthesized as a single phase by a simple and facile solvo-hydrothermal technique using water-ethylene glycol mixture as solvent, without using surfactant. Physical properties of produced particles were analyzed by X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy (FTIR), surface area (BET) and particles size distribution. This material was used as support for inulinase immobilization by physical adsorption and the influence of temperature (30 and 50 °C) was evaluated. Material with mesoporous characteristic and with a surface area of 35.5 m².g⁻¹ was obtained. According to the findings, ZnWO₄ present a satisfactory inulinase adsorption, and the better result was 605 U.g⁻¹ support at 30 °C. Therefore, ZnWO₄ particles prepared by one-step solvo/hydrothermal route provide a new potential support for inulinase immobilization.

Keywords: ZnWO₄, synthesis, characterization, inulinase, immobilization.

1. Introduction

Zinc tungstate (ZnWO_4) is a ternary oxide that due to its unique physical and chemical properties, possess a high application potential in various fields, such as scintillator material¹, photoluminescence², electronic and optical properties³, photovoltaic property⁴, humidity sensor⁵, hydrogen sensor⁶, ether sensor⁷, photocatalyst⁸⁻¹⁰ and high-power lithium-ion batteries¹¹. Herein, a new application is proposed for the ZnWO_4 oxide, as support for enzymes immobilization.

The use of enzymes has been increased in the last years due the variety application such as food production, medicine, textile and pharmaceutical¹². Immobilization presents some advantages such as lowering downstream purification requirements because the products are easily removed from the immobilized enzymes¹³ and lowering the costs because enzyme can be reuse. Enzymes are supported in solid matrix for the immobilization by a variety of methods such as physical and chemical mechanisms¹². The physical adsorption of enzyme^{12,14} is entrapment on porous matrix, and in the chemical immobilization enzyme is attachment by covalent bonds¹⁵ and cross-linking between enzyme and matrix¹⁶. The immobilization by adsorption usually preserves the catalytic activity of the enzyme¹⁷, therefore, sometimes during its use the immobilized enzyme can be lost when the interactions between adsorbent and enzyme are relatively weak^{17,18}, and in this case, the support can be reused. Inulinases are enzymes useful on industrial processes, which can be applied for the production of sugars. It may produce high fructose syrups by enzymatic hydrolysis, and are used for the production of fructooligosaccharides, which are functional food ingredients. Inulinase has been immobilized by adsorption on different supports such as grafted alginate beads¹⁹, aminated non-porous silica²⁰ and chitin²¹. However, the inulinase immobilization using the ZnWO_4 oxide as support has not been explored yet.

ZnWO_4 particles have been synthesized by various routes such as polymerized complex method²², microwave assisted technique²³, hydrothermal²⁴, ligand-assisted hydrothermal²⁵, template-free hydrothermal²⁶, solid-state reaction²⁷, polyol-mediated synthesis²⁸, solid-state metathetic approach²⁹, mechanochemical synthesis³⁰, sol-gel³¹, calcining co-precipitated precursor³² and combustion method³³, electrodeposition³⁴ and high direct voltage electrospinning process³⁵. Herein, ZnWO_4 particles were prepared by the one-step solvo/hydrothermal method due be simple,

facile, mild reaction temperature, and environmentally friendly, because use not surfactant.

In this context, we aimed prepare ZnWO_4 particles by one-step solvo-hydrothermal route and investigate their ability as support for inulinase immobilization.

2. Experimental Procedure

2.1 Preparation and characterization of ZnWO_4

ZnWO_4 support was prepared by solvo/hydrothermal method using sodium tungstate ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) and zinc chloride (ZnCl_2) as starting materials. For the material synthesis, 0.14 g of sodium tungstate was dissolved in 20 mL of solution containing deionized water and ethylene glycol (1:1, v/v), under magnetic stirring by 30 min. The same procedure was taken to ZnCl_2 , however using 0.13 g. The sodium tungstate solution was added into the zinc chloride solution under magnetic stirring. Then the resulting homogeneous solution was transferred into Teflon-lined stainless-steel autoclave. This autoclave was sealed and maintained at 180 °C for 24 h and then cooled to room temperature. The obtained white powders were collected and washed with deionized water and ethanol for several times to remove impurities, and then the product was dried at 110 °C for 4 h.

ZnWO_4 particles were characterized by X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy (FTIR), BET surface area measurement and particles size distribution. X-ray diffraction patterns were obtained using a Rigaku Miniflex 300 diffractometer. The X-ray source was $\text{Cu-K}\alpha$ radiation, powered at 30 kV and 10 mA. Data were collected over the 2θ range 10–70° with a step size of 0.03° and a count time of 0.9 s per step. By means of infrared spectroscopy, Fourier transform infrared spectra (FTIR) for all samples pressed into KBr pellets (10 mg zinc tungstate/300 mg KBr) were recorded by a Shimadzu IR-Prestige-21 spectrometer. IR spectra were measured in the range 3750–400 cm^{-1} . Nitrogen adsorption–desorption isotherms were obtained from nitrogen adsorption isotherms at 77 K, carried out on an ASAP 2020 apparatus at relative pressure (P/P_0) ranging from 0 to 0.99. The particle size distribution of sample was measured using a laser particle size analyzer (Mastersizer 2000).

