



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
CURSO DE PÓS – GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA – CPGQB  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

**ESTUDO ELETROQUÍMICO DA TRIFLURALINA,  
ADSORÇÃO EM QUITOSANA, INTERAÇÃO COM O  
BIOSSENSOR *ds*DNA E TOXICIDADE FRENTE AO  
CARAMUJO *BIOMPHALARIA GLABATRA*.**

**Acácia Maria dos Santos Melo**

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Fabiane Caxico de Abreu  
Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup> Marília O. F. Goulart

Maceió – Alagoas  
- 2007 -



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
CURSO DE PÓS – GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA – CPGQB  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

**ESTUDO ELETROQUÍMICO DA TRIFLURALINA,  
ADSORÇÃO EM QUITOSANA, INTERAÇÃO COM O  
BIOSSENSOR *dsDNA* E TOXICIDADE FRENTE AO  
CARAMUJO *BIOMPHALARIA GLABATRA*.**

**Acácia Maria dos Santos Melo**

Tese apresentada ao Curso de Pós – Graduação  
em Química e Biotecnologia da Universidade  
Federal de Alagoas, como requisito para obtenção  
do grau de Doutor em Ciência.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Fabiane Caxico de Abreu  
Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup> Marília O. F. Goulart

Maceió – Alagoas  
- 2007 -

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

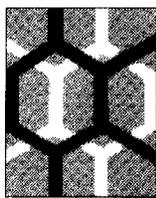
M528e Melo, Acácia Maria dos Santos.  
Estudo eletroquímico da trifluralina, adsorção em quitosana, interação com o biossensor dsDNA e toxicidade frente ao caramujo *Biomphalaria glabatra* / Acácia Maria dos Santos Melo. – Maceió, 2007.  
129 f. : il. tabs., graf.

Orientadora: Fabiane Caxico de Abreu.  
Co-Orientadora: Marília O. F. Goulart.  
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2007.

Bibliografia: f. 115-129.

1. Eletroquímica. 2. Trifluralina. 3. Quitosana. 4. Biossensor de DNA. I. Título.

CDU: 544.6



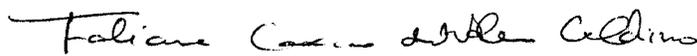
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

Instituto de Química e Biotecnologia  
Universidade Federal de Alagoas  
Tel. 55 82 3214-1384 Fax. 55 82 3214-1389  
www.cpgqb@qui.ufal.br

Campus A. C. Simões  
Tabuleiro dos Martins  
57072-970  
Maceió-AL  
Brasil

Membros da Comissão Julgadora de Defesa de Tese da doutoranda Acácia Maria dos Santos Melo, intitulada: "**Estudo eletroquímico da Trifluralina, adsorção em Quitosana, interação com o biossensor dsDNA e toxicidade frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata***", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 18 de dezembro de 2007, às 08h30min na sala de reuniões do IQB da UFAL.

COMISSÃO JULGADORA



Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Fabiane Caxico de Abreu Galdino

Orientadora – PPGQB/IQB/UFAL.

CPF: 460.304.255-87



Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Marília Oliveira Fonseca Goulart

Co- Orientadora – PPGQB/IQB/UFAL

CPF: 144.766.304-72



Prof. Dr. Cláudio Luis Donnici

DQ/UFMG

CPF: 094.540.868-47



Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Brancilene Santos de Araujo

Arapiraca/UFAL

CPF: 956.530.074-04



Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Simoni Margaret Plentz Meneghetti

PPGQB/IQB/UFAL

CPF: 406.980.760-87



Prof. Dr. Antonio Euzébio Goulart Sant'Ana

PPGQB/IQB/UFAL

CPF: 118.677.606-49

## *Dedico*

Este trabalho a **Deus**, por permitir que eu pudesse transpor os espinheiros do seu jardim para enfim aspirar ao seu perfume exalado.

Aos meus amados pais **Pedro** (*in memoriam*) pelas melhores lembranças, por nunca ter deixado de estar ao meu lado, mesmo longe dos meus olhos, pois permanece vivo no meu coração. E a minha mãe **Marizete** mulher batalhadora e guerreira a quem devo tudo que sou.

Ao meu marido **Ciro** pela compreensão, carinho, dedicação, pelo amor e paciência com a minha ausência. Se não fosse por tudo isso não conseguiria chegar até o fim.

## *Agradecimento Especial*

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fabiane Caxico de Abreu Caldino pela dedicação e orientação, sem as quais não seria possível realizar este sonho e acima de tudo pela sua amizade, paciência, delicadeza, confiança e compreensão nos momentos conturbados.

A minha amiga **Branci** por tudo, sem sua ajuda jamais conseguiria chegar até o fim. *Meu Muito Obrigado.*

E a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marília de Oliveira Fonseca Goulart, por ter me dado à oportunidade de realizar este trabalho no seu laboratório, pelos ensinamentos e paciência.

## *Agradeço*

A Aline que sempre esteve presente nos ensinamentos no laboratório e os mais importantes, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

## *Agradecimentos*

- A todo o pessoal do Departamento de Química da UFAL.
- A Rui pela sua amizade, brincadeiras muitas vezes nos momentos difíceis que enfrentei realizando esse trabalho.
- A Iara, pelos seus ensinamentos de adsorção necessários para o término desse trabalho.
- A todos do laboratório de eletroquímica, em especial Francine, Antônio, Paulo, Augusto e Cícero.
- As minhas amigas Patrícia, Ana, Emília e Andréa pelos conselhos, amizade, força e brincadeiras.
- A Aldy pela confecção das vidrarias.
- Aos professores do Programa de Pós – Graduação em Química e Biotecnologia da UFAL que contribuíram para meu aprendizado.
- Ao professor Nivaldo pelas correções e ensinamentos.

- Ao professor Péricles Barreto Alves do Dept<sup>o</sup> de Química da UFS, pela análise em CG/ EM.
  
- Ao professor Antônio Euzébio por ter permitido a realização dos testes de moluscicida.
  
- A Cenira pela realização dos testes de moluscicida.
  
- Aos meus amigos da UFS que sempre torceram e incentivaram para a conclusão desse trabalho, principalmente Marcli.
  
- A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.
  
- A todas as pessoas que amo, pois sem elas qualquer sonho ou desejo em minha vida não teria significado.
  
- A CAPES/ PQI, ao CNPq e à FAPEAL pelo apoio financeiro ao grupo.

## SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas	xiii
<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
1.1- Revisão Bibliográfica	02
1.2- O Herbicida: <b>TRIFLURALINA (TRF)</b>	06
1.2.1- Comportamento do Herbicida Trifluralina nas Plantas	08
1.2.2- Comportamento do Herbicida Trifluralina no Ambiente	09
1.2.2.1- no Solo	09
1.2.2.2- na Água	12
1.2.2.3- no Ar	13
1.3- Técnicas Aplicadas à Análise de Pesticidas	14
1.3.1- Métodos Cromatográficos	14
1.3.2. - Métodos Eletroanalíticos	15
1.4- Técnicas Eletroquímicas Utilizadas	18
1.4.1- Considerações Gerais	18
1.4.2- Voltametria Cíclica (VC)	19
1.4.3- Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)	21
1.4.4- Voltametria de Onda Quadrada (VOQ)	23
1.5- Eletrólise	25
1.6- Processos Oxidativos Avançados	26
1.6.1- Reação de Fenton	28
1.6.1.1- Fatores Condicionantes da Reação	30
1.7- Quitina/Quitossana	31
1.7.1- Quitossana Funcionalizada	35
1.7.2- Quitossana Como Adsorvente	37

1.8- Isotermas de Adsorção	38
1.8.1- Termodinâmica de Adsorção	39
1.8.2.- Isoterma de Langmiur	41
1.9- Biossensor a Base de DNA	43
1.9.1- Comportamento Eletroquímico do DNA	45
<b>2- OBJETIVOS</b>	<b>48</b>
2.1- Gerais	48
2.2- Específicos	48
<b>3 – EXPERIMENTAL</b>	<b>49</b>
3.1- Preparações Auxiliares	49
3.1.1- Extração da Trifluralina ( <b>TRF</b> )	49
3.1.2- Preparo da Solução Tampão	50
3.1.3- Preparo da Solução de Trifluralina ( <b>TRF</b> )	50
3.1.4- Preparo do Gel de Quitosana	50
3.1.5- Preparo do gel de DNA	50
3.1.6- Preparo da Solução CoTSPc	51
3.2- Técnicas Eletroquímicas	51
3.2.1- Voltametria Cíclica (VC)	51
3.2.2- Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)	51
3.2.3- Voltametria de Onda Quadrada (VOQ)	51
3.2.4- Eletrólise	52
3.2.4.1- Eletrodos	52
3.2.4.2- Procedimento Geral	52
3.3- Reação de Eletro - Fenton	54
3.3.1- Procedimentos e Equipamentos	54
3.4- Análise de CG-EM	54
3.5- Análise Espectroscópica	55
3.5.1- Meio Etanólico	55
3.5.2- Meio Ácido	55

3.5.3- Efeito do Tempo com Agitação	55
3.5.4- Efeito do Tempo sem Agitação	56
3.5.5- Efeito da Variação da Massa de Quitosana	56
3.6- Estudo das Isotermas de Adsorção	56
3.6.1- Efeito da Variação da Massa de Quitosana	56
3.6.2- Cinética de Adsorção	56
3.6.3- Isotermas de Adsorção da <b>TRF</b> em Quitosana	57
3.7- Eletrodo Modificado	57
3.7.1- Preparo do Eletrodo Modificado com Quitosana (EMQ)	57
3.7.2- Preparo do Eletrodo Modificado com DNA	58
3.7.2.1- Preparo do Biossensor de DNA	58
3.7.3- Preparo do Eletrodo com CoTSPc e Gel de Quitosana	59
3.8- Atividade Moluscicida	59
3.8.1- Ensaio Biológico	59
3.8.2 – Análise Estatística	61
<b>4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>62</b>
4.1- Caracterização do Princípio Ativo do herbicida Trifluralina	62
4.2- Estudo Eletroquímico da <b>TRF</b> em Eletrodo de Carbono Vítreo	65
4.2.1- Voltametria Cíclica (VC)	65
4.2.2- Voltametria de Onda Quadrada (VOQ)	71
4.2.3- Estudo da Variação do Potencial de Redução com o pH da <b>TRF</b>	75
4.2.4- Efeito da Concentração na Corrente de Pico	78
4.3- Estudo da Eletrogradação da Trifluralina	80
4.3.1- Coulometria e Eletrólise Exhaustiva	80
4.3.2- Reação de Fenton - eletrofenton	84
4.4- Estudo da Adsorção de <b>TRF</b> em Quitosana	87
4.4.1- Análise Espectroscópica da <b>TRF</b> em Quitosana	88
4.4.2- Efeito da Variação da Massa	91
4.4.3- Cinética de Adsorção	92

4.4.4- Isotermas	93
4.5- Estudo Eletroquímico da <b>TRF</b> em Eletrodo Modificado com Quitosana (EMQ)	98
4.5.1- Voltametria Cíclica (VC)	98
4.5.2- Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)	98
4.5.3- A Curva Analítica da <b>TRF</b> em EMQ	100
4.5.4- Eletrodo Modificado com CoTSPc e Gel de Quitosana	103
4.6- Estudo da Interação da TRF com macromolécula do DNA e da Toxicidade frente ao caramujo <i>Biomphalaria glabrata</i>	104
4.6.1- Estudo Eletroquímico da <b>TRF</b> em Biossensor de <i>dsDNA</i>	105
4.6.2- Atividade Moluscicida – Caramujo Adulto	109
<b>5 – CONCLUSÃO</b>	<b>112</b>
<b>6- PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>114</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>115</b>

## RESUMO

**Palavra-chave:** Trifluralina, eletroquímica, quitosana, biossensor de DNA.

O presente estudo aborda a investigação do comportamento eletroquímico do herbicida Trifluralina (**TRF**), umas das substâncias mais aplicadas para o controle de gramíneas, em eletrodo de carbono vítreo, através do uso de técnicas eletroquímicas visando estabelecer o mecanismo de redução, bem como verificar a interação deste herbicida com o biopolímero quitosana através das isotermas de adsorção e avaliar a possibilidade de aplicação do biossensor à base de quitosana para a sua quantificação. O comportamento eletroquímico da **TRF** em eletrodo de CV apresentou dois picos de redução, ambos de natureza difusional, referentes à redução dos grupos nitro, e uma onda anódica correspondente à oxidação do grupo hidroxilamínico gerado na varredura catódica. A eletrólise preparativa levou ao consumo de  $7,75 \text{ F mol L}^{-1}$  e ao completo desaparecimento das duas ondas de redução e a reação de eletron-fenton levou a formação de possíveis estruturas diméricas resultantes do acoplamento entre os radicais da **TRF** obtidos a partir do ataque da hidroxila radicalar. A **TRF** adsorve em quitosana mediante interação eletrostática entre o íon amônio do biopolímero e o dipolo da molécula do herbicida por um processo espontâneo e termodinamicamente favorável e o eletrodo modificado com quitosana pode ser utilizado para a detecção da **TRF** onde o limite de detecção foi na ordem de  $7,45 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  dez vezes menor do que em eletrodo de CV, mostrando assim uma maior sensibilidade. O estudo eletroquímico da **TRF** em biossensor de *dsDNA*, tanto em solução como incorporado na superfície do eletrodo de CV, mostrou que a **TRF** interage com o *dsDNA* tanto na sua forma não reduzida quanto após a eletrorredução *in situ*. Ensaios moluscidas mostraram que a **TRF** apresenta toxicidade frente ao caramujo *Biomphalaria Glabrata*.

## ABSTRACT

**Key words:** trifluralin; electrochemical; chitosan; biosensor of DNA

The electrochemical behavior of the herbicide trifluralin (TRF), used in the weed control, was investigated in the present study by using a vitreous carbon electrode (VCE). The reduction mechanism as well as the interaction of this herbicide with the biopolymer chitosan was determined by electrochemical techniques through adsorption isotherms to evaluate the potential application of a chitosan-based biosensor to quantify it. The TRF electrochemical behavior in a VCE lead to two reduction peaks of diffusional nature related to the reduction of the two nitro group and an anodic wave correspondent to the oxidation of the group hydroxylamine generated in the cathodic sweep. A consumption of  $7,75 \text{ F mol L}^{-1}$  and the complete disappearance of the two reduction waves were observed during the preparative electrolysis, while the electron-Fenton reaction gave possibly dimeric structures due to the coupling between TRF radicals produced after hydroxyl radical attack. The TRF is adsorbed in chitosan by electrostatics interaction between the biopolymer ammonium ion and the dipoles in the herbicide molecule through a spontaneous and thermodynamically favorable process. The electrode modified with chitosan can be used to analyze TRF once the detection limit was ten times slower than that unmodified electrode. Some previous studies showed that TRF is toxic to the periwinkle *Biomphalaria Glabrata* and interacts with the DNA macromolecule.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Fórmula estrutural da trifluralina.

**Figura 2:** Degradação microbiana do herbicida trifluralina por via aeróbica (A) e anaeróbica (B).

**Figura 3:** Fotodegradação do herbicida trifluralina.

**Figura 4:** Técnica da VC. Perturbação aplicada e resposta obtida.

**Figura 5:** Voltametria de Pulso Diferencial (A) Esquema de aplicação de potenciais (B) perfil corrente-potencial esquemático.

**Figura 6:** Representação esquemática da VOQ.

**Figura 7:** Voltametria de Onda Quadrada (VOQ), perfil corrente-potencial. esquemático. (A) Sistema reversível, (B) Sistema irreversível.

**Figura 8:** Representação esquemática da produção eletrocatalítica dos radicais hidroxil através do processo eletro-fenton.

**Figura 9:** Representação esquemática das estruturas de celulose e quitina.

**Figura 10:** Representação esquemática da estrutura de quitosana, com X representando o grau de acetilação.

**Figura 11:** Esquema da reação entre a quitosana, glutaraldeído e a enzima peroxidase.

**Figura 12:** Ligações de hidrogênio entre as nucleobases do DNA em fita dupla.

**Figura 13:** Voltamogramas de Pulso Diferencial (carbono vítreo) para a mistura das bases guanina, adenina ( $2,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ ) timina e citosina ( $2,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ ). Tampão fosfato pH 7,4 velocidade ( $v = 5 \text{ mVs}^{-1}$ ), amplitude 50mV.

**Figura 14:** Mecanismo de oxidação para a guanina e adenina em meio prótico.

**Figura 15:** Esquema de cela de eletrólise em eletrodo de feltro de carbono.

**Figura 16:** Agitador orbital contendo a suspensão de quitosana e TRF.

**Figura 17:** Procedimento de preparação do eletrodo modificado com quitosana, dsDNA ou quitosana/CoTSPC.

**Figura 18:** Teste moluscicida

**Figura 19:** Espectro na região de Infravermelho da TRF.

**Figura 20:** Cromatograma CG-EM da TRF.

**Figura 21:** Espectro de EM da TRF.

**Figura 22:** Fragmentações EM sugeridas da TRF.

**Figura 23:** Voltamograma Cíclico da TRF,  $c = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato/etanol (1:1)  $\text{pH}_{\text{ap}} = 7,56$  em eletrodo de carbono vítreo, (A)  $v = 0,035 \text{ Vs}^{-1}$  e (B)  $v = 0,100 \text{ Vs}^{-1}$ .

**Figura 24:** Voltamograma Cíclico da TRF,  $c = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato/etanol (1:1)  $\text{pH}_{\text{ap}} = 7,56$  em eletrodo de carbono vítreo,  $v = 0,75 \text{ Vs}^{-1}$ .

**Figura 25:** Voltamograma Cíclico da TRF,  $c = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato/etanol (1:1)  $\text{pH}_{\text{ap}} = 7,56$  em eletrodo de carbono vítreo. Efeito da velocidade de varredura.

**Figura 26:** Voltametria Cíclica da TRF ( $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato/etanol (1:1), eletrodo de carbono vítreo. (A):  $I_{\text{pc}} \text{ vs } v^{1/2}$ ; (B):  $I_{\text{pc}} \text{ vs } v$ ; (C):  $E_{\text{pc}} \text{ vs } \log v$ ; (D):  $E_{\text{p}/2} \text{ vs } \log v$ .

**Figura 27:** Voltamograma Cíclico da TRF,  $c = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato/etanol (1:1)  $\text{pH}_{\text{ap}} = 7,56$  em eletrodo de carbono vítreo. Gráfico de corrente normalizada.

**Figura 28:** Esquema da provável oxidação da hidroxilamina formada após a redução da TRF.

**Figura 29:** Voltamograma de Onda Quadrada para a TRF em tampão fosfato/etanol (1:1)  $\text{pH}_{\text{ap}} = 7,0$  com  $a = 50\text{mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ ,  $f = 100\text{s}^{-1}$  com separação das componentes de corrente direta, reversa e resultante.

**Figura 30:** Voltamograma de Onda Quadrada para a TRF em tampão fosfato/etanol (1:1)  $\text{pH}_{\text{ap}} = 7,0$  com  $a = 50\text{mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  em função da variação de freqüência de aplicação dos pulsos de potencial, com inserção da relação da corrente de pico com a raiz quadrada da freqüência.

**Figura 31:** Dependência Linear do potencial de pico com o logaritmo da freqüência da onda quadrada para os dados extraídos da **Figura 30**.

**Figura 32:** Voltamograma de Onda Quadrada para a TRF em tampão fosfato/etanol (1:1)  $\text{pH}_{\text{ap}} = 7,0$  com  $f = 50 \text{ Hz}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  em função da variação da amplitude dos pulsos de potencial.

**Figura 33:** Dependência da corrente de pico com a amplitude da TRF em tampão fosfato/etanol (1:1),  $\text{pH}_{\text{ap}} = 7,0$  com  $f = 50\text{Hz}$ ,  $\Delta E_s = 2\text{ mV}$  em função da variação da amplitude dos pulsos de potencial.

**Figura 34:** VPD da TRF na  $c = 1,0 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$  em 3D em função do pH.

**Figura 35:** (A) e (B) Gráficos de  $E_p$  vs pH para os picos da VPD correspondentes à redução da TRF. (C) Gráfico obtenção do  $\text{pK}_a$  para a TRF,  $a = 50\text{ mV}$ , tempo de pulso =  $70\text{ ms}$ ,  $v = 5\text{ mVs}^{-1}$ .

**Figura 36:** Esquema de dissociação do sal de amônio aromático (TRF).

**Figura 37:** (A) VPD da TRF para várias concentrações,  $0,1\text{ mol L}^{-1}$ , tampão fosfato/etanol (1:1)  $\text{pH}_{\text{ap}} = 7,0$ ,  $a = 50\text{ mV}$ , tempo de pulso =  $70\text{ ms}$ ,  $v = 5\text{ mVs}^{-1}$ . (B) relação entre a corrente de pico com a concentração da TRF.

**Figura 38:** (1) VC da TRF antes da eletrólise,  $c = 1,52 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ , eletrólito tampão acetato/etanol (1:1)  $\text{pH}_{\text{ap}} = 6,39$ . (2) VC do produto de eletrólise após consumo de 4F. (3) VC do produto de eletrólise após consumo de 8F.

**Figura 39:** Cromatograma CG-EM da mistura reacional resultante da eletrólise da TRF.

**Figura 40:** Espectros de massa das principais substâncias (figura 39) observadas no CG.

**Figura 41:** Esquema sugerido para a degradação da TRF.

**Figura 42:** (A) Cromatograma CG-EM da TRF. (B) Mistura reacional após a reação eletrofenton.

**Figura 43:** Espectros de massa dos produtos resultantes da reação eletrofenton da TRF.

**Figura 44:** Espectro no UV-vis da TRF em meio etanólico e meio ácidos respectivamente.

**Figura 45:** Gráficos do efeito da variação da massa de quitosana em meio etanólico e meio ácido respectivamente.

**Figura 46:** Espectro da TRF em meio ácido após permanecer em contato com a quitosana por 2h de agitação.

**Figura 47:** Espectro de absorção no UV-Vis da TRF com quitosana em meio ácido, com a variação do tempo.

**Figura 48:** Razão da TRF adsorvida por unidade de massa de quitosana em função da massa de quitosana a 25° C, 150 rpm,  $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de TRF, 4h.

**Figura 49:** Cinética de adsorção de TRF em quitosana, a 25° C, 150 rpm,  $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de TRF, 180 mg de quitosana.

**Figura 50:** Isotermas de adsorção de TRF em quitosana em função da concentração de equilíbrio a 25, 30, 35 e 40°C. Os experimentos feitos em triplicata.

**Figura 51:** Esquema representando uma possível interação da TRF com quitosana.

**Figura 52:** Isoterma de adsorção da TRF em quitosana em função da concentração de equilíbrio a 25°C com  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  de NaCl.

**Figura 53:** Voltamograma Cíclico da TRF,  $c = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  obtido em EMQ com eletrólito tampão fosfato/etanol (1:1),  $\text{pH}_{\text{ap}} = 7,0$  e  $v = 0,100 \text{ Vs}^{-1}$ .

**Figura 54:** Voltamograma de Pulso Diferencial obtido em  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  com eletrólito tampão fosfato/etanol (6:4) para a TRF. a (●●●) eletrólito suporte em eletrodo EMQ, b (- -) VPD da TRF em eletrodo de CV e c (—) EMQ em solução de TRF. A concentração de TRF em solução,  $c = 5,79 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Concentração de quitosana no eletrodo de CV  $30 \text{ mg L}^{-1}$ .

**Figura 55:** (A) VPD da TRF em EMQ para várias concentrações, eletrólito tampão fosfato/etanol (6:4),  $\text{pH}_{\text{ap}} = 7,0$ ,  $a = 50 \text{ mV}$ , tempo de pulso = 70 ms,  $v = 20 \text{ mVs}^{-1}$ . (B) Efeito da corrente de pico e a concentração da TRF.

**Figura 56:** Voltametria de Pulso Diferencial ( $a = 50 \text{ mV}$ ,  $v = 10 \text{ mVs}^{-1}$ ) realizados em tampão fosfato/álcool (1:1)  $\text{pH}_{\text{ap}} = 7,0$  para eletrodo de carbono vítreo modificado com Qui/CoTSPc (a); eletrodo modificado com Qui/CoTSPc+TRF após 10min de desaeração (b); eletrodo modificado com Qui/CoTSPc + TRF após a 1ª corrida (c); eletrodo modificado com Qui/CoTSPc + TRF com adição de oxigênio (d).

**Figura 57:** Voltamograma de pulso diferencial da TRF em um biossensor de dsDNA, tampão acetato, pH 4,5. Efeito da concentração da TRF.

**Figura 58:** Voltamograma de pulso diferencial da TRF em um biossensor de dsDNA, tampão acetato, pH 4,5. Análise do tempo de exposição.

**Figura 59:** Voltamograma de pulso diferencial da **TRF** em um biossensor de *dsDNA*, tampão acetato, pH 4,5 em presença da **TRF**  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  após redução *in situ*.  $E_{ap} = -0,800 \text{ V}$ ;  $t_d = 120 \text{ s}$ .

**Figura 60:** Esquema de oxidação da guanina e da 8-oxiguanina.

## LISTA DE TABELA

**Tabela 1:** Classificação toxicológica dos agrotóxicos em função  $DL_{50}$ .

**Tabela 2:** Estruturas de alguns herbicidas.

**Tabela 3:** Análise de alguns pesticidas através de técnicas cromatográficas.

**Tabela 4:** Aplicação das técnicas eletroanalíticas em estudos envolvendo análise de pesticida.

**Tabela 5:** Testes diagnósticos em VC para processos reversíveis, irreversíveis e quase-reversíveis.

**Tabela 6:** Potenciais de Redução de Algumas espécies.

**Tabela 7:** Sistemas mais estudados para a geração de radicais hidroxilas.

**Tabela 8:** Tampões para eletrólito suporte.

**Tabela 9:** Parâmetros eletroquímicos pelo estudo da influência da velocidade de varredura da TRF.

**Tabela 10:** Dados de Adsorção e Termodinâmicos da interação TRF-quitosana.

**Tabela 11:** Atividade Moluscicida da Trifluralina frente à *Biomphalaria glabrata*. Teste preliminar.

**Tabela 12:** Experimento realizado em triplicata, contendo cada copo 10 caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*.

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$a$  = amplitude

$A_{(s)}$  = adsorbato na solução.

$A_{\text{adsorvido}}$  = adsorbato no interior do sólido adsorvente

AdSV = voltametria adsortiva.

$b$  = valor do coeficiente angular da curva analítica

$C_{\text{eq}}$  = concentração de equilíbrio no sobrenadante.

CELMM = Complexo Estuarino Lagunar Mundaú – Manguaba

CG – EM: Cromatografia Gasosa Acoplada Espectrometria de Massa (Gas Chromatography/ Mass Spectrometry).

CV: carbono vítreo.

CoTSPc = Ftalocianina Tetrassulfonada de Cobalto (Cobalt Tetrasulfonated Phthalocyanine).

$D_a$  = Dalton.

DC = polarografia de corrente direta.

$DL_{50}$  = Dose Letal.

DNA = Ácido Desorribonucléico

$dsDNA$  = DNA nativo, *double-strand* ou fita dupla.

DP = pulso diferencial.

EC= Mecanismo eletródico consistindo de etapa de transferência eletrônica e etapa química.

$E_{1/2}$  = potencial de meia onda ou pico de meia altura.

$E_{p_{c1}}$  = potencial de pico catódico 1ª onda.

$E_{p_{c2}}$  = potencial de pico catódico 2ª onda.

EQCM = Microbalança eletroquímica de cristal de quartzo

EM: Espectrometria de Massas

EMQ = eletrodo modificado com quitosana.

$\Delta E_s$  = variação do incremento de potencial.

ES= Eletrólito Suporte

$f$  = frequência

F = constante de Faraday.

$\Delta G^{\circ}_{\text{ads}}$  = variação de energia livre padrão.

$\Delta H^{\circ}_{\text{ads}}$  = variação de entalpia padrão.

IBAMA= Instituto Brasileiro de Meio-Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.

$\Delta I$  = diferença de corrente.

$I_{p_{c1}}$  = corrente de pico catódico 1ª onda.

$I_{\text{res}}$  = corrente residual.

IV: Espectrometria na região de Infravermelho.

$K_a$  = constante de velocidade de adsorção.

K = constante que relacionam a intensidade de adsorção.

$K_d$  = constante de velocidade de dessorção.

LD = limite de detecção.

m = massa eletrolisada.

M = massa molecular da espécie eletroativa

n = número de elétrons envolvidos.

ND = não detectada.

NDPA= Nitrosodipropilamina.

pH = potencial hidrogeniônico.

pH<sub>ap</sub> = potencial hidrogeniônico aparente.

PCD = polografia de corrente direta.

PF= ponto de fusão.

PPD = polografia de pulso diferencial.

POAs = processos oxidativos avançados.

$Q_{\text{liq}}$  = carga líquida.

$Q_{\text{res}}$  = carga residual.

R = constante dos gases.

r = coeficiente de correlação.

rpm = rotação por minuto.

$S_B$  = desvio padrão da média aritmética das correntes dos brancos.

t= tempo de eletrólise.

TE= Transferência Eletrônica.

TRF: Trifluralina ( $\alpha, \alpha, \alpha$ - trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropil-p-toluidina).

USEPA = Agency of North American Environmental Protection .

UV-vis: Espectrometria de ultravioleta visível.

VC = voltametria cíclica.

$v$  = velocidade de varredura.

$v^{1/2}$  = raiz quadrada da velocidade de varredura.

VPD = voltametria de pulso diferencial.

VPDVR= Voltametria de Pulso diferencial de varredura rápida.

VOQ = voltametria de onda quadrada.

VVL = voltametria de varredura linear.

$\alpha$  = coeficiente de transferência eletrônica.

$\Gamma$  = quantidade de herbicida adsorvido no sólido.

$\Gamma_m$  = capacidade de adsorção máxima.

$\tau$  = período da onda quadrada.

$\theta$  = fração da superfície que é coberta com a substância.

## **1 – INTRODUÇÃO**

O problema da poluição ambiental atinge todo o planeta. Em muitas regiões brasileiras, que abrigam pólos industriais e de alta densidade demográfica, o ecossistema vem sofrendo uma degradação efetiva provocada pelos esgotos domésticos e industriais. No Nordeste, a situação não é diferente e esses problemas são agravados tanto pela falta de saneamento quanto pelos impactos causados pela agroindústria.

No Estado de Alagoas, localiza-se um dos estuários mais produtivos da costa brasileira, o Complexo Estuarino Lagunar Mundaú-Manguaba (CELMM), Maceió-AL. O Complexo Estuarino é formado por duas lagoas (Mundaú e Manguaba) e por vários canais que as conectam uma com a outra e com o Oceano Atlântico. A superfície total do estuário é de 81 km<sup>2</sup>. No Complexo Estuarino, devido ao grande aporte de nutrientes, surgiu um ecossistema altamente produtivo, em que se desenvolveu um grupo de organismos que constituem fontes de alimento para a população local. Essa população depende diretamente da produção pesqueira ali produzida. O CELMM vem sofrendo o impacto ambiental produzido por diversas atividades humanas. Nas margens dos rios que ali deságuam (rios Mundaú, Paraíba e Sumaúma), instalaram-se usinas para a produção de açúcar e destilarias de álcool. O cultivo extensivo da cana de açúcar faz com que sejam carregados para o CELMM, através das águas fluviais, agrotóxicos e fertilizantes utilizados na agroindústria canavieira. Apesar de hoje já haver certo controle sobre essas atividades industriais, ainda se constata lançamentos, nos rios, de vinhaça e águas de lavagem da cana, onde a contaminação por pesticidas vem sendo observada.

As fontes de contaminação de ar, solo e água são inúmeras e inúmeros são igualmente, as formas de impedir ou minimizar a poluição. Para conduzir a poluição a índices aceitáveis é necessária a implantação de medidas preventivas e corretivas. As principais técnicas disponíveis envolvem processos de adsorção, precipitação, degradação química, eletroquímica e fotoquímica, aliadas àquelas que envolvem o uso de microorganismos, em que se recorre a bioestimulação e biorremediação. O desenvolvimento de tecnologia adequada para desenvolver tratamento de resíduos tóxicos é objeto de grande interesse nos últimos anos. Técnicas eletroquímicas

aliadas aos processos de extração e posterior descontaminação contribuem significativamente para a remoção de diversos poluentes do meio ambiente.

No presente trabalho propõe-se estudar o desenvolvimento de métodos que possam ser utilizados em descontaminação de meios contaminados pelo herbicida Trifluralina através de processos adsortivos, utilizando técnicas espectroscópicas e eletroquímicas. A aplicação de técnicas eletroanalíticas para estudos de detecção e eletrodegradação desse herbicida foi também avaliados.

O estudo do herbicida TRF se deve ao fato dele ser muito utilizado na agricultura, em especial no Estado de Alagoas e no agreste do Estado de Sergipe para o controle de ervas daninhas nas plantações de milho, feijão, cana de açúcar e nas pastagens. Devido também apresentar uma alta toxicidade e uma longa persistência no ambiente.

## **1.1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

A agricultura praticada mundialmente ainda é altamente dependente de insumos químicos, dentre os quais os pesticidas, mais comumente denominados de agrotóxicos ou defensivos agrícolas. Os pesticidas têm sido usados por mais de quarenta anos devido a sua eficácia em controlar uma grande variedade de pragas, doenças e plantas daninhas que infestam as lavouras, garantindo assim uma maior produtividade e, conseqüentemente, o retorno econômico da atividade agrícola. Sem o uso de pesticidas, a produção e a qualidade dos alimentos seria drasticamente afetada, além dos riscos de gerar a falta de alimentos e de promover alta nos preços dos produtos agrícolas. Entretanto, muitos questionamentos são feitos sobre a necessidade da utilização destes produtos na agricultura para gerar uma maior produção de alimentos, devido aos riscos que podem causar à saúde do consumidor e ao meio ambiente em geral, oriundos da sua utilização inadequada (BAIRD, 2002).

Os riscos maiores causados pelo emprego de pesticidas, tais como saúde da população e contaminação do meio ambiente, muitas vezes passa despercebida pela sociedade diante dos benefícios econômicos gerados, por isso é importante utilizá-los na agricultura somente quando não existir outro recurso economicamente eficaz. No entanto, tem-se observado ao longo dos anos, que o uso indiscriminado

dos pesticidas tem levado ao aparecimento de resíduos desses compostos nos diferentes compartimentos do meio ambiente (água, solo e ar) e em produtos alimentícios. Diante desse fato e da periculosidade que os pesticidas apresentam à saúde humana e à manutenção da biodiversidade, há hoje uma necessidade urgente de se intensificarem os estudos que possibilitem um monitoramento eficiente de possíveis contaminações do ambiente (www. jornalexpress.com.br, acessado em 02/06/2004).

Para agravar o quadro, em muitas regiões do Brasil são feitas aplicações de pesticidas diretamente nas águas superficiais, para combater as larvas de insetos transmissores de doenças como a malária. Muitas vezes são os próprios rios que abastecem as cidades.

A toxicidade da maioria dos agrotóxicos é expressa em termos de valor da Dose Letal (DL<sub>50</sub>), por vias orais, representadas por miligrama do produto tóxico por quilo de peso vivo, necessário para matar 50% dos organismos testes.

Assim, para fins de prescrição das medidas de segurança contra riscos para a saúde humana, os produtos são enquadrados em função do DL<sub>50</sub>, inerente a cada um deles, conforme mostra a Tabela 1 (Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos, 1999).

**Tabela 1:** Classificação toxicológica dos agrotóxicos em função do DL<sub>50</sub>.

<b>Classe toxicológica</b>	<b>Descrição</b>	<b>DL<sub>50</sub> mg kg<sup>-1</sup></b>
I	Extremamente tóxicos	< 50
II	Muito tóxicos	50 a 500
III	Moderadamente tóxicos	500 a 5000
IV	Pouco tóxicos	> 5000

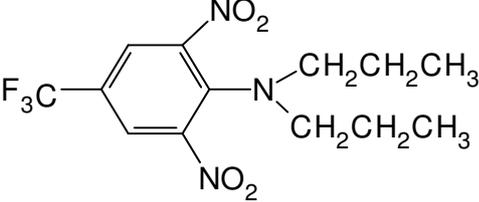
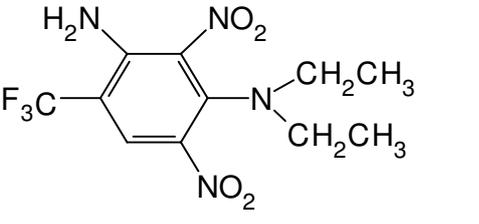
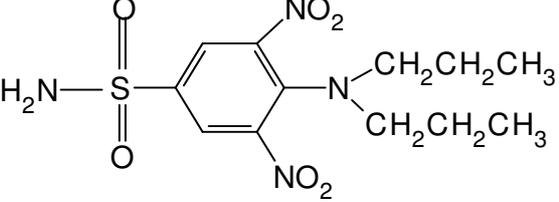
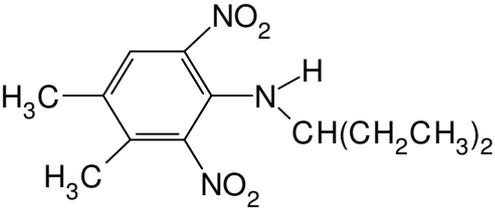
A preocupação com a contaminação por agrotóxico no Brasil tem despertado o interesse de pesquisadores. O ambiente (RIEDER, 1999; DORES, 2000), os alimentos (PIZANO e BAPTISTE, 1998; VIEIRA, 1999) e o leite humano (MATUO e *et al.*,1990; OLIVEIRA, 1997) têm sido alvos de estudo em algumas regiões brasileiras, porém poucos autores, tais como SCHIO (2001), GUIMARÃES (2000),

RIBEIRO (1999) e o IBGE (1999) têm desenvolvido trabalhos que avaliam a periculosidade ambiental, decorrente do uso dos agrotóxicos (VIEIRA *et al.*, 2001).

O consumo de agrotóxicos no Brasil é de aproximadamente 3,2 Kg de ingrediente ativo por hectare. Dentre os agrotóxicos, os herbicidas constituem o grupo mais empregado na agricultura (aproximadamente 65%). Esses herbicidas têm como função controlar plantas daninhas, um dos fatores redutores de produtividade, sem prejudicar as culturas agrícolas. De acordo com ASHTON e MÔNACO (1991), planta daninha é toda planta que cresce onde não é desejada. Essas plantas tendem a competir com os cultivares, por meio da extração de elementos do solo que são vital como água, luz, CO<sub>2</sub> e nutrientes, interferindo no desenvolvimento da cultura e afetando a produção agrícola. Estima-se que as perdas ocasionadas nas culturas agrícolas, pela interferência das plantas daninhas, no Brasil, estejam em torno de 20-30% (LORENZI, 1990). Os herbicidas são também utilizados para eliminar plantas das margens de estradas e rios e para marcar, corretamente, as linhas de trilhas (BAIRD, 2002).

Os herbicidas podem ser classificados segundo diferentes critérios, relacionados às suas propriedades, características, uso, eficácia e permanência no ambiente (DEUBER, 1992). Quanto ao seu caráter químico, os herbicidas podem ser classificados como carbamatos, amidas, difeniléteres, aminofosforado, dinitroanilinas, entre outros. O herbicida do grupo das dinitroanilinas tem por base a estrutura da anilina, contendo moléculas de NO<sub>2</sub> nas posições 2 e 6 ou 3 e 5 do anel. Este grupo possui mais de dez diferentes herbicidas, entre os quais quatro estão representados na tabela 1.

**Tabela 2:** Estruturas de alguns herbicidas

HERBICIDAS	ESTRUTURAS
<p data-bbox="437 533 606 566"><b>Trifluralina</b></p> <p data-bbox="429 696 614 730"><b>Dinitriamina</b></p>	 
<p data-bbox="453 1048 592 1081"><b>Orizalina</b></p> <p data-bbox="413 1267 632 1301"><b>Pendimetalina</b></p>	 

Segundo LUCHINI (2000), a contaminação de recursos hídricos resultantes da utilização de herbicidas na agricultura pode ser influenciada por três processos principais: processos de adsorção, que regulamentam a disponibilidade do herbicida na solução do solo; processos de transferência, que deslocam o herbicida do ponto de aplicação para outra área; e os processos de degradação, que minimizam os problemas com a persistência, acumulação e os efeitos ambientais desses compostos. Por isso, o monitoramento destas substâncias em diferentes matrizes, assim como os produtos de sua degradação, que muitas vezes são mais tóxicos que a própria substância de origem, é muito importante para avaliar o grau de

contaminação do meio ambiente por esses poluentes. Sendo assim, se faz necessário o desenvolvimento de métodos alternativos para análises de pesticidas.

Atualmente, os principais métodos de análise de pesticidas são os cromatográficos, destacando-se as cromatografias gasosa e líquida. Tais métodos são precisos, sensíveis e seletivos, mas trabalhosos e de maior custo. Técnicas eletroanalíticas têm sido também utilizadas como métodos de determinação de pesticidas em águas puras, naturais, solos, frutas, etc. (VAZ, 1994). Segundo RUPP *et al.* (1992), a principal vantagem desses métodos é a possibilidade de se determinar a concentração de pesticidas diretamente na amostra, sem pré-tratamentos ou separações químicas. Em particular, é possível analisar materiais coloridos ou mesmo amostras contendo partículas sólidas dispersas. Em geral, as metodologias baseadas em técnicas eletroanalíticas são menos seletivas e sensíveis que as cromatográficas, mas são mais rápidas e de menor custo.

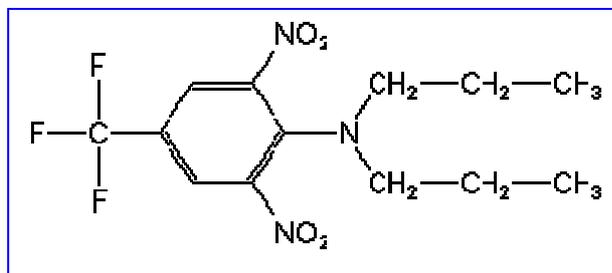
## 1.2 – O HERBICIDA: Trifluralina (TRF)

A trifluralina é um herbicida de derivados benzênicos pertencentes à família da dinitroanilina (BYRD *et al.*, 1995). O herbicida apresenta-se sob a forma de uma emulsão concentrada ou na forma de um sólido cristalino amarelo alaranjado. É pouco solúvel em água (solubilidade de 0,2 a 0,4 mg L<sup>-1</sup> a 25°C), medianamente volátil (pressão de vapor de 1,1 x 10<sup>-4</sup> mmHg a 25°C), possui densidade igual a 1,36 g cm<sup>-3</sup> a 22°C, é considerado alcalino e de longa persistência no ambiente (120-240 dias) (DEUBER, 1992). A trifluralina tem alta afinidade com o solo (SANDERS e SEIBER, 1983), é relativamente imóvel e possui meia-vida de 3 a 18 semanas, dependendo do solo e da localização geográfica (CALDERON *et al.*, 1999).

A composição química da trifluralina é:  $\alpha, \alpha, \alpha$ - trifluorometil-2,6-dinitro-N,N-dipropil-*p*-toluidina (BELLINASSO *et al.*, 2004) e sua fórmula estrutural está demonstrada na **Figura 1**.

A trifluralina tem sido usada na agricultura desde 1963 (GROVER *et al.*, 1997). Esse herbicida é registrado isoladamente ou em misturas nas seguintes culturas: soja, citros, café em formação, algodão, amendoim, feijão, alho, vagem, girassol, mamona, mandioca, berinjela, cenoura, quiabo, brócolis, repolho, couve-

flor, cebola de transplante, pimentão, tomate e plantas ornamentais (RODRIGUES e ALMEIDA, 1998).



**Figura 1:** Fórmula estrutural da Trifluralina

O produto comercial contém nitrosodipropilamina, um contaminante carcinogênico (NDPA) (USEPA, 1987). EBERT *et al.* (1992) estudaram a toxicologia e o potencial de risco da **TRF** pura em um experimento conduzido em animais de laboratório para avaliar a segurança desse herbicida. Esses estudos revelaram os seguintes resultados:

- ✓ A TRF mostrou-se levemente tóxica com relação à exposição oral.
- ✓ Não apresentou efeito teratogênico, e diferentes testes de mutagenicidades mostraram que a TRF não foi genotóxica.
- ✓ Nenhum efeito foi observado nos níveis de 4,8 e 41 mg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>, respectivamente, para cachorros e ratos sob exposição crônica.
- ✓ Não apresentou oncogenicidade em ratos e gatos.
- ✓ Foi sugerido que um fator de segurança de 100 deverá ser usado para a determinação aceitável da DL<sub>50</sub> da TRF que deverá ser 0,05 mg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>.

Entretanto, outros estudos mostraram que a TRF pode causar danos ao fígado e ao rim, diminuir o peso e o tamanho fetal, aumentar as probabilidades de aborto além de favorecer as alergias, diminuir a contagem de células vermelhas no sangue, aumenta os níveis de lipídeos totais, triglicerídeos e colesterol no soro sanguíneo, apresentar efeitos mitogênicos moderados e limitar a blastogênese dos linfócitos T (HEGEDÜS *et al.*, 2000). Apesar de seus efeitos biológicos, a TRF também mostrou atividade farmacológica contra os parasitas *Leishmania major*, *L. donovani*, *L. panamensis*, causadores da Leishmaniose, *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas (ZAIDENBERG *et al.*, 2007) e *Plasmodium falciparum*, causador da malária (FREARSON *et al.*, 1997).

A USEPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) (1999) classificou o herbicida trifluralina como do grupo C: possivelmente carcinogênico para humanos. De acordo com WORTHING (1991) a TRF é proibida na Colômbia, Suécia e Belize, tendo o seu uso restrito na Guatemala e EUA. No Brasil, de acordo com a portaria 03 de 16 de janeiro de 1992, o herbicida TRF é considerado altamente tóxico (classe toxicológica II) e muito perigoso (classe II) quanto ao seu potencial de periculosidade ambiental estabelecido pela Portaria Normativa nº 139 de 21 de dezembro de 1994 do IBAMA, com base no decreto nº 98.816/90.

