



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA  
DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA

**JOHN ALEXANDER RODRIGUEZ BUSTOS**

**USO DOS EXTRATOS NATURAIS DE MANDIOCA  
(*Manihot esculenta* Crantz) PARA TRATAMENTO DE ÁGUAS  
CONTENDO RESÍDUOS ORGÂNICOS**

FLORIANÓPOLIS  
JANEIRO 2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

B982u Bustos, John Alexander Rodriguez

Uso dos extratos naturais de mandioca (manihot esculenta crantz) para tratamento de águas contendo resíduos orgânicos [dissertação] / John Alexander Rodriguez Bustos; orientadora, Mara Gabriela Novy Quadri. - Florianópolis, SC, 2011.

124 p.: grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia química. 2. Mandioca. 3. Lectinas. 4. Taninos. 5. Hemaglutinação. I. Quadri, Mara Gabriela Novy. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDU 66.0

**JOHN ALEXANDER RODRIGUEZ BUSTOS**

**USO DOS EXTRATOS NATURAIS DE MANDIOCA  
(*Manihot esculenta* Crantz) PARA TRATAMENTO DE ÁGUAS  
CONTENDO RESÍDUOS ORGÂNICOS**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Mara Gabriela Novy Quadri

Florianópolis. Santa Catarina  
Janeiro 2012



**Uso dos extratos naturais da parte aérea de mandioca  
(*Manihot Esculenta Crantz*) para  
tratamento de águas contendo resíduos orgânicos**

Por

**John Alexander Rodriguez Bustos**

Dissertação julgada para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** é aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Leonel Teixeira Pinto  
**Coordenador do CPGENQ**

**Banca Examinadora:**

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Mara Gabriela Novy Quadri (Orientadora)

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Regina de Fátima Peralta Muniz Moreira

Prof Dr. Rogério Marcos Dallago

Prof Dr. Marinho Bastos Quadri

Florianópolis, 16 de janeiro de 2012



*Aos meus pais Blanca e Luis,  
meu irmão Christian  
e minha esposa Paola,  
pelo amor, confiança  
e apoio incondicional*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais esta oportunidade de enriquecimento profissional e pessoal.

Ao meu pai Luis y minha mãe Blanca, verdadeiros autores deste trabalho.

A meu irmão Christian pelo apoio nos momentos mais difíceis e pela amizade incondicional.

A Pao pelo amor, dedicação e carinho e por acreditar nesta aventura e sua determinação em avançar sempre juntos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq pelo suporte financeiro por meio do Programa de Estudante-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG).

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Mara Gabriela Novy Quadri pelo conhecimento transmitido, confiança y credibilidade no meu trabalho

A Prof<sup>a</sup> Regina de Fátima P.M. Moreira apoio e ajuda no desenvolvimento experimental do trabalho e por seus aportes.

Ao Prof. Dr. Antônio Augusto Ulson de Souza pelos aportes e sugestões recebidos.

A Edson Wuerges da EPAGRI - Santa Catarina pela colaboração com a consecução de matérias primas para o trabalho

Ao professor João Borges Laurindo e ao Engenheiro Giustino Tribuzi do laboratório PROFI pela colaboração na parte experimental deste trabalho.

Ao Engenheiro Álvaro Vargas Júnior do instituto Federal catarinense (IFC) pela ajuda na consecução de amostras.

Ao pessoal do LASIPO, especialmente a Solange, Raquel, Marcel e Fabrício pela amizade e ajuda em todo momento.

À aluna de iniciação científica Maria Julia das Chagas pela ajuda no desenvolvimento experimental do trabalho.

Aos amigos, familiares e colegas que entenderam minha ausência e tentaram me ajudar sempre.

À galera colombiana em Florianópolis, especialmente a Lore, Rafael, Julian e Leonardo pela amizade e companheirismo.

Ao tio Carlos que partiu antes de tempo e cuida de mim desde o céu.

A minha terra Colômbia por formar pessoas de bem

Ao Brasil por me receber com carinho.



## RESUMO

A parte aérea da mandioca (*Manihot Esculenta* Crantz), planta cultivada no Brasil, é pouco utilizada e muitas vezes descartada como resíduo. Em sua composição encontram-se lectinas e polifenóis, compostos cuja estrutura química está relacionada a fenômenos de aglomeração, podendo, portanto, serem aproveitados em diversos campos tecnológicos. No presente trabalho, extratos aquosos e etanólicos de folhas e caule de mandioca foram aplicados ao tratamento de efluentes em escala de laboratório. Os extratos foram inicialmente avaliados quanto aos teores protéico e fenólicos, obtendo-se concentrações de proteína maiores nas folhas (0,44 mg·mL<sup>-1</sup> de extrato). Os conteúdos de fenólicos também foram determinados, evidenciando uma alta percentagem de taninos condensados (90-100% do total de taninos). Quanto aos agentes extratores (água e etanol 70%), o etanol apresentou melhor rendimento tanto nas folhas (59%) como no caule (37%), porém com inconvenientes no seu uso no caso das folhas, pela extração de pigmentos indesejáveis. Foi avaliada a atividade hemaglutinante dos extratos em vários tipos de eritrócitos, detectando aglutinação em alguns deles (humano, bovino e de frango) com distintas intensidades, o que sugere a presença de uma lectina de caráter específico. Utilizando testes de significância e análise de variância, foram estabelecidas as condições de extração (25°C e 60 min) e armazenamento (10°C) sob as quais o fenômeno de aglutinação é maior. Posteriormente, os extratos foram testados na descoloração de soluções aquosas de azul de metileno, achando-se uma maior remoção de cor quando a fase aquosa proveniente da concentração do extrato etanólico do caule da mandioca era utilizada. Escolhido o extrato, foram conduzidos testes de coagulação para remover o corante e, usando um planejamento fatorial fracionário, foram avaliadas diferentes variáveis com objetivo de atingir a máxima remoção (0,10 mg corante·ml de extrato<sup>-1</sup>). O pH e a dosagem de extrato foram os fatores mais influentes. Posteriormente, testaram-se outros dois corantes catiônicos (Azul Maxilon GRL e Verde de Malaquita) atingindo remoções máximas de 0,19 e 0,14 mg corante·ml de extrato<sup>-1</sup> respectivamente. pHs neutros e básicos, concentrações de corante baixas, dosagens de extrato em torno de 40 ml·L<sup>-1</sup>, ausência de NaCl e tempos de agitação de 5 e 30 min para as etapas de mistura rápida e lenta, favoreceram o processo de descoloração. Adicionalmente foi testada a adição de um alcalinizante o que permitiu aumentar a

remoção até 90%. Finalmente foram avaliadas a demanda química de oxigênio e a toxicidade das soluções tratadas com o extrato. Houve um aumento da DQO e uma diminuição da toxicidade das amostras tratadas em 80%. A concentração letal do extrato em fase aquosa foi de 80 ml·L<sup>-1</sup>. Como as dosagens medidas nos testes de descoloração foram menores à dosagem letal determinada, os mesmos foram considerados inócuos.

Palavras-Chave: Mandioca. Lectinas. Atividade hemaglutinante. Taninos. Descoloração.

## ABSTRACT

The aerial part of cassava (*Manihot esculenta* Crantz), a plant grown in Brazil, is almost unused and often considered a waste. Its composition includes lectins and polyphenols, so-called antinutritional factors. The chemical structure of these compounds is related with the agglomeration phenomena and therefore they can be utilized in several technological fields. In this study aqueous and ethanolic extracts of leaves and stems were obtained. Their protein and phenolic content were e; achieving greater protein contents in leaves (0,44 mg·mL<sup>-1</sup> of extract), and showing a high percentage of condensable tannins (90-100% of total tannins). Regarding the extracting agents (water and 70% ethanol), ethanol showed the best performance in the recovery of phenolic compounds from leaves (59%) and stems (37%), with drawbacks in its use in the leaves due to the extraction of undesirable pigments. The hemagglutinating activity of the extracts on various erythrocytes was evaluated, detecting agglutination in some of them (human, bovine and chicken) with different intensities, suggesting the presence of a lectin with a specific character. Using significance tests and analyses of variance, were established the extraction conditions (25 °C and 60 min) and the storage temperature (10°C) under which the agglutination is higher. Subsequently, the extracts were tested in discoloration of aqueous solutions of Methylene Blue, finding a higher colour removal by using the aqueous phase obtained of the concentration of ethanolic extract of cassava stem. Coagulation tests were made to remove the dye and, with a fractional factorial design, several variables were evaluated in order to achieve the maximum removal (0,10 mg dye·ml extract<sup>-1</sup>). The pH and extract dosage were the most influential ones. Later, two other cationic dyes were tested (Maxilon Blue GRL and Malachite Green) reaching maximum removals of 0,19 and 0,14 mg dye·ml extract<sup>-1</sup> respectively. Neutral and basic pH values, low dye concentrations, extract dosages around 40 ml·L<sup>-1</sup>, absence of NaCl and shaking times of 5 and 30 min in mixing steps, improved the discoloration process. In addition, an alkali agent was tested, obtaining an increase in the removal up to 90%. Finally, the chemical oxygen demand and the toxicity of treated solutions were evaluated. There was an increase in the COD and a decrease in the toxicity of the treated samples in 80%. The lethal dosage (LD<sub>50</sub>) of the extract was 80 ml·L<sup>-1</sup>.

Since the extract dosages used in the discoloration tests were under the  $LD_{50}$ , they were considered harmless.

Keywords: Cassava. Lectins. Hemagglutinating activity. Tannins. Discoloration.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Mandioca .....</b>	<b>19</b>
3.1.1.	Composição química da parte aérea da mandioca .....	20
<b>3.2</b>	<b>Lectinas.....</b>	<b>22</b>
3.2.1.	Presença de lectinas na parte aérea da mandioca .....	24
3.2.2.	Extração das lectinas.....	25
3.2.3.	Purificação parcial das lectinas .....	26
3.2.4.	Proteínas como princípio ativo em tratamento de águas.....	28
<b>3.3</b>	<b>Taninos.....</b>	<b>29</b>
3.3.1.	Taninos condensáveis .....	30
3.3.2.	Taninos hidrolisáveis .....	32
3.3.3.	Presença de taninos na parte aérea da mandioca.....	33
3.3.4.	Extração de taninos .....	35
3.3.5.	Taninos como princípio ativo em tratamento de água .....	38
<b>3.4</b>	<b>Coagulação - floculação.....</b>	<b>39</b>
3.4.1.	Fatores que influenciam a coagulação-floculação .....	43
3.4.1.1.	pH .....	43
3.4.1.2.	Temperatura .....	44
3.4.1.3.	Concentração inicial do poluente.....	45
3.4.1.4.	Agitação.....	45

3.4.1.5. Dosagem do coagulante.....	46
3.4.1.6. Adição de alcalinizante.....	47
<b>3.5 Coagulantes naturais.....</b>	<b>47</b>
<b>3.6 Remoção de corantes.....</b>	<b>51</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
<b>4.1 Material.....</b>	<b>57</b>
4.1.1. Folhas e caule de Mandioca.....	57
4.1.2. Amostras de eritrócitos.....	58
4.1.3. Corantes.....	59
4.1.4. Outros materiais.....	60
<b>4.2 Metodologia.....</b>	<b>60</b>
4.2.1. Processamento primário.....	60
4.2.2. Processamento secundário.....	61
4.2.2.1. Extração.....	61
4.2.3. Processamento terciário.....	62
4.2.3.1. Fracionamento salino do extrato bruto de folhas.....	62
4.2.4. Caracterização.....	63
4.2.4.1. Umidade.....	63
4.2.4.2. Teor de proteína.....	63
4.2.4.3. Teor de taninos.....	64
4.2.4.4. Determinação do ponto de carga zero.....	64
4.2.4.5. Espectros FTIR.....	65
4.2.5. Atividade hemaglutinante.....	65
4.2.6. Testes de remoção de corantes.....	67
4.2.6.1. Ensaios de descoloração.....	67
4.2.6.2. Determinação da percentagem de remoção de cor.....	69
4.2.6.3. Determinação de DQO.....	69

4.2.6.4.	Testes de toxicidade.....	69
4.2.7.	Análise estatística dos dados.....	70
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>5.1</b>	<b>Umidade.....</b>	<b>71</b>
<b>5.2</b>	<b>Espectros FTIR .....</b>	<b>71</b>
<b>5.3</b>	<b>Teor de proteínas e taninos .....</b>	<b>75</b>
<b>5.4</b>	<b>Atividade hemaglutinante.....</b>	<b>77</b>
<b>5.5</b>	<b>Ensaio de descoloração .....</b>	<b>84</b>
5.5.1.	Azul de metileno (AM).....	86
5.5.2.	Azul Maxilon GRL 300% (AMG).....	93
5.5.3.	Verde de malaquita (VM).....	95
5.5.4.	Adição de alcalinizante .....	98
5.6	Determinação da DQO.....	101
5.7	Testes de toxicidade.....	102
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>105</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÕES.....</b>	<b>107</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O aproveitamento dos resíduos da produção agroindustrial e o tratamento de efluentes fazem parte da crescente preocupação ambiental global; a procura constante de processos sustentáveis é uma necessidade para a indústria atual.

A mandioca (*Manihot Esculenta* Crantz), planta originária da Amazônia brasileira [1], tem parte aérea composta por folhas, hastes e caule, que é geralmente considerada como rejeito [2]. Nesta porção da planta encontram-se componentes antinutricionais que limitam seu uso como suplemento alimentar [3]. Dentre estas substâncias estão as lectinas, glicoproteínas com capacidade de aglutinar estruturas complexas que tenham um número suficiente de sítios livres [4]. Adicionalmente encontram-se os taninos, componentes fenólicos secundários que desempenham diversos papéis no metabolismo das plantas [5]. Estes dois princípios ativos têm sido relacionados a aplicações que incluem fenômenos de aglomeração de partículas [6,7]. Estudos anteriores confirmam a presença tanto de lectinas quanto de taninos na parte aérea da mandioca [8,9].

A efetividade na extração de proteínas e compostos fenólicos a partir de tecidos vegetais é influenciada por vários fatores como o pH, a temperatura, o tempo e o tipo de agente extrator, dentre outros [10,11]. Estes fatores podem influenciar a intensidade do fenômeno de aglomeração associado aos princípios ativos mencionados. Portanto a otimização do processo de extração é importante para determinar as melhores condições de trabalho. Além disso, as condições de armazenamento dos extratos obtidos desempenham um papel importante na estabilidade [12].

No caso das lectinas, o extrato bruto ou purificado pode ser testado em aplicações de remoção de poluentes em águas residuais após detecção do fenômeno de aglomeração e determinação da afinidade da proteína para um determinado tipo de eritrócito [13]. Após detectada a atividade, o extrato bruto ou purificado pode ser testado em aplicações de remoção de poluentes em águas residuais [14]. De igual forma, os taninos podem ser utilizados como princípio ativo em tratamento de águas para remoção de diferentes tipos de poluentes [15] e, em alguns casos, submetendo-os a transformações físico-químicas visando melhoras na eficiência do tratamento [16].

A capacidade de aglomeração das lectinas e dos taninos tem incentivado pesquisas com utilização destes princípios ativos em



processos de coagulação-floculação, etapas normalmente incluídas no tratamento primário de águas residuais [17]. Nestes processos, o composto natural, mediante fenômenos de transporte na camada difusa, adsorção, formação de pontes, varredura e neutralização de cargas, desestabiliza as partículas coloidais e suspensas e as remove do efluente tratado [18].

O uso de coagulantes orgânicos naturais aparece como uma tecnologia sustentável no tratamento de águas residuais [12], tornando-se uma alternativa ao uso dos coagulantes comuns, tais como os sais de alumínio e ferro, associados a vários problemas ambientais [19]. É conhecido que os parâmetros de qualidade da água podem afetar significativamente o tratamento do efluente; além disso, variáveis do processo de coagulação como a dosagem de coagulante e o pH, entre outros, determinam a efetividade do composto usado no tratamento [20].

Dentre os poluentes mais problemáticos estão os corantes que, além da poluição intrínseca que geram, reduzem a penetração da luz em corpos d'água afetando a quantidade de oxigênio dissolvido e dificultando assim os processos fotossintéticos [21]. Por outro lado alguns corantes são tóxicos e mutagênicos, e outros, como os corantes básicos, têm o potencial de liberar compostos classificados como cancerígenos [22].

Diante deste contexto o presente estudo pretende avaliar, de forma preliminar, a capacidade de aglutinação dos extratos brutos obtidos da parte aérea da mandioca. Primeiramente é feita uma avaliação da atividade hemaglutinante em diversos tipos de eritrócitos, associada à otimização das condições de extração e armazenamento desses extratos que visam maximizar a atividade hemaglutinante. Depois os extratos são testados em ensaios de descoloração de soluções aquosas de corantes catiônicos, determinando também, as condições mais adequadas para a remoção da cor.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o fenômeno de aglutinação dos extratos aquosos e etanólicos obtidos da parte aérea da mandioca mediante ensaios de atividade hemaglutinante e testes de remoção de corantes catiônicos em soluções aquosas.

### **2.2 Objetivos específicos**

Têm-se como objetivos específicos:

- a. Estabelecer as condições ótimas de extração e armazenamento dos extratos brutos e parcialmente purificados, sob as quais sejam obtidas as maiores atividades hemaglutinantes.
- b. Avaliar a seletividade da proteína presente nas folhas de mandioca mediante testes de atividade hemaglutinante em diversos tipos de eritrócitos.
- c. Selecionar a matéria prima mais adequada (folhas ou caule) e o agente extrator que apresente melhor resultado (água ou etanol 70%) nos ensaios de descoloração.
- d. Determinar a eficiência máxima de remoção de cor de soluções aquosas de corantes catiônicos, usando os extratos como agentes coagulantes.
- e. Caracterizar os conteúdos de proteínas, compostos fenólicos e taninos nas farinhas de folhas e caule e relacionar os teores obtidos com os fenômenos de aglomeração.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Mandioca

A mandioca, (*Manihot Esculenta* Crantz) é uma planta perene e arbustiva pertencente à família Euphorbiaceae, originária da Amazônia brasileira, região tropical de America do Sul há mais de 500 anos e levada para Ásia e África nos séculos XVI a XVIII [1]. Apresenta uma fácil adaptação a solos pobres, alta resistência a pragas ou alterações biológicas, baixa demanda de nutrientes e, em geral, uma alta tolerância a condições climáticas extremas. Estas características facilitam sua difusão tornando-se uma boa opção para os agricultores. A mandioca constitui uma das principais fontes alimentícias em países em desenvolvimento, onde é cultivada em pequenas áreas com tecnologias de baixo nível [23,24]. Aproximadamente 70 milhões de pessoas obtêm mais que  $2100 \text{ J}\cdot\text{d}^{-1}$  de energia a partir da mandioca e mais de 500 milhões consomem quantidades maiores que  $420 \text{ J}\cdot\text{d}^{-1}$  a partir dos diferentes produtos obtidos desta planta [25].

Segundo a FAO [26] a produção brasileira de mandioca em 2009 foi de 24,4 milhões de toneladas, sendo o Brasil o segundo produtor mundial após a Nigéria. Além disso, o consumo per capita é um dos mais altos ( $10,8 \text{ kg}\cdot\text{hab}^{-1}\cdot\text{ano}^{-1}$ ) nas variedades mandioca, farinha e fécula [27]. A produção se concentra nos estados do Pará, Bahia e Paraná, responsáveis por 49% do total cultivado no Brasil. Toda a produção é restrita ao mercado interno, ficando longe de participar no mercado internacional, onde países asiáticos como Tailândia e Indonésia representam a maior percentagem de exportações [28]. Estes países têm processos de transformação físico-química de alta tecnologia e centros de pesquisa onde desenvolvem novos produtos a partir da mandioca.

O principal aproveitamento industrial da mandioca é o uso dos tubérculos, parte subterrânea da planta, como alimento. São encontrados dois tipos de mandioca: a mansa e a brava, esta última com concentrações de linamarina acima de  $50 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de tubérculo. A linamarina é um glicosídeo pertencente ao mecanismo de defesa na planta que se transforma em ácido cianídrico no corpo humano, gerando alterações no sistema digestivo quando há consumo [29]. Normalmente este tipo de mandioca é utilizado na fabricação da farinha industrial. A

mandioca de mesa é consumida cozida ou frita na forma de diversos tipos de alimentos [30].

A parte aérea da planta é tratada como subproduto, e um dos usos refere-se ao das folhas como suplemento alimentar humano ou como ração animal devido ao teor protéico. No entanto, na maioria dos casos, é descartada gerando uma quantidade considerável de rejeitos [2]. No nordeste brasileiro as folhas de mandioca fazem parte da chamada multimistura, a qual é fornecida na merenda escolar e na cesta básica para famílias carentes [10].

### 3.1.1. Composição química da parte aérea da mandioca

A parte aérea da mandioca inclui as folhas, as hastes e o caule da planta (Figura 1). Anualmente são produzidas  $2,5 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$  de folha de mandioca e cerca de 180 mil toneladas são desperdiçadas anualmente [31]. Existe, portanto, uma clara necessidade de aproveitamento desta porção da planta visando a diminuição do resíduo gerado.



**Figura 1:** Parte aérea da mandioca (folhas e caule)

Partindo de um total de 1,88 milhões de hectares cultivados no Brasil em 2010 [28], considerando um peso médio de 0,45 kg da parte aérea por planta (um terço do peso total) e uma densidade de plantio de  $20000 \text{ plantas}\cdot\text{ha}^{-1}$  [32], aproximadamente 17 milhões de toneladas são produzidas sem utilização prática. Comparando a quantidade de folhas

desperdiçadas anualmente e as toneladas geradas pela perda da parte aérea, o caule da planta representa a maior parte dos resíduos gerados.

Atualmente, os estudos de composição química focam a determinação qualitativa e quantitativa dos componentes nutricionais e antinutricionais, visando a um melhor aproveitamento da parte área da mandioca como alimento. A maioria das caracterizações é feita nas folhas devido ao maior teor de proteína das mesmas, o qual é comparado ao conteúdo protéico encontrado no caule e nas hastes [29]. A *Tabela 1* apresenta uma composição média de componentes nutricionais nas folhas de mandioca e a *Tabela 2* apresenta valores médios de alguns componentes antinutricionais.

**Tabela 1.** Teor médio de componentes nutricionais em farinha de folhas de mandioca de 12 meses de idade, cultivar Ouro do Vale

Constituinte	Valor <sup>1</sup>
Umidade (%)	9,2
Proteína (g·100g <sup>-1</sup> )	29,2
Vitamina C (mg·100g <sup>-1</sup> )	64,1
Fibra (g·100g <sup>-1</sup> )	24,1
β-caroteno (mg·100g <sup>-1</sup> )	124,2

<sup>1</sup>Valores de proteína, vitamina C, fibra e β-caroteno são apresentados em base seca. Fonte: [33]

**Tabela 2.** Teor médio de componentes antinutricionais em folhas de mandioca de 12 meses de idade, cultivar Ouro do Vale

Constituinte	Valor <sup>1</sup>	Unidade
Polifenóis	61,5	mg·g <sup>-1</sup>
Cianeto	11,29	mg·100g <sup>-1</sup>
Oxalatos	2,48	g·100g <sup>-1</sup>
Saponinas	1,74	g·100g <sup>-1</sup>

Fonte: [3]

<sup>1</sup>Valores em base seca

Os teores dos componentes acima estão relacionados com a idade da planta, o grau de enfolhamento e o cultivar da planta. Para cada composto considerado como antinutricional ou tóxico existe uma idade de planta onde a concentração será maior ou menor [32]. Junto com o alto conteúdo protéico e de vitaminas, as folhas de mandioca apresentam níveis aceitáveis de minerais como cálcio, ferro e zinco [33,34].

Dentro dos componentes antinutricionais encontram-se os polifenóis (que incluem os taninos), substâncias com hidroxilas ligadas

a anéis aromáticos, que reduzem a digestibilidade e disponibilidade de aminoácidos como a lisina prejudicando o aproveitamento protéico [9].

Além das substâncias apresentadas na Tabela 2, as folhas de mandioca contêm glicoproteínas chamadas de hemaglutininas ou lectinas as quais têm a capacidade de se ligar a carboidratos. Estas proteínas podem gerar inconvenientes na utilização de nutrientes ou gerar interferências na absorção dos mesmos por parte do corpo humano [35].

Existe pouca informação sobre a composição química do caule. Regularmente ele apresenta alto conteúdo de fibras e pouca umidade, comparado com as folhas [36]. O teor de proteína é da ordem de 5-6% [30], percentagem muito menor à apresentada pelas folhas (Tabela 1). Devido a esta diferença, o caule não é usado em suplementos alimentares. Além disso, a dificuldade em triturá-lo [30] é outra desvantagem para seu uso como alimento. Embora sejam encontradas principalmente em sementes, a presença das hemaglutininas tem sido comprovada em outros tecidos vegetativos como o caule [6,37]. Não existem estudos sobre o conteúdo de polifenóis no caule da mandioca.

Embora existam substâncias prejudiciais para o uso do caule e das folhas como alimento, estes compostos podem ser aproveitados em outras aplicações industriais [12,14]. No caso específico deste estudo, a pesquisa é dirigida à avaliação da capacidade coagulante ou aglutinante das hemaglutininas e dos polifenóis presentes em extratos brutos obtidos do caule e das folhas de mandioca.

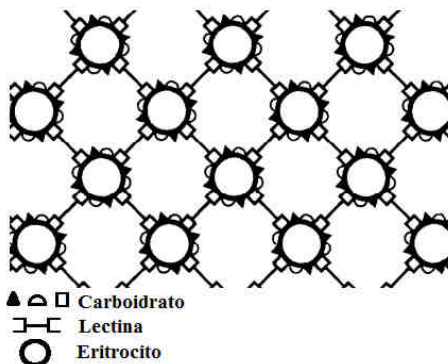
### **3.2 Lectinas**

As lectinas são glicoproteínas com capacidade de aglutinar eritrócitos e de precipitar polissacarídeos ou carboidratos com estruturas complexas [4]. As lectinas respondem por 2 a 15% do conteúdo total de proteínas nos vegetais [38]; suas funções nas plantas incluem a interação e transporte de carboidratos e, também, a participação em mecanismos de defesa contra microrganismos patogênicos e insetos [6]. As lectinas são majoritariamente encontradas nas sementes das plantas [14], mas também nas folhas, caules ou raízes, sendo que em cada um deles apresentam diferentes estruturas e grau de especificidade [39].

As lectinas comumente apresentam seletividade em sua interação com açúcares formando ligações com moléculas específicas. Por exemplo, em experimentos de caracterização da aglutinação é comum

observar diferenças de hemaglutinação entre eritrócitos distintos, os quais possuem carboidratos superficiais presentes nas células sanguíneas, e mesmo entre lectinas diferentes presentes em plantas da mesma família [38]. Esse processo de aglutinação é de caráter reversível, mantendo inalterada a estrutura do carboidrato ao qual se liga a lectina [40].

O mecanismo de ação das lectinas sobre os açúcares tem sido amplamente estudado: a interação ocorre nos domínios não catalíticos das proteínas onde se forma a ligação reversível com o carboidrato; esta ligação é feita por forças de Van der Waals ou por pontes de hidrogênio. Comumente as lectinas apresentam dois ou mais sítios de ligação o que permite a formação de ligações cruzadas que podem precipitar o composto ligado [37]. A Figura 2 mostra as interações entre uma lectina com dois domínios de ligação e os eritrócitos.



**Figura 2.** Representação esquemática do fenômeno de aglutinação por parte das lectinas [41]

Dependendo da estrutura, a forma em que ocorre a aglutinação e a capacidade de precipitar moléculas, as lectinas são classificadas em [6]:

- Merolectinas: Possuem um sítio de ligação para carboidratos. Devido à sua natureza monovalente são incapazes de precipitar glicoconjugados; um exemplo é a proteína que se liga à quitina do látex da seringueira (*Hevea Brasiliensis*).
- Hololectinas: Contêm pelo menos dois sítios de ligação para carboidratos, idênticos ou similares. Devido à sua natureza divalente aglutinam e precipitam os glicoconjugados.

- Quimerolectinas: Possuem um ou mais sítios de ligação para carboidratos e outro sítio com atividade catalítica (ou outra atividade biológica) que funciona independentemente daquele de ligação para carboidratos. Dependendo do número de sítios, agem como merolectinas ou hololectinas.
- Superlectinas: Possuem pelo menos dois sítios de ligação para carboidratos diferentes.

A interação com os carboidratos explica o efeito tóxico das lectinas, pois ao serem ingeridas e passar pelo trato digestivo sem se degradar, elas podem se ligar aos carboidratos presentes nas células intestinais [41]. Assim, elas podem interferir na absorção e aproveitamento dos nutrientes, ocasionando deterioração em alguns órgãos, e em geral afetando o metabolismo corpóreo [42].

Aproveitando suas características estruturais, as lectinas são utilizadas em aplicações terapêuticas como agentes antitumorais na detecção e tratamento de câncer [43], no desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico em histologia [37], como biosensores [44] e em geral no isolamento de biomoléculas tais como polissacarídeos [40] e enzimas [45].

A afinidade das lectinas por compostos orgânicos permite propor a idéia de remover substâncias específicas em efluentes líquidos. O estudo de afinidade da lectina obtida da *Moringa Oleifera* com compostos húmicos para a remoção dos mesmos em águas superficiais, é um exemplo deste tipo de aplicações [6].

### **3.2.1. Presença de lectinas na parte aérea da mandioca**

A presença de lectinas nos tecidos vegetais é determinada mediante a avaliação da atividade hemaglutinante (AH), a qual é definida como a mínima quantidade de proteína por unidade de volume necessária para aglutinar os eritrócitos presentes em uma amostra previamente processada, avaliando diluições seriais em base 2.

