



Universidade do Porto

Faculdade de Engenharia

**FEUP**



Maria de Fátima de Sá Barroso

# MÉTODOS ANALÍTICOS EM PROCESSOS DE BIODEGRADAÇÃO DE PESTICIDAS-O MOLINATO

FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

Departamento de Engenharia Química

**MÉTODOS ANALÍTICOS EM PROCESSOS DE BIODEGRADAÇÃO DE  
PESTICIDAS – O MOLINATO**

Maria de Fátima de Sá Barroso

Licenciada em Engenharia Química  
Pelo Instituto Superior de Engenharia do Porto

Dissertação submetida para satisfação parcial  
Dos requisitos do grau de mestre em  
Engenharia do Ambiente  
(Ramo de Tratamento de Águas e Águas Residuais)

Dissertação realizada sob a supervisão de  
Professora Doutora Olga Cristina Pastor Nunes  
Do Departamento de Engenharia Química  
Da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

e co-orientação de  
Professora Doutora Maria do Carmo Veiga Fernandes Vaz  
Do Departamento de Engenharia Química  
Do Instituto Superior de Engenharia do Porto

Porto, Outubro de 2001

628(043)/BAR m/MET

<b>UNIVERSIDADE DO PORTO</b>
Faculdade de Engenharia
<b>BIBLIOTECA M</b>
N.º <u>60193</u>
CDU <u>628(043)</u>
Data <u>2 1 4</u> 20 <u>02</u>

## Resumo

O molinato é um herbicida selectivo da família dos tiocarbamatos mundialmente utilizado na eliminação selectiva de ervas daninhas que atacam a cultura de arroz. Devido à sua aplicação intensiva nos últimos anos, é frequentemente detectado em águas superficiais e subterrâneas.

Este trabalho teve como objectivo desenvolver uma metodologia analítica alternativa para o doseamento de molinato ao longo de um processo de biodegradação efectuado por um consórcio bacteriano. Para isso, fez-se o estudo do comportamento electroquímico na zona da oxidação e da redução do molinato, utilizando-se um eléctrodo de carbono vítreo e um eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, respectivamente.

O estudo da oxidação do molinato foi efectuado usando como electrólito de suporte meio de cultura e meio orgânico, acetonitrilo/perclorato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

Utilizando meio de cultura, fez-se o estudo da influência do pH no pico de oxidação deste pesticida, e dos processos que ocorrem no eléctrodo.

A redução do molinato num eléctrodo de mercúrio foi efectuada utilizando-se meio de cultura como electrólito de suporte, optimizadas as condições de análise em eléctrodo de mercúrio e recorrendo à voltametria de onda quadrada, desenvolveu-se uma metodologia analítica alternativa para o doseamento de molinato ao longo de um processo de biodegradação efectuado por um consórcio bacteriano.

Os resultados obtidos por esta metodologia voltamétrica proposta foram comparados com os obtidos pelo método de comparação (HPLC) demonstrando-se não existirem diferenças significativas sob o ponto de vista estatístico.

## Abstract

Molinate is a selective thiocarbamate herbicide used worldwide for the selective elimination of weed in rice cultures. Due to its intensive application in recent years, it is frequently detected in superficial and underground waters.

The aim of this work was the development of an alternative analytical methodology for the determination of molinate during a biodegradation process carried out by a microbial consortium.

Electrochemical oxidation and reduction studies of molinate, using a glassy carbon and an hanging mercury drop electrode, respectively, were attending.

The oxidation study of molinate was performed using culture medium and organic solution, acetonitrile/sodium perchlorate ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ ), as supporting electrolyte solution.

Using the culture medium, the effect of the pH on the oxidation peak of this pesticide and the electrode processes were studied.

The reduction of molinate at the mercury electrode was carried out using culture medium as supporting electrolyte. After the optimisation of experimental conditions an alternative methodology was developed. It was applied for the determinations of molinate during a biodegradation process carried out by a bacterium consortium.

The results obtained by this proposed voltammetric methodology were compared with those supplied by another method (HPLC) showing no significant differences concerning the statistic point of view.

## Résumé

Le molinate est un herbicide sélectif mondialement utilisé dans l'élimination des herbes nuisibles qui attaquent les rizières. Malheureusement comme cet herbicide a été intensément utilisé pendant ces dernières années, il est facilement détecté dans les eaux superficielles et souterraines.

Ce travail a eu comme objectif développer une méthodologie analytique alternative pour le dosage du molinate au long d'un processus de biodégradation effectué par un organisme bactérien.

Dans ce travail on a fait l'étude du comportement electrochimique dans la zone de l'oxydation et de la réduction du molinate en utilisant une électrode en carbone vitré, et une électrode en mercure de goutte suspendue, respectivement.

L'étude de l'oxydation du molinate a été effectuée en utilisant comme électrolyte de support moyen de culture et moyen organique.

En utilisant le moyen de culture, on a fait l'étude de l'influence du pH dans le maximum de l'oxydation de ce pesticide, et des processus qui surviennent sur l'électrode.

La réduction du molinate dans une électrode de mercure a été effectuée en utilisant le moyen de culture comme électrolyte de support.

En optimisant les conditions d'analyse dans une électrode de mercure et ayant recours à la voltamétrie d'onde carrée, on a développé une méthodologie analytique alternative pour le dosage du molinate au long d'un processus de biodégradation effectué par un consortium bactérien.

Les résultats obtenus par cette méthodologie voltamétrique ont été comparé avec ceux obtenus par la méthode de comparaison (HPLC) et ils démontrent qu'il n'existe pas de différence significatives du point de vue statistique.

## **Agradecimentos**

À Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto por me ter aceite como estudante de mestrado.

Ao Instituto Superior de Engenharia do Porto, por me ter admitido como membro do seu corpo docente.

À Professora Doutora Cristina Matos, o meu muito obrigado pelo seu empenho, optimismo e dedicação, apoio em termos científicos e pessoais e por toda a compreensão que sempre demonstrou, mesmo nos momentos mais difíceis. Agradeço-lhe também todas as oportunidades que me deu em termos profissionais.

À Professora Doutora Olga Nunes por ter aceite ser minha orientadora de mestrado e por todo o apoio científico e disponibilidade demonstradas ao longo do trabalho experimental.

À Professora Doutora Carmo Vaz, minha co-orientadora, agradeço o apoio científico, disponibilidade e a colaboração em todas as etapas da realização deste trabalho.

Ao Engenheiro Mendes Pinto por toda a colaboração quer em apoio técnico quer na disponibilidade de equipamento para a realização da parte experimental do trabalho.

Ao Mestre Henry por toda a disponibilidade e ajuda prestada na execução do trabalho experimental.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório do Grupo de Reacção e Análise Química (GRAQ) do DEQ/ISEP, onde foi desenvolvida a maior parte do trabalho experimental. Por toda a simpatia e ajuda agradeço à Eng<sup>a</sup>. Isabel Serra, à Eng<sup>a</sup>. Aurora Silva e ao Eng<sup>o</sup>. Tomás Albergaria.

Ao Engenheiro Abel Duarte pela ajuda prestada na pesquisa bibliográfica.

À Engenheira Patrícia Correia pelo apoio e disponibilidade na realização das análises microbiológicas.

À Eng<sup>a</sup>. Carla Rocha e à Eng<sup>a</sup>. Marília Baptista que em todos os momentos se revelaram verdadeiras amigas e por todo o carinho com que sempre me ouviram e ajudaram. Do fundo do meu coração, o meu muito, muito.....obrigada.

Aos meus irmãos e sobrinhos por me aturarem desde sempre, e pelas palavras amigas com que sempre me aconselharam.

Aos meus pais por me ajudarem nos momentos mais difíceis e por toda a compreensão e paciência com que sempre se dedicaram ao longo destes anos, de uma forma tão unívoca e incondicional.



# Índice geral

	<b>Pág.</b>
Resumo	iii
Abstract	iv
Résumé	v
Agradecimentos	vi
Índice geral	viii
Índice de figuras	xi
Índice de tabelas	xv
Abreviaturas e símbolos	xvii

## Capítulo 1

### INTRODUÇÃO

1.1 Consumo de pesticidas	2
1.2 Destino dos pesticidas	4
1.3 O molinato	5
1.4 Técnicas analíticas para o doseamento de molinato	14
1.5 Técnicas voltamétricas	16
1.5.1 Voltametria cíclica	17
1.5.2 Voltametria de onda quadrada	22
1.5.3 Eléctrodos sólidos	23
1.5.4 Eléctrodo de mercúrio	24

## Capítulo 2

### Parte experimental

2.1 Introdução	26
----------------	----

2.2 Equipamento	26
2.3 Material de uso geral	30
2.4 Preparação de soluções	30
2.5 Procedimento gerais das metodologias utilizadas	33
2.5.1 Biodegradação do molinato	33
2.5.1.1 Conservação do consórcio bacteriano III	33
2.5.1.2 Preparação da cultura de inóculo	34
2.5.1.3 Estudo cinético da biodegradação do molinato	34
2.5.2 Voltametria cíclica	35
2.5.3 Voltametria de onda quadrada	35
2.5.4 Método cromatográfico de comparação	36
2.5.5 Cinética de degradação do molinato	36
2.6 Reagentes	37

## Capítulo 3

### Resultados e Discussão

3.1 Introdução	40
3.2 Oxidação do molinato em solução aquosa	40
3.2.1 Influência do pH	40
3.2.2 Mecanismo de oxidação	43
3.2.3 Curva de calibração	47
3.3 Oxidação do molinato em meio orgânico	49
3.3.1 Estudo do comportamento electroquímico em acetonitrilo	49
3.3.2 Curva de calibração	51
3.4 Redução do molinato em solução aquosa	54
3.4.1 Otimização do potencial e do tempo de acumulação	54
3.4.2 Influência do pH	57
3.4.3 Estudos por voltametria cíclica	58
3.4.4 Estudos por voltametria de onda quadrada	59

3.5 Determinação do molinato	61
3.5.1 Curva de calibração em HPLC	61
3.5.2 Curva de calibração em voltametria	62
3.5.3 Doseamento do molinato ao longo do processo de biodegradação	64
Capítulo 4	
Conclusões	72
Capítulo 8	
Bibliografia	75

## Índice de figuras

Figura 1.1	Venda dos principais pesticidas em Portugal em 1998 (M.A., 2000).	3
Figura 1.2	Consumo dos principais pesticidas efectuado nos quinze países da União Europeia por área agrícola em 1996 (M.A., 2000).	4
Figura 1.3	Transferência dos pesticidas no meio ambiente (IARN, 1998).	5
Figura 1.4	Mecanismo proposto de mineralização do molinato no solo (Rajapogal et al., 1984).	9
Figura 1.5	a) Coloração Gram de um esfregaço do consórcio III (microscopia óptica campo claro (1000x); b) Cultura em meio sólido do consórcio.	13
Figura 1.6	Esquema genérico do controlo potencióstico existente numa célula voltamétrica de três eléctrodos.	17
Figura 1.7	Esquema de aplicação de potenciais, com o tempo, em voltametria cíclica.	18
Figura 1.8	Voltamograma cíclico para uma reacção reversível.	19
Figura 1.9	Voltamograma cíclico típico de uma reacção totalmente irreversível.	20
Figura 1.10	Representação esquemática de voltamogramas para sistema: A- reversível; B-quase-reversível; C- irreversível.	21
Figura 1.11	Voltametria de onda quadrada.	23
Figura 1.12	Esquema do eléctrodo de mercúrio multimodo.	24
Figura 1.13	Representação esquemática de um voltamograma na ausência e na presença de adsorção.	25
Figura 2.1	Equipamento usado nas determinações voltamétricas.	27
Figura 2.2	Célula electroquímica.	28
Figura 2.3	Eléctrodo de trabalho de carbono vítreo.	28
Figura 2.4	Eléctrodo de trabalho de gota de mercúrio.	29
Figura 3.1	Voltamograma de onda quadrada da solução electrolítica a pH 1,9: A – meio de cultura acidificado com HNO <sub>3</sub> e força iónica ajustada com KNO <sub>3</sub> ; B – meio de cultura acidificado com HCl e força iónica ajustada com KCl.	41
Figura 3.2	Estudo da variação da intensidade de corrente de pico de oxidação com o pH de uma solução de molinato de concentração $7 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> em meio de cultura, à frequência de 50 Hz, amplitude 50 mV e incrementos de potencial de 1 mV.	42