### **1.2.1- Comportamento do herbicida trifluralina nas plantas**

A trifluralina é um herbicida de pré-emergência que deve ser incorporado ao solo e aplicado logo após a semeadura, quando as sementes das plantas estão em início do processo de germinação (RIBAS *et al.*, 1996). A absorção do herbicida ocorre principalmente pelo caulículo e, secundariamente, pelas radículas das plântulas, no início da germinação (RODRIGUES e ALMEIDA, 1998).

A trifluralina apresenta, como principal mecanismo de ação, a inibição do processo de divisão celular mitótica. Este herbicida atua, basicamente, sobre os meristemas e tecidos dos órgãos subterrâneos como, raízes, gemas, epicótilo, hipocótilo, plúmula, rizomas, tubérculos e sementes (DEUBER, 1992).

A inibição do desenvolvimento radicular pela ação da trifluralina, tanto no crescimento da raiz principal quanto na emissão de raízes secundárias, é muito evidente em algumas dicotiledôneas. Também é comum ocorrer o engrossamento do hipocótilo (DEUBER, 1992).

De acordo com ALMEIDA (1985), a trifluralina induz diversas mudanças bioquímicas em plantas superiores, incluindo alterações nos teores de carboidratos, lipídios, nitrogênio e, principalmente, alterações nos ácidos nucléicos. Com isso, o produto afeta a divisão celular nos tecidos meristemáticos, inibindo a germinação de sementes e a formação de novas células na radícula e no caulículo.

BAYER *et al.* (1967) relataram que a trifluralina promove a diminuição da zona de tecido meristemático e a interrupção de divisões mitóticas em raízes de trigo, algodão e cebola. Células de cebola tratadas com trifluralina apresentaram-se

pequenas, densas e multinucleadas, anormais, frágeis e aberrantes (HACSKAYLO *et al.*, 1968). Estudos realizados com *Allium cepa* por FERNANDES (2002) mostraram que a toxicidade de concentrações residuais de trifluralina pode induzir alterações nessa planta. A autora verificou que o herbicida promoveu inibição no crescimento da planta, maior turgescência, maior fragilidade e maior espessura das raízes, em relação ao tratamento controle.

Segundo ALMEIDA (1985), plantas cultivadas em solos tratados com a trifluralina só exibiram resíduos nas raízes. Não foi detectado resíduo, em folhas, frutos e sementes, em análise com sensibilidade de até 5,0 ppb. Essa informação nos sugere que o herbicida trifluralina não deve ser transportado pela seiva, para outros tecidos da planta.

## **1.2.2 - COMPORTAMENTO DO HERBICIDA TRIFLURALINA NO AMBIENTE**

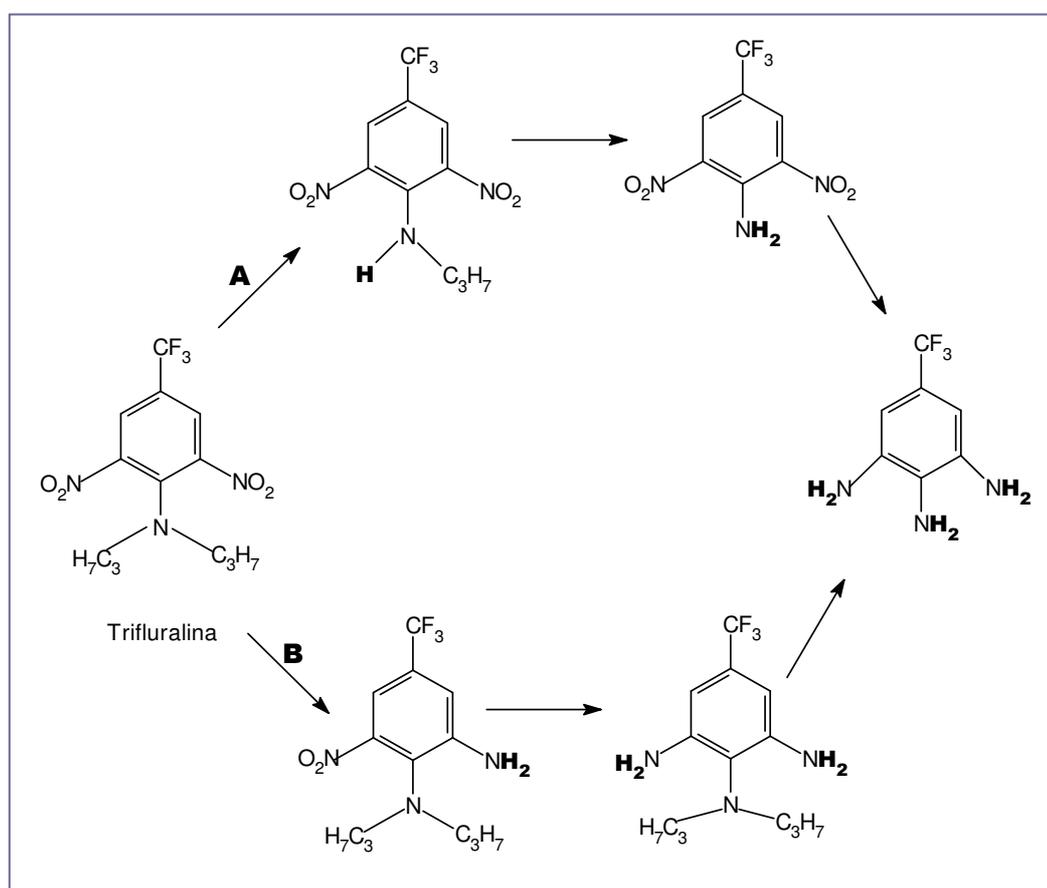
### **1.2.2.1- No solo**

O herbicida TRF é fortemente adsorvido pelos colóides da matéria orgânica e pouco pelos da argila. Em solos ricos em matéria orgânica, a adsorção impede a absorção do produto pelas raízes das plantas, não sendo aconselhável o uso deste herbicida nestas condições (RODRIGUES e ALMEIDA, 1998). A lixiviação é muito reduzida, assim como o movimento lateral no solo. Sua principal característica é a persistência em solos decorrente de sua baixa mobilidade, o que pode provocar danos em cultivos posteriores à sua aplicação (CALDERON *et al.*, 1999).

Herbicidas como a trifluralina, aplicados em pré-emergência, atuam melhor quando a umidade do solo é de média a elevada. Com isso, o herbicida pode ser, pelo menos, parcialmente solubilizado e distribuído nas primeiras camadas da superfície do solo, o que o protegerá contra perdas (DEUBER, 1992).

A degradação desse herbicida no solo ocorre por via química, microbiana e por fotólise. A degradação química promove dealquilação do grupo amino, redução do grupo nitro a amino, oxidação parcial do grupo trifluorometil e,

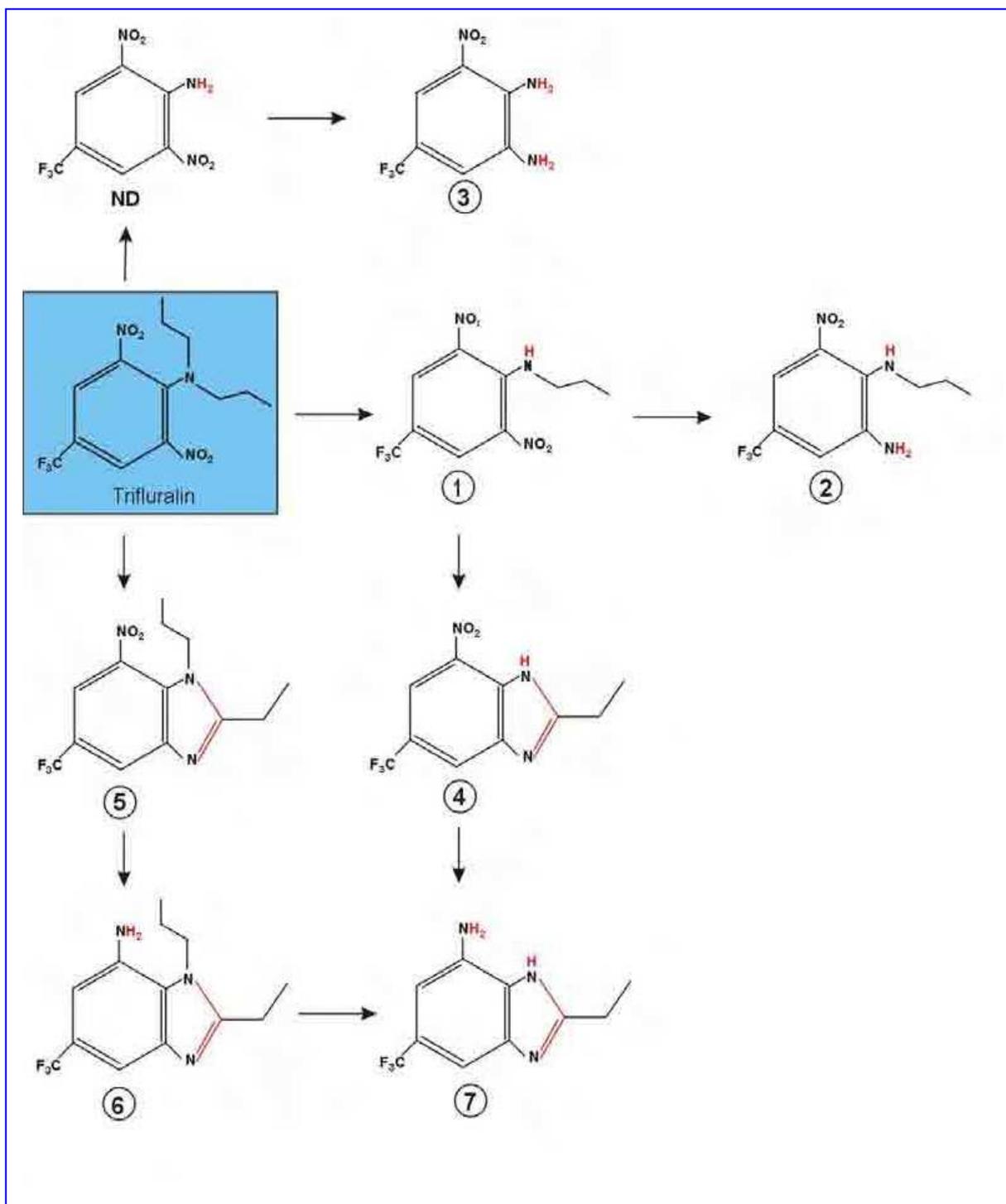
subseqüentemente, a degradação em fragmentos menores. A degradação microbiana pode ocorrer em condições aeróbicas e anaeróbicas (**Figura 2**). No entanto, observa-se que a degradação ocorre, principalmente, em condições anaeróbicas, como a observada em solos de drenagem insuficiente, quando as chuvas são sucessivas. Em condições anaeróbicas, em um mesmo período de tempo, 98% da trifluralina degrada-se, enquanto que em condições aeróbicas só se decompõe 25% do produto. Dentre os fungos com capacidade de degradar o herbicida trifluralina temos o *Sclerotium rolfsii*, *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp e *Trichoderma* sp (RODRIGUES e ALMEIDA, 1998).



**Figura 2:** Degradação microbiana do herbicida trifluralina por via aeróbica (A) e anaeróbica (B). Extraído de AUDUS (1980).

O herbicida trifluralina também é sensível à degradação pelos raios ultravioletas e sua volatilização também é um dos fatores importantes da perda do produto no solo (SELIM e ZHU, 2002; CYNDY *et al.*, 2004). A fotodecomposição da

trifluralina geralmente envolve 3 processos: dealquilação oxidativa da propilamina, ciclização e redução do grupo nitro (**Figura 3**) (DIMOU *et al.*, 2004).



**Figura 3:** Fotodegradação do herbicida trifluralina. <sup>^</sup>ND = Substância não detectada na fonte. Esquema modificado de DIMOU *et al.* (2004).

O primeiro produto da fotólise da trifluralina, de acordo com DIMOU *et al.* (2004) e ilustrado na **Figura 3**, parece ser um mono-dealquilado derivado do composto principal, originando o composto 1. A dealquilação é atribuída à oxidação pelo radical livre. Outro intermediário da fotodegradação parece ser formado por reações de ciclização. Os compostos médios 4 e 5 são formados, aparentemente, pela reação entre a propilamina do carbono  $\alpha$  da trifluralina e o grupo NO<sub>2</sub> do composto 1 e são identificadas as 2- etil -7nitro-1-propil-5 (trifluorometil)-1H-benzimidazol e 2-etil-4 nitro-6- (trifluorometil)-1H-benzimidazol, respectivamente. O dealquilado benzimidazol (composto 4) é o fotoproduto mais estável, podendo persistir no ambiente por um tempo maior, possibilitando a sua detecção. Este produto pode ser formado pela reação de dealquilação do composto 5.

Os compostos 4 e 5 podem ser reduzidos em água por mecanismos não muito claros (CROSBY, 1972), direto da formação de aril hidroxilamina (KLUPINSKI *et al.*, 2003) para formar o composto 6 e 7, respectivamente. Esses produtos também foram formados durante a degradação química da trifluralina (KLUPINSKI *et al.*, 2003). Os compostos 2 e 3 são formados pela redução do grupo NO<sub>2</sub> para NH<sub>2</sub> do composto 1 e 2,6-dinitro-4-(trifluorometil) benzenamina (composto ND), respectivamente. Esses compostos têm sido formados durante a degradação química da trifluralina (KLUPINSKI *et al.*, 2003), mostrando que esta rota acontece também em outros processos, além da fotodegradação (DIMOU *et al.*, 2004).

A persistência média do herbicida trifluralina no solo para as doses recomendadas em condições de campo é de 1,8 ppm de resíduo após 180 dias da aplicação (ALMEIDA, 1985). No entanto, segundo o mesmo autor essa persistência pode variar de acordo com o tipo de solo e as condições climáticas.

### 1.2.2.2 - Na água

A contaminação da água pela trifluralina pode ocorrer, eventualmente, por lixiviação de sedimentos, durante a limpeza de equipamentos ou por derrames acidentais. No entanto, somente 0,5% da quantidade aplicada no solo é lixiviada e pode vir a contaminar fontes aquíferas. Essa porcentagem representa uma contaminação muito baixa da água, representando concentrações menores que 1.0

$\mu\text{g L}^{-1}$ . Conseqüentemente, o herbicida trifluralina não é comumente detectado em águas superficiais (GROVER *et al.*, 1997; ZIMMERMAN *et al.*, 2000).

DAYAMA e COUPE (1997), THURMAN *et al.* (1998) e ZIMMERMAN *et al.* (2000) em suas análises no Rio Mississippi detectaram taxas extremamente baixas do herbicida trifluralina (menores que  $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ). Uma vez que esse herbicida é amplamente utilizado, os autores afirmam que as baixas concentrações do herbicida detectadas em águas superficiais podem ser atribuídas à sua baixa mobilidade no solo e a baixa solubilidade em água (menor que  $1 \text{ mg L}^{-1}$ ).

De acordo com a revisão da resolução do CONAMA nº 020/86, sobre Classificação e Enquadramento de corpos de água, o valor máximo aceitável de trifluralina nos corpos de água é de  $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$  (CONAMA, 2003). O Brasil apresenta uma legislação que também regulamenta os níveis máximos de agrotóxicos em água potável, baseados em sua periculosidade. Esses dados estão regulamentados na Portaria nº 1460, de 29 de dezembro de 2000, e estabelece que a quantidade máxima aceitável de trifluralina na água de beber deve ser igual ou menor que  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ . No entanto, a USEPA (2001) e a legislação da Comunidade Européia (EC., 1982) estabeleceram um valor bem mais baixo,  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

### 1.2.2.3 – No ar

GROVER *et al.* (2000) afirmam que o herbicida trifluralina é dissipado rapidamente na atmosfera. Dependendo da estação, cerca de 25% do produto aplicado é volatilizado, mas são encontrados no ar, no máximo,  $2-3 \mu\text{g m}^{-3}$ , de trifluralina, logo após a aplicação, diminuindo para menos que  $100 \text{ ng por m}^{-3}$  após algumas horas (WAITE *et al.*, 2005). Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1993), foram encontrada na atmosfera do Canadá, entre os anos de 1988-89, uma concentração média de  $0,27 \text{ ng m}^{-3}$  de herbicida no ar, com uma variação de  $0,0$  a  $3,4 \text{ ng m}^{-3}$ .

MONGAR e MILLER (1988) afirmam que as baixas concentrações encontradas desse herbicida na atmosfera se devem à rápida reação da trifluralina

com radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) e à reação de fotólise que promove a degradação do produto.

## 1.3 - TÉCNICAS APLICADAS À ANÁLISE DE PESTICIDAS

### 1.3.1- MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Tradicionalmente a análise de resíduos de pesticidas em amostras ambientais é realizada utilizando-se Técnicas Cromatográficas. Estas constituem uma família de técnicas relacionadas à separação e análise de uma larga variedade de amostras ambientais e são muito importantes em função da facilidade para separar, identificar e quantificar as espécies presentes na amostra através da utilização de detectores específicos. A quantificação pode ser realizada apenas com a utilização de detectores cromatográficos ou em conjunto com outros métodos, como espectroscópicos e eletroanalíticos (COLLINS, 1990). A tabela 3 apresenta alguns pesticidas e as técnicas cromatográficas utilizadas para sua detecção.

**Tabela 3:** Análises de alguns pesticidas através de técnicas cromatográficas.

Pesticida	Técnica	Amostra	LD	Referência
Organoclorados	CG/DCE	Águas fluviais	-	CHAGAS <i>et al.</i> , 1999.
Diclorvos	CG/DCE	Vegetais	1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	CHEN <i>et al.</i> , 2002.
Diclorvos, isocarbovos e paration metílica	HPLC/UV HPLC/CL	Folhas de plantas	5,0; 2,0 e 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente	HUANG <i>et al.</i> , 2002.
Atrazina e 4 pesticidas organofosforados	SPME	Água	2-8 $\mu\text{g L}^{-1}$	TOMKINS, B.A e ILGNER, R.H., 2002

**Tabela 3: Continuação.**

Determinação de traços de carbamatos	EFS-CLAE-EM	Água	0,5 -3,0 ng L <sup>-1</sup>	NOGUEIRA, J.M.F B., 2003.
Análise de pesticidas neutros	EFS-CLAE	Água	0,5-3,0 ng L <sup>-1</sup>	NOGUEIRA, J.M.F. <i>et al.</i> , 2004.
monocrotófos e parationa metílica	CG-EM-SPE	Águas fluviais	4,8 e 5,0 ppt respectivamente para parationa metílica	PINHEIRO 2004.
Atrazina e Simasiana	CG-EM e HPLC		0,1 ng L <sup>-1</sup>	DORES <i>et al.</i> , 2006.
<b>Trifluralina</b>	<b>CG-EM e HPLC</b>		<b>5,0 ng L<sup>-1</sup></b>	<b>DORES <i>et al.</i>, 2006.</b>

### 1.3.2- MÉTODOS ELETROANALÍTICOS

As técnicas eletroanalíticas surgiram como uma ferramenta importante para análise de pesticidas. Estas técnicas podem ser resumidas como a resposta da variação de corrente que circula pelo circuito elétrico em função de uma dada variação de potencial aplicada ao eletrodo de trabalho (VAZ *et al.*, 1996). A principal vantagem destas técnicas é a possibilidade da medida ser feita diretamente na amostra sem separações prévias. Esta vantagem, aliada ao curto tempo na realização das análises, ao baixo custo da instrumentação e dos materiais utilizados em comparação com métodos cromatográficos e, principalmente, à sensibilidade que as técnicas eletroanalíticas apresentam em relação à presença de interferentes,

fez com que esta metodologia começasse a ser utilizada na análise de resíduos de pesticidas em água, solo, alimentos e até mesmo fluidos biológicos (SZCZEPANIAK *et al.*, 1995).

O desenvolvimento tecnológico gerou grande avanço da instrumentação eletroanalítica, o que contribuiu intensamente para a melhoria da sensibilidade destes métodos. Atualmente os limites de detecção já podem ser comparados aos dos métodos cromatográficos, quando se utilizam técnicas de Pulso e de Redissolução. Em eletroanalítica, cada espécie possui um potencial de oxidação e/ou redução particular, em uma determinada condição, o que minimiza a interferência de outras espécies.

A utilização de técnicas eletroanalíticas depende da presença, na estrutura do composto a ser analisado, de grupos ou sítios eletroativos, que são os grupos passíveis de sofrerem processos de redução e/ou oxidação. No entanto, é possível tornar um composto não eletroativo em um composto eletroativo, pela substituição ou adição de um grupo eletroativo, eliminando assim uma das limitações ao uso destas técnicas. A Tabela 4 apresenta um resumo de alguns trabalhos publicados com utilização de técnicas eletroanalíticas.

**Tabela 4.** Aplicação das técnicas eletroanalíticas em estudos envolvendo análise de pesticida.

Pesticida	Técnica	Amostra	Referência
Nitropesticidas	DC e VPDVR	Etanol/água; DMF/água;	KOUTOUCEK e OPRAVILOVÁ, 1996.
Nitralin	VOQ-AdS VPD-CV	metanol/água Água	ARRANZ <i>et al.</i> , 1997.
Aletrin	VPD-HMDE	Solventes não aquosos	COOMBER <i>et al.</i> , 1997.
Sulfoniluréia	VPD	Água	DREVINEK e HORAK, 1997.
Imazaquim	PPD e VPD		MORAES <i>et al.</i> , 1997.
Folpet e Captafol	VPD	Solo Água	CARABIAS-MARTÍNEZ <i>et al.</i> , 1998.
Tralometrin e tralocentin	VC	Água	COOBER <i>et al.</i> , 1998.
Benzaton	VOQ	Formulação comercial	GARRIDO <i>et al.</i> , 1998.
Dicarboxiamidas <b>Trifluralina</b>	VC e DC <b>VPD-AdS</b>	Água	POSPISIL <i>et al.</i> , 1999.
Deltrametrina	PPD e VC	<b>Água/etanol</b> Vegetais, trigo e	<b>RADI, 2000.</b> SAMATHA e SREEDHAR, 1999.
Buprofezin	VPD-AdS	arroz	IBRAHIM <i>et al.</i> , 2001.
Paration	VOQ	Água e solos	ZEN <i>et al.</i> , 1999.
Clorofenóis	VC e EQCM	Água -	URETA-ZAÑARTU <i>et al.</i> , 2001.
Imidacloprid	VOQ-AdS		GUIBERTEAU <i>et al.</i> , 2001.
N-metilcarbamato	-	Água	FUJISHIMA <i>et al.</i> , 2002.
4-clorofenol	VOQ	Água	AVACA <i>et al.</i> , 2003.
Picloram	VOQ	Água	MACHADO <i>et al.</i> , 2003.
Paration	PPD	Água Solos	CASTANHO <i>et al.</i> , 2003.

**Tabela 4: Continuação.**

Paraquat	VOQ	Água	MACHADO e SOUZA, 2003
Diclorvos	VOQ	Água	OLIVEIRA E MACHADO, 2004.
Lambda-cialotrin	VC e VPD	Água e solo	OUDOU <i>et al.</i> , 2004
Organofosforados	VOQ	Água	LIU e LIN, 2005

No Brasil, segundo VAZ *et al.* (1996), são poucos os trabalhos de monitoramento de pesticidas em águas, solos e alimentos ou estudos básicos usando métodos eletroanalíticos para o entendimento da interação desses produtos com o ambiente, se levarmos em consideração que o país ocupa atualmente a posição de terceiro maior usuário mundial de pesticidas. Em um estudo comparativo, VAZ *et al.* (1996) observaram que alguns pesticidas necessitam de análise em meios fortemente ácidos, pois a sua detecção depende de uma protonação prévia para desestabilizar a molécula, como é o caso da atrazina, simazina e ametrina. Outro fator que chamou atenção dos autores foi o grande número de trabalhos que utilizavam soluções puras de laboratório como eletrólitos. Neste caso, eles acreditam que o desenvolvimento de metodologias de análise é muito mais fácil nessas condições, mas suas aplicações em matrizes naturais são, em geral, possíveis de serem realizadas, desde que as influências de interferentes na resposta eletroanalítica sejam cuidadosamente estudadas.

## 1.4-TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS UTILIZADAS

### 1.4.1- Considerações Gerais

A eletroquímica refere-se a fenômenos químicos associados à transferência de elétrons, que podem ocorrer homoganeamente em solução, ou heterogeneamente na superfície do eletrodo (BRETT *et al.*, 1996).

A eletroquímica pode oferecer opções viáveis para remediar problemas ambientais, particularmente efluentes aquosos. A tecnologia eletrolítica é capaz de

oxidar ou reduzir íons metálicos, cianetos, compostos organoclorados, hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos. Neste processo o elétron é o principal agente de transformação química, evitando o uso de compostos químicos que podem ser tóxicos (BOUDENNE e CERCLIER, 1999).

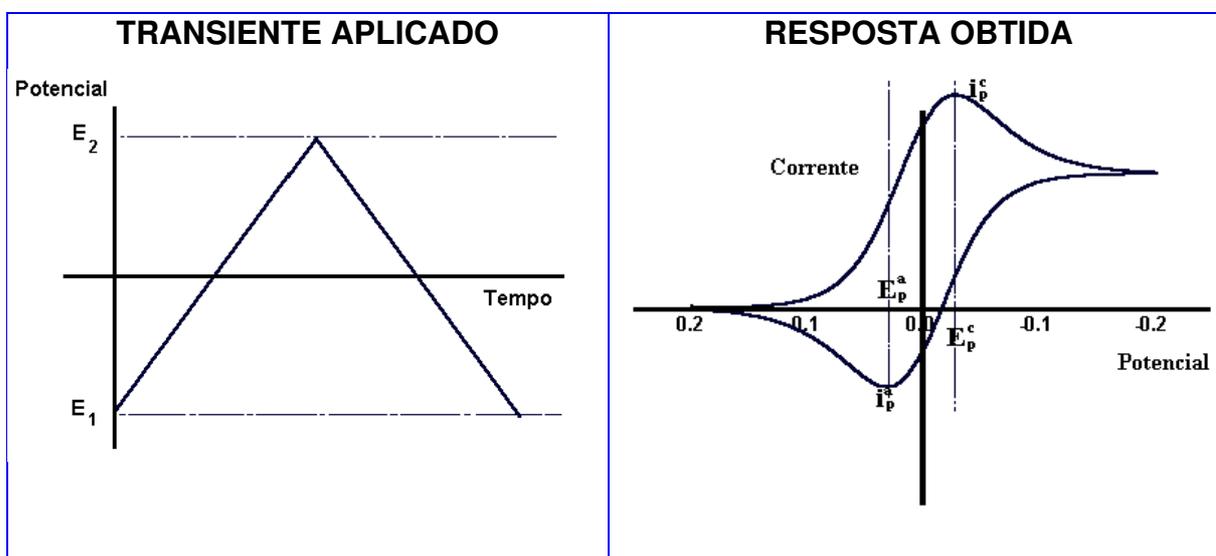
O processo eletroquímico baseia-se na aplicação de um potencial capaz de oxidar ou reduzir substratos de interesse. A eletro-oxidação direta de compostos orgânicos ocorre, muitas vezes, em potenciais altos e, em meio aquoso, a reação de evolução de oxigênio é um caminho competitivo com a degradação. Semicondutores imobilizados em eletrodos têm sido empregados para diminuir esta competição. Vários semicondutores, entre eles SnO<sub>2</sub>, têm apresentado excelente eficácia eletroquímica quando empregados como elemento modificador de eletrodos, por apresentarem alta condutividade e estabilidade em soluções aquosas ácida, neutra ou básica (LIPP e PLETCHER, 1977).

No caso de oxidação indireta, a reação ocorre com espécies que são geradas eletroquimicamente e que são capazes de oxidar os poluentes orgânicos na solução. Algumas espécies com forte poder oxidante, como O<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, têm sido detectadas nos processos eletroquímicos (VLYSSIDES e ISRAILIDES, 1997), ou deliberadamente produzidas *in situ* (PLETCHER e DE LEON, 1995).

Uma das vantagens da eletroquímica em relação à química convencional é a não utilização de grandes quantidades de reagentes nas análises eletroquímicas, além do fácil controle de variáveis, que combinadas de formas diversas, levam as técnicas eletroquímicas particulares.

#### 1.4.2.- VOLTAMETRIA CÍCLICA

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroquímica muito utilizada, capaz de fornecer, rapidamente, informações mecanísticas eletródicas. É uma técnica de varredura reversa de potencial, onde o potencial aplicado ao eletrodo é variado numa velocidade conhecida, e ao atingir o potencial final desejado, a varredura é revertida ao valor inicial, na mesma velocidade. Obtém-se, como resposta a essa perturbação, por exemplo, um par de picos, catódico e anódico (**Figura 4**).



**Figura 4:** Técnica da VC. Perturbação aplicada e resposta obtida (GREEF *et al.*, 1985).

De posse dos parâmetros eletroquímicos mais importantes, ou seja, os potenciais de pico catódico e anódico ( $E_{pc}$  e  $E_{pa}$ ), as correntes de pico catódico e anódico ( $i_{pc}$  e  $i_{pa}$ ) e os potenciais de meia onda ( $E_{1/2}$ ) ou pico de meia altura ( $E_{p2}$ ), pode-se analisar o processo eletródico ocorrido. A dependência do potencial e da corrente com a variação da velocidade de varredura, com a concentração da substância eletroativa e a partir da adição de eletrófilos, nucleófilos ou prótons, com análise baseada em testes diagnósticos, permite obter informações importantes como reversibilidade e irreversibilidade do processo de transferência de elétrons, a presença de reações químicas acopladas, adsorção e fenômenos catalíticos, além de se poder caracterizar o fenômeno que controla a corrente de pico (GREEF *et al.*, 1985).

Os testes diagnósticos para a caracterização dos processos são descritos na tabela 5. Geralmente a própria feição da onda é indicativa de processo reversível; a presença de um par de picos (catódico e anódico) de mesma altura, com potenciais de pico separados por uma distância de  $59/n$  mV (caso as espécies oxidada e reduzida sejam estáveis). Já, o espectro eletroquímico de um sistema irreversível, evidencia a completa ausência do pico reverso, apesar de esse não ser o único critério de análise.

**Tabela 5:** Testes diagnósticos em VC para processos reversíveis, irreversíveis e quase – reversíveis (BARD e FAULKNER, 1996).

Reversíveis	Irreversíveis	Quase-reversíveis
1- $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 59/n$ mV. 2- $ E_p - E_{p/2}  = 59/n$ mV. 3- $ I_{pa}/I_{pc}  = 1$ . 4- $E_p$ independente de v. 5- $I_p \propto v^{1/2}$	1- Ausência de pico reverso. 2- $ E_p - E_{p/2}  = 48/\alpha n$ mV. 3- $E_{pc}$ desloca $-30/\alpha n$ mv por década de aumento de v. 4- $I_{pc} \propto v^{1/2}$ .	1- $I_{pc}$ aumenta com v. 2- $ I_{pa}/I_{pc}  = 1$ se $\alpha = 0,5$ . 3- $\Delta E_p = 58/n$ mV e aumenta com v. 4- $E_{pc}$ desloca negativamente com o aumento de v.

### 1.4.3- VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL (VPD)

Uma melhoria instrumental considerável na discriminação da corrente faradaica da capacitiva viria a ser conquistada com o desenvolvimento das técnicas de pulso, principalmente a de pulso diferencial. Neste caso a instrumentação foi desenvolvida de tal modo que as medidas de corrente e aplicações de potencial e pulsos de potencial sejam realizadas em intervalos de tempo muito pequenos.

Na voltametria de pulso normal (VPN), escolhe-se um valor base de potencial,  $E_{base}$ , normalmente onde não há reação faradaica, e aplica-se ao eletrodo.

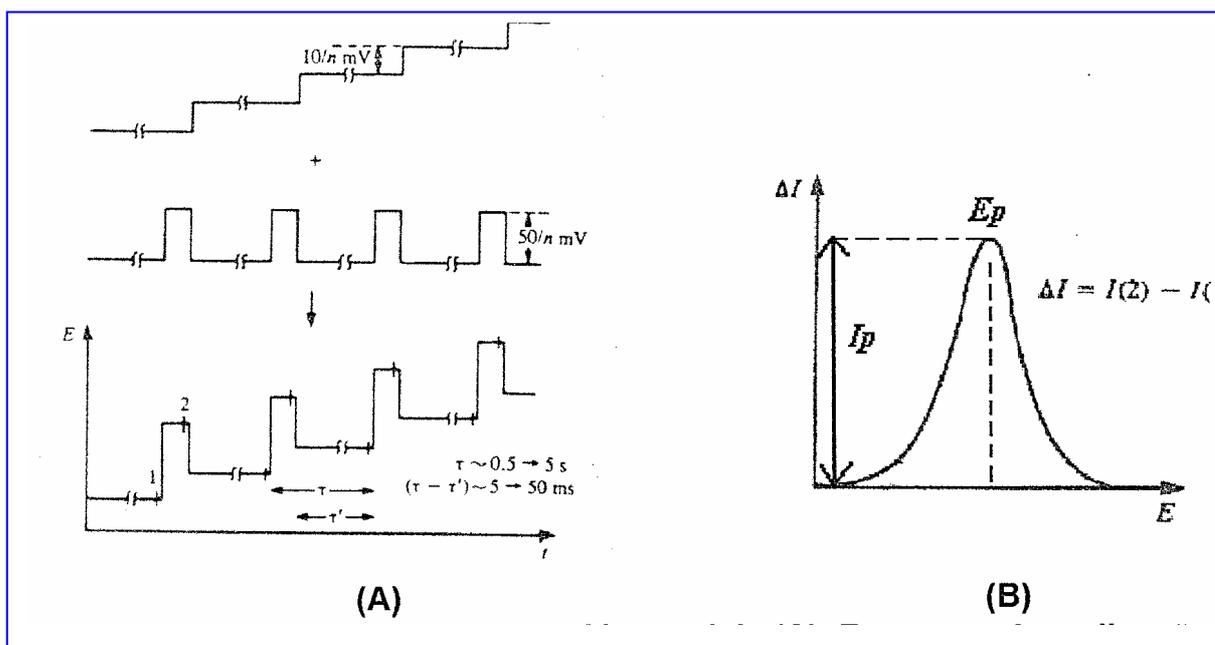
A partir desse valor aplicam-se pequenos pulsos de amplitude crescente, sendo o aumento de amplitude sempre igual. A corrente é medida no fim de cada pulso, cuja duração varia normalmente entre 5,0 e 100 ms; o intervalo entre os pulsos é de 2 – 4 s. A voltametria de pulso diferencial (VPD) é semelhante a VPN, mas com algumas diferenças importantes (BRETT *et al.*, 1996):

- O potencial –base é aumentado entre os pulsos, sendo esses aumentos iguais.

- A corrente é medida imediatamente antes da aplicação do pulso e no fim do pulso: registra-se a diferença entre as duas correntes.

- A duração de cada pulso varia normalmente entre 5,0 e 50 ms.
- O intervalo entre os pulsos é de 0,5 – 4,0 s.

A curva corrente – potencial está representada na **Figura 5**.



**Figura 5:** Voltametria de Pulso Diferencial. (A) Esquema de aplicação de potenciais (algumas vezes sobrepostas numa rampa, em vez de numa escada); (B) Perfil corrente-potencial esquemático.

Dessa maneira, a corrente capacitiva é compensada, pois os seus valores nos dois pontos onde a corrente é amostrada são muito próximos. O valor das duas correntes está separado de dois valores de potenciais por cerca de 50 a 100 mV (que na verdade é o valor da amplitude do pulso de superposto).

A diferença de correntes amostradas em ( $I_1$ ) e em ( $I_2$ ) será maior ao redor do potencial de meia onda, onde uma pequena variação de potencial produzirá uma grande variação de corrente. A diferença dessas correntes aumentará até atingir um valor máximo próximo do valor correspondente ao potencial de meia onda ( $E_{1/2}$ ) da polografia clássica. Após este ponto a diferença dos valores de corrente diminuirá, voltando ao valor da corrente de fundo e o polarograma terá forma de pico conforme pode ser visto na **Figura 5B**.

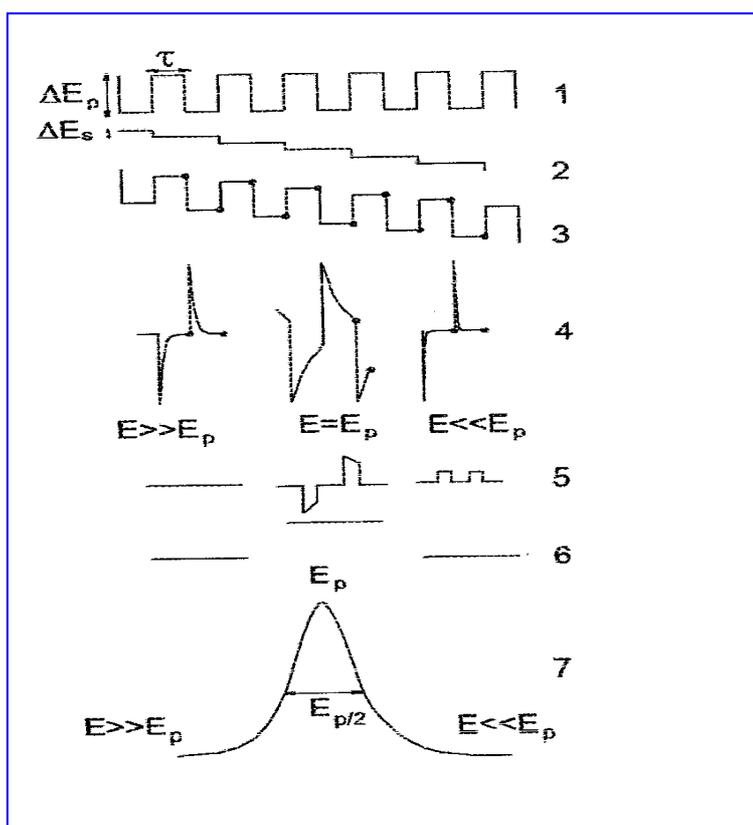
O potencial correspondente ao ponto máximo do pico é chamado de potencial de pico,  $E_p$ , e serve para identificar a espécie eletroativa (**Figura 5B**). O valor da corrente correspondente ao  $E_p$  é chamado de corrente de pico,  $I_p$ , que é proporcional à concentração da espécie eletroativa, permitindo a sua determinação quantitativa. Em razão da corrente capacitiva ser compensada ao registrarem-se as diferenças de corrente, a sensibilidade da técnica de pulso diferencial (DP) ultrapassa significativamente à da polarografia clássica ou DC, atingindo-se limites de detecção da ordem de  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>. A resolução da técnica também é melhorada. Na polarografia DC para que duas substâncias eletroativas sejam simultaneamente determinadas elas precisam apresentar uma diferença de potenciais de meia onda de pelo menos 200 mV. Já na polarografia de pulso diferencial uma diferença entre os potenciais de pico ( $E_p$ ) de apenas 50 a 100 mV poderá ser suficiente para a determinação simultânea.

#### 1.4.4- VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA (VOQ)

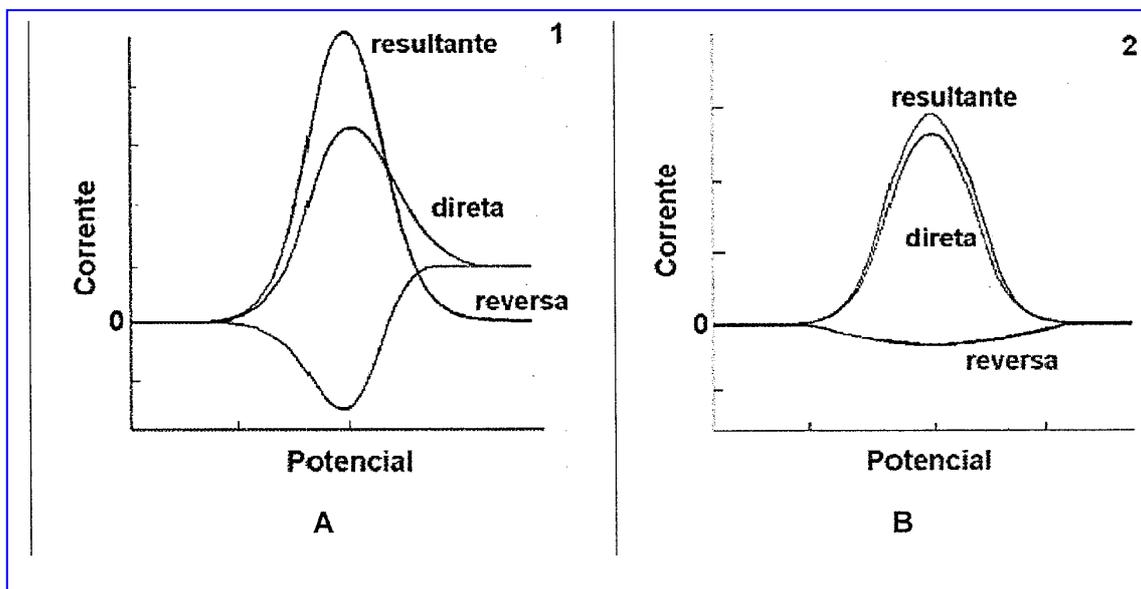
A voltametria de onda quadrada foi inventada em 1952 por Baker, mas foi pouco utilizada nesse tempo devido às dificuldades com o controle eletrônico. Com os progressos na instrumentação, tornou-se uma técnica analítica importante (BRETT *et al.*, 1996). O esquema de aplicação de potenciais está representado na **Figura 6**. Três parâmetros caracterizam a forma da onda: a altura do salto  $\Delta E$ ; a amplitude da onda quadrada  $a_{OQ}$  e o período da onda quadrada  $\tau$  (largura do salto). Enquanto na VPD a velocidade de varredura efetiva vai de 1 a 20 mV s<sup>-1</sup> (nestes casos, a  $v$  é definida como a razão  $\Delta E^{PD} / t_{imp}$ ), na voltametria de onda quadrada a velocidade de varredura pode atingir 5 V s<sup>-1</sup> (na VOQ, é definida como a razão  $\Delta E^{OQ} / \tau$ ). Este fato confere vantagens a VOQ como técnica analítica, em termos de rapidez de análise, de menor consumo de reagente e da diminuição de problemas associados ao bloqueio da superfície do eletrodo. Em VOQ, o regime de pequenos pulsos simétricos e a amostragem de corrente efetuada no fim do pulso direto e, depois, no fim do pulso inverso, faz com que a diferença de corrente ( $\Delta I = I_1 - I_2$ , **Figura 6**) seja zero para uma espécie eletroativa cujo transporte de massa seja limitado por difusão. Isto permite discriminar o sinal da espécie de interesse

relativamente a sinais parasitas, como, por exemplo, o da redução de oxigênio dissolvido, o que torna a técnica atrativa quando usada em aplicações analíticas. Por outro lado, na VOQ o regime de amostragem permite obter, como resposta, três tipos de curva: a corrente amostrada no pulso direto ( $I_1$  ou  $I_d$ ), a corrente amostrada no pulso inverso ( $I_2$  ou  $I_r$ ) e o valor da diferença  $\Delta I = I_1 - I_2$ . A **Figura 7** representa voltamogramas de onda quadrada para sistemas reversíveis e irreversíveis, com separação observada das correntes direta, inversa e resultante.

Os parâmetros característicos dos voltamogramas são a corrente de pico  $I_p$ , medida desde o zero, o potencial do pico  $E_p$  e a largura do pico a meia altura,  $W_{1/2}$ . Esta técnica apresenta picos bem definidos em concentrações da ordem de  $10^{-7}$  mol  $L^{-1}$ . Acredita-se que a voltametria de onda quadrada, em virtude de não ser afetada por correntes capacitivas, pode ser utilizada em estudos cinéticos de sistemas químicos de concentrações mais baixas do que aquelas utilizadas em outras técnicas (ODEA *et al.*, 1985; ECCLES, 1991).



**Figura 6:** Representação esquemática da VOQ, onde: 1) potencial de forma de onda; 2) escada de potencial; 3) forma de aplicação do potencial na VOQ; 4) forma da onda da corrente; 5) sinal da corrente; 6) corrente diferencial e 7) corrente total.



**Figura 7:** Voltametria de Onda Quadrada (VOQ), perfil corrente-potencial esquemático. (A) Sistema reversível. (B) Sistema irreversível.

## 1.5- ELETRÓLISE

Eletrólises são também utilizadas para auxiliar nas definições mecânicas. São técnicas exaustivas que podem ser classificadas de acordo o parâmetro controlado (corrente ou potencial). O potencial aplicado ao eletrodo de trabalho pode ser mantido constante ao longo do processo. O sentido e a velocidade de uma transferência eletrônica entre uma fase sólida – o eletrodo e a solução podem ser controladas por meio de um potencial aplicado entre dois eletrodos. Na eletrólise, esses dois eletrodos, cátodo e ânodo, estão em contato com o meio condutor (solvente/ eletrólito de suporte) a reação principal se processa no eletrodo chamado trabalho. Se esta se realizar no cátodo (redução), há necessidade de um separador para prevenir que os produtos obtidos no ânodo interfiram no processo ou que o produto reacional seja reoxidado (cátodo e ânodo em compartimentos separados, cela dividida). O mesmo acontece no caso de oxidação, com separação entre os compartimentos, quando há interferência do cátodo. Existem processos em que esses produtos podem permanecer no meio sem a presença do separador (cela não dividida).

Em eletrólises, determina-se a carga total desenvolvida no processo depois que 99% da substância eletroativa foi consumida. Pode-se, assim, calcular através das leis de Faraday, a quantidade de material eletrolisado ou o número de elétrons envolvido na reação (a quantidade de substrato eletrolisado é proporcional à quantidade de eletricidade passada). As análises estruturais e da razão entre os produtos dão importantes subsídios para a determinação do mecanismo de reação (NIYAZYNBETOV *et al.*, 1993).