Estudos prévios indicam a presença de hemaglutininas em concentrados de folhas de mandioca de vários cultivares. A intensidade da atividade é inversamente proporcional à idade da planta, encontrando os valores mais altos de AH aos 12 meses de idade. Em plantas com 15 e 17 meses o fenômeno de aglutinação é menor ou inexistente. As



máximas atividades hemaglutinantes têm sido detectadas até a primeira [3] e segunda diluição [8,13].

No caso do caule não existem estudos prévios sobre a possível presença de hemaglutininas. No entanto, de acordo com análises anteriores, a percentagem de proteína diminui nas farinhas que incluem tanto folhas como caule da planta [46]; Portanto se espera uma diminuição na AH nos extratos obtidos do caule. Além disso, fatores como a variedade do cultivar, a fertilidade do solo e a disponibilidade de água podem afetar a percentagem de proteína presente na parte aérea da mandioca [47].

### **3.2.2. Extração das lectinas**

Após etapas prévias de secagem e acondicionamento, o processo de extração comumente inclui a obtenção de extratos brutos, muitas vezes aquosos ou utilizando soluções salinas ou tampões [6,48]. O agente extrator e a proporção sólido:líquido são fatores que influenciam de forma significativa na quantidade de proteína extraída. Pereira et al. [13] concluíram que utilizando água destilada em proporções 1:20 (g de folhas de mandioca:ml de água<sup>-1</sup>) obtêm-se melhores rendimentos que em extrações feitas com soluções salinas tamponadas ou em outras proporções. Antov et al. [49] encontraram teores de proteínas maiores em extrações salinas que em extrações aquosas trabalhando com sementes de feijão. Além destes fatores, existem outras variáveis que influenciam o rendimento na extração protéica, tais como o pH, a temperatura, o tempo de extração e a velocidade de agitação.

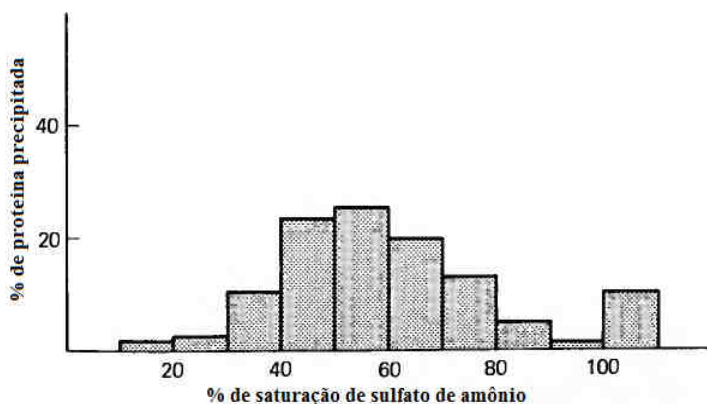
Valores de pH perto de 7 requerem uma concentração menor de proteína para causar hemaglutinação; pHs básicos diminuem em aproximadamente 50% a AH enquanto pH menores a 4 muitas vezes inibem a atividade hemaglutinante [50].

Incrementos na temperatura causam diminuições na AH, sendo este decréscimo dependente em grande parte do peso molecular da lectina: pesos moleculares baixos ajudam a manter a estabilidade e a intensidade da AH [50]. Em alguns casos o aumento de temperatura (acima de 40°C) ocasiona uma perda parcial da AH, chegando a uma perda total a temperaturas de 90°C possivelmente devido a processos de desnaturação das proteínas [39]. Portanto é importante estabelecer uma temperatura adequada na extração com condições de operação viáveis e otimização do consumo energético.

O tempo de extração e a velocidade de agitação ajudam a incrementar e melhorar o contato entre o solvente e o sólido [13,51]. Embora estas condições não sejam comumente otimizadas e sejam estabelecidas como parâmetros, podem influenciar na AH final do extrato [10].

### 3.2.3. Purificação parcial das lectinas

A precipitação isoeletrica das lectinas, e em geral das proteínas, é influenciada pela solubilidade, a qual pode variar desde praticamente insolúveis ( $<10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) até muito solúveis ( $>300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Fatores críticos que afetam a solubilidade de uma proteína são o pH, a força iônica, a natureza dos íons, a temperatura e a polaridade do solvente. As proteínas são geralmente menos solúveis no seu ponto isoeletrico onde a repulsão das cargas é menor. O fracionamento das proteínas é comumente feito mediante a adição de sulfato de amônio, pois este proporciona um meio estabilizante para as proteínas [52], além de apresentar custo relativamente baixo, puro e altamente solúvel [53].



**Figura 3.** Precipitação de proteína com sulfato de amônio a partir de extratos brutos. Adaptada de [54]

É comum a referência à concentração de sulfato de amônio como a percentagem de saturação. Em geral, a solubilidade de uma proteína diminui em um fator de 10 com aumento de 6% na quantidade de sulfato

de amônio [54]. A Figura 3 ilustra a influência da quantidade de sal na quantidade de proteína precipitada de um extrato.

O fracionamento influi na pureza e na quantidade de proteína obtida. Quando o objetivo é obter uma maior quantidade possível de proteína, deve-se sacrificar a obtenção de uma proteína altamente pura por uma maior eficiência na recuperação. Opostamente, se o fracionamento é a primeira etapa para a obtenção de uma matéria prima, a pureza deve prevalecer sob a quantidade precipitada [54]. É comum a utilização de fracionamentos sucessivos objetivando o aumento da percentagem de saturação com o objetivo de incrementar a pureza da proteína [13].

Posteriormente, e dependendo do objetivo final do uso da proteína, existem diversos métodos de purificação como cromatografia de troca iônica [55] e filtração em gel [56] cujo fundamento se baseia na variação da carga, no tamanho e na forma das moléculas [53]. Um exemplo hipotético do grau de purificação é mostrado na Tabela 3; nela a coluna de atividade específica se refere ao aumento de uma propriedade, neste caso a AH, tomando como base a atividade do extrato bruto.

**Tabela 3.** Resumo de uma purificação protéica hipotética

<b>Fracionamento</b>	<b>Proteína (mg)</b>	<b>Atividade total (%)</b>	<b>Atividade específica</b>	<b>Rendimento etapa (%)</b>	<b>Rendimento total (%)</b>
Extrato bruto	12000	100	1	75	100
Precipitação com sulfato de amônio (45-50%)	1800	75	5	80	75
Cromatografia de troca iônica	240	60	30	75	60
Filtração gel	36	45	150	-	45
Standard puro	-	-	150	-	-

Fonte: [53]

Os fracionamentos salinos com sulfato de amônio são seguidos por operações exaustivas de diálise com o objetivo de retirar os sais. Nesta etapa, a escolha apropriada da membrana de diálise influi diretamente na eficiência do processo [57]. Uma membrana com um limite de exclusão muito grande pode ocasionar perda de proteínas com baixo peso molecular afetando o rendimento [10]. Assim uma informação prévia do peso molecular da proteína estudada é importante.

Alguns trabalhos encontrados na literatura apresentam estudos experimentais com folhas de mandioca moídas. Silva [10] obteve uma recuperação protéica de 58% com precipitação em extrato aquoso com sulfato de amônio a 80% da saturação, com conseqüente aumento da AH em 30%. Por outro lado, Pereira [58] trabalhou com precipitações em diferentes percentagens de saturação, obtendo o melhor rendimento de proteína em 50% de saturação e a maior AH com percentagens de saturação de 25 e 50%; a valores maiores que 80% não foi detectada atividade.

No presente estudo, a precipitação com sulfato de amônio, servirá para avaliar a efetividade do fenômeno de coagulação do extrato bruto, comparando a AH antes e depois do fracionamento.

### **3.2.4. Proteínas como princípio ativo em tratamento de águas**

Após a detecção de lectinas em um tecido vegetal e da avaliação de sua AH, pode-se estudar seu comportamento como molécula coagulante, seja no extrato bruto ou utilizando a proteína parcial ou totalmente purificada. A propriedade coagulante destas moléculas pode ser explicada pelo modelo de formação de pontes: a coagulação de partículas carregadas negativamente é o resultado de sua ligação com partículas carregadas positivamente e a posterior neutralização da carga superficial [59]. Fenômenos de adsorção posterior à neutralização, também têm sido propostos como parte do processo de aglomeração de partículas [60]. No caso da *Moringa Oleifera* existe um debate sob a composição do agente ativo que ocasiona a coagulação. Alguns estudos concluem que este se deve à presença de uma proteína catiônica (lectina) [61]; outros afirmam que o princípio ativo é um polieletrólito de peso molecular baixo diferente de uma proteína ou um polissacarídeo [62].

Diversos estudos têm sido conduzidos para avaliar a capacidade coagulante das lectinas vegetais como princípios ativos: extratos aquosos de sementes de *Moringa Oleifera* [61,63] e extratos salinos de sementes de feijão [48,49]. Santos et al. [14] testaram a lectina presente em sementes, caule e folhas de *Moringa Oleifera*, achando um desempenho aceitável na remoção da turbidez em efluentes simulados em laboratório..

Pesquisas feitas sobre a atividade coagulante dos compostos protéicos em águas residuais sugerem que a aplicação do produto, logo

depois de uma purificação adequada pode ter resultados satisfatórios [48,64]. No entanto, estudos comparativos de extratos brutos e lectinas isoladas indicam a possibilidade de utilizar o extrato com uma eficiência similar à do composto purificado [14], e a utilização do extrato bruto se torna uma alternativa mais econômica eliminando custos de processamento.

### **3.3 Taninos**

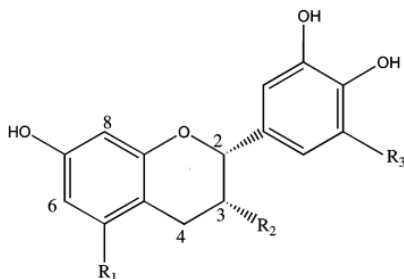
Os taninos são componentes fenólicos secundários das plantas distribuídos amplamente no reino vegetal [5]. Estas substâncias não têm funções no metabolismo primário das mesmas, mas desempenham diversos papéis na proteção das plantas, como por exemplo, ataque por doenças e animais herbívoros, agindo até como hormônios tóxicos, inibindo a digestão das proteínas. Os taninos têm uma grande variedade de pesos moleculares e complexidade em sua estrutura. Sua composição química está baseada na presença de compostos aromáticos policíclicos que lhes conferem a capacidade de ligação a diversos tipos de moléculas [7]. Seus múltiplos grupos hidroxifenólicos favorecem a formação de complexos primários com polissacarídeos, metais, aminoácidos, proteínas e outros compostos [65].

Quantidades importantes de taninos estão presentes em qualquer parte da planta. A concentração dos taninos muda de uma planta para outra; de uma forma geral a percentagem varia em um intervalo de 1-5% [66]. A quantidade de taninos é dependente da taxa metabólica na síntese de compostos fenólicos e grau de polimerização dos polifenóis, chegando a percentagens maiores quando há formação de componentes de alto peso molecular, como ocorre nas sementes [67]. Os taninos podem ser classificados em dois grupos: proantocianidinas (condensados) e os poliésteres dos ácidos gálico e hexahidroxidifênico (hidrolisáveis, galo e elagitatinos respectivamente) [68]. Os taninos condensados estão presentes principalmente nos talos, folhas e caule das plantas, enquanto os taninos hidrolisáveis são comumente achados em folhas de plantas e arbustos de zonas tropicais [5,69].

### 3.3.1. Taninos condensados

Comumente chamados de proantocianidinas ou poliflavonoides, os taninos condensáveis são comuns em algumas plantas [5]: a unidade estrutural fundamental deste grupo é o fenólico flavan-3-ol (catequina). Os taninos condensados existem como complexos de oligômeros (solúveis em água) e polímeros (insolúveis em água) de unidades flavonóides ligados por ligações carbono-carbono [5,66]. São resistentes à hidrólise, mas, dependendo de sua estrutura, podem ser solúveis em solventes aquosos [70].

A análise dos taninos condensados é complexa devido à diversidade de estruturas presentes neste grupo de compostos. De forma resumida, a Figura 4 representa a estrutura básica da unidade repetitiva, onde os radicais  $R_1$ ,  $R_2$ , e  $R_3$  podem ser grupos OH que podem estar esterificados, ou podem ser grupos H. As diferentes combinações destes três radicais determinam a reatividade do tanino. A presença de unidades OH nos anéis pode aumentar a capacidade de ligação com moléculas tipo proteínas [71].



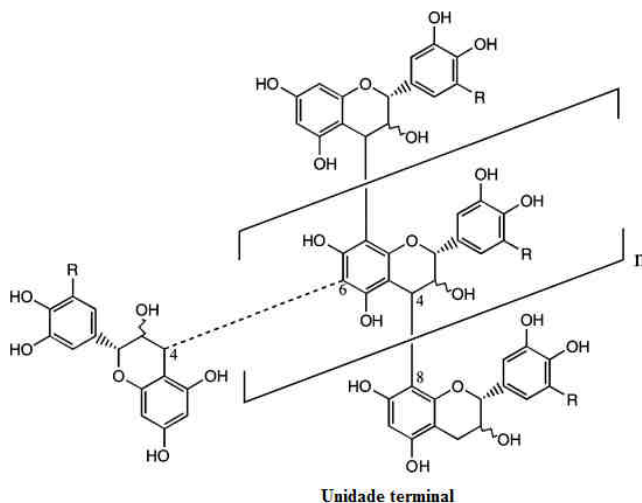
**Figura 4.** Unidade básica repetitiva presente nos taninos condensados.  
Adaptada de [71]

O processo de polimerização para formar a estrutura do tanino condensável inclui uma ligação oxidante entre os monômeros flavonóides (Figura 4) nas posições 4, 6 e 8. O número de unidades flavonóides no polímero final está na faixa de 2-17. Polímeros com graus de polimerização mais altos são insolúveis. A Figura 5 mostra uma estrutura modelo de um tanino condensado indicando o ponto terminal do polímero [71].

As interações dos taninos condensados são baseadas em pontes de hidrogênio e ligações hidrofóbicas. É geralmente aceito que estas

interações são fortemente influenciadas pelo pH; a formação de complexos é favorecida em pHs maiores a 3,5; abaixo deste valor normalmente estes complexos se dissociam [5].

Existem diversas técnicas para a análise de taninos e fenóis totais em plantas, como o teste butanol-ácido e o método de Folin-Ciocalteu, cada um deles com suas vantagens e desvantagens. Dependendo da estrutura molecular, cada componente fenólico produz uma intensidade diferente na cor por unidade de massa e, desta forma, os resultados obtidos por métodos colorimétricos são usados para comparações semiquantitativas [72]. O método geralmente aceito para a determinação de taninos condensados é a determinação colorimétrica pelo teste Butanol-HCl, baseado em uma despolimerização oxidativa que gera uma coloração vermelha característica das moléculas flavonóides, constituintes estruturais dos taninos. Este procedimento tem limitações e considerações que devem ser levadas em conta no momento da análise [71].

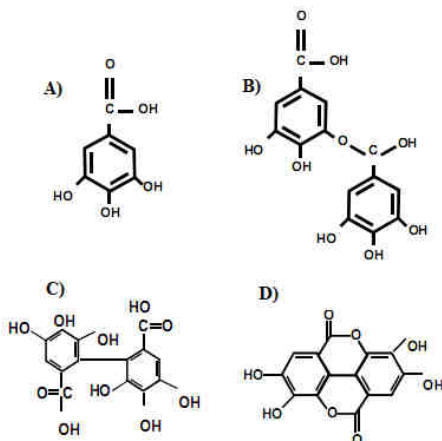


**Figura 5.** Modelo estrutural dos taninos condensados. Adaptada de [71]

### 3.3.2. Taninos hidrolisáveis

Os taninos hidrolisáveis estão presentes em folhas, caule, hastes, casca, sementes e frutos. Algumas espécies podem sintetizar tanto elagitaninos como galotaninos e ainda existem plantas que produzem taninos hidrolisáveis e condensados ou complexos com características das duas classes [72]. Contrariamente aos taninos condensados, os taninos hidrolisáveis são facilmente degradáveis [73].

Os taninos hidrolisáveis são constituídos de misturas de fenóis simples, como o ácido elágico, e de ésteres do ácido gálico com açúcares, como a glicose [70]. Suas ligações ester-carboxila fazem que sejam rapidamente hidrolisados tanto em condições básicas como ácidas [74]. A unidade básica estrutural é o poliol pentagalossilglicose (PGG) formado pela esterificação da glicose pelos ácidos gálico e digálico (galotaninos) ou pelo ácido hexadihidroxifênico ou elágico (elagitaninos) [70]. A estrutura molecular dos ácidos mencionados é mostrada na Figura 6.

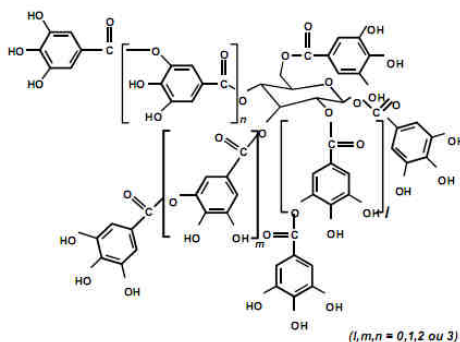


**Figura 6.** Estruturas moleculares dos ácidos gálico (A), digálico (B), hexadihidroxifênico (C) e elágico (D). Adaptado de [70]

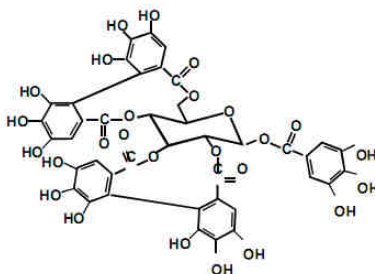
O mais comum dos galotaninos é o ácido tânico (Figura 7), composto geralmente por um núcleo de 6 a 9 unidades de ácido gálico [70]. Moléculas simples de galotaninos são difíceis de achar na natureza, mas tendem a ser as unidades constitutivas dos ácidos tânicos comercialmente disponíveis [72]. A Figura 8 mostra a estrutura



molecular de um elagitanino onde os grupos fenólicos são moléculas dos ácidos hexahidroxi-difenico e elágico.



**Figura 7.** Estrutura química de um galotanino (ácido tânico) [70]



**Figura 8.** Estrutura química de um elagitanino [70]

### 3.3.3. Presença de taninos na parte aérea da mandioca

É conhecida a presença de polifenóis nas folhas de mandioca, especialmente de taninos condensados [34]. Esta presença limita o uso da parte aérea da mandioca como alimento devido à diminuição da digestibilidade pela interação dos taninos no sistema digestivo [75]. Marie Magdeleine et al. [76] apresentam um perfil fitoquímico característico de folhas de mandioca (Tabela 4), indicando a presença de taninos condensados que compõem grande percentagem do total de polifenóis. Taninos hidrolisáveis não foram detectados.

**Tabela 4:** Perfil fitoquímico das folhas de mandioca

<b>Componente</b>	<b>Presença e intensidade</b>
Fenóis	+
Taninos	++++
Taninos hidrolisáveis	--
Taninos condensados	++++
Flavonóides	+++
Antocianinas	--
Proantocianidinas	++++
Quinonas	--
Esteróis	++
Alcalóides	--
Coumarinas	--
Antracenos	--

Fonte: Adaptado de [76]

Estudos feitos mediante o teste de Vanilina confirmam a presença de taninos condensados em extratos metanólicos e aquosos de folhas de mandioca, em percentagens de 10,0 e 25,0 % respectivamente. Análises por HPLC indicam a presença de unidades de flavan-3-ol e proantocianidinas, estruturas próprias dos taninos condensados. Embora os extratos aquosos tenham mais eficiência, os extratos metanólicos apresentam compostos específicos que não são extraídos com água [76,77].

Melo et al. [34] e Fasuyi e Aletor [2] acharam percentagens de fenólicos totais em farinha de folhas de mandioca de 47,2 e 97,0 mg·g<sup>-1</sup> em base seca utilizando etanol (50%) e acetona (70%) respectivamente. Do total de polifenóis existem certa quantidade de taninos; concentrações na faixa de 30-50 mg·g<sup>-1</sup> em base seca são consideradas como típicas em folhas de mandioca; contudo, há uma variação nas quantidades achadas em diferentes pesquisas. Enquanto Awoyinka et al. [78] acharam 29,7 mg·g<sup>-1</sup> numa variedade da Nigéria e Dung et al. [79] reportaram concentrações de 23 mg·g<sup>-1</sup>, outros estudos detectaram quantidades muito mais baixas. Wanapat et al. [80] encontraram valores de 2,6 mg·g<sup>-1</sup> e Mondolot et al. [77] acharam uma concentração de 1,83 mg·g<sup>-1</sup> expressa em equivalentes de catequina. A diversidade dos métodos usados na extração e na determinação dos taninos podem ser causas destas variações [77]. Com o objetivo de aumentar a

digestibilidade da farinha de folhas de mandioca, Correa [9] testou diferentes solventes na remoção dos polifenóis; a Tabela 5 mostra as percentagens obtidas para os diferentes solventes testados.

**Tabela 5:** Teores de polifenóis em folhas de mandioca antes e após extração

Solvente	Polifenóis		Remoção (%)
	(mg ácido tânico:g de matéria seca)		
	Antes	Após	
Água	63,8	22,4	64,9
Etanol (50%)	63,8	10,6	83,3
NH <sub>4</sub> OH	63,8	3,7	94,2

Fonte: Adaptado de [9]

Anteriormente foi enunciado que a idade da planta influencia a presença de lectinas nas folhas; no caso dos polifenóis e, portanto, dos taninos, a percentagem diminui com a longevidade da árvore. Wobeto et al. [3] determinaram teores de polifenóis em um intervalo de 70-106 mg·g<sup>-1</sup> em folhas coletadas aos 17 meses, enquanto que em folhas coletadas aos 12 meses os teores estiveram entre 43 e 62 mg·g<sup>-1</sup>. Em um estudo similar, Teo et al. [81] acharam concentrações de taninos de 60 e 120 mg·g<sup>-1</sup> para folhas colhidas aos 6 e 12 meses respectivamente.

Existem estudos sobre a presença de polifenóis em misturas de folhas, caule e hastes de mandioca. Thang et al. [82] e Wanapat et al. [83] determinaram teores de 12,0 e 40,0 mg·g<sup>-1</sup> em base seca para misturas de plantas coletadas aos três meses de plantio. Nestes estudos não existem dados da proporção de caule usada nas misturas. Dung et al. [79] reportaram conteúdos de taninos condensados da ordem de 20-30 mg·g<sup>-1</sup> em misturas contendo uma pequena parte de caule e hastes moídos. Hue et al. [84] acharam que a percentagem de taninos em misturas de folhas e caule moídas frescas é maior que a encontrada em mistura armazenadas por longos períodos.

### 3.3.4. Extração de taninos

A extração dos taninos é influenciada pela natureza química, método utilizado, tamanho de partícula do sólido, condições de armazenamento e a presença de substâncias interferentes. Os taninos podem estar formando complexos com carboidratos, proteínas ou outros

compostos dificultando sua solubilidade e, por isto, etapas adicionais podem ser necessárias para garantir a total remoção [85]. Para isto, extrações em fase sólida são comumente usadas [86].

Em geral, existem processos simples de contacto sólido-solvente [65,87], modificações aplicando refluxo (método Soxhlet) [11] e procedimentos que procuram aumentar o contacto, como as microondas e o ultrassom [88].

Um dos fatores determinantes durante o processo de extração é a escolha do solvente. Correa et al. [9] acharam uma remoção eficaz com soluções salinas de hidróxido de amônio; Teo et al. [81] determinaram que a adição de sulfito de sódio em soluções aquosas aumenta a quantidade de taninos extraídos. No entanto, o uso destes sais pode gerar toxidez residual, além do custo ser elevado e o manuseio, cuidadoso.

A polaridade do solvente e a relação solvente-sólido são fatores que influenciam fortemente a escolha de agente extrator [11]. Misturas acetona-água e metanol-água têm alta eficiência na extração de taninos, especialmente os condensados [87,89]. Quando se objetiva aplicações ambientalmente amigáveis, estes solventes geram vapores, além de serem perigosos na sua manipulação e tóxicos. O etanol tem sido usado com sucesso [11,90] tornando-se uma alternativa facilmente acessível e de menor custo, podendo-se aproveitar sua volatilidade para a recuperação do solvente e concentração do extrato [81].

Chavan et al. [67] acharam os melhores rendimentos na extração de taninos condensados da *Lathyrus Maritimus L.A* usando soluções aquosas acidificadas de 70% de acetona. A Tabela 6 resume os resultados obtidos na extração de taninos da planta *Phyllanthus niruri Linn* comparando a eficiência atingida para cada solvente.

É comum o uso de extrações sucessivas para aumentar a quantidade de taninos extraídos. Naczki e Shahidi [86] indicam que depois de três extrações sucessivas o aumento no incremento de compostos fenólicos no extrato bruto torna-se imperceptível.

A secagem prévia das amostras a serem extraídas também influencia a percentagem de taninos extraída. Pode parecer que a liofilização seja o método mais adequado para preservar a amostra; porém, embora este processo mantenha a composição de polifenóis, há uma diminuição na capacidade de extrair os taninos; além disso, os custos energéticos associados a este processo são altos. A secagem com aumento de temperatura torna-se a melhor alternativa, no entanto, poucas quantidades de taninos são extraídas em amostras secas a altas temperaturas devido à alteração da estrutura molecular dos polifenóis. Assim, uma secagem à temperatura ambiente é preferida [87].

**Tabela 6.** Efeito dos solventes na extração de taninos

Solvente <sup>1</sup>	Índice Snyder de polaridade <sup>2</sup>	Ponto de ebulição (°C)	Taninos (mg·g <sup>-1</sup> de amostra <sup>-1</sup> ) <sup>3</sup>
Orgânico			
n-Hexano	0,1	69	18
Éter de petróleo	0,1	60	22
Diclorometano	3,4	40	40
Clorofórmio	4,1	61	97
Acetona	5,4	56	39
Etanol	5,2	78	116
Metanol	6,6	65	146
Acuoso <sup>4</sup>			
Acetona 70%	6,5	84	185
Etanol 70 %	8,2	90	208
Etanol 50%	7,9	94	225
Etanol 30 %	7,1	97	264
Etanol 20%	6,3	98	271
Água	9,0	100	262
Água (tratada com hexano)		100	235

Fonte: Adaptado de [11]

<sup>1</sup> Extratos obtidos pelo método Soxhlet, relação amostra-solvente 1g:25ml, temperatura: 25°C, tempo: 3 horas

<sup>2</sup> Um aumento no índice, indica uma maior polaridade.

<sup>3</sup> Taninos expressos em mg de ácido tânico.

<sup>4</sup> A percentagem indica a parte composta pelo solvente orgânico.

Alguns estudos indicam que longos tempos de extração favorecem a percentagem de taninos extraídos [11], enquanto outros afirmam que o rendimento é independente do tempo de exposição do sólido ao agente extrator [91] ou contrariamente, prolongadas extrações podem ocasionar a oxidação dos compostos. Períodos de extração desde 1 minuto até 72 horas têm sido relatados na literatura [86]. Dependendo do objetivo da extração, é comum a adição de compostos antioxidantes como o ácido ascórbico em concentrações da ordem de 0,01% [65,92].

A agitação durante a extração ajuda o aumento da eficiência na remoção, incrementando o contacto sólido-solvente [81]. Podem ser usadas agitação magnética, mecânica, homogenizadores, microondas ultrassom e equipamentos de sonicação [86,88].

A recuperação dos taninos também é afetada pela relação amostra:solvente. Relações comuns variam entre 1:5 e 1:20 (m:v).

Naczk e Shahidi [86] incrementaram a eficiência de extração de taninos da canola em 30% passando de 1:5 a 1:10 com acetona 70% [86].

Valores de pH comuns para extratos de folhas de mandioca (aquosos ou etanólicos) estão na ordem de 5-6 e em alguns casos, atingir valores de pH neutros dependendo isto, das características dos polifenóis solúveis no agente extrator. [9].

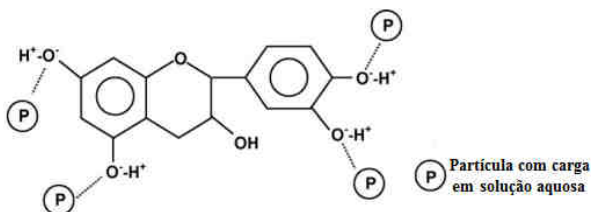
Nos processos posteriores, com objetivo de dar aplicabilidade aos extratos obtidos, caracterizá-los ou para recuperar os solventes usados, são conduzidas operações de evaporação-concentração aproveitando a diferença nos pontos de ebulição dos solventes [11,67,87,91].

### 3.3.5. Taninos como princípio ativo em tratamento de água

Geralmente, polieletrólitos sintéticos (catiônicos, aniônicos e não aniônicos) e polieletrólitos naturais, como a goma guar, amidos e proteínas, têm sido aplicados com sucesso como coagulantes em águas. Do mesmo modo, os taninos podem ser usados com este fim devido à presença de grupos carboxilas e hidroxilas em suas estruturas [93].

Existem vários produtos à base taninos comercializados como floculantes ou coagulantes. As espécies *Acácia mearnsii*, Castanha (tropicais), *Quercus ilex*, súber e robur (não tropicais) são exemplos de fontes de taninos aplicados em tratamento de águas [15].

As moléculas de taninos têm natureza aniônica devido à presença dos grupos fenólicos. A Figura 9 é uma representação esquemática da estrutura básica de um tanino em solução aquosa e as possíveis interações moleculares que conduzem à coagulação [94].



**Figura 9.** Representação da estrutura básica do tanino em solução aquosa e suas possíveis interações moleculares. Adaptado de [94]

A efetividade do tanino como princípio ativo é função dos sítios de ligação disponíveis na estrutura molecular e do grau de modificação

que possam sofrer nos processos de extração e purificação [19]. Na literatura existem processos de transformação físico-química de misturas de taninos baseados na reação de Mannich, muitos deles protegidos por patentes [95,96,97]. Esta reação, comumente conhecida como cationização, é definida como o procedimento químico que confere caráter catiônico à matriz orgânica de taninos mediante adição de sais de amônio quaternários. Essas modificações dão aos taninos uma natureza anfotérica devido à presença de grupos amino (catiônicos) nas unidades monoméricas e aos grupos fenólicos (aniônicos) do tanino [94].