- Figura 3.3 Voltamograma de onda quadrada de uma solução de molinato de 42  
concentração  $7,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de cultura com pH 1,9 utilizando  
uma frequência de 50 Hz, amplitude 50 mV e incrementos de potencial de  
1 mV.
- Figura 3.4 Voltamograma cíclico de uma solução de molinato de concentração 43  
 $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de cultura a pH 1,9 e força iônica  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ ,  
usando uma velocidade de varrimento  $150 \text{ mV s}^{-1}$ .
- Figura 3.5 Gráfico de  $i_p$  vs  $v^{1/2}$  para uma solução de molinato de concentração  $2,0 \times 10^{-3}$  44  
 $\text{mol L}^{-1}$  em meio de cultura a pH 1,9 e força iônica  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ .
- Figura 3.6 Voltamograma de onda quadrada de uma solução de molinato de 45  
concentração  $7,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de cultura a pH 1,9 e força iônica  
de  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  utilizando uma frequência de 50 Hz, amplitude 50 mV e  
incremento de potencial de 1 mV.
- Figura 3.7 Gráfico de  $i_p$  vs  $w^{1/2}$  para uma solução de molinato de concentração  $7,0 \text{ mol}$  45  
 $\text{L}^{-1}$  a pH 1,9 e força iônica  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ .
- Figura 3.8 Voltamogramas de onda quadrada de soluções aquosas de molinato a pH 47  
1,9: A -  $4,0 \times 10^{-4}$ ; B -  $5,0 \times 10^{-4}$ ; C -  $6,0 \times 10^{-4}$ ; D -  $7,0 \times 10^{-4}$ ; E -  $8,0 \times 10^{-4}$ ; F -  
 $9,0 \times 10^{-4}$ ; e G -  $9,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando uma frequência de 50 Hz,  
amplitude 50 mV e incremento de potencial de 1 mV.
- Figura 3.9 Curva de calibração para soluções aquosas de molinato a pH 1,9. 48
- Figura 3.10 Voltamograma cíclicos para uma solução  $2,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de molinato em 50  
acetoneitrilo/perclorato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) num eléctrodo de carbono  
vítreo.
- Figura 3.11 Gráfico  $i_p$  vs  $v^{1/2}$  de uma solução  $2,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de molinato em 51  
acetoneitrilo/perclorato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ).
- Figura 3.12 Voltamogramas de onda quadrada de soluções de molinato em 52  
acetoneitrilo/perclorato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ): A -  $4,9 \times 10^{-4}$ ; B -  $7,8 \times 10^{-4}$ ; C  
-  $9,8 \times 10^{-4}$ ; D -  $1,5 \times 10^{-3}$  e E -  $2,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .
- Figura 3.13 Curva de calibração para o segundo pico de oxidação para soluções de 53  
molinato em acetoneitrilo/perclorato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

- Figura 3.14 Voltamogramas de onda quadrada para uma solução  $2,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de molinato em meio de cultura, pH 7,4 e força iónica  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ , utilizando uma frequência de 150 Hz ao potencial de deposição ( $E_d$ ) de  $-0,800 \text{ V}$  e amplitude 50 mV. Tempo de acumulação: A – 0 s; B – 10 s. 55
- Figura 3.15 Efeito do tempo de deposição na intensidade da corrente de pico ( $i_p$ ) numa solução aquosa de molinato de concentração:  $2,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  ( $\blacklozenge$ ) e  $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  (O). pH 7,4 frequência 150 Hz e potencial de deposição  $-0,800 \text{ V}$ . 56
- Figura 3.16 Efeito do potencial de deposição ( $E_d$ ) na intensidade de corrente de pico ( $i_p$ ) numa solução de molinato de concentração  $2,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de cultura a pH 7,4 à frequência de 150 Hz e tempo de deposição 10 s. 56
- Figura 3.17 Efeito do pH sobre os valores de ( $\square$ )  $E_p$  e ( $\times$ )  $i_p$  para soluções de molinato de concentração  $2,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  usando a técnica de voltametria de onda quadrada. Frequência 150 Hz, amplitude 50 mV,  $t_d$  10 s e  $E_d -0,800 \text{ V}$  57
- Figura 3.18 Voltamogramas cíclicos de uma solução aquosa de molinato de concentração  $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em eléctrodo de gota de mercúrio: A - 20; B - 50; C - 100; D - 150; E - 200; F - 300; G - 400; H - 500 e I - 600  $\text{mV s}^{-1}$ . 58
- Figura 3.19 Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de molinato de concentração  $2,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  com pH 7,4 às frequências de: A - 20; B - 50; C - 100; D - 150 e F - 200 Hz. Potencial de deposição ( $E_p$ )  $-0,800 \text{ V}$  aplicado durante 10s. 60
- Figura 3.20 Voltamograma de onda quadrada de uma solução de molinato de concentração  $2,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de cultura com pH 7,4 utilizando uma frequência de 50 Hz, amplitude 50 mV e incremento de potencial de 1 mV. 60
- Figura 3.21 Cromatograma de uma solução padrão de molinato de concentração  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de cultura a pH 7,4 usando um caudal de eluente de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$  e a detecção a um comprimento de onda 210 nm. 61
- Figura 3.22 Curva de calibração para soluções padrão de molinato em meio de cultura a pH 7,4 usando o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). 62

- Figura 3.23 Voltamogramas de onda quadrada de soluções padrão de molinato em meio de cultura a pH 7,4: A-  $5,0 \times 10^{-6}$ ; B-  $6,0 \times 10^{-6}$ ; C-  $7,0 \times 10^{-6}$ ; D-  $8,0 \times 10^{-6}$  e E-  $9,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. 63
- Figura 3.24 Curva de calibração para soluções de molinato a pH 7,4 usando o método voltamétrico. 64
- Figura 3.25 Cromatograma de uma amostra biológica retirada ao sobrenadante da cultura do consórcio III após 26 horas de incubação a pH 7,4 utilizando-se um caudal de eluente 0,8 mL min<sup>-1</sup> e comprimento de onda 210 nm. 65
- Figura 3.26 Voltamograma de onda quadrada de uma amostra biológica retirada ao sobrenadante da cultura de crescimento do consórcio III após 26 horas de incubação a um pH 7,4 utilizando uma frequência de 150 Hz com um potencial deposição - 0,800 V aplicado durante 10 s. 65
- Figura 3.27 Estudo da biodegradação do molinato ao longo do tempo. perfil de crescimento da cultura do consórcio III (biomassa) (○); perfil de degradação do molinato quantificado por cromatografia (+); perfil de degradação do molinato quantificado por voltametria (□); controlo abiótico quantificado por cromatografia (x); controlo abiótico quantificado por voltametria (△). 66
- Figura 3.28 Comparação dos resultados obtidos na determinação de molinato em amostras biológicas usando o método voltamográfico e o método cromatográfico (HPLC). 68
- Figura 3.29 Cromatograma obtido para a amostra biológica retirada ao sobrenadante da cultura do consórcio III após 46 horas de incubação (pH 7,4) usando um caudal de eluente 0,8 mL min<sup>-1</sup> e a detecção espectrofotométrica a um comprimento de onda de 210 nm. 68
- Figura 3.30 Voltamogramas das amostras biológicas retiradas ao sobrenadante da cultura do consórcio III no tempo: A - 46 e B - 48 horas. pH 7,4, frequência 150 Hz, potencial de deposição -0,800 V durante 10 s. 69

## Índice de tabelas

Tabela 1.1	Composição e formula de estrutura dos tiocarbamatos (Ware, 1994).	6
Tabela 1.2	Propriedades físicas e químicas do molinato (Tomlin, 1997).	7
Tabela 1.3	Classificação de toxicidade de acordo com a EPA (Tomlin, 1997).	11
Tabela 1.4	Critérios para diagnosticar processos de transferência de carga reversíveis.	19
Tabela 1.5	Critérios para diagnosticar processos de transferência de carga irreversíveis.	20
Tabela 1.6	Critérios para diagnosticar processos de transferência de carga quase-reversível.	22
Tabela 2.1	Constituição de 1 litro de solução de macronutrientes (Correia et al., 2001).	31
Tabela 2.2	Constituição de 1 litro de solução de micronutrientes (Correia et al., 2001).	31
Tabela 2.3	Constituição de 1 litro de meio de cultura (Correia et al., 2001).	32
Tabela 3.1	Dados de voltametria cíclica para uma solução de molinato de concentração $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ em meio de cultura com pH 1,9 e força iónica $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ .	44
Tabela 3.2	Equação da recta de calibração e respectivo declive e ordenada na origem.	48
Tabela 3.3	Valores de $i_p$ e $E_p$ obtidos com a técnica de voltametria cíclica para os três picos de oxidação do molinato em acetonitrilo/perclorato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ).	50
Tabela 3.4	Valores de $i_p$ e $E_p$ obtidos com a técnica SWQ para os três picos de oxidação do molinato em acetonitrilo/perclorato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ).	52
Tabela 3.5	Equação da recta de calibração e respectivo declive e ordenada na origem.	53
Tabela 3.6	Dados de voltametria cíclica para uma solução de molinato de concentração $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em meio de cultura com pH 7,4 e $I 0,3 \text{ mol L}^{-1}$ .	59



- Tabela 3.7 Equação da recta e respectivo erro associado ao declive obtido por HPLC para soluções padrão de molinato. 62
- Tabela 3.8 Equação da recta de calibração e respectivo declive e ordenada na origem. 64
- Tabela 3.9 Resultados obtidos na determinação de molinato no sobrenadante da cultura do consórcio III ao longo do tempo usando o método voltamétrico e HPLC. 67

## Abreviaturas e símbolos

$\alpha$	coeficiente de transferência para os processos de redução e de oxidação
A	área da superfície do eléctrodo
A	ordenada na origem
AgCl/Ag	eléctrodo de referência cloreto de prata/prata
B	declive
C	concentração de molinató
CV	voltametria cíclica
D	coeficiente de difusão
E	potencial
$E_d$	potencial de deposição
$E_f$	potencial final
$E_i$	potencial inicial
$E_p$	potencial de pico
$E_{p,a}$	potencial de pico catódico
$E_{p,c}$	potencial de pico anódico
$E_{p/2}$	potencial a meia altura do pico
EPA	Environmental Protection Agency
GC	cromatografia gasosa
HMDE	eléctrodo de mercúrio de gota suspensa
HPLC	cromatografia líquida de elevada eficiência
i	intensidade de corrente eléctrica
I	força iónica
$i_f - i_b$	diferença entre a intensidade de corrente directa e inversa
$i_p$	intensidade de corrente de pico
$i_{p,a}$	intensidade de corrente de pico anódico
$i_{p,c}$	intensidade de corrente de pico catódico
$i_t$	intensidade de corrente de pico total
LD <sub>50</sub>	dose letal mediana

M.A.	Ministério do Ambiente
M.A.R.N.	Ministério do Ambiente e dos recursos naturais
n	número de electrões
$n_{\alpha}$	número de electrões envolvidos
OD	densidade óptica
sa	erro associado à ordenada na origem
sb	erro associado ao declive
SWQ	voltametria de onda quadrada
t	tempo
$t_d$	tempo de deposição
$t_r$	tempo de retenção
UV	ultra violeta
v	velocidade de varrimento
w	frequência
$\mu$	velocidade específica de crescimento
Y	rendimento biológico
X	concentração da biomassa

# **Capítulo 1**

## **Introdução**

Let's get our priorities in perspective... We must feed ourselves and protect ourselves against the health hazards of the World. To do that, we must have agricultural chemicals. Without them, the world population will starve.

Norman E. Borlaug  
1970 Nobel Peace Prize

## 1.1 – Consumo de pesticidas

Desde sempre o Homem se viu confrontado com pragas que afectavam e destruíam as culturas. Os primeiros relatos que descrevem estas catástrofes aparecem na bíblia (antigo testamento), datando dessa época o uso de produtos químicos para combater as pestes. Por exemplo, a primeira estratégia usada para eliminar ervas daninhas, usando para esse efeito cinza e sal, data de 1200 A.C. Homero, o poeta grego, em 1000 A.C. fez referência à aplicação de enxofre para o controlo de pestes. Os romanos em 100 A.C. efectuavam o controlo de ratos, ratazanas e insectos com heléboro (erva besteira). Na China, em pleno século X utilizava-se arsênio para o controlo de insectos. No século XVII, na América do Sul, era aplicado rotenona para paralisar peixes. Em 1860 soluções de cloreto de mercúrio eram utilizadas para eliminar minhocas existentes no solo (Ware, 1994). Contudo, é no século XX, precisamente em 1930, que começa a era dos produtos químicos orgânicos sintéticos, os denominados Pesticidas (Younos et al., 1988).

Pesticida é o termo vulgarmente utilizado, para fazer referência ao grande número de produtos químicos (cerca de 45000) usados para eliminar, controlar ou repelir insectos, ervas daninhas (infestantes), roedores, fungos, caracóis, ácaros, peixes, térmitas etc (Younos et al., 1988).

O uso de pesticidas sintéticos no controlo de pragas iniciou-se após a Segunda Guerra Mundial. As quantidades usadas cresceram extraordinariamente desde então, de tal forma que em 1991 foram utilizadas cerca de 700000 toneladas de pesticidas na Europa, das quais mais de 90% em terras aráveis (cereais, milho, beterraba sacarina, batatas e vegetais) e culturas permanentes (vinhas, olivais e pomares) e os restantes 10% foram usados em pastagens (M.A., 1995).

De acordo com a Direcção Geral da Protecção das Culturas, DGPC, o consumo total Pesticidas em Portugal no ano de 1998 foi de cerca 14000 toneladas, sendo as substâncias mais vendidas os fungicidas, seguindo-se os herbicidas e insecticidas conforme se representa na figura 1.1. Em Portugal as zonas onde se nota uma situação mais preocupante de sobre-exploração e abuso de pesticidas são aquelas onde a densidade populacional é mais elevada e onde se pratica agricultura intensiva, como é o caso do Algarve Litoral, Ribatejo Oeste, Aveiro e Baixo Mondego (M.A., 2000).