## 1.6- PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS (POAs)

A utilização de oxidantes fortes para descontaminação de água é antiga. O primeiro trabalho utilizando ozônio como desinfetante foi feito por De Meritens em 1886. Em 1972, Fujishima e Honda descrevem a oxidação da água em suspensão de TiO<sub>2</sub> gerando hidrogênio e oxigênio e em 1976 foi publicado o primeiro trabalho utilizando fotocatalise heterogênea na degradação de contaminantes, tanto em fase aquosa quanto gasosa. Entretanto, somente em 1973, durante o primeiro Simpósio Internacional em Ozônio para o Tratamento de Águas e Efluentes, foi usada a terminologia “Tecnologias de Oxidação Avançada”. Neste trabalho era usada a combinação entre ozônio e radiação ultravioleta para oxidar complexos de cianeto (GÁLVEZ *et al.*, 2001).

Estes trabalhos talvez tenham sido o ponto de partida para que essas tecnologias fossem conhecidas e difundidas. Em 1998, a USEPA publicou o handbook of Advanced Oxidation Processes, reconhecendo sua importância, o que acelerou ainda mais o desenvolvimento nesta área.

Os POAs foram definidos por GLAZE (1994) como processos que envolvem a geração de espécies transitórias de elevado poder oxidante, dentre as que se destaca o radical hidroxila (<sup>•</sup>OH). Este radical apresenta alto poder oxidante ( $E^0_{HO/HO^{\cdot-}} = \sim +2,8V, 25\text{ }^{\circ}C$ ) e baixa seletividade, possibilitando a transformação de um grande número de contaminantes tóxicos, em tempos relativamente curtos (MALATO *et al.*, 2002; KUNZ, 2002).

A elevada eficiência destes processos pode ser atribuída a fatores termodinâmicos, representados pelo elevado potencial de redução do radical

hidroxila (Tabela 6), e cinéticos, favorecidos pela elevada velocidade das reações radicalares.

A literatura apresenta um grande número de processos que podem ser utilizadas para geração *in situ* de radical hidroxila (LEGRINI *et al.*, 1993). São processos limpos e não seletivos podendo degradar inúmeros compostos, mesmo em uma mistura complexa. Além disso, podem ser usados para destruir compostos orgânicos tanto em fase aquosa, como em fase gasosa ou adsorvida numa matriz sólida. Os radicais hidroxilas podem ser gerados através de reações envolvendo oxidantes fortes, como ozônio (O<sub>3</sub>) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), semicondutores, como dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e óxido de zinco (ZnO) e irradiação ultravioleta (UV) (MANSILLA *et al.*, 1997). Os processos que contam com a presença de catalisadores sólidos são chamados heterogêneos, enquanto que os demais são chamados homogêneos. Os principais sistemas de POA são apresentados na Tabela 7.

**Tabela 6:** Potenciais de Redução de Algumas Espécies.

ESPÉCIE	POTENCIAL DE REDUÇÃO (V, 25°C) Referência Eletrodo do Normal de Hidrogênio
F	3,06
•OH	2,80
O ( oxigênio atômico)	2,42
O <sub>3</sub>	2,07
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1,77
KMnO <sub>4</sub>	1,67
Cl <sub>2</sub>	1,36
I <sub>2</sub>	0,54

**Tabela 7:** Sistemas mais Estudados para a Geração de Radicais Hidroxila.

SISTEMAS HOMOGÊNEOS		SISTEMAS HETEROGÊNEOS	
Com irradiação	Sem irradiação	Com irradiação	Sem irradiação
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV	O <sub>3</sub> /HO <sup>-</sup>	Catalisador/UV	Eletro-Fenton
O <sub>3</sub> /UV	O <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Catalisador/UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Eletroquímico
Ultra-som	Fe <sup>+2</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fotoeletroquímico	
Fe <sup>+2</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV ou Vis			

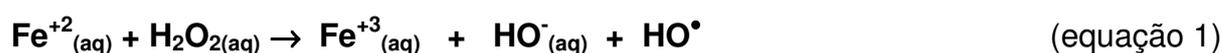
Fonte: HUANG *et al.*, 1993.

Os POA apresentam uma série de vantagens, podendo-se citar:

- ✓ Mineralizam o poluente e não somente transferem-no de fase;
- ✓ São muito usados para compostos refratários a outros tratamentos;
- ✓ Transformam produtos refratários em compostos biodegradáveis;
- ✓ Podem ser usados com acoplados a processos (pré e pós-tratamento);
- ✓ Tem forte poder oxidante, com cinética de reação elevada;
- ✓ Geralmente não necessitam um pós-tratamento ou disposição final;
- ✓ Tendo sido usado oxidante suficiente, mineralizam o contaminante e não formam subprodutos;
- ✓ Geralmente melhoram as qualidades organolépticas da água tratada;
- ✓ Em muitos casos, consomem menos energia, acarretando menor custo;
- ✓ Possibilitam tratamento *in situ*.

### 1.6.1- REAÇÃO DE FENTON

Dentre os processos oxidativos avançados, um dos mais promissores é baseado na reação de Fenton. Descrito pela primeira vez em 1894, o processo consiste na geração de radical hidroxila, a partir da reação entre íons ferrosos (Fe<sup>+2</sup>) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (equação 1), cuja velocidade de reação é de 70 mol L<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (NEYENS e BAEYENS, 2003).



Esta reação pode ser inteiramente monitorada por eletroquímica. Para isto é suficiente introduzir uma quantidade catalítica de íons férricos dentro da solução inicial. O peróxido de hidrogênio e os íons ferrosos são simultaneamente gerados no cátodo eletrodo trabalho em um potencial de -0,5 V (SCE), de acordo com as seguintes reações eletroquímicas:



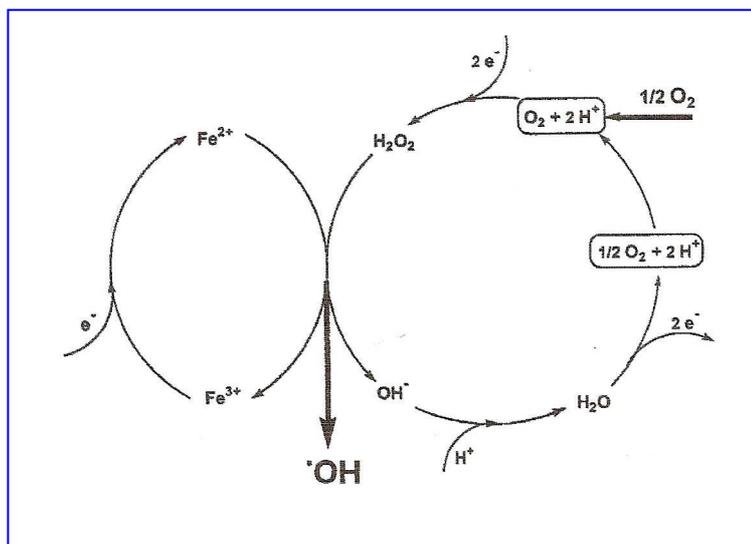
A reação de fenton (equação 1) toma lugar em meio homogêneo conduzindo para a formação de radicais hidroxilas. A reação anódica é a oxidação da água para oxigênio molecular (equação 4) que é usada para produção de peróxido de hidrogênio (equação 2) necessário para reação de fenton.



A equação química correspondente ao processo eletro-fenton pode ser obtida pela soma das reações (1) – (4):



As equações 1 e 3 resumem as características catalíticas do processo eletro-fenton: o íon ferroso não aparece na equação e 75% do oxigênio usado pelo sistema é produzido pela reação anódica. A produção de 2,0 mols de radicais hidroxilas requer somente o consumo da metade de mols de oxigênio. A **Figura 8** mostra dois ciclos catalíticos que toma lugar durante este processo.



**Figura 8:** Representação esquemática da produção eletrocatalítica dos radicais hidroxil através do processo eletro-fenton.

#### 1.6.1.1- Fatores Condicionantes da Reação

Um fator preponderante é a concentração de ferro. Na ausência de ferro não há qualquer evidência de formação de radicais hidroxilas quando se adiciona, por exemplo, apenas  $\text{H}_2\text{O}_2$  a uma água residual. Existe, no entanto um teor ótimo de catalisador de ferro no meio reacional, o que permite que o tempo de reação não seja demasiado longo (US Peroxide, " Peroxide Applications", [www.h2o2.com.2000](http://www.h2o2.com.2000)).

Além da concentração e natureza dos reagentes, diversos são os fatores que afetam diretamente esta reação. A temperatura, por exemplo, é também importante, sendo tipicamente utilizadas temperaturas na faixa dos 20 – 40°C (BIGDA, 1995).

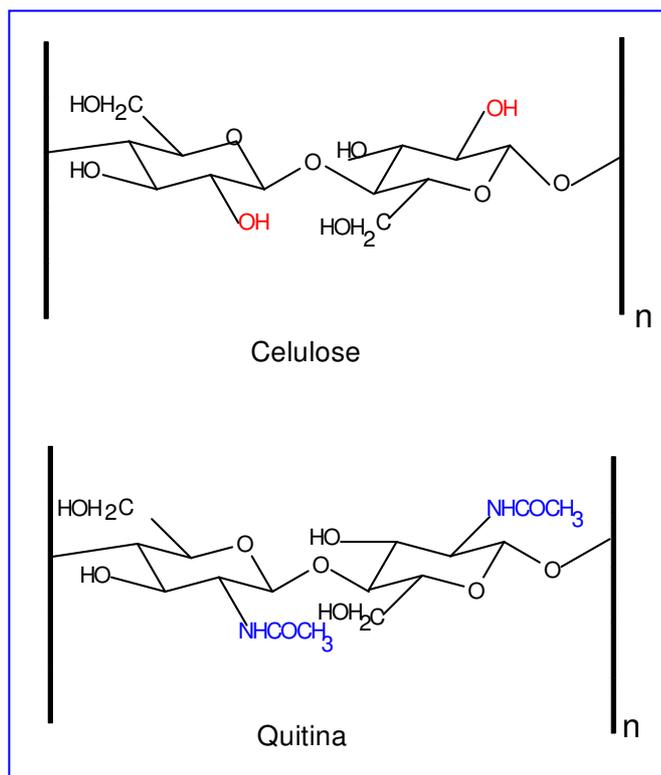
O controle do pH do meio reacional é também extremamente importante, sendo o pH ótimo 3,0 para que a reação ocorra com eficiência, o que muitas vezes é difícil de ser obtido em matrizes ambientais e que ainda pode causar perturbações, ainda mais graves, que a própria contaminação em si. Convém por isso controlar cuidadosamente o pH de forma que este se mantenha em 3,0 (BIGDA, 1995), isto é para se evitar a precipitação de oxi-hidróxidos férricos (NEYENS e BAYENS, 2003, PERÉZ *et al.*, 2002), podendo, entretanto, ser significativamente estendida com o uso de formas suportadas de ferro II e III (FENG *et al.*, 2006).

Embora diversos estudos relatam o sistema fenton como alternativa simples e eficiente para a degradação de poluentes recalcitrantes, a sua capacidade de mineralização é reduzida (GUTOWSKA *et al.*, 2006).

## 1.7- QUITINA / QUITOSANA

A quitosana é um polímero natural proveniente da reação de desacetilação da quitina, um dos mais abundantes polissacarídeos encontrados na natureza. A quitina é proveniente principalmente de exoesqueletos de moluscos (camarão, caranguejo e lula), sendo um polissacarídeo de cadeia linear constituído por unidades de 2-acetamida-2-deoxi-D-glicopiranosose que, a exemplo do que ocorre na celulose com suas unidades de 2-deoxi-D-glicopiranosose, são unidas por ligações glicosídicas. A fórmula estrutural da quitina é muito similar à da celulose, exceto que os grupos (-OH) na posição 2 foram substituídos por grupos N-acetil-glucosamina (-NHCOCH<sub>3</sub>), (**Figura 9**). A semelhança estrutural é refletida nas funções similares desses polímeros na natureza, onde ambos atuam como material estrutural.

Em 1811, a quitina foi descoberta em cogumelos pelo professor francês Henri Braconnot, sendo denominada primeiramente como fungina. Odier, em 1823 isolou um resíduo insolúvel de insetos, chamando-o de quitina, sendo este nome derivado da palavra grega “Chiton”, que significa carapaça ou caixa protetora. A quitina contém nitrogênio em sua estrutura, o que foi descoberto somente em 1843 por Payen. Rouget descobriu, em 1859, a quitosana através da ebulição de uma solução de hidróxido de potássio com quitina, sendo que a quitina é precursora da quitosana, e sua maior aplicação é na produção da mesma (SHAHIDI, *et al.*, 1999; KUMAR, 2000; POLYMAR, 2004).

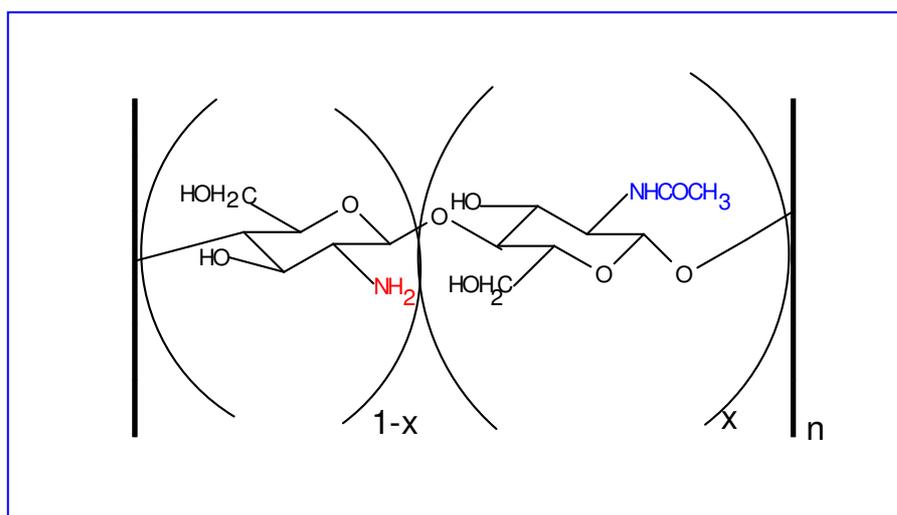


**Figura 9:** Representação esquemática das estruturas de celulose e quitina.

A quitina ocorre em três formas diferentes denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , as quais diferem no arranjo de suas cadeias. A forma  $\alpha$ , encontrada principalmente em crustáceos, insetos e fungos, apresenta um arranjo alternado de cadeias paralelas e antiparalelas. A ocorrência da forma  $\beta$  é menos comum, sendo encontrada exclusivamente em organismos marinhos como, lulas e algas microscópicas e possui um arranjo de cadeias paralelas. A forma  $\gamma$  ainda não foi completamente caracterizada, mas sugeriu-se um arranjo de duas cadeias paralelas e uma antiparalela (ROBERTS, 1992; RATHKE e HUDSON, 1994). A forma  $\alpha$  é dominante e mais estável que as outras duas  $\beta$  e  $\gamma$ , mas estas últimas podem ser convertidas à forma  $\alpha$  através de tratamentos adequados (SIGNINI, 1998).

Como citado anteriormente, da reação de desacetilação parcial da quitina obtém-se a quitosana, um polieletrólito catiônico (em meio ácido), que estruturalmente é um polissacarídeo linear com um número variável e randomicamente localizado de grupos *N*-acetil-glucosamina. Dependendo da fonte e procedimentos de preparação, seu peso molecular médio pode variar entre 50 e

1000 Da e as preparações comerciais tem graus de desacetilação variando entre 50 – 90%. Uma definição mais moderna de quitina e quitosana é que ambas têm a mesma estrutura química, uma série de copolímeros lineares de 2-acetamino-2-deoxiglicose e 2-amino-2-deoxi-D-glicose. As diferenças residem em que a quitosana é solúvel em solução ácida diluída e a quitina não, e a fronteira entre ambas é o grau de desacetilação, que quando maior que 60% a quitina passa a ser chamada de quitosana (**Figura 10**).



**Figura 10:** Representação esquemática da estrutura de quitosana, com x representando o grau de acetilação.

Todas as propriedades físico-químicas apresentadas pela quitosana (solubilidade, viscosidade, comportamento polieletrólítico e outros) dependem do grau de acetilação, da distribuição de cargas ao longo da cadeia e da massa molar do polímero, que são propriedades que podem ser controladas durante a reação de desacetilação. As propriedades de retenção de água e a biodegradabilidade da quitosana podem ser controladas também por ligações cruzadas entre suas cadeias.

Nas cadeias de quitosana os átomos de nitrogênio estão na forma, principalmente de grupos amino alifáticos primários e, assim, sofrem reações típicas de aminas. Os grupos amino desacetilados, quando protonados ( $\text{pH} < 6,0$ ), são os responsáveis pelas cargas positivas que tornam a quitosana um policátion.

Os grupos amino estão totalmente protonados em pH ~ 3,0. Para o caso de poliaminas, quanto maior o número de grupos protonados na cadeia, devido à repulsão eletrostática entre eles, maior será a facilidade de dissociação do ácido conjugado, R-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, (pois uma vez nessas condições ocorre maior hidrofília, portanto maior absorção de água). Devido à alta densidade de grupos aminos, a quitosana é um bom agente coagulante e floculante, podendo interagir com substâncias carregadas negativamente tais como proteínas, corantes e polímeros.

A quitosana, embora insolúvel em meios aquosos neutro e básico, dissolve-se em ácidos orgânicos (acético, fórmico, láctico) ou inorgânicos (HCl), resultando em soluções viscosas. Amostras comerciais geralmente são solúveis somente em soluções aquosas de pH menores que 6,0. A insolubilidade em água das amostras de quitosana pode ser uma vantagem para certas aplicações, mas pode complicar o uso em outras aplicações, como por exemplo, efeitos biológicos em pH fisiológico.

A versatilidade de poder ser transformada em filmes, membrana, fibras, gel, pasta, tabletes, microesferas, assim como flocos, pó ou soluções tem possibilitado as inúmeras aplicações comerciais, industriais, ambientais e biomédicas da quitosana (SHAHIDI *et al.*, 1999; KUMAR, 2000; RABEA *et al.*, 2003; POLYMAR, 2004; PADETEC, 2004). Há alguns anos, as principais aplicações da quitosana eram na remoção de sedimentos de água, quelação de íons metálicos e na indústria de alimentos. Atualmente a quitosana vem sendo bastante utilizada na produção de cosméticos, medicamentos, aditivos alimentícios, membranas semipermeáveis e no desenvolvimento de biomateriais, tanto na medicina como na odontologia.

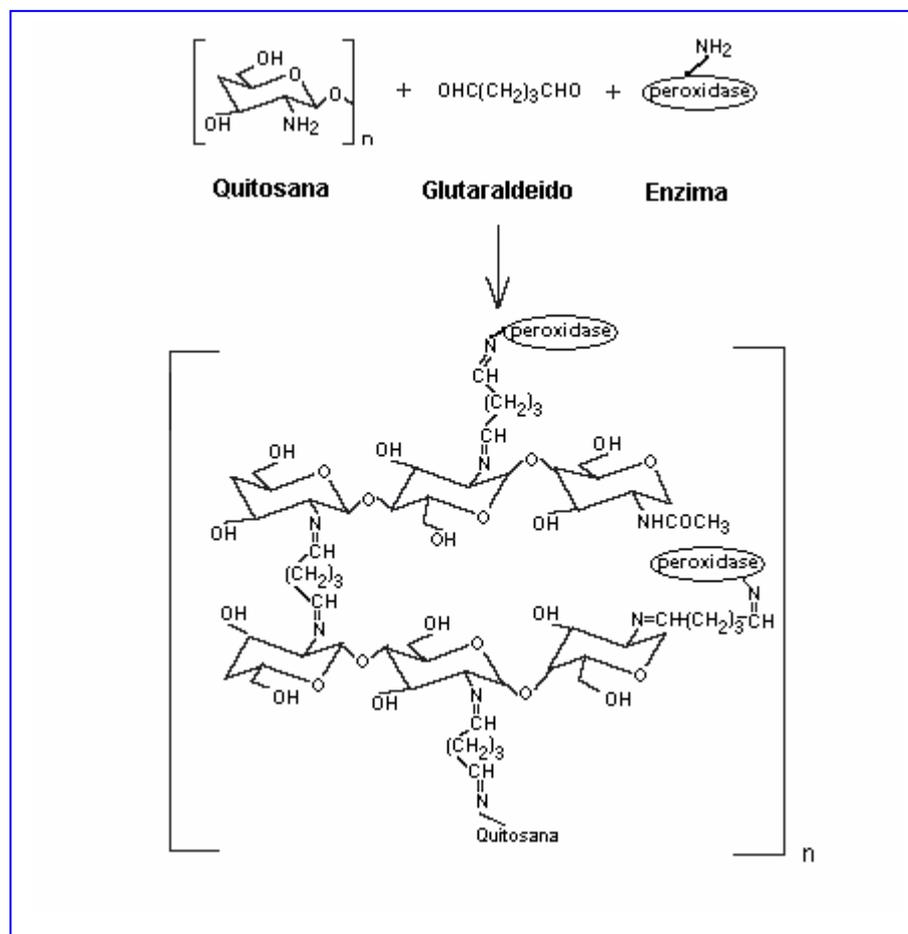
Há cerca de três décadas a quitosana está sendo usada em processos de purificação de água, principalmente devido à propriedade quelante (remoção de íons metálicos), bem como no tratamento de água para a remoção de óleo.

Na indústria alimentícia é usada como estabilizante de gordura e aroma, aditivo, preservação e conservação. Em cosméticos a quitosana é empregada em produtos para cuidados da pele devido ao efeito umectante, para cabelos por oferecer proteção e efeito antieletrostático, como também é usada para encapsulamento de fragrâncias, pigmentos e ingredientes ativos (POLYMAR, 2004; PADETEC, 2004).

### 1.7.1- QUITOSANA FUNCIONALIZADA

A quitosana é utilizada em descontaminação ambiental principalmente para a remoção de poluentes orgânicos e inorgânicos; sua capacidade adsortiva, contudo, depende da fonte da quitina, do grau de desacetilação e da massa molar. Outra limitação é que por conter em sua molécula grande quantidade de grupos amino passíveis de ionização em meio ácido, ela se apresenta solúvel em pH abaixo de 5,5. Dessa forma, a quitosana vem sendo tentativamente modificada com grupos funcionais específicos com o objetivo de gerar compostos mais estáveis em condições ácidas e aumentar seu poder de adsorção.

A versatilidade da quitosana não está limitada somente a sua modificação física, uma vez que pode ser utilizada sob diferentes formas, tais como gel, esferas ou fibras. Por conter um grande número de grupos reativos (hidroxila, acetamido, amino) quitina e quitosana podem sofrer vários tipos de modificações químicas, produzindo diferentes derivados polissacáricos com aplicações específicas (CRINI, 2005; KURITA, 2001). Em processos de descontaminação de águas, a modificação de quitosanas visa em aumentar o seu poder de adsorção, pelo uso de agentes “cross-link”, tornando-as menos solúveis em meio ácido. O glutaraldeído é um dos reagentes mais utilizados em ligações cruzadas com a quitosana e é utilizado principalmente para auxiliar em processos de imobilização de enzimas (**Figura 11**) (OLIVEIRA e VIEIRA, 2006).



**Figura 11:** Esquema da reação entre quitosana, glutaraldeído e enzima peroxidase.

Quitosanas também foram funcionalizadas com mercaptano [N-(2-hidroxi-3-mercaptopropilquitosana e 6-O-(mercaptoaceto-N-acetilquitosana)], derivados esses que exibiram alta capacidade de adsorção de íons mercúrio (CÁRDENAS *et al.*, 2001). A modificação da quitosana com o ácido poliacrílico (PAA), também resultou no aumento da adsorção, em relação à quitosana, de íons chumbo com valor máximo de adsorção observado em pH 4 (LI e BAI, 2006). A quitosana N-succinilada mostrou-se um material útil para adsorção de cobre (LIMA *et al.*, 2006). A imobilização de nanopartículas, principalmente de ouro, melhorou significativamente os processos de imobilização de enzimas em quitosana aumentando o desempenho de biossensores utilizados na análise de peróxido de hidrogênio e pesticidas (CAI, 2007; LEI *et al.*, 2003).

## 1.7.2- QUITOSANA COMO ADSORVENTE

Vários métodos podem ser aplicados na remoção de poluentes da água (TSAI *et al.*, 2005); dentre esses, um método físico muito utilizado é o de adsorção em sólidos. A adsorção é definida como o acúmulo de moléculas na interface, onde a concentração interfacial da espécie adsorvida é diferente daquela que está no seio do líquido. A adsorção de uma substância a partir de uma solução é a combinação de dois processos (LYKLEMA, 1994), em que a transferência de espécies da substância do interior do líquido para interface ocorre apenas com a transferência de um volume equivalente de solvente da interface para a solução. Assim, adsorção a partir de uma solução é um fenômeno de troca. Várias superfícies sólidas podem ser utilizadas como adsorventes: sílica, óxidos minerais, carbono ativado, polímeros e fibras sintéticas e naturais. O adsorvente preferido para descontaminação de água é o carvão ativado; no entanto, sua ampla utilização está limitada devido ao elevado custo. Dessa forma, na tentativa de diminuir os custos, é grande a procura por novos adsorventes, como, por exemplo, a quitosana, que propiciem menor custo no tratamento de águas (CRINI, 2006).

A quitina nativa tem em torno de 10% de grupos amino (VIEIRA *et al.*, 1997) e é facilmente obtida. Por apresentar o grupo amino acetilado, contudo, comporta-se com uma baixa capacidade de adsorção (LIMA e AIROLDI, 2004). Por esse motivo, torna-se indispensável sua desacetilação para obter a quitosana. A conversão da quitina em quitosana não implica em elevação significativa de custo, que permanece muito baixo em comparação ao custo do carvão ativo. Aumenta, por outro lado, a capacidade adsorviva da substância em relação à da substância-mãe (quitina), justificando o gasto.

A quitosana tem capacidade de remover fenóis de águas contaminadas. TAKAHASHI *et al.* (2005) utilizaram uma *p*-quinona como molécula-modelo e investigaram a capacidade adsorviva da quitosana com base em sua massa molecular relativa,  $M_r$ , e seu grau de desacetilação. As melhores condições encontradas para realização desse processo foram: quitosana com  $M_r$  em torno de  $1,24 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$  e com um grau de desacetilação entre 83,1 e 88,6 % e em pH alcalino.

A quitosana também mostra excelente desempenho na remoção de corantes de águas contaminadas. BLACKBURN (2004) mostrou que a quitosana com diferentes Mr (baixa, média e alta) remove corante (Reactive Red 238 e Acid Blue 193) de águas contaminadas com excelente eficiência (faixa de 74 a 99 %) e isto foi atribuído à combinação de interações intermoleculares, tais como eletrostática, Van der Waals e ligação de hidrogênio. DOS ANJOS *et al.* (2002) também verificaram que o corante Indigo Carmine (IC) foi removido da solução pela quitosana pela interação com os grupos amino protonados dela. Ambos os modelos de adsorção de Langmuir e Freundlich sugerem que a interação de corantes IC com quitosana ocorre sobre uma superfície heterogênea, formando uma monocamada de corante.

Uma outra classe de compostos para os quais a quitosana apresenta um grande potencial de remoção de águas contaminadas é a dos pesticidas.

O grupo de pesquisa em eletroquímica da Universidade Federal de Alagoas desenvolve atividades de pesquisa quanto à interação de alguns pesticidas com quitosana; o que mais se destacou foi o herbicida trifluralina (**TRF**). Com a utilização dos herbicidas, o solo fica contaminado e os resíduos são levados para águas de rios e lagos através das águas das chuvas. Assim, a presença desses resíduos nessas águas pode causar sérios problemas ao ecossistema, levando à necessidade de sua remoção. Informações sobre calor de adsorção em relação à quitosana e estrutura do herbicida são de suma importância, podendo revelar o mecanismo de adsorção e, assim, indicando qual o tipo de interação e fatores que influenciam no processo. No futuro, essas informações podem auxiliar na modificação da quitosana e para tornar o processo de adsorção mais seletivo.

## 1.8- ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

A adsorção é o processo de transferência de um ou mais constituintes (adsorbatos) de uma fase fluida para a superfície de uma fase sólida (adsorvente). Neste processo as moléculas presentes na fase fluida são atraídas para a zona interfacial devido à existência de forças atrativas não compensadas na superfície do adsorvente (RUTHVEN, 1994).

A adsorção pode ocorrer por mecanismos físicos ou químicos (FOUST, 1980). A adsorção física ocorre quando forças intermoleculares de atração entre as moléculas do fluido e a superfície do sólido são maiores do que as forças de atração entre as próprias moléculas do fluido. As moléculas do fluido aderem-se à superfície do sólido e o equilíbrio é estabelecido entre o fluido adsorvido e o restante que permaneceu na fase líquida.

Na adsorção química, ou quimiossorção, há formação de ligação covalente entre o fluido adsorvido e o sólido adsorvente, onde há compartilhamento de elétrons. Neste caso, o calor de adsorção é da mesma ordem de grandeza dos calores de reação. Por esta razão, somente a adsorção física é apropriada a uma operação cíclica. Além disso, na adsorção física podem formar-se multicamadas, enquanto que na adsorção química forma-se uma única camada molecular adsorvida (monocamada).

Vários fatores afetam a adsorção, tais como a estrutura molecular ou natureza do adsorvente, a solubilidade do soluto, o pH do meio e a temperatura. Compostos com diâmetros moleculares pequenos têm mais facilidade em difundir-se para o interior do sólido e conseqüentemente a adsorção é maior. Grupos polares têm uma alta afinidade com a água e isto geralmente diminui a adsorção a partir de soluções aquosas.

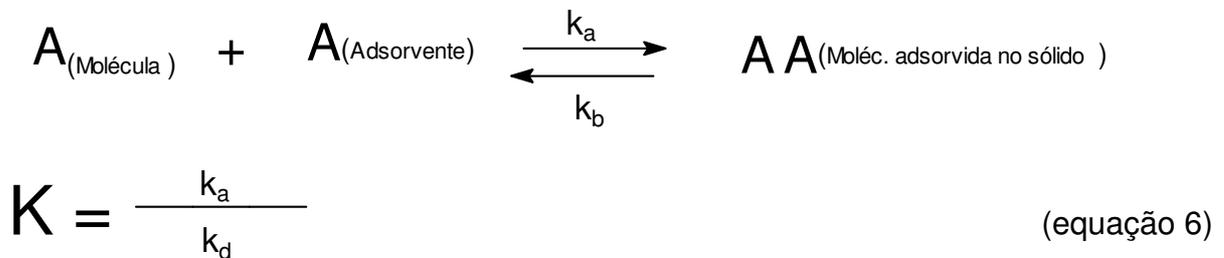
A temperatura é a variável que afeta a extensão da adsorção, que, em geral, é um processo exotérmico onde temperaturas altas diminuem a quantidade de soluto adsorvido. Baixas temperaturas são favoráveis à adsorção embora a velocidade e a extensão da adsorção sejam afetadas por outros fatores.

### **1.8.1- Termodinâmica da Adsorção**

Para estimar a capacidade de adsorção de um dado adsorvente, é essencial ter informações do equilíbrio de adsorção. Vários estudos têm sido conduzidos para determinar a quantidade de espécies adsorvidas sob condições determinadas (concentração e temperatura) ou a seletividade do processo de adsorção quando dois ou mais compostos adsorvíveis estão presente na solução (FOUST, 1980; SUZUKI, 1990; GEANKOPLIS, 1993; RUTHVEN, 1994).

Quando um adsorvente está em contato com um fluido que possui uma determinada composição específica, o equilíbrio da adsorção acontece depois de um tempo necessário para atingir o equilíbrio. A relação entre a quantidade adsorvida  $Q_e$  e a concentração da fase fluida  $C_{eq}$  a uma dada temperatura é chamada de **Isoterma de Adsorção**.

Em geral, para a adsorção física numa superfície homogênea em concentrações suficientemente baixas, a isoterma deve se aproximar à forma linear, onde a inclinação limite na região de baixa concentração é chamada de constante da lei de *Henry* ( $K$ ), ou *constante de equilíbrio termodinâmico* (Equação 6):



onde:  $A_{(s)}$  = adsorbato na solução

$A_{\text{adsorvido}}$  = adsorbato na superfície do sólido adsorvente

$k_a$  = constante de velocidade de adsorção

$k_d$  = constante de velocidade de dessorção

A lei de Henry corresponde fisicamente à situação em que a fase adsorvida está tão diluída que não existe competição por sítios adsorptivos nem interações entre as moléculas adsorvidas. Em maiores concentrações ambos os efeitos tornam-se importantes, modificando a forma da isoterma (RUTHVEN, 1994).

As isotermas de adsorção indicam:

- como o adsorvente efetivamente adsorverá o soluto e se a purificação requerida pode ser obtida;
- uma estimativa da quantidade máxima de soluto que o adsorvente adsorverá;
- informações que determinam se o adsorvente pode ser economicamente viável para a purificação do líquido.

Existem vários tipos de isotermas que são consideradas importantes no processo de adsorção, como por exemplo, isoterma de Langmuir, Freundlich, e Brunauer-Emmett-Teller (BET). Dessas, a isoterma de Langmuir foi a que melhor se enquadrou no nosso trabalho.

### 1.8.2- Isoterma de Langmuir

Devido a sua simplicidade e ampla utilidade, a isoterma de Langmuir tem encontrado uma ampla aplicação em diversas situações. Esse modelo é baseado na suposição que a adsorção está restrita a monocamada, que adsorção está localizada (como por exemplo, existe local de adsorção específico e as interações estão entre o local e uma molécula específica), e que o calor de adsorção é independente da quantidade de material adsorvido (HOLMBERG *et al.*, 1998).

A isoterma pode falhar em muitos aspectos e essas falhas devem-se, entre outros fatores, à heterogeneidade da superfície. No entanto, apesar das limitações, a equação de Langmuir se ajusta, razoavelmente bem aos dados experimentais de muitos sistemas.

A equação de Langmuir é interpretada sob as seguintes suposições:

- A superfície é homogênea.
- A substância adsorve em somente uma monocamada.
- Não existe interação substância-solvente ou substância-substância.
- As moléculas de substância e solvente têm igual área de secção transversal.

A equação de Langmuir pode ser derivada de um caminho simples. Permite que a velocidade de adsorção seja igual a:

$$\text{Velocidade de adsorção} = k_a C (1 - \theta) \quad (\text{equação 7})$$

onde C é a concentração de equilíbrio do adsorvente na solução e  $\theta$  é a fração da superfície que é coberta com a substância e  $k_a$  é a constante de velocidade de adsorção. Similarmente, a velocidade de dessorção é escrita como;

$$\text{Velocidade de dessorção} = k_d \theta \quad (\text{equação 8})$$

onde  $k_d$  é a constante de velocidade dessorção. No equilíbrio a velocidade de adsorção e dessorção são as mesmas e então nós temos

$$\frac{\theta}{1-\theta} = KC \quad (\text{equação 9})$$

$$\theta = \frac{KC}{1+KC} \quad (\text{equação 10})$$

onde  $K$  é a constante de equilíbrio ( $= k_a/k_d$ ). As equações 9 e 10 são termos da equação de Langmuir. A constante de equilíbrio,  $K$ , descreve a partição da substância entre a fase da superfície e a fase da solução.

$$K = \left( \frac{\theta}{C} \right)_c \rightarrow o \quad (\text{equação 11})$$

Conseqüentemente, valor de  $K$  baixo indica uma fraca adsorção enquanto um valor de  $K$  alto uma forte adsorção.

A fração da superfície que é coberta com uma determinada substância,  $\theta$ , é definida como:

$$\theta = \frac{\Gamma}{\Gamma_{\max}} \quad (\text{equação 12})$$

onde  $\Gamma$  é a quantidade adsorvida e  $\Gamma_{\max}$  é a adsorção máxima para uma monocamada. Esta equação pode ser combinada com equação (10) e rearranjando para forma linearizada de Langmuir:

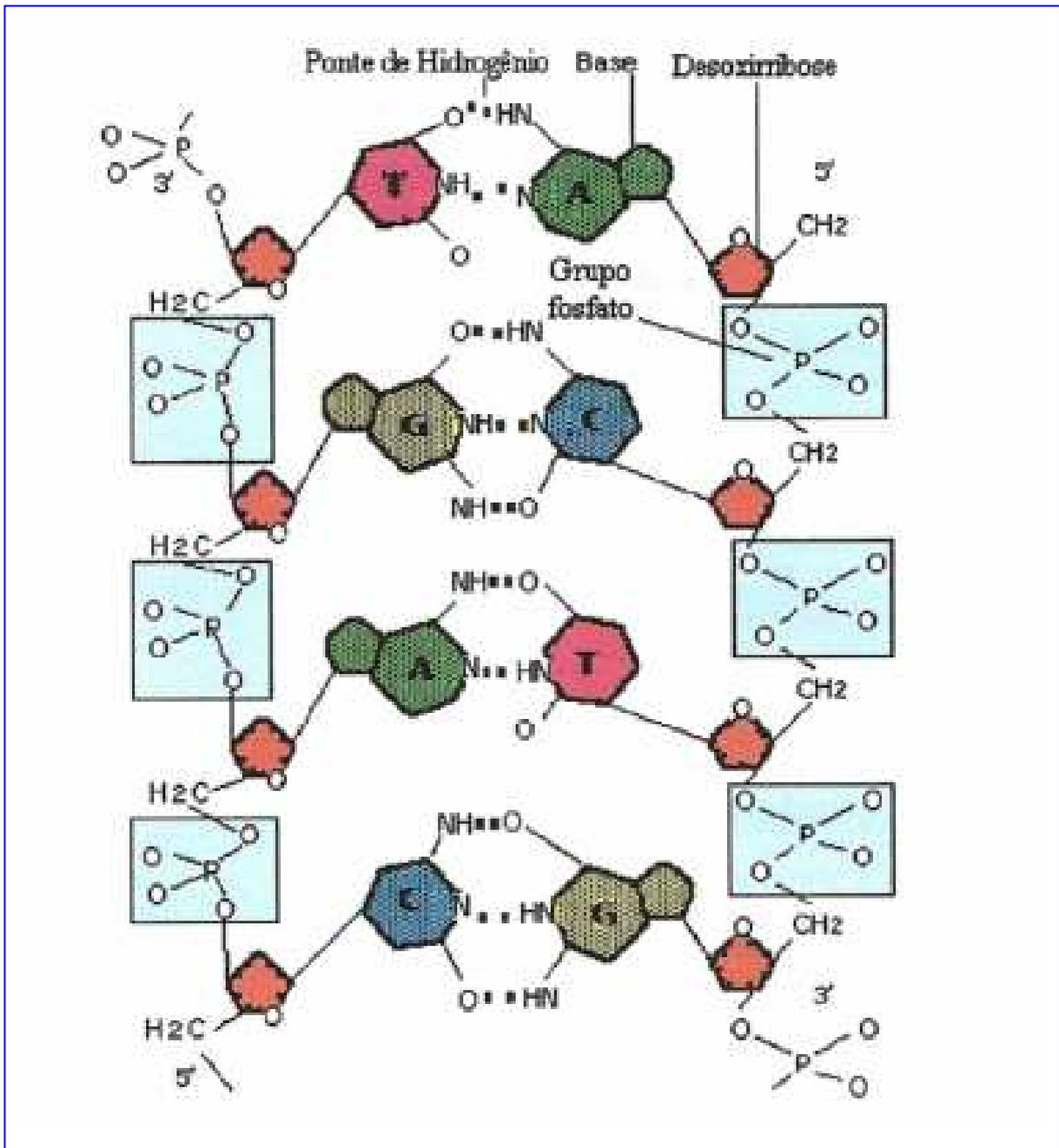
$$\frac{C}{\Gamma} = \frac{1}{\Gamma_m K} + \frac{C}{\Gamma_m} \quad (\text{equação 13})$$

O gráfico  $\frac{C}{\Gamma}$  versus  $C$  nos dar o valor de  $K$  e  $\Gamma_{\max}$  da intersecção e inclinação do gráfico, respectivamente. Deste modo, ambos os valores de  $\Gamma_{\max}$  e de  $K$ , e conseqüentemente a energia livre padrão de adsorção,  $\Delta G_{\text{ads}}$ , pode facilmente ser obtido de uma isoterma de adsorção. A energia livre padrão de adsorção,  $\Delta G_{\text{ads}}$ , está relacionado ao valor de  $K$  através da;

$$\Delta G_{\text{ads}} = - RT \ln (K) \quad (\text{equação 14})$$

## 1.9- BIOSSENSOR A BASE DE DNA

Biomacromoléculas têm papel importante nos processos básicos da vida, dentre eles estão os ácidos nucleicos, as proteínas e os polissacarídeos. Estudos relacionados à determinação de suas estruturas, propriedades e interações com outras substâncias, tornaram-se essencial para a compreensão de vários processos biológicos. No caso do DNA, as estruturas tridimensionais de sua dupla hélice, consistindo de duas fitas, cada uma delas formadas por grupos fosfatos, pentoses e bases púricas e pirimídicas ligadas através de ligações de hidrogênio é de fundamental importância (**Figura 12**).



**Figura 12:** Ligações de hidrogênio entre as nucleobases do DNA em fita dupla.

Os biossensores são definidos como dispositivos analíticos incorporados a um material biológico (tecidos, microorganismos, organelas, enzimas, ácidos nucleicos, etc.), a um material derivado biologicamente ou integrado com um transdutor, que pode ser ópticos, eletroquímicos, termométricos, piezoelétrico ou magnético. Ele vem sendo aplicado a uma grande variedade de problemas analíticos tanto na medicina, quanto no meio ambiente e na alimentação; em processos

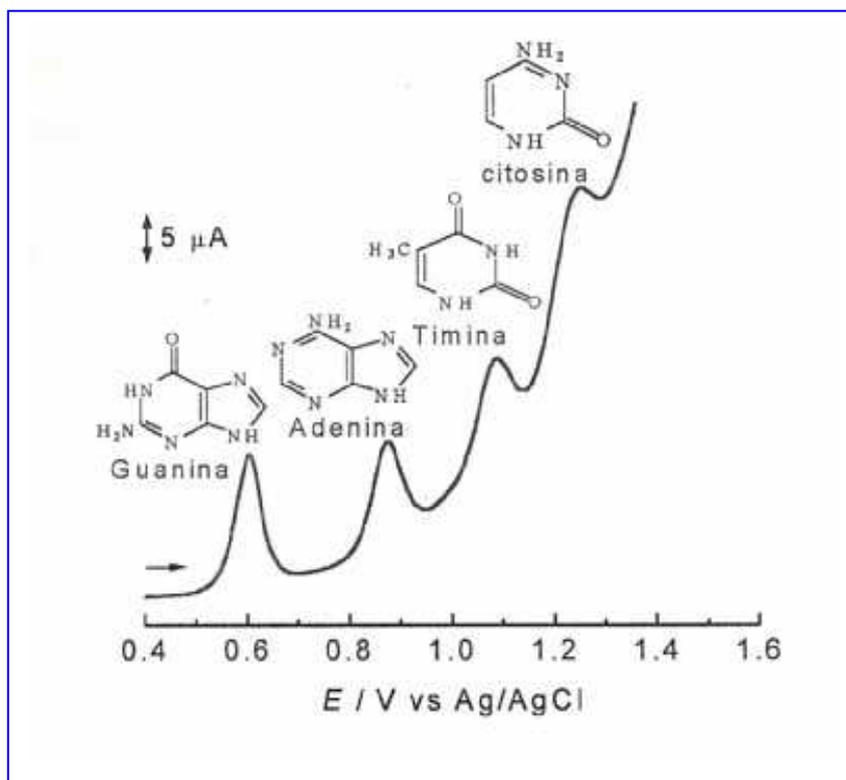
industriais e em segurança, entre tantos. Vários são os materiais que podem ser incorporados aos sensores. Particularmente, os biossensores de DNA são utilizados nos estudos de interação cinética entre compostos biologicamente ativos e o DNA, através de técnicas eletroquímicas, tais como voltametria cíclica, técnica de pulso diferencial, voltametria de onda quadrada, entre outras (BRETT *et al.*, 1995; BRETT *et al.*, 1998; LA-SCALEA *et al.*, 1999).

### 1.9.1- Comportamento eletroquímico do DNA

A complexidade estrutural do ácido desoxiribonucleico (DNA), bem como sua adsorção em diversas superfícies carregadas, ou seja, eletrodos (Hg, carbono vítreo, grafite, etc.) vêm sendo pesquisados há quase 40 anos, primeiro em mercúrio, depois em eletrodos sólido (PALECEK, 1961; WANG *et al.*, 1996). O estudo da adsorção do DNA em superfícies eletródicas é de fundamental interesse, já que a interação do DNA com superfícies carregadas ocorre naturalmente em sistemas biológicos. Em eletrodos de carbono vítreo, a eletrooxidação do DNA, em meio ácido, relaciona-se à oxidação das bases púricas (guanina, adenina), sendo as bases pirimídicas (timina, citosina) eletroinativas nessas condições. O dsDNA (DNA nativo, *double-strand* ou fita dupla) sempre apresenta menores correntes de eletrooxidação quando comparado ao ssDNA (DNA desnaturado, *single-strand* ou fita única), desnaturado termicamente, não só pelo fato de os sítios de oxidação estarem protegidos, por estarem envolvidos em ligações de hidrogênio, mas como também por sua menor flexibilidade e maior dificuldade de adsorção. Isoladamente, em pH 7,0 com eletrodo de carbono vítreo e por voltametria de pulso diferencial, as bases guanina e adenina apresentam picos de mesma intensidade; já os picos de oxidação da timina e citosina, só podem ser observados em maiores concentrações (BRETT *et al.*, 1999) como mostrados na **Figura 13**.

Muitas das doenças hereditárias, que apresentam conseqüências letais, mutagênicas ou carcinogênicas, são oriundas de algum dano irreversível ao DNA (SÉQUARIS e VALENTA, 1987). Muitos compostos se ligam e interagem com o DNA, causando mudanças na estrutura do DNA e seqüência de bases, provocando

perturbações na replicação do DNA (BRETT e CHIORCEA, 2003). Dentre estes se destacam os nitroaromáticos.