A capacidade coagulante dos taninos aumenta ao desestabilizar colóides em solução, sem alterar as propriedades (solubilidade, estabilidade) do composto natural. A desestabilização e subsequente sedimentação provocam a remoção de uma grande variedade de compostos, principalmente corantes aniônicos e surfactantes [98].

O uso de extratos naturais sem processos exaustivos de purificação requer que os testes de descoloração sejam conduzidos com extratos que não sejam armazenados por longos períodos ou em condições que favoreçam a degradação, processos oxidativos ou desnaturação. Jeon et al. [12] utilizaram extratos polifenólicos de sementes de uva até, no máximo, 24 horas depois de serem extraídos e armazenados a 4°C.

### **3.4 Coagulação - floculação**

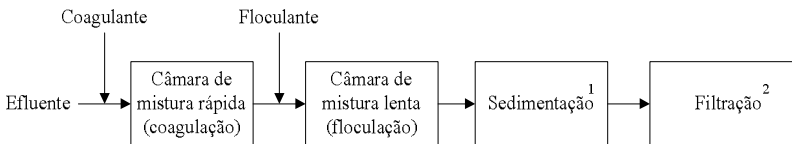
A água constitui um recurso essencial à vida do homem. Ela não se encontra em estado puro na natureza, e sua presença é acompanhada de substâncias em solução ou em suspensão que podem alterar suas características e gerar problemas à saúde, à economia ou ao meio ambiente. Além das substâncias que por natureza a compõem, a água tem substâncias do solo ou provenientes de diversas atividades agrícolas ou industriais. Portanto o tratamento de efluentes torna-se indispensável [6]. Um esquema geral no tratamento de águas residuais envolve três etapas principais:

- Um tratamento primário ou pré-tratamento utilizando métodos físicos, químicos e mecânicos.
- Um tratamento secundário ou etapa de purificação aplicando metodologias químicas ou biológicas.

- Tratamento dos lodos ou sub-resíduos formados.

Os processos de coagulação-floculação são frequentemente aplicados nas etapas primárias de tratamento de águas (em alguns casos são utilizados também em tratamentos secundários e terciários). A coagulação consiste em combinar partículas insolúveis ou matéria orgânica dissolvida em compostos agregados, facilitando sua remoção em etapas subseqüentes de sedimentação, flotação ou filtração. Usualmente este processo inicia com a dispersão de um agente coagulante que desestabiliza as partículas coloidais, promovendo a formação de microflocos. A agregação de vários microflocos, pela adição do agente floculantes, conduz à formação de aglomerados maiores permitindo separá-los facilmente por operações mecânicas [99].

O processo industrial se inicia com a adição do coagulante ao efluente numa câmara de mistura rápida com o objetivo de distribuir rapidamente o químico por toda a massa de água (coagulação). Posteriormente, o corpo de água é submetido à agitação lenta onde são formados flocos maiores (floculação). Dependendo do agente coagulante, o processo de floculação ocorre no instante da adição, ou então outro agente químico é requerido. Os dois processos (coagulação e floculação) são necessários para remover os poluentes [100]. Finalmente, o efluente é levado para tanques de sedimentação de lodos, os quais são levados a tratamentos terciários. A Figura 10 apresenta um esquema comum de coagulação-floculação; os tempos de retenção em cada etapa dependem do volume da unidade utilizada e da vazão do efluente.



**Figura 10.** Esquema tradicional do processo de coagulação-floculação em tratamento de águas. Adaptado de [17].

<sup>1</sup> Ou processos alternativos de remoção de sólidos sedimentados.

<sup>2</sup> Ou processos alternativos de sólidos suspensos.

Os colóides são estáveis em solução e, em geral, os fatores que os estabilizam prevalecem sobre os que os desestabilizam. Os fatores estabilizantes incluem forças repulsivas, como as eletrostáticas e a

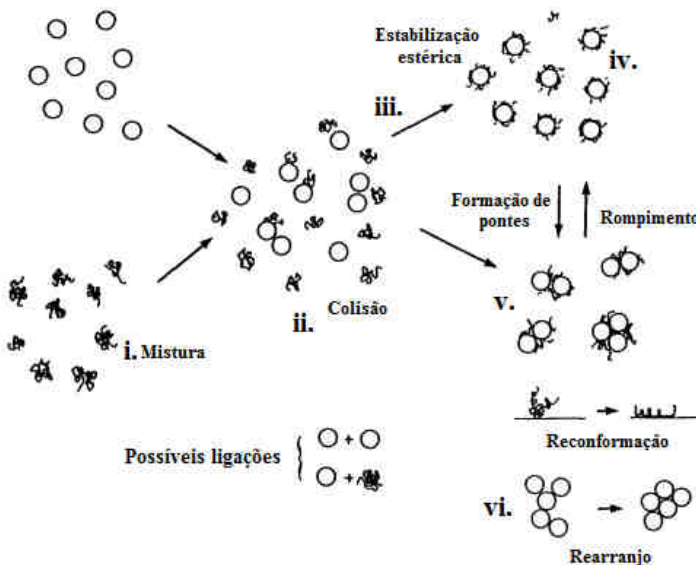


hidratação. Contrariamente, as forças de atração (como a gravidade, o movimento Browniano e as forças de Van der Waals) causam uma desestabilização. O princípio da coagulação-floculação pode ser explicado por diferentes mecanismos, os quais têm em comum a alteração de forças iônicas no meio. A literatura propõe quatro mecanismos de desestabilização:

- Compressão da camada difusa: Adição de íons com carga oposta aos colóides incrementando o total de íons na camada difusa a qual, para manter-se eletricamente neutra, reduz seu volume. Desta forma, as forças de Van der Waals acabam com a estabilidade eletrostática [18]. Neste mecanismo a quantidade de eletrólitos é independente da concentração do poluente; além disso, não há re-estabilização das partículas coloidais [22].
- Adsorção e formação de pontes: Fenômeno comum para compostos orgânicos; os sítios ionizáveis das longas cadeias moleculares se ligam com o poluente de acordo ao caráter do coagulante, podendo ser catiônico, aniônico ou anfótero.
- Adsorção e neutralização de cargas: Existe uma adsorção da molécula do coagulante na superfície da partícula coloidal para logo, por ter cargas opostas, desestabilizar os colóides. Este fenômeno inclui interações tipo covalentes, pontes de hidrogênio, troca iônica e reações de coordenação.
- Varredura: As partículas coloidais são envolvidas por precipitados formados. Este mecanismo é descrito em processos industriais onde são usados sais de alumínio e ferro, e os hidróxidos formados são aproveitados [22].

Os polímeros coagulantes são associados com mecanismos de adsorção, formação de pontes e neutralização de cargas, e constituem um ponto de partida para propor os mecanismos que prevalecem nos coagulantes naturais [94]. A Figura 11 apresenta de forma esquemática o processo de coagulação-floculação usando compostos orgânicos, onde há uma sucessão de processos elementares que ocorrem simultaneamente e de acordo as condições fluxo existente no meio (normalmente turbulento) [101]. As etapas propostas no diagrama são:

- i. Diluição do floculante em uma solução homogênea.
- ii. Colisão entre as partículas coloidais.
- iii. Transporte do composto orgânico adicionado até a superfície das partículas coloidais.
- iv. Reconformação do coagulante adsorvido na superfície das partículas coloidais.
- v. Formação de ligações (pontes) entre as partículas coloidais.
- vi. Rearranjo e rompimento da estrutura dos flocos formados.



**Figura 11.** Diagrama esquemático do processo de coagulação-floculação usando compostos orgânicos. Adaptado de [101]

Existem duas classes principais de materiais usados em processos de coagulação-floculação:

- Coagulantes orgânicos e inorgânicos incluindo aditivos minerais (lima, cálcio, sais, etc.), sais metálicos hidrolisados (sulfato de alumínio, cloreto férrico), metais prehidrolisados (policloreto de alumínio) e polieletrólitos [102].

- Floculantes orgânicos incluindo polieletrólitos catiônicos e aniônicos, polímeros não-iônicos, compostos anfóteros e coagulantes e floculantes naturais (taninos, proteínas, amidos, alginatos, etc.) [102].

### **3.4.1. Fatores que influenciam a coagulação-floculação**

É bem conhecido que os parâmetros de qualidade da água, como o pH, a concentração de matéria orgânica, a temperatura podem afetar significativamente o tratamento de um efluente. Além disso, variáveis como a dosagem do coagulante, o pH e a carga orgânica, entre outros, determinam a efetividade do composto usado no tratamento por coagulação [20].

O processo de coagulação pode resultar na formação de flocos pequenos e frágeis que podem ser quebrados por forças físicas. Por isto é importante dotar o processo de uma capacidade floculante adequada e sedimentação rápida dos flocos formados. Uma alternativa é o uso de coadjuvantes ou aditivos para facilitar as ligações e para aglomerar os flocos formados pelo coagulante. Os aditivos, muitos deles de caráter polimérico (natural ou sintético), são caracterizados pelo seu caráter iônico: catiônico, aniônico ou não-iônico. Estes compostos podem agir por mecanismos de formação de pontes ou por neutralização de cargas [99].

Uma breve descrição dos fatores que são comumente estudados na avaliação de qualquer tipo de coagulante é apresentada a seguir, enfatizando nos princípios ativos naturais e na forma como eles afetam ou influenciam a efetividade final da substância testada.

#### **3.4.1.1. pH**

O desempenho dos polieletrólitos nos processos de coagulação-floculação é principalmente governado pelo pH, o qual é afetado tanto pela carga dada pelo polieletrólito quando ele é adicionado, como pela solubilidade dos compostos [103]. Na adição de coagulantes inorgânicos, como os sais de alumínio e ferro, as mudanças no pH são fatores importantes para um tratamento efetivo. No caso dos coagulantes naturais, os intervalos de pH nos quais existe uma efetividade

considerável são maiores que os dos coagulantes inorgânicos, permitindo um processo mais flexível e sem variações abruptas dos parâmetros iniciais do processo. Quando se consideram coagulantes naturais, o efeito do pH é mais notável naqueles que contêm taninos como princípio ativo [63]. Quando o componente essencial do coagulante é um composto protéico, a força iônica gerada pela mudança do pH não afeta a conformação das proteínas, mantendo a atividade coagulante estável até valores de pH de 4 a 9; fora desses valores podem ocorrer fenômenos de desnaturação da proteína.

A adição do composto coagulante pode gerar mudanças no pH inicial de um efluente: o uso de sais inorgânicos gera um decréscimo mais acentuado que no caso de coagulantes naturais. Ndabigengesere et al. [61], partindo de efluentes sintéticos (água+caulim) com pH inicial de 7, chegaram a pHs de 4,2; porém, ao trabalhar com coagulante natural (extrato de sementes de *Moringa oleifera*), a diminuição chegou apenas a um pH final de 6,5.

A determinação do pH ótimo para coagulantes naturais pode ser difícil, ainda que estes compostos não afetem de forma significativa o pH do efluente. De fato, a literatura apresenta valores ótimos de pH tanto ácidos [104], quanto neutros [64] ou básicos [105].

### 3.4.1.2. Temperatura

Em geral, os extratos brutos obtidos de matérias primas naturais, submetidos a altas temperaturas, não diminuem sua atividade coagulante, ou seu efeito é muito menor que o efeito de variáveis como o pH, a dosagem do coagulante ou concentração inicial do poluente [105]. Santos et al. [14] encontraram uma estabilidade até 100°C de uma fração protéica purificada das sementes da *Moringa oleifera*. Normalmente as operações de coagulação-floculação são feitas a temperaturas abaixo de 40°C, garantindo a não degradação dos princípios ativos presentes no coagulante utilizado [15]. Beltran-Heredia et al. [63] concluíram que ao trabalhar em temperaturas até 40°C com extratos de *Moringa oleifera* na remoção de corantes, a percentagem de remoção de cor não sofre maiores alterações. Algumas pesquisas mostram proteínas com uma maior resistência, especialmente quando no estado purificado [14].

A temperatura de estudo é associada com as condições reais do efluente no processo ou no ambiente onde ele é coletado. Por exemplo,

no caso de águas superficiais, as flutuações climáticas fazem com que os estudos de coagulação sejam feitos a temperaturas entre 10 e 40°C [106]; este intervalo reúne uma grande percentagem dos efluentes industriais e domésticos.

### **3.4.1.3. Concentração inicial do poluente**

A concentração inicial do poluente afeta diretamente a dosagem requerida de coagulante, influenciando a percentagem final de remoção. Não existe um consenso comum com respeito à proporcionalidade do efeito desta variável. Têm sido reportadas maiores eficiências em concentrações de corantes baixas, onde a percentagem máxima de remoção é atingida de forma mais rápida que em efluentes com altas concentrações [107]. Outros autores indicam percentagens de remoção maiores quando a concentração do poluente é alta [104]. A causa desta diferença é explicada pela maior quantidade de moléculas disponíveis para a colisão com as cadeias moleculares dos coagulantes.

### **3.4.1.4. Agitação**

A coagulação-floculação inicia-se com a mistura rápida do efluente com o coagulante, o agente floculante ou os dois. A alta velocidade de agitação distribui o composto (sal inorgânico, polímero sintético ou natural) por toda a massa de água. Posteriormente, numa etapa lenta ocorre a formação dos flocos e a aglomeração das moléculas que permite a sedimentação do poluente para sua remoção posterior [108].

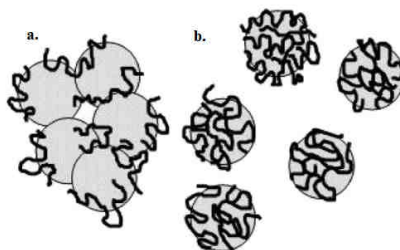
A otimização destas etapas depende do estabelecimento de uma velocidade de agitação, na etapa rápida, que produza um fluxo turbulento de modo a formar uma mistura homogênea das partículas, sem formação de flocos. Na mistura lenta o objetivo é favorecer as colisões de partículas e a formação de pontes, para assim ter uma formação progressiva de flocos [101]. A escolha errada dos tempos de agitação nas etapas rápida e lenta ocasiona problemas como a formação de flocos finos sem capacidade de sedimentação; opostamente, a otimização destes tempos pode trazer benefícios como diminuição na dosagem dos coagulantes; estas vantagens e desvantagens são mais

visíveis quando se trabalha com dosagens baixas de coagulante [99,106]. É conveniente garantir tempos iguais ou maiores àqueles considerados como ótimos; tempos insuficientes causarão decréscimos na remoção, com aproveitamento deficiente da capacidade do coagulante [17]. Tempos de agitação rápida entre 1 e 10 minutos e etapas lentas de 30 minutos são usadas comumente em testes de coagulação [22,62,64].

As velocidades de agitação na etapa de mistura rápida estão na ordem de 150-300 rpm. Na etapa lenta, valores comuns estão entre 30 e 60 rpm [12,61,107]. Não existem uma relação significativa entre as velocidades e tempos das duas etapas.

#### **3.4.1.5. Dosagem do coagulante**

A formação de pontes na coagulação-floculação depende da existência de sítios livres suficientes na molécula do poluente que permitam a adsorção das cadeias longas do coagulante orgânico. Uma superdosagem do coagulante pode ocasionar uma quantidade de ligações muito alta na superfície do poluente, de modo que a re-estabilização dos colóides seja favorecida, impedindo uma agregação e posterior formação de flocos (Figura 12) [102]. Esta dosagem excessiva pode também aumentar a turbidez da água devido à reversão da carga coloidal ocasionada pela grande quantidade de moléculas adsorvidas; além disso, no caso de coagulantes naturais, a proteína não ligada fica na solução, aumentando a carga orgânica do efluente [61]. Por outro lado, uma dosagem insuficiente não permite a formação das pontes e dificulta o contato poluente-coagulante. Estas considerações conduzem à idéia de uma dosagem ótima, que é encontrada em um valor menor à completa saturação da superfície por parte do coagulante; assim, propõe-se que a dosagem ótima é diretamente proporcional à área superficial das partículas do poluente [102].



**Figura 12.** Diagrama esquemático da a) formação de pontes e flocculação e b) Re-estabilização dos colóides [102].

### 3.4.1.6. Adição de alcalinizante

Para facilitar o processo de aglomeração de partículas que possam sedimentar deve-se garantir a alcalinidade do meio, seja pelas condições originais do efluente ou pela adição de auxiliares de coagulação que proporcionem um caráter básico ao meio. Compostos como o carbonato de sódio e os hidróxidos de sódio e cálcio são usados comumente nestes tratamentos [22]. A escolha do agente alcalinizante é governada primeiro por sua efetividade e segundo pelos custos. Além disso, é importante avaliar a possível presença de íons residuais (carbonatos principalmente) que possam gerar problemas de precipitação e incrustação em equipamentos na escala industrial [109].

## 3.5 Coagulantes naturais

Os sais de alumínio e ferro são os coagulantes mais comumente usados em água e tratamento de efluentes. No entanto, pesquisadores têm indicado sérios inconvenientes relacionados com o uso destes sais, como por exemplo a doença de Alzheimer, que está associada a quantidades residuais de alumínio na água tratada [19]. Além disso, a disposição dos lodos gerados no tratamento é difícil devido à grande quantidade de material inorgânico presente [49] e à reação de sais de alumínio com a alcalinidade natural da água e que leva à diminuição do pH [20]. Até hoje, vários coagulantes como os sais férricos e os policloreto têm sido sugeridos como alternativas aos sais de alumínio

[102]. Embora estes materiais se desenvolvam adequadamente na coagulação, conseqüências positivas na saúde e no meio ambiente não estão garantidas.

Outro tipo de coagulante usado são os polímeros sintéticos, os quais podem ter caráter catiônico ou aniônico. Um dos problemas apresentados no uso destes compostos é a presença de monômeros tóxicos nos lodos formados, e que estão relacionados com problemas neuronais e propriedades carcinogênicas [49].

O uso de coagulantes orgânicos naturais aparece então como uma alternativa sustentável para o tratamento de águas residuais [12]. Eles têm características como alta densidade de carga, cadeias moleculares compridas, formação de pontes e precipitação em pH neutros ou alcalinos, especialmente [99]. A substituição dos químicos usados comumente pelos coagulantes naturais diminui os custos de dosagem de coagulantes e floculantes, e gera lodos de sedimentação com maior biodegradabilidade, menores volumes (redução de 20-30%), maiores facilidades de manuseio e sem substâncias potencialmente tóxicas [110]. Em zonas rurais ou afastadas, coagulantes naturais obtidos de plantas da região são usadas para propósitos domésticos, mesmo antes do uso de coagulantes químicos, aproveitando os baixos custos de obtenção, processamento e a disponibilidade [20,49].

Os princípios ativos, particularmente compostos protéicos e fenólicos, são extraídos de diversas partes das plantas: casca, talos, folhas, fruto, flores e até as raízes [111]. Hoje em dia, têm sido relatadas na literatura experiências com coagulantes obtidos a partir de diversas espécies vegetais: feijão (*Phaseolus Vulgaris*) [48], *Moringa Oleifera* [59,60,62,64], *Opuntia* spp [20], *Strychnos Potatorum* L. [94,112], *Cassia javahikai* [113], Quiabo (*Abelmoschus esculentus*) [114], Quebracho (*Schinopsis balansae*) [106], amido de mandioca [115], Acacia negra (*Acacia mearnsii*) [116], goma guar (*Fabaceae*) [117], *Jathropa curcas*, Castanha (*Castanea sativa*) [100], Maize (*Zeemays*) [118] e outras matérias agrícolas [119].

Na indústria já existem várias marcas comercializadas como coagulantes ou floculantes baseados em princípios ativos naturais. Produtos como *Acquapol C-1*, *Acquapol S5T* e *Tanfloc*, obtidos da *Acacia mearnsii* e comercializados no Brasil, e *Silvafloc* derivado do Quebracho (*Schinopsis balansae*) e distribuído na Itália, são exemplos de coagulantes com taninos com princípio ativo [100].

As características físico-químicas dos coagulantes naturais abrem a possibilidade de testá-los com vários poluentes, tanto na forma de



material particulado como na de compostos dissolvidos [99]. A Tabela 7 apresenta um resumo de alguns dos efluentes já testados.

**Tabela 7.** Exemplos de efluentes tratados mediante coagulação-floculação utilizando compostos de origem natural

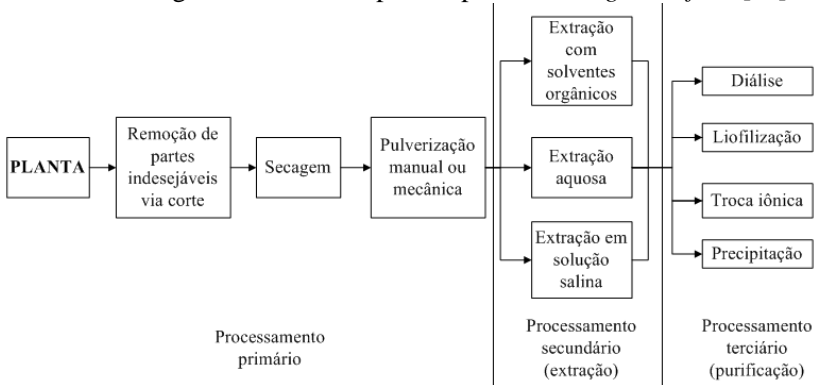
<b>Efluente</b>	<b>Referencia</b>
Surfactantes aniônicos	[15,116]
Suspensões inorgânicas (bentonita, caolinita)	[14,49,61,62,64]
Efluentes contendo corantes	[12,63,100,107]
Efluentes de minas	[110]
Efluente contendo íons metálicos	[112,113]
Efluentes contendo substâncias húmicas	[114]
Água de poço	[115,117]
Águas superficiais	[100,106]
Emulsões água-óleo	[110,120]
Águas residuais domésticas	[100]
Tratamento de água potável	[93,121]

Os coagulantes naturais podem ser usados como coagulantes primários em substituição aos coagulantes ou floculantes químicos ou sintéticos, ou ainda como coadjuvantes destes [49]. A eficiência destes compostos é influenciada pelo grau de purificação. Diversas técnicas são utilizadas para isolar os princípios ativos, tais como o fracionamento por troca iônica, diálise e a eliminação de lipídeos [48,62].

Os processos envolvidos na obtenção de coagulantes naturais a partir de plantas podem se dividir em três etapas principais (Figura 13):

- Secagem e pulverização das partes da planta: os produtos obtidos nesta etapa não só contem os agentes ativos; outros compostos orgânicos podem estar presentes e podem afetar a carga do efluente e, portanto o desempenho do coagulante. No entanto, seu uso sem purificações adicionais gera uma diminuição dos custos do tratamento [122].
- Extração: A extração dos princípios ativos pode ser feita utilizando diferentes solventes (orgânicos, aquosos, soluções salinas) que podem influenciar as estruturas químicas extraídas e as propriedades eletrostáticas do extrato obtido [122].
- Etapas terciárias, raramente utilizadas na indústria, e dirigidas à pesquisa para a determinação e caracterização dos agentes

ativos. Incluem processos de liofilização, diálise e troca iônica [61,62,123]. Estes procedimentos incrementam o custo total de processamento sendo utilizadas industrialmente somente em alguns casos, como por ex. para a *Moringa Oleifera* [94].



**Figura 13.** Etapas gerais de processamento na preparação de coagulantes naturais obtidos a partir de plantas. Adaptada de [94]

A escolha do agente extrator deve favorecer a capacidade coagulante sem prejudicar o custo da operação e sem gerar novos contaminantes no efluente. Okuda [62] indica que o coagulante extraído das sementes da *Moringa Oleifera* com solução salina de NaCl, tem uma capacidade 7 a 8 vezes maior que aquele extraído com água.

O uso de coagulantes naturais traz junto variações na demanda química de oxigênio (DQO) do efluente, devido à presença de biomoléculas que podem incrementar a carga orgânica [123]. Ndabigengesere et al. [64] e Anastasakis et al. [114] obtiveram aumentos até de 50% no valor inicial da DQO do efluente. Esta mudança pode ultrapassar a demanda de cloro e como consequência favorecer a formação de trihalometanos durante o processo de desinfecção. A purificação dos extratos brutos permite que o efeito no aumento da DQO seja menor [123]. Antov et al. [48] fizeram uma purificação da proteína obtida de sementes de feijão e obtiveram uma carga orgânica 15 vezes menor no efluente tratado com o extrato purificado que a obtida ao tratar o efluente com o extrato bruto.

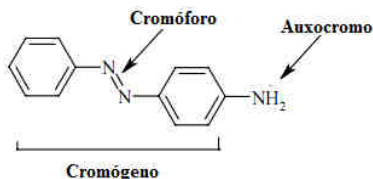
Um aspecto importante na efetividade dos coagulantes naturais é seu armazenamento, bem seja dos sólidos coletados ou dos extratos produzidos. Katayon et al. [124] tiveram uma diminuição na atividade coagulante de sementes de *M. Oleifera* com o aumento do tempo de estocagem da matéria prima.

### 3.6 Remoção de corantes

Grandes quantidades de corantes são jogadas anualmente em efluentes aquíferos. Além da contaminação intrínseca que geram, sua presença reduz a penetração da luz afetando a quantidade de oxigênio dissolvido de forma mais crítica que outro tipo de contaminantes, pois dificultam o processo fotossintético feito pela flora aquática e alterando os processos de respiração da fauna [21]. Alguns corantes são tóxicos e mutagênicos; outros, como é o caso dos corantes básicos, têm o potencial de liberar compostos classificados como cancerígenos devido à presença de estruturas como a benzidina [22].

A classificação dos corantes é baseada em vários critérios, tais como a estrutura química ou a natureza ácida ou básica, entre outros [16]. Uma classificação aceita mundialmente é o Índice de Cor (Colour Index - CI), que é publicado pela SDC (Society of Dyers and Colourists) junto com a AATCC (American Association of Textile Chemists and Colorists). Nesta base de dados, corantes e pigmentos são agrupados por faixas de cor com estruturas químicas similares [22]. Quase dois terços dos corantes orgânicos são compostos azo, seguidos em percentagem pelas antraquinonas (15%).

A Tabela 8 mostra as categorias estabelecidas pelo CI para os corantes testados no presente trabalho, os quais são classificados de acordo à estrutura molecular principal e ilustrada na Figura 14. Esta estrutura é composta regularmente por anéis aromáticos e por uma unidade funcional insaturada onde a cor é desenvolvida (cromóforo). Além disso, podem existir grupos funcionais adicionais (-OH, -NH<sub>2</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, etc.) ligados aos anéis, denominados auxocromos [125].

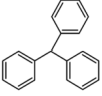



**Figura 14.** Exemplo da estrutura de um corante (4-aminoazobenzeno – Amarelo forte) [125]

Pode-se observar na Tabela 8 que para cada estrutura molecular podem existir vários modos de aplicação, o que depende essencialmente da superfície ou material onde o corante é aplicado. A Tabela 9 resume os

principais campos de uso dos corantes, enunciados de acordo ao método de aplicação utilizado para cada corante; esta classificação é muito usada na indústria.

**Tabela 8.** Classificação de corantes e pigmentos segundo o Índice de Cor

Estrutura molecular básica	Código CI	Grupo funcional	Exemplo	Classificação por modos de aplicação
Monoazo	11000-19999	-N=N-	Azul Maxilon GRL 300%	Ácidos, diretos, dispersos, básicos, mordentes, reativos.
Triarilmetano	42000-44999		Verde malaquita	Ácidos, básicos, mordentes.
Tiazina	52000-52999		Azul de metileno	Básicos, mordentes.

Fonte: Adaptado de [21,22,125]

Ao longo do tempo, pesquisadores têm trabalhado em desenvolver técnicas para remover os corantes da água residual e diferentes procedimentos têm sido propostos: adsorção em materiais como carvão ativado e biosólidos [21], degradação física ou química, oxidação fenton, degradação eletroquímica, ozonização, etc. [63].

**Tabela 9.** Campos de utilização dos corantes de acordo ao seu método de aplicação

Modo de aplicação	Principais usos
À cuba	Fibras naturais e artificiais
À tinta	Fibras naturais
Ácidos	Alimentos, couro, fibras naturais e sintéticas, lã e papel
Ao enxofre	Fibras naturais (celulósicas)
Básicos	Couro, fibras sintéticas, lã, madeira, papel
Diretos	Couro, fibras naturais e artificiais, papel
Dispersos	Fibras naturais e sintéticas (acrílicas)
Mordentes	Alumínio anodizado, lã, fibras naturais e sintéticas
Reativos	Couro, fibras naturais e artificiais, papel
Solventes	Ceras, cosméticos, madeira, plásticos, vernizes, tintas
Pré-metalizados	Fibras protéicas e poliamidas
Branqueadores ópticos	Detergentes, fibras naturais, artificiais e sintéticas, plásticos, sabões, tintas, papel

Fonte: [21]

Nos processos de coagulação-floculação, diferentes tipos de coagulantes naturais têm sido utilizados com sucesso como agentes primários para remover corantes. A Tabela 10 apresenta um resumo destas pesquisas, fazendo ênfase no tipo de corante estudado e sua estrutura molecular base. Existem também estudos onde os coagulantes são usados como coagulante secundário ou como floculante para diminuir o uso do coagulante principal, que normalmente é um sal inorgânico [126].