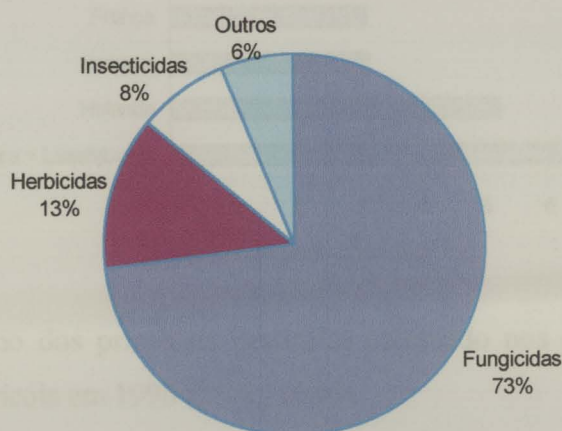


Figura 1.1 – Venda dos principais pesticidas em Portugal em 1998 (M.A., 2000).

No que respeita à comparação com os restantes países europeus quanto à utilização de produtos fitofarmacêuticos, em 1996 Portugal encontrava-se próximo do valor médio europeu, com valores de 3,15 kg/ha e 3,83 kg/ha respectivamente. Há, contudo, que salientar que os produtos fitofarmacêuticos, são sobretudo, utilizados nas culturas horto-frutícolas, de grande representatividade a nível nacional, assim como na vinha e nos pomares, pelo que os valores médios aplicados são superiores aos países onde domina a cultura cerealífera. Este facto contribui para a observação de valores superiores aos verificados na Alemanha e na Dinamarca, mas também nitidamente inferiores aos países que praticam horticultura em estufa como os países de Benelux, conforme se pode observar na figura 1.2 (M.A., 2000).

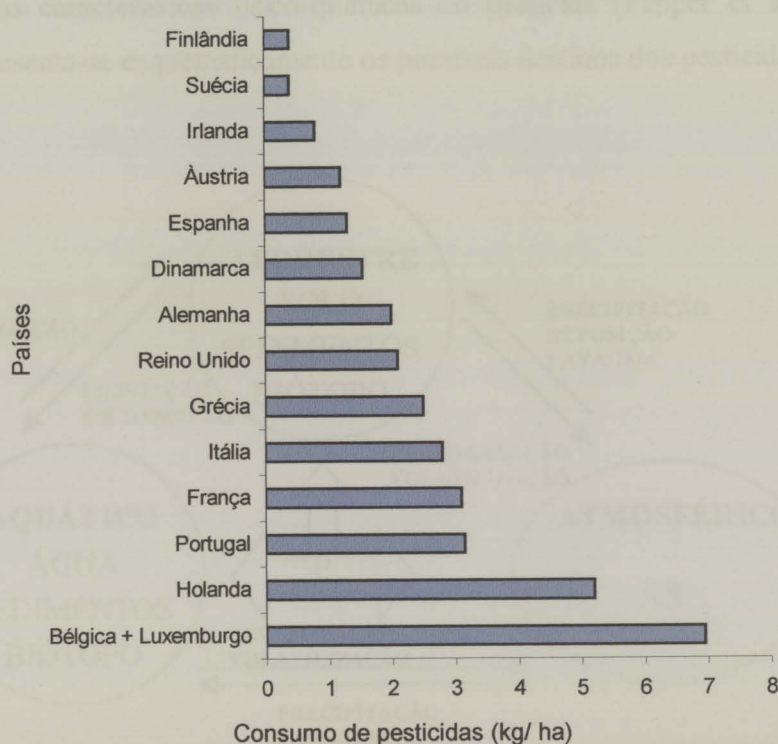


Figura 1.2 – Consumo dos principais pesticidas efectuado nos quinze países da União Europeia por área agrícola em 1996 (M.A., 2000).

## 1.2 – Destino dos pesticidas

Após a sua aplicação às culturas, a fracção do pesticida que é incorporada no solo pode ser absorvido pelas plantas, biodegradado totalmente ou parcialmente por microrganismos dando origem a novos compostos químicos, ou ser lixiviado através do subsolo e contaminar águas subterrâneas em determinados locais (Pepper et al., 1996). Dependendo das propriedades químicas do pesticidas, este poderá permanecer retido no solo, adsorvido a argilas ou lama (M.A.R.N, 1995). Uma fracção destes compostos será perdida por volatilização e/ou evaporação contaminando a atmosfera, enquanto que parte será transportada até às águas superficiais, por precipitação e/ou escorrências, podendo também sofrer fotodegradação.

A distribuição do pesticida por estes vários subsistemas depende das características geomorfológicas do terreno, das condições atmosféricas, das práticas de

aplicação e das características físico-químicas do pesticida (Pepper et al., 1996). Na figura 1.3 representa-se esquematicamente os possíveis destinos dos pesticidas.

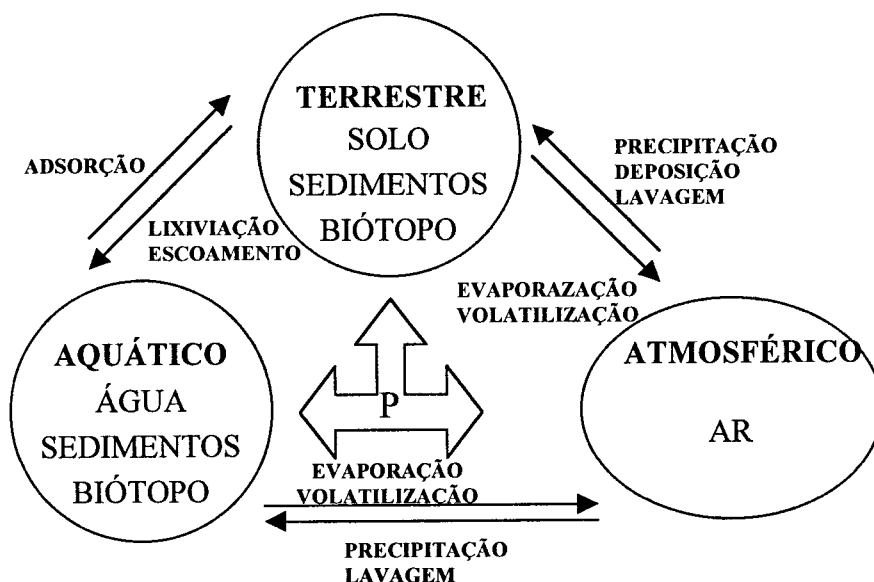


Figura 1.3 – Transferência dos pesticidas no meio ambiente (IARN, 1998).

Os herbicidas, denominação atribuída aos pesticidas cuja especificidade é eliminar ervas daninhas dos campos de cultivo, são largamente utilizados na agricultura, podendo ser usados isoladamente ou associado a fertilizantes ou outros pesticidas.

Quanto ao espectro de acção, os herbicidas podem ser selectivos ou não selectivos. Um herbicida é selectivo quando é tóxico para algumas espécies e tem pouco ou nenhum efeito para outras espécies similares, enquanto que um pesticida não selectivo não actua contra um único tipo de organismo, mas quando aplicado numa cultura elimina toda a vegetação aí existente.

### 1.3 – O molinato

Os tiocarbamatos, são herbicidas sistémicos e selectivos, que contêm enxofre e derivam do ácido tiocarbámico. Estes compostos são utilizados para eliminar ervas daninhas dos campos de cultivo apresentando elevadas pressões de vapor e portanto



tornam-se de fácil volatilização (Ware, 1994). Na tabela 1.1 apresenta-se a fórmula estrutural do ácido tiocarbâmico e dos diversos compostos formados a partir deste ácido.

Tabela 1.1 – Composição e estrutura molecular dos tiocarbamatos (Ware, 1994).

Nome comercial	Nome científico	Estrutura molecular
Ácido tiocarbâmico	Ácido tiocarbâmico	$\text{HS}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}_2$
Butilato	S-etildiisobutiltiocarbamato	$\text{C}_2\text{H}_5\text{S}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{N}\begin{cases} \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \\ \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \end{cases}$
Cicloato	S-etilciclohexaetiltiocarbamato	$\text{C}_2\text{H}_5-\text{S}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{N}\begin{cases} \text{C}_6\text{H}_{11} \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{cases}$
Molinato	S-etilo-N,N-hexametileno-tiocarbamato	$\text{C}_2\text{H}_5\text{S}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{N}\begin{cases} \text{C}_6\text{H}_{12} \\ \text{C}_6\text{H}_{12} \end{cases}$
Tiobencarbe	S-(4-clorofenilmetil)-dietiltiocarbamato	$\text{Cl}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{H}_2\text{CS}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{N}\begin{cases} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{cases}$
Vernolato	S-propildipropiltiocarbamato	$\text{C}_3\text{H}_7\text{S}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{N}\begin{cases} \text{C}_3\text{H}_7 \\ \text{C}_3\text{H}_7 \end{cases}$
EPTC	S-etildipropiltiocarbamato	$\text{C}_2\text{H}_5\text{S}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{N}(\text{C}_3\text{H}_7)_2$
Pebulato	S-propilbutiletiltiocarbamato	$\text{C}_3\text{H}_7\text{S}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{N}\begin{cases} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \text{C}_4\text{H}_9 \end{cases}$

O molinato, S-etilo-N,N-hexametileno-tiocarbamato, é um herbicida selectivo, mundialmente utilizado na eliminação de ervas daninhas (Imai et al., 1986a) especialmente a milhã (*Echinochloa sp.*, *Digitaria sp.* e *Setaria sp.*), que atacam a cultura do arroz (Zeneca, 1999). Em Portugal, este pesticida é aplicado, isolado ou associado a outros pesticidas, em formulações líquidas ou granulares (Bayer, 1995), nos vales dos rios Vouga, Mondego, Tejo, Sado e Guadiana (Machado, 1997), sendo comercializado por várias empresas (Herbex, Sepec, R.P. Agro, Zeneca, Bayer, Sican e Aventis). Em 1999, foram aplicados cerca de 95733 Kg de molinato nos arrozais Portugueses (<http://www.min-agricultura.pt>). Anualmente são aplicados na Califórnia cerca de 700 toneladas deste herbicida (Cochran et al., 1997).

Após ser aplicado ao campo de cultivo, quando as plantas de arroz são ainda pequenas e os campos de cultivo estão cobertos por água, o molinato é absorvido pela raiz da infestante, alterando o metabolismo da erva daninha, interferindo na síntese dos lípidos e proteínas, inibindo a sua respiração e a fotossíntese (Zeneca, 1999), evitando a germinação das sementes e o crescimento dos rebentos e levando a erva daninha à morte (Ware, 1994). Na tabela 1.2 apresentam-se algumas características físicas e químicas do molinato.

Tabela 1.2 – Propriedades físicas e químicas do molinato (Tomlin, 1997).

Massa molecular ( $\text{g mol}^{-1}$ )	187,3
Massa volúmica ( $\text{g cm}^{-3}$ )	1,063 (20° C)
Solubilidade em água ( $\text{mg L}^{-1}$ )	800 (20° C)
Pressão de vapor (mPa)	746 (25° C)
Constante de Henry ( $\text{atm mol}^{-1} \text{m}^3$ )	$1,6 \times 10^{-5}$
Adsorção (Koc)	190
Bioacumulação (Kow)	2,88
Ponto ebulição (°C)	202 (P= 10 mm Hg)
Solventes mais adequados	acetona, 2-propanol, metanol acetonitrilo, etanol, benzeno

Estudos efectuados demonstram que as principais formas de dissipação do molinato, após a sua aplicação ao campo de cultivo, é maioritariamente sob a forma de evaporação (75 a 85 %), e em pequena escala, por fotólise (5 a 10 %), adsorção ao solo e biodegradação (5 a 10 %) (Rajagopal et al., 1984; Mabury et al., 1996; Soderquist et al., 1997).

Como foi referido, o molinato é maioritariamente dissipado sob a forma de evaporação. Este fenómeno ocorre em grande escala devido às propriedades físicas e químicas do molinato e também devido aos extensos lençóis de água que cobrem os arrozais, que facilitam imensamente a volatilização deste pesticida.

Crosby e seus colaboradores em 1983 demonstraram que o molinato não absorve significativamente energia correspondente à radiação ultravioleta, mas é parcialmente degradado por compostos que se formam na água por acção da luz solar.

Para além dos fenómenos de evaporação e de fotodegradação, a concentração de molinato pode diminuir através de processos químicos, envolvendo mecanismos de hidrólise química e oxidação do enxofre, do anel azepino e do grupo etilo (Imay et al., 1982). Estudos efectuados, indicam a presença de sulfóxido de molinato, em águas tratadas com cloro. A presença deste metabolito deve-se à reacção do molinato com o cloro presente em água (Cochran et al., 1997).

Embora os xenobióticos possam ser degradados por processos abióticos (físicos e químicos) (Imay et al., 1986b), a biodegradação é um processo na qual ocorre transformação de compostos orgânicos por acção de organismos vivos, em cultura pura ou em populações mistas (consórcios). A biodegradação de um xenobiótico, em alguns casos conduz à sua total mineralização, ou então à acumulação de produtos intermediários e/ou polimerização com substâncias naturais (Molinari et al., 1992). A biodegradação de um composto químico depende da presença de populações microbianas com capacidade para o degradar, e das condições ambientais, tais como, concentração de oxigénio, pH, temperatura, da presença de nutrientes, e ainda da biodisponibilidade do composto (Chapalamadugu et al., 1992).