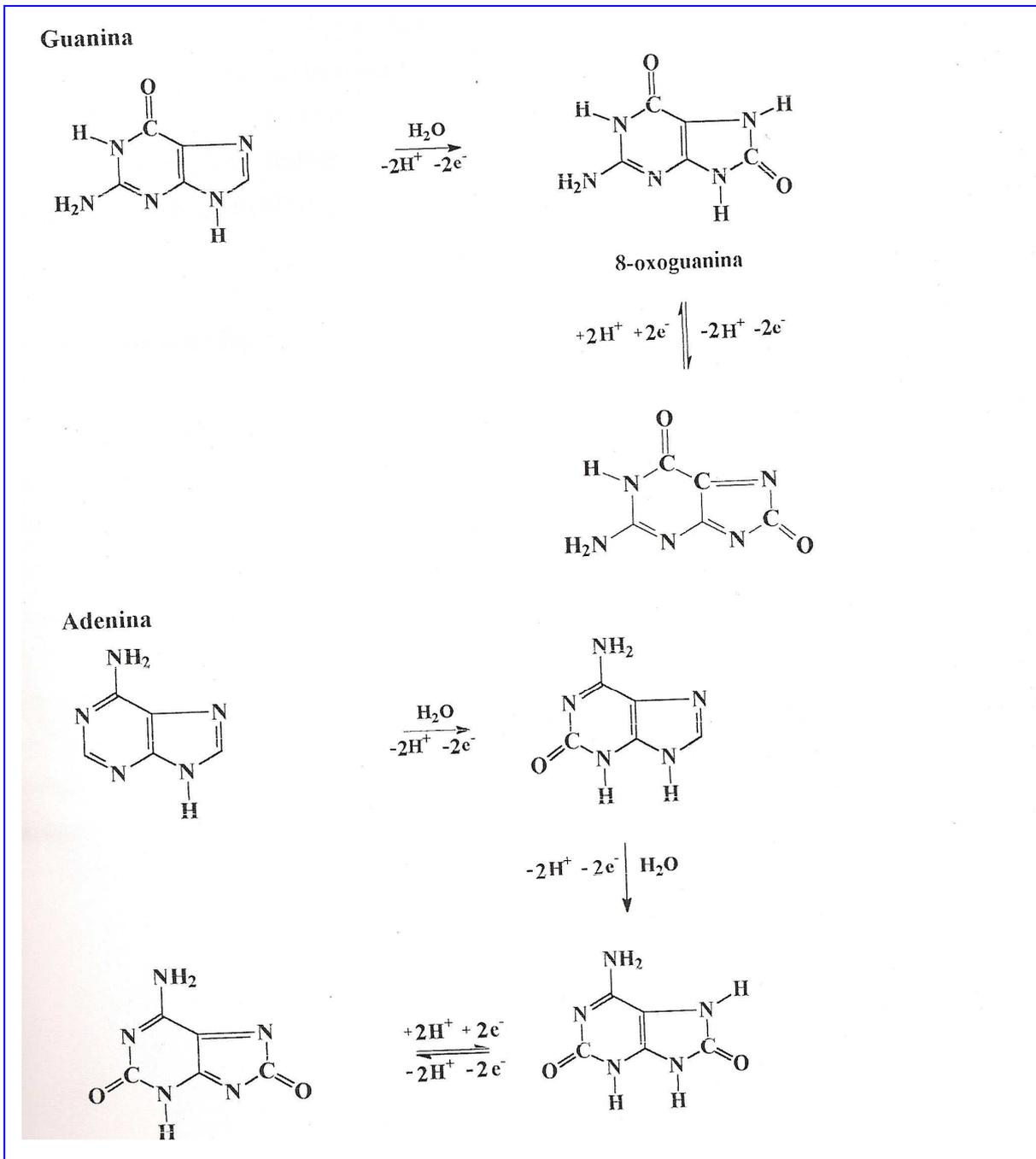


**Figura 13:** Voltamogramas de pulso diferencial (carbono vítreo) para a mistura das bases guanina, adenina ( $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), timina e citosina ( $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ). Tampão fosfato pH 7,4. velocidade ( $v = 5 \text{ m V s}^{-1}$ ), amplitude 50mV.

A oxidação da guanina e adenina já está bem descrita na literatura e ocorre em mecanismo de duas etapas, com a perda total de quatro elétrons e quatro prótons como apresentado na **Figura 14** (LA-SCALEA *et al.*, 1999).

Nos estudos de hibridação de DNA aventou-se quanto à possibilidade de se desenvolverem biossensores eletroquímicos de DNA, processo logo encarado com afinco e entusiasmo. As novas técnicas baseadas em modificação de eletrodos com ácidos nucleicos, além de ampliar de forma significativa o potencial das técnicas eletroanalíticas aplicadas à química medicinal, com determinação do mecanismo de ação de drogas e de citotoxicidade frente ao DNA. O desenvolvimento de novos ensaios envolvendo técnicas de hibridação em fase-sólida, com rapidez,

sensibilidade e amplitude de utilização terá forte impacto em diagnóstico e no estudo genômico (THORP, 1998).



**Figura 14:** Mecanismo de oxidação para a guanina e adenina em meio prótico.

## 2- OBJETIVOS

### 2.1- Gerais

Realizar estudos eletroquímicos e de adsorção sobre a quitosana e ao *dsDNA*, tanto por técnicas espectroscópicas quanto eletroquímicas, avaliar a degradação eletroquímica da TRF combinada ou não com processos oxidativos e determinar a toxicidade frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*.

### 2.2- Específicos

- ✓ Estudo eletroquímico da **TRF** em eletrodo de carbono vítreo usando Voltametria Cíclica, Voltametria de Pulso Diferencial e Voltametria de Onda Quadrada.
- ✓ Determinação da quantidade de elétrons envolvidos no processo de redução da **TRF** através de coulometria e eletrólise exaustiva.
- ✓ Construção de isotermas de adsorção entre a **trifluralina** e **quitosana**.
- ✓ Aplicação do biossensor à base de **quitosana** para quantificação da **trifluralina**.
- ✓ Estudo da interação da **TRF** com o biossensor *dsDNA* (uso de biossensor à base de DNA).
- ✓ Estudo de toxicidade da trifluralina frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*.

### **3- EXPERIMENTAL**

#### **3.1 - Preparações Auxiliares**

##### **3.1.1- Extração da Trifluralina (TRF)**

A trifluralina comercial (Milena) foi extraída em funil de separação (30 mL) com acetato de etila (20 mL) e NaOH 10% (50 mL). A mistura foi agitada e deixada em repouso até que as duas fases distintas fossem observadas. Em seguida, a fase orgânica foi removida e transferida para um balão volumétrico de 250 mL ao qual etanol (10 mL) foi adicionado para a remoção da água residual. Os solventes foram evaporados em rotavapor BÜCHI461 Batch – tipo RE1115 e a parte do resíduo de cristais alaranjados foi solubilizado em acetato de etila. A cromatografia em camada delgada em placa de sílica do resíduo foi realizada usando como eluente hexano/acetato de etila (3:7, v/v) com revelação sob luz UV. Os cristais foram caracterizados quanto ao ponto de fusão MPAQF-301, da Microquímica, o espectro de IV foi registrado em espectrofotômetro IFS66, utilizando pastilhas de KBr contendo cerca de 1% da amostra e o de EM usando aparelho Shimadzu GCMS-QP5050A cujos dados espectrais encontram-se no item 5.1.

##### **3.1.2. Preparo da solução tampão**

Os experimentos foram realizados, utilizando-se uma solução aquosa-etanólica (50%) tamponada, cujo  $pH_{\text{aparente}}$  variou entre 1,2 e 12,85. Os tampões usados foram preparados de acordo com a Tabela 6. A medida do pH foi realizada em pHmetro mod. MAPA 200, série 0113992 da MARCONI.

**Tabela 8:** Tampões para eletrólito suporte.

Quantidade de eletrólito (mL)	C (mol L <sup>-1</sup> )	Quantidade de eletrólito (mL)	C (mol L <sup>-1</sup> )	pH	Força
KCl (25)	0,20	+ HCl (42,5)	0,20	1,20	0,135
KCl (25)	0,20	+ HCl (6,5)	0,20	2,02	0,063
NaOAc (3,7)	0,20	+ HOAc (46,3)	0,20	3,40	0,100
NaOAc (13,2)	0,20	+ HOAc (36,8)	0,20	4,30	0,197
NaOAc (7,2)	1,00	+ HOAc (12,5)	1,00	4,50	0,100
NaOAc (41,2)	0,20	+ HOAc (8,8)	0,20	5,40	0,100
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (6,15)	0,20	+ NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (43,85)	0,20	6,08	0,125
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (30,5)	0,20	+ NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (19,5)	0,20	6,91	0,222
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (47,35)	0,20	+ NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (2,65)	0,20	8,05	0,289
NaHCO <sub>3</sub> (50)	0,05	+ NaOH (2,5)	0,10	9,25	0,041
NaHCO <sub>3</sub> (50)	0,05	+ NaOH (13,8)	0,10	10,20	0,060
KCl (25)	0,20	+ NaOH (6,0)	0,20	12,04	0,062

### 3.1.3- Preparo da Solução de Trifluralina (Solução Estoque)

Para preparar uma solução de TRF ( $M = 335,3 \text{ g mol}^{-1}$ ) de concentração  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  foram pesados 33,53 mg do composto que foram dissolvido em 10,0 mL de etanol. Dessa solução estoque foram preparadas as seguintes soluções:  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  e  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , conforme o procedimento acima. Essas soluções foram usadas apenas por dois dias, em seguida novas soluções foram preparadas.

### 3.1.4 - Preparo do gel de Quitosana

O gel de quitosana foi preparado pela dissolução, sob agitação por 2 horas, de 50 mg da mesma em 5 mL de ácido acético (1%).

### 3.1.5- Preparo do Gel de DNA

O gel de dsDNA ( calf thymus, sal de sódio tipo I, Sigma) foi preparado pela dissolução de 18,75 mg do mesmo em 1 mL de tampão acetato (pH 4,5) em um tubo

Eppendorf. O gel foi deixado em geladeira por 24 horas para homogeneização e para evitar a degradação pelo calor.

### 3.1.6 - Preparo da Solução de CoTSPc

Uma solução do complexo CoTSPc foi preparada para o desenvolvimento de sensor para a **TRF** na concentração de  $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$  em água deionizada para o preparo do filme a ser colocado na superfície do eletrodo.

## 3.2-TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS

As técnicas eletroquímicas foram realizadas em potenciostato Autolab PGSTAT 20 em um sistema de três eletrodos: eletrodo de carbono vítreo (BAS, diâmetro 3,0 mm) como eletrodo trabalho, eletrodo de platina como auxiliar e como eletrodo de referência, Ag|AgCl|Cl<sup>-</sup> ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) em tubo com capilar de Luggin com vycor na extremidade. A análise dos dados foi realizada a partir de gráficos obtidos nos experimentos e tratados com o auxílio do programa Origin 6.0.

### 3.2.1- Voltametria Cíclica (VC)

A voltametria cíclica foi realizada na faixa de potencial de  $0 \rightarrow -1,400\text{V} \rightarrow 1,400\text{V}$ , utilizando solução de TRF  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  preparada em solução aquosa-etanólica (1:1; v/v) tamponada, pH aparente 7,0 ( $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$  e  $0,2 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ ).

### 3.2.2- Voltametria de Pulso Diferencial (VPD)

Técnica utilizada principalmente para fazer o estudo da dependência do potencial de redução da **TRF** com o pH. Os experimentos foram realizados, utilizando-se uma solução aquosa-etanólica (1:1, v/v) tamponada, cujo pH aparente variou entre 1,20 e 12,85. Os tampões usados foram preparados de acordo com a tabela 7.

### 3.2.3- Voltametria de Onda Quadrada (VOQ)

A **VOQ** foi realizada em tampão fosfato/etanol (1:1, v/v), cujo pH aparente 7,0. Os valores dos parâmetros voltamétricos foram otimizados.

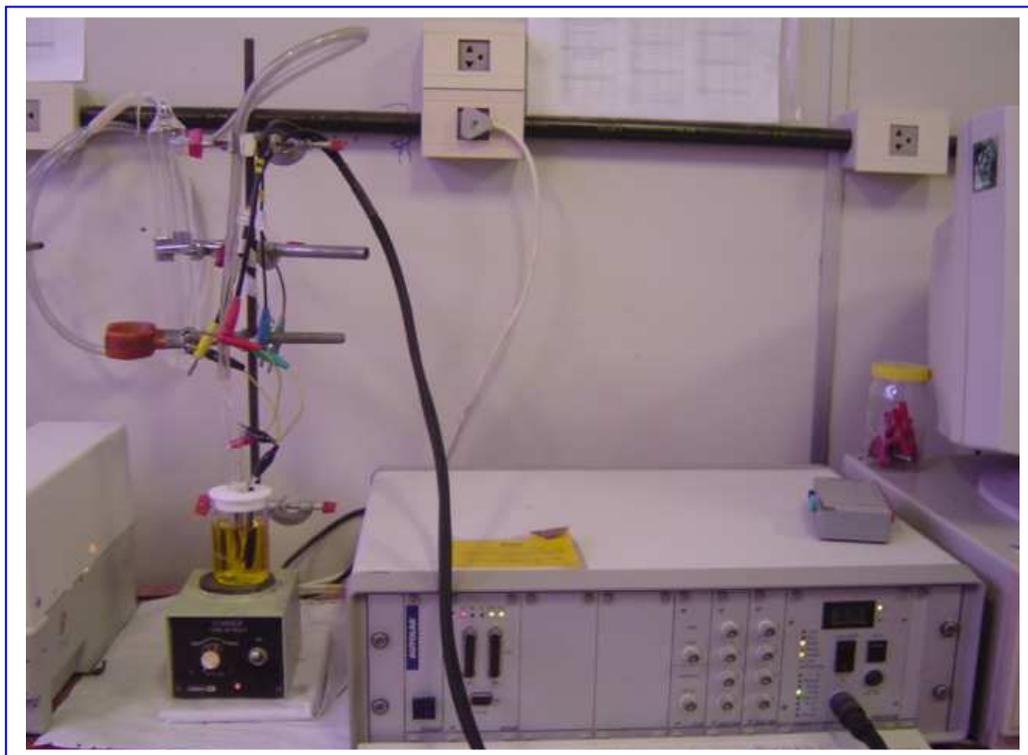
### 3.2.4-Eletrólises

#### 3.2.4.1 - Eletrodos

Todas as eletrólises foram realizadas utilizando feltro de carbono modelo KFA5 marca SEECIL carbon como eletrodo de trabalho (área 3 x 2 cm), espiral de platina como eletrodo auxiliar e o eletrodo de referência, Ag|AgCl|Cl<sup>-</sup> (0,1 mol L<sup>-1</sup>) em tubo com capilar de Luggin com vycor na extremidade (**Figura 15**).

#### 3.2.4.2 - Procedimento Geral

A solução de tampão/etanol (1:1, v/v) foi adicionada à cela com 1,49 g de KCl (0,2 mol L<sup>-1</sup>) com a finalidade de aumentar a força iônica da solução e desaerada com fluxo de nitrogênio durante 15 min. Em seguida, iniciou-se a pré-eletrólise dessa solução até que uma corrente de aproximadamente 1% da corrente inicial fosse atingida. A **TRF** (80 mg) foi adicionada a cela e procedeu-se à eletrólise até a corrente atingir valores suficientemente baixos. A carga foi integrada eletronicamente. Todo o processo foi feito sob fluxo de N<sub>2</sub> e com agitação magnética. Todo o procedimento foi acompanhado por voltametria cíclica.



**Figura 15:** Esquema da cela de eletrólise em eletrodo de feltro de Carbono.

Ao final da eletrólise, o compartimento anódico foi removido rapidamente para evitar a mistura. Em seguida, a solução foi transferida para um funil de separação e a cela foi lavada com 10 mL de água que, reunida à solução do funil, sofreu extração com três volumes de 20 mL de acetato de etila. Em seguida, a fase orgânica foi separada, o solvente foi evaporado e o produto da reação foi separado.

Ao final do processo (quando a corrente residual foi atingida), a carga integrada eletronicamente pelo coulômetro foi registrada. Esse valor representa a carga total do processo. Em seguida, calculou-se a carga residual, multiplicando o tempo de eletrólise pela corrente residual atingida, de acordo com a equação 15.

$$Q_{\text{res}} = I_{\text{res}} \times t$$

(equação 15)

A carga residual foi subtraída da carga total e resultou na carga líquida relativa à redução do substrato. A partir dessa carga líquida, o número de elétrons envolvidos no processo foi calculado a partir da equação 16:

$$n = Q_{\text{liq}} \times M/m \times F$$

(equação 16)

onde **n** é o número de elétrons, **Q<sub>liq</sub>** a carga líquida (coulombs), **M** a massa molar do substrato (g mol<sup>-1</sup>), **m** massa do substrato (g) e **F** a constante de Faraday (96485 C mol<sup>-1</sup>).

### 3.3 – Reação de Eletrofenton

A eletrólise foi conduzida em uma cela eletroquímica em um sistema de três eletrodos controlada por um potenciostato-galvanostato Autolab PGSTAT 20. O eletrodo de trabalho foi um feltro de carbono de área 6,0 cm<sup>2</sup> (KFA5 marca SEECIL carbon), o contra-eletrodo foi um fio de platina e o eletrodo de referência, Ag|AgCl|Cl<sup>-</sup> (0,1 mol L<sup>-1</sup>) em tubo com capilar de Luggin com vycor na extremidade. A solução aquosa de TRF foi preparada em uma concentração de 1,0 x 10<sup>-8</sup> mol L<sup>-1</sup>. Este valor constitui seu limite de solubilidade em água. Antes da eletrólise, oxigênio foi borbulhado por 5 min para saturar a solução aquosa que foi agitada continuamente por um agitador magnético. O sal de Mohr's (0,39 mg, (NH<sub>4</sub>)Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O) foi introduzida na solução antes de começar a eletrólise. O pH da solução foi continuamente ajustado entre 3,0 e 3,5 pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>. O potencial do eletrodo trabalho foi fixado em -0,5 V. As amostras foram retiradas da solução eletródica em intervalos regulares de carga coulométrica (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 C) e analisados em UV. O produto final foi analisado através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) usando aparelho Shimadzu GCMS-QP5050A.

### 3.4- Análise de CG-EM

As condições cromatográficas foram coluna capilar de sílica fundida (30 x 0,25 mm) com fase estacionária Zebon ZB-5MS (0,25 μm de espessura de filme) usando hélio (He) como gás de arraste gás com fluxo de 1,8 mL min<sup>-1</sup>, a temperatura foi programada mantendo 80<sup>o</sup> C por 2 min, seguido de um aumento de 10<sup>o</sup> C min<sup>-1</sup> até atingir 300 °C, mantendo a temperatura constante por 15 min; a temperatura do detector (ou interface) 350 °C; foi injetado um volume de 1,0 μL em

acetato de etila. As condições do EM foram detector de captura iônica operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eV; velocidade 1000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/s e fragmentos detectados de 40 a 500 Da.

### 3.5- Análise Espectroscópica

A análise foi realizada em um espectrofotômetro Shimadzu Multispec-1501. Uma solução estoque de trifluralina em etanol com concentração de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada usando água sendo acidificada pela adição de HCl concentrado até o pH 4,0 (1:1). Uma alíquota foi retirada e adicionada a 10 mL de água acidificada/etanol para obter uma concentração de  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Em seguida, foi feita a análise em meio etanólico e meio ácido, observando o efeito do tempo com agitação e sem agitação e o efeito da variação da massa de quitosana. A faixa de comprimento de onda analisada foi de 200 a 600 nm.

#### 3.5.1- Meio Etanólico

Para a análise em meio etanólico, foi preparada uma solução estoque de trifluralina  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ , 50% etanólica. Para obter uma concentração  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , foi retirada uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  e adicionados em 10mL de água (50% etanólica).

#### 3.5.2 – Meio Ácido

Na análise em meio ácido, foi feita uma solução estoque de trifluralina a  $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ , 50% etanólica em pH corrigido para 4. Para obter uma concentração  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , foi retirada uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  e adicionada em 10 mL de água (50% etanólica em pH 4).

#### 3.5.3 - Efeito do Tempo com Agitação

Foi preparada uma solução  $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  de trifluralina e colocada 3,0 mL da mesma em uma cubeta de quartzo e sua absorvância foi medida na faixa de 200 a 700 nm. Os 3,0 mL foram retirados e colocados para agitar durante 2 horas com 3,0 mg de quitosana. Ao final deste período, a absorvância foi novamente medida na mesma faixa de comprimento de onda.

### 3.5.4– Efeito do Tempo sem Agitação

Da solução  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, 3,0 mL foram colocados na cubeta de quartzo e medida a sua absorvância. Foi adicionada 0,5 mg de quitosana na mesma cubeta e medida a absorvância a cada 20 min, no decorrer de 2 horas. Ambas as medidas foram feitas na faixa de 200 a 700 nm.

### 3.5.5 – Efeito da Variação da Massa de Quitosana

Da solução  $10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, foram colocados 3,0 mL na cubeta de quartzo e medida a absorvância. Foram adicionadas, seis massas de 0,5 mg de quitosana e medidas as absorvâncias após a adição de cada massa.

## 3.6 – Estudo das isotermas de adsorção

### 3.6.1- Efeito da variação da massa de quitosana

O experimento foi realizado à temperatura constante ( $25 \pm 1^\circ$  C), utilizando várias massas de quitosana (60; 90; 120; 180 e 240 mg) que foram adicionadas a um erlenmeyer com 30 mL de água acidificada (pH 4,0 usando HCl) e após 15 min (tempo suficiente para protonar a quitosana) foi adicionado 900  $\mu$ L de uma solução estoque de TRF ( $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) para chegar a uma concentração de  $3,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. Este sistema permaneceu em um agitador orbital (incubadora Shaker marca Marconi NA420) por 1 hora sob agitação constante (150 rpm). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A partir destes dados, uma curva foi construída para mostrar a massa de TRF adsorvida por unidade de massa de quitosana em função de massa de quitosana.

### 3.6.2- Cinética de adsorção

A quitosana (180 mg) foi adicionada a 30 mL de água acidificada (pH 4,0 usando HCl) e após 15 min de contato adicionou 900  $\mu$ L de TRF ( $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) para concentração de  $3,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>. O sistema foi deixado em uma incubadora termostaticada a 25 °C, variando-se o tempo de contato de 10 a 120 min. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Com os dados obtidos, a curva da

cinética de adsorção foi construída para mostrar a massa de TRF adsorvida por unidade de massa de quitosana em função do tempo de contato.

### 3.6.3- Isotermas de adsorção da TRF em quitosana

A quitosana (180 mg) foi adicionada a 30 mL de água acidificada (pH 4,0 usando HCl) e após 15 min de contato a **TRF** foi adicionada em concentrações variadas (0,010 a 0,217 g L<sup>-1</sup>). As suspensões foram colocadas em uma incubadora termostatizada por 1,5 h em temperatura constante (298, 303, 308 e 313K) (**Figura 16**). Após o tempo pré-determinado, a quitosana foi removida da suspensão por filtração. A concentração residual de TRF no filtrado foi medida através do espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu Multispec-1501, em 274 nm. A quantidade de **TRF** adsorvida na quitosana foi calculada da diferença entre as concentrações inicial e final de **TRF**.



**Figura 16:** Agitador orbital contendo a suspensão quitosana e **TRF**.

## 3.7- Eletrodo Modificado

### 3.7.1- Eletrodo Modificado com Quitosana (EMQ)

Um eletrodo de carbono vítreo, com área geométrica de 3,0 mm<sup>2</sup>, foi usado para a construção do EMQ. Para a modificação do eletrodo, foi adicionado na superfície do mesmo uma alíquota de 20 µL de gel de quitosana cobrindo a

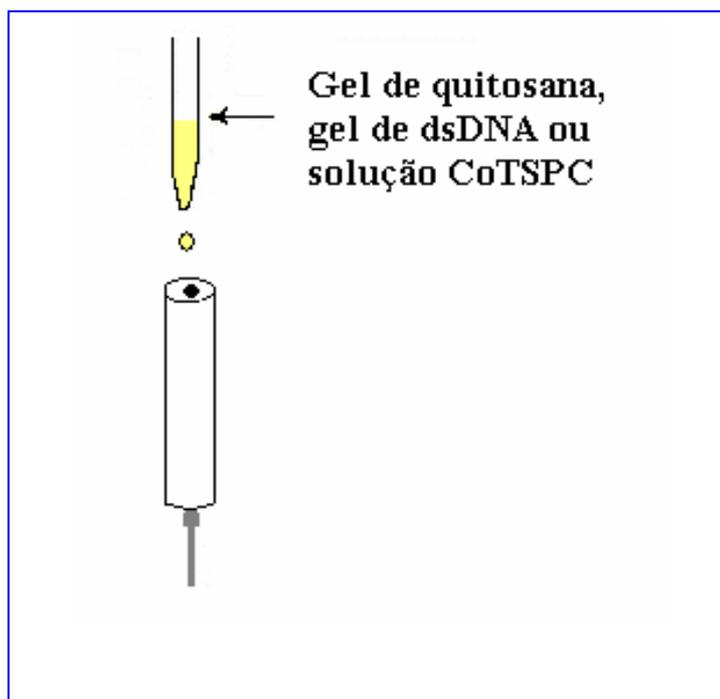
superfície do eletrodo de carbono vítreo e o mesmo foi deixado secar a temperatura ambiente. Em seguida, o EMQ foi mergulhado em 10mL de tampão fosfato ( $\text{pH}_{\text{ap}} = 7,0$ ) para a obtenção do branco, e a TRF ( $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) foi adicionada.

### 3.7.2- Preparo do Eletrodo Modificado com DNA

Todo o estudo eletroquímico do biossensor foi realizado utilizando-se a VPD em um sistema de três eletrodos: eletrodo de carbono vítreo (BAS, diâmetro de 3,0 mm), modificado com *dsDNA* como eletrodo de trabalho, platina como eletrodo auxiliar e  $\text{Ag} | \text{AgCl} | \text{Cl}^-$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) em um tubo com capilar de Luggin com vycor na extremidade, como eletrodo de referência. O experimento foi realizado em meio tamponado (tampão acetato pH 4,5). As análises foram realizadas em Potenciostato Autolab e o pH medido em pHmetro MARCONI MAPA200 (**Figura 17**).

#### 3.7.2.1- Preparo do biossensor de DNA

Para o preparo do biossensor de *dsDNA*, um eletrodo de carbono vítreo foi condicionado em tampão acetato utilizando-se a técnica VPD. Esse eletrodo foi submetido a várias ciclagens na faixa de potencial de 0 a 1,4 V. Após esse condicionamento, foram colocados 80  $\mu\text{L}$  do gel de *dsDNA* na superfície do eletrodo, que foi seco mediante fluxo de  $\text{N}_2$  antes da realização do experimento. Após a secagem, esse eletrodo modificado com *dsDNA* foi imerso na cela eletroquímica contendo 5,0 mL de solução tampão acetato (pH 4,5). Foram colocados volumes adequados de solução etanólica de TRF ( $1 \times 10^{-6}$  a  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) e feita uma varredura VPD na região de potencial de 0 a 1,4 V, na velocidade de varredura de  $5 \text{ mV s}^{-1}$  (**Figura 17**).



**Figura 17:** Procedimento de preparação do eletrodo modificado com quitosana, dsDNA ou quitosana/CoTSPC

### 3.7.3- Preparo do eletrodo modificado com CoTSPC e gel quitosana

O sensor foi construído com um eletrodo de carbono vítreo após a realização da polarização do mesmo. 10  $\mu\text{L}$  de uma solução de CoTSPc e 10  $\mu\text{L}$  gel de quitosana preparados de acordo com o item 4.1.5 (1:1, v/v) foram adicionados na superfície do sensor. Em seguida, o eletrodo foi deixado secar a temperatura ambiente. O eletrodo foi então lavado cuidadosamente com água para retirar o excesso de complexo que permanece na superfície do eletrodo. Em seguida, foi feito o estudo eletroquímico.

## 3.8 – Atividade Moluscicida

### 3.8.1- Ensaio Biológico

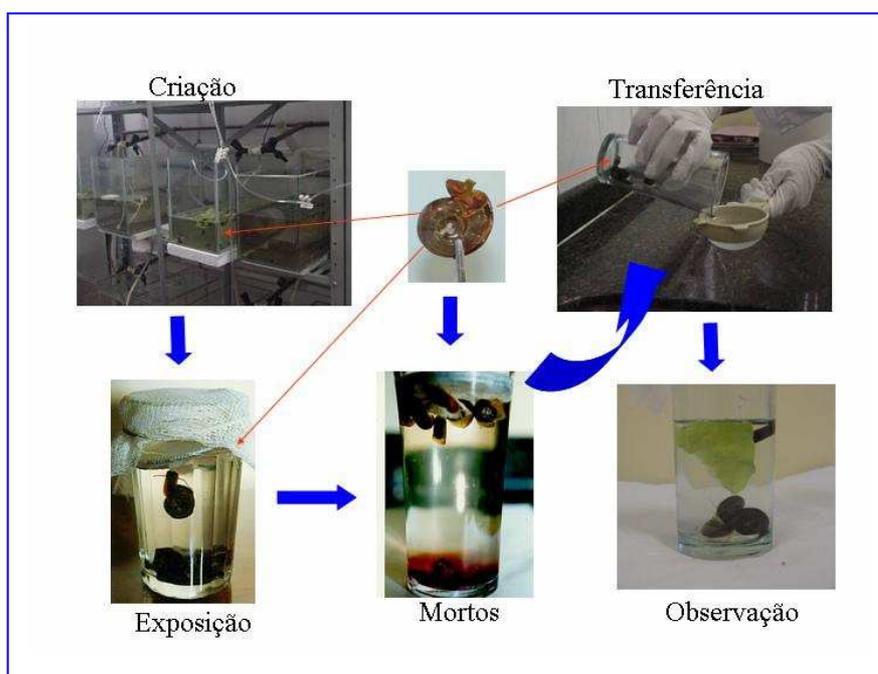
A metodologia usada para avaliar a atividade moluscicida se baseou na imersão do caramujo *B. glabrata* em uma solução aquosa a 0,1% de DMSO da TRF, nas concentrações apropriadas - **Figura 18.**

A solução teste para a substância foi preparada a 100, 50 e 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para o teste preliminar com o caramujo. No teste apurado as concentrações foram selecionadas em função dos resultados obtidos nos ensaios preliminares e realizados em duplicata (caramujo adulto). Em ambas as fases do teste foi obedecida a relação de 1 caramujo – 25 mL de solução-teste. Na etapa preliminar foram utilizados 5 caramujos por concentração e na etapa apurada 10 caramujos por concentração.

Dois conjuntos de controle foram usados visando verificar a suscetibilidade dos caramujos, um positivo com niclosamida a 3  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ou carbonato cúprico a 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e um negativo - somente com água desclorada. O tempo de exposição destes organismos foi de 24 horas e o de observação 72 horas, com leitura e troca de água a cada 24 horas, além da remoção dos exemplares mortos. Durante o período de observação a alimentação dos caramujos constituiu de alface.

A morte dos caramujos foi indicada pela descoloração, ausência de contrações musculares, hemorragia e deterioração dos tecidos do corpo.

Com relação ao bioensaio com o caramujo adulto, apenas foi submetido ao teste apurado a concentração que promoveu em torno de 30% de mortalidade a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



**Figura 18:** Teste moluscicida.

### **3.8.2 - Análise Estatística**

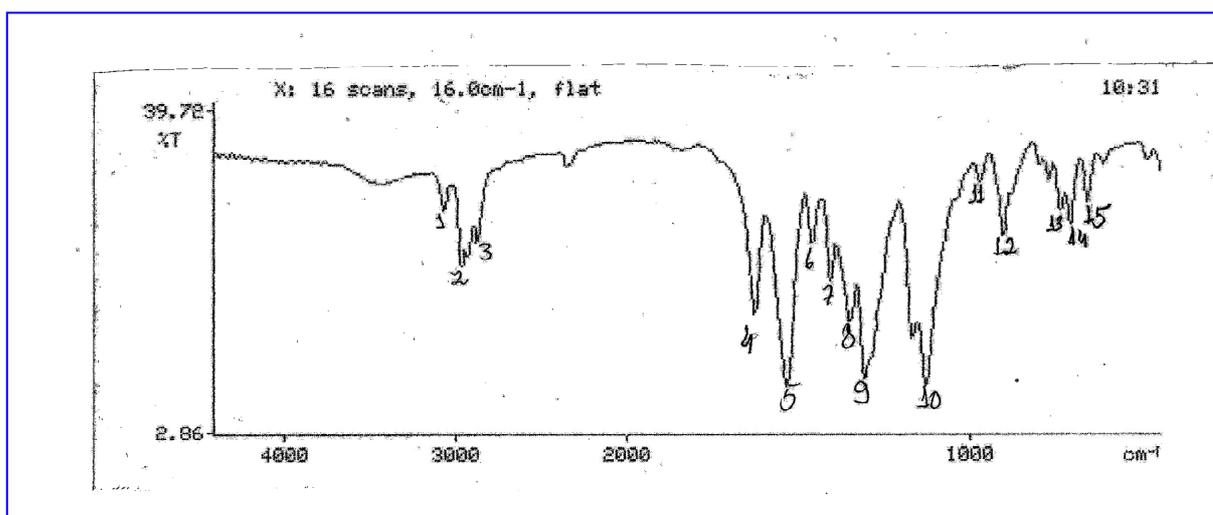
A análise dos dados, concentração x mortalidade dos organismos-alvo, visando à determinação dos valores de concentração letal  $CL_{90}$ ,  $CL_{50}$  e  $CL_{10}$  e seus respectivos intervalos de confiança  $IC_{95}$  e  $IC_{90}$ , foi realizada de acordo com o método Próbitos de análises disponível no programa computacional POLO.

## 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1- Caracterização do Princípio Ativo do Herbicida TRF

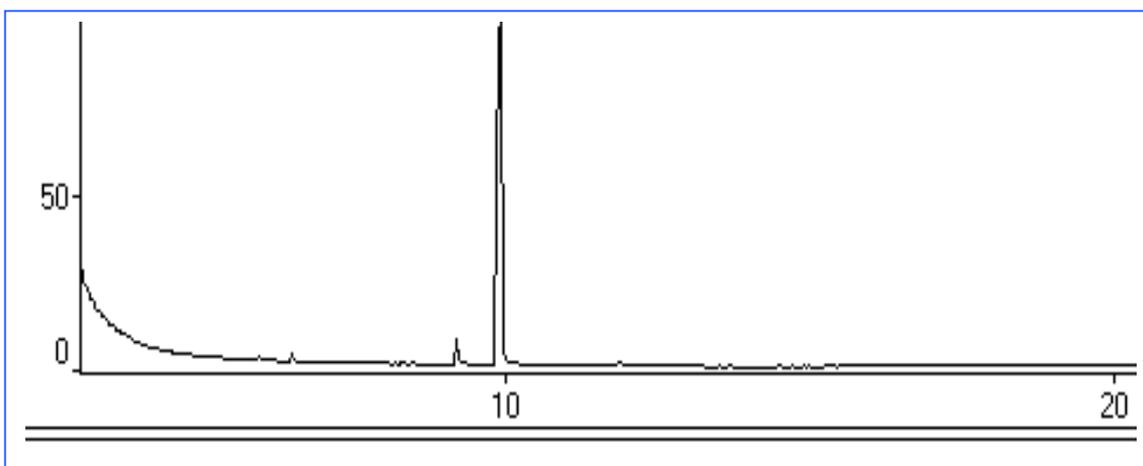
A TRF [2,6-dinitro-N,N-dipropil-4-(trifluorometil)benzenamina] pura foi obtida a partir do produto comercial Trifluralina (Milena Agrociência) com composição de 55,55% de inertes e 44,45% do princípio ativo após a extração com NaOH (10%) e acetato de etila. Em seguida a fase orgânica foi submetida à evaporação formando cristais finos alaranjados de ponto de fusão 48,0 °C (literatura p.f 48,5-49 °C, The Pesticide Manual). A sua caracterização foi feita através de IV(KBr) e EM (**Figuras 19 e 20**).

O espectro na região IV (**Figura 19**) apresentou bandas de absorção indicativas da presença de aromático em torno de 3070 cm<sup>-1</sup> (banda 1) (deformação axial C-H de aromático); 1629, 1536 e 1464 cm<sup>-1</sup> (bandas 4,5 e 6) (deformação axial C=C do anel aromático), grupos nitro 1536 e 1464 cm<sup>-1</sup> (bandas 5 e 6) (estiramento assimétrico C-NO<sub>2</sub>), 1352 -1310 cm<sup>-1</sup> (bandas 8 e 9) (estiramento simétrico C-NO<sub>2</sub>) e deformação axial C-N de aminas aromáticas terciárias. Na região de 906-965 cm<sup>-1</sup> (bandas 11 e 12) é indicativo do padrão tetra-substituído do anel aromático.



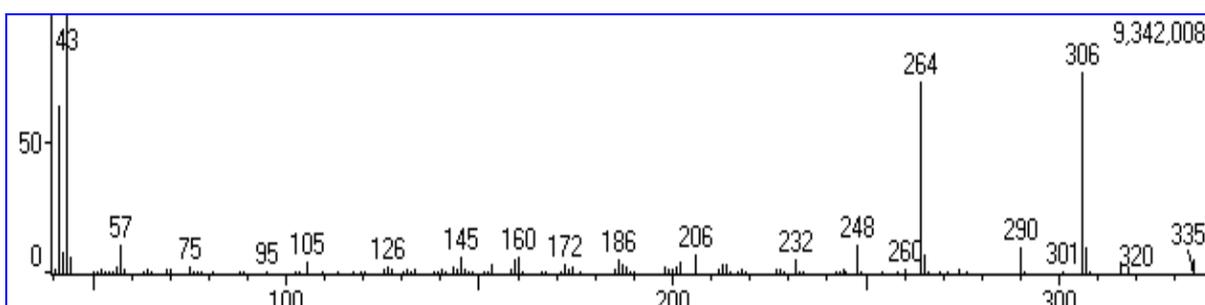
**Figura 19:** Espectro na região de IV da TRF.

O cromatograma CG-EM (**Figura 20**) da TRF nos mostra que a substância se encontra pura.

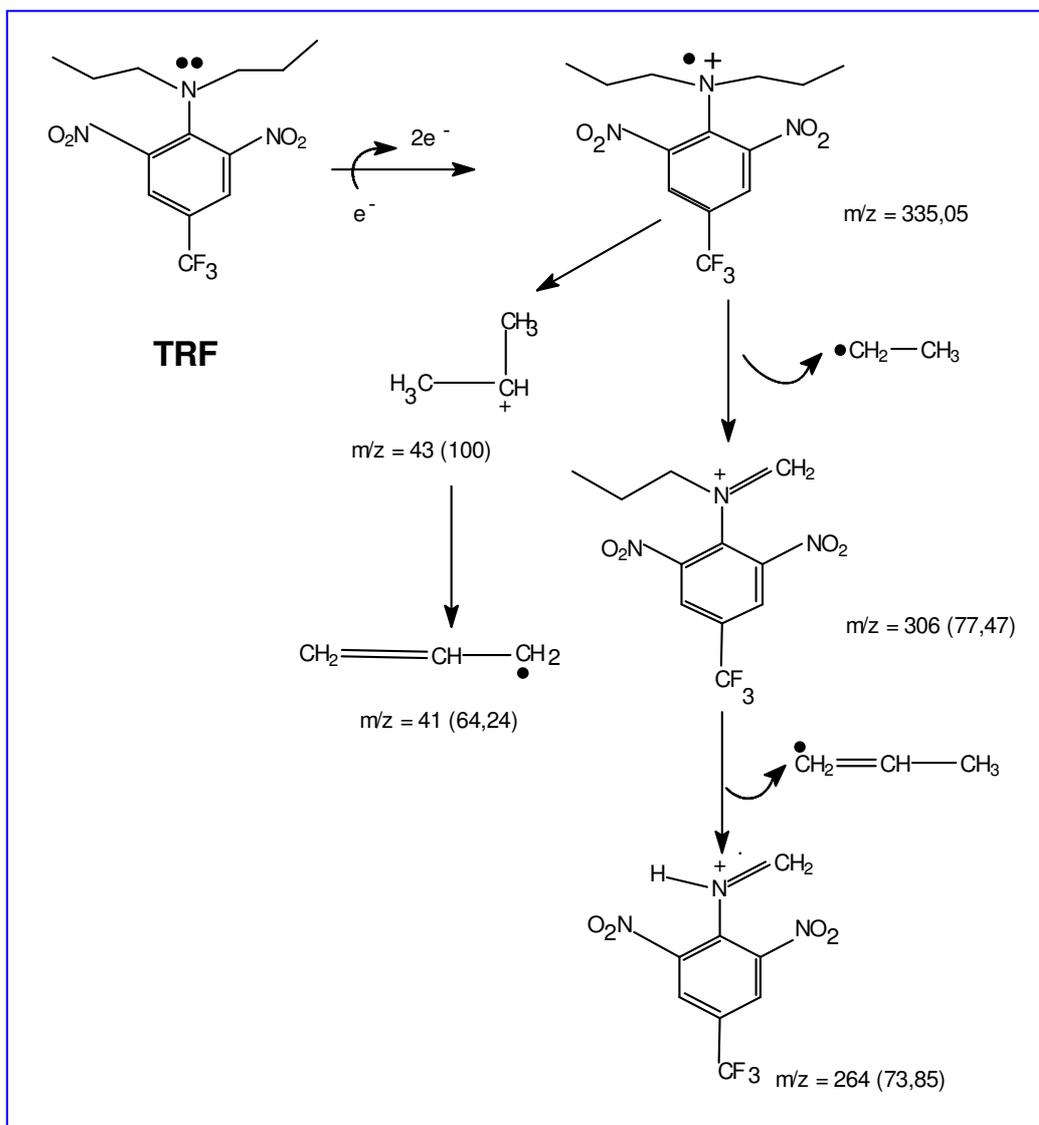


**Figura 20:** Cromatograma CG-EM da TRF

O espectro EM (**Figura 21**) revelou os picos correspondentes ao íon molecular em  $m/z = 335,00$  (5,51), pico base  $m/z = 43$  (100),  $m/z = 41$  (64,24),  $m/z = 306$  (77,47) e  $m/z = 264$  (73,85). A **Figura 22** apresenta as fragmentações da TRF.



**Figura 21:** Espectro de massa da TRF.



**Figura 22:** Fragmentações sugeridas para o íon molecular da TRF

Esses dados foram comparados com aqueles obtidos da literatura (KLUPINSKI e CHIN, 2003; <http://webbook.nist.gov/chem>) confirmando tratar-se da Trifluralina o composto isolado. A partir daí foram realizados estudos eletroquímicos, de adsorção sobre a quitosana tanto por técnicas espectroscópicas quanto eletroquímicas, interação da macromolécula do DNA e de toxicidade frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*.

## 4.2- ESTUDO ELETROQUÍMICO DA TRF EM ELETRODO DE CV

Os estudos eletroquímicos da TRF foram realizados em um eletrodo de carbono vítreo, em meio misto, através das técnicas de voltametria cíclica, onda quadrada e pulso de diferencial. Eletrólises exaustivas e eletrofenton foram realizadas e os produtos de eletrodegradação da TRF foram analisados por CG-EM e comparados com aqueles obtidos por degradação biológica descritos na literatura. Estudos eletroquímicos completos da TRF nesse sistema eletródico/eletrodo não foram ainda relatados.

### 4.2.1 - Voltametria Cíclica

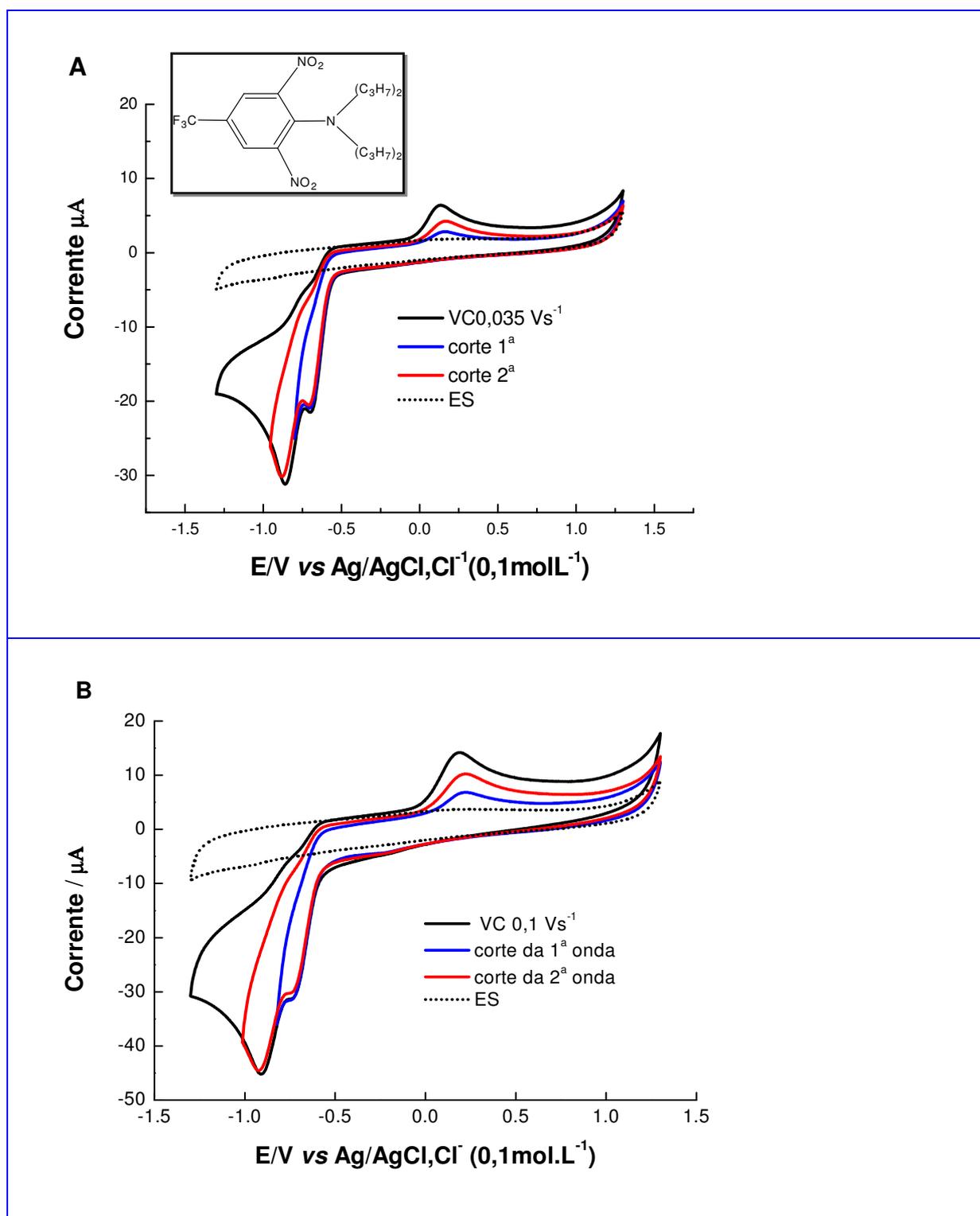
O principal uso da voltametria cíclica é como ferramenta para os estudos fundamentais e de diagnóstico que fornecem informação qualitativa sobre processos eletroquímicos em várias condições. A voltametria cíclica, mesmo quando não usada em análises quantitativas rotineiras, tornou-se uma ferramenta importante para o estudo de mecanismos e velocidades de processos de oxidação/redução, principalmente em sistemas orgânicos e metalorgânicos.