2.2 Enzyme immobilization assays

Adsorption experiments were carried out to investigate the inulinase immobilization from aqueous solution. Commercial inulinase was obtained from *Aspergillus niger* (fructozyme, exo-inulinase EC 3.2.1.80 and endo-inulinase EC 3.2.1.7) was purchased from Sigma-Aldrich. The influence of temperature (30 and 50 °C) on the immobilization process was investigated. The adsorption of inulinase was performed using a batch technique. Typically, ZnWO₄ (0.025 g) were placed in Erlenmeyers flasks containing of inulinase solution (1.3 % v/v) in sodium acetate buffer (pH 4.8) and 1:400 of adsorbent:adsorbate ratio. The resulting solution was maintained under agitation (150 rpm), and then an aliquot of the aqueous solution was taken at various time intervals and filtered through a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (0.22 μm) before analysis. The inulinase activity in the aqueous solution was determined according to procedure defined below.

2.3 Inulinase Activity Assay

An aliquot of the enzyme (0.5 mL) was incubated with sucrose solution (4.5 mL, 2% w/v) in sodium acetate buffer (0.1 M, pH 4.8) at 50 °C. Released reducing sugars were measured by the 3,5-dinitrosalicylic acid method³⁶. A separate blank was set up for each sample to correct for the non-enzymatic release of sugars. One unit of inulinase activity was defined as the amount of enzyme necessary to hydrolyze 1 μmol of sucrose per minute under the mentioned conditions (sucrose as a substrate). The adsorption (inulinase immobilization) was determined using Equation (1).

$$Q_t = \frac{(A_0 - A_t)V}{m} \quad (1)$$

where A_0 and A_t (U.mL⁻¹) are the inulinase activities at $t = 0$ and time t , respectively; V (mL) is the volume of solution, and m (g) is the mass of support.

2. Results and Discussion

The XRD pattern of the ZnWO₄ prepared through solvo/hydrothermal process is shown in Fig. 1. The XRD peaks of ZnWO₄ sample can be assigned to monoclinic ZnWO₄, accordingly to JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) card No. 73-544, indicating that the synthesized sample is single phase. The major diffraction peaks at 2θ of 18.89, 30.44, 36.43 and 53.64 correspond to the (100), (111), (002) and (221) planes of ZnWO₄. The average crystallite size of ZnWO₄ was calculated by the Scherrer equation³⁷:

$$D = \frac{K \cdot \lambda}{h_{1/2} \cdot \cos \theta}$$

(2)

where D is the average crystallite size, K is the Scherrer constant (0.90), λ is the wavelength of the X-ray radiation (0.1541 nm for Cu-K α), $h_{1/2}$ is the peak width at half height and θ corresponds to the peak position (in the current study, $2\theta = 30.44^\circ$). The average crystallite size of ZnWO₄ sample was 11 nm.

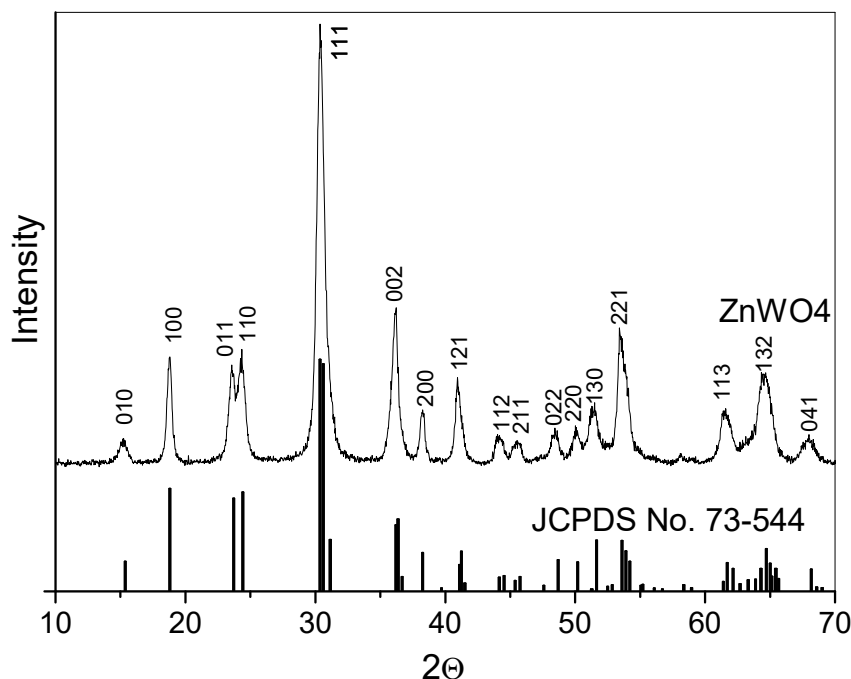


Figure 1. XRD pattern of ZnWO₄ powders prepared by solvo/hydrothermal crystallization. Inset at figure: ZnWO₄ reference according to JCPDS card No. 73-544.