**Tabela 10.** Estudos de coagulação-floculação para remoção de corantes relatados na literatura utilizando coagulantes naturais

Corante	Classe	Coagulante	% de remoção <sup>1</sup>	Referencia
Violeta de alizarina	Antraquinona	a. Extrato de <i>Moringa Oleifera</i>	90	[98,100]
		b. ACQUAPOL C-1 <sup>2</sup>	55	
		c. TANFLOC <sup>2</sup>	55	
		d. SILVAFLOC <sup>2</sup>	40	
		e. ACQUAPOL SST <sup>2</sup>	65	
		f. Quitosana <sup>3</sup>	20	
		g. Amido	10	
Azul de metileno	Tiazina	a. Extrato de <i>Moringa Oleifera</i>	0	[16,63]
		b. ACQUAPOL C-1	0	
Carmin índigo	Indigo	a. Extrato de <i>Moringa Oleifera</i>	55	[16,63]
		b. ACQUAPOL C-1	8	
Preto Palatino	Monoazo	a. Extrato de <i>Moringa Oleifera</i>	100	[16,98]
		b. ACQUAPOL C-1	80	
Azul Sky Chicagó 66	Diazo	a. Extrato de <i>Moringa Oleifera</i>	100	[16,63]
		b. ACQUAPOL C-1	70	
Ericromocianina R	Triarilmetano	a. Extrato de <i>Moringa Oleifera</i>	40	[16,63]
		b. ACQUAPOL C-1	10	
Vermelho ácido 88	Monoazo	a. Extrato de <i>Moringa Oleifera</i>	100	[16,63]

		b. ACQUAPOL C-1	75	
Vermelho de congo	Diazo	a. Extrato de <i>Moringa Oleifera</i>	70	[118]
		b. Extrato de milho	45	
		c. Quitosana	65	
Preto acido 1	Diazo	Quitosana	82	[107]
Violeta acido 5	Monoazo	Quitosana	83	[107]
Preto reativo 5	Diazo	Quitosana	85	[107]
Verde de Malaquita	Triarilmetano	Extrato de concha de caracol <sup>4</sup>	55	[104]
Laranja direto 26	Diazo	Extrato de sementes de Ipomoeae dasysperma <sup>5</sup>	50	[113]
Vermelho acido 114	Diazo	Extrato de goma de sementes de Ipomoea dasysperma	30	[113]
Azul procion brilhante	Antraquinona	Extrato de goma de sementes de Ipomoea dasysperma	20	[113]
Violeta de cristal	Triarilmetano	Extrato de sementes de uva	75	[12]
Verde de malaquita	Triarilmetano	Extrato de sementes de uva	60	[12]
Amarelo ouro	Diazo	Mucilagem do <i>Tamarindus indica</i>	60	[127]
Vermelho direto	Monoazo	Mucilagem do <i>Tamarindus indica</i>	25	[127]

<sup>1</sup> Máxima percentagem de remoção atingida para cada estudo em função de diferentes variáveis (pH, dosagem de coagulante, concentração de corante, temperatura, etc.)

<sup>2</sup> Coagulantes à base taninos extraídos da *Acacia mearnsii* (TANFLOC, ACQUAPOL C-1, ACQUAPOL SST) e do *Quebracho* (SILVAFLOC)

<sup>3</sup> Polissacarídeo catiônico de origem animal, encontrado no exoesqueleto de crustáceos

<sup>4</sup> De origem animal

<sup>5</sup> Planta nativa da Índia

Os corantes, especialmente os ácidos, básicos e reativos podem escapar do tratamento convencional de águas residuais devido ao seu propósito industrial: resistir ataques microbiológicos e fenômenos de fotodegradação ou degradação química [128]. Nos efluentes das indústrias têxtil, plásticos, pinturas, tintas entre outras, os corantes são

encontrados na forma coloidal, porém não sedimentável, o que dificulta sua remoção por processos mecânicos [104]. Dependendo do caráter ácido ou básico do corante e das propriedades iônicas do agente ativo cada coagulante é capaz de remover um tipo específico de moléculas. Utilizando um coagulante modificado à base tanino, Beltran-Heredia et al. [16], acharam altas percentagens de remoção de corantes aniônicos das classes azo e antraquinônico, e não obtiveram nenhum tipo de efeito em corantes catiônicos (azul de metileno).

A eficiência de remoção de diferentes corantes por um mesmo coagulante é variável, mesmo que eles tenham a mesma estrutura. Szygula et al. [107] acharam percentagens de remoção diferentes em corantes reativos com as mesmas quantidades de grupos sulfônicos. As explicações destas diferenças estão relacionadas com a) as propriedades ácido-base do corante (possíveis dissociações) ou b) os mecanismos de agregação do corante.

No estudo dos sistemas coagulante-corante, a análise estatística baseada no planejamento experimental se apresenta como uma ferramenta para avaliar diferentes condições (pH, dosagens de coagulante, concentração do corante, temperatura, etc.) visando à determinação das condições ótimas de operação [63].

De acordo com a Tabela 10 a maioria dos estudos está dirigida à remoção de corantes de caráter ácido sobre os quais os coagulantes naturais geralmente apresentam uma eficiente descoloração. Contrariamente, em alguns casos os resultados em corantes básicos não apresentam bons resultados [16,63] devido à repulsão de forças eletrostáticas entre o corante e o coagulante em solução aquosa. No entanto, outras pesquisas [12] mostram a possibilidade de remover este tipo de corante com uma efetividade aceitável.

Os corantes básicos são considerados os mais tóxicos pela ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dye stuff Manufacturing Industry) [22]. No presente trabalho foram escolhidos corantes básicos das classes monoazo (Azul Maxilon 300 GRL), triarilmetano (verde de malaquita) e tiazina (azul de metileno). Até o dia de hoje, poucas pesquisas têm sido orientadas à avaliação de coagulantes naturais em corantes catiônicos [12]. Informações relativas a esses corantes são apresentadas na Tabela 11.

Pesquisas anteriores [12] comprovam a capacidade do ácido tânico e da catequina, polifenóis presentes em diversas partes das plantas, de induzir a descoloração e a sedimentação de partículas em soluções aquosas. Os mecanismos de interação molecular propostos são relações íon-íon e íon-dipolo, aproveitando os dipolos permanentes

resultantes da eletronegatividade do oxigênio nos grupos funcionais ou mesmo a perda de íons hidrogênio na solução aquosa [94].

Desta forma a avaliação da descoloração de corantes catiônicos constitui um amplo campo de pesquisa que pode ajudar a resolver um problema específico devido à toxicidade e problemas gerados pela presença desses corantes em efluentes. Nos seguintes capítulos são apresentados a metodologia e os resultados dos processos extrativos realizados com a parte aérea da mandioca, e dos testes de descoloração conduzidos sobre alguns corantes básicos.

**Tabela 11.** Características principais dos corantes básicos testados

<b>Categoria</b>	<b>Características</b>	<b>Problemas gerados no efluente</b>
Azo (mono)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Representam 60 % dos corantes comerciais existentes (especialmente os reativos) e 43 % dos corantes básicos</li> <li>• A presença de grupos sulfonados acrescenta sua solubilidade em água</li> <li>• Sofrem biodegradação em ambientes anaeróbios</li> <li>• Tem alto padrão de fixação e alta resistência contra a luz e umidade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suas dosagens letais são menores a 1,0 mg·l<sup>-1</sup></li> <li>• Em suas formas hidrolisadas produzem aminas carcinogênicas</li> <li>• 15 % dos corantes azo são vertidos sem tratamento algum.</li> </ul>
Triarilmetano	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apresentam colorações intensas.</li> <li>• São utilizados como indicadores de pH</li> <li>• São usados como traçadores hidrológicos</li> <li>• Representam 3% dos corantes utilizados industrialmente e 11% dos corantes básicos</li> <li>• São utilizados principalmente em fibras acrílicas por sua rápida fixação</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suas modificações moleculares no efluente são potenciais agentes carcinogênicos.</li> <li>• Causam alterações metabólicas em peixes presentes em águas contaminadas.</li> <li>• Altamente tóxicos para células de mamíferos, promovendo tumores hepáticos</li> </ul>
Tiazina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• São 5% dos corantes básicos</li> <li>• Além de ser usados como corantes, são utilizados como inseticidas e em aplicações biológicas</li> <li>• 60% dos corantes tiazínicos são básicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suas dosagens letais são menores a 1,0 mg·l<sup>-1</sup>.</li> <li>• São associados com problemas no sistema nervoso e irritações severas nos olhos</li> </ul>

Fonte: [125,129,130,131]



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

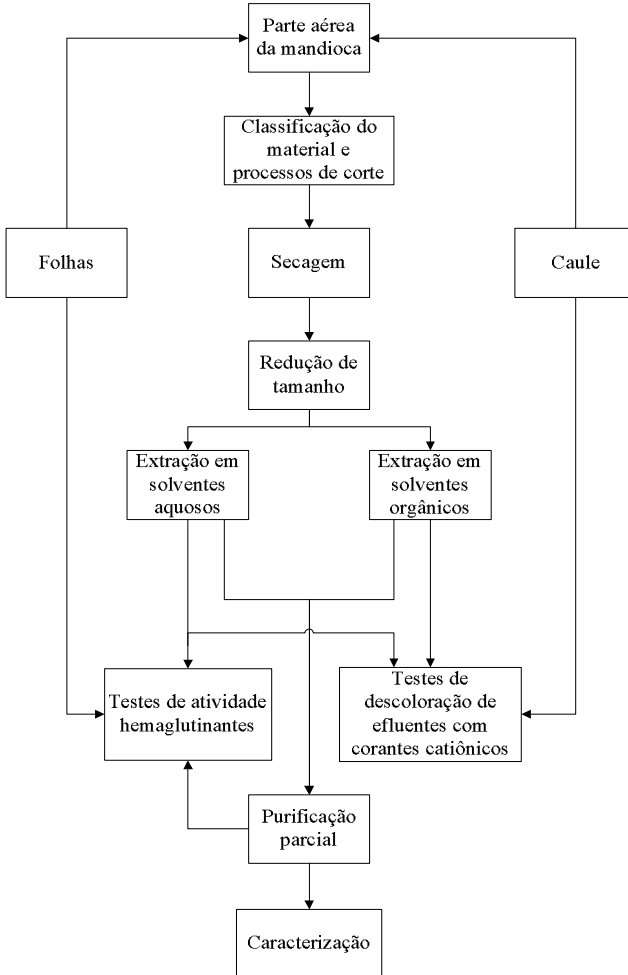
Na Figura 15 é mostrado um esquema de trabalho proposto para a avaliação da atividade coagulante da parte de aérea da mandioca. O diagrama inclui as etapas de processamento comumente seguidas em pesquisas para a extração de compostos protéicos ou fenólicos em vegetais (Figura 13) [94]. As folhas e o caule foram estudados separadamente para aproveitamento das características físico-químicas de cada parte estudada.

### 4.1 Material

#### 4.1.1. Folhas e caule de Mandioca

As folhas e o caule de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) foram fornecidos pelo Engenho Três Irmãs, localizado na comunidade Três Barras, na região de Palhoça, estado de Santa Catarina. Tanto as folhas quanto o caule foram coletados em plantas com aproximadamente quatro meses de idade (tempo após o plantio). As folhas frescas foram separadas do caule e transportadas em caixas de isopor, diretamente para o laboratório para lavagem e secagem, processo que foi feito até 24 horas após a colheita.

O caule foi submetido a um processo prévio de secagem e trituração no engenho. O produto triturado foi transportado até o laboratório, embalado em sacolas de polietileno de alta densidade, seladas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até seu uso para a preparação dos extratos brutos.



**Figura 15.** Esquema de trabalho proposto

#### 4.1.2. Amostras de eritrócitos

O teste aceito para medida da atividade hemaglutinante utiliza sangue humano, de coelho ou de rato. Sendo o sangue humano o mais facilmente disponível, este foi usado como padrão. Sangues bovino, de frango e suíno foram usados visando possível aplicação em tratamento de efluentes de frigorífico.

Sangue humano tipo O+ foi coletado de voluntário nas instalações do Laboratório Santa Luzia, Florianópolis, SC. O sangue de frango foi coletado na planta de produção da Sadia em Chapecó, SC. As amostras de sangue de porco e bovino foram obtidas no matadouro experimental do Instituto Federal Catarinense, Campus de Concórdia, Concórdia, SC. Todas as amostras foram coletadas em solução anticoagulante de citrato de sódio 3,8% (1 ml de solução de citrato a cada 9 ml de sangue) para evitar a coagulação durante o transporte, o qual foi feito sob temperatura de refrigeração (2-8°C).

No laboratório as misturas foram lavadas sucessivamente com solução salina tamponada pH 7,4 na proporção de 1 ml de sangue a cada 4 ml de solução salina e centrifugadas a 1500×g a 20°C por 15 minutos. O sobrenadante (soro e material hemolisado) foi descartado e o precipitado lavado. Repetiu-se este procedimento até obtenção de uma massa de eritrócitos íntegra, livre de soro ou material hemolisado. Finalmente, o volume de precipitado foi diluído com solução salina tamponada pH 7,4 até atingir uma suspensão de eritrócitos 2% (v:v). As suspensões de eritrócitos foram refrigeradas até seu uso em testes de AH [10,58].

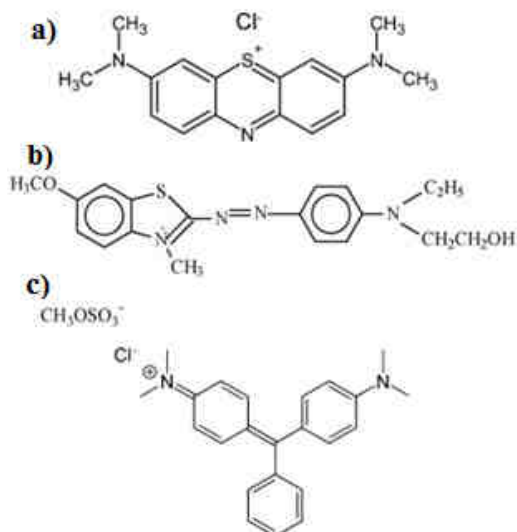
#### 4.1.3. Corantes

Os corantes utilizados para os estudos foram o Azul de metileno, Verde de malaquita e Azul maxilon GRL 300%, todos eles de caráter básico. Cada um deles tem uma classificação diferente de acordo ao Índice de Cor (IC). Outras características destes corantes são apresentadas na Tabela 12 e suas estruturas são mostradas na Figura 16.

**Tabela 12.** Propriedades dos corantes utilizados

Corante	Código CI	Classe	Massa molecular (g·gmol <sup>-1</sup> )	Máxima absorbância (nm)
Azul de metileno	52015	Tiazina	319,8	665
Azul Maxilon GRL 300%	11105	Monoazo	456,0	608
Verde de Malaquita	42000	Triaril metano	364,9	620

Fonte: [12,104,131,132]



**Figura 16.** Estruturas moleculares dos corantes a) Azul de metileno, b) Azul Maxilon GRL 300% e c) Verde de Malaquita

#### 4.1.4. Outros materiais

Sacos de diálise com limite de exclusão de 2 kDa e dimensões 33\*21 mm foram fornecidos por INLAB. A albumina sérica bovina (BSA), o ácido tânico e o hidrogenoftalato de potássio utilizados como padrões foram marca SIGMA. Os demais reagentes foram de pureza analítica de marcas variadas.

## 4.2 Metodologia

### 4.2.1. Processamento primário

As folhas frescas transportadas ao laboratório foram lavadas em hipoclorito de sódio 1% e secas à sombra durante 48 horas à temperatura ambiente (20-25°C). As hastes foram removidas, bem como

os pecíolos e outros materiais [30]. Posteriormente, procedeu-se à secagem em estufa a 35-40°C até peso constante ou até obtenção de umidade inferior a 10%. As folhas secas foram moídas em liquidificador industrial até obtenção de uma farinha com um tamanho máximo de partícula de 1 mm. A farinha foi armazenada à temperatura de refrigeração (2-8°C) em sacolas plásticas seladas ou em frascos de vidro, hermeticamente fechados [29].

Da amostra bruta de caule foram retirados pedaços de hastes, folhas ou qualquer outro tipo de material diferente. Posteriormente, foi seco em estufa a 35°C até peso constante ou até atingir uma umidade máxima de 10%. O material seco foi moído em liquidificador industrial até obter uma farinha com um tamanho máximo de partícula de 1 mm. A farinha obtida foi armazenada da mesma forma que as folhas (2-8°C).

## **4.2.2. Processamento secundário**

### **4.2.2.1. Extração**

A extração aquosa foi feita em uma relação de 1:20 (g de folhas moídas:ml de agente extrator) com uma agitação mecânica suficiente para suspender o sólido no solvente. No caso das folhas, as condições de tempo e temperatura de extração foram otimizadas, tendo como base estudos anteriores [10,58]. Foram testados tempos de extração entre 15 e 120 min e temperaturas de 10, 25 e 40°C. Quanto ao caule, não existindo estudos anteriores sob processo de extração, foram estabelecidas as condições de temperatura e tempo de extração nas quais o rendimento protéico e de taninos obtido nas folhas fosse o melhor possível.

Após a extração, o extrato bruto foi filtrado duas vezes com papel Whatman N<sup>o</sup>.1, resultando em um líquido livre de sólidos suspensos. No caso da permanência de material particulado em suspensão, procedeu-se à centrifugação (2500×g, 20 °C, 10 min) após a filtração. Os extratos obtidos foram armazenados em geladeira (2-8°C) e utilizados para os diferentes testes no máximo 3 dias após feita a extração.

O processo de extração com solvente orgânico foi realizado para as duas farinhas processadas (folhas e caule). Foi utilizada uma relação 1:20 (g de farinha:ml de agente extrator) utilizando como solvente orgânico etanol 70% [11]. No extrato aquoso foi feita uma dupla

filtração com papel filtro Whatman No.1 seguida de centrifugação nas condições já descritas.

Os extratos brutos foram concentrados [11,87] em rotaevaporador a vácuo a 60 °C, velocidade de agitação: 40 rpm, pressão de vácuo 60 mmHg, e resfriamento do destilador a 10 °C,. Este procedimento foi realizado até redução de 85% do volume inicial do extrato filtrado, levando aprox. 45 minutos para cada 450 ml de extrato original.

Os extratos foram armazenados de 2 a 8°C, podendo ser usados até no máximo 3 dias após a extração.

### 4.2.3. Processamento terciário

Com o objetivo de fazer a caracterização dos princípios ativos presentes nos extratos brutos, processos de purificação parcial foram conduzidos. Eles são descritos a seguir:

#### 4.2.3.1. Fracionamento salino do extrato bruto de folhas

Ao extrato aquoso de folhas de mandioca adicionou-se sulfato de amônio sólido até atingir 50% saturação de acordo com a Equação 1 [54].

$$g = \frac{533(S_2 - S_1)}{100 - 0,3S_2} \quad (1)$$

Onde:

G = Quantidade de sulfato de amônio por litro de solução

S<sub>1</sub> = Percentagem inicial de saturação de sulfato de amônio (0%)

S<sub>2</sub> = Percentagem final de saturação de sulfato de amônio (50%)

O valor de 533 corresponde à solubilidade do sulfato de amônio a 20 °C (533 g·L<sup>-1</sup>). Os valores de 100 e 0,3 foram determinados a partir do fato que uma solução saturada de sulfato de amônio precisa de 761 g·L<sup>-1</sup>.

O extrato bruto foi mantido em banho de gelo com agitação magnética durante a adição do sulfato, a qual foi feita lentamente para eliminar a possibilidade de desnaturação por fenômenos de tensão

superficial. A agitação foi mantida por 30 min após a última adição do sal para garantir o equilíbrio [54]. Em seguida, a mistura foi posta para descansar a 2-8°C por uma noite. Posteriormente, o extrato foi centrifugado (8000×g, por 15 min a 10°C) [10]. O precipitado foi redissolvido em solução tampão fosfato pH 7,4 e dialisado exaustivamente contra a mesma solução, fazendo 2 trocas diárias durante 48 horas, com agitação constante.

Na precipitação, o sulfato de amônio foi, primeiramente, adicionado lentamente com agitação constante para evitar a formação de bolhas, o que indica a desnaturação das proteínas na interface ar-água; em segundo lugar, garantiu-se adição de quantidade específica de sulfato, considerando a densidade inicial e final da solução, de modo a manter a percentagem da saturação desejada [133].

Uma parte da suspensão dialisada foi submetida a testes de hemaglutinação, e a outra posta para secar a 35°C e armazenada em geladeira, até o uso em testes de AH ou em ensaios de caracterização por FTIR. Para os testes de AH, a amostra dialisada foi suspensa na menor quantidade possível de água ou solução tampão.

#### **4.2.4. Caracterização**

##### **4.2.4.1. Umidade**

A umidade foi determinada, em triplicata, utilizando o método de perda de água por secagem até peso constante a 105°C das folhas frescas, do caule previamente seco e das farinhas obtidas após trituração [134].

##### **4.2.4.2. Teor de proteína**

A determinação do teor de proteína nos extratos foi feita pelo método de ligação corante-proteína de acordo a Bradford [135] utilizando Albumina Sérica Bovina (BSA) como padrão (ANEXO 1).

#### 4.2.4.3. Teor de taninos

A determinação de taninos foi feita de acordo ao método resumido por Barman et al. [136], o qual inclui uma remoção previa de pigmentos das amostras sólidas com dietil éter e ácido acético. A medição dos compostos fenólicos foi conduzida usando como solventes etanol 70% (para simular as condições reais do extrato) e acetona (para garantir a maior remoção possível). O teor de taninos é determinado por diferença entre os fenólicos totais, medidos pelo método de Folin-Ciocalteu (Makkar et al. [92]), e aqueles não tânicos, determinados utilizando polivinilpirrolidona (PVP) como ligante. A curva padrão foi elaborada com ácido tânico (ANEXO 1). Os valores foram reportados como equivalentes de ácido tânico (base seca). A análise dos taninos condensados foi feita pelo método Butanol-HCl de acordo com Porter et al. [137]. Os resultados foram calculados pela Equação 2 e reportados como equivalentes de leucocianidina [136]:

$$\% \text{ TC} = \frac{A_{550 \text{ nm}} * 78,26 * F}{\% \text{ MS}} \quad (2)$$

Onde:

% TC = Percentagem de taninos condensados.

A = Absorbância da amostra a 550 nm.

F = Fator de diluição na medição espectrofotométrica.

% MS = Percentagem de matéria seca da amostra.

Os taninos hidrolisáveis foram calculados pela diferença entre os taninos totais e os taninos condensados.

#### 4.2.4.4. Determinação do ponto de carga zero

O extrato etanólico previamente concentrado e congelado (-20°C) durante 24 horas foi liofilizado. O sólido foi armazenado em atmosfera inerte até a realização do espectro FTIR e a determinação do ponto de carga zero.



A determinação foi feita de acordo a Čerović et al. [138]. Amostras de 0,200 g do sólido liofilizado obtido do extrato etanólico de caule foram levadas a erlemeyers com 20 ml de solução de NaCl 0,1 N ajustados previamente a diferentes valores pH mediante adição de HCl ou NaOH 0,1 M. Os frascos hermeticamente fechados foram mantidos sob agitação constante (90 rpm) em um shaker marca Dist DI-940 a 25°C. O pH foi medido utilizando o pHmetro marca Digimex DM-23.

O pH foi monitorado a intervalos de 1 hora até obtenção de valores constantes, ponto atingido após cerca de 4 horas. Por conveniência, a agitação foi mantida por 24 h para garantir o equilíbrio das soluções. Os valores de pH finais foram plotados em função dos valores pH inicial. A intersecção da curva com a reta  $y=x$  indica o ponto de carga zero do sólido purificado.

#### **4.2.4.5. Espectros FTIR**

Com o objetivo de obter informações estruturais sobre os compostos extraídos, foi feita a análise FTIR das seguintes amostras:

- Extrato aquoso das folhas, precipitado com sulfato de amônio, dialisado e seco.
- Extrato etanólico do caule, concentrado e liofilizado.

Leituras foram realizadas em pastilha de KBr, na Central de Análises do departamento de Química da UFSC, em espectrofotômetro System 2000, PERKIM & ELMER 16 PC.

#### **4.2.5. Atividade hemaglutinante**

A determinação da AH foi realizada com diferentes suspensões de eritrócitos preparadas, segundo metodologia descrita por Silva [10]. Placas de microtitulação, contendo 4 fileiras de 6 poços cada, foram preenchidas com 100  $\mu$ l de solução tampão fosfato pH 7,4 e em seguida, acrescidos com igual volume de amostra de extrato nos primeiros poços da fileira. A amostra foi submetida à diluição serial, base 2 em triplicata,

com homogeneização e transferência de 100 µl para o poço seguinte até o penúltimo poço da fila. Desta forma o último poço continha somente solução salina e foi utilizado como branco.

Em seguida cada poço foi incubado com 100 µl da suspensão de eritrócitos 2% preparada anteriormente. A aglutinação foi observada macroscopicamente, após incubação das amostras por 30 min, a 37°C [139] com leitura confirmada 12 horas após armazenamento a 4°C [38]. Os resultados foram expressos em AH específica (AHE) que é a relação entre a AH e o teor de proteína do extrato. O cálculo foi feito a partir do valor inverso do título da maior diluição que ainda apresentou AH e o teor de proteína medido pelo método de Bradford [135]. A seguir um exemplo de cálculo:

- Máxima diluição com aglutinação visível: 2
- Título da diluição:  $2^2=4$
- Volume de amostra utilizado: 100 µl
- Teor de proteína da amostra:  $10,3\mu\text{g}\cdot 100\mu\text{l}^{-1}$

Calculo da AHE:

$$AHE = \frac{4UH}{100\mu\text{EXTRATO}} * \frac{100\mu\text{EXTRATO}}{10,3\mu\text{gPROTEINA}} * \frac{1000\mu\text{gPROTEINA}}{1\text{gPROTEINA}} = 388,3 \text{UH/gPROTEINA} \quad (3)$$

Para a otimização das condições de tempo e temperatura de extração foram feitas extrações em triplicata com volumes de agente extrator de 1 litro. Alíquotas de extrato bruto de 5 ml foram tomadas a cada 15 min, filtradas e centrifugadas (2500×g, 20 °C, 10 min) nas quais foi avaliada a percentagem de proteína extraída e a AH. As condições nas quais a AH foi maior foram utilizadas para extrações posteriores, tanto nas folhas quanto no caule. Os extratos com AH mais altas foram armazenados a 10, 25 e 40°C. A AH foi monitorada a cada 12 horas durante 7 dias, e o tempo onde a AHE atingia a metade do valor inicial foi determinado (tempo de meia vida).

#### 4.2.6. Testes de remoção de corantes

Soluções padrão de  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  dos corantes foram preparadas com água destilada, e diluições de 10, 40 e  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) foram usadas para teste. Posteriormente, o pH foi ajustado com adição de NaOH ou HCl 0,1 M.

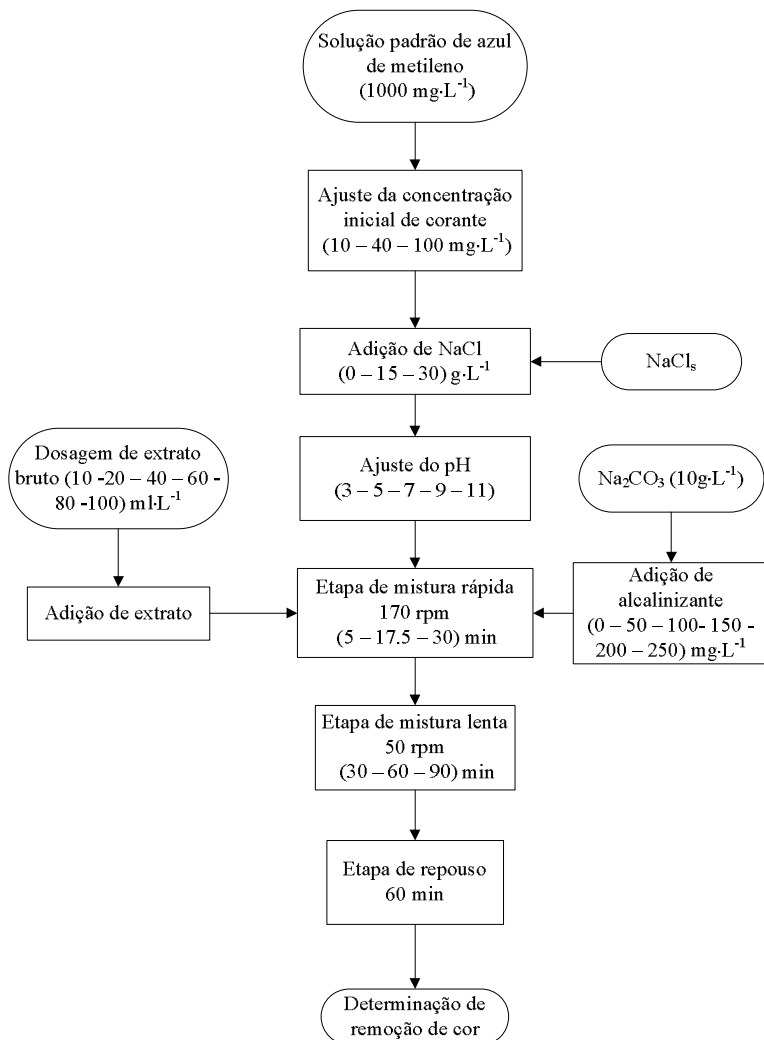
##### 4.2.6.1. Ensaios de descoloração

Quatro tipos de extrato, aquoso e etanólico, tanto de folhas quanto do caule, foram testados em triplicata de forma preliminar em tubos de ensaio contendo 10 ml de solução de corante. O extrato com melhor resultado visual foi utilizado para estudo de descoloração posterior em jar-test (Quimis).

A determinação das melhores condições de pH, concentração inicial do corante, concentração de sal (NaCl), tempo de agitação das etapas de mistura rápida e lenta e dosagem de extrato bruto foi feita com azul de metileno, em volumes de 200 mL no jar-test. A otimização destas do sistema com estas variáveis utilizou temperatura de trabalho de  $20^\circ\text{C}$  e velocidades de agitação em 170 e 50 rpm para as etapas rápida e lenta, respectivamente.