A análise voltamétrica da TRF em eletrodo de carbono vítreo apresentou duas ondas catódicas ( $E_{pc1} = -0,700V$  e  $E_{pc2} = -0,868V$ ) para velocidade de  $0,035V/s$  referentes à redução de cada grupo nitro e uma anódica em potenciais mais positivo correspondente à oxidação do grupo hidroxilamínico gerado na varredura catódica (**Figura 23 e 24**). A primeira onda é de natureza difusional ( $I_{pc1} \propto \nu^{1/2}$ ) e irreversível ( $E_{pc}$  independente de  $\nu$ ) conforme dados da tabela 9. A análise do efeito da velocidade de varredura na corrente de pico de acordo com o gráfico da (**Figura 25**), evidencia um tipo de mecanismo EC (mecanismo eletródico consistindo de etapa TE e etapa química) onde a corrente de pico catódica normalizada ( $I_{pc1}/\nu^{1/2}$ ) diminui com o aumento da velocidade de varredura sugerindo assim, que a protonação ocorre posterior à transferência eletrônica. Esse comportamento é típico de redução de nitroaromático em meio prótico e similar ao observado em eletrodo de mercúrio

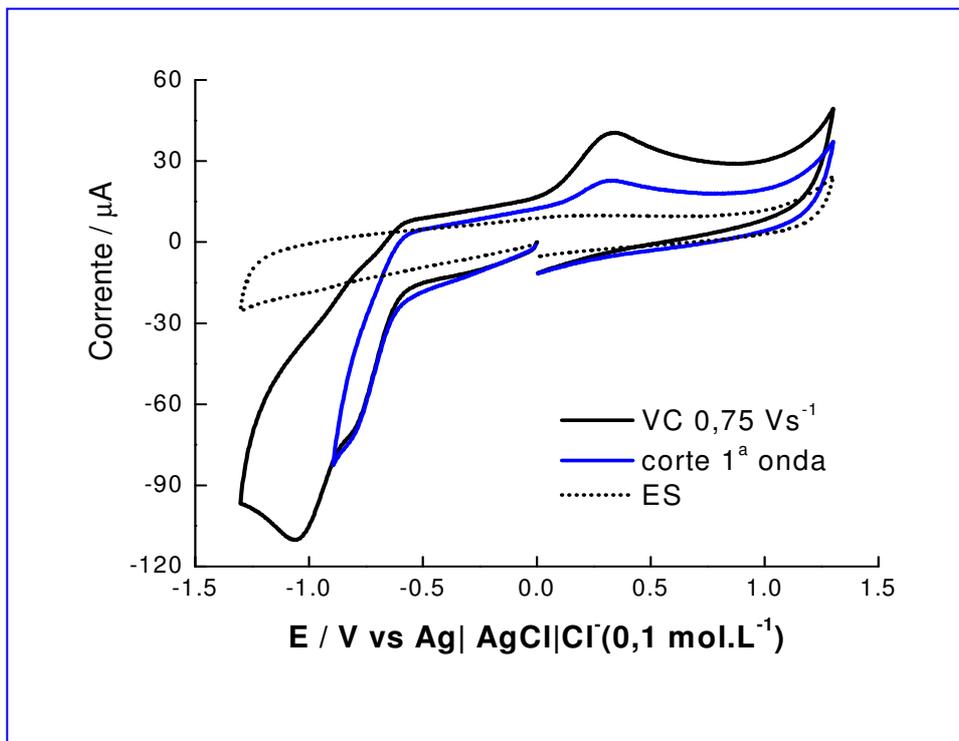
(KOTOUČEK e OPRAVILOVÁ, 1996). Os gráficos de  $i_{pc1}$  vs  $v^{1/2}$ ,  $i_{pc1}$  vs  $v$ ,  $E_{pc1}$  vs  $\log v$ ,  $i_p/v^{1/2}$  vs  $v$  e  $E_{p/2}$  vs  $\log v$ , relativo à primeira onda de redução são mostrados nas **Figuras 26A-D**.

**Tabela 9:** Parâmetros eletroquímicos pelo estudo da influência da velocidade de varredura da TRF.

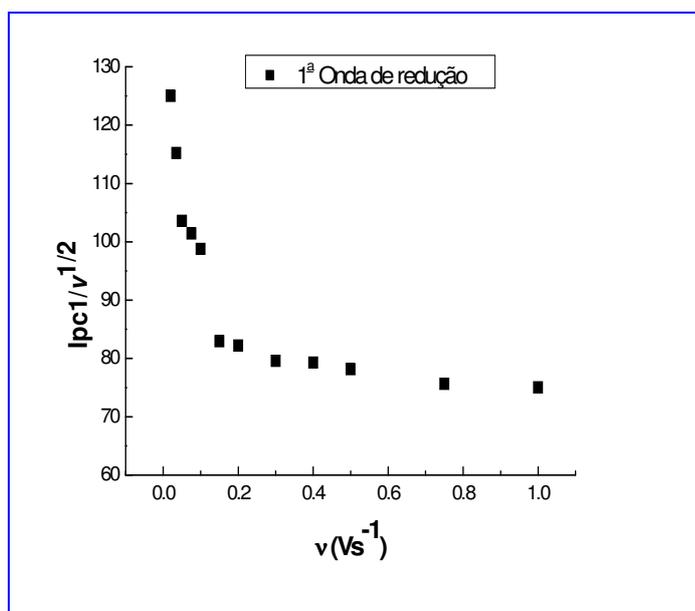
$v$ (Vs <sup>-1</sup> )	$v^{1/2}$ (Vs <sup>-1</sup> )	$-E_{pc1}$ (V)	$i_{pc1}$ (μA)	$-E_{p/2}$ (V)	$E_p - E_{p/2}$ (V)	$i_{pc1}/v^{1/2}$
0,020	0,141	0,684	17,62	0,614	0,070	124,96
0,035	0,187	0,694	21,55	0,617	0,077	115,24
0,05	0,223	0,718	23,10	0,632	0,080	103,58
0,075	0,273	0,735	27,68	0,650	0,085	101,40
0,100	0,316	0,742	31,21	0,652	0,090	98,76
0,150	0,387	0,756	32,10	0,659	0,097	82,94
0,200	0,447	0,765	36,74	0,663	0,102	82,20
0,300	0,547	0,782	43,54	0,670	0,112	79,59
0,400	0,632	0,804	50,12	0,677	0,127	79,30
0,500	0,707	0,814	55,24	0,682	0,132	78,13
0,750	0,866	0,828	65,52	0,700	0,128	75,65
1,0	1,0	0,832	75,04	0,702	0,130	75,04



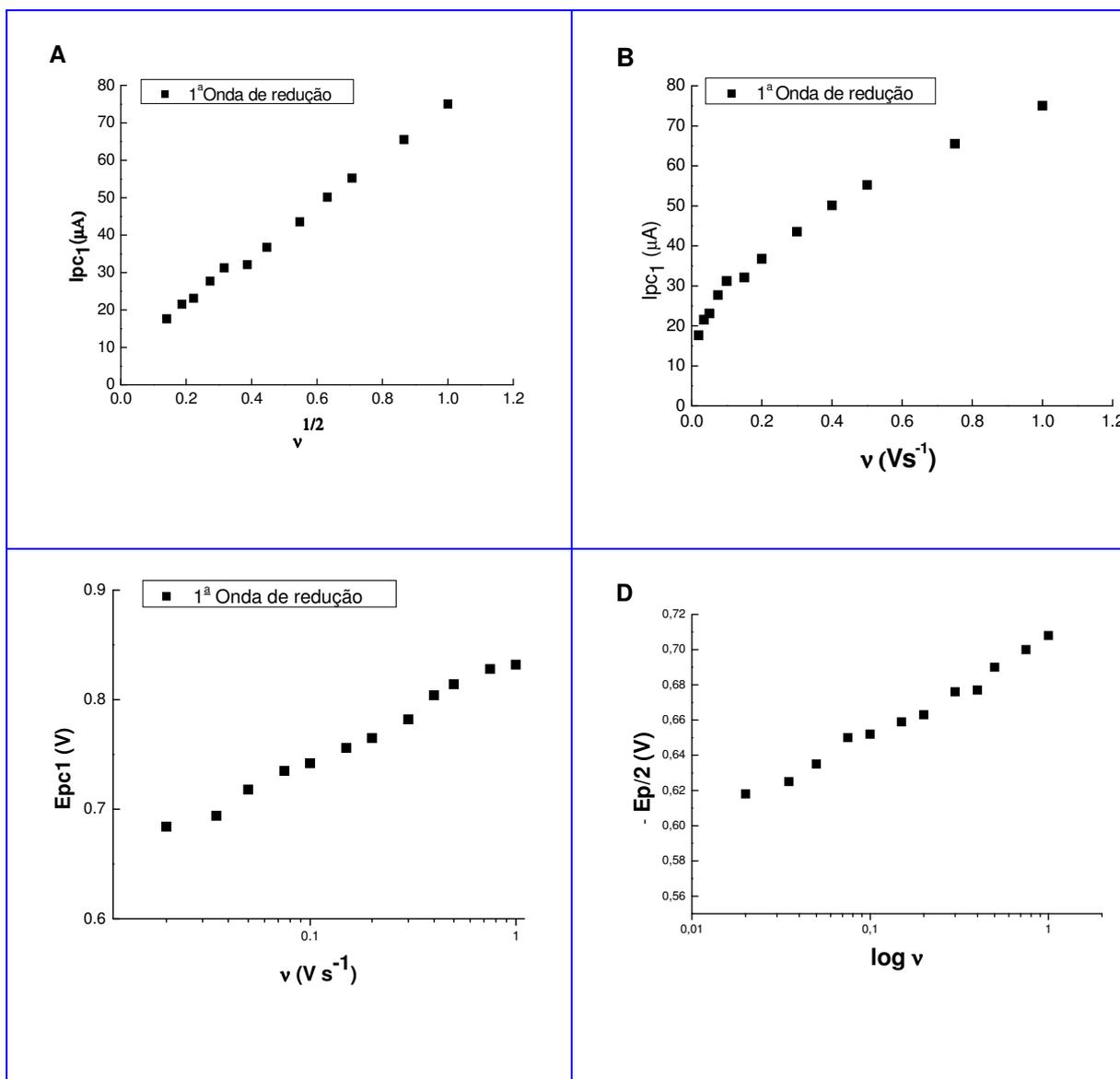
**Figura 23:** Voltamograma Cíclico da TRF,  $c = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato/etanol (1:1)  $\text{pH}_{\text{ap}} 7,56$  em eletrodo de carbono vítreo, (A)  $v = 0,035 \text{ Vs}^{-1}$  e (B)  $v = 0,100 \text{ Vs}^{-1}$ .



**Figura 24:** Voltamograma Cíclico da TRF,  $c = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato/etanol (1:1)  $\text{pH}_{\text{ap}} 7,56$  em eletrodo de carbono vítreo ( $v = 0,750 \text{ Vs}^{-1}$ ).



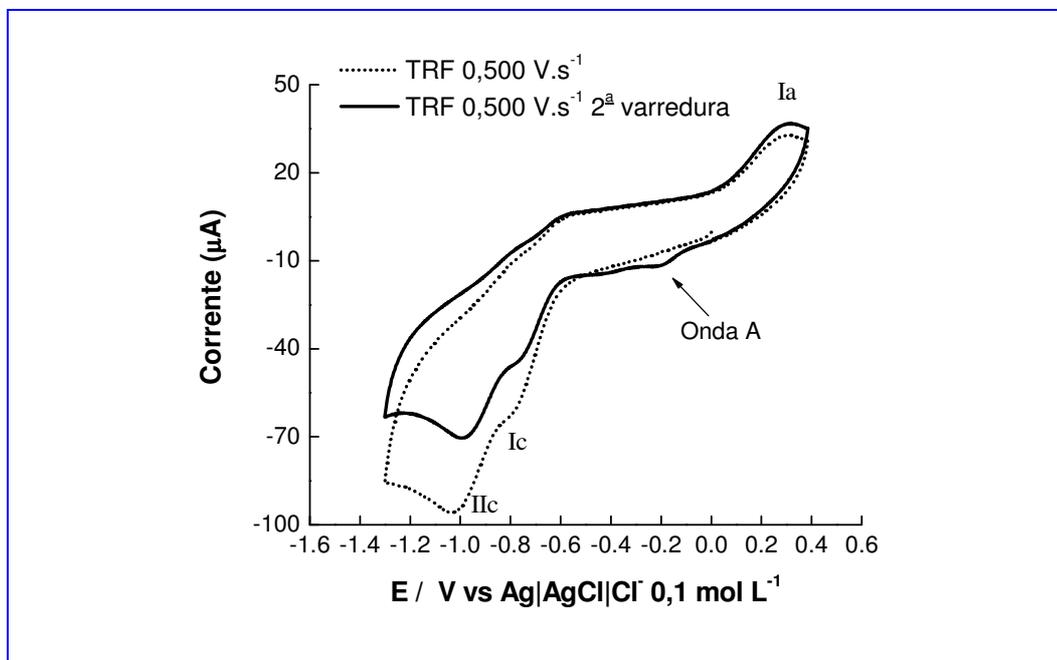
**Figura 25:** Gráfico da TRF ( $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato, carbono vítreo: Efeito da velocidade de varredura na corrente de pico.



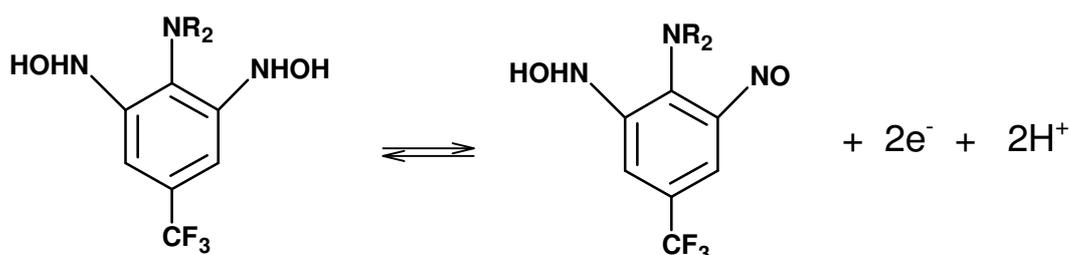
**Figura 26:** Gráficos da TRF ( $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ ) em tampão fosfato, carbono vítreo. **A:**  $lpc$  vs  $v^{1/2}$ ; **B:**  $lpc$  vs  $v$ ; **C:**  $E_{pc}$  vs  $\log v$ ; **D:**  $E_{p/2}$  vs  $\log v$

Em altas velocidades de varredura, superior a  $0,5 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ , a TRF apresentou na segunda varredura, uma nova onda de redução de pequena intensidade associada ao processo de oxidação Ia. A onda A deve se referir à redução do derivado nitroso gerado após oxidação da hidroxilamina (**Figura 27 e 28**). O fato desse sistema ( $\text{RNHOH} \rightleftharpoons \text{RNO} + 2e^- + 2\text{H}^+$ ) ser observado somente em altas velocidades de varredura demonstra a instabilidade do derivado hidroxilamínico formado no processo de redução dos grupos nitro presente na molécula. A instabilidade de

outros derivados hidroxilamínicos já foi relatada em outros nitrocompostos (GRIMSHAW, 2000).



**Figura 27:** Voltamograma Cíclico com corrente normalizada da TRF,  $c = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em tampão fosfato/etanol (1:1)  $\text{pH}_{\text{ap}} 7,56$  em eletrodo de carbono vítreo.

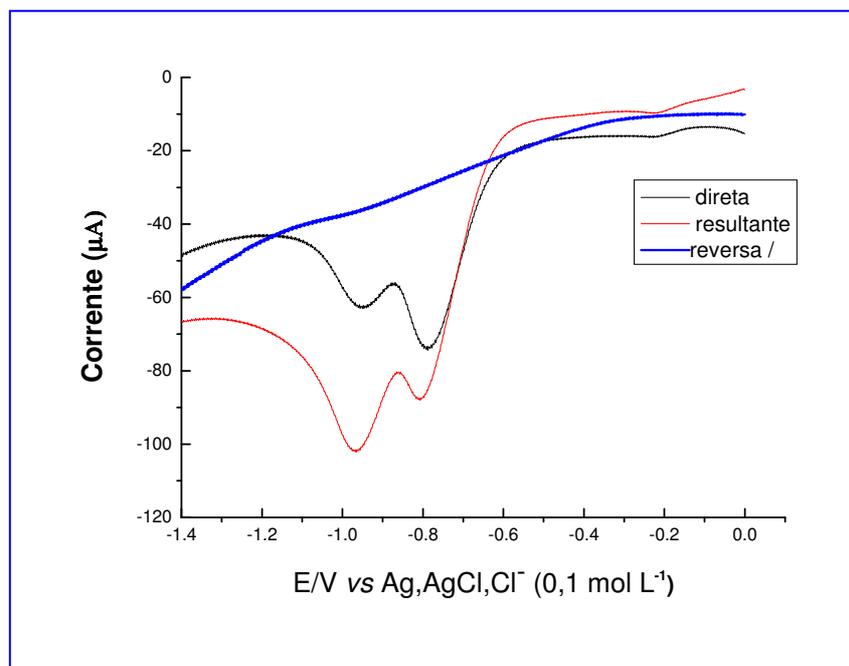


**Figura 28:** Esquema da provável oxidação da hidroxilamina formada após redução da TRF.

#### 4.2.2- VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA (VOQ)

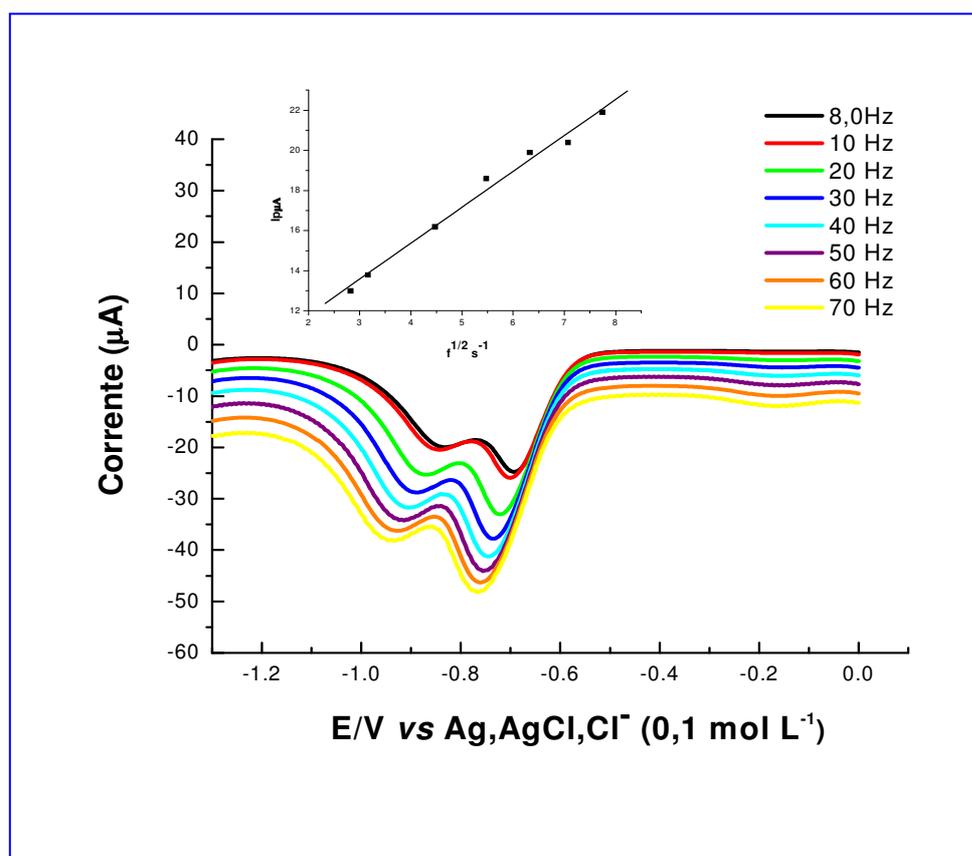
A utilização da técnica de **VOQ** objetivou corroborar as informações da voltametria cíclica e, assim, analisar o mecanismo de redução eletroquímica da **TRF** pela variação dos parâmetros voltamétricos. Tanto na voltametria cíclica quanto na **VOQ**, dois picos de redução foram observados, de natureza irreversível conforme a

**Figura 29.** Todos os parâmetros estudados foram feitos para a 1<sup>a</sup> onda de redução, que é mais bem definida.



**Figura 29:** Voltamograma de onda quadrada para a TRF em tampão fosfato/etanol (1:1)  $\text{pH}_{\text{ap}} = 7,0$  com  $a = 50 \text{ mV}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ ,  $f = 100 \text{ s}^{-1}$  com separação das componentes de corrente direta, reversa e resultante.

O estudo da variação da freqüência de aplicação dos pulsos de potencial ( $f$ ) é um dos mais importantes parâmetros voltamétricos envolvidos na VOQ, pois além de melhorar a sensibilidade da análise ainda possibilita uma observação do tipo de processo e o número de elétrons envolvidos na transferência eletrônica. A **Figura 30** apresenta os voltamogramas obtidos em diferentes valores de freqüência de aplicação de pulsos de potenciais para a **TRF**. Acima de 70 Hz, o aumento da corrente em função da freqüência não promove melhora significativa nas respostas voltamétricas.



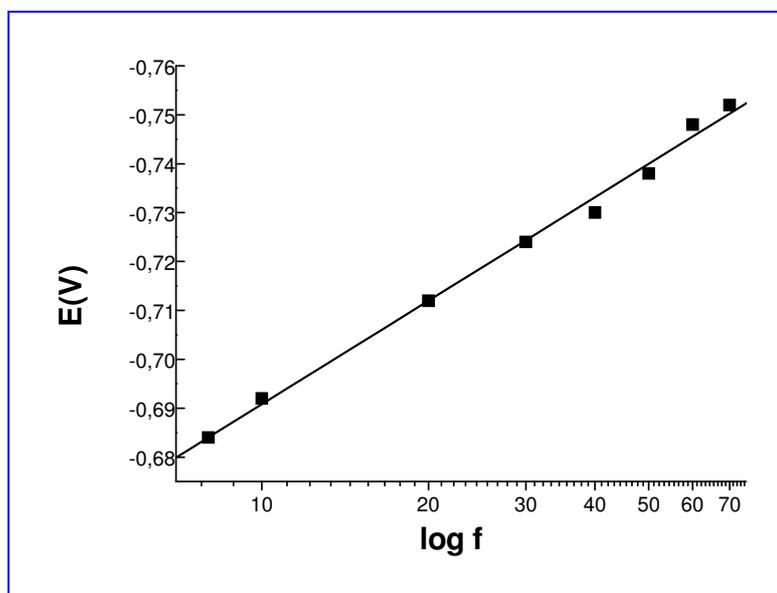
**Figura 30:** Voltamogramas de onda quadrada para a TRF em tampão fosfato/etanol (1:1)  $pH_{ap} = 7,0$  com  $a = 50$  mV,  $\Delta E_s = 2$  mV em função da variação de frequência de aplicação dos pulsos de potencial, com a inserção da relação da corrente de pico com a raiz quadrada da frequência.

Para a TRF o aumento da frequência de aplicação dos pulsos de potencial promoveu um aumento linear da corrente de pico em função da raiz quadrada da frequência. De acordo com os critérios diagnósticos da OQ (LOVRIÉ, M. e KOMORSKY, S. 1988), este comportamento é típico de processos controlados por difusão do reagente. A inserção na **Figura 30** apresenta esta relação. Este comportamento foi confirmado com os dados da voltametria cíclica.

De acordo com os critérios da OQ, neste tipo de sistema os potenciais de pico variam linearmente com o logaritmo da frequência, com uma inclinação dada pela Equação de Lovrié (equação 17) (LOVRIÉ *et al.* 1988):

$$\frac{\Delta E_p}{\Delta \log f} = \frac{-2,3R}{\alpha nF} \quad (\text{equação 17})$$

onde **R** é a constante dos gases, **T** é a temperatura, **α** é o coeficiente de transferência eletrônica, **n** o número de elétrons envolvidos na transferência eletrônica e **F** a constante de Faraday. Assim, para a **TRF** a inclinação obtida foi de 70 mV que, aplicando na Equação 17 fornece um valor de **αn** igual a 0,843. A eletrólise preparativa da **TRF** indicou a transferência de 8,0 elétrons deste modo sugerindo um valor de **α** maior do que 0,5, uma característica comum para as moléculas orgânicas. A **Figura 31** mostra a dependência do  $E_p$  com  $\log f$ .

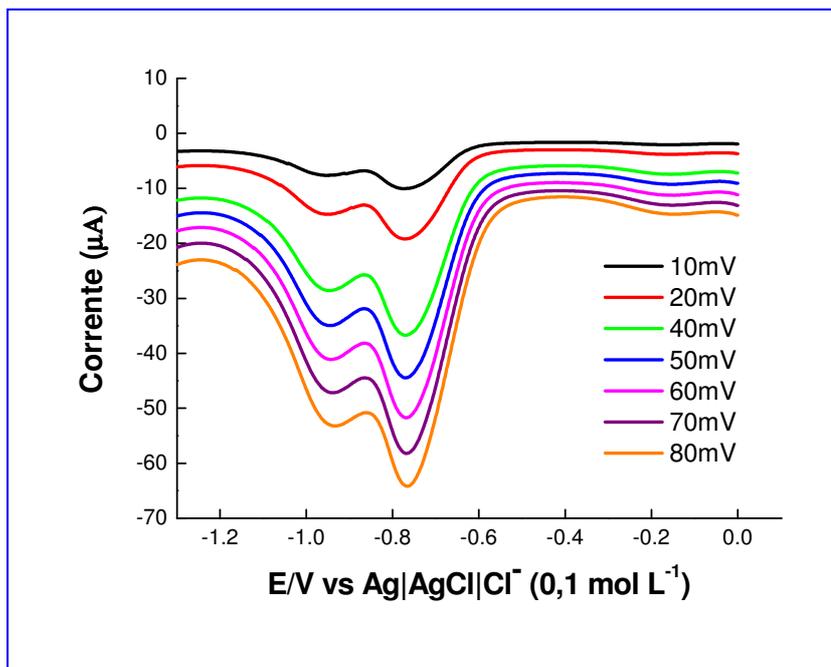


**Figura 31:** Dependência Linear do potencial de pico com o logaritmo da frequência da onda quadrada para os dados extraídos da **Figura 30**.

Para a reação redox totalmente irreversível a sensibilidade analítica na OQ sofre uma grande influência do aumento da amplitude da onda, isto porque a largura de meia-onda se mantém constante para amplitudes maiores que 20 mV (OSTERYOUNG, R. OSTERYOUNG, 1985). Com isso, a variação na amplitude de pulso é um dos parâmetros a ser otimizados na análise por OQ.

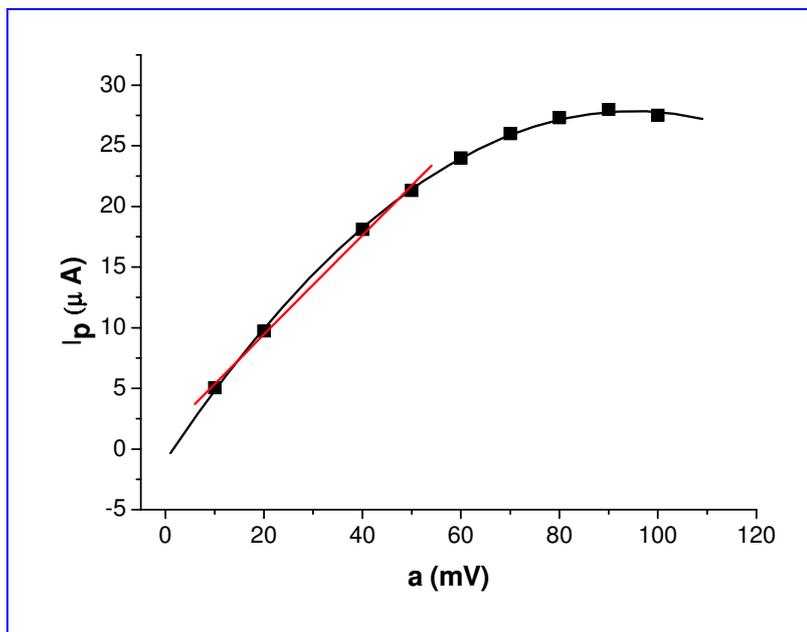
Para a TRF, a variação na amplitude dos pulsos de potencial provocou um aumento na intensidade das correntes de pico e um deslocamento dos potenciais

para valores mais positivos. A **Figura 32** apresenta os voltamogramas resultantes da variação de amplitude de pulsos de potencial para a TRF.



**Figura 32:** Voltamogramas de onda quadrada para a **TRF** em tampão fosfato/etanol (1:1)  $\text{pH}_{\text{ap}} = 7,0$  com  $f = 50 \text{ Hz}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  em função da variação da amplitude dos pulsos de potencial.

Uma análise do comportamento da corrente de pico em função das mudanças na amplitude dos pulsos de potenciais mostrou que um aumento linear ocorre até amplitude de 60 mV, sendo que após este valor o aumento não é mais linear, tendendo a se tornar constante com o aumento da amplitude evidenciando um patamar (**Figura 33**). Este comportamento está de acordo com a teoria de OQ, desenvolvida para sistemas totalmente irreversíveis com a espécie adsorvida na superfície do eletrodo, que afirma que para amplitudes acima de 60 mV a corrente de pico é constante (OSTERYOUNG, R. OSTERYOUNG, 1985).

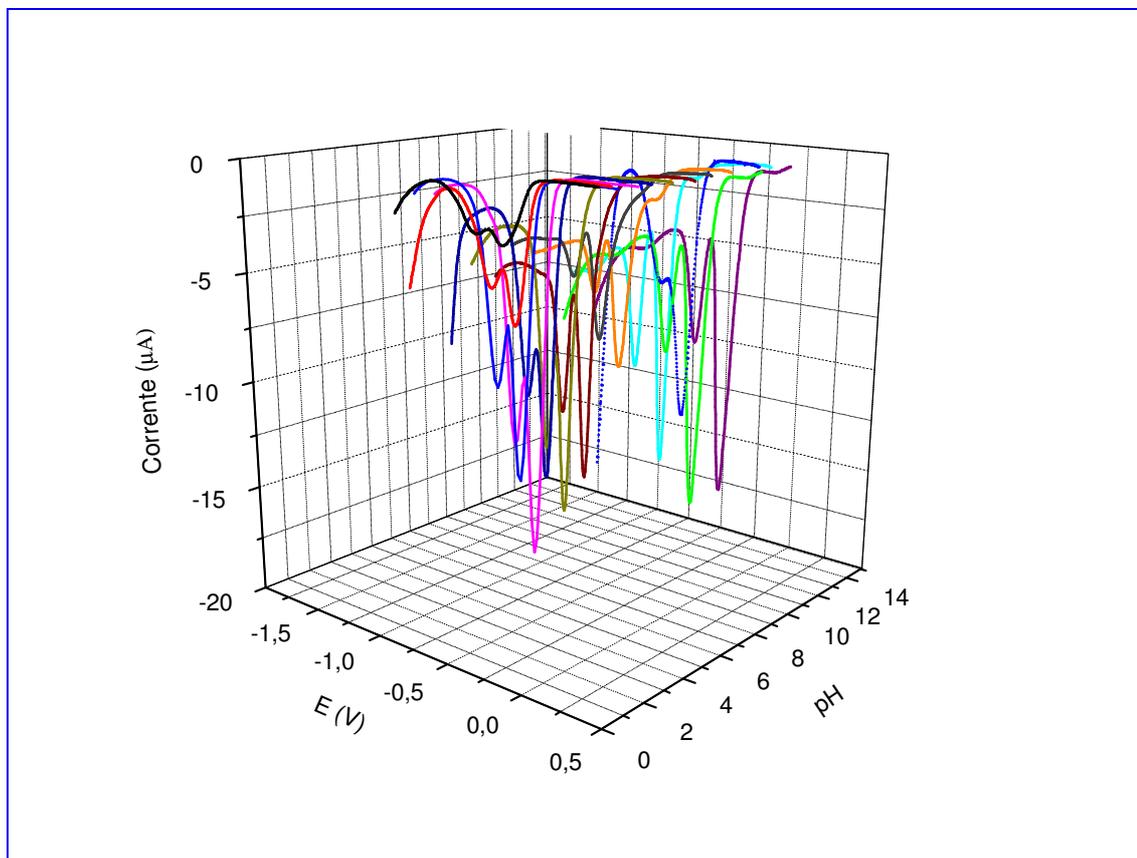


**Figura 33:** Dependência da corrente de pico com a amplitude TRF em tampão fosfato/etanol (1:1)  $\text{pH}_{\text{ap}} = 7,0$  com  $f = 50 \text{ Hz}$ ,  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  em função da variação da amplitude dos pulsos de potencial.

#### 4.2.3- ESTUDO DA VARIAÇÃO DO POTENCIAL DE REDUÇÃO COM O pH DA TRF

Objetivou-se estudar a variação do potencial de redução da TRF com o pH em meio misto (tampão/etanol 1:1), para determinação do seu  $\text{pK}_a$ , uma vez que a TRF é muito pouco solúvel em água. Tal parâmetro físico-químico é importante em termos de biodisponibilidade, biodegradação, no solo e em outros ambientes. Para o estudo da variação do potencial de redução da TRF com o pH (**Figura 34**) utilizou-se a técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD), com o uso de eletrodo de carbono vítreo, platina e Ag/AgCl,  $\text{Cl}^-$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente.

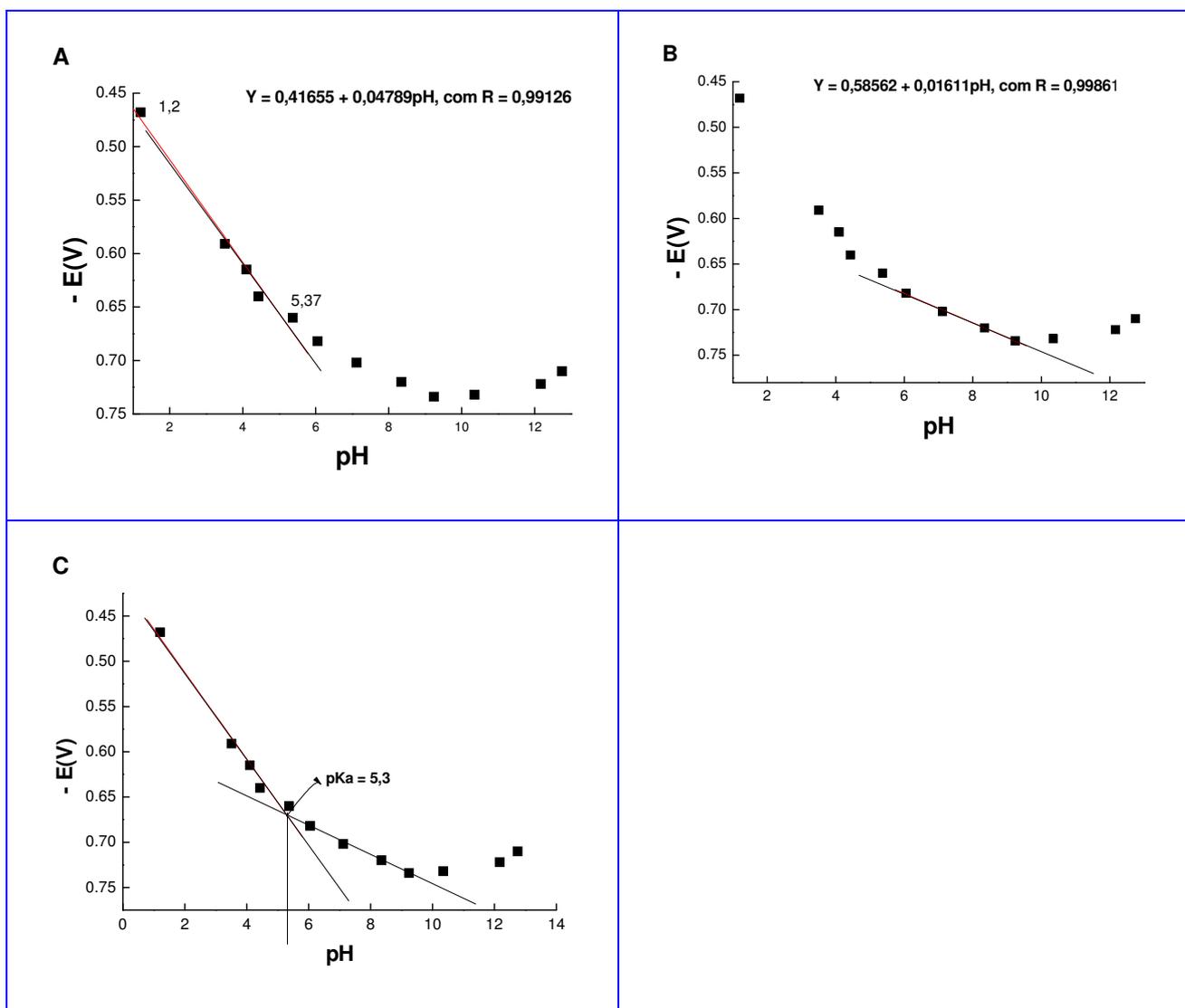
Foram feitos experimentos em 14 diferentes valores de pH, variando entre 1,20 e 12,75 e mantendo-se a concentração da TRF constante ( $c = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ). A **Figura 34** mostra os voltamogramas obtidos. O diagrama da variação do potencial catódico ( $\Delta E_{\text{pc}}$ ) versus pH, permite inferir comportamento não linear e mecanismo complexo (**Figura 35 A-B**).



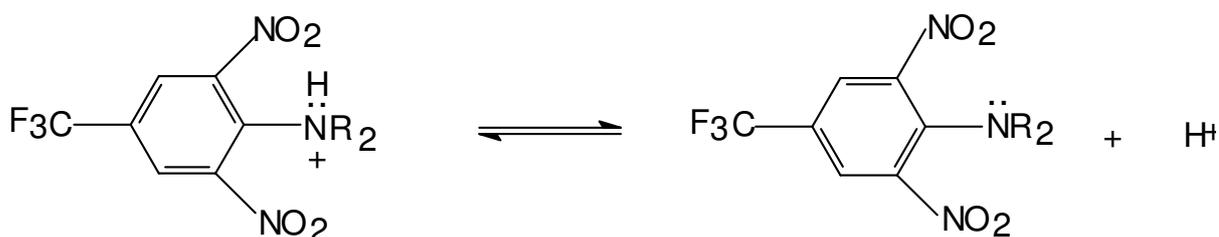
**Figura 34:** VPD da TRF na  $c= 1,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$  em 3D em função do pH.

A análise da variação de corrente ( $i_{pc}$ ) com o pH evidenciou uma ampla variação da corrente em pH ácido. A corrente diminuiu expressivamente até  $\text{pH}_{ap}$  próximo de 8,35, tornando-se constante no intervalo entre 9,0-10,35. Em valores de pH mais elevados, observaram-se alterações das correntes de redução para menores intensidades. Em termos de potencial de redução, há deslocamento do potencial para valores mais negativos, à medida que o pH aumenta. O meio mais ácido leva a protonação das espécies, que, então, sofrem redução mais facilmente. Na primeira faixa, em pH baixo (1,2-5,37) obteve-se uma reta com inclinação de 47,89 mV/unidade de pH cuja equação é representada por:  $0,41655 + 0,04789\text{pH}$ . Na faixa de pH (6,0-10,35) apresentou uma reta com inclinação de 16,11 mV/unidade de pH representada pela equação:  $0,58562 + 0,01611\text{pH}$ . A **Figura 35C** mostra a intersecção entre as duas retas correspondentemente ao  $\text{pK}_a$  (aparente) com

valor de 5,3 nesse meio, relativo à dissociação do sal de amônio aromático (**Figura 36**).



**Figura 35:** **A e B:** Gráficos de  $E_p$  vs pH para os picos da VPD correspondentes à redução da TRF. **C:** Gráfico obtenção do  $pK_a$  para a TRF,  $a = 50$  mV, tempo de pulso 70 ms,  $v = 5$  mV s<sup>-1</sup>.

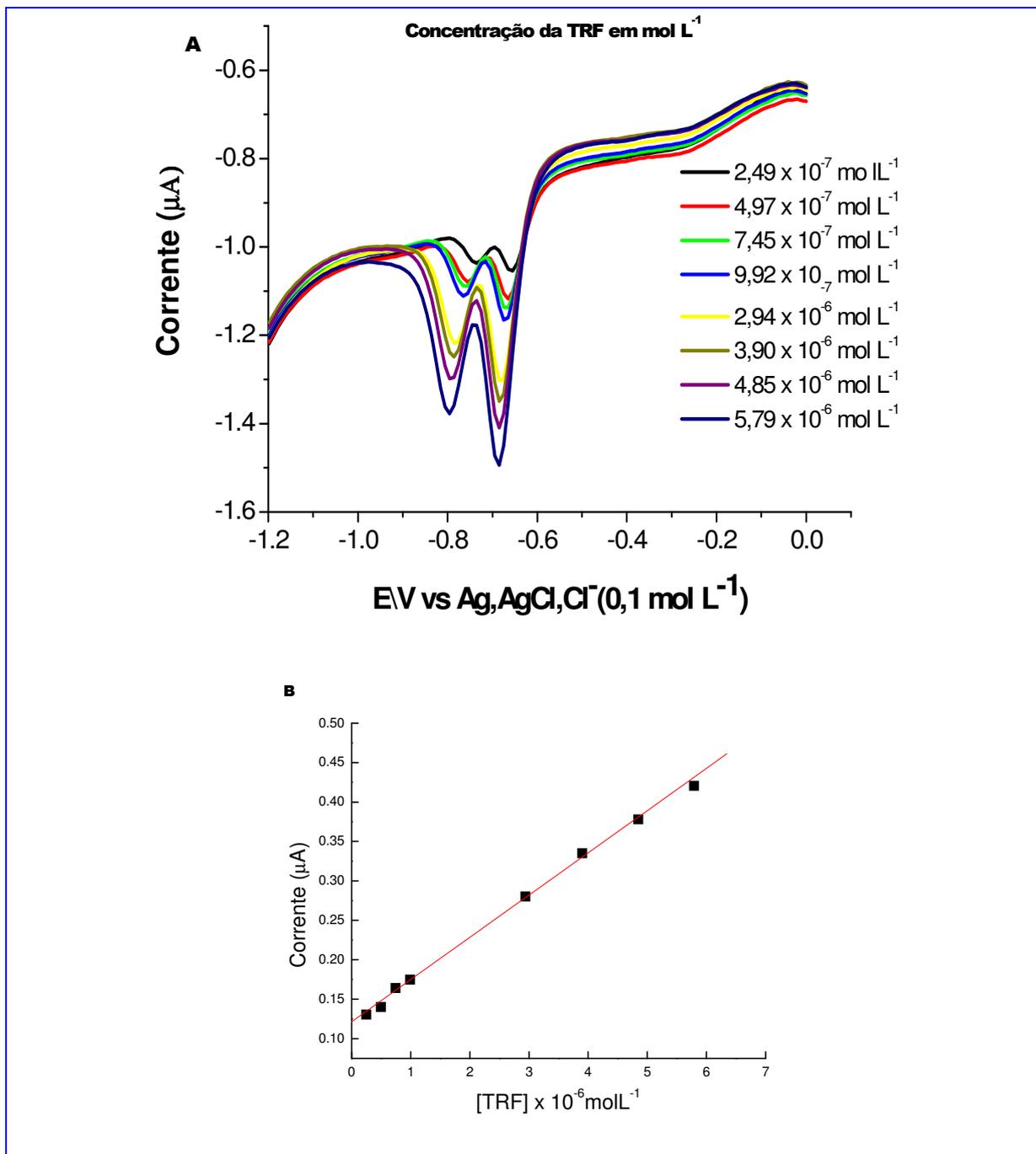


R = propril

**Figura 36:** Esquema de dissociação do sal de amônio aromático (TRF).

#### 4.2.4 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO NA CORRENTE DE PICO

Com o objetivo de quantificar a TRF, utilizou-se a técnica de **VPD**. Os voltamogramas de **VPD** foram obtidos para a redução da TRF em diferentes concentrações em meio misto (tampão fosfato/etanol 1:1)  $\text{pH}_{\text{ap}} = 7,0$  (**Figura 37A**). Nestas condições, observou-se uma linearidade em relação a corrente de pico e a concentração, em  $c_1$  entre  $2,49 \times 10^{-7}$  a  $5,79 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , descrita pela equação  $I_{p,a} (\text{A}) = 0,1214 + 0,05356 ([\text{C}]/\text{M})$  ( $R = 0,99529$ ,  $n=8$ ). A curva analítica foi confeccionada para a primeira onda de redução, devido à mesma possuir uma melhor definição de onda. A **Figura 37B** apresenta a relação entre as correntes de pico e a concentração da TRF.