The nitrogen adsorption–desorption isotherms and pore size distribution corresponding to ZnWO₄ support are depicted in Fig. 2. The nitrogen adsorption-desorption isotherms (Fig. 2a) showed weak adsorption at low relative pressure and a H1-type hysteresis loop at higher relative pressure ($P/P_0 = 0.70\text{--}0.90$). This suggests that the material presents mesoporosity, which can be attributed to the interparticle pores due to the crystallites agglomeration. According to the IUPAC classification, the isotherms are type IV and typical of mesoporous solids. Pore size distribution (Fig. 2b) consisted of one wide peak centered at around 15 nm. The Brunauer Emmett-Teller (BET) surface area, average pore size and total pore volume of the ZnWO₄ sample were $35.5\text{ m}^2\cdot\text{g}^{-1}$, 12.4 nm and $0.112\text{ cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$, respectively. These physical characteristics regarding the pores structure are essential for immobilization purposes by adsorption process.

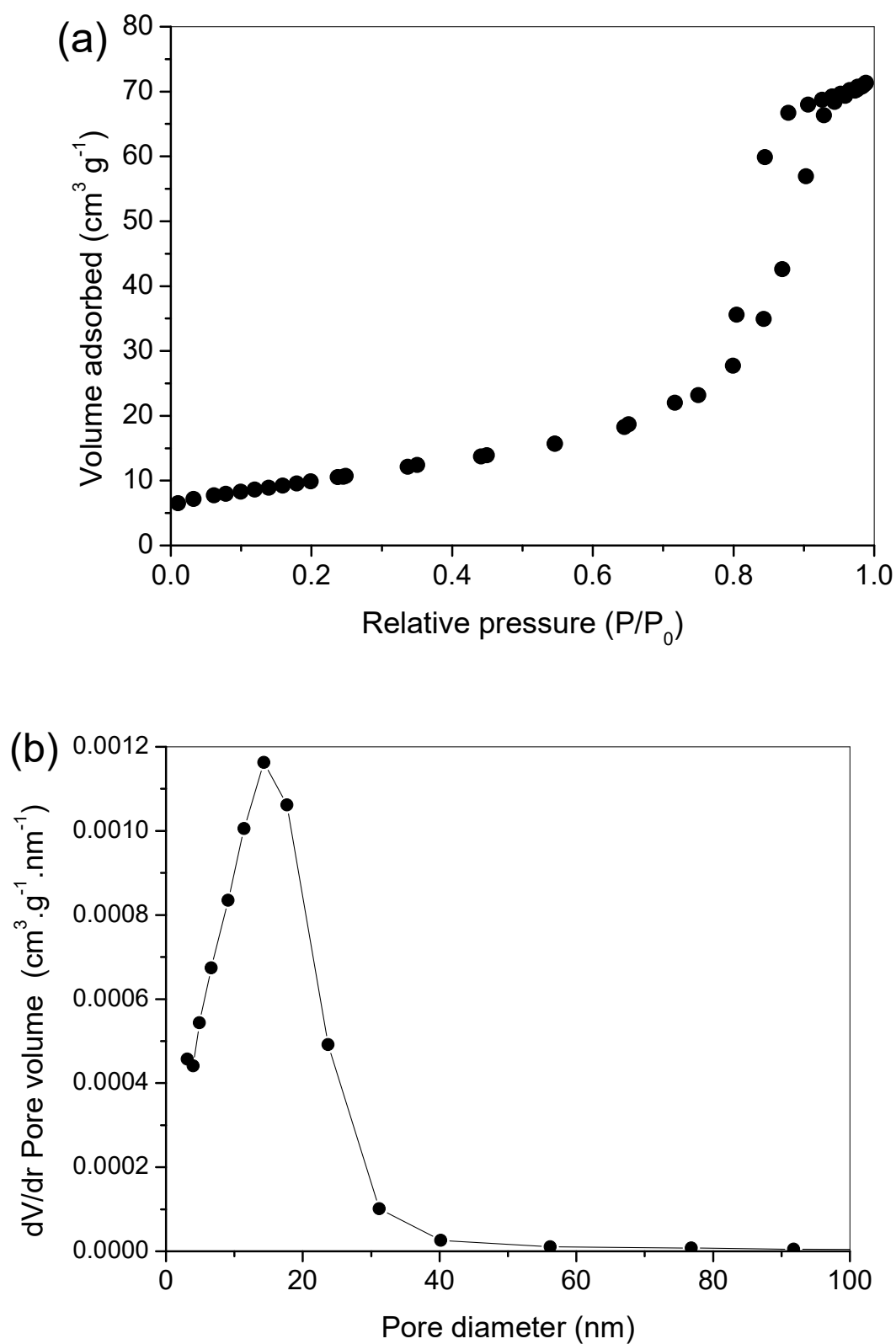


Figure 2. (a) Nitrogen adsorption–desorption isotherms and (b) pore size distribution of the ZnWO₄ support.

The particle size distribution pattern for the zinc tungstate by the solvo-hydrothermal technique is shown in Fig. 3. The particle sizes for the oxide sample range between 0.36 μm and 240 μm , resulting and an average size of 26 μm . These particle sizes in micrometric scale