Na literatura encontra-se descrito o isolamento de vários tipos de microrganismos, a partir de solos e águas contaminadas com molinato, com capacidade para degradar este herbicida na presença de outras fontes de carbono e de energia (co-metabolismo)

(Carrasco et al., 1992). Alguns exemplos de microrganismos que co-metabolizam o molinato são, o fungo *Fusarium* sp. e principalmente as estirpes bacterianas pertencentes aos gêneros *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Actinobacillus*, *Moraxella* (Imai et al., 1982; Imai et al., 1986a; Imai et al., 1986b; Imai et al., 1986c, Molinari et al., 1992; Daffonchio et al., 1996). A degradação biológica do molinato origina produtos intermediários (metabólitos), tais como, sulfóxido de molinato, hidróxido de molinato e oxo-molinato (Golovleva et al., 1981; Klysheva et al., 1980; Zyakun et al., 1983). Estes intermediários têm sido detectados em ambientes naturais e em meios de cultura experimentais (Carrasco et al., 1987, Carrasco et al., 1992, Ross et al., 1986).

Na figura 1.4 apresenta-se esquematicamente um mecanismo proposto de mineralização do molinato no solo.

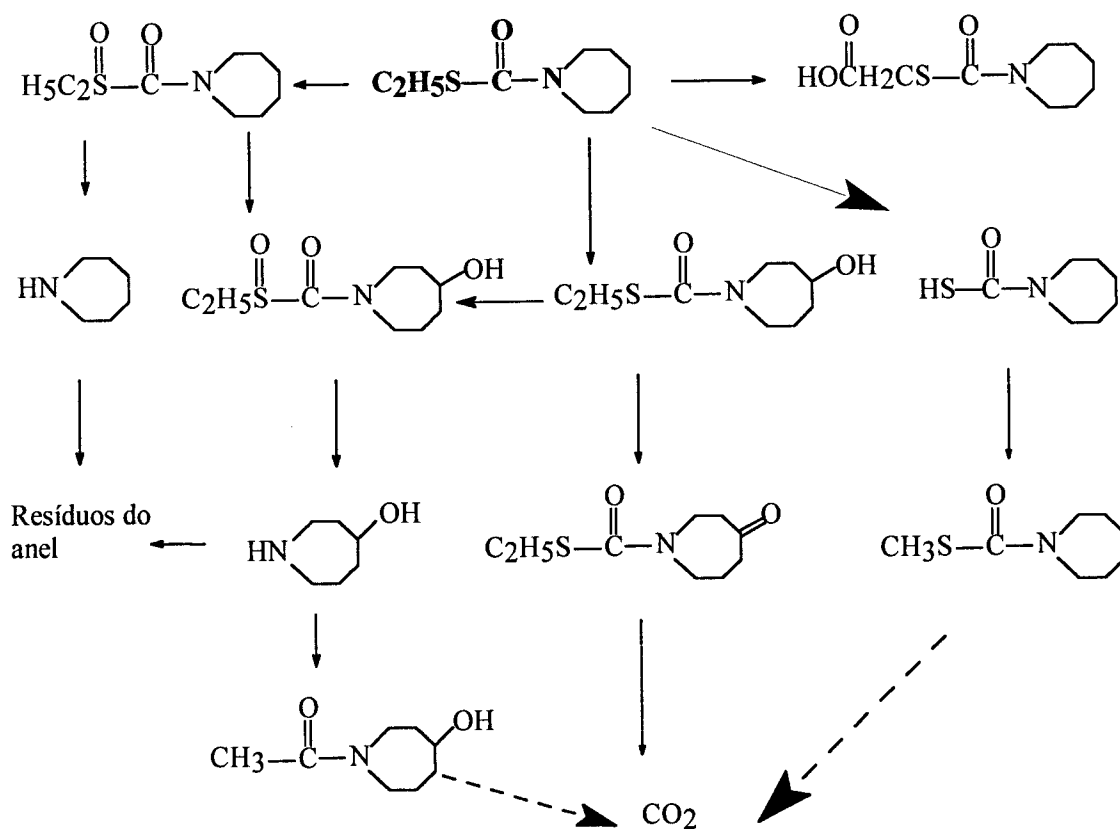


Figura 1.4 – Mecanismo proposto de mineralização do molinato no solo (Rajagopal et al., 1984).

Actualmente existe uma preocupação crescente em torno da utilização de molinato. Embora este pesticida seja um composto pouco persistente no ambiente (Deuel et al., 1978), apresentando tempos de semi vida de cerca de 12 dias (Mabury et al., 1996) dependendo das condições de temperatura e de humidade do solo em que é aplicado (Thomas et al., 1980). No entanto, tem-se observado em vários países contaminação do solo, rios, lagos, aquíferos e águas de abastecimento, com este pesticida e/ou com produtos fitotóxicos, tais como, sulfóxido de molinato, hidróxido de molinato, oxo-molinato (Imay et al., 1988; Ross et al., 1986; Carrasco et al., 1992; Tsuda et al., 1998). Esta contaminação deve-se essencialmente à utilização excessiva deste herbicida, moderada solubilidade em água e fraca adsorção ao solo (Mabury et al., 1996).

Análises efectuadas em águas superficiais, detectaram o pesticida, molinato, em Espanha (80 ppb) (Carrasco et al., 1987), Austrália (42 ppb) (Julli et al; 1995), Japão (24 ppb), Califórnia (100 ppb), e no rio Mississippi e seus afluentes (0,15 a 2,6 ppb). Neste rio também foi detectado um metabolito, 4-oxomolinato (0,2 a 1,65 ppb) (Mabury et al., 1996). Estudos efectuados em solos da Califórnia detectaram molinato (15 ppb) a uma profundidade de 20 cm da superfície (Mabury et al., 1996). Em 1996 foram efectuados em Portugal estudos toxicológicos em amostras de águas recolhidas no rio Sado após a aplicação de molinato nos campos de cultivo, tendo-se confirmado a presença deste herbicida nas águas do rio e o seu efeito tóxico na vida aquática (Cerejeira et al., 1998).

Todos os pesticidas são toxinas, pois o seu objectivo é matar organismos no entanto, nem todos os pesticidas são poluentes. Na realidade, um pesticida só se torna poluente se aparecer em quantidades que ultrapassem o limite estabelecido por lei, quer em águas subterrâneas, águas superficiais, adsorvido ao solo, acumulado na cadeia alimentar ou como resíduo num alimento (Pepper et al., 1996). No entanto, a utilização massiva dos pesticidas implica riscos para a saúde pública, efeitos adversos em espécies não alvo e eventual contaminação do solo, da água e atmosfera, já que se estima que apenas cerca de 0,1 % do pesticida aplicado atinja efectivamente o seu alvo, o que significa a introdução, no meio ambiente de elevadas quantidades destes xenobióticos (Younos et al., 1988).

A toxicidade dos pesticidas é medida através do denominado LD<sub>50</sub> (Dose Letal Mediana), que corresponde à dose administrada em mg de contaminante por kg de

organismo em estudo, para a qual sobrevive metade da população em estudo. De acordo com os critérios da EPA (Environmental Protection Agency de U.S.A.), o grau de toxicidade depende da via de introdução no organismo: oral, dérmica e inalação (tabela 1.3). Segundo estes critérios, o molinato apresenta a classificação de 2 para contaminações orais, sendo por isso muito tóxico, e moderadamente tóxico quando introduzido por via dérmica ou por inalação (Tomlin, 1997).

Tabela 1.3 – Classificação de toxicidade de acordo com a EPA (Tomlin, 1997).

Classificação	Classe	LD <sub>50</sub> para os ratos (mg/ kg)		
		Oral	Dérmica	Inalação
Extremamente Tóxico	1	≤ 50	≤ 200	<0,2
Muito tóxico	2	5-500	200-2000	0,2-2,0
Moderadamente Tóxico	3	500-5000	2000-20000	2,0-20
Pouco tóxico	4	>5000	>20000	>20

Embora o molinato seja um xenobiótico moderadamente tóxico para a maioria dos seres vivos, é muito tóxico para algumas espécies de peixes (Tjeerdema et al., 1988), já que existem relatos de morte massiva de peixes após a aplicação deste tiocarbamato aos campos de cultivo (Ross et al., 1986). Suspeita-se que este pesticida tenha efeitos teratogénicos e neurotóxicos irreversíveis para a saúde pública (Cohran et al., 1997). Sintomas como náuseas, diarreia, dores abdominais, febre, fraqueza e conjuntivite são atribuídos ao consumo de água contaminada com este herbicida (Stevens et al., 1991).

Estudos epidemiológicos efectuados na Califórnia demonstram que a presença deste herbicida em águas contribui para a formação de compostos mutagénicos, pois aumenta o potencial de formação de nitrosocarbamatos no corpo humano (Chapalamadugu et al., 1992).

Estudos toxicológicos efectuados, demonstram ainda que o molinato é facilmente metabolizado pelas células do fígado humano, produzindo sulfóxido de molinato, aumentando assim o potencial de formação de células cancerígenas (Jewell et al., 1999).

Como já foi referido, o molinato pode ser degradado por processos físicos, químicos e biológicos, no entanto, estudos efectuados demonstram que os metabolitos formados por estas vias são muito tóxicos para animais de sangue quente, sendo mais tóxicos e persistentes que o próprio pesticida que lhe deu origem, como é disso exemplo o sulfóxido de molinato (Tjeerdema et al., 1988).

Tendo em conta que o molinato é um potencial contaminante das águas superficiais, aquíferos e solos, com a agravante de ser tóxico formando por vias químicas, físicas e biológicas metabolitos com um grau de toxicidade ainda maior, foi desenvolvido por Nunes e seus colaboradores (2000), um projecto com a finalidade de descontaminar o ambiente recorrendo a processos biológicos.

Com essa perspectiva foram colhidas amostras de solo e água provenientes de uma fábrica Portuguesa produtora de molinato (Herbex), com a finalidade de isolar microrganismos capazes de mineralizar este herbicida.

As amostras colhidas foram enriquecidas em meio de cultura com uma concentração de  $2,7 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> em molinato, sendo este tiocarbamato utilizado como fonte única de carbono e de energia. No final do período de enriquecimento do meio de cultura, obteve-se uma cultura mista que se designou por consórcio I. Efectuando-se o crescimento deste consórcio em meio sólido isolaram-se 45 estirpes bacterianas com morfologias distintas.

De modo a reduzir o número de bactérias envolvidas na biodegradação do molinato, efectuou-se um novo enriquecimento, mas neste caso, do consórcio I em meio de cultura com uma concentração de  $4,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> em molinato, sendo este pesticida utilizado como fonte única de carbono, azoto e de energia. No final do período de enriquecimento, obteve-se uma segunda cultura mista, que se designou por consórcio II. A cultura em meio sólido do consórcio II apresentava unidades formadoras de colónias com cinco morfologias coloniais distintas. Após isolamento e purificação de cada uma destas estirpes microbianas, procedeu-se à sua identificação. Só quatro destas estirpes foram identificadas: *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes sp.* e *Stenotrophomonas maltophilia*. A estirpe não identificada pertence, provavelmente, a um género novo do grupo das bactérias Gram positivas ou a uma nova espécie do género *Brevibacterium*, tendo sido denominada de ON4. Juntando somente as cinco estirpes

atrás referidas, formou-se um novo consórcio capaz de mineralizar o molinato, que se designou por consórcio III.

Na figura 1.5 pode-se observar as células do consórcio III após ter sido efectuado uma coloração de Gram, bem como as morfologias coloniais distintas dos constituintes deste consórcio quando cultivado em meio nutritivo sólido.

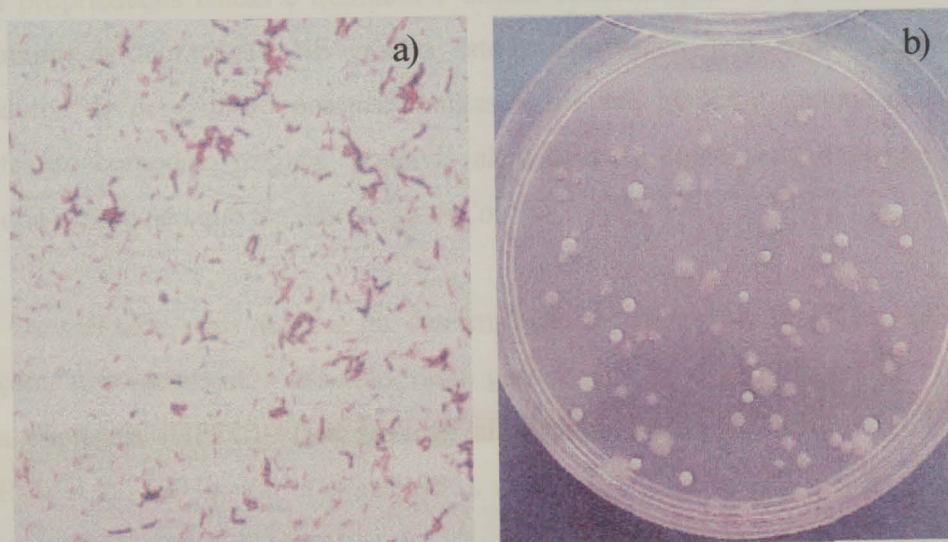


Figura 1.5 – a) Coloração Gram de um esfregaço do consórcio III (microscopia óptica campo claro (1000x); b) Cultura em meio sólido do consórcio III.