A Figura 17 mostra o esquema dos Jar-tests; a adição de sal foi feita antes do ajuste final de pH devido à forte influencia do NaCl nas soluções estudadas. A adição do extrato foi feita durante a etapa de mistura rápida para garantir homogeneidade na solução de corante. Após a mistura rápida, as soluções foram deixadas em repouso durante 1 hora, e a descoloração foi monitorada em 1, 24 e 48 horas mantendo-se as soluções de corante com o extrato em repouso total.

Foram também testados os corantes Azul maxilon GRL 300% e Verde malaquita com variação apenas do pH e dosagem de extrato. As demais variáveis foram fixadas de acordo com a otimização feita com o azul de metileno. Testou-se também o efeito da adição de um agente alcalinizante ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) para os três corantes. A adição desse agente, assim como a do extrato, foi feita na etapa de mistura rápida.



**Figura 17.** Procedimento Jar-Test para a remoção de azul de metileno

Após determinação das melhores condições para cada corante, foram determinados os parâmetros de cor, DQO e toxicidade das soluções em triplicata.

#### 4.2.6.2. Determinação da porcentagem de remoção de cor

A determinação de cor foi feita em espectrofotômetro (Bel Photonics SP 1105) com leituras no comprimento de onda de máxima absorvância na faixa visível para cada corante segundo a Tabela 12. As curvas de calibração dos corantes relacionam a concentração do corante em solução aquosa ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) com a absorvância (ANEXO 1); com base nessas curvas calculou-se a porcentagem removida das soluções iniciais. Tanto para a realização das curvas padrão quanto para os ensaios de remoção foram feitas as diluições necessárias para satisfazer a Lei de Lambert-Beer, trabalhando sempre em faixa de absorvância na qual a linearidade fosse garantida.

#### 4.2.6.3. Determinação de DQO

O incremento de matéria orgânica gerado pela adição dos extratos no efluente foi determinada pela avaliação da demanda química de oxigênio (DQO). A determinação foi feita nas condições ótimas de trabalho.

O procedimento seguido foi o correspondente ao método colorimétrico em refluxo fechado [140], que tem como base a oxidação do íon dicromato durante a digestão das amostras a  $150^{\circ}\text{C}$  por duas horas. A mudança do cromo hexavalente (VI) para cromo trivalente (III), com absorvância em 600 nm, permite a medição da intensidade da cor e com isto a DQO da amostra. A cor foi medida em espectrofotômetro (Bel Photonics SP 1105). Hidrogenoftalato de potássio foi utilizado para fazer a curva de calibração (ANEXO 1), sabendo que o hidrogenoftalato tem uma DQO teórica de  $1.176 \text{ mg O}_2\cdot\text{mg}^{-1}$ .

#### 4.2.6.4. Testes de toxicidade

A toxicidade das soluções de corante bruta e tratadas foi avaliada com o ensaio da *Artemia salina* (método adaptado de Pérez e Lazo [141]): Placas multipoços foram preenchidas com 5 ml de solução de corante; posteriormente, a cada poço foram adicionadas 10 larvas do

microcrustáceo (cuidando que o volume de água de onde eram tomados os microrganismos não fosse maior de 0,1 ml). Após 24 horas de incubação a 25°C, foi feita a contagem do número de larvas mortas em cada condição avaliada. As análises foram feitas em quadruplicata.

Adicionalmente, foram avaliadas diferentes concentrações em água do extrato escolhido para a descoloração, com o objetivo de determinar a  $CL_{50}$ , que é a concentração de extrato na qual o 50% das larvas iniciais são encontradas mortas. O procedimento foi idêntico ao feito nas soluções de corantes.

Para a eclosão e o crescimento dos microcrustáceos foram seguidas as instruções de Furlan [22]: 1 g de ovos de *Artemia salina* foi adicionado a 0,5 litros de água previamente misturada com 16 g de sal marinho. A solução foi incubada durante 60 horas a 30°C com iluminação e aeração.

#### **4.2.7. Análise estatística dos dados**

Na otimização das condições de extração (tempo e temperatura) os resultados de teor de proteína e AH foram estatisticamente avaliados com o teste de Tukey e análise de variância (ANOVA) para os efeitos de primeira ordem (não-interativos).

Nos testes de descoloração de azul de metileno utilizou-se planejamento fatorial fracionário  $2^{(k-p)}$  com fração 1/2 para 6 fatores ( $k=6$ ,  $p=1$ ). Este tipo de planejamento permite separar e estimar efeitos tanto principais como de interações entre os fatores estudados. Adicionalmente os fatores foram avaliados em triplicata no ponto central. O uso do ponto central permite avaliar a significância dos efeitos tanto em planejamentos de triagem (completos ou fracionários) como em metodologias de superfície de resposta [142], estas últimas são apresentadas para as relações de segunda ordem de maior importância segundo os resultados.

De forma geral, nos resultados mostrados nos diversos gráficos e tabelas neste trabalho, são apresentados valores de médias e desvios padrão para os ensaios, na maioria dos casos, feitos em triplicata.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Umidade

A Tabela 13 mostra os teores de umidade dos materiais em sua condição inicial (folhas frescas e caule previamente seco no engenho) e após o processamento primário (farinhas de folhas e caule).

**Tabela 13.** Teores de umidade de amostras de folhas e caule de mandioca

<b>Amostra</b>	<b>Umidade (%)<sup>1</sup></b>
Folhas frescas	63,0±1,0
Folhas previamente secas	9,0±1,7
Farinha de folhas	11,3±1,8
Caule previamente seco	11,9±0,4
Farinha de caule	13,7±0,1

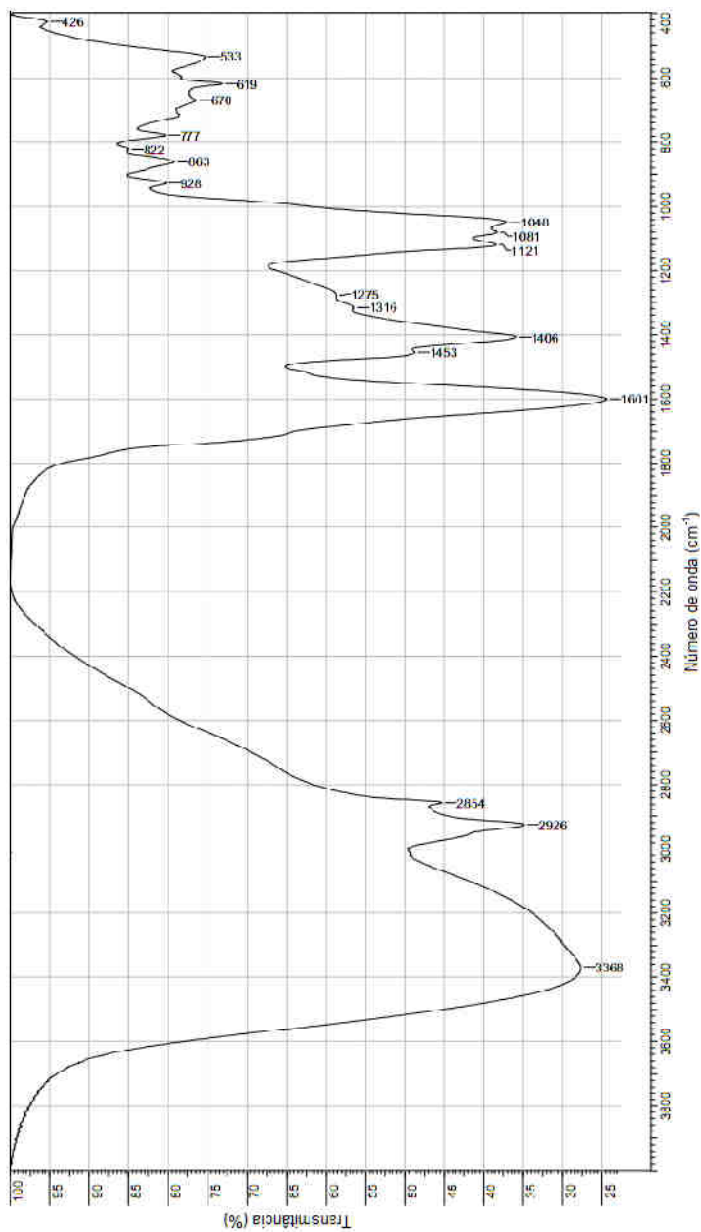
<sup>1</sup>Testes feitos em triplicata

Os resultados, em base seca, mostrados nas seções a seguir, correspondem a percentagens ou teores calculados com respeito às umidades das farinhas de folhas e de caule.

### 5.2 Espectros FTIR

O espectro FTIR do sólido obtido após concentração e liofilização do extrato etanólico do caule da mandioca é apresentado na Figura 18. A banda, larga, no intervalo de 3600-3100 cm<sup>-1</sup> corresponde a grupos OH, os quais são atribuídos a grupos fenólicos ou a hidrogênios de moléculas de água ligados esse grupos. Adicionalmente, a presença de álcoois residuais também pode gerar vibrações nessa faixa. A presença dos grupos fenólicos é confirmada pela absorções nas regiões de 1440 a 1220 cm<sup>-1</sup> e 1260 a 1000 cm<sup>-1</sup> [143].

Os pequenos picos na região de 2950-2850 cm<sup>-1</sup> são associados com grupos metileno (-CH<sub>2</sub>-). Além disso, vibrações de grupos C-H presentes em anéis aromáticos também geram absorção nesta região. As vibrações perto de 1600 cm<sup>-1</sup> são características de ligações -C=C-. As



**Figura 18.** Espectro FTIR do extrato etanólico de caule de mandioca concentrado e liofilizado



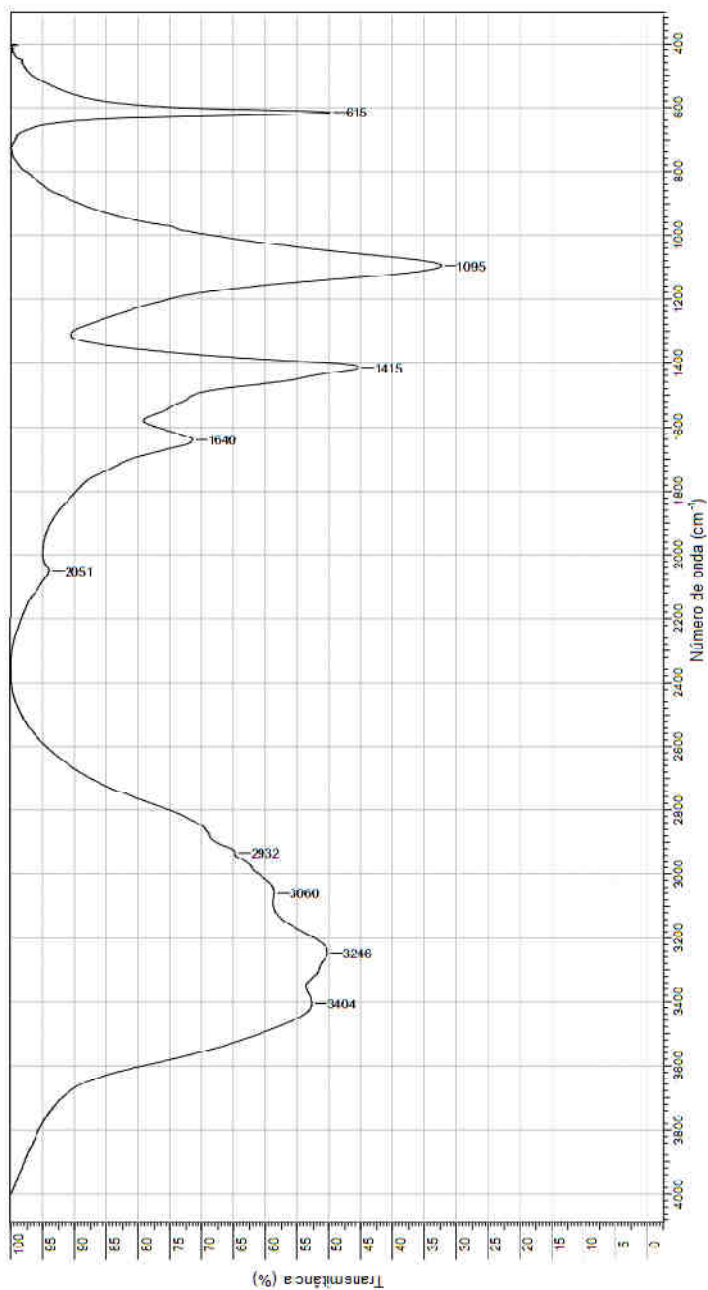
vibrações características das ligações C-C dos grupos fenólicos são observadas na região de 1500-1400  $\text{cm}^{-1}$ . Os picos na região de 1160-975  $\text{cm}^{-1}$  são devidos a alongamentos assimétricos de grupos C-O-C e deformações C-H. As vibrações devido a deformações das ligações C-H nos anéis aromáticos geram absorção no intervalo de 835-650  $\text{cm}^{-1}$  [143].

Na Figura 19 é apresentado o espectro do extrato aquoso obtido de folhas de mandioca, após as operações de precipitação com sulfato de amônio, diálise e secagem à temperatura controlada (35°C). A presença de uma ampla faixa de vibrações perto de 3400  $\text{cm}^{-1}$  sugere a presença de grupos O-H provenientes de compostos fenólicos ou água remanescente no sólido avaliado, a intensidade desta região é muito menor que no espectro do extrato etanólico (Figura 18). A menor quantidade de polifenóis e taninos removidos com o solvente aquoso podem explicar a diminuição nas vibrações na faixa perto de 3400  $\text{cm}^{-1}$ . A leve absorção em 2932  $\text{cm}^{-1}$  e o pico presente em 1415  $\text{cm}^{-1}$  estão relacionados com a existência de grupos  $-\text{CH}_2-$  [143].

A existência de uma vibração em 1640  $\text{cm}^{-1}$  sugere várias alternativas para o análise do espectro da Figura 19, como por exemplo a presença de amidas primárias, onde esta vibração é devida principalmente aos grupos C=O e as deformações angulares de grupos N-H. Lectinas de outras fontes tem sido explicadas pela presença de vibrações na faixa anteriormente descrita. O valor exato da frequência é determinado pela geometria molecular do polipeptídeo [144].

O conjunto das vibrações em 3246  $\text{cm}^{-1}$  ( $-\text{NH}_2$ ), 1640  $\text{cm}^{-1}$  (N-H), 1415  $\text{cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}_2-$ ) e 1095  $\text{cm}^{-1}$  (C-N) podem estar relacionadas com a presença de aminas. Os dois picos na região de 3200 a 3500  $\text{cm}^{-1}$  são característicos das aminas primárias devido à dupla ligação com o hidrogênio. Finalmente a absorção em 1640  $\text{cm}^{-1}$  junto com a presença de picos à esquerda de 3000  $\text{cm}^{-1}$  (3060  $\text{cm}^{-1}$  no espectro) pode representar também a presença de ligações duplas C=C [143].

A análise dos espectros permite ver uma maior de presença de compostos aromáticos e fenólicos no extrato etanólico (amostra analisada a partir do caule), e a possibilidade de ter compostos nitrogenados no sólido obtido da precipitação com sulfato de amônio do extrato aquoso das folhas de mandioca, sugerindo a presença de compostos protéicos. No entanto, estas hipóteses devem ser confirmadas com técnicas de caracterização de um maior nível de precisão, como por exemplo, análise cromatográfica.



**Figura 19.** Espectro FTIR do extrato aquoso de folha de mandioca precipitado com sulfato de amônio, dialisado e seco.

Como é visto nos espectros, existe a presença de vários grupos funcionais (fenólicos, carboxílicos, alcoólicos, anéis aromáticos, compostos nitrogenados, etc.), muitos destes grupos estão diretamente relacionados com a possibilidade de aglomerar substâncias por diversos mecanismos (adsorção, neutralização de cargas, formação de pontes, etc.) e podem ser um ponto de partida para descrever os processos de coagulação e floculação [106].

### 5.3 Teor de proteínas e taninos

Definidas as condições de extração, foram determinados os teores de proteína e taninos no caule e folhas. A Tabela 14 apresenta um resumo desses resultados. As curvas padrão do BSA no caso da análise de proteína e de ácido tânico no caso da análise de fenólicos e taninos encontram-se no ANEXO 1.

**Tabela 14.** Teores de proteínas e taninos nos extratos<sup>1</sup>

Determinação	Folhas		Caule	
	Extrato aquoso	Extrato etanólico	Extrato aquoso	Extrato etanólico
Proteínas (mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	2,62±0,82	8,83±2,33	1,43±0,23	2,60±0,48
Fenólicos totais (mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	7,35±0,86	21,22±3,78	1,29±0,36	2,01±0,64
Taninos totais (mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	4,05±0,65	13,69±0,10	0,17±0,05	0,93±0,23
Taninos hidrolisáveis (%) <sup>3</sup>	0,79±0,05	13,15±0,89	0,91±0,15	9,01±1,45
Taninos condensados (%) <sup>3</sup>	99,21±0,05	86,85±0,89	99,09±0,15	90,98±1,45

<sup>1</sup>Condições de extração: tempo 60 min, temperatura 25°C, relação sólido:solvente: 1g:20 ml

<sup>2</sup>mg de proteína·g de sólido<sup>-1</sup> (Resultados em base seca com respeito á matéria prima moída)

<sup>3</sup>Percentagens com respeito ao total de taninos

Em geral, a extração com solvente orgânico apresentou melhores rendimentos na extração de proteínas e compostos fenólicos. A farinha de folhas contém maiores quantidades de proteínas e compostos fenólicos que o caule. Embora não existam estudos específicos deste último, preparações de suplementos nutricionais contendo misturas com diversas proporções de caule diminuem seu conteúdo protéico na medida em que a percentagem de caule aumenta [46].

No caso dos compostos fenólicos, os teores obtidos estão na faixa de resultados encontrados na literatura [3,34], os quais foram obtidos com uso de metanol como solvente [9]. A Tabela 15 mostra os resultados obtidos utilizando como agente extrator acetona 70%, o qual foi considerado como uma referência, comparando as extrações feitas com água e etanol 70%.

Para os taninos (Tabela 14), os valores determinados nas folhas também estão no intervalo dos resultados apresentados na literatura (2-40 mg·g<sup>-1</sup> de folhas) [145,146], onde as diferenças encontradas podem ser atribuídas ao grau de maturação no momento da colheita [9].

A quantidade significativa de taninos condensados nas folhas é uma característica comum na mandioca [8]. Pode-se observar pelos resultados apresentados acima, que uma alta percentagem dos compostos fenólicos presentes na parte aérea da mandioca corresponde a moléculas de taninos, característica comum do perfil fitoquímico desta planta [76].

**Tabela 15.** Recuperação de polifenóis e taninos para diferentes solventes<sup>1</sup>

Solvente	Polifenóis (mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>		Taninos (mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	
	Teor (mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	Recuperação (%)	Teor (mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	Recuperação (%)
Folhas				
Água	7,35±0,86	20,5	4,05	15,4
Etanol 70%	21,2±3,78	59,3	13,69	52,1
Acetona 70 %	35,8±2,91	100,0	26,26	100,0
Caule				
Água	1,29±0,36	23,7	0,17	5,2
Etanol 70%	2,01±0,64	36,7	0,93	28,9
Acetona 70 %	5,47±1,45	100,0	3,23	100,0

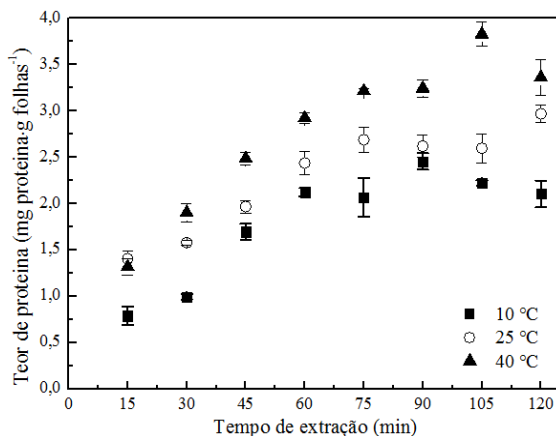
<sup>1</sup>Condições de extração: 60 min, 25°C, relação sólido-solvente: 1g:20 ml

<sup>2</sup>Os resultados são expressos em base seca, com base na relação sólido-solvente.

Os resultados da quantificação de proteínas e polifenóis confirmam a informação obtida dos espectros FTIR.

#### 5.4 Atividade hemaglutinante

A Figura 20 mostra os teores de proteína obtidos; extrações feitas a 40°C apresentaram teores de proteína mais elevados. Dois pontos devem ser levados em consideração para explicar o fato: a célula vegetal é fragilizada pela temperatura, diminuindo sua capacidade seletiva e a solubilidade de outras proteínas não ligantes pode ter aumentado com o aumento da temperatura.



**Figura 20.** Teor de proteína em extratos aquosos de folhas frescas de mandioca, a diferentes temperaturas e tempos de extração.

A análise estatística (Tabela 16) indica uma diferença significativa no que se refere à temperatura de extração, sugerindo uma influência importante desta variável na percentagem final de proteína.

Quanto ao tempo de extração, observa-se um primeiro período (15 até 75 minutos) onde há um aumento progressivo do teor de proteína, sendo o incremento mais facilmente notado de 15 a 60 min. De 60 a 75 min, o incremento do teor é mais leve e os resultados obtidos não diferem estatisticamente. Para extrações feitas com 90 min ou mais, as percentagens de proteína extraída não apresentam variações significativas indicando que a estabilização foi atingida. Valores

similares foram achados em estudos anteriores [58]. Os máximos teores de proteína foram atingidos no intervalo de 90-105 min para as diferentes temperaturas testadas.

**Tabela 16.** Teores de proteína (mg de proteína·g de folhas<sup>-1</sup>) para diferentes temperaturas e tempos de extração<sup>1</sup>

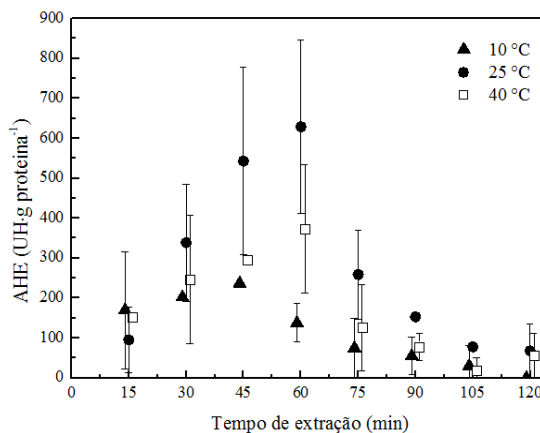
Tempo de extração (min)	Temperatura de extração (°C) <sup>2</sup>		
	10	25	40
15	0,79±0,10 <sup>Aa</sup>	1,40±0,09 <sup>Ba</sup>	1,31±0,09 <sup>Ca</sup>
30	0,99±0,03 <sup>Ab</sup>	1,58±0,03 <sup>Bb</sup>	1,90±0,10 <sup>Cb</sup>
45	1,69±0,09 <sup>Ac</sup>	1,97±0,07 <sup>Bc</sup>	2,48±0,07 <sup>Cc</sup>
60	2,12±0,04 <sup>Ad</sup>	2,43±0,13 <sup>Bd</sup>	2,92±0,06 <sup>Cd</sup>
75	2,06±0,21 <sup>Ade</sup>	2,69±0,14 <sup>Bde</sup>	3,21±0,09 <sup>Cde</sup>
90	2,45±0,09 <sup>Ade</sup>	2,62±0,09 <sup>Be</sup>	3,24±0,09 <sup>Ce</sup>
105	2,22±0,09 <sup>Ae</sup>	2,59±0,09 <sup>Be</sup>	3,82±0,09 <sup>Ce</sup>
120	2,10±0,09 <sup>Ae</sup>	2,97±0,09 <sup>Be</sup>	3,36±0,09 <sup>Ce</sup>

<sup>1</sup>Valores em base seca com respeito à farinha de folhas de mandioca

<sup>2</sup>Valores com letras maiúsculas e minúsculas iguais em uma fila ou coluna respectivamente, não tem diferença significativa de acordo ao teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )

Com o objetivo de avaliar a seletividade da lectina, o extrato aquoso de folhas de mandioca foi testado em vários tipos de eritrócitos. Foi detectada AH nas suspensões de eritrócitos humano, bovino e de frango (Figura 21 e Figura 22). Pode-se observar na Figura 22 que com o aumento da temperatura de extração de 10 para 25°C proporciona um incremento da AHE para os eritrócitos humanos. As extrações feitas a 40°C apresentam uma diminuição na atividade quando testados eritrócitos humanos (Figura 21) e bovinos; este comportamento pode estar associado à perda de estabilidade dos compostos protéicos [39], entre estes as lectinas, cujo maior teor foi obtido a 40°C (Figura 20). Não foi detectada atividade alguma nas amostras de sangue de porco. Vários trabalhos na literatura indicam a seletividade dos compostos lectínicos, aproveitando estas características para usá-los em aplicações médicas como traçadores [43,44]. Desta forma as variações encontradas na AHE, assim como a total ausência em alguns casos, sugerem que a lectina presente na parte aérea da mandioca apresenta especificidade quanto às moléculas às quais se liga. Os grandes desvios padrão observados na Figura 21 e 22 estão relacionados com o método de cálculo da AH, o qual é feito a partir do título da diluição mais alta com

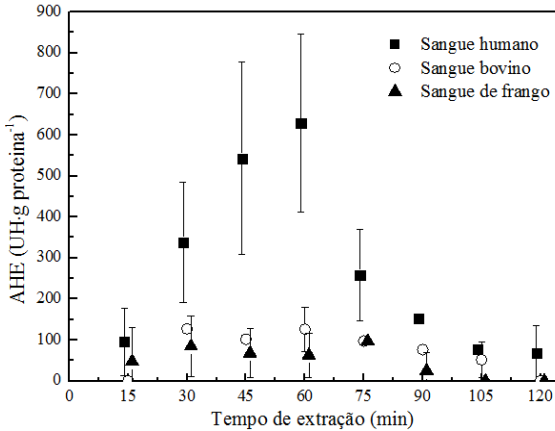
atividade. Assim, variações de uma diluição para outra nos testes em triplicata podem ocasionar este tipo de desvios.



**Figura 21.** AHE do extrato aquoso de folhas em eritrócitos humanos para diferentes temperaturas de extração.

De acordo com a Figura 22, o aumento do tempo de extração além de 60 min promove um decréscimo na AHE, de forma que em extrações maiores a 90 min em alguns casos não é detectada nenhuma atividade. Esta perda de AHE pode ser explicada por possíveis ligações entre a proteína e açúcares presentes no extrato, uma vez que o processo extrativo não é seletivo [37]. De acordo com Chakrabarti e Podder [147], as ligações lectina-açúcar apresentam uma baixa velocidade de reação, sendo controladas por fenômenos de difusão e formação de ligações múltiplas. A desnaturação da lectina pode ser descartada por analogia; pesquisas anteriores relatam fenômenos de desnaturação em temperaturas maiores a 70°C [148].

Comparando com a Figura 20, é importante observar que o pico de AHE é atingido antes do tempo no qual o teor de proteína é máximo, existindo a possibilidade que outro tipo de proteínas não ligantes estejam sendo extraídas em longos tempos de extração. Estudos prévios indicam que as lectinas compõem do 2-10% das proteínas solúveis e sua concentração está diretamente relacionada com a intensidade da AHE [38].



**Figura 22.** AHE do extrato aquoso de folhas em função do tempo para os tipos de eritrócitos nos que foi detectada atividade AH. Condições de extração: 25°C.

De acordo com a análise estatística, não existiram diferenças significativas quanto ao tempo de extração para as temperaturas de 10 e 40°C. Em relação às extrações feitas a 25°C observou-se uma influência do tempo de extração para os eritrócitos humanos e bovinos, especialmente onde são obtidos os valores mais altos de AHE. Para os eritrócitos de frango não foi detectada dependência alguma do tempo. A Tabela 17 apresenta os valores médios de AHE para as extrações feitas a 25°C; pode-se concluir que tempos de extração entre 30 e 75 minutos, garantem as maiores atividades.

Fazendo uma análise semelhante para comparar as temperaturas de extração, pode-se afirmar que no caso dos eritrócitos de frango não houve diferenças significativas quanto as AHE obtidas. No caso dos eritrócitos humanos e bovinos, foram encontradas diferenças em tempos de extração de 30 e 75 minutos; além disso, nesta faixa de tempo é onde são encontradas as maiores atividades, isto sugere que quanto maior seja a capacidade de aglutinar por parte da lectina, mais notável é a diferença ao usar uma ou outra temperatura na extração, sendo mais eficiente o processo a 25°C (Figura 21).



**Tabela 17.** Diferenças significativas segundo o Teste de Tukey para o tempo de extração do extrato aquoso de folhas (Temperatura de extração: 25°C)

Tempo de extração (min)	AHE(UH·g proteína <sup>-1</sup> ) e tipo de eritrócito <sup>1</sup>		
	Humano	Bovino	Frango
15	95,2 ± 82,5 <sup>a</sup>	N,D	47,6 ± 12,5 <sup>a</sup>
30	338,5 ± 146,6 <sup>ab</sup>	126,9 ± 0,0 <sup>b</sup>	84,6 ± 33,3 <sup>a</sup>
45	542,8 ± 135 <sup>bc</sup>	101,8 ± 0,0 <sup>bc</sup>	67,9 ± 48,8 <sup>a</sup>
60	628,7 ± 217,8 <sup>bd</sup>	125,7 ± 54,4 <sup>b</sup>	62,9 ± 44,4 <sup>a</sup>
75	258,6 ± 112 <sup>acd</sup>	97 ± 0,0 <sup>bd</sup>	97 ± 0,0 <sup>a</sup>
90	152,8 ± 0,0 <sup>a</sup>	76,4 ± 0,0 <sup>be</sup>	25,5 ± 4,1 <sup>a</sup>
105	77,1 ± 0,0 <sup>a</sup>	51,4 ± 24,5 <sup>acde</sup>	N.D
120	67,4 ± 37,4 <sup>a</sup>	N.D <sup>2</sup>	N.D

<sup>1</sup>Valores com letras iguais em uma coluna não tem diferença significativa de acordo ao teste de Tukey (p≤0,05)

<sup>2</sup>N.D. = AH não detectada

A Tabela 18 resume as maiores AHE encontradas para os diferentes tipos de eritrócitos testados. Estes resultados foram utilizados para estabelecer as condições de extração prévias à precipitação parcial com sulfato de amônio e para a otimização das condições temperatura de armazenamento dos extratos.