can explain the mesoporosity of material due to a variety of accumulated pore voids among the particles formed by the agglomeration of crystallites. Thus this mesoporous structure can be interesting for enzyme immobilization purposes.

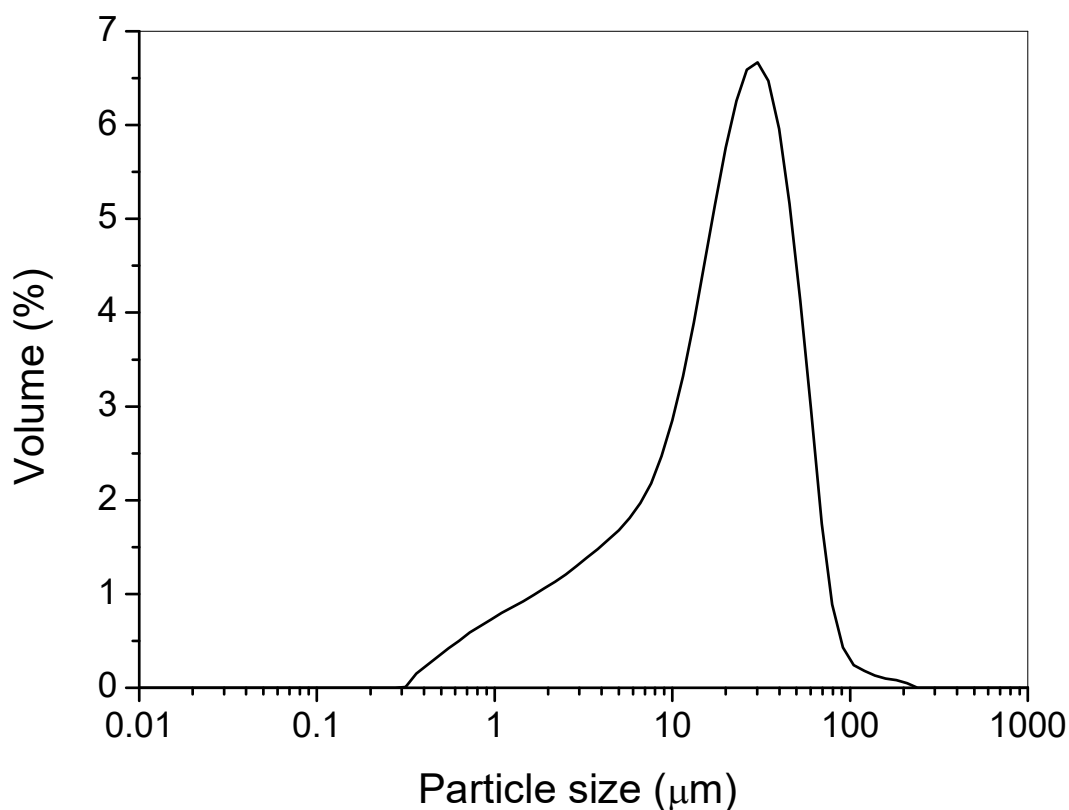


Figure 3. Particle size distribution plot for zinc tungstate prepared by the solvo-hydrothermal route.

In order to investigate the immobilization of enzyme on the ZnWO_4 support, FTIR spectra of ZnWO_4 support, immobilized enzyme on the support and free enzyme were recorded (Fig. 4). The ZnWO_4 support (Fig. 4a) shows main absorption bands between 450 and 1000 cm^{-1} ³⁸. The bands at 820 and 880 cm^{-1} are due to the stretching modes of W–O bonds. The bands at 600 and 700 cm^{-1} are assigned to

Zn–O–W bonds. Bands at 1600 and 3400 cm^{-1} are associated to presence of water absorbed on the ZnWO_4 sample. These results indicate the formation of ZnWO_4 single phase, corroborating to the results from XRD analysis. Bands around 2300 cm^{-1} are assigned to the adsorbed atmospheric CO_2 . Inulinase free (Fig. 4c) shows bands associated with amino groups (CONH) at 1400–1600 cm^{-1} ^{39,40}. Bands around 1000 cm^{-1} correspond to $-\text{C}=\text{O}$ binding of enzyme on the support. These bands are also displayed in the spectrum of the immobilized enzyme on the support (Fig. 4b), confirming the immobilization of inulinase on the ZnWO_4 support.