Durante este estudo, a quantificação do decréscimo da concentração de molinato ao longo do processo de biodegradação foi efectuado usando a técnica de cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) com um detector de ultravioleta e visível com um comprimento de onda de 210 nm (Correia et al., 2001). No entanto, esta técnica para além de ser dispendiosa, laboriosa tem um tempo de análise que ronda os 20 minutos e tendo em conta que foi necessário efectuar um grande número de análises sentiu-se necessidade de desenvolver uma metodologia analítica alternativa mais rápida e sensível para o doseamento do molinato ao longo do processo de biodegradação.

A metodologia desenvolvida foi baseada em técnica voltamétricas, encontrando-se o processo de estudo, experimental e a descrição detalhadas nesta dissertação.



## 1.4 – Técnicas analíticas para o doseamento de molinato

Para o estudo dos processos de degradação, transformação e transporte de pesticidas, é essencial dispor de técnicas analíticas precisas para os níveis em que estes micropoluentes surgem, no solo, águas superficiais e aquíferos (Redondo et al., 1996). A análise de degradação de um pesticida em amostras ambientais, é por vezes, difícil devido às suas propriedades físicas e químicas e baixas concentrações do pesticida bem como dos produtos de degradação. No entanto, este estudo reveste-se de todo o interesse, pois os produtos de degradação possuem muitas vezes actividades e tempos de semi-vida diferentes do composto original, podendo além disso, e como já foi referido, ser mais tóxico que o pesticida que lhe deu origem (Correia, 1997).

Os métodos mais usados na determinação de pesticidas envolvem técnicas de separação, nomeadamente, cromatografia gasosa (GC), e cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) (Tjeerdema et al., 1988, Puig et al., 1994; Aguillar et al., 1997; Ruiz et al., 1997b; Yarita et al., 1996).

Na literatura encontram-se referências ao uso da técnica de cromatografia gasosa para a quantificação de molinato, tendo sido utilizado vários detectores, tais como, o detector de azoto- fósforo (NPD), o detector de ionização de chama (FID) (Ruiz et al., 1997b), o detector de captura electrónica (ECD) e o detector de espectrometria de massa (MS) (Aguillar et al., 1997). Existem também referências ao uso da cromatografia de fase líquida com detecção por ultravioleta (UV) (Tjeerdema et al., 1988, Correia, 2001).

A maior parte destes métodos impõem preparação prévia de amostras, recorrendo a extracções líquido-líquido, por exemplo, com acetato de etilo (Correia, 2001), ou extracções sólido-líquido utilizando adsorventes do tipo octadecil-sílica ( $C_{18}$ ) (Redondo et al., 1996). Recentemente foi proposta uma técnica baseada em extracção com fluido super crítico (SFE) (Yarita et al., 1996).

Estudos recentes têm apontado a viabilidade da utilização de ensaios imunológicos, como forma alternativa de análise de pesticidas e seus metabolitos, devido

ao seu carácter simples e pouco dispendioso. Estes métodos apresentam baixos limites de detecção, correlacionando-se bem com os métodos de referência existentes (Gee et al., 1988; Li et al., 1989).

Embora as técnicas cromatográficas apresentem bons limites de detecção e boa reprodutibilidade, têm a desvantagem de serem dispendiosas, laboriosas e poluentes. Por isso, têm surgido métodos alternativos para a quantificação de pesticidas, baseados em técnicas voltamétricas, que para além de serem económicas, rápidas e não poluentes, podem ser usadas *in situ*.

Neste sentido surgem vários trabalhos que referem a utilização de eléctrodo de carbono vítreo aplicado ao estudo do comportamento na zona da oxidação de vários pesticidas, nomeadamente, carbamatos.

Recentemente foi proposto um método analítico para dosear molinato em formulações fitofarmacêuticas, utilizando este tipo de eléctrodo e recorrendo à voltametria de onda quadrada, tendo-se verificado que este herbicida é electroquimicamente activo com um potencial de oxidação a + 1,60 V, com um limite de detecção de  $8,7 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  (Brett et al., 1997).

Existem também na literatura vários exemplos do uso de eléctrodos de mercúrio no estudo de processos de redução de pesticidas e o seu doseamento em solos, águas superficiais, aquíferos e produtos agrícolas, nomeadamente, pesticidas pertencentes à família das triazinas, organofosforados, organoclorados e pesticidas contendo o grupo nitro com limites de detecção da ordem dos  $1 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ , sendo muito mais baixo do que nos casos anteriores (Garrido, 2000), no entanto não existem na literatura referências ao estudo da redução do molinato.

Associando as inúmeras vantagens das técnicas electroquímicas à necessidade de desenvolver um método expedito de controlo do molinato ao longo do processo de biodegradação, explorou-se a capacidade de oxidação e de redução do molinato usando técnicas voltamétricas. Por este motivo apresentam-se a seguir, de um modo resumido, algumas definições e conceitos relativos a esta metodologia analítica.

## 1.5 – Técnicas voltamétricas

A voltametria é uma técnica usada como alternativa na análise qualitativa e quantitativa de qualquer composto químico que seja electroactivo, isto é, que possa ser oxidado e/ ou reduzido. Com esta técnica podem ser efectuados estudos fundamentais de processos de oxidação e redução em vários electrólitos, processos de adsorção em diferentes materiais, e mecanismos de transferência electrónica em superfícies de eléctrodos modificados quimicamente.

A voltametria é uma técnica electroquímica em que a intensidade de corrente que flui através de um eléctrodo é medida em função do potencial aplicado a esse eléctrodo.

Os sistemas voltamétricos assentam na utilização de potenciostatos que servem para controlar o potencial aplicado ao eléctrodo de trabalho e permitem a medição da intensidade de corrente que se estabelece numa célula electroquímica constituída por três eléctrodos (figura 1.6).

- Eléctrodo de trabalho (WE), de área superficial reduzida, onde ocorrem os fenómenos electroquímicos que se pretendem estudar.
- Eléctrodo de referência (RE), usado para controlar com rigor o potencial imposto ao eléctrodo de trabalho. Habitualmente utiliza-se o eléctrodo saturado de calomelanos ou o eléctrodo de AgCl/Ag, KCl 3 mol L<sup>-1</sup>.
- Contra-eléctrodo ou eléctrodo auxiliar (SE), utilizado para completar o circuito eléctrico por onde circula a intensidade de corrente resultante.

De entre todas as técnicas disponíveis, foi utilizada neste trabalho a voltametria cíclica (CV), e a voltametria de onda quadrada (SWQ). De seguida serão feitas resumidamente algumas considerações teóricas sobre estas técnicas.

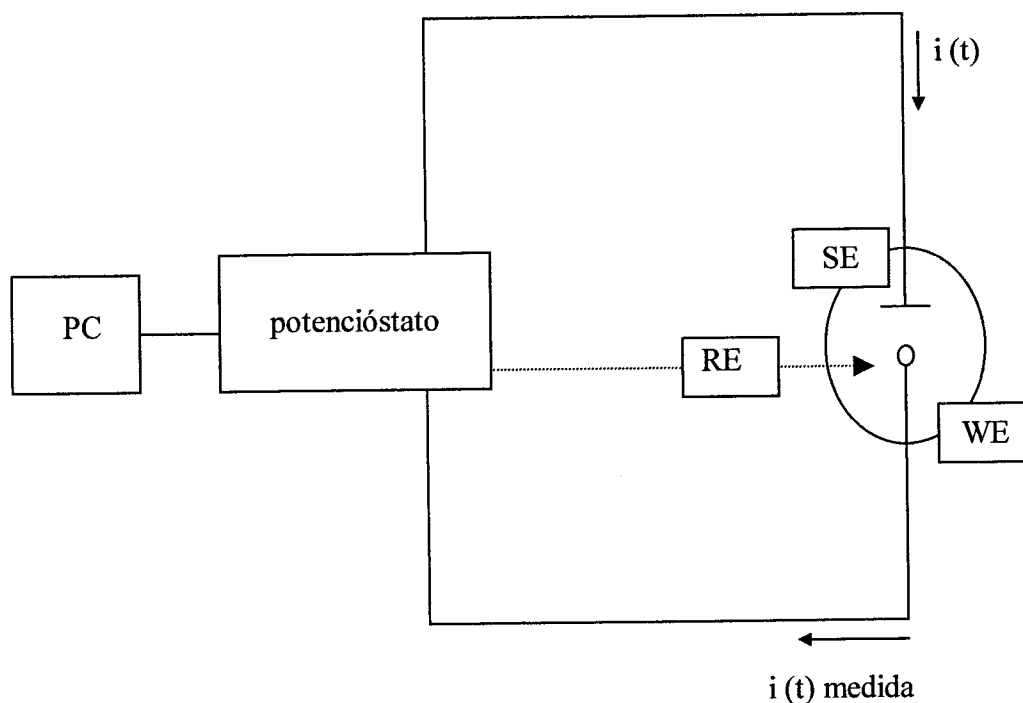


Figura 1.6 – Esquema genérico do controlo potenciostático existente numa célula voltamétrica de três eléctrodos. WE - eléctrodo de trabalho, RE – eléctrodo de referência, SE – eléctrodo auxiliar, PC – computador pessoal.

### 1.5.1 – Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é a técnica normalmente escolhida para se estudar electroquimicamente um composto pela primeira vez. A partir do voltamograma traçado, facilmente se recolhem informações quantos aos potenciais em que ocorrem os processos de transferência de electrões, a identificação de fenómenos de adsorção, determinação de constantes de velocidade, estudo da reversibilidade da reacção redox e o número de electrões transferidos numa reacção.

Na voltametria cíclica, o potencial varia linearmente entre os valores  $E_i$  (potencial inicial) e  $E_f$  (potencial final), a uma velocidade de varrimento constante  $v$  (figura 1.7). Ao ser atingida o valor  $E_{max}$ , a direcção do varrimento é invertida para  $E_{min}$  e depois invertida para  $E_{max}$  e assim sucessivamente.

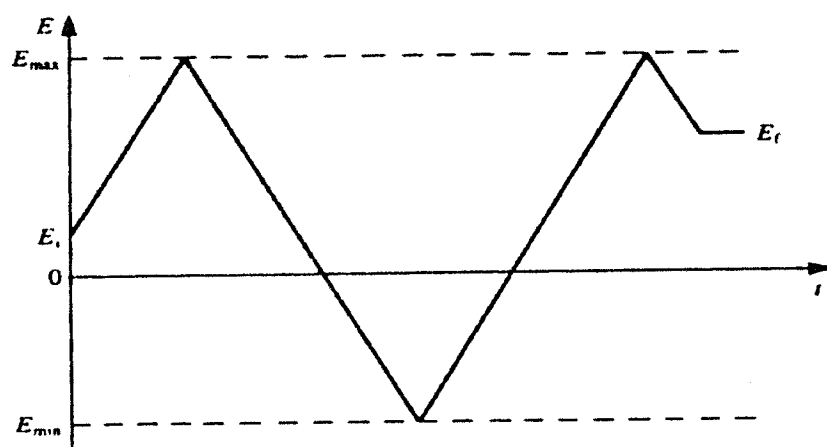


Figura 1.7 – Esquema de aplicação de potenciais, com o tempo, em voltametria cíclica sendo  $E_i$  – potencial inicial,  $E_f$  – potencial final,  $E_{máx}$  – potencial máximo.  $E_{min}$  – potencial mínimo. O sentido do varrimento inicial pode ser positivo ou negativo.

As reacções químicas podem ser classificadas de reversíveis ou irreversíveis. Uma reacção é considerada reversível quando o produto inicial de oxidação ou de redução formado durante o varrimento é respectivamente reduzido ou oxidado no varrimento inverso. Na figura 1.8 apresenta-se um voltamograma cíclico representativo de um processo reversível. Sendo ( $E_{p,a}$ ) o potencial de pico anódico, ( $E_{p,c}$ ) o potencial de pico catódico, ( $i_{p,a}$ ) a intensidade da corrente de pico anódica e ( $i_{p,c}$ ) a intensidade da corrente de pico catódica.

Na tabela 1.4 apresentam-se as condições necessárias para que um sistema electroquímico apresente comportamento reversível.

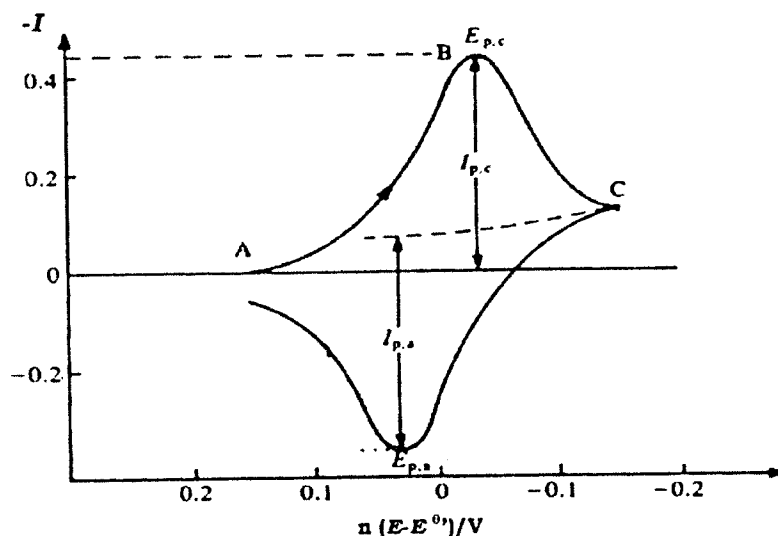


Figura 1.8 – Voltamograma cíclico para uma reacção reversível : (---) corresponde à situação da queda de corrente observada depois do varrimento inverso.