**Figura 37:** (A) VPD da TRF para várias concentrações, 0,1molL<sup>-1</sup>, tampão (fosfato/etanol 1:1) pH<sub>ap</sub> = 7,0. a= 50 mV, tempo de pulso= 70 ms, v= 20 mV s<sup>-1</sup>. (B) Relação da corrente de pico com a concentração da TRF.

Para a determinação do limite de detecção utilizou-se o desvio padrão da média aritmética das correntes obtidas dos dez voltamogramas de brancos, no

mesmo potencial do pico voltamétrico da redução da TRF, e a relação (PEDROSA *et al.*, 2003):

$$LD = \frac{3S_B}{b} \quad (\text{equação 18})$$

onde  $S_B$  é o desvio padrão da média aritmética das correntes dos brancos e o  $b$  o valor do coeficiente angular da curva analítica. O valor calculado para a TRF em eletrodo de carbono vítreo foi de  $4,58 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  considerando os dados da **Figura 37B**.

### 4.3. ESTUDO DA ELETRODEGRADAÇÃO DA TRF

A persistência de um pesticida em um determinado meio depende dos processos de dissipação, ou seja, dos processos de transferência como evaporação, lixiviação, escoamento, absorção e degradação. Os processos de degradação podem ser químicos, físicos e biológicos e podem resultar na mineralização total do pesticida ou na sua conversão em metabólitos. No presente estudo será avaliados a degradação eletroquímica da TRF combinada ou não com processos oxidativos, bem como os produtos desta reação serão avaliados e comparados com aqueles obtidos da degradação microbiana considerada a mais importante para este herbicida.

#### 4.3.1- COULOMETRIA E ELETRÓLISE EXAUSTIVA

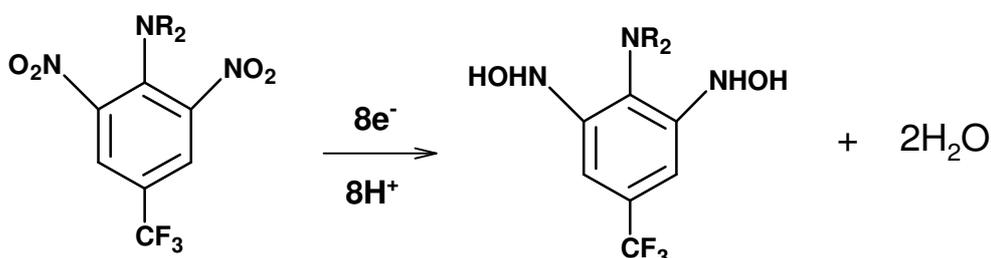
A coulometria tem como objetivo determinar a quantidade de elétrons consumida para reduzir a TRF. A eletrólise foi feita em meio tamponado/EtOH (1:1),  $\text{pH}_{\text{ap}} = 6,39$  e com adição de KCl  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  para aumentar a força iônica do meio e potencial controlado para as duas ondas ( $-0,950 \text{ V}$ ), registrou-se o número de coulombs gasto, o valor da corrente residual e o tempo do processo. No fim da eletrólise foi observada uma mudança de coloração da solução, que passou de amarela clara para incolor. Segundo Faraday para a transferência de um mol de

elétrons, em uma reação química, são requeridos 96487 Coulomb de carga. Partindo-se do princípio que a reação ocorra com 100% de eficiência, a carga envolvida no processo é dada pela expressão:

$$Q = m96487n/M \quad (\text{equação 19})$$

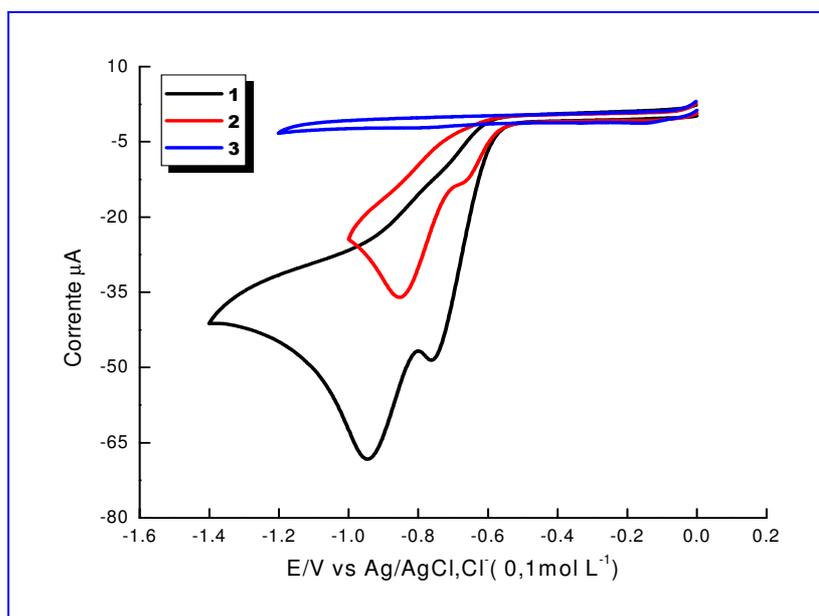
onde  $m$  é a massa eletrolisada,  $n$  é o número de elétrons envolvido no processo e  $M$  a massa molecular da espécie eletroativa.

A coulometria à potencial controlado (-0,950V), para a **TRF**, levou ao consumo de 7,75 F mol<sup>-1</sup> valor que foi próximo ao obtido por KOTOUCEK e OPRAVILOVÁ, (1996) quando do estudo do comportamento voltamétrico de cinco nitropesticidas em eletrodo de gota pendente de mercúrio e ao completo desaparecimento das duas ondas de redução (**Figura 38**), levando a redução da **TRF** à hidroxilamina, de acordo com a equação abaixo:

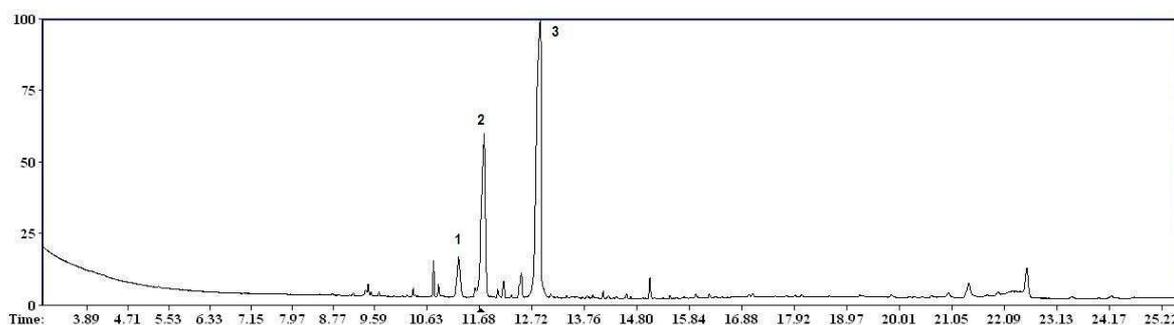


**R** = propril

Os produtos resultantes da eletrólise da **TRF** foram analisados por CG-EM e a hidroxilamina da **TRF** (m/z 305) não estava entre os compostos obtidos, devido as condições cromatográficas além de ser um pouco volátil. Entretanto, sabe-se que as hidroxilaminas intermediárias da redução de nitrocompostos são reduzidas às aminas correspondentes e também formam subprodutos, o que pode justificar a não observação destes intermediários no presente estudo. O cromatograma da mistura reacional resultante da eletrólise, após 5,0 horas de reação mostrou o desaparecimento da **TRF** (tempo de retenção 10 min) e a presença de vários subprodutos de degradação como mostrado na **Figura 39**.



**Figura 38:** (1) VC da TRF antes da eletrólise,  $c = 1,52 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  tampão acetato/etanol (1:1)  $\text{pH}_{\text{ap}} = 6,39$ . (2) VC do produto de eletrólise após consumo de 4F; (3) VC do produto de eletrólise após o consumo de 8F.

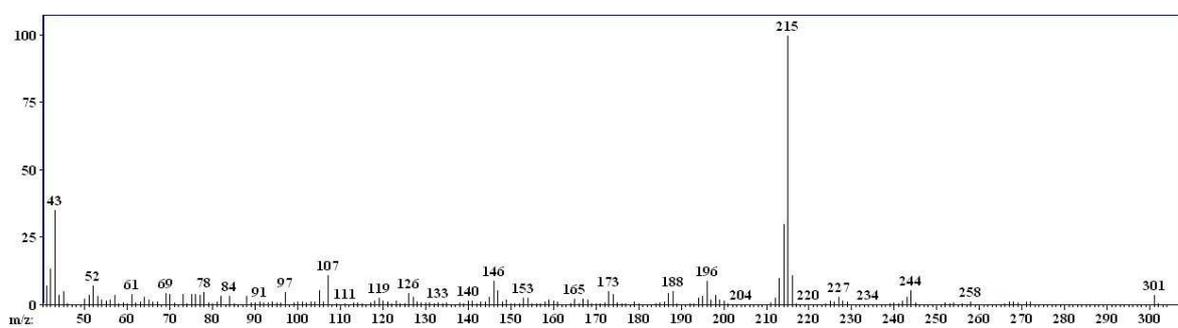


**Figura 39:** Cromatograma CG-EM da mistura reacional resultante da eletrólise da TRF.

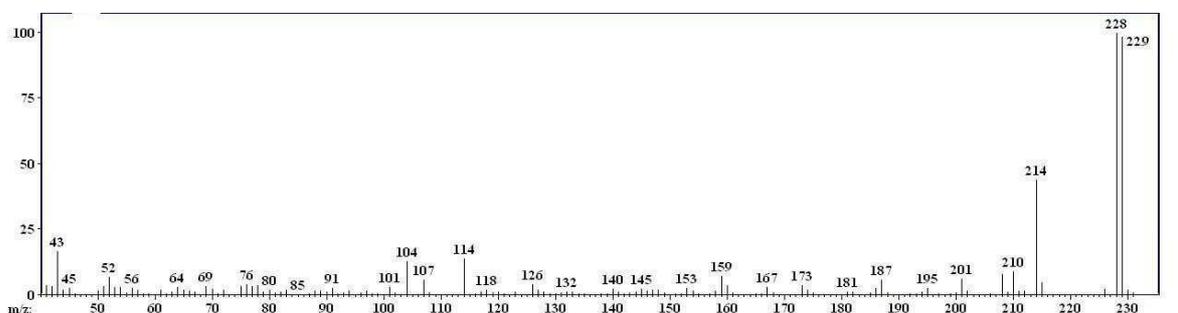
A análise e comparação dos espectros de massa dos produtos de eletrodegradação da **TRF** (**Figura 40**) foram análogos aos encontrados no estudo da fotólise da TRF (CROSBY, 1972), redução abiótica dos herbicidas dinitroanilina (WANG e ARNOLD, 2003) como também foi observado por KLUPINSKI e CHIN (2003) quando estudaram a redução da **TRF** em Fe(II). O espectro obtido permitiu definir os picos 1, 2 e 3 como sendo os derivados 2-etil-7-nitro-1-propil-5-(trifluorometil)-1*H*-benzimidazol, 2-etil-6-(trifluorometil)-1*H*-benzimidazol-4-amina e 2-etil-1-propil-5-(trifluorometil)-1*H*-benzimidazol-7-amina respectivamente.

A **Figura 41** mostra o possível esquema de degradação da TRF em seus intermediários e alguns produtos benzimidazóis segundo KLUPINSKI e CHIN, (2003), que foram sugeridos nesse trabalho através dos picos 1, 2 e 3. Comparando a degradação da TRF através da eletrólise exaustiva e a fotodecomposição da TRF (LEITIS e CROSBY, 1974) nossas condições experimentais são melhores devido ao curto tempo de análise como também não ter ocorrido decomposição térmica. Na fotodecomposição da TRF (LEITIS e CROSBY, 1974) o experimento foi realizado em temperatura bem acima do ponto de fusão da substância a ser degradada.

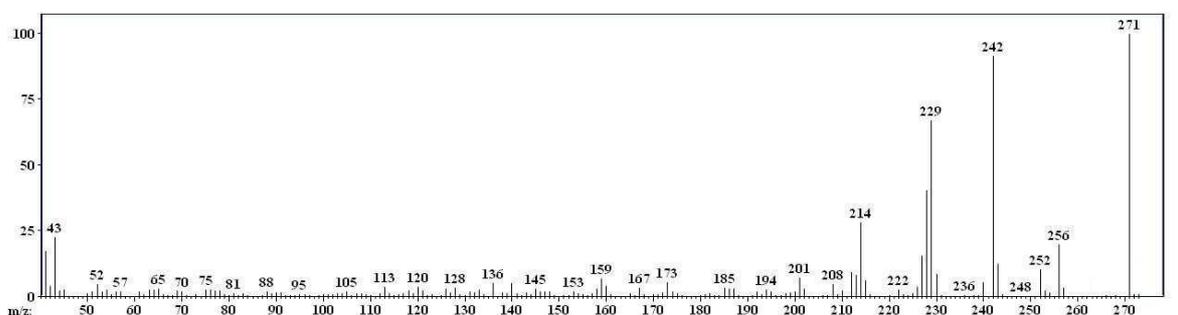
### Pico 1



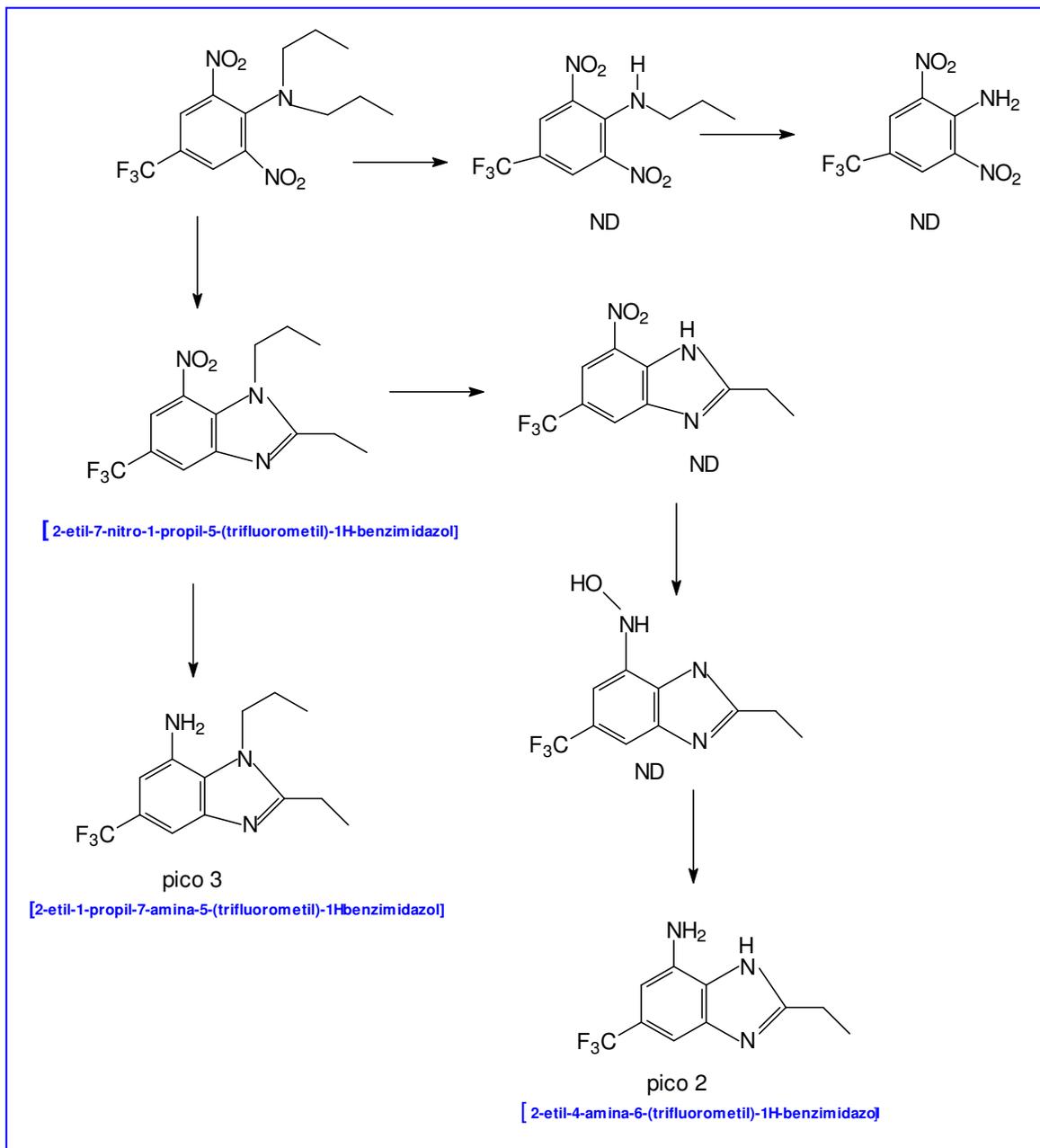
### Pico 2



### Pico 3



**Figura 40:** Espectros de massa das principais substâncias observadas no CG.



**Figura 41:** Esquema da degradação da TRF (KLUPINSKI e CHIN, 2003).

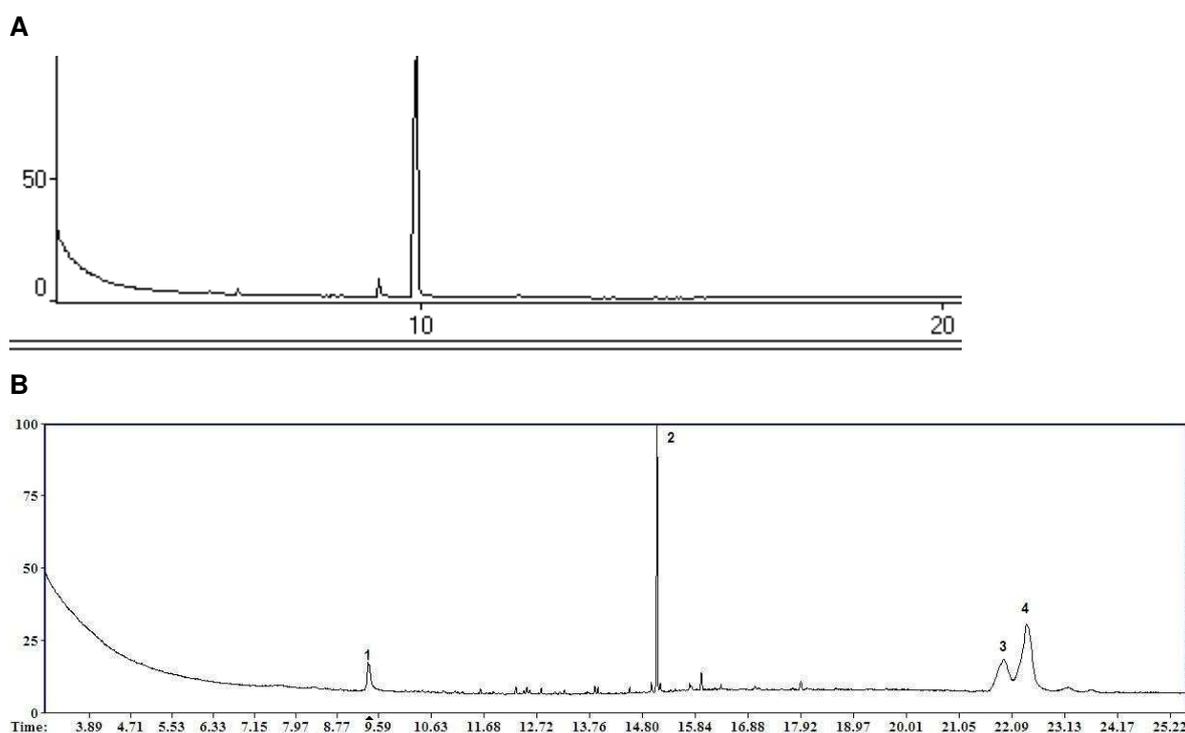
ND = não detectado.

#### 4.3.2- REAÇÃO DE FENTON - ELETROFENTON

Os processos oxidativos avançados tais como a reação de fenton, que se baseia na química do radical hidroxila, vem sendo usados em conjunto com métodos eletroquímicos para o tratamento de efluentes indústrias, bem como para o estudo da degradação e destruição de poluentes orgânicos (OTURAN *et al.*, 2001; PANIZA

e CERISOLA, 2001). Assim, esta técnica foi usada, no presente estudo, em conjunto com a eletrólise para avaliar a degradação eletroquímica do herbicida TRF.

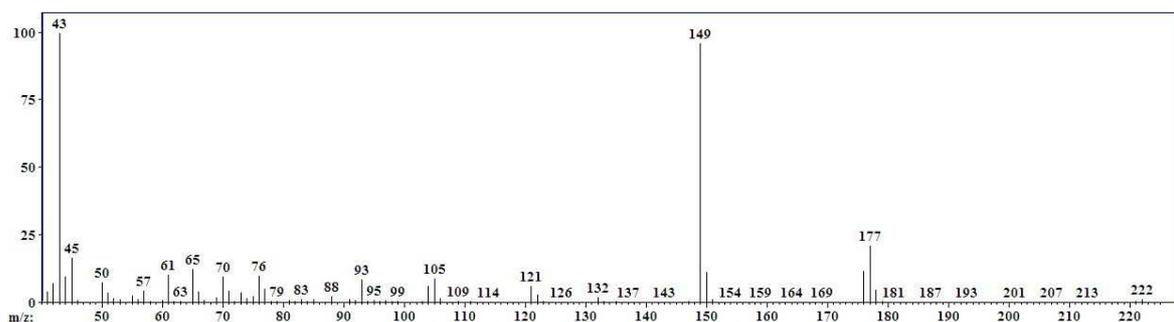
A reação eletrofenton da **TRF** foi conduzida em uma célula não dividida, onde o contra eletrodo consistiu de uma lâmina de platina como eletrodo de referência  $\text{Ag}/\text{AgCl}^-$  (0,1M) e um feltro de carbono foi usado como eletrodo de trabalho. Após a reação, a mistura reacional foi extraída e analisada por CG-EM para dar os cromatogramas da **Figura 42**. A TRF apresenta um tempo de retenção de 10 min (**Figura 42a**) e como pode ser visto na **Figura 42b**, ela não está presente na mistura reacional após 1,0 hora de reação eletro-fenton. Ao contrário do que foi observado durante a coulometria, onde os principais produtos reacionais corresponderam a formas nitro reduzidas da TRF, a reação eletrofenton levou a formação de quatro substâncias mais abundantes (picos 1, 2, 3 e 4 da **Figura 42**), sendo que uma delas apresentou um  $m/z$  429 (**Figura 43**). As outras duas substâncias encontradas parecem isoméricas, uma vez que tiveram a mesma massa ( $m/z$  480) e tempos de retenção muito próximos (**Figura 43**).



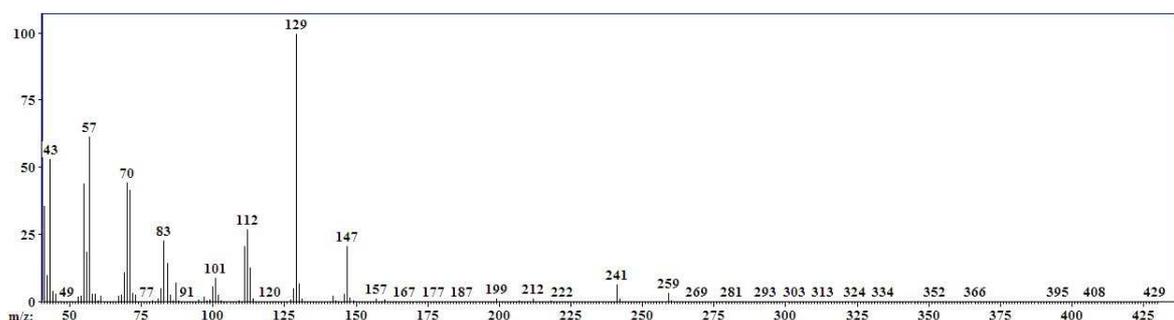
**Figura 42:** Cromatogramas CG-EM (a) da TRF (b) mistura reacional após a reação eletrofenton da **TRF**.

Embora não tenha sido possível definir a estrutura desses produtos reacionais, as razões m/z apresentadas sugerem que eles sejam estruturas diméricas resultantes do acoplamento entre os possíveis radicais da TRF obtidos a partir do ataque da hidroxila radicalar ( $\bullet\text{OH}$ ). Estas estruturas diméricas podem estar sozinhas ou ainda apresentar-se queladas com  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , precipitando no eletrodo como previamente descrito na literatura e observado durante o presente estudo (BRILLAS *et al.*, 1999). A polimerização de substâncias é um processo desejável durante o tratamento de rejeitos industriais, uma vez que os mesmos podem perder sua toxicidade devido ao acoplamento de estruturas, além de precipitarem ou flocularem na mistura reacional, tornando sua remoção mais simples e de menor custo (WAGNER e NICELL, 2002; FENGLIAN *et al.*, 2006).

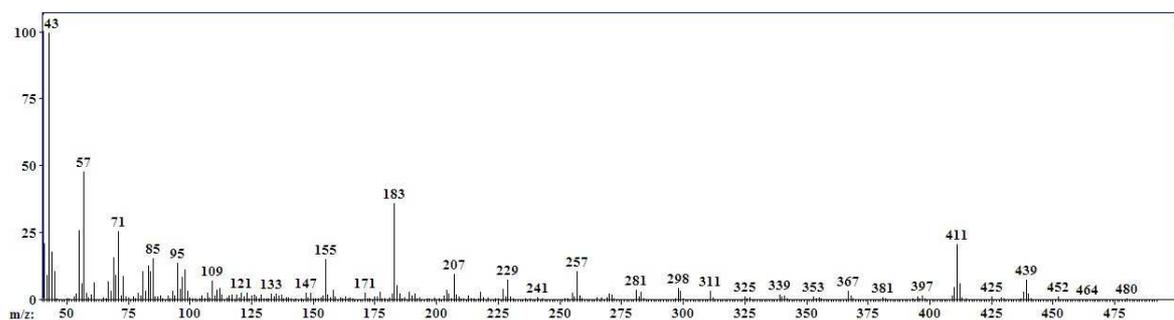
### Pico 1



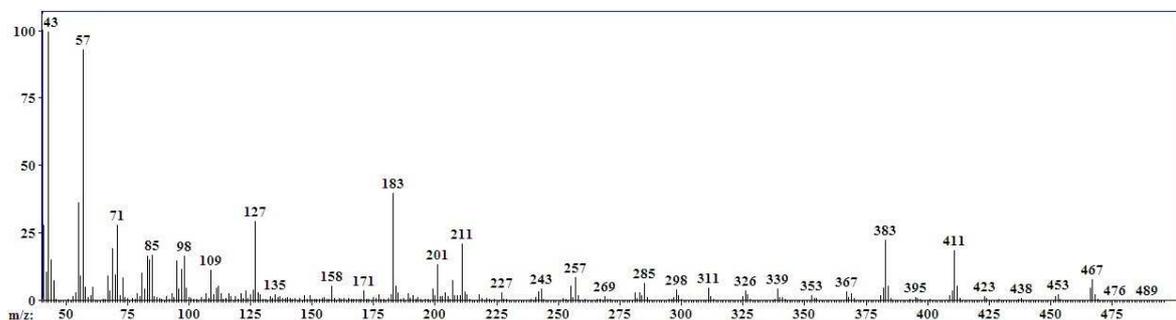
### Pico 2



### Pico 3



#### Pico 4



**Figura 43:** Espectros de massa dos produtos resultantes da reação eletrofenton da TRF.

#### 4.4– ESTUDO DA ADSORÇÃO DA TRF EM QUITOSANA

Sabe-se que a TRF é um herbicida muito utilizado principalmente nas culturas de cana de açúcar, feijão, milho, soja, algumas hortaliças e nas pastagens. Com a utilização dos herbicidas, o solo fica contaminado e os resíduos são levados para águas de rios e lagos através das águas das chuvas. Assim, a presença desses resíduos nessas águas pode causar sérios problemas ao ecossistema, levando à necessidade de sua remoção.

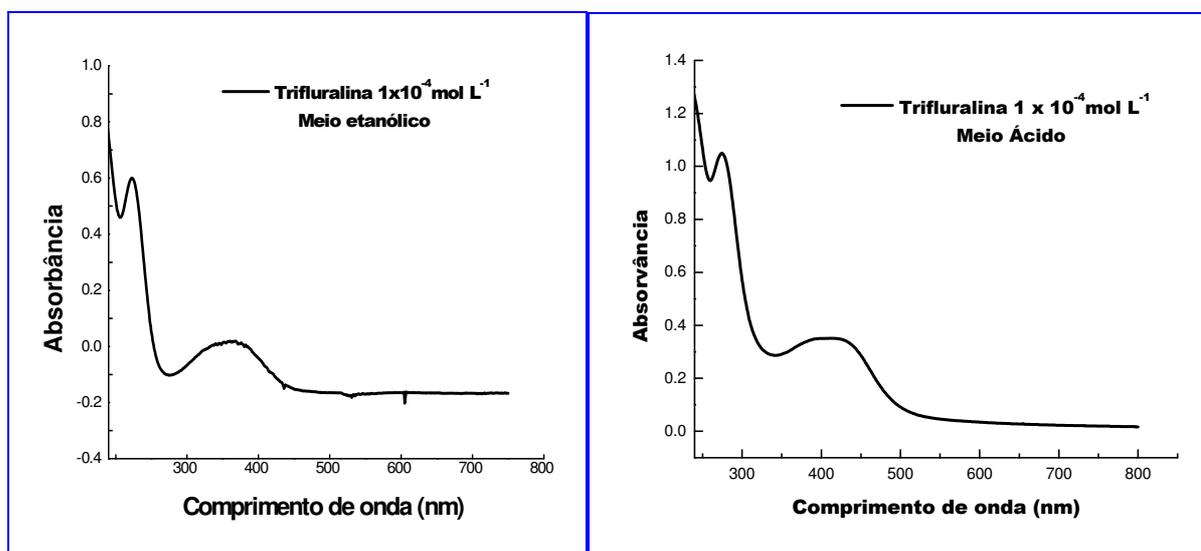
A quitosana tem diversas aplicações como dito anteriormente. Uma delas é como adsorvente para recuperação e separação de vários metais e compostos orgânicos de águas residuais. A quitosana se mostra um adsorvente atrativo economicamente por ser derivado da quitina que é por sua vez o segundo biopolímero mais abundante na natureza perdendo apenas para a celulose. A quitosana é conhecida como suporte ideal devido a muitas características, tais como: hidrofiliabilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, e propriedade antibacteriana (CHANG *et al.*, 2005). Sendo assim, com o intuito de remover pesticidas do meio ambiente, verificamos se a TRF adsorve em quitosana e qual a quantidade máxima de TRF adsorvida ( $\text{mg g}^{-1}$ ), através da construção de isoterma de adsorção. Informações sobre calor de adsorção em relação a quitosana e estrutura do herbicida são de suma importância, podendo revelar o mecanismo de adsorção e, assim, indicando qual o tipo de interação e fatores que influenciam no processo. No

futuro, essas informações podem auxiliar na modificação da quitosana e para tornar o processo de adsorção mais seletivo.

O estudo da adsorção de TRF em quitosana possibilitará também a construção de um biossensor à base de quitosana para a detecção e quantificação da TRF em meio aquoso.

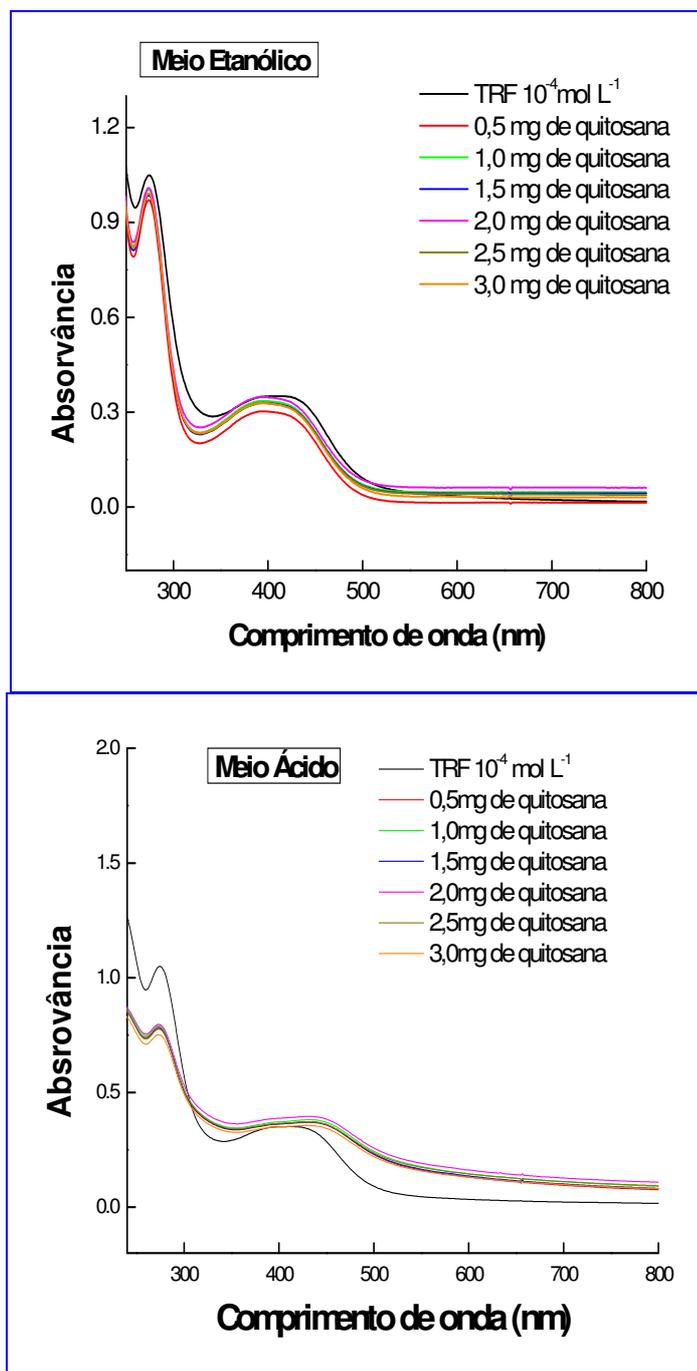
#### 4.4.1- Análise espectroscópica da TRF em quitosana

Nos espectros eletrônicos da trifluralina na região do UV-Vis foram observadas duas bandas de absorção situadas no comprimento de onda de 275 e 430 nm. Foram utilizados dois meios para análise: meio etanólico e ácido (**Figura 44**). Em meio etanólico a adição de diferentes massas de quitosana não provocou qualquer modificação no espectro.



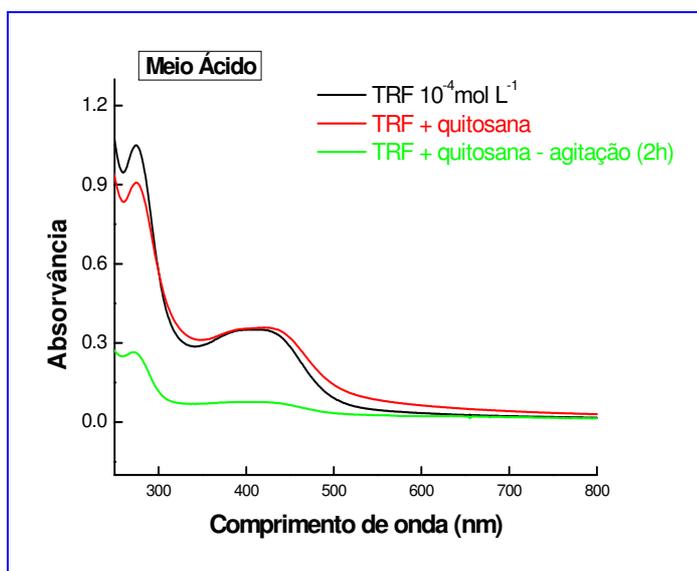
**Figura 44:** Espectro no Uv-vis da TRF em meio etanólico e meio ácido respectivamente.

Nos experimentos com adição de diferentes massas de quitosana, a absorbância variou de acordo com a adição de quitosana somente em meio ácido. À medida que a quantidade de quitosana é adicionada ao meio, há uma diminuição da intensidade de absorção no comprimento de onda correspondente a trifluralina (**Figura 45**).



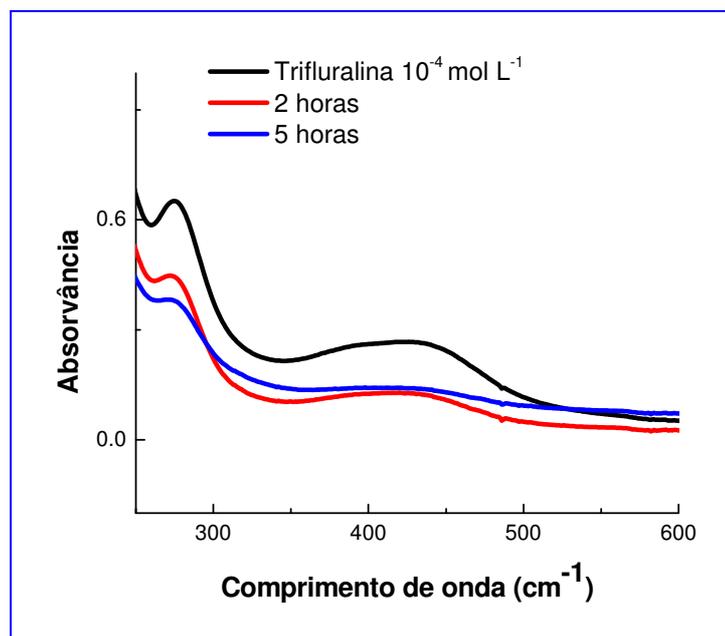
**Figura 45:** Gráficos do efeito da variação da massa de Quitosana em meio etanólico e meio ácido respectivamente.

Observou-se também que a agitação é um fator importante no processo de adsorção, com a diminuição da absorbância (**Figura 46**).



**Figura 46:** Espectro da TRF em meio ácido após permanecer em contato com a quitosana por 2 horas com agitação.

Como podemos observar a adição de quitosana em meio aquoso/etanólico não ocasionou qualquer modificação no espectro, entretanto, em meio ácido, ocorreu à diminuição das bandas de absorção, tanto em função da adição de quitosana, quanto ao tempo que permaneceu em contato sob agitação, **Figura 47**. Este resultado indica que provavelmente somente a sua forma protonada da quitosana interage com o herbicida, mediante interação eletrostática entre os grupos nitro e o íon amônio do biopolímero, este resultado será confirmado com o estudo das isotermas de adsorção.



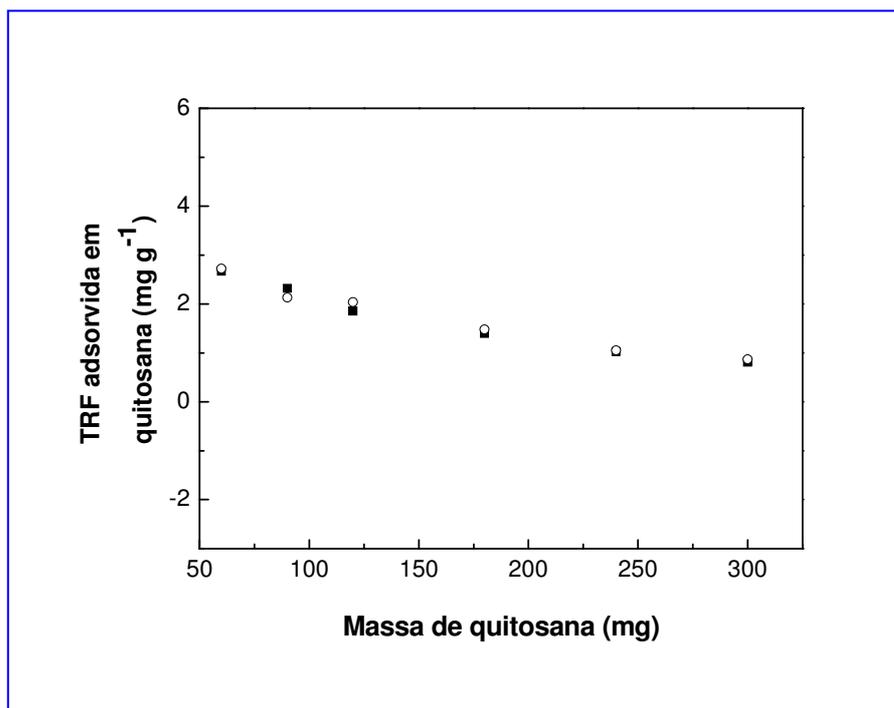
**Figura 47:** Espectro de absorção no UV-vis da TRF com quitosana em meio ácido com a variação do tempo.

Antes do estudo das isotermas foram avaliados os seguintes parâmetros na adsorção da TRF em quitosana: influência da variação da massa de quitosana e a variação do tempo sobre adsorção de TRF em quitosana. A partir dos resultados obtidos foi possível definir as variáveis que podem influenciar na adsorção da TRF.

#### 4.4.2 – Efeito da Variação da Massa

De acordo com NAGY (1988), para um experimento de adsorção a influência da variação da massa do sólido na quantidade adsorvida de um determinado componente da solução deve ser a primeira etapa do experimento. Deveremos verificar o seguinte ponto: a razão do adsorbato por unidade de massa do adsorvente deve ser independente da massa do adsorvente utilizada no meio.

A **Figura 48** apresenta a razão de TRF adsorvido por unidade de massa de quitosana em função da massa de quitosana. Observa-se que esta razão é aproximadamente constante, a partir de 180 mg de quitosana utilizada a um volume constante de solução.



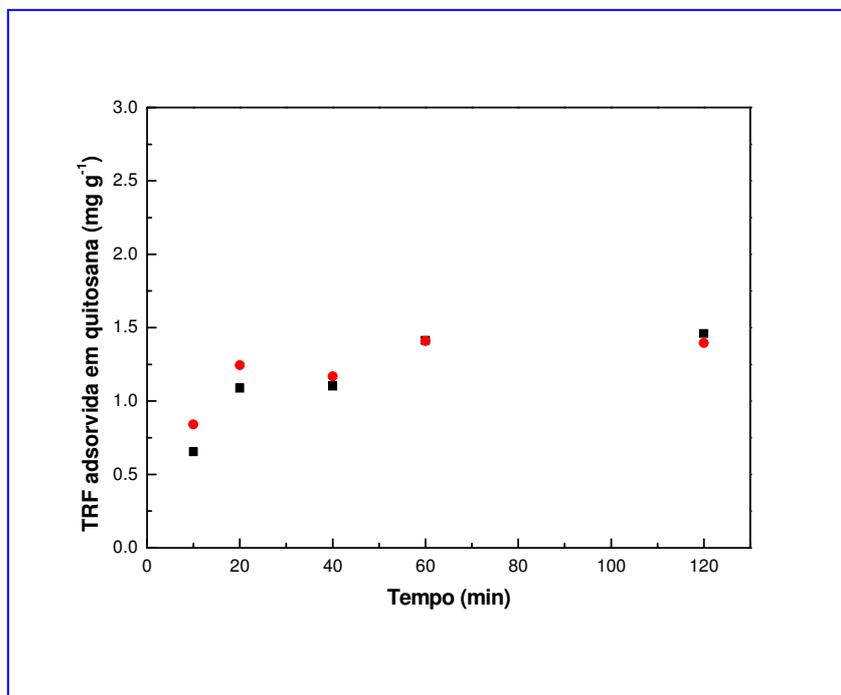
**Figura 48:** Razão de **TRF** adsorvido por unidade de massa de quitosana em função da massa de quitosana a 25 °C, 150 rpm,  $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de **TRF**, 4 h.

#### 4.4.3- Cinética de adsorção

A cinética de adsorção foi realizada com o objetivo de determinar o tempo necessário para saturação da superfície de quitosana pela **TRF**, ou seja, o tempo em que o equilíbrio de adsorção foi atingido. As isotermas de adsorção só poderão ser obtidas após a determinação deste tempo. A **Figura 49** mostra a cinética de adsorção de TRF/quitosana.

Nota-se que a massa de **TRF** adsorvida por unidade de massa de quitosana inicialmente aumenta com o aumento do tempo de contato e atinge o patamar constante após 1,0 h, sendo que o tempo escolhido para o experimento da isoterma foi de 1,5 h.