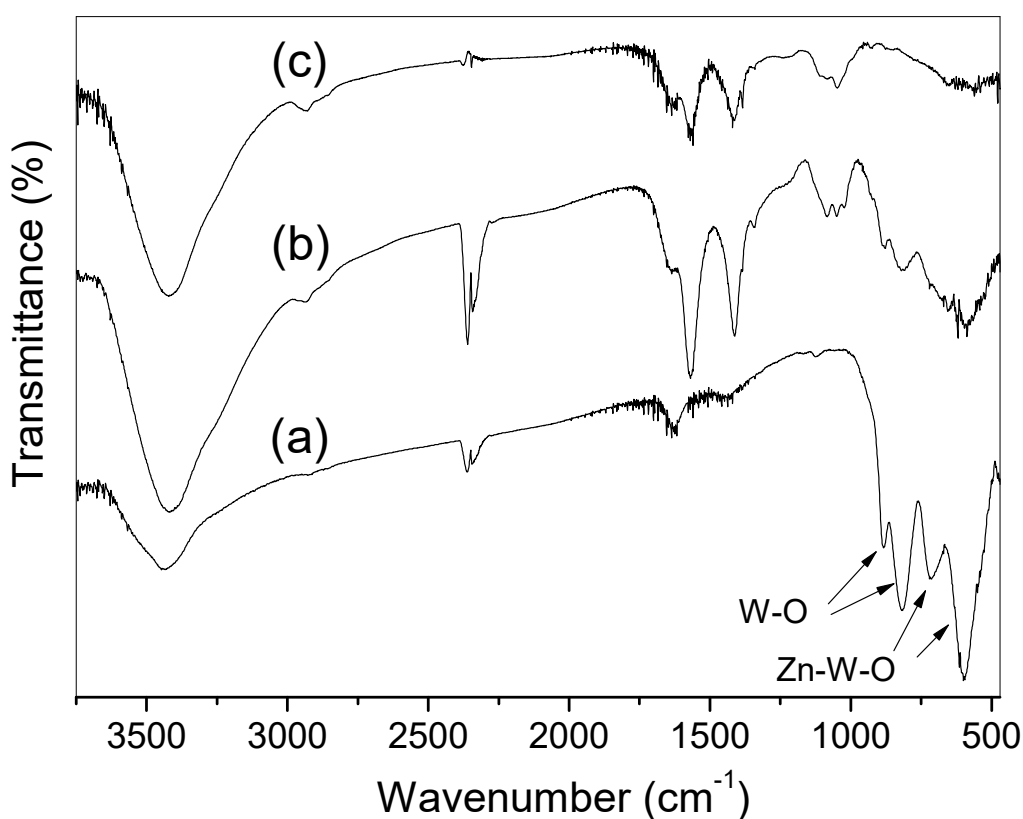


Figure 4. FTIR spectra of (a) ZnWO_4 support, (b) immobilized enzyme on the ZnWO_4 support and (c) free enzyme.

According to the results of inulinase immobilization shown in Fig 5, it is possible to observe that the adsorption equilibrium was obtained in 120 min for both temperatures (30 and 50 $^{\circ}\text{C}$). Fig. 5 also demonstrates that the increase of the

temperature had a negative effect in the improvement of enzyme adsorption, with loading capacity of 605 U.g^{-1} support and 264 U.g^{-1} support at 30 and 50 °C, respectively. For comparison purposes, Missau et al.¹⁶ found similar results regarding the inulinase immobilization on alginate-chitosan beads, achieving 668 U.g^{-1} gel beads at 50 °C. Grafted alginate beads showed an inulinase loading capacity of 530 U.g^{-1} gel beads¹⁹. Chitin²¹ and silica⁴¹ were used as inulinase supports, reaching 291.58 U.g^{-1} chitin and 43 U.g^{-1} silica, respectively. Therefore, these findings indicate that the ZnWO_4 particles present satisfactory inulinase immobilization, which can be attributed to their porous structure.