Tabela 1.4 – Critérios para diagnosticar processos de transferência de carga reversíveis.

$E_p$  é independente de  $v$

$$E_{p,a} - E_{p,c} = \frac{57,0}{n} \text{ (mV) e é independente de } v$$

$$\left| E_p - E_{p/2} \right| = \frac{56,6}{n} \text{ (mV)}$$

$$i_p \propto v^{1/2}$$

$$\left| \frac{i_{p,a}}{i_{p,c}} \right| = 1$$

$E_{p/2}$  (potencial do pico a meia altura),  $n$  ( $n^\circ$  de electrões).

$v$  – velocidade de varrimento.

Da tabela anterior, verifica-se, que um dos critérios para a reversibilidade é que  $i_{p,c}$  seja igual  $i_{p,a}$ . Contudo, um aumento da velocidade de varrimento pode conduzir a uma

diminuição da corrente de pico catódica e o sistema parece irreversível. Neste caso, a extensão da irreversibilidade aumenta com o aumento da velocidade de varrimento, verificando-se ao mesmo tempo, uma diminuição da corrente de pico relativamente ao caso reversível e uma separação crescente entre os picos anódicos e catódicos (figura 1.9).

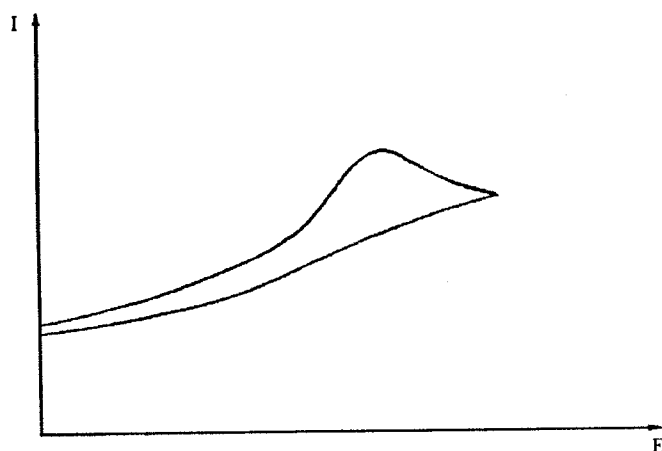


Figura 1.9 – Voltamograma cíclico típico de um processo totalmente irreversível.

Num processo de transferência irreversível, a separação dos picos pode ser tão grande que muitas vezes não se observa corrente no varrimento do potencial inverso. Na tabela 1.5 indicam-se as condições características de um processo irreversível.

Tabela 1.5 – Critérios para diagnosticar processos de transferência de carga irreversíveis.

Não existe corrente no varrimento inverso

$E_p$  desloca - se na direcção catódica  $\frac{30}{\alpha n_{\alpha}}$  (mV) para um aumento de 10 vezes de  $v$

$$\left| E_p - E_{p/2} \right| = \frac{56,6}{n} \text{ (mV)}$$

$$i_p \propto v^{1/2}$$

$\alpha$  - coeficiente de transferência para os processos de redução e de oxidação.

$n_{\alpha}$  - número de electrões envolvidos.

$v$  - velocidade de varrimento.

Para além de reacções reversíveis e irreversíveis, também podem ocorrer reacções quase-reversíveis, que acontecem quando a velocidade relativa da transferência electrónica comparada com a correspondente ao transporte de massa é insuficiente para manter o equilíbrio de Nernst à superfície do eléctrodo, correspondendo a situação para a qual a corrente é controlada simultaneamente por difusão e cinética de transferência da carga. Na figura 1.10 apresentam-se os voltamogramas cíclicos típicos para os três casos existentes. Os critérios de diagnóstico para transferência de carga quase-reversível encontram-se resumidos na tabela 1.6.

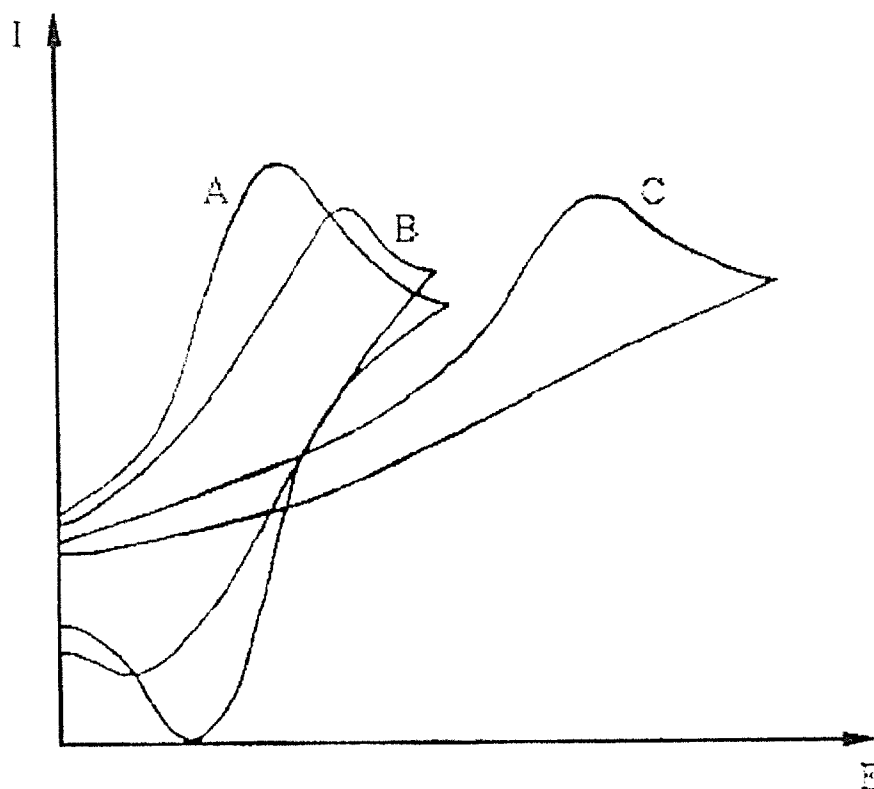


Figura 1.10 – Representação esquemática de voltamogramas cíclicos para sistemas: A - reversível; B - quase-reversível; C - irreversível.



Tabela 1.6 – Critérios para diagnosticar processos de transferência de carga quase-reversível.

---

$|i_p|$  aumenta com  $v^{1/2}$ , mas não é directamente proporcional a  $v^{1/2}$

$$\left| \frac{i_{p,a}}{i_{p,c}} \right| = 1 \text{ quando } \alpha_a = \alpha_c = 0,5$$

$|E_{p,c} - E_{p,a}|$  aproxima-se de  $59/n$  mV para baixos valores de  $v$ , mas aumenta à medida que  $v$  aumenta

$E_{p,c}$  desloca-se no sentido negativo com o aumento de  $v$

---

## 1.5.2 – Voltametria de onda quadrada

Na voltametria de onda quadrada existe, a capacidade de discriminação da intensidade de corrente faradaica relativamente à intensidade da corrente capacitiva. O potencial aplicado é equivalente a um duplo impulso sobreposto a uma rampa de potencial crescente com o tempo. A intensidade de corrente registada é o resultado das intensidades de correntes lidas para cada par de impulsos consecutivos, ou seja, é a soma da intensidade gerada por um varrimento catódico com a intensidade gerada por varrimento anódico. Desta forma aumenta-se a sensibilidade, já que, o sinal é a soma de duas intensidades (figura 1.11).

No desenvolvimento de métodos electroanalíticos para a determinação de pesticidas, é de primordial importância a escolha do material do eléctrodo de trabalho, tendo em vista a zona de potencial que é necessária utilizar para a detecção destes compostos. Neste trabalho foi utilizado um eléctrodo sólido e um eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, dos quais serão feitas referências teóricas.

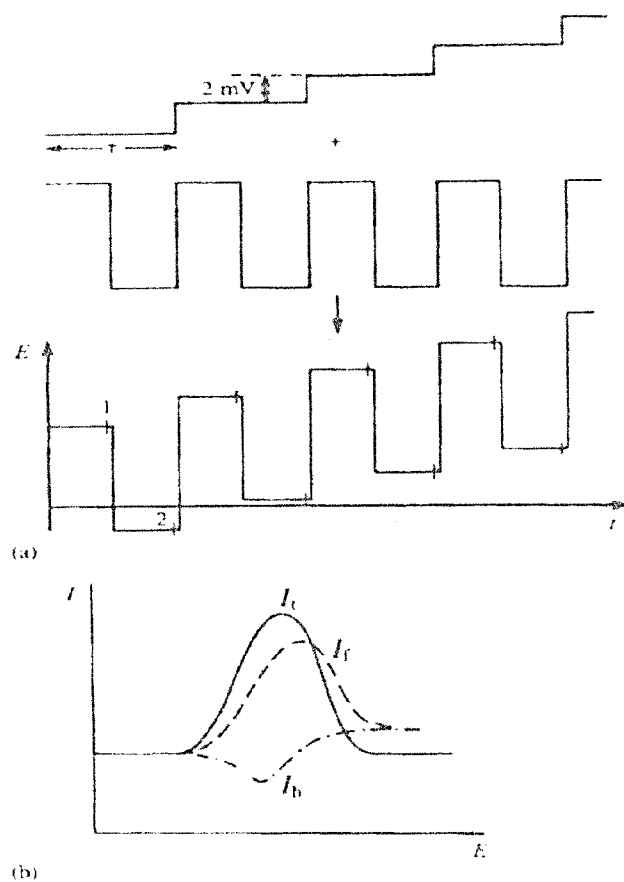


Figura 1.11 – Voltametria de onda quadrada. a) Esquema de aplicação de potenciais: soma de uma escada e de uma onda quadrada, b) perfil voltamétrico de  $i$  vs.  $E$ .

### 1.5.3 – Eléctrodos sólidos

Os eléctrodos sólidos podem ser constituídos por diversos materiais: platina, ouro, níquel, carbono, etc. No entanto, o eléctrodo de carbono vítreo, devido às suas propriedades electrocatalíticas, é frequentemente o mais utilizado para monitorizar reacções de oxidação electroquímica. O intervalo de actividade electroquímica do eléctrodo de carbono vítreo é dependente do electrólito de suporte e do estado da sua superfície. No entanto é comum observar-se um intervalo de trabalho de cerca de 3 V, direccionado na maior parte das vezes, para a zona da oxidação.

### 1.5.4 – Eléctrodo de mercúrio

Neste tipo de eléctrodos o mercúrio encontra-se armazenado dentro de um reservatório fechado, mantido sob pressão de azoto. O fluxo de mercúrio pelo capilar é controlado através de um agulha de aço que se pode movimentar longitudinalmente relativamente ao eixo do eléctrodo, obstruindo ou desobstruindo a passagem de mercúrio pelo capilar. O movimento da agulha é impulsionado por um diagrama que responde com movimentos ascendentes ou descendentes ao disparo de uma electroválvula, controlada pelo sistema electroquímico. Este tipo de eléctrodo apresenta boa repetibilidade da área de gota de mercúrio e é facilmente automatizável. Na figura 1.12 apresenta-se um esquema do eléctrodo de mercúrio.

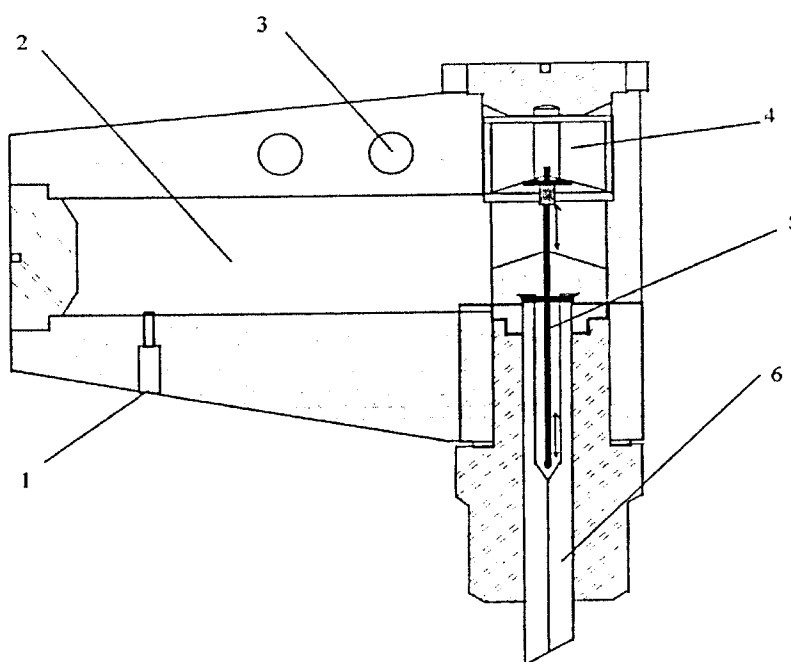


Figura 1.12 – Esquema do eléctrodo de mercúrio multimodo: 1 – contacto eléctrico para ligação do eléctrodo ao equipamento electroquímico; 2 – depósito de mercúrio; 3 – ligação do gás inerte (azoto) sob pressão; 4 – diagrama que faz movimentar a agulha de aço; 5 – agulha de aço que pode obstruir a passagem de mercúrio pelo capilar; 6 – capilar de vidro.

Na análise voltamétrica o transporte de massa da espécie electroactiva para a superfície do eléctrodo pode ocorrer por três mecanismos diferentes – difusão, migração e convecção sendo conveniente minimizar o efeito da migração e da convecção.