A Tabela 19 mostra efeito da precipitação isoeletrica na AHE. Após a adição do sulfato de amônio e posterior diálise, encontrou-se um aumento geral na AH das amostras de eritrócitos humanos e bovinos. O processo de purificação concentra o princípio ativo, resultando em uma maior AH final.

Estudos anteriores relacionam a recuperação protéica com a atividade atingida. Silva [30] encontrou uma recuperação protéica entre 50 e 60% na etapa de precipitação com sulfato e encontrou valores de AHE de 2800 UH·g<sup>-1</sup> de proteína; entretanto Pereira [58], com recuperações da ordem de 20%, obteve atividades no intervalo de 800-1000 UH·g<sup>-1</sup> de proteína. No presente trabalho a percentagem de recuperação média foi de 60%. Comparando com os estudos citados anteriormente, as atividades encontradas estiveram no intervalo de 200-900 UH·g de proteína<sup>-1</sup> (Tabela 19). Uma explicação para a diminuição na AHE pode ser o uso de uma membrana de diálise com limite de exclusão pequeno (2 kDa), podendo reter proteínas diferentes às lectina [58].

**Tabela 18.** AHE máxima do extrato aquoso de folhas para os diferentes tipos de eritrócitos

<b>Tipo de eritrócito</b>	<b>Temperatura de extração (°C)</b>	<b>AHE máxima (UH·g proteína<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tempo de extração (min)</b>
Humano	10	258,6	45
	25	628,7 <sup>2</sup>	60
	40	152,8	60
Bovino	10	97,0	60
	25	125,7 <sup>2</sup>	60
	40	76,4	60
Porco	10	N.D <sup>1</sup>	--
	25	N.D	--
	40	N.D	--
Frango	10	67,2	30
	25	97,0 <sup>2</sup>	75
	40	N.D	--

<sup>1</sup>AH não detectada

<sup>2</sup>Atividade hemaglutinante específica máxima (AHE<sub>o</sub>).

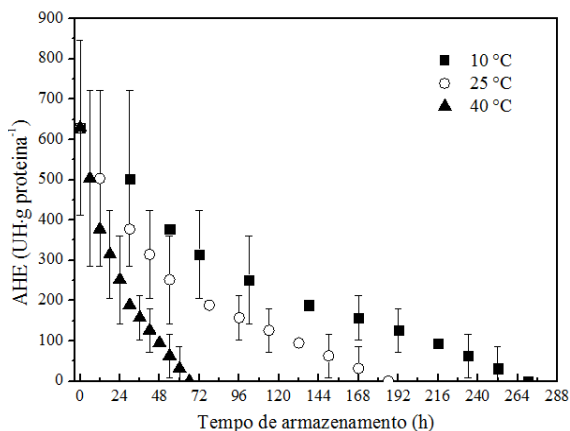
**Tabela 19.** AHE (UH·g proteína<sup>-1</sup>) do extrato bruto de folhas precipitado com sulfato de amônio e posteriormente dialisado.

<b>Extrato</b>	<b>Tipo de eritrócito</b>			
	<b>Humano</b>	<b>Bovino</b>	<b>Frango</b>	<b>Porco</b>
Bruto	628,7± 217,8	125,7±54,4	N.D	N.D
Purificado em água destilada	912,4± 430,1	608,3 ± 0,0	N.D	N.D
Purificado em tampão fosfato	825,5 ± 0,0	619,1 ± 291,8	N.D	N.D
Purificado e seco em tampão fosfato <sup>1</sup>	517,8 ± 244,1	258,9 ± 122,0	N.D	N.D

<sup>1</sup>Após a diálise, a amostra foi seca a 40°C durante 3 horas e redissolvida para o teste de AH.

Com os extratos de maior atividade (Tabela 18) foram determinadas as melhores condições de temperatura de armazenamento e paralelamente o tempo onde a AHE<sub>o</sub> decresceu até a metade do seu valor inicial. Na Tabela 20 encontram-se os resultados obtidos para diferentes temperaturas de armazenamento. Baixas temperaturas favoreceram a estabilidade da lectina, denotado pelo maior tempo de meia vida. Isto provavelmente decorre da inibição dos fenômenos

comumente associados a degradações físicas e químicas e precipitação de compostos. Processos posteriores de purificação da lectina presente aumentariam os tempos de meia vida em relação à AHE. Como exemplo, na Figura 23 é apresentado o comportamento da AHE com o tempo de armazenamento para eritrócitos humanos.



**Figura 23.** Estabilidade da AHE<sub>o</sub> em eritrócitos humanos a diferentes temperaturas de armazenamento.

**Tabela 20.** Tempo de meia vida da AHE para os diferentes tipos de eritrócitos testados

Tipo de eritrócito	Temperatura de armazenamento (°C)	AHE <sub>o</sub> <sup>1</sup> (UH·g proteína <sup>-1</sup> )	Tempo de meia vida de AHE (h)
Humano	10	628,7	72
	25	628,7	42
	40	628,7	18
Bovino	10	125,7	138
	25	125,7	48
	40	125,7	18
Frango	10	97,0	87
	25	97,0	60
	40	97,0	30

<sup>1</sup>Atividade hemaglutinante específica máxima.

O comportamento para eritrócitos bovinos e suínos foi similar, com maior estabilidade a 10°C, e os extratos utilizados em ensaios de

hemaglutinação e descoloração tiveram, no máximo, 3 dias de armazenamento, considerando como parâmetro o maior tempo de meia vida a 10°C para eritrócitos humanos (72 h).

Partindo do comportamento do fenômeno de hemaglutinação, foram definidas as condições para as extrações etanólicas e aquosas tanto das folhas como do caule; a temperatura de trabalho foi estabelecida em 25°C e o tempo de extração em 1 hora.

## 5.5 Ensaios de descoloração

Na Tabela 21 são apresentados os resultados dos testes preliminares feitos para a descoloração do AM.

**Tabela 21.** Remoção de cor em testes preliminares com AM (%)

Extrato <sup>1</sup>	Concentração inicial de corante (mg·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	
	10	40
<b>E1</b> - Extrato aquoso de folhas	14,7	4,1
<b>E2</b> - Extrato etanólico de folhas	20,4	12,9
<b>E3</b> - Extrato aquoso do caule	7,3	4,0
<b>E4</b> - Extrato etanólico do caule	11,5	8,2
<b>E5</b> - Fase aquosa concentrada obtida do extrato etanólico do caule	39,2	32,0

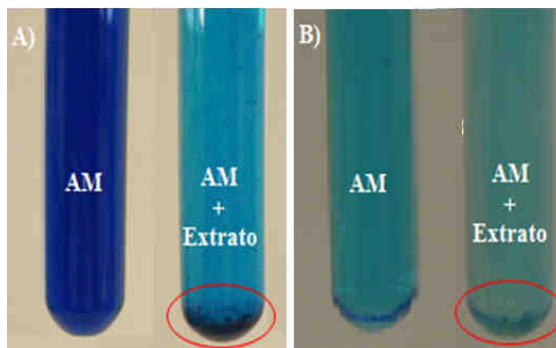
<sup>1</sup> Dosagem de extrato: 20 ml de extrato-1 de corante<sup>-1</sup>.

<sup>2</sup> pH iniciais de 6,1 e 5,6 para as soluções de 10 e 40 mg·L<sup>-1</sup> respectivamente.

<sup>3</sup> Não foi determinado.

Destes resultados pode-se observar que a fase aquosa obtida da concentração do extrato etanólico do caule (E5) foi aquela que apresentou melhores resultados. A concentração do extrato e, porém, dos princípios ativos condensados pode estar relacionada com a atividade coagulante evidenciada nestes ensaios preliminares.

A Figura 24 mostra o resultado do uso do extrato E5 em soluções de AM de diversas concentrações iniciais. Observa-se descoloração das amostras tratadas. Junto com a descoloração gradual, o aumento do tempo de incubação leva a uma formação de flocos precipitados. Isto indica que o extrato induz o fenômeno de coagulação-floculação, o qual repousa sobre interações moleculares iniciais entre o extrato e o corante em solução aquosa.



**Figura 24.** Coagulação e descoloração de soluções de AM. A)  $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; B)  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Dosagem de extrato  $20 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$  de solução de corante. Fotografias tomadas após 48 horas de incubação a  $25^\circ\text{C}$ .

A formação de flocos sedimentados em processo de descoloração similares, está relacionada também com a presença de compostos fenólicos com valores baixos de pKa. Estudos utilizando compostos sintéticos ricos em taninos (ácido tânico e catequina) confirmam a capacidade de agregar poluentes orgânicos de caráter catiônico [12]. Nos resultados obtidos, a capacidade de sedimentação dos flocos formados na etapa de coagulação é lenta e, por isso, industrialmente é recomendado o uso de um agente floculante posterior ao coagulante, para acelerar o processo de decantação do sólido aglomerado [98].

A presença de leves colorações amarelas observadas nos extratos brutos devem-se a pigmentos extraídos juntamente com os princípios ativos, e que interferem nos estudos de descoloração. No entanto, a influência na medida da cor e na aparência das soluções tratadas não foi significativa. Este tipo de problema é relatado em outros estudos [105].

No caso do extrato etanólico de folhas (E2), ainda este apresenta-se os maiores teores de proteína e taninos, a extração de diversos pigmentos afins à fase alcoólica do extrator interferia na medição e fazia inutilizável este extrato para remover a cor.

Embora parte das pesquisas sugiram características catiônicas para os taninos, devido à presença de aminas terciárias [7], a capacidade de remoção do extrato E5, pode também estar relacionada com a presença de polifenóis com natureza anfotérica, como os grupos fenólicos; adicionalmente, os extratos concentrados apresentam uma disponibilidade aumentada de grupos fenólicos, o que melhora a eficiência no processo de coagulação [94].

### 5.5.1. Azul de metileno (AM)

Com a melhor condição obtida no estudo anterior (fase aquosa concentrada do extrato etanólico de caule da mandioca, E5), foram feitos ensaios em Jar-Test de acordo com um planejamento experimental  $2^{6-1}$  (ensaios 1-32 em ordem aleatória) com ponto central (ensaios 33-35) os quais são apresentados na Tabela 22. A otimização dos fatores estudados permitirão obter as melhores condições de descoloração. Na análise estatística foram avaliados os efeitos de primeira e segunda ordens (interações entre dois efeitos de primeira ordem).

O método tradicional de um fator por vez resulta dificultoso quando existem diversos fatores que podem ou não interagir entre eles. Mesmo quando a análise tradicional é utilizado para determinar os fatores predominantes, é difícil achar os valores ótimos quando as interações entre os fatores são consideradas. Para resolver este problema o planejamento experimental oferece uma melhor alternativa para estudar efeitos de variáveis e suas respostas com um numero menor de experimentos [16].

**Tabela 22.** Planejamento experimental e resultados do estudo descoloração do AM.

Ensaio	Fator						
	1-[AM] (mg·L <sup>-1</sup> )	2- pH	3 -Dosagem extrato (ml·L <sup>-1</sup> )	4 -[NaCl] (g·L <sup>-1</sup> )	5 -TAR <sup>1</sup> (min)	6 -TAL <sup>2</sup> (min)	% de remoção
7	10	9	40	0	5	30	40,7±2,9
16	40	9	40	30	5	30	18,3±2,7
27	10	9	10	30	30	90	12,9±0,3
12	40	9	10	30	5	90	0,0±0,0
32	40	9	40	30	30	90	38,4±3,0
31	10	9	40	30	30	30	34,9±3,4
17	10	5	10	0	30	90	6,8±1,2
30	40	5	40	30	30	30	21,3±1,4
20	40	9	10	0	30	90	6,7±1,8
29	10	5	40	30	30	90	27,4±1,7
28	40	9	10	30	30	30	10,5±0,6
19	10	9	10	0	30	30	33,3±3,4
22	40	5	40	0	30	90	2,7±0,1
10	40	5	10	30	5	30	10,6±1,4
13	10	5	40	30	5	30	19,7±1,0
26	40	5	10	30	30	90	2,6±3,7
5	10	5	40	0	5	90	32,1±0,2
3	10	9	10	0	5	90	29,7±5,2

24	40	9	40	0	30	30	15,8±0,1
6	40	5	40	0	5	30	19,1±0,4
8	40	9	40	0	5	90	38,9±4,9
9	10	5	10	30	5	90	0,0±0,0
23	10	9	40	0	30	90	34,8±5,2
2	40	5	10	0	5	90	4,2±5,9
11	10	9	10	30	5	30	5,6±0,0
14	40	5	40	30	5	90	22,2±3,2
25	10	5	10	30	30	30	13,9±1,0
4	40	9	10	0	5	30	1,7±0,8
21	10	5	40	0	30	30	15,3±1,2
18	40	5	10	0	30	30	12,4±2,9
1	10	5	10	0	5	30	18,9±1,3
15	10	9	40	30	5	90	0,0±0,0
33	25	7	25	15	17,5	60	7,5±2,2
34	25	7	25	15	17,5	60	11,5±0,6
35	25	7	25	15	17,5	60	8,4±0,8

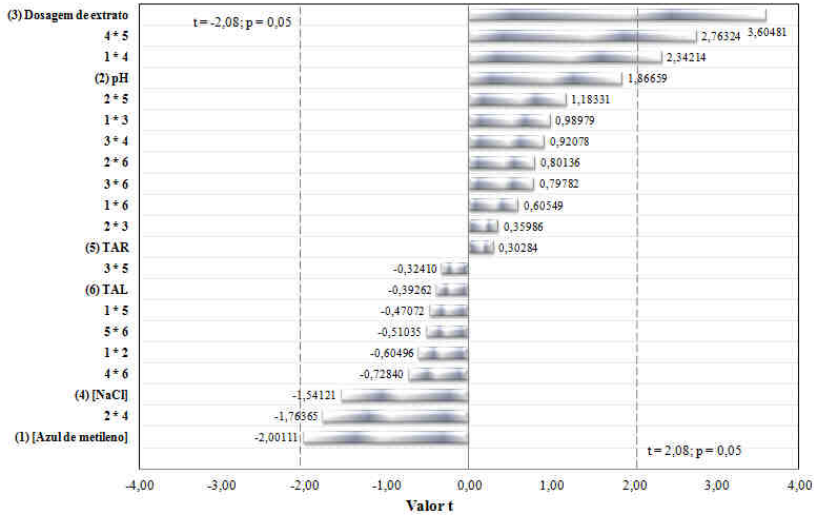
<sup>1</sup>Tempo de agitação rápida

<sup>2</sup>Tempo de agitação lenta

Para determinar a influência dos fatores na remoção da cor, foi estabelecido um nível de significância de 95% ( $p=0,05$ ). No diagrama de Pareto (Figura 25), que mostra o efeito dos fatores estudados, observa-se que um aumento na dosagem do extrato (3) ou no pH (2) irá gerar um efeito positivo na remoção de cor. Por outro lado, um acréscimo na concentração inicial de sal (4) e um aumento na concentração inicial do AM (1) dificultarão o tratamento do efluente. Entre estas variáveis, a dosagem do extrato é a variável mais influente tornando-se significativa qualquer variação segundo o limite estatístico de 95% de significância. Embora a influência do pH não fosse significativa no limite estatístico escolhido, estudos prévios mostram a importância de avaliar esta variável para cada poluente de forma separada [63].

O planejamento apresentado pode ser descrito por um modelo que inclua as interações de terceira ordem (Equação 3), cujo valor de  $R^2$  foi de 0,96405 e a falta de ajuste foi desprezível. As denominações  $X_1$  a  $X_6$  correspondem às denominações das variáveis na Tabela 22.

$$\begin{aligned} \% \text{ remoção AM} = & 16,9 - 7,0X_1 + 6,5X_2 + 12,5X_3 - 5,4X_4 + 1,0X_5 - 1,4X_6 - \\ & 2,1X_1X_2 + 3,4X_1X_3 + 8,2X_1X_4 - 1,6X_1X_5 + 2,1X_1X_6 + 1,2X_2X_3 - 6,1X_2X_4 + \\ & 4,1X_2X_5 + 2,8X_2X_6 + 3,2X_3X_4 - 1,1X_3X_5 + 2,8X_3X_6 + 9,6X_4X_5 - 2,5X_4X_6 - \\ & 1,8X_5X_6 + 5,9X_1X_2X_3 + 4,4X_1X_2X_4 - 0,4X_1X_2X_5 + 5,9X_1X_2X_6 - 0,1X_1X_3X_4 - \\ & 3,4X_1X_3X_5 + 3,4X_1X_3X_6 - 3,6X_1X_4X_5 + 2,4X_1X_4X_6 - 1,4X_1X_5X_6 \quad (3) \end{aligned}$$



**Figura 25.** Diagrama de Pareto dos efeitos de primeira e segunda ordem na remoção de AM.

<sup>1</sup>Um valor de  $p = \pm 0,05$  equivale a  $t = \pm 2,084$

Quanto à concentração inicial de corante, pesquisas anteriores apresentam como um aumento deste fator afeta negativamente a remoção, de forma mais aguda para coagulantes com base protéica que para coagulantes base taninos [107]. Outras pesquisas obtiveram uma maior eficiência de remoção em concentrações iniciais altas de corante, como é o caso das sementes da *Moringa oleifera* [63].

Quanto aos tempos das etapas de agitação, sua variação não influi de forma importante na percentagem de cor final e, portanto, se conclui que os menores tempos utilizados, 5 e 30 minutos para as etapas de agitação rápida e lenta respectivamente, são suficientes para garantir o processo de contato e aglomeração de partículas.

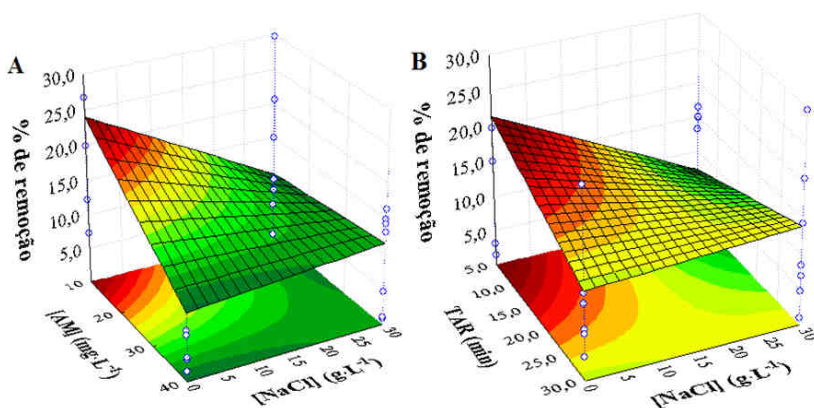
No que refere aos efeitos de segunda ordem existe um efeito significativo positivo da interação entre a concentração AM e concentração de sal (fatores 1\*4), cujo valor positivo indica que um aumento destas variáveis favorece a remoção. Um comportamento similar se encontra no efeito de segunda ordem concentração de sal-tempo de agitação rápida (fatores 4\*5) pois a presença de sal no efluente sintético pode ser anulada utilizando tempos de agitação rápida maiores (30 minutos).

A Figura 26 ilustra o comportamento das concentrações de AM, de sal e TAR pela superfície da resposta. Observa-se que os efeitos



principais destas variáveis apresentam porcentagem de remoção máxima em baixas concentrações de AM, sal e TAR.

Quanto ao pH e à TAR, a interação destes fatores com a adição de sal indica uma clara desvantagem na remoção do corante, tornando-se prejudicial na otimização do pH e afetando a velocidade de sedimentação dos flocos formados. Em geral, a adição de sal dificulta o processo de descoloração, fenômeno comum no tratamento de efluentes têxteis na etapa de tingimento [22]. Já os demais efeitos de segunda ordem não são significativos, apresentando valores de  $p$  menores que 0,05.



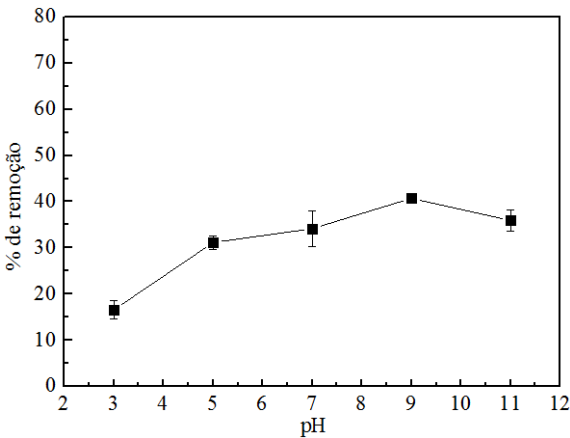
**Figura 26.** Superfície de resposta para descoloração de AM para as interações de segunda ordem. A) concentração inicial de corante e concentração de NaCl. B) TAR e concentração de NaCl.

Levando em consideração que o pH e a dosagem de coagulante foram os fatores que mais influenciaram a descoloração, e que as porcentagens de remoção máximas foram atingidas nos limites superiores dos intervalos de cada uma destas variáveis, foram testados valores de pH de 10 e 11 e dosagens de extrato maiores às estabelecidas originalmente. Os outros fatores (TAR, TAL, [AM]<sub>INICIAL</sub>, [NaCl]) foram considerados parâmetros para todos os ensaios posteriores.

A Figura 27 mostra o efeito do pH na descoloração de AM. Observa-se um aumento na descoloração em pH básicos, sugerindo o favorecimento do processo de neutralização das cargas positivas do corante, levando à transformação dos poluentes solúveis a uma fase sólida precipitada [102]. As baixas remoções em pHs ácidos podem ser

explicados pela inibição da atividade coagulante dos princípios ativos estudados: a presença dos taninos sugere o estabelecimento de ligações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio, que geram complexos os quais, abaixo de valores de pH 3,5 tornam-se instáveis e se dissociam [5]. Por outro lado, a atividade aglutinante dos compostos protéicos é favorecida em valores neutros ou básicos, com uma leve diminuição nestes últimos. Valores de pHs ácidos (baixo de 4) podem inibir totalmente esta capacidade. [50].

Devido à natureza mista dos extratos obtidos, não é possível determinar a participação de cada princípio ativo no processo de coagulação-floculação. Somente com os compostos puros, é possível a determinação do papel de cada componente.



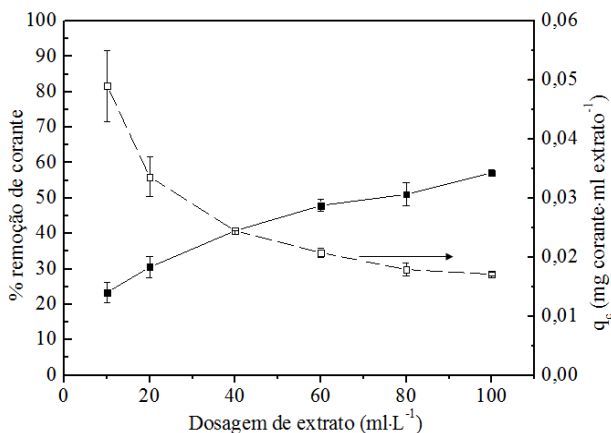
**Figura 27.** Descoloração de AM em função do pH. Parâmetros:  $[AM]_{INICIAL}=10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $[NaCl]=0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , TAR=5 min, TAL = 30 min, dosagem de extrato= $40 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Estabelecido o valor do pH, foram testadas dosagem maiores de extrato às utilizadas no planejamento experimental. Para determinar a dosagem adequada, é necessário saber a capacidade coagulante ( $q_c$ ), que é definida como a quantidade de corante removido por um determinado volume de coagulante ( $\text{mg}$  de corante- $\text{ml}$  de extrato $^{-1}$ ) de acordo à Equação 4 [16]:

$$q_c = \frac{(C_0 - C_i) \cdot V_C}{V_E} \quad (4)$$

Onde  $C_o$  é a concentração inicial de corante ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $C_i$  é a concentração atingida após o período de sedimentação estabelecido ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $V_C$  é o volume final da solução de corante utilizada (L) e  $V_E$  a dosagem de extrato ( $\text{ml}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

A Figura 28 apresenta a variação da percentagem de remoção de cor em função da dosagem do extrato. É evidente um aumento na remoção de cor com o incremento da dosagem de extrato, comportamento comum no uso de coagulantes naturais [100]. No entanto pode-se observar um decréscimo constante na capacidade coagulante, além disto, a presença de colorações próprias do extrato é vista desde dosagens de  $60 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ . Decidiu-se trabalhar com uma dosagem intermédia que oferece uma remoção aceitável, ainda com uma boa capacidade coagulante, no caso do AM,  $40 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ .



**Figura 28.** Descoloração de AM em função da dosagem do extrato. Parâmetros:  $[\text{AM}]_{\text{INICIAL}}=10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $[\text{NaCl}]=0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , TAR=5 min, TAL = 30 min, pH=9.

Com o objetivo de estabelecer uma comparação das dosagens utilizadas neste trabalho com outros estudos [64,100,128], na equação 5 é apresentado o valor de taninos dosados em peso, calculado a partir da concentração de taninos totais no extrato E5 (Tabela 15). Uma dosagem de  $40 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$  equivale a 12,4 mg de tanino por litro de solução de corante; dosagens comuns de coagulantes naturais (*Moringa Oleifera* e *Acacia Negra*) estão no intervalo de 0,5 a  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  [128].

$$\begin{aligned} \text{Dosagem de extrato} &= \frac{40 \text{ ml}_{\text{Extrato concentrado}}}{1 \text{ L}} * \frac{1 \text{ ml}_{\text{Extrato bruto}}}{0,15 \text{ ml}_{\text{Extrato concentrado}}} \\ &* \frac{1 \text{ g}_{\text{Caule}}}{20 \text{ ml}_{\text{Extrato bruto}}} * \frac{0,93 \text{ mg}_{\text{Taninos}}}{1 \text{ g}_{\text{Caule}}} = 12,4 \text{ mg}_{\text{Tanino}} \cdot \text{L}_{\text{Efluente}}^{-1} \quad (5) \end{aligned}$$

As percentagens de remoção de corantes foram determinadas a partir de medidas feitas após o período de repouso das amostras (60 minutos). Sabe-se que o processo de coagulação ocorre de forma rápida, e alguns autores [63] sugerem que a concentração de equilíbrio do corante é atingido na etapa de agitação rápida, sendo provável que os mecanismos complexos de coagulação que envolvem a formação de uma estrutura tipo rede, não precisem de um tempo longo de contato. Isto é uma vantagem comparado a outros processos como a adsorção, onde os tempos de contato são maiores.

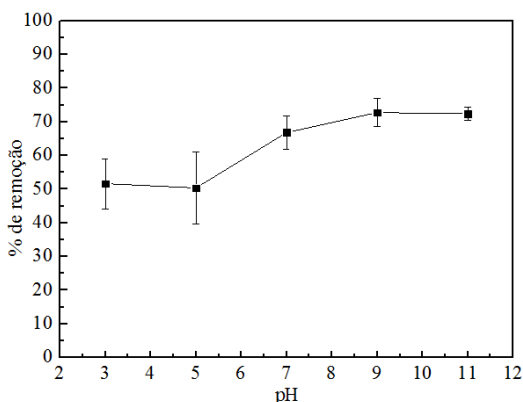
No que refere ao tipo de corante, tanto o grupo cromóforo como o grupo auxocromo presentes na molécula do corante tem um papel importante durante o processo de coagulação-floculação. As cadeias pequenas e a baixa carga, neste caso, catiônica para o AM, podem influenciar negativamente o processo [128].

Em relação à forma de ação do extrato bruto na descoloração das soluções de AM, acredita-se que os fenômenos de formação de complexos e neutralização de cargas por afinidade entre poluentes e coagulantes são os principais mecanismos propostos [149]. No caso da remoção de compostos catiônicos, propõe-se a teoria de que os vários grupos OH presentes no extrato polifenólico natural podem interagir com o corante catiônico via forças íon-íon e íon-dipolo. O caráter aniônico em polieletrólitos naturais, como os extraídos da árvore *Nirmali (Strychnos potatorum)*, originária da Índia tem sido explicado, na literatura, pela presença de grupos hidroxilo (OH<sup>-</sup>) e carboxilos (COO<sup>-</sup>) [119]. Adicionalmente, a natureza dos taninos condensados sugere a possibilidade de formação de interações não-covalentes com compostos orgânicos, como neste caso o AM [12].

Nos itens seguintes são apresentados os resultados dos testes de descoloração para outros dois tipos de corantes catiônicos, com o fim de avaliar o comportamento do extrato bruto para diferentes estruturas moleculares. Para estes corantes serão apresentados apenas os resultados referentes a variações do pH e da dosagem de extrato, fatores considerados como mais positivamente significativos de acordo ao planejamento experimental realizado para o AM.

### 5.5.2. Azul Maxilon GRL 300% (AMG)

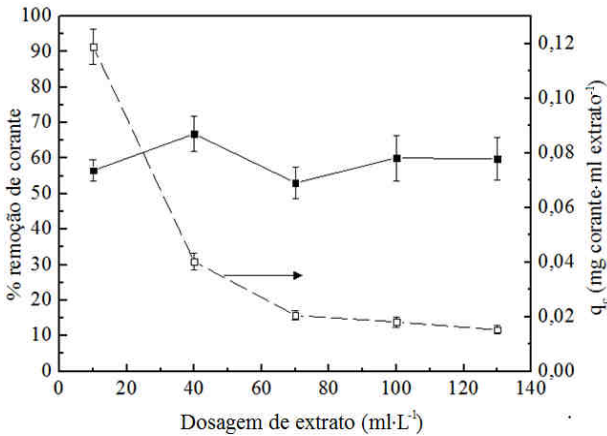
As Figura 29 e Figura 30 mostram a influência do pH e da dosagem de extrato em soluções de AMG, corante de classe azo. Estudos anteriores indicam uma maior facilidade na remoção de cor neste tipo de corantes, sugerindo que o grupo azo é o cromóforo com maior facilidade para coagular [100,128]. Neste trabalho as maiores eficiências (sem uso de alcalinizante) foram atingidas para o AMG. A quantidade de grupos azo influi na remoção, sendo que uma menor quantidade de ligações deste tipo levará a uma maior eficiência como é o caso do AMG que é um corante monoazo. O aumento na descoloração de soluções contendo este tipo de corante está também relacionado com o alto grau de dissociação de soluções aquosas do AMG e os mecanismos de agregação fracos do corante [107].