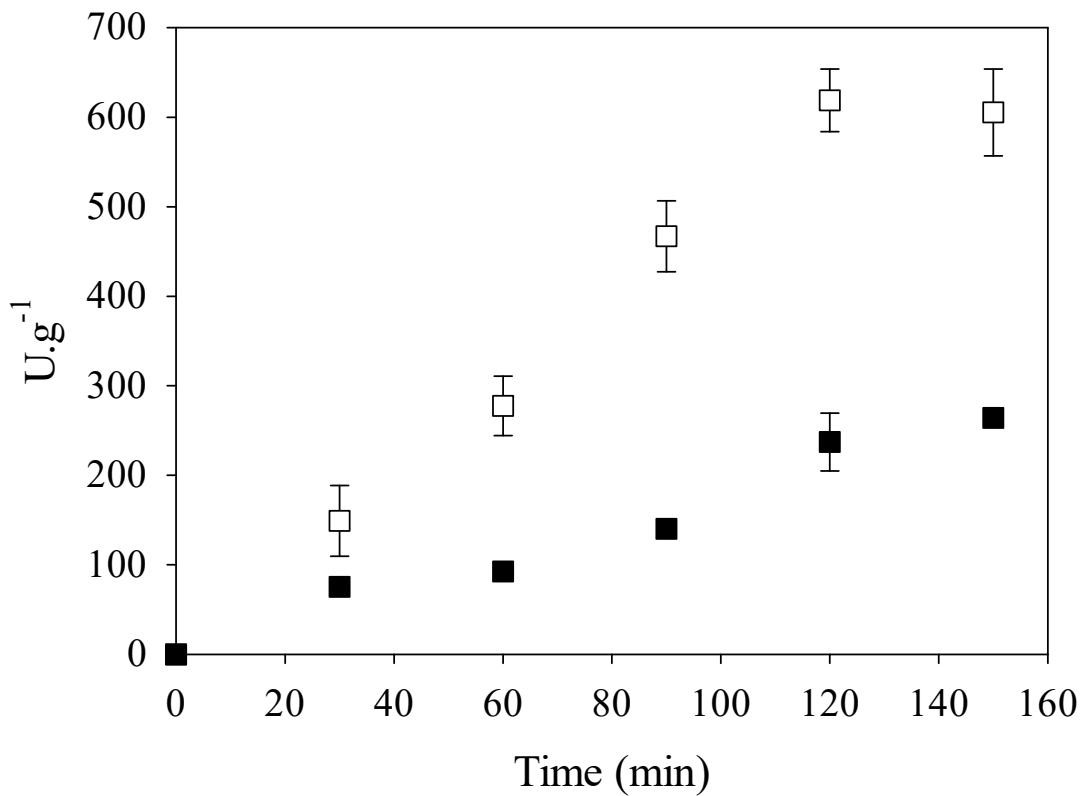


Figure 5. Adsorption capacity (U.g^{-1}) of inulinase on ZnWO_4 particles at (\square) 30 °C and (\blacksquare) 50 °C.

4. Conclusions

ZnWO₄ powders were successfully synthesized through one-step solvo-hydrothermal crystallization at a mild temperature, without using additives. ZnWO₄ particles presented porous structure with surface area of 35.5 m².g⁻¹. Inulinase could be successfully immobilized using ZnWO₄ particles. Temperature had a significant effect on enzyme immobilization process. In the best condition, the enzyme loading capacity was 605 U.g⁻¹ at 30 °C using 1.3% (v/v) enzyme concentration and a 1:400 adsorbent:adsorbate ratio. Therefore, the ZnWO₄ support prepared herein shows attractive physical characteristics for the potential application on inulinase immobilization.

Acknowledgments

The authors would like to thank CAPES and CNPq for their financial support and scholarships.

References

1. Bavykina I, Angloher G, Hauff D, Kiefer M, Petricca F and Pröbst F. Development of cryogenic phonon detectors based on CaMoO₄ and ZnWO₄ scintillating crystals for direct dark matter search experiments. *Optical Materials*. 2009; 31:1382–1387.
2. Kalinko A and Kuzmin A. Raman and photoluminescence spectroscopy of zinc tungstate powders. *Journal of Luminescence*. 2009; 129:1144–1147.
3. Brik MG, Nagirnyi V and Kirm M. Ab-initio studies of the electronic and optical properties of ZnWO₄ and CdWO₄ single crystals. *Materials Chemistry and Physics*. 2012; 134:1113–1120.
4. Kim DW, Cho IS, Shin SS, Lee S, Noh TH, Kim DH, et al. Electronic band structures and photovoltaic properties of MWO₄ (M=Zn, Mg, Ca, Sr) compounds. *Journal of Solid State Chemistry*. 2011; 184: 2103–2107.
5. You L, Cao Y, Sun YF, Sun P, Zhang T, Du Y, et al. Humidity sensing properties of nanocrystalline ZnWO₄ with porous structures. *Sensors and Actuators B*. 2012; 161:799– 804.