A minimização da migração é conseguida através da adição à solução a analisar de um electrólito de suporte, a minimização do transporte de massa por convecção é conseguida evitando a agitação da solução durante o ensaio voltamétrico.

Para além da difusão é muito comum ocorrer processos controlados por adsorção de compostos orgânicos na superfície do eléctrodo. Este efeito (adsorção) é no entanto mais acentuado quando se utiliza o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, pelo facto do ensaio se realizar numa só gota de mercúrio, podendo-se estender mesmo a espécies metálicas.

Embora este fenómeno ainda não esteja muito bem estudado a nível teórico, há autores que defendem o fenómeno da adsorção como sendo o resultado da reacção electroquímica em que o produto formado permanece adsorvido no eléctrodo. Neste caso o voltamograma formado em onda quadrada apresenta o denominado quase reversível.

Na figura 1.13 apresenta-se um voltamograma representativo de uma situação controlada por adsorção.

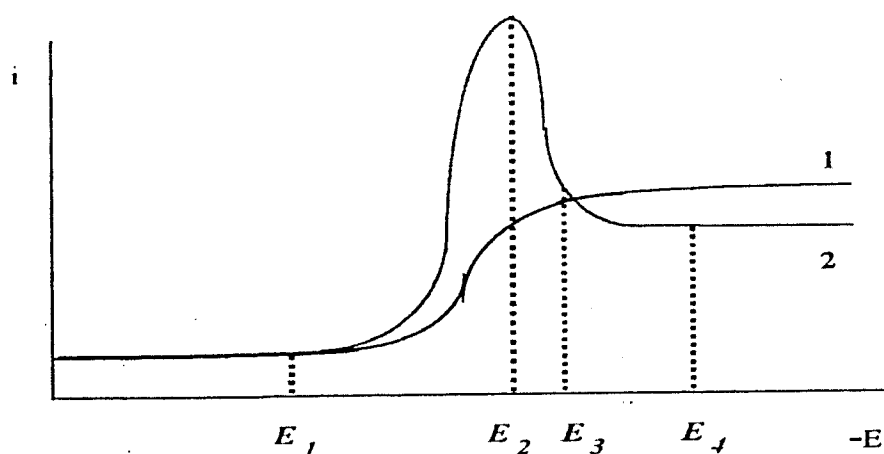


Figura 1.13 - Representação esquemática de um voltamograma na ausência (1) de adsorção e na presença (2) de adsorção.

## **Capítulo 2**

### **Parte experimental**

## 2.1 - Introdução

Neste capítulo será feita uma descrição detalhada dos materiais, reagentes, equipamento e metodologias usadas ao longo do trabalho experimental desenvolvido.

Começa-se por descrever o procedimento experimental efectuado no estudo da cinética da biodegradação do molinato. A biodegradação foi realizada por um consórcio de cinco bactérias, designado por consórcio III. Este consórcio foi incubado num meio mineral no qual o pesticida era a única fonte de carbono, azoto e energia. De forma a comprovar e quantificar o decréscimo da concentração de molinato, foram colhidas amostras ao longo do tempo as quais foram analisadas por dois métodos analíticos distintos: um método electroquímico desenvolvido neste estudo e outro, o método cromatográfico de comparação.

Assim, são também descritas as condições analíticas estabelecidas quando se utilizam técnicas voltamétricas de controlo do molinato. Indica-se de igual modo as condições de operação do método de comparação utilizado na avaliação da qualidade dos resultados fornecidos pela metodologia proposta.

## 2.2 - Equipamento

Para esterilização do material de vidro usou-se um autoclave e uma estufa da marca Selecta modelo 210.

As inoculações e crescimento de bactérias foram efectuadas numa incubadora com agitação orbital da marca Gallenkamp.

O crescimento celular foi seguido por espectrofotometria. A densidade óptica das amostras colhidas ao longo do processo de biodegradação foi medida num espectrofotómetro de ultravioleta marca Philips modelo PU8620. As amostras foram colocadas em cuvetes de plástico.

Para centrifugar as amostras usaram-se centrífugas de diferentes capacidades de acordo com o volume de amostra: para amostras de volume inferior a 2 mL usou-se uma centrífuga de marca Eppendorf modelo 5410 e tubos tipo Eppendorf; para amostras de

volume superior a 2 mL usou-se uma centrífuga da marca Beckman, modelo Avanti™ J25.

As determinações voltamétricas foram efectuadas num potenciostato da marca Ecochimie/Autolab, Holanda, modelo PSTAT 10 com sistema de aquisição e tratamento de dados GPES 3, acoplado a um sistema de eléctrodos da marca Metrohm, modelo 663VA ( figura 2.1).

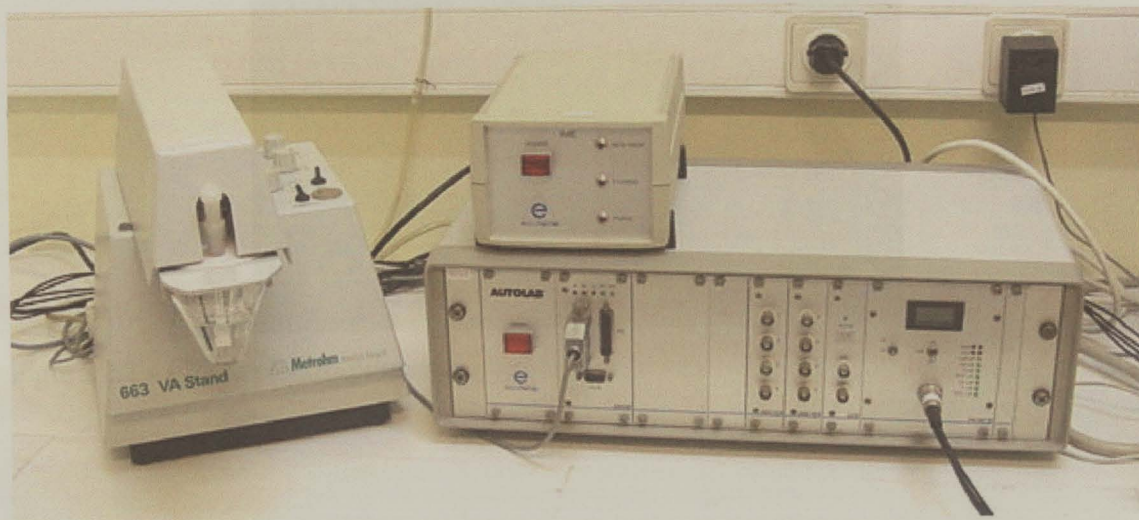


Figura 2.1 – Equipamento usado nas determinações voltamétricas.

Para os ensaios voltamétricos foi usada uma célula de vidro (figura 2.2) com um só compartimento onde é possível fazer circular um gás inerte, neste caso azoto (qualidade 5.1), de modo a desarejar as soluções e evitar a interferência electroquímica do oxigénio aí existente ou então com a função única de homogeneizar as soluções. A célula é constituída por três eléctrodos da marca Metrohm:

a) eléctrodos de trabalho:

a<sub>1</sub>- carbono vítreo de 3 mm de diâmetro (6.1204.000) (figura 2.3)

a<sub>2</sub>- mercúrio de gota suspensa (6.1246.0200) (figura 2.4)

b) eléctrodo de referência de Ag / AgCl / KCl (3 mol L<sup>-1</sup>) (6.0728.000)

c) eléctrodo auxiliar de carbono vítreo de 2 mm de diâmetro (6.1247.000)



Figura 2.2 - Célula electroquímica.

No início de cada determinação voltamétrica, a superfície do eletrólito de trabalho de carbono vítreo foi submetida a uma limpeza mecânica, realizando-se um polimento numa emulsão com alumina de 0,3  $\mu\text{m}$  de granulometria, tamalada com água, até se obter uma superfície opalinada. Em seguida o eletrólito foi lavado apenas com água de alta pureza.

Após se ter efetuado o condicionamento electroquímico do carbono vítreo foi submetido a uma limpeza mecânica, realizando-se um polimento numa emulsão com alumina de 0,3  $\mu\text{m}$  de granulometria, tamalada com água, até se obter uma superfície opalinada. Em seguida o eletrólito foi lavado apenas com água de alta pureza.

O mercúrio utilizado foi proveniente da Faculdade de Ciências da Universidade de Coimbra, sendo a qualidade de operações que se realizou um instrumento químico com

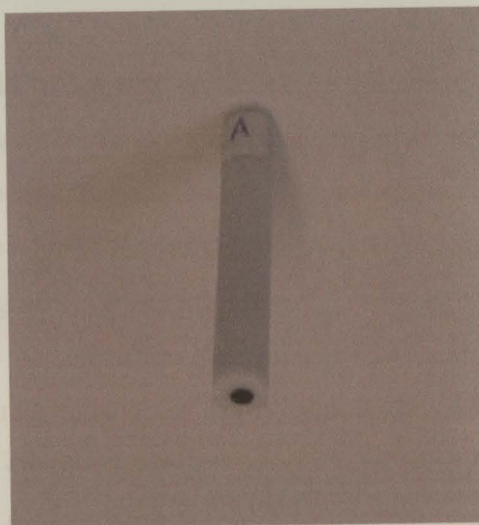


Figura 2.3 – Eléctrodo de trabalho de carbono vítreo.



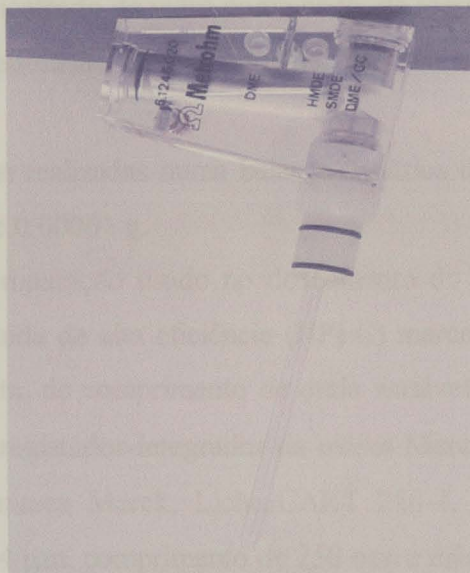


Figura 2.4 – Eléctrodo de trabalho de gota de mercúrio.

No início de cada determinação voltamétrica, a superfície do eléctrodo de trabalho de carbono vítreo foi submetida a uma limpeza mecânica, realizando-se um polimento numa camurça com alumina de  $0,3 \mu\text{m}$  de granulometria, humedecida com água, até se obter uma superfície espelhada. Em seguida o eléctrodo foi lavado apenas com água de elevada pureza.

Após se ter efectuado a limpeza mecânica, o eléctrodo de carbono vítreo foi condicionado electroquimicamente a um potencial negativo de  $-1,5 \text{ V}$  durante  $1 \text{ s}$  (Garrido, 2000). Quer a limpeza mecânica quer o condicionamento electroquímico foram efectuados sempre, entre dois voltamogramas consecutivos. No caso do eléctrodo de mercúrio, entre dois voltamogramas consecutivos ocorria sempre a renovação da gota.

O mercúrio utilizado no eléctrodo de trabalho foi cedido pelo laboratório da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, depois de purificado através de uma sequência de operações que envolveu sucessivamente uma filtração prévia do mercúrio, um tratamento químico com ácido nítrico  $3 \text{ mol L}^{-1}$ , lavagem com água para remover o excesso de ácido nítrico, secagem do mercúrio e destilação a pressão constante.

As medições de pH foram realizadas num potenciómetro da marca Metrohm modelo 632, usando um eléctrodo de vidro combinado, da mesma marca.

Para facilitar a dissolução dos compostos, usou-se um banho de ultra-sons da marca Crest.

As pesagens foram realizadas numa balança analítica da marca Sartorius, modelo BP211D, com precisão de 0,00001 g.

No método de comparação usado no doseamento do molinato recorreu-se a um cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência (HPLC) marca Knauer, com um detector de absorção de ultravioleta, de comprimento de onda variável, um injector de volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$  e um registador-integrador da marca Merck-Hitachi, modelo D-2500. A coluna usada foi da marca Merck, LichroCART 250-4, Supersphere<sup>R</sup> RP-18, com tamanho de partículas de 4  $\mu\text{m}$ , comprimento de 250 mm e diâmetro 4 mm.

## 2.3 - Material de uso geral

O material de vidro utilizado era da classe A ou equivalente sendo, em alguns casos, submetido a tratamento prévio por imersão numa solução de ácido nítrico (1:1) e lavado posteriormente com água desionizada.

De modo a não permitir contaminações, o material de vidro usado em ensaios microbiológicos foi esterilizado em autoclave ou em estufa.

Para medição rigorosa de volumes foram usadas pipetas de vidro graduadas de classe A esterilizadas, de diferentes capacidades, e micropipetas de volume regulável da marca Gilson, modelos, P100, P200, P1000, P5000 com capacidade máxima de 100, 200, 1000 e 5000  $\mu\text{L}$ , respectivamente.

## 2.4 - Preparação de soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de qualidade p.a. ou equivalente e com água de elevada pureza, obtida a partir de sistemas do tipo Millipore Mili-Q (condutividade  $<0,1\mu\text{S cm}^{-1}$ ).

As soluções usadas em ensaios de microbiologia necessitaram de cuidados de esterilização e de assepsia.