**Figura 29.** Descoloração de AMG em função do pH. Parâmetros:  $[AMG]_{INICIAL}=10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $[NaCl]=0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , TAR=5 min, TAL = 30 min, dosagem de extrato= $40 \text{ ml g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Um dos problemas encontrados na indústria têxtil é a flutuação dos parâmetros de um efluente, principalmente, o pH, a cor e a demanda química de oxigênio, devido à natureza do processo (operação em batelada) [128]. Com o aumento do pH, o número de sítios positivamente carregados no meio diminui e uma maior carga negativa favorece as atrações eletrostáticas entre o corante catiônico e o coagulante [132]. No entanto, no caso do AMG, valores de pH básicos não apresentam diferenças significativas com as remoções feitas em pH

neutro, razão pela qual foi determinado um pH 7 como valor ótimo. Este sistema mostra, portanto, uma flexibilidade maior quanto ao valor do pH do extrato do que em outros estudos, onde uma modificação do pH é altamente significativa [63,150]. Da mesma forma a ação do extrato em um pH neutro sugere que a formação de pontes entre moléculas, mecanismo no qual a carga das partículas têm uma importância secundária, prevalece sobre a neutralização de cargas, fenômeno descrito na literatura [127].

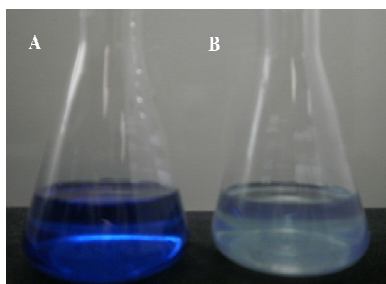


**Figura 30.** Descoloração de AMG em função da dosagem do extrato. Parâmetros:  $[AMG]_{INICIAL}=10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $[\text{NaCl}]=0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{TAR}=5 \text{ min}$ ,  $\text{TAL}=30 \text{ min}$ ,  $\text{pH}=7$ .

Já que uma parte do mecanismo proposto para a coagulação é a adsorção dos colóides e moléculas dissolvidas de corante na superfície dos flocos já formados, o ponto de carga zero ( $\text{pH}_{CZ}$ ) pode ajudar na descrição do fenômeno de descoloração, descrevendo como as mudanças de pH afetam o processo. As interações de cátions com a superfície do material são favorecidas em  $\text{pH} > \text{pH}_{CZ}$  [104]; o valor do ponto de carga zero encontrado foi de 6,2 (ANEXO 1), justificando assim, o aumento na remoção observado na faixa de pH 5 até 7, e que pode ser explicado pela afinidade da superfície ao corante em valores de pH acima do  $\text{pH}_{CZ}$ .

Avaliando a dosagem de extrato, são observados leves aumentos na remoção de cor com o aumento, no entanto existe um rápido decréscimo da capacidade coagulante. O aumento da dosagem é significativo até valores em torno de  $40 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ , o máximo valor de

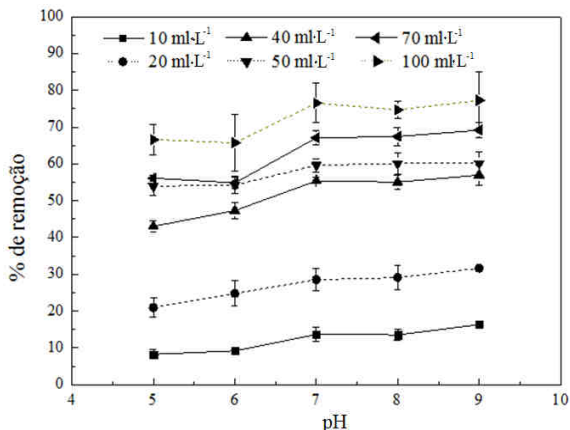
remoção encontrado. Pesquisas anteriores seguem que o decréscimo da remoção após um ponto máximo é devido a uma restabilização da suspensão por sobredosagem, reduzindo a eficiência do processo [99]. Na Figura 30 pode-se ver também que as mudanças na remoção com o aumento da dosagem do extrato são muito menores que no caso do AM (Figura 28).



**Figura 31.** Amostras de AMG. A) Solução original e B) solução com adição de extrato. Condições:  $[AMG]_{INICIAL}=10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $[NaCl]=0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , TAR=5 min, TAL=30 min, pH=7, dosagem de extrato= $40 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ .

### 5.5.3. Verde de malaquita (VM)

A figura 32 apresenta as remoções obtidas para diferentes dosagens e valores de pH. Para este corante foram atingidas percentagens de descoloração em torno de 60 a 80%, valores similares aos apresentados por Bibi et al. [131], que utilizou extratos fenólicos obtidos de sementes e cascas de amendoim, atingindo percentagens de remoção entre 70 a 90% variando a dosagem do extrato e monitorando o tempo de incubação.



**Figura 32.** Descoloração de VM em função do pH a diferentes dosagem de extrato. Parâmetros:  $[VM]_{INICIAL}=10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $[NaCl]=0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , TAR=5 min, TAL = 30 min.

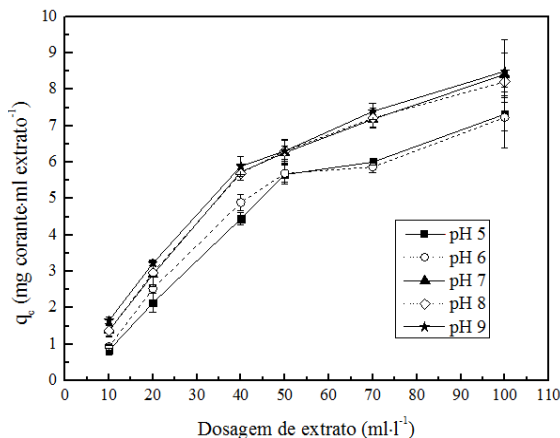
Em alguns casos, o pH da solução do corante pode afetar a estrutura original do corante, como é o caso do VM, diminuindo a intensidade da cor no efluente. Tem sido reportado que a cor de uma solução de VM é estável na faixa de pH de 3-7, podendo valores acima desta faixa levar a conclusões errôneas [151]. Deste modo, considerando os resultados acima, um pH neutro foi escolhido como parâmetro de trabalho, garantindo que a descoloração fosse ocasionada pela adição do extrato e não por mudanças moleculares do corante devido à alteração do pH. Na Figura 32 um observa-se um comportamento praticamente estável em pH básicos, sem aumento significativo na descoloração. Este comportamento foi observado na literatura [104]. O comportamento mencionado sugere, como no caso do AMG, a presença de mecanismos de formação de pontes de hidrogênio, especialmente em pH próximos a 7.

Os resultados obtidos para o VM diferem de outras pesquisas [12], as quais relatam decréscimos significativos na remoção em pH básicos, e que poderiam estar relacionadas a uma maior disponibilidade de sítios de carga negativa no extrato, promovendo fenômenos de neutralização de cargas e também, uma possível degradação do corante durante o período de incubação. A dificuldade na remoção deste corante em pH ácidos tem sido relatada na literatura. Estas remoções, quando comparadas com aquelas dos corantes azo ou antraquinônicos, os



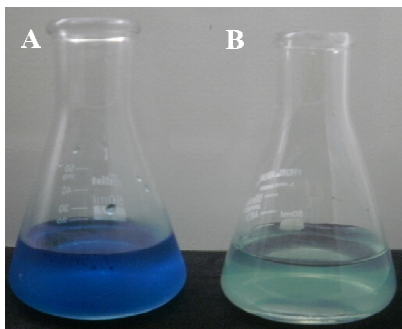
triarilmetanos apresentam uma dificuldade maior e percentagens de remoção mais baixas são observadas [128].

O efeito da dosagem do extrato nas soluções de VM pode ser observado na Figura 33, na qual dosagens acima de  $50 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$  foram observadas dificuldades na sedimentação dos flocos, isto devido possivelmente à superdosagem do extrato, formando camadas em torno dos sólidos suspensos produzindo um efeito negativo na descoloração [110]. Além disso, dosagens maiores a  $60 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$  interferem na avaliação da remoção de cor, pois o extrato colore a solução.



**Figura 33.** Capacidade coagulante do extrato em soluções de VM em função da dosagem do extrato. Parâmetros:  $[\text{VM}]_{\text{INICIAL}}=10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $[\text{NaCl}]=0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{TAR}=5 \text{ min}$ ,  $\text{TAL}=30 \text{ min}$ .

Nas amostras de VM a formação do floco foi mais lenta que nos demais corantes testados, necessitando de tempos maiores para a total sedimentação das partículas aglomeradas. A estrutura do corante, com uma baixa carga catiônica pode ter influenciado no decréscimo da atividade coagulante [128]. Observou-se que os flocos formados eram leves, facilmente dispersáveis, o que sugere que apenas a adição do extrato para este tratamento pode não ser suficiente para a total desestabilização das moléculas de corante. A Figura 34 mostra o resultado do teste de descoloração nas condições ótimas encontradas.

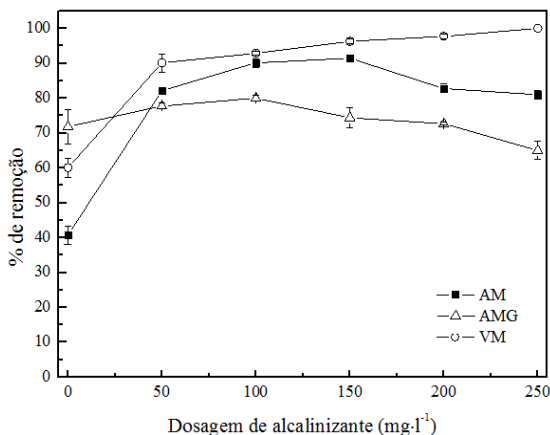


**Figura 34.** Amostras de VM. A) Solução original e B) Com adição de extrato. Condições:  $[VM]_{INICIAL}=10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $[\text{NaCl}]=0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , TAR=5 min, TAL=30 min, pH=7, dosagem de extrato= $50 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Logo depois de avaliar a ação do extrato E5 nos diferentes corantes, pode-se avaliar a importância de estudar separadamente as condições de trabalho para atingir uma melhor descoloração, especialmente no que refere à determinação do pH e dosagem de extrato apropriados.

#### 5.5.4. Adição de alcalinizante

Com as condições de pH e dosagem de extrato estabelecidas, foi testada a adição de carbonato de sódio como alcalinizante, avaliando seu efeito na remoção de cor e na estabilidade dos flocos formados. A aplicação dos dois agentes, extrato e alcalinizante, de forma simultânea na etapa de agitação rápida, garantiram a homogeneização na solução de corante, requisito indispensável para a formação dos flocos. Os efeitos da adição do carbonato são apresentados na Figura 35. Pode-se observar que existe uma dosagem de carbonato na qual a remoção é máxima para o AM e o AMG. As dosagens utilizadas no presente trabalho são similares àsquelas usadas em pesquisas que utilizam o carbonato associado a sais de alumínio como coagulantes [22].



**Figura 35.** Ensaio de descoloração com o uso de carbonato de sódio como alcalinizante. Parâmetros:  $[\text{Corante}]_{\text{INICIAL}}=10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $[\text{NaCl}]=0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , TAR=5 min, TAL = 30 min. Valores de pH e dosagem de extrato de acordo á Tabela 23 para cada corante.

Para o VM, dosagens de carbonato acima de  $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  levam a remoções levemente maiores, porém a estabilidade observada dos flocos formados foi muito baixa, e os mesmos se mantiveram em suspensão mesmo após 48 h de incubação das amostras. Visando uma aplicação em maior escala que só com o tempo de incubação fosse possível remover o corante sedimentado, foi escolhida uma dosagem de  $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de carbonato.

A presença de alcalinizante ajuda na geração e posterior decantação dos flocos [22]. Nesta situação uma maior disponibilidade de íons de carga negativa aumenta a superfície disponível para aglomerar partículas e favorece o incremento de tamanho das partículas suspensas no processo de adsorção. Pode-se ver na Tabela 23 o aumento da eficiência na remoção com o uso do alcalinizante para os três colorantes testados. Nos casos do AM (Figura 36) e do VM a ação do alcalinizante aumenta consideravelmente as percentagens de remoção. Para o AMG o efeito foi pouco expressivo. No caso das amostras de corante tratadas só com alcalinizante não foi evidenciada nenhuma diferença de cor com as soluções iniciais de corante, nem houve formação de flocos.

**Tabela 23.** Condições ótimas de remoção utilizando a fase aquosa extrato etanólico concentrado do caule de mandioca (E5).

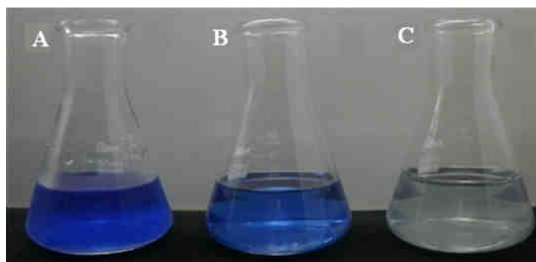
Parâmetros	Corante <sup>1</sup>		
	AM	AMG	VM
Dosagem de extrato (ml·L <sup>-1</sup> )	40	40	50
NaCl (g·L <sup>-1</sup> )	0	0	0
Alcalinizante (mg·L <sup>-1</sup> )	150	100	50
TAR (min) <sup>2</sup>	5	5	5
TAL (min) <sup>3</sup>	30	30	30
Remoção de cor sem alcalinizante (%) <sup>4</sup>	40,7	71,8	64,8
Remoção de cor com alcalinizante (%) <sup>4</sup>	91,4	80,0	90,1
pH original da solução de corante	6,1	6,0	5,0
pH ajustado	9,0	7,0	7,0
pH final da solução de corante tratada sem alcalinizante	6,0	5,8	5,5
pH final da solução de corante tratada com alcalinizante	6,9	7,0	7,0

<sup>1</sup>Concentração de corante: 10 mg·L<sup>-1</sup>.

<sup>2</sup>Velocidade na etapa de agitação rápida: 170 rpm.

<sup>3</sup>Velocidade na etapa de agitação lenta: 50 rpm.

<sup>4</sup>Remoção calculada de amostras com tempo de sedimentação de 1 hora



**Figura 36.** Amostras de AM (10 mg·L<sup>-1</sup>). A) Sem tratamento. B) Com extrato bruto. C) Com extrato bruto e alcalinizante. Fotografias tomadas após 24 horas de incubação a 25 °C com previa remoção dos flocos formados. Condições de trabalho de acordo à Tabela 23

Nas soluções tratadas sem adição de alcalinizante houve um decréscimo no pH final em comparação ao ajustado para os testes. A variação pode estar relacionada com a baixa força iônica da solução inicial (água destilada sem nenhum efeito tampão), e também à leve acidez do extrato polifenólico (pH entre 5 e 6). Testes complementares contendo soluções tamponadas podem apresentar uma maior estabilidade quanto ao pH durante o processo. Nas amostras submetidas à adição de alcalinizante, o pH final (após o tratamento) ficou próximo a 7, não havendo necessidade de reajuste do mesmo, vantagem já documentada para o uso do carbonato juntamente com sais de alumínio [17,124]. O alcalinizante também pode agir como neutralizante de substâncias ácidas formadas no meio [104] ou já presentes no extrato bruto.

Com as condições da Tabela 23 foram avaliadas a demanda química de oxigênio (DQO) e a toxicidade das soluções sem ou com tratamento.

## 5.6 Determinação da DQO

A Tabela 24 resume os resultados da determinação da DQO para as soluções de corante tratadas após a remoção total dos flocos formados. As DQO iniciais apresentam valores comuns de efluentes industriais que contém corantes (produção de papel, têxteis, etc.) os quais são da ordem de  $10\text{-}80 \text{ mgO}_2\text{-L}^{-1}$  [128].

Existe um claro aumento da quantidade de matéria orgânica presente nas soluções testadas com o extrato natural, sendo este aumento proporcional ao acréscimo da dosagem do extrato. Este é um fenômeno comum em efluentes tratados com coagulantes naturais. Anastasakis et al. [114] apresentam diversos tipos de floculantes naturais, os quais aumentam a carga orgânica (medida como carbono orgânico dissolvido - COD) do efluente tratado em diferentes percentagens. Okuda et al. [62] determinaram que o aumento da carga orgânica utilizando extratos aquosos de *Moringa oleifera* é devido a principalmente a componentes inativos presentes no extrato.

Não se observa uma tendência clara na variação da DQO pela adição de alcalinizante, sugerindo um efeito não significativo sobre esta variável quando é feita a adição de carbonato.

**Tabela 24.** DQO das soluções de corantes tratadas

Corante	DQO solução de corante	Dosagem de extrato (ml·L <sup>-1</sup> )			
		40	60	40	60
		DQO Sem alcalinizante		DQO Com alcalinizante <sup>1</sup>	
AM	105	1134	1938	1084	1502
AMG	53	991	1070	962	1143
VM	59	1038	1555	1423	1885

<sup>1</sup>Dosagem de alcalinizante de acordo à tabela 23.

<sup>2</sup>Valores de DQO em mgO<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>

Neste estudo não foram feitos tratamentos prévios aos extratos. Para posteriores pesquisas, processos de delipidação [62], remoção de pigmentos ou adição de antioxidantes [89] podem ser aplicados com o objetivo de eliminar carga orgânica ou compostos presentes no extrato que possam interferir na DQO final do efluente tratado. A remoção de ácidos graxos, açúcares ou pigmentos não afetam a eficiência de remoção, a qual está relacionada especificamente com a presença dos polifenóis no extrato [12]. Técnicas analíticas específicas (cromatografia gasosa – espectrometria de massas) poderiam ajudar a determinar os diversos compostos orgânicos presentes no extrato.

O uso de compostos naturais com ação coagulantes ou floculantes secundária torna-se também uma alternativa interessante para não afetar a carga orgânica [105]. É importante anotar que o aumento da carga orgânica deve ser monitorado em todos os casos, devido à possibilidade de formação de produtos clorados tóxicos, em potenciais etapas subsequentes de cloração para o efluente em questão [114]. O uso de tratamentos biológicos com o objetivo de degradar a matéria orgânica é necessário de acordo às condições finais das soluções testadas.

## 5.7 Testes de toxicidade

O teste de toxicidade com *Artemia salina* foi feito para três condições diferentes:

- Solução de corante 10 mg·L<sup>-1</sup>
- Solução de corante tratada com extrato nas condições estabelecidas na Tabela 23 sem remoção dos flocos formados.

- Solução de corante tratada com extrato nas condições estabelecidas na Tabela 23 com remoção dos flocos formados (efluente clarificado).

A Tabela 25 apresenta os resultados obtidos, expressos como a mortalidade (em percentagem) da população de *Artemia salina* para cada condição avaliada. Para as soluções de corante sem nenhum tipo de tratamento a taxa de mortalidade foi baixa comparada com estudos anteriores que descrevem dosagens letais em corantes catiônicos da ordem de  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  [130,131].

**Tabela 25.** Toxicidade das soluções de corante antes e após o tratamento com o extrato etanólico de caule de mandioca

Corante <sup>1</sup>	Mortalidade (%)		
	Solução inicial	Após adição de extrato <sup>2</sup>	Após adição de extrato e remoção de aglomerado <sup>1</sup>
AM	18,5±4,5	72,5±9,6	12,4±4,3
AMG	18,7±1,6	80,0±8,2	12,4±5,0
VM	24,7±5,8	63,8±11,1	3,6±4,3

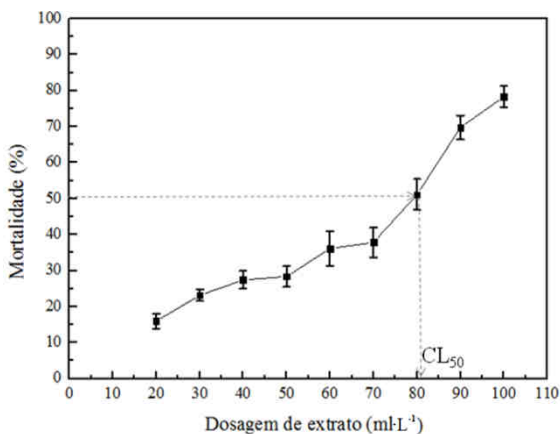
<sup>1</sup>Concentração de corante:  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

<sup>2</sup>Parâmetros do processo de acordo à tabela 23.

Nos efluentes tratados, houve diferença significativa quanto às amostras nas quais o material aglomerado não foi removido, ficando sedimentado ou em suspensão. Nestas amostras a mortalidade aumentou comparando com as soluções sem tratamento, dão aumento da DQO deprimindo a quantidade de  $\text{O}_2$  e a possível formação de compostos tóxicos ao longo do período de incubação (24 h) podem explicar este acréscimo. Nas amostras nas quais o material coagulado foi removido e a solução foi clarificada, a toxicidade diminuiu, apresentando percentagens menores que as soluções iniciais. Por tanto a eliminação dos complexos moleculares formadas no tratamento, são necessários para obter um efluente menos nocivo para o meio aquático.

Para a avaliação da toxicidade do extrato foi determinada a concentração letal ( $\text{CL}_{50}$ ), que causa a morte do 50% dos organismos presentes no meio aquático. A Figura 37 mostra a curva obtida para a mortalidade dos microcrustáceos em função da concentração de extrato

em água, neste caso concentrações acima de 80 ml de extrato- $L^{-1}$  são consideradas letais para o ambiente aquático estudado.



**Figura 37.** Teste de toxicidade com *Artemia salina* da fração aquosa do extrato etanólico concentrado de caule (E5). Determinação da  $CL_{50}$

A literatura reporta que coagulantes naturais de caráter aniônico ou não-iônico são geralmente de baixa toxicidade, enquanto que os polieletrólitos catiônicos são mais tóxicos, especialmente para organismos aquáticos [102]. Por outro lado, a maioria dos polímeros comerciais derivados do petróleo utilizados em tratamento de águas não são inteiramente seguros e ambientalmente amigáveis. Disto advém o interesse, cada vez maior, no desenvolvimento de alternativas naturais, de baixo custo [99].



## 6 CONCLUSÕES

O presente trabalho determinou as condições ótimas de extração para favorecimento da atividade hemaglutinante de extratos aquosos de folhas de mandioca: temperatura de 25°C e tempos entre 45 e 60 min. O armazenamento a baixa temperatura (10°C) permite a conservação da AH dos extratos por um período até de 3 dias.

A AH é favorecida com processos de purificação como a precipitação isoelétrica, permitindo promover a aglutinação com uma menor quantidade proteína. O aumento de temperatura e o tempo de extração favorecem o aumento das percentagens de proteínas obtidas.

Foi observado um caráter seletivo da lectina presente na folha de mandioca tendo em conta os diferentes valores de AH para cada tipo de eritrócito. Nenhuma atividade foi detectada nas amostras de sangue de porco.

Os conteúdos protéicos e de compostos fenólicos nos extratos brutos foram maiores nas folhas que no caule em todas as extrações feitas. A percentagem de taninos condensados extraídos com etanol é maior àquela observada para extração aquosa.

Comparando os teores obtidos de polifenóis e taninos em extrações feitas com acetona 70%, a recuperação com etanol 70% foi de 60% enquanto que para o extrato aquoso foi de 27%.

A fase aquosa do extrato etanólico concentrado do caule da mandioca foi a fração mais adequada para os testes de descoloração, atingindo percentagens de remoção significativas. A presença majoritária de taninos condensados sugere sua importância no fenômeno de coagulação em testes de descoloração feitos posteriormente.

Os espectros FTIR permitiram identificar os principais grupos funcionais presentes nos extratos, ajudando a propor estruturas moleculares que fazem parte dos processos de aglomeração nos testes de AH e descoloração. Os espectros obtidos apresentam os picos característicos de compostos protéicos (extrato aquoso dialisado) e de compostos polifenólicos (extrato etanólico liofilizado).

Os mecanismos propostos como promotores da coagulação-floculação, tais como interações moleculares, formação de flocos e posterior precipitação, são causados por processos físico-químicos complexos que se desenvolvem progressivamente durante o período de incubação da amostra.

Nos testes de descoloração, foram determinadas a dosagem do extrato e o pH como os fatores principais e mais influentes na eficiência

da remoção da cor. Os tempos de agitação nas etapas lentas e rápida não afetaram o grau o desempenho do extrato. A concentração inicial de corante e a dosagem de NaCl afetaram o processo de forma negativa, razão pela qual foram fixadas as quantidades mínimas avaliadas no planejamento fatorial.

As dosagens de extrato ótimas foram da ordem de  $40 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$  e os valores de pH com as melhores remoções foram de 9 para o AM e de 7 para AMG e o VM.

Os extratos utilizados apresentaram percentagens de remoção aceitáveis quando comparados com coagulantes naturais de outras fontes vegetais.

A formação lenta dos flocos pode ser explicada pela ligação ineficiente corante-extrato. Baixos pesos moleculares nos princípios ativos (taninos e proteínas) e a não linearidade estrutural molecular dos polifenóis estão relacionados com este processo.

Os teores de agentes ativos (proteínas e polifenóis) determinados no caule são mais baixos que os encontrados em fontes vegetais comumente usadas para tratamento de efluentes (*Moringa Oleifera*) e, por consequência, os volumes de extrato dosados são altos.

A adição de um agente alcalinizante aumentou a eficiência do processo. Dosagens ótimas de  $150$  e  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  foram encontradas para o AM e o AMG respectivamente. Para o VM, a adição do carbonato em dosagens acima de  $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  gerou a re-estabilização do material suspenso não permitindo a sedimentação natural dos flocos formados.

Houve um claro acréscimo da DQO das soluções tratadas com os extratos, devido à presença de componentes orgânicos ativos adicionais aos princípios ativos. A adição do agente alcalinizante não gerou alterações na DQO das soluções de corante, melhorando a eficiência do processo.

Houve uma diminuição da toxicidade nas amostras tratadas e as dosagens de extrato utilizadas foram menores à  $DL_{50}$  ( $80 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

A simplicidade das técnicas de coagulação-floculação torna o processo com coagulantes naturais mais barato e atrativo. O uso potencial da parte aérea da mandioca em tratamento de efluentes leva em conta a presença de princípios ativos promotores do fenômeno de coagulação. Sua utilização está ligada ao uso de processos adequados de extração com eficiências significativas na extração de proteínas e compostos fenólicos.

## 7 SUGESTÕES

Com base nos resultados obtidos sugerem-se os seguintes tópicos para futuros trabalhos:

- Realizar testes de descoloração com extratos obtidos de plantas com uma idade maior (12 meses) com o objetivo de obter uma maior percentagem de taninos condensados.
- Avaliar o rendimento na concentração de proteína, fenólicos e taninos nos extratos brutos finais fazendo extrações sucessivas do sólido testado.
- Utilizar os extratos etanólicos com um maior grau de concentração ao realizado neste trabalho (15% do volume inicial do extrato) para os testes de descoloração.
- Realizar um estudo da eficiência na remoção de cor a partir de extratos salinos das folhas e do caule e comparar os resultados com as extrações aquosas e etanólicas.
- Avaliar o uso de técnicas avançadas de caracterização para a determinação de grupos funcionais presentes nos extratos.
- Fazer a caracterização dos extratos brutos em quanto a composição de lipídios e carboidratos e sua influencia no aumento da DQO nos efluentes tratados.
- Fazer o monitoramento da descoloração em função do período de incubação com objetivo de estudar a velocidade de sedimentação dos flocos formados.
- Fazer estudos apropriados a escala piloto para avaliar a capacidade de desempenho do extrato e estabelecer custos realistas e a potencialidade do uso do produto a escala industrial.

## REFERÊNCIAS

1. PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 81-87, 2000.
2. FASUYI, A. O.; ALETOR, V. A. Varietal composition and functional properties of Cassava (*Manihot Esculenta* Crantz) leaf meal and leaf protein concentrates. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 4, n. 1, p. 43-49, 2005.
3. WOBETO, C. et al. Antinutrients in the Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaf powder at three ages of the plant. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 108-112, 2007.
4. GOLDSTEIN, I. J. et al. What should be called a lectin? **Nature**, v. 66, p. 285, 1980.
5. MIN, B. R. et al. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 106, p. 3-19, 2003.
6. SANTOS, A. D. F. S. **Moléculas Bioativas de *Moringa Oleifera*: detecção, caracterização e isolamento**. 2007. 112 f. Tese (Doutorado em ciências biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE. 2007.
7. ÖZACAR, M.; SENGIL, I. A. The use of tannins from turkish acorns (Valonia) in water treatment as a coagulant and coagulant aid. **Turkish Journal of Engineering and Environmental Science**, v. 26, p. 255-263, 2002.
8. MELO, D. S. D. **Farinha de folhas de mandioca: efeitos sobre a peroxidação e o perfil lipídico plasmático e hepático de ratos**. 2005. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG. 2005.
9. CORREA, D. A. et al. Remoção de polifenóis da farinha de folhas de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 2, p. 159-164, 2004.
10. SILVA, M. C. **Caracterização parcial da lectina de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. 2008. 55 f. Dissertação (mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG. 2008.
11. MARKOM, M. et al. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.: Effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology**, v. 52, p. 487-496, 2007.