6. Tang Z, Li X, Yang J, Yu J, Wang J and Tang Z. Mixed potential hydrogen sensor using ZnWO₄ sensing electrode. *Sensors and Actuators B*. 2014; 195:520–525
7. Cao X, Wu W, Chen N, Peng Y and Liu Y. An ether sensor utilizing cataluminescence on nanosized ZnWO₄. *Sensors and Actuators B*. 2009; 137:83–87.
8. Fu H, Pan C, Zhang L and Zhu Y. Synthesis, characterization and photocatalytic properties of nanosized Bi₂WO₆, PbWO₄ and ZnWO₄ catalysts. *Materials Research Bulletin*. 2007; 42:696–706.
9. Huang G, Zhang C and Zhu Y. ZnWO₄ photocatalyst with high activity for degradation of organic contaminants. *Journal of Alloys and Compounds*. 2007; 432:269–276.
10. He D, Zhang X, Xie T, Zhai J, Li H, Chen L, et al. Studies of photo-induced charge transfer properties of ZnWO₄ photocatalyst. *Applied Surface Science*. 2011; 257:2327–2331.
11. Zhang L, Wang Z, Wang L, Xing Y and Zhang Y. Preparation of ZnWO₄/graphene composites and its electrochemical properties for lithium-ion batteries. *Materials Letters*. 2013; 108:9–12.
12. Daoud FB, Kaddour S and Sadoun T. Adsorption of cellulose *Aspergillus niger* on a commercial activated carbon: Kinetic and equilibrium studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010; 75:93–99.
13. Fernandes P, Marques MPC, Carvalho F and Cabral JMS. A simple method for biocatalyst immobilization using PVA-based hydrogel particles. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2009; 84:561–564.
14. Garlet TB, Weber CT, Klaic R, Foletto EL, Jahn SL, Mazutti MA, et al. Carbon nanotubes as supports for inulinase immobilization. *Molecules*. 2014; 19:14615–14624.
15. Elnashar MMM, Danial EN and Awad GEA. Novel carrier of grafted alginate for covalente immobilization of inulinase. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2009; 48:9781–9785.
16. Missau J, Scheid AJ, Foletto EL, Jahn SL, Mazutti MA and RC Kuhn. Immobilization of commercial inulinase on alginate–chitosan beads. *Sustainable Chemical Processes*. 2014; 2:13. DOI:10.1186/2043-7129-2-13

17. Brena B, González-Pombo P and Batista-Viera F. Immobilization of enzymes: A literature survey. *Methods in Molecular Biology*. 2013; 1051:15–31.
18. Feng W and Ji P. Enzymes immobilized on carbon nanotubes. *Biotechnology Advances*. 2011; 29:889–895.
19. Danial EN, Elnashar MMM and Awad GEA. Immobilized inulinase on grafted alginate beads prepared by the one-step and the two-steps methods. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2010; 49:3120–3125.
20. Karimi M, Chaudhury I, Jianjun C, Safari M, Sadeghi R, Habibi-Rezaei M, et al. Immobilization of endo-inulinase on non-porous amino functionalized silica nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2014; 104:48–55.
21. Nguyen QD, Rezessy-Szabó JM, Czukor B and Hoschke Á. Continuous production of oligofructose syrup from Jerusalem artichoke juice by immobilized endo-inulinase. *Process Biochemistry*. 2011; 46:298-303.
22. Ryu JH, Lim CS and Auh KH. Synthesis of ZnWO₄ nanocrystalline powders by the polymerized complex method. *Materials Letters*. 2003; 57:1550–1554.
23. Garadkar KM, Ghule LA, Sapnar KB and Dhole SD. A facile synthesis of ZnWO₄ nanoparticles by microwave assisted technique and its application in photocatalysis. *Materials Research Bulletin*. 2013; 48:1105–1109.
24. Arin J, Dumrongrojthanath P, Yayapao O, Phuruangrat A, Thongtem S and Thongtem T. Synthesis, characterization and optical activity of La-doped ZnWO₄ nanorods by hydrothermal method. *Superlattices and Microstructures*. 2014; 67:197–206.
25. Kim MJ and Huh YD. Ligand-assisted hydrothermal synthesis of ZnWO₄ rods and their photocatalytic activities. *Materials Research Bulletin*. 2010; 45: 1921–1924.
26. Hojamberdiev M, Zhu G and Xu Y. Template-free synthesis of ZnWO₄ powders via hydrothermal process in a wide pH range. *Materials Research Bulletin*. 2010; 45:1934–1940.
27. Kumar GB, Sivaiah K and Buddhudu S. Synthesis and characterization of ZnWO₄ ceramic powder. *Ceramics International*. 2010, 36:199–202.
28. Ungelenk J, Speldrich M, Dronskowski R and Feldmann C. Polyol-mediated low-temperature synthesis of crystalline tungstate nanoparticles MWO₄ (M = Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn). *Solid State Sciences*. 2014; 31:62–69.