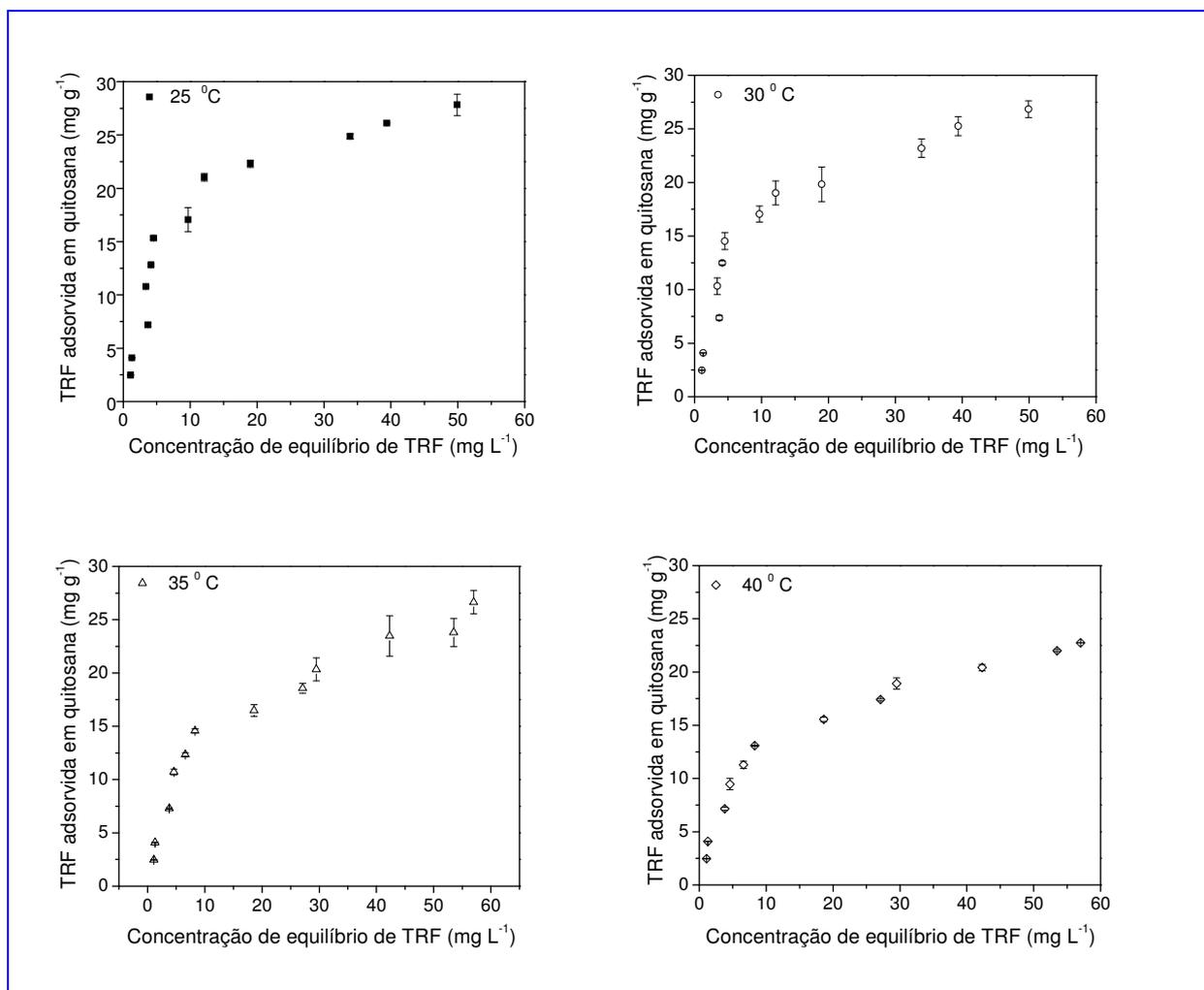
De posse desses dois parâmetros podemos construir as isotermas.



**Figura 49:** Cinética de adsorção de **TRF** em quitosana, a 25°C, 180 mg de quitosana, 150 rpm,  $c=3,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> de **TRF**.

#### 4.4.4– Isotermas

As isotermas de adsorção da TRF em quitosana foram obtidas nas seguintes temperaturas: 25, 30, 35 e 40 °C como apresentadas na **Figura 50**. De acordo com a literatura (PARIA e KARTIC, 2004) a adsorção é um processo de transferência de moléculas da solução para a interface. A obtenção de isotermas é importante, pois suas formas podem estimar o mecanismo de adsorção e a natureza da interação entre o adsorbato e o adsorvente (SOMASUNDARAN e HUANG, 2000).



**Figura 50:** Isotermas de adsorção de **TRF** em quitosana em função da concentração de equilíbrio a 25, 30, 35 e 40<sup>o</sup> C. Os experimentos foram feitos em triplicata.

Observa-se, na **Figura 50**, que estas isotermas não alcançaram um patamar bem definido e a quantidade adsorvida de **TRF** por unidade de massa de quitosana é alterada com o aumento da temperatura. Estas isotermas estão de acordo com o sistema de classificação de isotermas de GILES *et al.*, (1960) a partir da solução. Este sistema divide as isotermas em quatro classes principais de acordo com a sua inclinação inicial e em subgrupos baseado no tipo de patamar. Seguindo este sistema, as isotermas obtidas classificam-se como a do tipo L (inclinação inicial côncava com relação ao eixo x) e no subgrupo 2. Na prática, as isotermas L sugerem que à medida que os sítios de adsorção são preenchidos torna-se mais difícil para outras moléculas encontrarem sítios disponíveis (LYKLEMA, 1991). Foram feitos testes para as isotermas de Langmuir, Freundlich e Brunauer-Emmett-

Teller, para se determinar às quantidades máximas adsorvidas de **TRF** em quitosana como também a constante de adsorção em cada temperatura, mais só o modelo de Langmuir apresentou forma linear. Esse modelo assumiu que a camada adsorvida é de natureza monomolecular, onde a forma linear das isotermas de Langmuir é dada pela equação:

$$\frac{C_{eq}}{\Gamma} = \frac{1}{\Gamma_m K} + \frac{C_{eq}}{\Gamma_m} \quad (\text{equação 19})$$

onde  $C_{eq}$  é a concentração de equilíbrio no sobrenadante ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $\Gamma$  é a quantidade de herbicida adsorvido no sólido ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $\Gamma_m$  é a capacidade de adsorção máxima ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $K$  é a constante que relaciona a intensidade de adsorção ( $\text{L mg}^{-1}$ ). As formas linearizadas das isotermas da TRF a 25, 30, 35 e 40°C foram linear sobre a faixa de concentração estudada e os correspondentes coeficientes de correlação foram satisfatórios ( $r = 0,995$ ). Este valor sugere que os dados de adsorção TRF-quitosana seguem o modelo de Langmuir. Todas as constantes obtidas por este modelo e parâmetros termodinâmicos ( $\Delta G_{ads}^0$  e  $\Delta H_{ads}^0$ ) do processo de adsorção estão representadas na tabela 10. A variação de energia livre padrão ( $\Delta G_{ads}^0$ ) e a variação da entalpia padrão ( $\Delta H_{ads}^0$ ) do processo de adsorção são calculados através de,

$$\Delta G_{ads}^0 = -RT \ln K \quad (\text{equação 20})$$

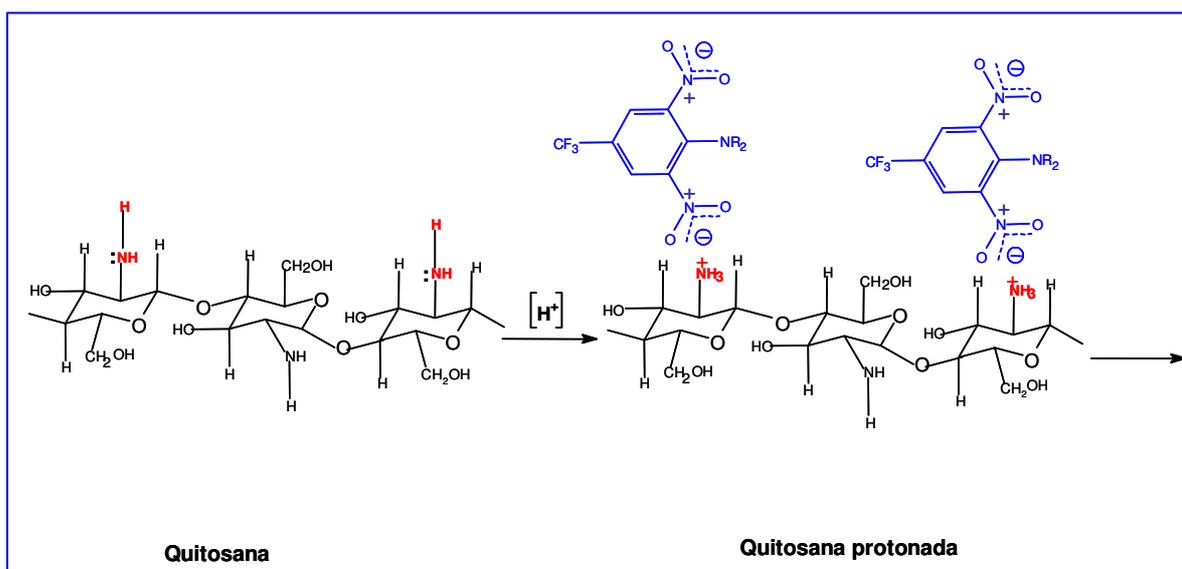
onde  $R$  é a constante dos gases ( $8,314 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura absoluta. Dos valores de  $K$ , o gráfico van't Hoff ( $\ln K \times 1/T$ ) pode fornecer a variação da entalpia do processo de adsorção usando a seguinte equação,

$$\frac{\partial(\ln K)}{\partial(1/T)} = -\frac{\Delta H_{ads}^0}{R} \quad (\text{equação 21})$$

**Tabela 10:** Dados de Adsorção e Termodinâmicos da interação **TRF**-quitosana.

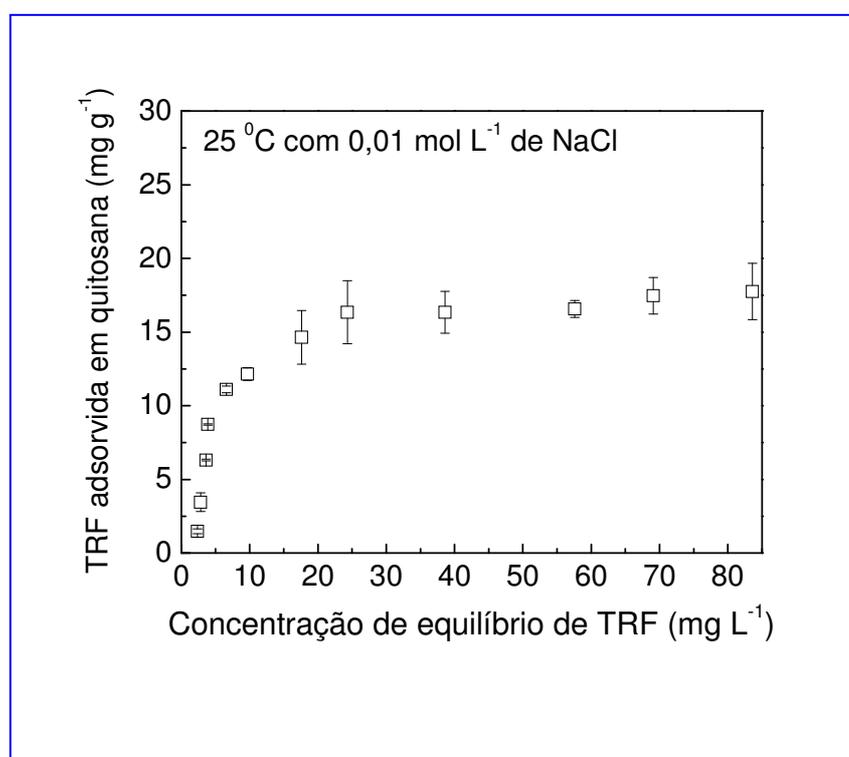
Adsorvente	Temperatura (K)	$\Gamma_m$ (mg g <sup>-1</sup> )	$K$ (L g <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{ads}^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H_{ads}^0$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
Quitosana	298	31,8	126,3	-11,9	-10,2
	303	30,7	117,3	-12,0	
	308	29,2	94,7	-11,7	
	313	25,4	109,1	-12,2	

Em geral a quantidade de **TRF** adsorvida em quitosana diminui quando a temperatura aumenta, indicando que há o processo de dessorção da **TRF** em quitosana. O valor de entalpia obtido foi de  $-10,2 \pm 0,8$  kJ mol<sup>-1</sup> confirmando que a adsorção **TRF**-quitosana é física. Este valor de entalpia está de acordo com a nossa hipótese que o processo de adsorção envolve atração eletrostática entre o grupo amino protonado da quitosana (RNH<sup>+</sup><sub>3</sub>) e o dipolo da molécula da **TRF** (**Figura 51**). DOS ANJOS *et al.*(2002) também verificaram que o corante Indigo Carmine (IC) foi removido da solução pela quitosana pela ação dos grupos amino protonados dela. A interação de IC com quitosana propicia a formação de uma monocamada de corante como indicado pelo modelo de adsorção aplicado.

**Figura 51:** Esquema representando uma possível interação para adsorção da **TRF** em quitosana.

O valor da energia livre obtido indica que o processo de adsorção é espontâneo na natureza e a interação **TRF-quitosana** é um processo termodinamicamente favorável para essas temperaturas.

Segundo a literatura (HOLMBERG *et. al.*, 1998) quando aumentamos a força iônica do meio geralmente ocorre uma diminuição da adsorção de moléculas em superfícies, isto é válido para interações de natureza eletrostática. Com base nessa teoria, foi construída uma isoterma com adição de NaCl para confirmar a natureza da interação. A **Figura 52** mostra a adsorção da **TRF** em quitosana com adição de 0,01 mol L<sup>-1</sup> de NaCl. Observa-se que esta isoterma alcança um patamar em torno de 17 mg g<sup>-1</sup>, este valor mostra a grande influência da presença do sal quando comparamos com a isoterma da **Figura 50** a 25°C. A partir desta observação é possível que o sal presente no meio interaja com o dipolo da **TRF** e desta forma diminui a interação da **TRF** com a quitosana.



**Figura 52:** Isoterma de adsorção de **TRF** em quitosana em função da concentração de equilíbrio a 25°C com 0,01 mol L<sup>-1</sup> de NaCl. Experimento feito em triplicata.

Estudos recentes demonstraram que a quitosana, além de ser naturalmente biodegradada por catálise enzimática ou por microorganismos (RATAJSKA e BORYNIEC, 1998), pode também sofrer degradação por POA (MURINOV *et al*, 2007). Essa informação é relevante em processos de descontaminação, já que o poluente orgânico, depois de ser retirado do meio, pode posteriormente ser degradado pelo método de Fenton, juntamente com sua matriz adsortiva.

Este estudo de adsorção foi também importante porque ao constatarmos a existência da interação entre **TRF-quitosana**, nos forneceu subsídios para a utilização um eletrodo a base de gel de quitosana. O próximo item mostra o estudo eletroquímico deste material eletródico.

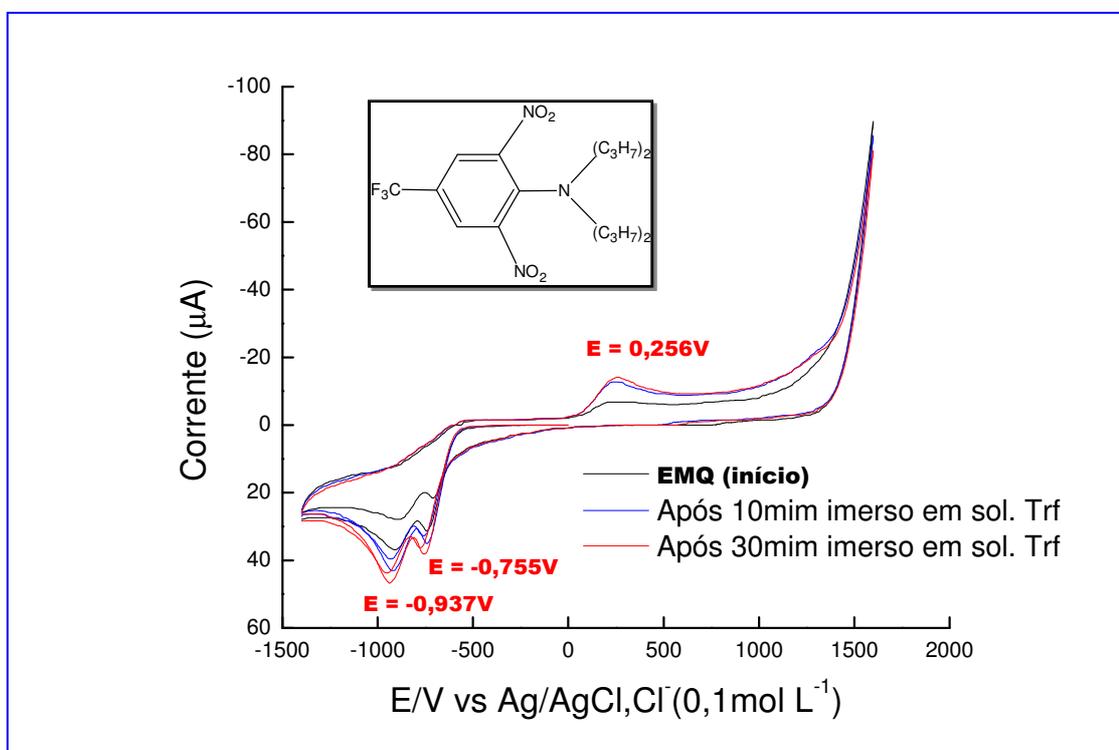
#### **4.5- Estudo eletroquímico da TRF em eletrodo modificado com quitosana (EMQ)**

A necessidade de técnicas mais versáteis para o monitoramento ambiental estimula a produção de uma grande variedade de métodos analíticos. No presente caso, baseado nos estudos adsortivos da **TRF** em quitosana, um eletrodo modificado com este polímero foi construído na perspectiva de sua utilização no monitoramento de efluentes e outras matrizes de interesse ambiental, possibilitando uma rápida adaptação nos processos de tratamento.

##### **4.5.1- Voltametria Cíclica**

No voltamograma cíclico da trifluralina em eletrodo de EMQ os picos de redução foram deslocados anodicamente, apresentando maior intensidade ( $E_{pc1} = -0,755$  V e  $E_{pc2} = -0,937$  V) em relação ao eletrodo de CV apresentado na **Figura 53**, caracterizando também que a trifluralina adsorve em quitosana. O efeito dessa adsorção foi verificado em função do tempo de imersão deste eletrodo na solução contendo a trifluralina. Após 30 min em contato, verificou-se um aumento da intensidade de pico cerca de 68%, corroborando com o que foi obtido na isoterma

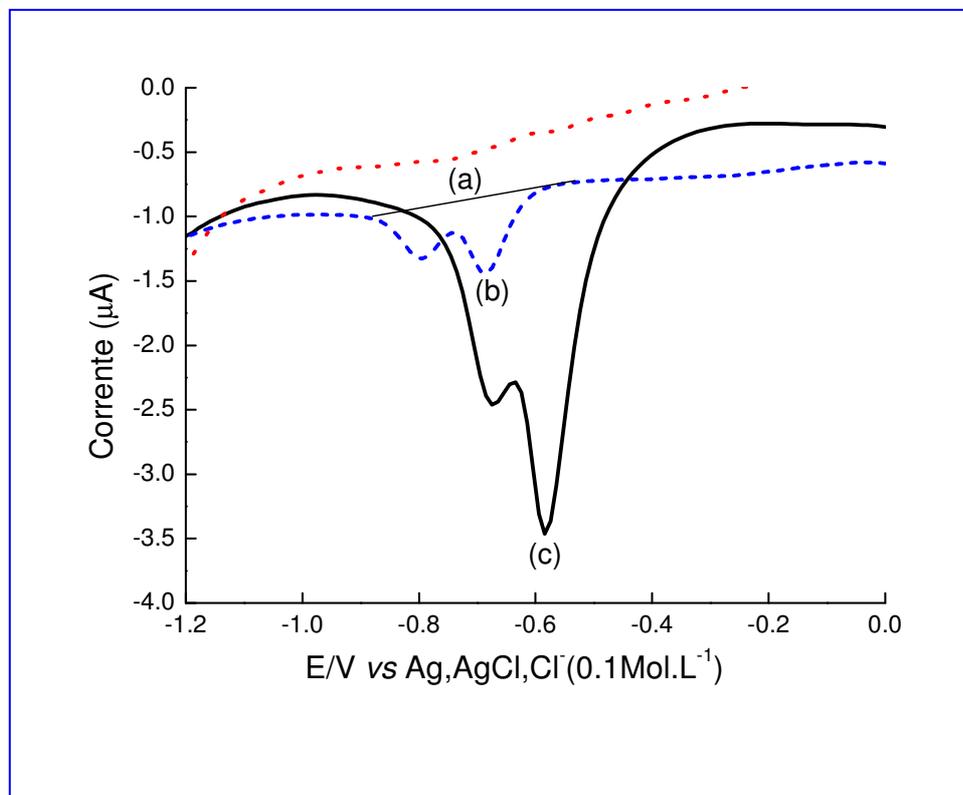
de adsorção onde o tempo é um fator importante para a saturação da superfície da quitosana pela **TRF**.



**Figura 53:** Voltamograma Cíclico da trifluralina  $c = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  obtido com eletrodo EMQ com eletrólito tampão fosfato/etanol (1:1)  $\text{pH}_{\text{ap}}=7,0$  e  $v = 0,100\text{V/s}$ .

#### 4.5.2- Voltametria de Pulso Diferencial

A VPD da **TRF** foi determinada, e revelou dois picos de redução em  $-0,687\text{V}$  e  $-0,795\text{V}$  respectivamente como no eletrodo de CV (**Figura 54B**). Quando o eletrodo foi modificado com quitosana, ambas a corrente de pico foram grandemente aumentadas (**Figura 54C**), aproximadamente 5 vezes maiores, e foi observado um deslocamento do potencial para valor menos negativo ( $\Delta E_p = 106 \text{ mV}$ ). A ciclagem do potencial catódico mostra que a intensidade da corrente não diminui mostrando a estabilidade do eletrodo. A razão é que no meio em estudo a quitosana é uma espécie carregada positivamente, e é adsorvido através dos dois grupos nitro presentes na molécula, como constatamos no estudo da isoterma de adsorção **TRF-quitosana**.



**Figura 54:** Voltamograma de pulso diferencial obtido com eletrólito suporte tampão fosfato/etanol (6:4) para a TRF. **a** (.....) eletrólito suporte em EMQ, **b** (----) VPD da TRF em eletrodo de CV e **c** (—) VPD em EMQ em solução de TRF. A concentração de TRF em solução  $c = 5,79 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Concentração de quitosana no eletrodo de CV  $30 \text{ mg L}^{-1}$ .

#### 4.5.3- A CURVA ANALÍTICA DA TRF EM ELETRODO EMQ

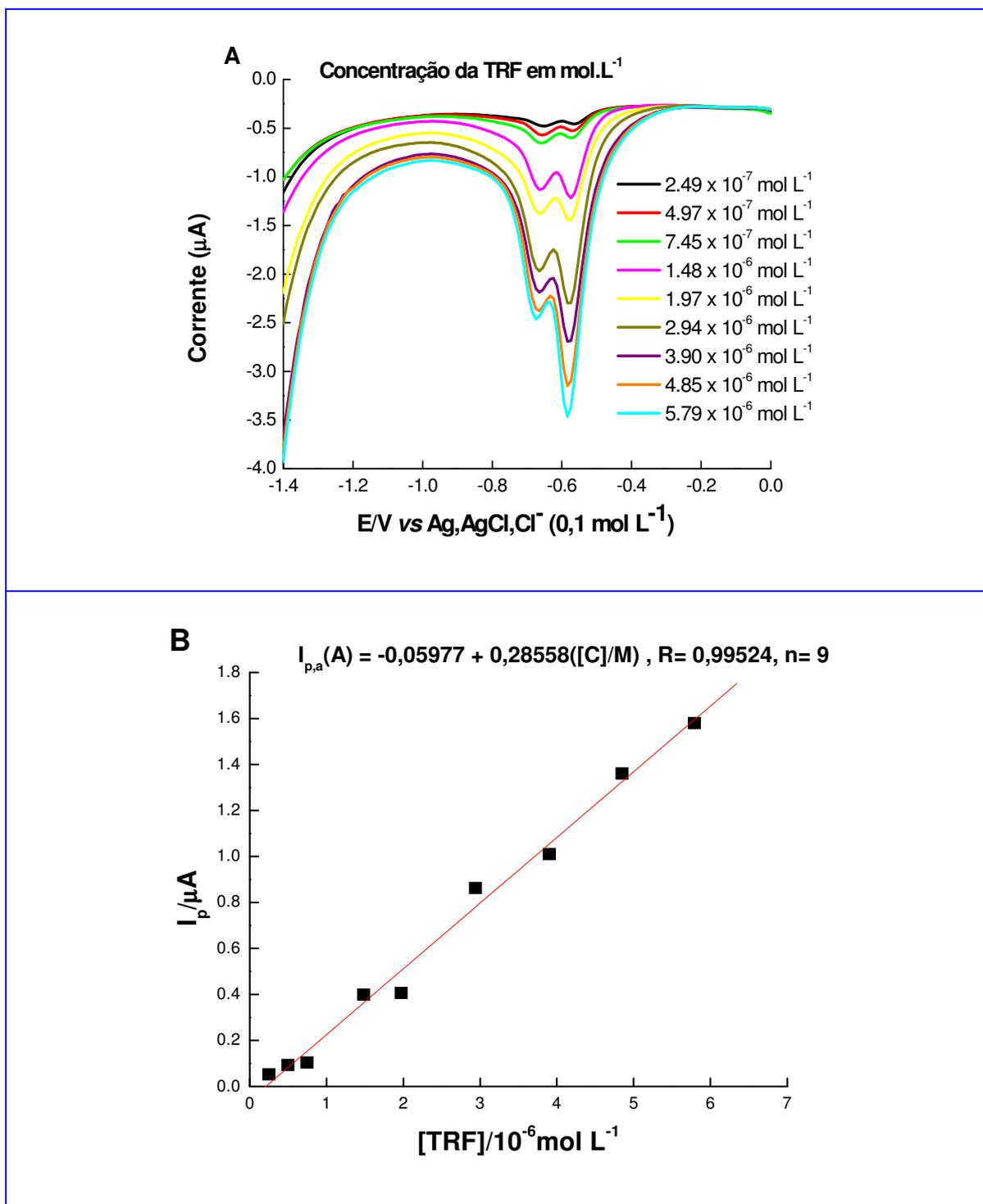
Os voltamogramas de Voltametria de Pulso Diferencial foram obtidos para a redução da TRF em diferentes concentrações em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{pH}_{\text{ap}} = 7,0$ . A análise do efeito da concentração na corrente  $E_{\text{plc}}$  permite explicitar a linearidade mostrada na relação entre a corrente de pico e a concentração (**Figura 55A**). Evidenciou-se linearidade entre a corrente de pico e a concentração em  $c_1$  entre  $2,49 \times 10^{-7}$  a  $5,79 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , descrita pela equação  $I_{p,a}(\text{A}) = -0,05977 + 0,28558([C]/\text{M})$  ( $R = 0,99524$ ,  $n=9$ ). A **Figura 55B** apresenta a relação entre as correntes de pico e a concentração da TRF.

Para a determinação do limite de detecção do EMQ utilizou-se o desvio padrão da média aritmética das correntes obtidas dos dez voltamogramas dos brancos, no mesmo potencial do pico voltamétrico da redução da TRF, e a relação (PEDROSA *et al.*, 2003) :

$$LD = \frac{3S_B}{b} \quad (\text{equação 22})$$

onde  $S_B$  é o desvio padrão da média aritmética das correntes dos brancos e o  $b$  o valor do coeficiente angular da curva analítica. O valor calculado para a **TRF** em eletrodo modificado com quitosana foi de  $7,45 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  considerando os dados da **Figura 55B**. Observamos que o valor LD obtido com o EMQ foi dez vezes menor que o LD obtido em eletrodo de CV, mostrando assim uma maior sensibilidade. Comparando o LD obtido com o determinado através do método da voltametria de redissolução com adsorção da **TRF** em eletrodo de carbono vítreo (RADI, 1999) que foi de  $2,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  podemos então afirmar que o EMQ possui uma boa sensibilidade.

A repetibilidade da resposta de corrente utilizando o EMQ foi investigada usando uma concentração de  $5,79 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  da **TRF**. O coeficiente de variação foi de 2% para três ensaios sucessivos. Esse eletrodo também mostrou reprodutibilidade (experimentos em dias diferentes) com uma variação de 4,2% de corrente utilizando à mesma concentração do herbicida.

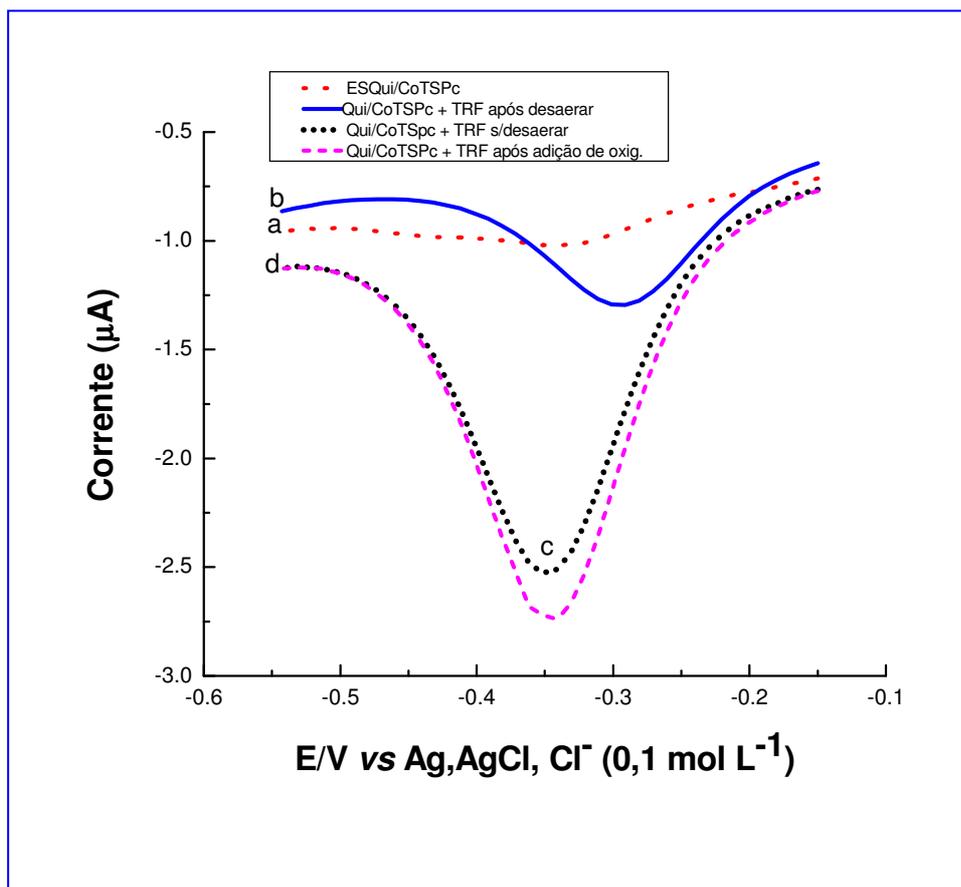


**Figura 55:** (A) VPD da TRF em EMQ para várias concentrações, eletrólito tampão fosfato/etanol (6:4) pH<sub>ap</sub> = 7,0. a = 50 mV, tempo de pulso: 70 ms, v = 20 mVs<sup>-1</sup>. (B) Efeito da corrente de pico e a concentração da TRF.

#### 4.5.4- ELETRODO MODIFICADO COM CoTSPc E GEL DE QUITOSANA

Vários trabalhos realizados pelo grupo do professor Dr. Lauro Kubota, da Universidade Estadual de Campinas, utiliza eletrodo de carbono vítreo modificado com filme de Ftalocianina Tetrassulfonada de Cobalto e poli-L-Lisina (CoTSPc/PLL), como sensor amperométrico para cisteína (LUZ *et al.*, 2006a), sensor para detecção de oxigênio dissolvido na solução (LUZ *et al.*, 2006b) e outros. Neste trabalho fizemos a utilização do complexo metálico com a substituição da poli-L-Lisina (PLL) por gel de quitosana para verificar uma possível reação eletrocatalítica entre o complexo e a **TRF**. Tanto a enzima quanto a quitosana serve de suporte para complexo de cobalto, mas diferentemente do polissacarídeo, a PLL tem custo relativamente alto, sofre facilmente degradação e não possui boa estabilidade mecânica o que confere o uso da quitosana uma grande vantagem.

Este estudo foi feito com o objetivo de observar se havia ou não catálise do complexo na reação com a **TRF** usando eletrodo modificado CoTSPc/gel de quitosana. Para verificar a redução eletrocatalítica da **TRF** no eletrodo modificado, foi utilizada voltametria de pulso diferencial. Nas condições utilizadas, as respostas voltamétricas com o eletrodo modificado com CoTSPc/quitosana não demonstrou reação catalítica entre o complexo e a **TRF** já que a onda em -0,3 V referente a redução da espécie ao íon metálico do complexo permaneceu inalterada na presença do herbicida (**Figura 56**). Entretanto, um aumento de corrente ocorreu dessa onda ocorreu quando a desaeração da solução foi interrompida. Esse aumento da intensidade de corrente foi mais evidente quando oxigênio molecular foi borbulhado da solução. Esse comportamento foi similar ao observado por LUZ *et al.* (2006a) com o eletrodo de CoTSPc/PLL. Comportamento este, associado à redução catalítica de oxigênio. Esse resultado foi interessante, pois demonstra que podemos utilizar o eletrodo modificado com CoTSPc/quitosana para detectar oxigênio presente na solução. Em trabalhos serão otimizados os parâmetros para o eletrodo CoTSPc/quitosana para detecção de oxigênio.



**Figura 55:** Voltametria de Pulso Diferencial ( $a = 50 \text{ mV}$ ,  $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ) realizados em tampão fosfato/álcool (1:1)  $\text{pH}_{\text{ap}} = 7,0$  para eletrodo de carbono vítreo modificado com Qui/CoTSPc (a); eletrodo modificado com Qui/CoTSPc+TRF após 10min de desaeração (b); eletrodo modificado com Qui/CoTSPc + TRF após a 1<sup>a</sup> corrida (c); eletrodo modificado com Qui/CoTSPc + TRF com adição de oxigênio (d).

#### 4.6. ESTUDO DA INTERAÇÃO DA TRF COM A MACROMOLÉCULA DO DNA E DA TOXICIDADE FRENTE AO CARAMUJO *BIOMPHALARIA GLABRATA*

Embora a TRF apresente vários processos e efeitos agudos no organismo tais como oxidação da hemoglobina, destruição dos glóbulos vermelhos, toxicidade aos rins e fígado, dermatites, entre outros, alguns autores afirmam que a TRF apresenta baixa toxicidade. Estudos recentes apresentaram que a TRF possui genotoxicidade, apesar de outros trabalhos não apresentarem genotoxicidade ou

resultados inconclusivos. Desta forma utilizou-se um biossensor de *dsDNA* para verificar possível interação entre o herbicida e biopolímero. Testes moluscidas foram também realizados e são ainda inéditos. Esses resultados serão importantes e servem para corroborar aos estudos de toxicidade da TRF oriundos da literatura alguns inclusive controversos.

#### 4.6.1- Estudo eletroquímico da TRF em biossensor de *dsDNA*.

Como anteriormente abordado um dos alvos biológicos mais relevantes para atuação de nitroaromáticos é o DNA. O biossensor de *dsDNA* é uma ferramenta valiosa na observação qualitativa da interação DNA/Fármacos, drogas, compostos tóxicos, principalmente em estudos de toxicidade, com ou sem redução preliminar.

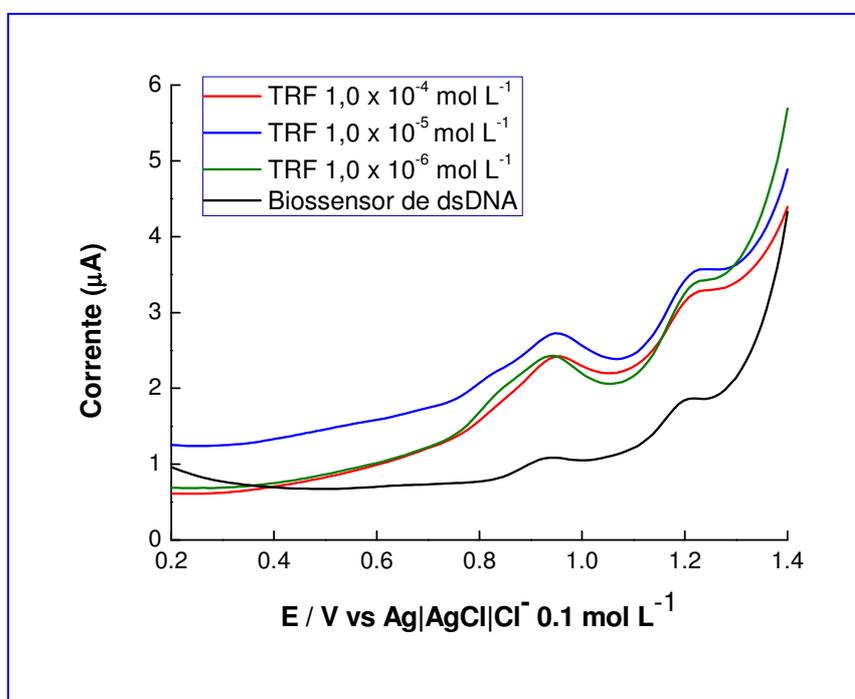
Um biossensor eletroquímico de *dsDNA* foi preparado e submetido a varreduras em voltametria de pulso diferencial na faixa de potencial de 0 a + 1,4 V, no intuito de verificar possíveis interações entre a TRF e o *dsDNA*. O mesmo tratamento foi também dado a um outro biossensor de *dsDNA* somente no meio eletrolítico na ausência da **TRF**, denominado de branco, com o objetivo de assegurar que quaisquer alterações observadas no espectro eletroquímico do biossensor em presença da **TRF** não fossem decorrentes da desnaturação da dupla hélice de DNA.

Em tampão acetato, pH 4,5, o comportamento eletroquímico do biossensor de DNA demonstrou a presença de dois picos de oxidação referentes as bases guanina e adenina. Estes picos são característicos do biossensor e suas correntes são ainda discretas o que se deve ao fato das bases não estar disponíveis para sofrer oxidação, em consequência das ligações de hidrogênio entre elas na dupla fita de DNA.

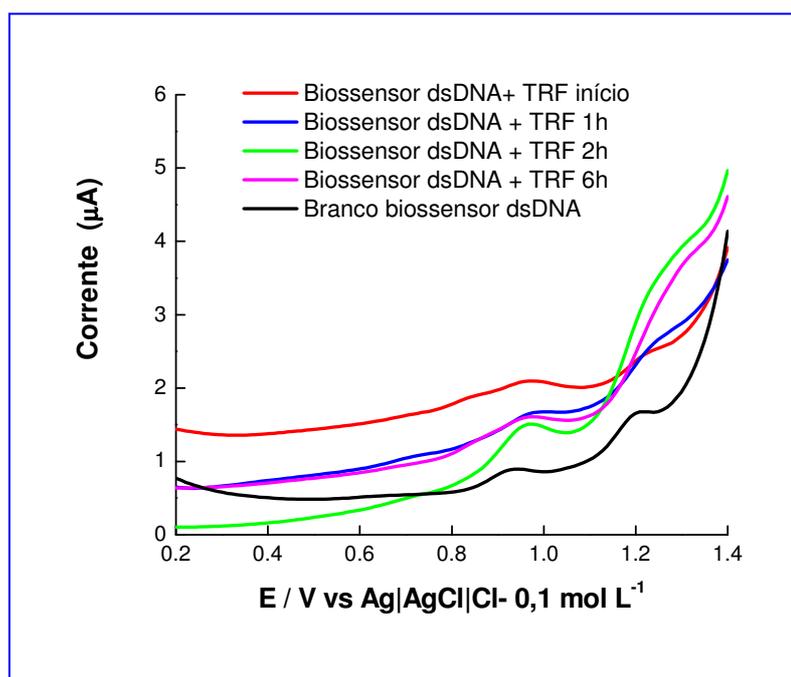
Estudos eletroquímicos da **TRF** foram realizados em biossensor de *dsDNA* através de duas metodologias. Na primeira, o *dsDNA* foi depositado eletroquimicamente na superfície do eletrodo de carbono vítreo com a aplicação de  $E_p = +0,5$  V por 300s em uma solução  $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de *dsDNA* em tampão acetato onde utilizou-se várias concentrações do herbicida. A outra metodologia, 25  $\mu$ L de uma solução de *dsDNA* foi colocado na superfície do eletrodo de carbono vítreo e secado sob atmosfera de N<sub>2</sub>. Este biossensor permaneceu em contato com a

solução de TRF por até 6 horas. Esta última metodologia garante uma completa cobertura da superfície do eletrodo e assim qualquer mudança voltamétrica estará associada exclusivamente a uma possível interação entre a macromolécula do DNA e a TRF.

De acordo com o observado na **Figura 57**, pode-se claramente perceber uma mudança do comportamento voltamétrico do biossensor ocorrendo um aumento expressivo do sinal de oxidação das nucleobases guanina e adenina mesmo em concentrações mais baixas do herbicida. Isto demonstra que a TRF interage com o dsDNA promovendo uma mudança conformacional da dupla fita e uma maior exposição das bases para sofrerem oxidação na superfície do eletrodo. Interações estas podendo ser eletrostáticas entre a TRF e o dsDNA e ou devido a quebra das ligações de hidrogênio entre as fitas da biomacromolécula. O efeito do tempo de exposição foi também analisado e após manter o biossensor em contato com TRF observou-se em varredura anódica o aumento dos picos de oxidação das duas ondas de oxidação referentes às nucleobases principalmente após 2 horas que o biossensor permaneceu em contato (**Figura 59**).

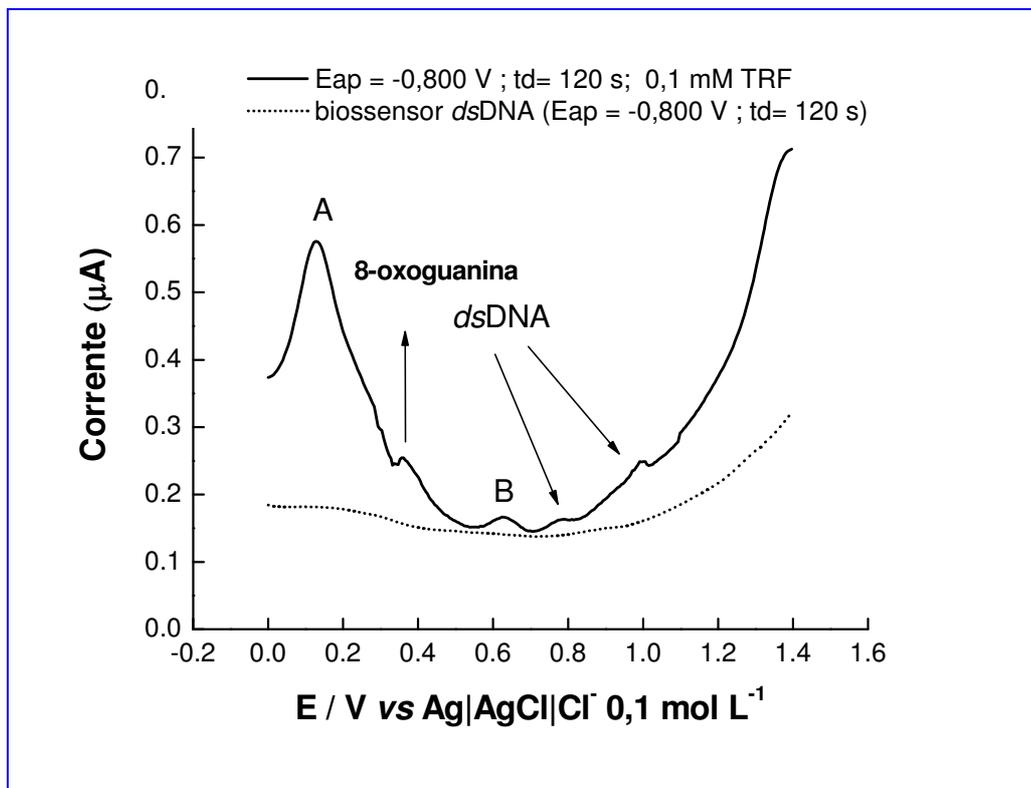


**Figura 57:** Voltamograma de pulso diferencial da TRF em um biossensor de dsDNA, tampão acetato, pH 4,5. Efeito da concentração da TRF.

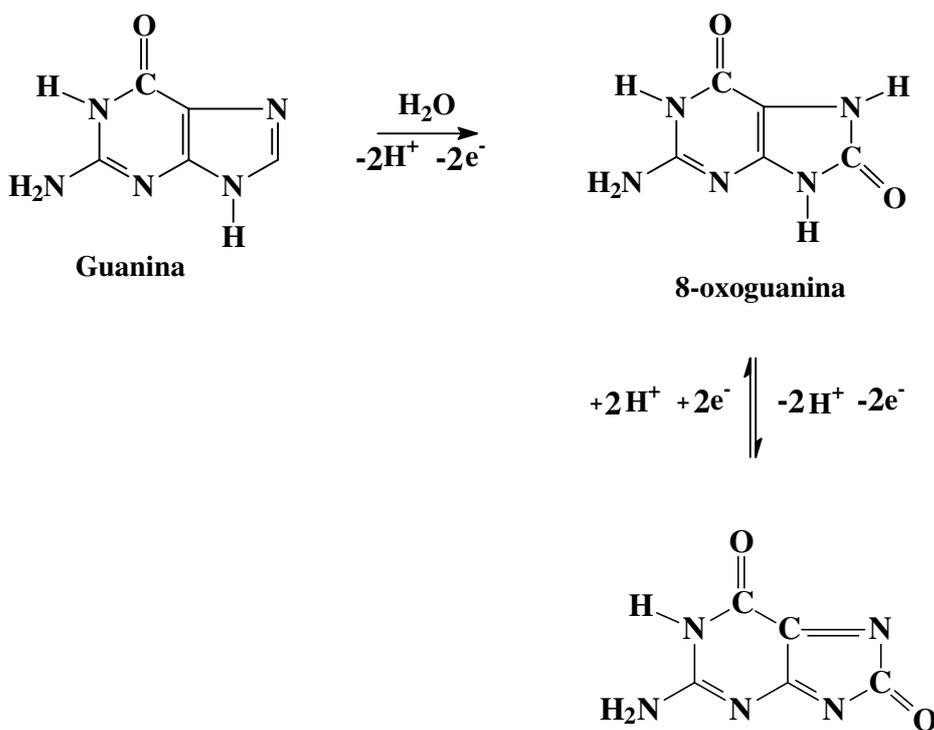


**Figura 58:** Voltamograma de pulso diferencial da TRF em um biossensor de *dsDNA*, tampão acetato, pH 4,5. Análise do tempo de exposição.

A análise da TRF reduzida em presença do biossensor de *dsDNA* foi também realizada. Ou seja, efetuou-se uma pré-eletrólise em -0,8 V por 120 s e varreu-se na varredura anódica utilizando o biossensor. Após ciclagem, observou-se, além das ondas de oxidação associadas às nucleobases, a presença da onda de oxidação referente ao derivado hidroxilamínico gerado após redução (pico A) e um pico característico do produto de oxidação da guanina, a 8-oxoguanina (**Figura 59**).