12. JEON, J. et al. Use of grape seed and its natural polyphenol extracts as an natural organic coagulant for removal of cationic dyes. **Chemosphere**, v. 77, p. 1090-1098, 2009.
13. PEREIRA, C. A. et al. Hemagglutinin of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz): partial purification and toxicity. **Ciência e Agrotecnologia de Lavras**, v. 32, n. 3, p. 900-907, 2008.
14. SANTOS, A. F. S. et al. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 504-508, 2009.
15. BELTRÁN-HEREDIA, J.; SÁNCHEZ MARTÍN, J.; SOLERA-HERNÁNDEZ, C. Removal of sodium dodecyl benzene sulfonate from water by means of a new tannin-based coagulant: Optimisation studies through desing of experiments. **Chemical Engineering Journal**, v. 153, p. 56-61, 2009.
16. BELTRÁN HEREDIA, J.; SÁNCHEZ-MARTÍN, J.; MARTÍN-SÁNCHEZ, C. Remediation of dye-polluted solutions by a new tannin-based coagulant. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 50, p. 686-693, 2011.
17. MRWA: MINNESOTA RURAL WATER ASSOCIATION. Coagulation and Flocculation Process Fundamentals, 2005. Disponível em: <[www.mrwa.com/OP-Coagulation.pdf](http://www.mrwa.com/OP-Coagulation.pdf)>. Acesso em: 22 Agosto 2011.
18. IITK - INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY KANPUR. Water & Wastewater Engineering, 2010. Disponível em: <<http://nptel.iitm.ac.in/courses/Webcourse-contents/IIT-KANPUR/wasteWater/Double%20Layer%20Compression.htm>>. Acesso em: 22 ago. 2011.
19. ÖZACAR, M.; SENGIL, A. Effectiveness of tannins obtained from Valonia as a coagulant aid for dewatering of sludge. **Water Research**, v. 34, n. 4, p. 1407-1412, 2000.
20. MILLER, S. M. et al. Toward understading the efficacy and mechanism of *Opuntia spp.* as a natural coagulant for potential application in water treatment. **Environmental Science and Technology**, v. 42, p. 4274-4279, 2008.
21. ROYER, B. **Remoção de corantes textéis utilizando casca de semente de *Araucaria angustifolia* como biossorvente**. 2008. 68 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidad Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. 2008.
22. FURLAN, F. R. **Avaliação da eficiencia do processo de coagulação-floculação e adsorção no tratamento de efluentes textéis**. 2008. 151 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia

- Química) - Universidad Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC. 2008.
23. STUPAK, M. et al. Biotechnological approaches to cassava protein improvement. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 634-641, 2006.
  24. CABALLERO, B. (Ed.). **Encyclopedia of Foods Science and Nutrition**. Baltimore: Academic Press., 2003.
  25. CEBALLOS, H. et al. Variation in crude protein content in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 589-593, 2006.
  26. FAO. FAO STATS, 2009. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 7 Julho 2011.
  27. NETO, C. R.; MARCOLAN, A. L. **Estudo exploratório acerca do comportamento de consumo de mandioca e derivados no Brasil, com ênfase na Região Norte**. 48 Congresso SOBER. Porto Velho: Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. 25 a 28 de julho de 2008. p. 1-20.
  28. GROXKO, M. **Mandioca. Análise da conjuntura agropecuária. Safra 2010/11**. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de Economia Rural. Estado do Paraná. Curitiba, PA. 2010. 16 p.
  29. BOHNENBERGER, L. **Concentrado protéico de folhas de mandioca como complemento alimentar para tilapias do Nilo**. 2008. 68 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidad Estadual do Oeste do Paraná. Cascavel, PA, p. 68. 2008.
  30. SILVA, J. L. D. **Obtenção de concentrado proteico de folhas e parte aérea da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. 2007. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidad Estadual do Oeste do Paraná. Cascavel, PA. 2007.
  31. CEREDA, M. P. **Manejo, Uso e Tratamento de Subprodutos da Industrialização da Mandioca**. Sao Paulo: Fundação Cargill, v. 4, 2001. 320 p. Serie Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas.
  32. CARVALHO, V. D. D.; KATO, M. D. S. A. Potencial de utilização da parte aérea da mandioca. **Informe Agropecuario**, v. 13, n. 145, p. 23-28, 1987.
  33. WOBETO, C. et al. Nutrients in the Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaf meal at three ages of the plant. **Ciência y Tecnología de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 865-869, 2006.

34. MELO, D. S. D. et al. Efeitos da farinha de folhas de mandioca sobre a peroxidação lipídica, o perfil lipídico sanguíneo e o peso do fígado de ratos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 420-428, 2007.
35. SGARBIERI, V. C. **Alimentação e Nutrição**: fator de saúde e desenvolvimento. São Paulo: Almed, 1987. 387 p.
36. BUITRAGO, J.; GIL, J. C. La yuca en la alimentación animal. Em: CEBALLOS, H.; OSPINA, B. **La yuca en el tercer milenio**. Cali: CIAT, 2002. Cap. 28, p. 531.
37. SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins - a large family of homologous proteins. **FASEB Journal**, v. 4, n. 3, p. 198-208, 1990.
38. CHEVREUIL, L. R. et al. Atividade de proteínas hemaglutinantes em sementes de leguminosas arbóreas da flora amazônica. **Revista Brasileira de Neurociências**, v. 5, n. 2, p. 1020-1022, 2007.
39. OCCEÑA, I. V.; MOJICA, E. E.; MERCA, F. E. Isolation and partial characterization of a lectin from the seeds of *Artocarpus camansi* Blanco. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. 5, p. 757-764, 2007.
40. FRANCO-FRAGUAS, L. et al. Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. **Journal of Chromatography B**, v. 790, p. 365-372, 2003.
41. KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230, 1995.
42. VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, Oxford, v. 44, n. 4, p. 385-403, 2004.
43. PUSZTAI, A. et al. Effects of an orally administered mistletoe (type-2 RIP) lectin on growth, body composition, small intestinal structure, and insulin levels in young rats. **Nutritional Biochemistry**, v. 9, p. 31-36, 1998.
44. FU, L. L. et al. Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 43, n. 10, p. 1442-1449, 2011
45. PILOBELLO, K. T. et al. Development of a lectin microarray for the rapid analysis of protein glycopartners. **ChemBioChem**, v. 6, p. 985-989, 2005.
46. FRANCO-FRAGUAS, L. F.; BATISTA-VIEIRA, F.; CARLSSON, J. Preparation of high-density Concanavalin A adsorbent and its use for rapid, high-yield purification of

- peroxidase from horseradish roots. **Journal of Chromatography B**, v. 803, p. 237-241, 2004.
47. ROSERO, D. F. V. **Evaluación, producción y calidad del forraje de yuca. *Manihot esculenta* Crantz, con corte periodico manual.** 2002. 65 f. Dissertação (Graduação em Engenharia Agronomica) - Universidad Nacional de Colombia. Palmira. 2002.
  48. MONTALDO, A. **La yuca o mandioca.** San Jose: IICA, 1985.
  49. ANTOV, M. G.; SCIBAN, M. B.; PETROVIC, N. J. Proteins from common bean (*Phaseolus vulgaris*) seed as a natural coagulant for potential application in water turbidity removal. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2167-2172, 2010.
  50. ANTOV, M. G. et al. Investigation of isolation conditios and ion-exchange purification of protein coagulation components from common bean seed. **Acta Periodica Technologica**, v. 38, p. 3-10, 2007.
  51. BENEVIDES, N. M. B.; LEITE, A. M.; FREITAS, A. L. P. Atividade hemaglutinante na alga vermelha *Solieria filiformis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, n. 2, p. 117-122, 1996.
  52. MOREIRA, R. D. A.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 59, p. 783-787, 1977.
  53. BURGESS, R. M. **Protein purification.** Em: Proteomics of the nervous system. NOTHWANG, S. E.(Ed.), Verlag GmbH & Co, Weinheim, 2008.
  54. SCOPES, R. K. **Protein Purification. Principles and Practice.** 3. ed. Nova Iorque: Springer-Verlag, 1993.
  55. WANG, H. X.; NG, T. B. A novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots with sequence to Kunitz-type soybean trypsin inhibitor. **Life Sciences**, v. 69, p. 327-331, 2001.
  56. REGO, E. J. L. et al. Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (smooth rattkebox). **Phytochemistry**, v. 60, p. 441-446, 2002.
  57. KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications immunobiological research. **Journal of Immunological Methods**, v. 212, p. 193-211, 1998.
  58. PEREIRA, C. A. **Hemaglutinina de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): purificação parcial e toxicidade.** 2007. 43 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidad Federal de Lavras. Lavras, MG. 2007.



59. GASSENSCHMIDT, U. et al. Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1243, p. 577-481, 1995.
60. KATAYAN, S. et al. Preservation of coagulant efficiency of *Moringa Oleifera*, a natural coagulant. **Biotechnology & Bioprocess Engineering**, v. 11, p. 489-495, 2006.
61. NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, K. S.; TALBOT, B. G. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. **Water Research**, v. 29, n. 2, p. 703-710, 1995.
62. OKUDA, T. et al. Isolation and characterization of coagulant extracted from *Moringa Oleifera* seed by salt solution. **Water Research**, v. 35, n. 2, p. 405-410, 2001.
63. BELTRÁN-HEREDIA, J. et al. Removal of Alizarin Violet 3R (anthraquinonic dye) from aqueous solutions by natural coagulants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, p. 43-50, 2009.
64. NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, K. S. Quality of water treated using *Moringa Oleifera* seeds. **Water Research**, v. 32, p. 781, 1998.
65. MAKKAR, H. P. S. **Quantification in Tree and Shrub Foliage**. Dordrecht. Holanda: Kluwer Academic Publishers, 2003.
66. HASLAM, E. Vegetable tannins - Lessons of a phytochemical lifetime. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2713-2721, 2007.
67. CHAVAN, U. D.; SHAHIDI, F.; NACZK, M. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. **Food Chemistry**, v. 75, p. 509-512, 2001.
68. HASLAM, E. **Plant Polyphenols: Vegetable Tannins Revisited**. Cambridge. Inglaterra: Cambridge University Press, 1989.
69. DE BRUYNE, T. et al. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 445-459, 1999.
70. BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicacoes de taninos e tanases em alimentos. **Alimentação e Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2004.
71. SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 21-40, 2001.
72. MUELLER-HARVEY, I. Analysis of hydrolisable tannins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 3-20, 2001.

73. FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Antinutritional factor present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. **Aquaculture**, v. 199, p. 197-227, 2001.
74. HAGERMAN, A.; BUTLER, L. G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, p. 4494-4497, 1981.
75. REED, J. D. et al. Condensed tannins: A factor limiting the use of cassava forage. **Journal of the science food and agriculture**, v. 33, p. 213-220, 1982.
76. MARIE-MAGDELEINE, C. et al. In vitro effects of Cassava (*Manihot esculenta*) leaf extracts on four development stages of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 173, p. 85-92, 2010.
77. MONDOLOT, L. et al. Domestication and defence: Foliar tannins and C/N ratios in cassava and a close wild relative. **Acta Oecologica**, v. 34, p. 147-154, 2008.
78. AWOYINKA, A. F.; ABEGUNDE, V. O.; ADEWUSI, S. R. A. Nutrient content of young cassava leaves and assessment of their acceptance as a green vegetable in Nigeria. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 47, p. 21-28, 1995.
79. DUNG, N. G.; MUI, N. T.; LEDIN, I. Effect of replacing a commercial concentrate with cassava hay (*Manihot esculenta* Crantz) on the performance of growing goats. **Animal Feed Science and Technology**, v. 119, p. 271-281, 2005.
80. WANAPAT, M.; PURAMONGKON, T.; SIPHUA, W. Feeding of cassava hay for lactating dairy cows. **Asian-Austral Journal of Animal Science**, v. 13, p. 478-482, 2000.
81. TEO, C. R. P. A. et al. Obtenção e caracterização físico-química de concentrado protéico de folhas de mandioca. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 9, p. 993-999, 2010.
82. THANG, C. M.; LEDIN, L.; BERTILSSON, J. Effect of using cassava products to vary the level of energy and protein in the diet on growth and digestibility in cattle. **Livestock Science**, v. 128, p. 166-172, 2010.
83. HONG, N. T. T. et al. Effects of timing of initial cutting and subsequent cutting on yields and chemical composition of Cassava hay and its supplementation on lactating dairy cows. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, v. 16, n. 12, p. 1763-1769, 2003.
84. HUE, K. T. et al. Effect of feeding fresh, wilted and sun-dried foliage from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) on the

- performance of lambs and their intake of hydrogen cyanide. **Livestock Science**, v. 131, p. 155-161, 2010.
85. COLLINS, P. J.; YAZAKI, Y. **Tannin extraction and processing**. US Patent 5,417,888. 24 Jan. 1994. 23 Maio, 1995.
  86. NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolic in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.
  87. HAGERMAN, A. E. Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. **Journal of Chemical Ecology**, v. 14, n. 2, 1988.
  88. COBZAC, S. et al. Tannin extraction efficiency, from *Rubus Idaeus*, *Cydonia Oblonga* and *Rumex Acetosa*, using different extraction techniques and spectrophotometric quantification. **Acta Universitatis Cibiniensis Seria F Chemia**, p. 55-59, 2005.
  89. FAO/IAEA. **Quantification of tannins in tree foliage**. IAEA. Vienna, p. 31. 2000.
  90. GINER-CHAVEZ, B. I. et al. A method for isolating condensed tannins from crude plant extracts with trivalent ytterbium. **Journal of Science Food and Agriculture**, v. 74, p. 359-365, 1997.
  91. ALONSO-AMELOT, M. E.; OLIVEROS, A.; ARELLANO, E. Exhaustive extraction of phenolics and tannins from some sun-exposed forbs and shrubs of the tropical Andes. **Ciência**, v. 13, n. 4, p. 429-439, 2005.
  92. MAKKAR, H. P. S. et al. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. **Journal of Science Food & Agriculture**, v. 61, p. 161-165, 1993.
  93. ÖZACAR, M.; SENGIL, I. A. Evaluation of tannin biopolymer as a coagulant aid for a coagulation of colloidal particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 229, p. 85-96, 2003.
  94. YIN, C. Emerging usage of plant-based coagulants for water and wastewater treatment. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1437-1444, 2010.
  95. QUAMME, J. E.; KEMP, A. H. **Stable tannin based polymer compound**. US patent 4,558,080. 24 jan. 1984. 10 dez. 1985.
  96. REED, P. E.; FINCK, M. R. **Modified tannin mannich polymers**. US patent 5,659,002. 24 mar. 1995. 19 ago. 1997.
  97. LAMB, L. H.; DECUSATI, O. G. **Manufacturing process for quaternary ammonium tannate, avegetable coagulating and flocculating Agent**. US patent 6,478,986. 18 ago. 2000. 12 nov. 2002.
  98. BELTRÁN-HEREDIA, J.; SÁNCHEZ-MARTÍN, J.; GÓMEZ-MUÑOZ, M. C. New coagulant agents from tannin extracts:

- Preliminary optimisation studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 162, p. 1019-1025, 2010.
99. RENAULT, F. et al. Chitosan for coagulation/flocculation processes - And eco-friendly approach. **European Polymer Journal**, v. 45, p. 1337-1348, 2009.
  100. BELTRÁN-HEREDIA, J.; SÁNCHEZ-MARTÍN, J.; DÁVILA-ACEDO, M. A. Optimization of the synthesis of a new coagulant from a tannin extract. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, p. 1704-1712, 2011.
  101. ADACHI, Y. Dynamic aspects of coagulation and flocculation. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 56, p. 1-31, 1995.
  102. BOLTO, B.; GREGORY, J. Organic polyelectroelites in water treatment. **Water Research**, v. 41, p. 2301-2324, 2007.
  103. LEVISKÄ, T.; RÄMÖ, J. Coagulation of wood extractives in chemical pulp bleaching filtrate by cationic polyelectrolytes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 153, p. 525-531, 2008.
  104. OLADOJA, N. A.; ALIU, Y. D. Snail shell as coagulant aid in the alum precipitation of malachite green from aqua system. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, p. 1496-1502, 2009.
  105. ZHANG, J. et al. A preliminary study on cactus as coagulant in water treatment. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 730-733, 2006.
  106. SÁNCHEZ-MARTÍN, J.; GONZÁLEZ-VELASCO, M.; BELTRÁN-HEREDIA, J. Surface water treatment with tannin-based coagulants from Quebracho (*Schinopsis balansae*). **Chemical Engineering Journal**, 2010. In press.
  107. SZYGULA, A. et al. The removal of sulphonated azo-dyes by coagulation with chitosan. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and engineering aspects**, v. 330, p. 219-226, 2008.
  108. COAGULAÇÃO/FLOCULAÇÃO. Disponível em: <<http://www.universoambiental.com.br/Arquivos/Agua/ProcessosQuimicosdeTratamentodeEfluentes07.pdf>>. Acesso em: 24 Agosto 2011.
  109. SEMERJIAN, L.; AYOUB, G. M. High-Ph-magnesium coagulation-flocculation in wastewater treatment. **Advances in Environmental Research**, v. 7, p. 389-403, 2003.
  110. ABDELAAL, A. M. **Using a natural coagulant for treating wastewater**. In: International Water Technology Conference. IWTC, 8. 2004, Alexandria. p. 781-792.
  111. ALI, G.; EL-TAWEEL, G.; ALI, M. A. The cytotoxicity and antimicrobial efficiency of *Moringa oleifera* seeds extracts.

- International Journal of Environmental Study**, v. 61, n. 6, p. 699-708, 2004.
112. JAYARAM, K. et al. Biosorption of lead from aqueous solution by seed powder of *Strychnos potatorum* L. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 71, p. 248-254, 2009.
113. SANGHI, R.; BHATTACHARYA, B.; SINGH, V. use of *Cassia javahikai* seed gum and gum-g-polyacrylamide as coagulant aid for the decolorization of textile dye solutions. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1259-1264, 2006.
114. ANASTASAKIS, K.; KALDERIS, D.; DIAMADOPOULOS, E. Flocculation behavior of mallow and okra mucilage in treating wastewater. **Desalination**, v. 249, p. 786-791, 2009.
115. DI BERNARDO, A.; DI BERNARDO, L. **Uso de amido de mandioca cationico como auxiliar de floculação**. In: Congresso Interamericano de Engenharia Sanitaria e Ambiental, 15. 2000, Rio de Janeiro: ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitaria e Ambiental, 2000. p. 1-12.
116. CRUZ, J. G. H. et al. **Aplicação de coagulante vegetal a base de tanino no tratamento por coagulação/floculação e adsorção/coagulação/floculação do efluente de uma lavanderia industrial**. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitaria e Ambiental, 23. 2005, Campo Grande: Associação Brasileira de Engenharia Sanitaria e Ambiental, 2005. p. 1-12.
117. PRITCHARD, M. et al. Potential of using plants extracts for purification of shallow well water in Malawi. **Physics and Chemistry of the Earth**, v. 34, p. 799-805, 2009.
118. PATEL, H.; VASHI, R. T. Removal of congo red dye from its aqueous solution using natural coagulants. **Journal of Saudi Chemical Society**, p. In press., 2011.
119. RAGHUWANSHI, P. K. et al. Improving filtrate quality using agrobased materials as coagulant aids. **Water Quality Research Journal Canada**, v. 37, n. 4, p. 745-756, 2002.
120. SANTANA, C. R. et al. Evaluation of the process of coagulation/flocculation of produced water using *Moringa oleifera* Lam. as natural coagulant. **Brazilian Journal of Petroleum and Gas**, v. 4, n. 3, p. 111-117, 2010.
121. BONGIOVANI, M. C. et al. Os beneficios da utilização de coagulantes naturais para a obtenção de agua potavel. **Acta Scientiarum**, v. 32, n. 2, p. 167-170, 2010.

122. GHEBREMICHAEL, K. A. et al. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. **Water Research**, v. 39, n. 11, p. 2338-2344, 2005.
123. GHEBREMICHAEL, K. A.; GUNARATNA, K. R.; DALHAMMAR, G. Single-step ion exchange purification of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 526-532, 2006.
124. KATAYON, S. et al. Effects of storage conditions of *Moringa oleifera* seeds on its performance in coagulation. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1455-1460, 2006.
125. SOCIETY OF DYERS AND COLOURISTS. Colorants. In: SHORE, J. **Colorants and auxiliaries: organic chemistry and application properties**. Yorkshire, Inglaterra: Society of Dyers and Colourists, v. 1, 2002. p. 372.
126. ABOULHASSAN, M. A. et al. Improvement of paint effluents coagulation using natural and synthetic coagulant aids. **Journal of Hazardous Materials B**, v. 138, p. 40-45, 2006.
127. MISHRA, A.; BAJPAI, M. The flocculation performance of Tamarindus mucilage in relation to removal of vat and direct dyes. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1055-1059, 2006.
128. ZAHIRIM, A. Y.; TIZAOUI, C.; HILAL, N. Coagulation with polymers for nanofiltration pre-treatment of highly concentrated dyes: A review. **Desalination**, v. 266, p. 1-16, 2011.
129. BELTRAME, L. T. C. **Sistemas microemulsionados aplicados à remoção da cor de efluentes textéis**. 2006. 185 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidad Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2006.
130. RAFATULLAH, M. et al. Adsorption of methylene blue on low-cost adsorbents: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, p. 70-80, 2010.
131. BIBI, I.; BHATTI, H. N.; ASGHER, M. Comparative study of natural and synthetic phenolic compound as efficient laccase mediator for the transformation of cationic dye. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, p. 225-231, 2011.
132. DOGAN, M. et al. Adsorption kinetics of maxilon blue GRL onto sepiolite from aqueous solution. **Chemical Engineering Journal**, v. 124, p. 89-101, 2006.
133. DRAGONTECH & WALLERT AND PROVOST LAB. Ammonium Sulfate PPT. Protocol, 5 Novembro 2009. Disponível em: <<http://www.dragontech.com>>. Acesso em: 8 Agosto 2011.

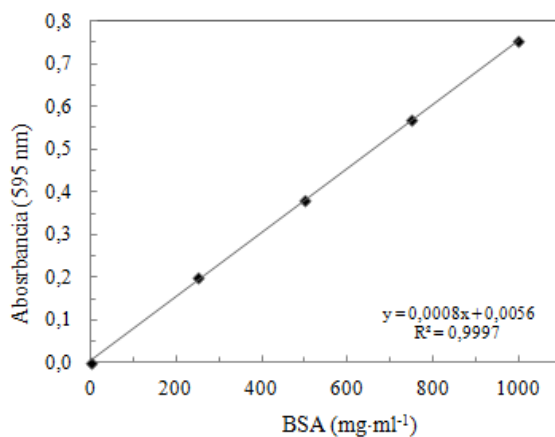
134. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16. ed. Arlington: Association of Analytical Communities, 1995.
135. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
136. BARMAN, K. et al. Tannins estimation, 2004. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/43638556/6506867-Tannin-Assay>>. Acesso em: 6 Setembro 2001.
137. PORTER, L. J.; HRSTICH, L. N.; CHAN, B. J. The conversion of proanthocyanidins oridelfinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, v. 223-330, p. 25.
138. ČEROVIĆ, L. S. et al. Point of zero charge of different carbides. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 297, p. 1-6, 2007.
139. AINOUIZ, I. L. et al. Agglutination of enzyme treated erythrocytes by Brazilian marine Algae. **Botanica Marina**, v. 35, p. 475-479, 1992.
140. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and wastewater**. 20. ed. Washington D.C.: American Public Health Association, 1998.
141. PÉREZ, O. P.; LAZO, F. J. Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicológicos y químicos de productos naturales. **Revista de Protección Vegetal**, v. 22, n. 1, p. 34-43, 2010.
142. TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, un tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.
143. COATES, J. **Interpretation of infrared spectra, a practical approach**. Em: Encyclopedia of Analytical Chemistry MEYERS, R. A.; (Ed.), Wiley 6 Sons, 2000.
144. KHAN, T. A.; QAYYUM, H.; AABGEENA, N. An novel and inexpensive procedure for the purification of concavalin A from jack bean (*Canavalia ensiformis*) extract. **European Journal of Applied Sciences** 2, , v. 2, p. 70-76, 2010.
145. PADMAJA, G. Evaluation of techniques to reduce assayable tannin and cyanide in cassava leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 712-716, 1989.
146. CAMARA, F. S.; MADRUGA, M. S. Cyanic acid, phytic acid, total tannin and aflatoxin contents of a Brazilian (Natal)

- multimistura preparation. **Revista de Nutrição de Campinas**, v. 14, n. 1, p. 33-36, 2001.
147. CHAKRABARTI, A.; PODDER, S. Complex carbohydrate-lectin interaction at the interface: a model for cellular adhesion. I. Effect of vesicle size on the kinetics of aggregation between a fatty acid conjugate of lectin and a liposomal asialoganglioside. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1024, n. 1, p. 103-110, 1990.
148. SOBRAL, P.; PALAZOLO, G. G.; WAGNER, J. R. Thermal behavior of soy protein fractions depending on their preparation methods, individual interactions, and storage conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 18, p. 10092–10100, 2010.
149. YAN, M. et al. Mechanism of natural organic matter removal by polyaluminum chloride: effect of coagulant particle size and hydrolysis kinetics. **Water Research**, v. 42, p. 3361-3370, 2008.
150. KIM, T. et al. Decolorization of disperse and reactive dye solutions using ferric chloride. **Desalination**, v. 161, p. 49-58, 2004.
151. MALL, I. D. et al. Adsorptive removal of malachite green dye from aqueous solution by bagasse fly ash and activated carbon-kinetic study and equilibrium isotherm analyses. **Colloids Surface A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 264, p. 17-28, 2005.

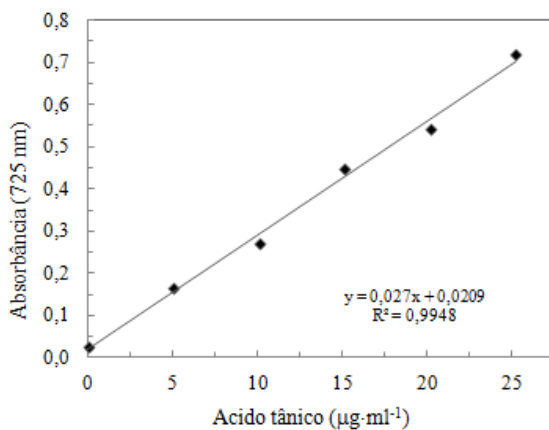


**ANEXO 1.**

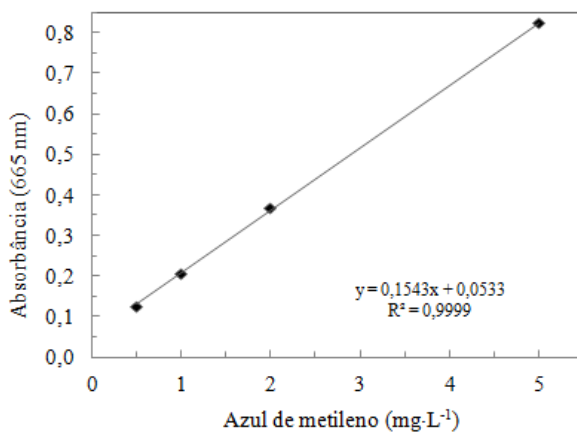
Curva padrão de albumina bovina serina (BSA)



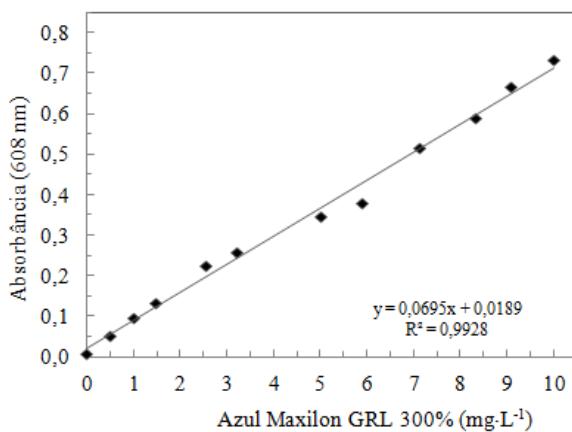
Curva padrão de ácido tânico.



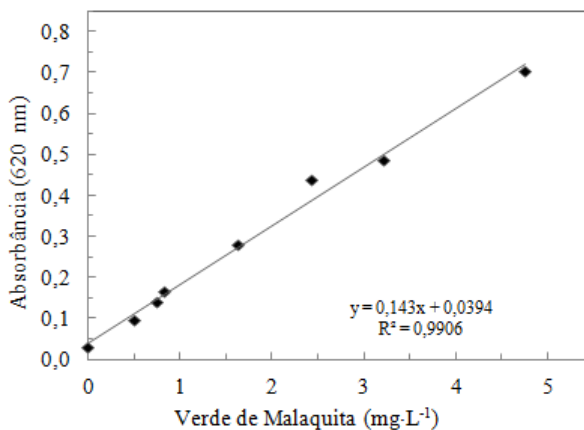
Curva padrão de AM.



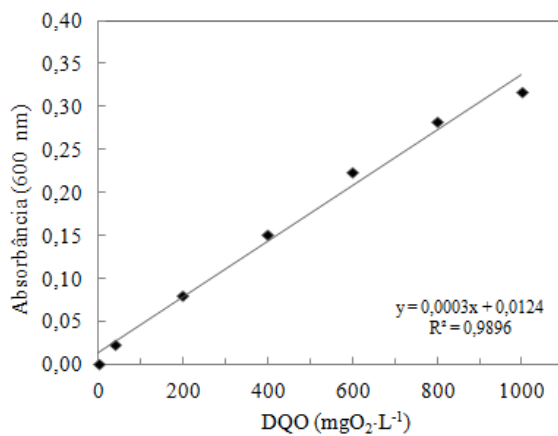
Curva padrão de AMG.



Curva padrão de VM.



Curva padrão de hidrogenoftalato de potássio



Curva de determinação do ponto de carga zero ( $\text{pH}_{\text{CZ}}$ ) para o extrato E5.