29. Parhi P, Karthik TN and Manivannan V. Synthesis and characterization of metal tungstates by novel solid-state metathetic approach. *Journal of Alloys and Compounds*. 2008; 465: 380–386.
30. Mancheva M, Iordanova R and Dimitriev Y. Mechanochemical synthesis of nanocrystalline ZnWO₄ at room temperature. *Journal of Alloys and Compounds*. 2011; 509:15–20.
31. Wu Y, Zhang SC, Zhang LW and Zhu YF. Photocatalytic activity of nanosized ZnWO₄ prepared by the sol-gel method. *Chemical Research in Chinese Universities*. 2007; 23:465–468.
32. G Huang and Zhu Y. Synthesis and photocatalytic performance of ZnWO₄ catalyst. *Materials Science and Engineering: B*. 2007; 139:201–208.
33. Dong T, Li Z, Ding Z, Wu L, Wang X and X Fu. Characterizations and properties of Eu³⁺-doped ZnWO₄ prepared via a facile self-propagating combustion method. *Materials Research Bulletin*. 2008; 43:1694–1701.
34. Rahimi-Nasrabadi M, Pourmortazavi SM, Ganjali MR, Hajimirsadeghi SS and Zahedi MM. Electrosynthesis and characterization of zinc tungstate nanoparticles. *Journal of Molecular Structure*. 2013; 1047:31–36.
35. Keereeta Y, Thongtem T and Thongtem S. Fabrication of ZnWO₄ nanofibers by a high direct voltage electrospinning process. *Journal of Alloys and Compounds*. 2011; 509:6689–6695.
36. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1959; 31:426–428.
37. Jenkins R and Snyder RL. *Introduction to X-ray powder diffractometry*. John Wiley & Sons Inc., New York; 1996.
38. Yu C and Yu JC. Sonochemical fabrication, characterization and photocatalytic properties of Ag/ZnWO₄ nanorod catalyst. *Materials Science and Engineering B*. 2009; 164:16–22.
39. Cicolatti EP, Valério A, Nicoletti G, Theilacker E, Araújo PHH, Sayer C, et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on PEGylated poly(urea-urethane) nanoparticles by step miniemulsion polymerization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2014; 109:116–121.
40. Verma ML, Barrowa CJ, Kennedyb JF and Puria M. Immobilization of β-D-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on functionalized silicon dioxide

- nanoparticles: Characterization and lactose hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2012; 50:432– 437.
41. Gaspari JW, Gomes LH and Tavares FCA. Imobilização da inulinase de *Kluyveromyces marxianus* para a hidrólise de extratos de *Helianthus tuberosus* L. *Scientia Agricola*. 1999; 56:1135-1140.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES GERAIS

FeWO_4 e ZnWO_4 mostraram grande usabilidade para aplicações tecnológicas no que tange àquelas abordadas nesse trabalho. O catalisador FeWO_4 foi sintetizado utilizando a técnica de microondas, através de um reator pressurizado, onde o material apresentou alta cristalinidade e estrutura mesoporosa, características essas importantes para reações de Fenton. Os testes para a reação de foto-Fenton usando o catalisador FeWO_4 apresentaram desempenhos satisfatórios, com remoção de 97% da cor do corante Amaranth e 58% de remoção de COT. O material também mostrou estabilidade e alta eficiência processual após 5 ciclos de reuso, o que demonstra que o mesmo possui características promissoras para ser aplicado na degradação de poluentes orgânicos.

ZnWO_4 foi sintetizado com sucesso pelo método hidro/solvotérmico a baixa temperatura. Por se tratar de um material com estrutura porosa, o mesmo foi utilizado com sucesso para imobilização da inulinase. As condições ótimas de processo foram na temperatura de 30°C, utilizando 1,3% (v/v) de enzima e uma razão 1:400 de adsorvente/adsorbato. A capacidade de imobilização foi de 605 U.g⁻¹. Portanto, este óxido demonstrou ser um suporte promissor para imobilização de enzimas.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

FeWO₄

- Testar o catalisador FeWO₄ na reação de Fenton induzida por ultrassom.
- Testar o catalisador FeWO₄ com outros tipos de poluentes, como os pesticidas, por exemplo.
- Aliar o tratamento de foto-Fenton a outros processos de tratamento, como o biológico, por exemplo.
- Sintetizar compósitos carbono/FeWO₄ e avaliar sua eficiência na degradação de poluentes orgânicos por processo Fenton.

ZnWO₄

- Testar o material para imobilização de outros tipos de enzimas.
- Testar o material na reação de fotocatalise heterogênea utilizando luz UV.
- Fazer testes para degradação de poluentes orgânicos em reator de fluxo contínuo, utilizando a luz solar como fonte de irradiação.