**Figura 59:** Voltamograma de pulso diferencial da TRF em um biossensor de dsDNA, tampão acetato, pH 4,5 em presença da TRF  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  após redução *in situ*.  $E_{ap} = -0,800 \text{ V}$ ;  $t_d = 120 \text{ s}$ .



**Figura 60:** Esquema de oxidação da guanina e da 8-oxoguanina

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que a **TRF** interage com o *dsDNA* tanto na sua forma não reduzida quanto após eletrorredução *in situ*. No meio estudado, pH 4,5, a TRF deve estar na forma protonada e interações eletrostáticas entre esses grupos catiônicos com os grupos fosfatos da biomacromolécula podem ocorrer promovendo mudanças no comportamento ciclovoltagemétrico do biossensor. Por outro lado, após redução, a TRF pode interagir com o *dsDNA* devido a formação de intermediários altamente reativos como o ânion nitro radical ( $\text{RNO}_2^\bullet$ ) e os derivados nitroso (RNO), hidroxilamina (RNHOH) e amina ( $\text{RNH}_2$ ) (ZIEBA-MIZGALA *et al.*, 2005), gerados após eletrorredução *in situ* dos grupos nitro.

#### **4.6.2- Atividade Moluscicida – Caramujo Adulto**

O objetivo do estudo da atividade moluscicida foi verificar a toxicidade da TRF frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*. Foram feitos testes preliminares nas concentrações 100, 50, 25, 20,15, 10, 5, e 1 ppm, onde foi observado que nas concentrações de 100 e 50 ppm após as primeiras 24 horas houve mortalidade de 100% e nas concentrações de 25, 20 e 15 ppm com 48 horas verificou 100% de mortalidade e nas concentrações de 5 e 1 ppm com 48 horas ocorreu 80% de mortalidade, a tabela 11 mostram esses resultados pré-liminares.

**Tabela 11:** Atividade moluscicida da trifluralina frente à *Biomphalaria Glabrata*. Teste preliminar.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração (ppm)</b>	<b>Mortalidade (Horas)</b>	<b>Mortalidade (%)</b>
Trifluralina 1	100	24	100
Trifluralina 2	100	24	100
Trifluralina 1	50	24	100
Trifluralina 2	50	24	100
Trifluralina 1	25	48	100
Trifluralina 2	25	48	100
Trifluralina 1	20	48	100
Trifluralina 2	20	48	100
Trifluralina 1	15	48	100
Trifluralina 2	15	48	100
Trifluralina 1	10	48	100
Trifluralina 2	10	48	100
Trifluralina 1	5	48	80
Trifluralina 2	5	48	80
Trifluralina 1	1	48	80
Trifluralina 2	1	48	80
Branco 1			0
Branco 2			0
Negativo 1			0
Negativo 2			0
Positivo 1	3	24	100
Positivo 2	3	24	100

Os testes apurados foram feitos nas concentrações de 5,0; 2,5; 1,0 e 0,5 ppm em triplicata, onde cada copo contém 10 caramujos e os resultados estão apresentados na tabela 12.

**Tabela 12:** Experimento realizado em triplicata, contendo cada copo 10 caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*

Concentração (ppm)	Número de Vivos	Número de Mortos	Mortalidade (%)
5	30	30	100
2,5	30	12	40
1	30	8	26,7
0,5	30	0	0

Os resultados da tabela 12 adicionados no programa estatístico computacional POLO e os valores de CL<sub>50</sub> para a TRF foi 1,79 ppm, demonstrando que a TRF possui atividade moluscicida frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata*.

O estudo da toxicidade frente ao caramujo *Biomphalaria glabrata* demonstrou a toxicidade da **TRF** em outros sistemas não ainda descritos na literatura, bem como corrobora a outros estudos de toxicidade para a **TRF**, alguns inclusive controversos.

Os resultados obtidos evidenciam uma forte atividade moluscicida de TRF contra caramujos adultos, que é muitas vezes superior àquelas apresentadas por vários moluscicidas; muzigadial, CL<sub>50</sub> = 5 e 10 ppm; warburganal, CL<sub>50</sub> = 2 ppm e mukaadial, CL<sub>50</sub> = 20 ppm (MARSTON; HOSTETTMANN, 1985), e próximo ao mostrado pela jatrofona, CL<sub>50</sub> = 1,86 ppm (SANTOS *et al.*, 1999).

## 5- CONCLUSÕES

- O comportamento eletroquímico da **TRF** em eletrodo de carbono vítreo apresentou dois picos de redução irreversível e de natureza difusional e uma onda anódica correspondente à oxidação do grupo hidroxilamínico gerado na varredura catódica.
- Através da análise do efeito da velocidade na corrente de pico, evidenciou um mecanismo do tipo EC onde a corrente de pico catódica normalizada diminuiu com o aumento da velocidade de varredura sugerindo, que ocorre a protonação posterior a transferência eletrônica.
- A TRF apresentou um comportamento de redução não linear, em função do pH aparente, com o deslocamento do potencial catódico ( $\Delta E_{pc}$ ) para valores mais negativos. A análise da corrente de redução ( $i_{pc}$ ) com o pH evidenciou uma ampla variação da corrente. E o pKa obtido através da intersecção das duas retas foi de 5,3 relativos à dissociação do sal de amônio aromático.
- A quantificação da **TRF** em eletrodo de carbono vítreo obteve um LD em torno de  $4,58 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ .
- A eletrólise preparativa da **TRF** levou o consumo de  $7,75 \text{ F mol L}^{-1}$  e ao completo desaparecimento das duas ondas de redução. A análise da mistura reacional observou-se a presença de vários subprodutos de degradação correspondente às formas nitro reduzida da **TRF**.
- O processo eletrofenton teve grande eficiência na oxidação do herbicida **TRF**, devido à simplicidade do método como também o tempo de análise. A reação eletrofenton levou a formação de quatro substâncias, embora não tenha sido possível definir a estrutura desses produtos reacionais, onde a razão m/z sugere que sejam estruturas diméricas resultantes do acoplamento entre os possíveis radicais da **TRF** obtidos a partir do ataque da hidroxila radicalar.
- O estudo da adsorção da **TRF** em quitosana foi feito através de UV-vis e das isotermas de adsorção e mostrou que a melhor adsorção foi em meio ácido, evidenciando que a quitosana, na sua forma protonada, interage com o herbicida. A variação da massa de quitosana adsorvida na **TRF** tornou-se

constante a partir de 180mg e o tempo de contato necessário atingiu um patamar constante após 1,0h.

- Com o estudo das isotermas de adsorção da **TRF** em quitosana foi possível determinar a variação da entalpia e da energia livre, onde foi confirmado que a adsorção **TRF-quitosana** é de natureza física (interação eletrostática entre o grupo amino protonado da quitosana ( $\text{RNH}^+_3$ ) e o dipolo da molécula da **TRF**) e que o processo é espontâneo e termodinamicamente favorável. Este estudo nos forneceu subsídios para a construção de um biossensor a base de gel de quitosana.
- O comportamento eletroquímico da **TRF** em **EMQ** mostrou que os picos de redução são deslocados anodicamente apresentando um aumento na corrente de pico. Foram feitas várias ciclagens e a intensidade da corrente não diminuiu mostrando a estabilidade do eletrodo.
- No **EMQ** obteve um LD dez vezes menor que o LD obtido em eletrodo de CV, mostrando assim uma maior sensibilidade.
- O estudo do eletrodo modificado com CoTSPc/quitosana pode servir para detectar oxigênio presente em uma solução.
- O estudo eletroquímico da **TRF** em biossensor *dsDNA*, tanto em solução como incorporado na superfície do eletrodo de carbono vítreo, mostrou que à **TRF** interage com o *dsDNA* tanto na sua forma não reduzida quanto após eletrorredução *in situ*.
- Ensaios moluscidas mostraram que a **TRF** apresenta toxicidade frente ao caramujo *Biomphalaria Glabrata* foram relevantes, pois demonstra a toxicidade da **TRF** em outros sistemas não ainda descritos na literatura, bem como corrobora a outros estudos de toxicidade para a **TRF**, alguns inclusive controversos. Esses resultados evidenciam uma forte atividade moluscida de **TRF** contra caramujos adultos, até mesmo superiores àquelas apresentadas por vários moluscidas.

## 6- PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho proporcionou a apresentação dos resultados em congressos nacionais e internacionais bem como a submissão de artigo em revista científica (Adsorption Studies of Trifluralin on Chitosan and its Voltammetric Determination on a Modified Chitosan Glassy Carbon Electrode; JBCS) e capítulo de livro (O uso de quitosana e quitosanas funcionalizadas em descontaminação ambiental; BNB). Mas alguns experimentos precisam ainda ser realizados para posterior submissão de novos trabalhos a periódicos indexados bem como perspectivas futuras profissionais nessa linha de pesquisa na UFS são ainda pretendidas. São eles:

- Estudo completo da TRF usando biossensor de *dsDNA* e *ssDNA* para se obter um diagnóstico mais preciso das interações observadas para a sugestão do mecanismo de toxicidade do herbicida frente á macromolécula biológica.
- Confecção do artigo sobre a toxicidade da TRF frente ao caramujo *Biophalaria Glabrata*.
- Modificação estrutural do biopolímero quitosana para estudos posteriores de adsorção para a TRF e outros pesticidas.
- Realização de reações de elétron fenton do compósito TRF-quitosana
- Desenvolvimento de biossensores a base de quitosana/CoTSPc para a detecção de pesticidas.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) ALMEIDA, F.S. - **Guia de herbicidas: recomendações para o uso adequado em plantio direto e convencional**. Londrina, IAPAR, 1985.
- 2) ANDREWS, P., THYSSEN, J.; LORKE, D. - The biology and toxicology of molluscicides, *Bayluscide. Pharmacol. Ther.*, v. 19, p. 245-295, 1982.
- 3) ARRANZ, A.; BETOÑO, S.F.; MOREDA, J.M.; ARRANZ, J.F. - Study of the electro-adsorptive behaviour of the herbicide nitratin by means of voltammetric techniques. *Talanta*, v. 45, p. 471-474, 1997.
- 4) ASHTON, F.M., MÔNACO, T.J. - **Weed science: Principles and Practices**. Nova Iorque, John Wiley & Sons, 1991.
- 5) AUDUS, L.J. **Herbicides**- Londres, Academic Press, p.608, 1980.
- 6) AVACA, L.A.; PEDROSA, V.A.; CODOGNOTO, L. - Determinação voltamétrica de 4-clorofenol sobre o eletrodo de diamante dopado com boro utilizando a voltametria de onda quadrada. *Quim Nova*, v. 26, p. 844-849, 2003.
- 7) BAIRD, C. - **Química Ambiental**, 2ed. Porto Alegre, Bookman, 2002.
- 8) BARD, A.J.; FAULKNER, L.R. - **Electrochemical Methods**. Nova Iorque, John Wiley & Sons, 1996.
- 9) BAYER, D.E.; FOY C.L.; MALLORY T.E.; CUTTER E.G. - Morphological & histological effects of trifluralin on root development". *Amer. J. Bot.*, v. 54, p. 945-952, 1967.
- 10) BELLINASSO, M.L.; HENRIQUE, L.A.; GAYLARDE, C.C.; GREER, C.W. - Genes similar to naphthalene dioxygenase genes in trifluralin degrading bacteria". *Pest. Manag. Sci.*, v. 5, p.474-478, 2004.
- 11) BIGDA, R.J. - **Consider Fenton's chemistry for wastewater treatment**. *Chem. Eng. Progress*, v. 91, p. 62-66, 1995.
- 12) BLACKBURN, R.S. - Natural Polysaccharides and Their Interactions with Dye Molecules: Applications in Effluent Treatment. *Environ. Sci. Technol.*, v. 38, p. 4905-4909, 2004.
- 13) BOUDENNE, J.L.; CERCLIER, O. O. - Performance of carbon black-slurry electrodes for 4-chlorophenol oxidation. *Water Res.*, v. 33, p.494-504, 1999.

- 14) BRETT, A.M.D.; MACEDO, T.R.A.; RAIMUNDO, D.; MARQUES, M.H.; SERRANO, S.H.P. - Voltammetric behaviour of mitoxantrone at a DNA-biosensor. *Bios. Bioelectr.*, v.13, p.861-867, 1998.
- 15) BRETT, A.M.O.; BRETT, C.M.A. - **Eletroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações**. Coimbra, Almedina. 1996.
- 16) BRETT, A.M.O.; CHIORCEA, A.M. - Effect of pH and applied potential on the adsorption of DNA on highly oriented pyrolytic graphite electrodes. Atomic force microscopy surface characterisation. *Electrochem. Comm.*, v. 5, p. 178-183, 2003.
- 17) BRETT, A.M.O.; SERRANO, S.H.P. - Electrochemical Oxidation of DNA. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 6, p. 97-100, 1995.
- 18) BRETT, A.M.O.; SERRANO, S.H.P.; PIEDADE, J.A.P. - **Electrochemistry of DNA**. In *Comprehensive Chemical Kinetics* (Ed. CROMPTON, R.G.; HANCOCK, G.), v.37. Oxford, Elsevier, 1999.
- 19) BRILLAS, E.; SAUDELA, R.; CASADO, J.- Use of an Acidic/Fe/O<sub>2</sub> Cell for WasteWater Treatment: Degradation of Aniline. *J. Electrochem. Soc.*, v. 12, p. 4539-4543, 1999.
- 20) BYRD, R.A.; MARKHAM, J.K.; EMMERSON, J.L. - Developmental toxicity of dinitroaniline herbicides in rats and rabbits". *Fundam. App. Toxicol.*, v. 26, p. 181-190, 1995.
- 21) CALDERON, M.J.; HERMOSÍN, M.C.; CORNE J.J.; MORENO, F. - Movilidad de trifluralina en laboreo tradicional y de conservación. **Estúdios de la Zona no Saturada Del Suelo**. Táxon, Tenerife, p.83-88, 1999.
- 22) CARABIAS-MARTÍNEZ, R.; RODRÍGUEZ-GONZALO, E.; GARCIA-JIMÉNEZ, M.G.; HERNÁNDEZ-MÉNDEZ, J. - Electroreduction of the fungicides folpet, captan and captafol on mercury electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, v. 456, p. 193-202, 1998.
- 23) CÁRDENAS, G., ORLANDO, P, EDELIO, T. - Synthesis and Applications of Chitosan mercaptanes as heavy metal retention agent. *Intern. J. Biol. Macromol.*, v. 28, 167-174, 2001.
- 24) CASTANHO, G.M.; VAZ, C.M.P.; MACHADO, S.A.S. - Electroanalytical Procedure for the determination of methylparathion in soil suspensions and its

- application for sorption studies with Brazilian soils. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 14, p. 594-600, 2003.
- 25) CHAGAS, C.M.; QUEIROZ, M.E.L.R.; NEVES, A.A. - Determinação de resíduos organoclorados em águas fluviais do município de Viçosa – MG. *Quim. Nova*, v. 22, p. 506-508, 1999.
- 26) CHANG, M.-Y.; JUANG, R.S. - Colloids and Surfaces. *Physicochem. Eng. Asp.*, v. 269, p. 35-46, 2005.
- 27) CHEN, Y.-I.; SU, Y.S.; JEN, J.F. - Determination of dichlorvos by on-line microwave-assisted extraction coupled to headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron-capture detection”. *J. Chromat. A*, v. 976, p. 349-355, 2002.
- 28) COLLINS, C.H. - **Princípios Básicos de Cromatografia**. Campinas, Unicamp, 1990.
- 29) CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Revisão da Resolução 020/86 “Classificação e Enquadramento de Corpos de Água**. 12 e 13 de Junho de 2003.
- 30) COOPER, D.C.; TUCKER, D.J.; BOND, A.M. - Electrochemical reduction of the pyrethroid insecticides tralomethrin and tralocytin at glassy carbon and mercury electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, v. 452, p. 5-11, 1998.
- 31) COOPER, D.C.; TUCKER, D.J.; BOND, A.M. - Electrochemical reduction of pyrethroid insecticides in non-aqueous solvents. *J. Electroanal. Chem.*, v. 426, p. 63-73, 1997.
- 32) CRINI, G. - Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in waste water treatment”. *Prog. Polym.Sci.*, v.30, p.38, 2005.
- 33) CRINI, G. - Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: a review. *Biores. Technol.*, v. 97, p. 1061-1085, 2006.
- 34) CROSBY, D.G.- Fate of Organic Pesticides in the Aquatic Environment. *Adv. Chem. Ser.*, v. 111, p. 173-188, 1972.
- 35) CYNDY, M.C.; GEORGE, S.; CHRISD, C. - Determination of solid-liquid partition coefficients (K<sub>d</sub>) for the herbicides isoproturon and trifluralin in five UK agricultural soils”. *Environ. Poll.*, v. 132, p. 541-552, 2004.

- 36) DAYAMA, A.; COUPE, R.H.Jr. - Pesticides in the Yazoo River and Bogue Phalia, February through September 1996. **Proceedings of the 27 th Mississippi Water Resources Conference**, 25-26 de Março, Jackson, Mississippi, EUA. p. 127-132, 1997.
- 37) DEUBER, R. - **Botânica das plantas daninhas**. In Ciência das plantas daninhas (Ed. DEUBER, R.) Jaboticabal, FUNEP, 1992.
- 38) DIMOU, A.D.; SAKKAS, V.A.; ALBANIS, T. A. - Trifluralin photolysis in natural waters and under the presence of isolated organic matter and nitrate ions: Kinetics and photoproduct analysis". *J. Photochem. Photobiol. A*, v. 163, p. 473-480, 2004.
- 39) DORES, E.F.G.C. - **Contaminação por pesticidas das águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso** (Tese de Doutorado, Universidade Federal do Mato Grosso), 2000.
- 40) DOS ANJOS, F.S.C.; VIEIRA, E.F.S.; CESTARI, A.R. - Interaction of Indigo Carmine Dye with Chitosan Evaluated by Adsorption and Thermochemical Data. *J. Coll. Inter. Sci.*, v. 253, p. 243-246, 2002.
- 41) DOS SANTOS, A.F., FERRAZ, P.A.L., PINTO, A.V., PINTO, M.C.R.F., GOULART, M.O.F.; SANT'ANA, A.E.G. - Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and derivatives. *Int. J. Parasitol.*, v. 30, p. 1199-1202, 2000.
- 42) DOS SANTOS, A.F.; SANT'ANA, A.E.G. - Molluscicidal activity of the diterpenoids Jatrophone and Jatropholones A and B isolated from *Jatropha elliptica* (Pohl) Muell. Arg. *Phytother. Res.*, v. 13, p. 660-664, 1999.
- 43) DREVINEK, M.; HORAK, V. - Voltametric determination of a pesticide sulfometuron methyl via its N-chloroderivative. *J. Eletroanal. Chem.*, v. 423, p. 83-85, 1997.
- 44) EBERT, E.; LEIST, K.H.; HACK, R.; EHLING, G. - Toxicology and Hazard Potencial of Trifluralin. *Food. Chem. Toxic.*, v. 30, p. 1031-1044, 1992.
- 45) ECCLES, G.N. - Recent Advances in Pulse Cyclic and Square-Wave Cyclic Voltammetric Analysis. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, v.22, p. 345-380, 1991.

- 46) FENG, J.; HU, X.; YUE, P.L. - Effect of initial solution pH on the degradation of orange II using clay-based Fe nanocomposites as heterogeneous photo-Fenton catalyst". *Water Res.*, v. 40, p. 641-646, 2006.
- 47) FENGLIAN, F.; CHENB, R.; XIONG, Y. - Application of a novel strategy - Coordination polymerization precipitation to the treatment of Cu<sup>2+</sup>-containing previous wastewaters". *Sep. Purif. Technol.*, v. 52, p. 388-393, 2006.
- 48) FERNANDES, T.C.C. - Uso do teste de *Allium cepa* na detecção da toxicidade e genotoxicidade do herbicida trifluralina (Monografia de bacharelado, Universidade Estadual Paulista), 2002.
- 49) FOUST, A.S.; WENZEL, L.A.; CLUMP, C. W.; MAUS, L.; ANDERSEN, L.B. **Principles of Unit Operations**, 2<sup>a</sup> ed. Nova iorque, John Wiley & Sons, 1980.
- 50) FREARSON, M.J.; BHATT, R.; CARR, P.; ISMAIL, F.M.D. - Electron Impact Induced Elimination of HNO<sub>2</sub> from Trifluralin–Phenylenediamine Dimers - an Ortho-Effect Resulting from a π-π interaction Persisting into the Vapour Phase. *Rap. Comm. Mass Spectrosc.*, v. 11, p. 201-205, 1997.
- 51) FUJISHIMA, A.; RAO, T.N.; LOO, B.H.; SARADA, B.V.; TERASHIMA, C. - Electrochemical Detection of Carbamate Pesticides at Conductive Diamond Electrodes. *Anal. Chem.*, v. 74, p. 1578-1582, 2002.
- 52) GÁLVEZ, J.B.; RODRÍGUEZ, S.M.; GASCA, C.A.E.; BANDALA, E.R.; GELOVER, S.; LEAL, T. - **Purificación de águas por fotocátalisis heterogênea: estado Del arte**. In *CYTED. Eliminación de Contaminantes por Fotocátalisis Heterogênea*, 2001.
- 53) GARRIDO, E.M.; LIMA, J.L.C.; DELERUE-MATOS, C.M.; BRET, A.M.O. - Electrochemical oxidation of benzatón at a glassy carbon electrode. *Talanta*, v. 46, p.113-115, 1998.
- 54) GEANKOPLIS, C.J. - **Transport Process and Unit Operations**, 3<sup>a</sup> ed. Nova Jersey, Prentice Hall, 1993.
- 55) GILES, C.H.; MACEWAN, T.H.; NAKHWA, S.N.; SMITH, D. - Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids. *J. Chem. Soc.*, v. 3, p. 3973-3993, 1960.

- 56) GLAZE, W.H.; KANG, J. W. & Chapin, D. H. – “The Chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and UV-radiation ozone”. *Sci. Eng.*, v.9, p. 335-352, 1987.
- 57) GREEF, R.; PEAT, R.; PETER, L.M.; PLETCHER, D.; ROBINSON, J. **Instrumental Methods in Electrochemistry**, Southampton Electrochemistry Group, 1985.
- 58) GRIMSHAW, J. **Electrochemical reactions and mechanisms in organic chemistry**. Amsterdam, Elsevier, 2000.
- 59) GROVER, R.; CESSNA, A. J.; WAITE, D.T. - **Volatilization losses transport in air of triazine herbicides**. In *The triazine herbicides* (Ed. LE BARON, H.M.; GIANESSI, L.P.; McFARLAND, J.; BURNSIDE, O.C.). Amsterdam, Elsevier, 2000.
- 60) GROVER, R.; WOLT, J. D.; CESSNA, A. J.; SCHIEFER, H.B. - Environmental fate of trifluralin. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 153, p. 1-64, 1997.
- 61) GUIBERTEAU, A.; GALEANO, T.; MORA, N.; PARRILHA, P.; SALINAS, F.- Study and determinations of the pesticide imidacloprid by square wave adsorptive voltammetry. *Talanta*, v. 53, p. 943-949, 2001.
- 62) GUIMARÃES, L.T. - Utilização do Sistema de Informação Geográfica (SIG) para identificação de áreas potenciais para disposição de resíduos na Bacia do Paquequer, Município de Teresópolis - RJ (Dissertação de Mestrado em Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio de Janeiro), 2000.
- 63) GUTOWSKA, A.; CZAPLINSKA, J.K.; JÓZ'WIAK, W.K. - Degradation mechanism of reactive orange 113 dyes by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>+2</sup> and ozone in aqueous solution. *Dyes Pig.*, v. 74, p. 41-46, 2006.
- 64) HACSKAYLO J.; AMATO V.A. - Effect of trifluralin on roots of corn & cotton. *Weed Sci.*, v. 16, p. 513-515, 1968.
- 65) HEGEDÜS, G.; BÉLAI, I.; SZÉKÁCS, A. - Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the herbicide trifluralin. *Anal. Chim. Acta*, v. 421, p. 121-133, 2000.
- 66) HOLMBERG, K., JONSSON, B.; Bengt, K.; BJORN, L. **Surfactants and Polymers in Aqueous Solution**. Nova Iorque, John Wiley & Sons, 1998.
- 67) <http://webbook.nist.gov/chem>.

- 68) <http://www.jornalexpress.com.br>.
- 69) HUANG, G.; OUYANG, J.; BAEYENS, W.R.G.; YANG, Y.; TAO, C. - High-performance liquid chromatographic assay of dichlorvos, isocarbophos and methylparathion from plant leaves using chemiluminescence detection., v. 474, p. 1-29, 2002.
- 70) IBAMA. **Portaria Normativa nº 139**, 21 de dezembro de 1994 com base no Decreto nº 98816/90.
- 71) IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas. **Uso de Agrotóxicos no Estado do Paraná**. DP/DADG/DRNEA/PAS – 1998/1999. [www.<ftp.ibge.gov.br/pub/produçãoagropecuária/UsodeAgrotoxicoEstadoParaná/Tabelas/Tabelaselecionadas.xls>](http://www.<ftp.ibge.gov.br/pub/produçãoagropecuária/UsodeAgrotoxicoEstadoParaná/Tabelas/Tabelaselecionadas.xls>).
- 72) IBRAHIM, M.S.; AL-MAGBOUL, K.M.; KAMAL, M.M. - Voltammetric determination of the insecticide buproferin in soil and water. *Anal. Chim Acta*, v. 432, p. 21-26, 2001.
- 73) KLUPINSKI, T.P.; CHIN, Y.P. - Abiotic Degradation of trifluralin by Fe (II): Kinetics and Transformation Pathways. *Environ. Sci. Technol.*, v. 37, p.1311-1318, 2003.
- 74) KOTOUCHEK, M.; OPRIVILOVÁ, M. - Voltammetric behaviour of some nitro pesticides at the mercury drop electrode”. *Anal. Chim. Acta*, v. 329, p. 73-81, 1996.
- 75) KUMAR, M.N.V.R. - A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.*, v. 46, p. 1-27, 2000.
- 76) KUNZ, A.; PERALTA – ZAMORA, P.; MORAES, S.G.; DURAN, N. - Novas Tendências para o Tratamento de Efluentes Têxteis. *Quim Nova*, v. 25, p. 78-82, 2002.
- 77) KURITA, K. - Controlled functionalization of the polysaccharide Chitin. *Prog. Polym. Sci.*, v. 26, p. 1921-1971, 2001.
- 78) LA-SCALEA, M.A.; SERRANO, S.H.P.; GUTZ, I.G.R. - Eletrodos modificados com DNA: Uma nova alternativa em eletroanálise. *Quim Nova*, v. 22, p. 417-424, 1999.
- 79) LEGRINI, O.; OLIVEROS, E.; BRAUN, A. M. - Photochemical processes for water treatment. *Chem. Rev.*, v. 93, p. 671-698, 1993.

- 80) LEI, C.-X.; HUA, S.C.; SHEN, G.L.A; YU, R. - Immobilization of horseradish peroxidase to a nano-Au monolayer modified chitosan-entrapped carbon paste electrode for the detection of hydrogen peroxide. *Talanta*, v. 59, p. 981-988, 2003.
- 81) LEITIS, E e CROSBY G. D - Photodecomposition of Trifluralin. *J.Agric.Food Chem.*, v.22, p.842-848, 1974.
- 82) LI, N.; BAI, R. - Highly Enhanced Adsorption of Lead Ions on Chitosan Granules Functionalized with poly(acrylic acid). *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 45, p. 7897-7904, 2006.
- 83) LIMA, I. S.; AIROLDI, C. - A thermodynamic investigation on chitosan-divalent interactions. *Thermochim. Acta*, v. 421, p. 133-139, 2004.
- 84) LIMA, I.S.; LAZARIN, A.M.; AIROLDI, C. - Cyclic voltammetric investigations on copper  $\alpha$ -N,O-succinated chitosan interactions. *Carbohydr. Polym.*, v. 64, p. 385-390, 2006.
- 85) LIPP, L.; PLETCHER, D. - The preparation and characterization of tin dioxide coated titanium electrodes. *Electrochim. Acta*, v.42, p. 1091-1099, 1997.
- 86) LIU, G.; LIN, Y. - Electrochemical stripping analysis of organophosphate pesticides and nerve agents. *Electrochem. Comm*, v. 7, p. 339-343, 2005.
- 87) LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas**. Nova Odessa, Plantarum, 1990.
- 88) LOVRIÉ, M.; KOMORSKY, S. J. - Square-wave voltammetry of an adsorbed reactant. *Electroanal. Chem.*, v. 248 p. 239-253, 1988.
- 89) LOVRIÉ, M.; S. KOMORSKY; MURRAY, R. W. - Adsorption Effects in Square Wave Voltammetry of Totally Irreversible Reactions. *Electrochim. Acta*, v. 33, p. 739-744, 1988.
- 90) LUCHINI, L.C. - Comportamento de Herbicida no Ambiente Aquático. [http://www.geocities.com/~esabio/água/qualidade\\_da\\_agua.htm,2000](http://www.geocities.com/~esabio/água/qualidade_da_agua.htm,2000). [acesso 21/06/2004].
- 91) LUZ, R.C.S.; MOREIRA, A.B.; DAMOS, F.S.; TANAKA, A.A.; KUBOTA, L.T.- Cobalt tetrasulphonated phthalocyanine immobilized on poly-L-lisine film onto glassy carbon electrode as amperometric sensor for cysteine". *J. Pharmac. Biomed. Anal.*, v, p. 8-15, 2006a.

- 92) LUZ, R.C.S.; DAMOS, F.S.; TANAKA, A.A.; KUBOTA, L.T. - Dissolved oxygen sensor base don cobalt tetrasulphonated phthalocyanine immobilized in poly-L-lysine film onto glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators*, v. B114, p. 1019-1027, 2006b.
- 93) LYKLEMA, J. - Adsorption at solid—liquid interfaces with special reference to emulsion systems. *Physicochem. Eng. Asp.*, v. 91, p. 25-38, 1994.
- 94) LYKLEMA, J. **Fundamentals of Interface and Colloid Science**. Londres, Elsevier, 1991.
- 95) MACHADO, S.A.S.; AVACA, L.A.; MASSAROPPI, M.R.C. - Electroanalytical determination of the herbicide picloram in natural waters by square wave voltammetry. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 14, p. 113-119, 2003.
- 96) OLIVEIRA, R.T.S e MACHADO, S.A.S. - Quantificação do pesticida diclorvos por voltametria de onda quadrada em águas puras e naturais. *Quim. Nova*, v. 27, p. 911-915, 2004.
- 97) MALATO, S.; BLANCO, J.; VIDAL, A.; RICHTER, C. - Photocatalysis with solar energy at a pilot-plant Scale: An overview. *App. Catal. B: Environ.*, v. 37, p. 1-15, 2002.
- 98) MANSILLA, H.D.; YEBER, M.C.; FREER, J.; RODRÌGUEZ, J.; BAEZER, J.- Homogeneous and heterogeneous advanced oxidation of a bleaching effluent from the pulp and paper industry. *Wat. Sci. Tech.*, v. 35, p. 273-278, 1997.
- 99) Manual de resíduos de Pesticidas em Alimentos, 1999.
- 100) MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. - Plant molluscicides. *Phytochem.*, v. 24, p. 639-52, 1985.
- 101) MATUO, Y.K.; LOPES, J.N.C; MATUO, T. - **Contaminação do leite humano por organoclorados – DDT, BHC e Ciclodienos**. Jaboticabal: FUNEP, 1990.
- 102) MONGAR, K.; MILLER, G.C. - Vapor phase photolysis of trifluralin in na outdoor chamber”. *Chemos.*, v. 17, p. 2183 -2188, 1988.
- 103) MORAES, M.; VAZ, C.M.P.; MACHADO, S.A.S. - **Estudos polarográficos do herbicida imazaquim**. In Comunicado Técnico nº 19. São Carlos: EMBRAPA, 1997.

- 104) MURINOV, K.U.; ROMANKO, T.V.; KURAMSHINA, A.R.; KABAL'NOVA, N.N.; MURINOV, Y.I. - Oxidative degradation of chitosan under the action of hydrogen peroxide. *Rus. J. App. Chem.*, v. 80, p. 159-161, 2007.
- 105) NAGY, M. - The close analogy between the preferential solvation of polymers in mixed solvents and adsorption from liquid mixtures at solid/liquid interface". *Langmuir*, v. 4, p. 93-96, 1988.
- 106) NEWMAN, J.F. - **Pesticides**. In *Pesticides Application Methods*. Singapore: Logman & Technical, 1979.
- 107) NEYENS, E.; BAEYENS, J. - A review of classic fenton's peroxidation as advanced oxidation technique. *J. Haz. Mat.*, v. B98, p. 33-50, 2003.
- 108) NIYAZYMBETOV, M.E.; EVANS, D.H. - The utility of carbanions and heteroatom-anions in electroorganic synthesis. *Tetrahedron*, v. 49, p. 9627-9688, 1993.
- 109) NOGUEIRA, J.M.F., T. SANDRA, P. SANDRA – Multiresidue screening of neutral pesticides in water samples by high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, v.505, p.09-215, 2004.
- 110) ODEA, J.J.; OSTERYOUNG, J.; OSTERYOUNG, R.A. - Theory of square wave voltammetry for kinetic systems. *Anal. Chem.*, v. 53, p. 695-701, 1985.
- 111) OLIVEIRA, I.R.W.Z.; VIEIRA, I.C. - Construction and analytical applications of biosensors using different immobilization procedures of vegetable peroxidase on chitosan matrix. *Quim Nova*, v. 29, p. 932-939. 2006.
- 112) OSTERYOUNG, J.G.; OSTERYOUNG, R.A. - Square wave voltammetry. *Anal. Chem.*, v. 57, p. 101-110, 1985.
- 113) OTURAN, A.M.; OTURAN, N.; LAHITTE, C.; TREVIN, S. - Production of hydroxyl radicals by electrochemically assisted Fenton's reagent. Application to the mineralization of organic micropollutant, pentachlorophenol. *J. Electroanal. Chem.*, v. 507, p. 96-102, 2001.
- 114) OUDO, H.C.; ALONSO, R.M.; BRUUN, H.H.C. - Voltametric behaviour of the synthetic pyrethroid lambda-cyhalothrin and its determination in soil and well water". *Anal. Chim. Acta*, v. 523, p. 69-74, 2004.

- 115) PADETEC - Parque de Desenvolvimento Tecnológico – Universidade Federal do Ceará – Brasil. Disponível em < [www.Padetec.ufc.br](http://www.Padetec.ufc.br)> Acesso em 15 de março de 2005.
- 116) PALECEK, E. *Biochem. Bioph. Acta*, v. 51, p. 1, 1961.
- 117) PANIZZA, M.; CERISOLA, G. - Removal of Organic Pollutants from Industrial Wastewater by Electrogenerated Fenton's Reagent. *Wat. Res.*, v. 35, p. 3987-3992. 2001.
- 118) PARIA, S.; KHILAR, C. – A review on experimental studies of surfactant at the hydrophilic-solid-water interface. *Adv. Coll. Inter. Sci.*, v. 110, p. 75-95, 2004.
- 119) PEDROSA, V.; CODOGNOTO, L.; AVACA, L.A. - Electroanalytical Determination of 4-Nitrophenol by Square Wave Voltammetry on Diamond Electrodes. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 14, p. 530-535, 2003.
- 120) PÉREZ, M.; TORRADES, F.; DOMÈNECH, X.; PERAL, J. - Fenton and photo-Fenton oxidation of textile effluents. *Water Res.*, v.36, p. 2703- 2710, 2002.
- 121) PINHEIRO, A.S. - Utilização de Agrotóxicos no Perímetro Irrigado Califórnia e suas influências na Saúde do Trabalhador Rural. Sergipe-Brasil. São Cristóvão (Dissertação de Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal de Sergipe), 2004.
- 122) PIZANO, M.A.; BAPTISTA, G.C. - Resíduos de fenitroion em frutos e folhas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) estaqueado. *Sci. Agri.*, v. 55, p. 203-209, 1998.
- 123) PLETCHER, D.; DE LEON, P. - Removal of formaldehyde from aqueous solutions via oxygen reduction using a reticulated vitreous carbon cathode cell. *J. Appl. Eletrochem.*, v. 25, p. 307, 1995.
- 124) POLYMAR IND. COM. IMP e EXP. LTDA – Fortaleza-Ceará. Disponível em [www.polymar.com.br/quitosana/quito-apli-htm](http://www.polymar.com.br/quitosana/quito-apli-htm). Acesso em 15/03/06.
- 125) POSPISIL, L.; SOKOLOVÁ, R.; COLOMBINI, M.P.; GIANNARELLI, S.; FUOCO, R. - Electrochemical properties of three dicarboximide-type pesticides: vinclozoline, iprodione and procymidone. *J. Electroanal. Chem.*, v. 472, p. 33-41, 1999.

- 126) RABEA, E.I.; BADAWY, M.E.; STEVENS, C.V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. - Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. Reviews. *Biomacromol.*, v. 4, p. 1457-1465, 2003.
- 127) RADI, A.B.D. - Adsorptive stripping determination of trifluralin on a glassy carbon electrode. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, v. 76, p. 61-68, 2000.
- 128) RATAJSKA, M., BORYNIEC, S. - Physical and chemical aspects of biodegradation of natural polymers. *Reac. Func. Polym.*, v. 38, p. 35-49. 1998.
- 129) RATHKE, T.D.; HUDSON, S.M. - Review of Chitin and Chitosan as Fiber and Film Formers, Reviews. *Macromol. Chem. Phys.*, v. C34, p. 375-437, 1994.
- 130) RIBAS, G.J.S.; CARBONELL, E.N.X.; CREUS, A.; Marcos, R. - Genotoxic evaluation of the herbicide trifluralin on human lymphocytes exposed in vitro". *Mut. Res.*, v. 371, p. 15-21, 1996.
- 131) RIBEIRO, M.F.S. - Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental dos Produtos Químicos de uma Indústria Petroquímica (Dissertação de Doutorado em Saneamento Ambiental), 1999. [http://www.mackenzie.com.br/pos-graduacao/dissertacoes-teses\\_99/saneamento.pdf](http://www.mackenzie.com.br/pos-graduacao/dissertacoes-teses_99/saneamento.pdf).
- 132) RIEDER, A. - Indicadores de riscos de contaminação e de danos ao ambiente e a saúde humana por pesticidas às bordas do Alto Pantanal. Cuiabá (Tese de Doutorado, Universidade Federal do Mato Grosso), 1999.
- 133) ROBERTS, G.A.F. - **Chitin Chemistry**. Hampshire, Mac-Millan, 1992.
- 134) RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. Londrina, Londrina. 1998.
- 135) RUPP, E.B.; ZUMAN, P.; SESTAKOVA, I.; HORAK, V. - Polarographic determination of some pesticides: application to a study of their adsorption on lignin. *J. of Agri. Food Chem.*, v. 40, p. 2016-2021, 1992.
- 136) RUTHVEN, D. M. - Principles of Adsorption and Adsorption Process. Nova Iorque, John Wiley & Sons, 1994.
- 137) SAMATHA, K.; SREEDHAR, N.Y. - Polarographic determination of deltamethrin. *Talanta*, v. 49, p. 53-58, 1999.
- 138) SANDERS, P.F.; SEIBER, J.N. - A chamber for measuring volatilization of pesticides for model soil and water disposal system". *Chemos.*, v. 12, p. 999-1012, 1983.

- 139) SCHIO, R. - Caracterização toxicológica de produtos domésticos que geram resíduos sólidos perigosos e sua destinação no município de Campo Grande (Tese de Mestrado, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul), 2001.
- 140) SELIM, H.M.; ZHU, H. - Retention and Mobility of deltamethrin in soils transport. *Soil Sci.*, v. 167, p. 580-589, 2002.
- 141) SÉQUARIS, J. M.; VALENTA, P. - AC voltammetry: a control method for the damage to DNA caused in vitro by alkylating mutagens. *J. Electroanal. Chem.*, v. 227, p. 11-20, 1987.
- 142) SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J.K.V.; JEON, Y- J. - Food Applications of Chitin and Chitosans. *Trends in Food Sci. Technol.*, v. 10, p. 37-51, 1999.
- 143) SIGNINI, R. - Estudos de obtenção, purificação e caracterização de quitosana (Dissertação de Mestrado, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo), 1998.
- 144) SOMASUNDARANA, P.; HUANG, L. - Adsorption/Aggregation of Surfactants and their Mixture at solid-liquid Interface. *Adv. Colloid Interf. Sci.*, v. 88, p. 179-208, 2000.
- 145) SUZUKI, M. - **Adsorption Engineering Chemical**. In Engineering Monographs. Tóquio, Elsevier, 1990.
- 146) SZCZEPANIAK, W.; CZYZOWICZ, B.; REN, M. - Voltammetric determination of prometryne in soil and water. *Anal. Chim. Acta*, v. 305, p. 207-211, 1995.
- 147) TAKAHASHI, T.; IMAI, M.; SUZUKI, I. - High-potential molecular properties of chitosan and reaction conditions for removing p-quinone from the aqueous phase. *Biochem. Eng. J.*, v. 25, p. 7-13, 2005.
- 148) THORP, H.H. - Cutting out the middleman: DNA biosensors based on electrochemical oxidation. *Trends in Biotechnol.*, v. 16, p. 117-121, 1998.
- 149) THURMAN, E.M.; ZIMMERMAN, L.R.; SCRIBNER, E.A.; COUPE, R.H.Jr. Occurrence of cotton pesticides in surface water of the Mississippi Embayment. *US Geological Survey Fact Sheet*, v. 4, p. 22-98, 1998.
- 150) TSAI, W.T.; CHANG, Y.M.; LAI, C.W.; LO, C.C. - Adsorption of basic dyes in aqueous solution by clay adsorbent from regenerated bleaching earth. *App. Clay Sci.*, v. 29, p. 149-154, 2005.

- 151) U.S. Environmental Protection Agency. Environmental Law Institute Research Report an Opportunities for Advancing Environmental Justice: an analysis of US-EPA. Washington, 2001
- 152) U.S. Environmental Protection Agency. **Health advisories for drinking waters contaminants**. Boca Laton: Lewis Publishers, 1993
- 153) U.S. Environmental Protection Agency. - Trifluralin health advisory office of drinking water. Washington, 1987.
- 154) URETA-ZAÑARTU, M.S.; BUSTOS, P.; DIEZ, M.C.; MORA, M.L.; GUTIÉRREZ, C. - Electro-oxidation of chlorophenols at a gold electrode. *Electrochim. Acta*, v. 46, p. 2545-2551, 2001.
- 155) US Peroxide. **Peroxide Applications**, ([www.h202.com.2000](http://www.h202.com.2000)).
- 156) USEPA – U.S. Environmental Protection Agency. **Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potencial**. *Science Information Management Branch Health Effects, Divison Office of Pesticide Programs*. 1999.
- 157) VAZ, C.M.P. - Metodologia Eletroanalítica para Medida de Atrazina em Águas e Solução do Solo (Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo), 1994.
- 158) VAZ, C.M.P; CRESTANE, S.; MACHADO, S.A.S.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A. **Análise de Pesticidas por técnicas eletroanalíticas**. In Comunicado Técnico nº 7, São Carlos: EMBRAPA, 1996.
- 159) VIEIRA, E.F.S.; SIMONI, J.A.; AIROLDI, C. – Interaction of cátions with SH-modified sílica gel: Thermochemical study through calorimetric titration and direct extent of reaction determination. *J. Mater. Chem.*, v. 7, p. 2249, 1997.
- 160) VIEIRA, S.L.P. - Resíduos de pesticidas organoclorados e organofosforados em tomate (*Lycopersium esculentun* P. Miller) comercializados em Cuiabá, Mato Grosso (Dissertação de Mestrado, Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso) 1999.
- 161) VIEIRA, L.V.; GALDINO, S.; PADOVANI, C.R. - Utilização de pesticidas na agropecuária dos municípios da bacia do Alto Taquari de 1988 a 1996 e Risco de contaminação do Pantanal, MSW, Brasil. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2001.
- 162) VLYSSIDES, A.G.; ISRAILIDES, C.J. - Detoxification of tannery waste liquors with an electrolysis system. *Environ. Poll.*, v. 97, p.147-152, 1997.

- 163) WAGNER, M.; NICELL, J.A. - Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Res.*, v. 36, p. 4041-4052, 2002.
- 164) WAITE, A.D.T. *et al.* – Atmospheric concentrations and dry and wet deposits of herbicides currently used on the Canadian Prairies. *Chemosphere*, Oxfor. v.58, p.693-703, 2005.
- 165) WANG, J.; CHICHARRO, M.; RIVAS, G.; CAI, X.; DONTA, N.; FARIAS, P.A.M.; SHIRAISHI, H. - DNA Biosensor for Detection of Hydrazines. *Anal. Chem.*, v. 68, p. 2251-2254, 1996.
- 166) WANG, S.; ARNOLD, A.W. - Abiotic reduction of dinitroaniline herbicides. *Water Res.*, v. 37, p. 4191-4201, 2003.
- 167) WORTHING, C.R. **The pesticide manual**, 9<sup>o</sup> ed. Farnham: British Crop Protection Council, 1991.
- 168) ZAIDENBERG, A.; MASSA, C.; LUONG, T.; GOMEZ, P.; VILANI, L.; VILLAGNA, S.; DRUT, R. - Trifluralin toxicity in Chagas disease mouse model. *Pharmacol. Toxicol.*, v. 101, p. 90-95, 2007.
- 169) ZEN, J.M.; JOU, J.J.; KUMAR, A.S. - A sensitive voltametric method for the determination of parathion insecticide. *Anal. Chim. Acta*, v. 396, p. 39-44, 1999.
- 170) ZIEBA-MIZGALA, A.; PUSZKO, A.; REGIEC, A.; KUDUK-JAWORSKA, J. Electrophilic properties of nitroheterocyclic compounds. Potential hypoxic cells radiosensitizers. *Bioelectrochem.*, v. 65, p. 113-119, 2005.
- 171) ZIMMERMAN, L.R.; THURMAN, E.M.; BASTIAN, K.C. - Detection of persistent organic pollutants in the Mississippi Delta using semipermeable membrane devices. *Sci. Total Environ.*, v. 248, p.169-176, 2000.