O meio de cultura, era composto por 4 soluções: solução de macronutrientes, solução de micronutrientes, solução de cloreto de cálcio e solução tampão de fosfato.

A solução denominada de macronutrientes foi preparada por dissolução de cloreto de sódio, cloreto de magnésio e cloreto de ferro(II) em água de elevada pureza de acordo com as quantidades indicadas na tabela 2.1.

Tabela 2.1 - Constituição de 1 litro de solução de macronutrientes (Correia et al., 2001).

	Massa (g)
NaCl	73,65
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	23,35
FeCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,55

Para a solução designada de micronutrientes pesaram-se diferentes massas de vários sais (tabela 2.2), os quais foram dissolvidos em água de elevada pureza na presença de 1,3 mL de ácido clorídrico (25 %).

Tabela 2.2 - Constituição de 1 litro de solução de micronutrientes (Correia et al., 2001).

	Massa (g)
ZnCl <sub>2</sub>	0,070
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,100
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,062
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,190
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,017
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,024
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,036

A solução tampão de fosfato foi obtida por mistura de 500 mL de solução aquosa de diidrogenofosfato de potássio de concentração  $0,365 \text{ mol L}^{-1}$  com 500 mL de uma solução aquosa de hidrogenofosfato de sódio  $0,983 \text{ mol L}^{-1}$  até se obter um pH 7,4.

A solução de cloreto de cálcio foi preparada dissolvendo 1,47 g deste composto em 50 mL de água destilada.

Para os ensaios de biodegradação as soluções preparadas de macronutrientes, micronutrientes, tampão fosfato e cloreto de cálcio foram esterilizadas em autoclave a  $121^\circ\text{C}$ , à pressão de 1,20 bar durante 15 minutos e mantidas a  $+ 4^\circ\text{C}$  num frigorífico.

A partir das soluções anteriormente descritas preparou-se o meio de cultura segundo as proporções indicadas na tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Constituição de 1 litro de meio de cultura (Correia et al., 2001).

	Volume (mL)
Água destilada estéril	972
Cloreto de cálcio	1
Macronutrientes	6
Micronutrientes	1
Tampão fosfato	20

Para preparar um litro de meio de cultura com uma concentração em molinato de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , adicionou-se  $176 \mu\text{L}$  deste pesticida puro, usando uma ponta estéril e uma micropipeta. Deixou-se o meio de cultura a agitar durante 18 horas, por forma a solubilizar completamente o molinato. O meio de cultura contendo molinato foi mantido no frigorífico a  $+ 4^\circ\text{C}$  até à sua utilização.

Para a realização de experiências de voltametria preparou-se uma solução  $5,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> de molinato em acetonitrilo, por pesagem rigorosa deste herbicida numa balança analítica. A utilização do solvente orgânico teve como objectivo garantir a dissolução completa do molinato. Esta solução foi mantida ao abrigo da luz a + 4°C. Desta solução foi medido um volume rigoroso, o qual foi adicionado a 25,00 mL de electrólito de suporte, colocado na célula electroquímica de modo a que a concentração da solução resultante, calculada rigorosamente, se aproximasse do valor pretendido para a técnica utilizada.

Para os estudos do comportamento electroquímico do molinato em soluções aquosas usou-se meio de cultura como electrólito de suporte, fazendo variar o pH no intervalo de 1,9 e 11,0 por adição de solução de ácido nítrico ou ácido clorídrico a 25% (v/v) e hidróxido de sódio de concentração 1 mol L<sup>-1</sup>. A força iónica foi sempre ajustada a 0,3 mol L<sup>-1</sup> (Garrido, 2000) por adição de nitrato de potássio ou cloreto de potássio.

Nos ensaios em meio orgânico o acetonitrilo foi usado como solvente, e como electrólito utilizou-se uma solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> de perclorato de sódio em acetonitrilo.

## 2.5 – Procedimentos gerais das metodologias utilizadas

### 2.5.1 – Biodegradação do molinato

#### 2.5.1.1 – Conservação do consórcio bacteriano III

De modo a garantir a preservação do consórcio bacteriano III, foram congeladas à temperatura de -80°C aliquotas de 500 µL de células bacterianas homogeneizadas em glicerol a 15 % (v/v).

Sempre que foi necessário procedeu-se ao descongelamento das células bacterianas. Transferiu-se o conteúdo de um tubo de criopreservação para 20 mL de meio mineral com molinato ( $4 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>). A cultura foi incubada à temperatura de 30°C, 150 rpm, durante 5 dias. Após este período de incubação transferiu-se para um meio de cultura fresco (5% v/v de inóculo). Este procedimento foi realizado por duas vezes de

modo a garantir que o glicérol se fosse dissipando e não estivesse presente na última cultura.

### 2.5.1.2 – Preparação da cultura de inóculo

Para a preparação da cultura de inóculo, o consórcio III foi transferido para 30 mL de meio de cultura (10% v/v de inóculo) contendo molinato de concentração  $4 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. Esta cultura foi preparada num frasco tipo Erlenmeyer de tampa roscada com vedante de teflon, e incubada durante dois dias a 30°C e a 150 rpm.

### 2.5.1.3 – Estudo cinético da biodegradação do molinato

Transferiu-se 20 mL da cultura de inóculo para um erlenmeyer de 1 litro, contendo 300 mL de meio cultura e molinato na concentração  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. A cultura foi incubada a 30°C e 150 rpm. Para estudar a cinética da biodegradação do molinato, colheram-se amostras no tempo inicial e de 2 em 2 horas durante 2 dias. Durante as 14 primeiras horas pipetaram-se 4 mL de amostras para tubos tipo *Eppendorf* tendo-se lido a densidade óptica da cultura num espectrofotómetro de UV/visível a um comprimento de onda de 610 nm, sendo posteriormente a suspensão de células centrifugada a 14000 rpm (*Eppendorf*) durante 8 minutos. No final da centrifugação transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo *Eppendorf* devidamente identificado. Após um período de incubação de 14 horas, pipetaram-se 12 mL de amostra para um tubo de centrifuga tendo-se lido a densidade óptica das amostras, sendo posteriormente a cultura centrifugada a 75600 g (*Beckman*) durante 12 minutos, a uma temperatura de 4°C. Os sobrenadantes foram guardados em frascos de plástico envoltos em parafilme ou em tubos tipo *Eppendorf* a -30°C até serem analisados por HPLC e por voltametria.

Como controlo abiótico, foi utilizado meio de cultura não inoculado, mas preparado e incubado nas mesmas condições. Deste controlo, foram retiradas 2 amostras, uma no início da experiência (tempo zero), outra ao fim de 48 horas. Estas amostras

foram centrifugadas a 14000 rpm durante 8 minutos. Os sobrenadantes foram guardados em tubos tipo *Eppendorf* a  $-30^{\circ}\text{C}$  até serem analisados por HPLC e voltametria.

### 2.5.2 – Voltametria cíclica

Os voltamogramas cíclicos realizados em eléctrodo de trabalho de carbono vítreo para soluções de molinato foram traçados para o intervalo de potenciais compreendido entre 1,0 V e 2,0 V para soluções aquosas e entre 1,00 V e 3,00 V em meio de acetonitrilo, usando velocidades de varrimentos entre  $20\text{ mV s}^{-1}$  a  $300\text{ mV s}^{-1}$ .

Os estudos de redução, no eléctrodo de mercúrio, foram efectuados em soluções aquosas de molinato de concentração  $8,0 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ . O varrimento foi efectuado entre  $-0,700\text{ V}$  e  $-0,150\text{ V}$ , fazendo variar as velocidades entre  $20\text{ mV s}^{-1}$  e  $600\text{ mV s}^{-1}$ .

### 2.5.3 – Voltametria de onda quadrada

Nas experiências efectuadas com eléctrodo de carbono vítreo, a voltametria de onda quadrada foi aplicada com uma amplitude de impulso de 50 mV e incrementos de 1 mV. As curvas de calibração foram obtidas sempre a uma frequência de 50 Hz (Garrido, 2000). Nestas condições registaram-se os voltamogramas no intervalo de potenciais compreendidos entre 1,00 V e 2,00 V para soluções aquosas, e entre 1,00 V a 3,00 V para soluções preparadas em acetonitrilo. Traçaram-se curvas de calibração fazendo variar as concentrações de molinato entre  $5,0 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$  e  $9,5 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ .

Usando eléctrodo de mercúrio, procedeu-se à optimização das condições voltamétricas no que diz respeito à frequência, potenciais e tempos de deposição.

As curvas de calibração foram obtidas para soluções aquosas de molinato de concentrações variáveis entre  $5,0 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$  e  $9,0 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$ .

#### 2.5.4 - Método cromatográfico de comparação

Na quantificação do molinato pelo método de comparação (Correia, 2001), em que se usa a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Tjeerdema et al., 1988) com detecção por espectrofotometria de ultravioleta, começou-se por preparar o eluente. Para isso a água destilada foi filtrada através de filtros de porosidade 0,45  $\mu\text{m}$  (Schleicher & Schuell). Um dado volume da água filtrada foi adicionado ao metanol (Lichrosolv) de modo a obter uma mistura 20/80 (v/v). A solução resultante foi desgaseificada com hélio. O caudal de eluente usado foi de 0,8  $\text{mL min}^{-1}$ , para o qual a pressão na coluna não deveria ultrapassar os 350 bar.

Para traçar a curva de calibração em HPLC, preparou-se uma solução de concentração rigorosa  $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de molinato em meio de cultura. A partir da solução anterior, prepararam-se soluções diluídas de concentrações entre  $1,0 \times 10^{-6}$  e  $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . O volume de padrão injectado foi de 20  $\mu\text{L}$  e a detecção espectrofotométrica foi efectuada a 210 nm. Entre 2 injeções consecutivas a seringa foi lavada várias vezes com acetona e posteriormente com água de elevada pureza.

As amostras a analisar foram descongeladas à temperatura ambiente, e injectadas a partir da solução mais diluída para a mais concentrada. Dependendo da concentração do pesticida na amostra original, foi necessário realizar diluições da amostra concentrada, para a colocar na gama de concentrações da curva de calibração utilizada em HPLC.

#### 2.5.5 – Cinética de degradação de molinato

A velocidade específica de crescimento do consórcio bacteriano III, foi calculada durante a fase de crescimento exponencial.

A velocidade de degradação do molinato foi calculada a partir da equação (2.1), sendo C a concentração de molinato,  $\mu$  a velocidade de crescimento específica do consórcio III, Y o rendimento biológico em biomassa e  $X_0$  a concentração da biomassa no tempo inicial.



$$-\frac{dC}{dt} = \frac{X_0 \mu}{Y} e^{\mu t} \quad (2.1)$$

Integrando a equação 2.1 entre  $t = 0$  e  $t$  ( $C=C_0$  para  $t=0$ ), obtém-se a equação 2.2. Esta expressão foi usada para ajustar os valores experimentais obtidos e a derivada de  $C$  em relação a  $t$  foi tratada de modo a obter a velocidade de degradação de molinato ( $-\frac{dC}{dt}$ ).

$$C = C_0 - \frac{X_0}{Y} (e^{\mu t} - 1) \quad (2.2)$$

A degradação específica do molinato foi determinada segundo a equação 2.3, em que  $X$  é a concentração da biomassa no instante  $t$ .

$$\frac{1}{X} \left( -\frac{dC}{dt} \right) \quad (2.3)$$

A biomassa ( $\text{mg L}^{-1}$ ) foi calculada a partir da equação (2.1) determinada laboratorialmente (Correia, 2001).

$$\text{Biomassa (mg L}^{-1}\text{)} = 442,62 \times \text{D.O.} \quad (2.4)$$

## 2.6 – Reagentes

Acetona	Merck
Acetonitrilo	Merck
Ácido bórico	Riedel-de-Haen
Ácido clorídrico	Merck

Ácido nítrico	Merck
Alumina	BDH Chemical Ltd.
Azoto	Linde Sogás
Cloreto de cálcio	Merck
Cloreto de cobalto diidratado	Merck
Cloreto de cobre(II) diidratado	Merck
Cloreto de Ferro (II)tetraidratado	Merck
Cloreto de Magnésio hexaidratado	Merck
Cloreto de Manganês tetraidratado	Merck
Cloreto de Niquel hexaidratado	Merck
Cloreto de potássio	Merck
Cloreto de Sódio	Merck
Cloreto de Zinco	Merck
Diidrogenofosfato de potássio	Merck
Etanol	Merck
Hidrogenofosfato de sódio	Riedel-de-Haen
Hidróxido de sódio	Merck
Metanol	Merck
Molibdato de sódio diidratado	Merck
Molinato	Herbex
Molinato	Riedel-de-Haen
Nitrato de potássio	Merck
Perclorato de sódio	Fluka AG

## **Capítulo 3**

### **Resultados e Discussão**

### 3.1 - Introdução

O objectivo do trabalho descrito neste capítulo foi estudar a capacidade electroactiva do molinato de modo a avaliar a possibilidade de usar técnicas voltamétricas para dosear o pesticida ao longo do processo de biodegradação, e apresentar assim um método analítico alternativo, selectivo, sensível, mais rápido, mais económico, menos poluente e possível de se utilizar *in situ*.

De facto, apesar de serem conhecidos alguns resultados da reacção de oxidação do molinato em solução aquosa num eléctrodo de carbono vítreo (Garrido, 1999), pretendeu-se alargar o estudo investigando a influência da natureza do solvente e ainda o efeito de variações no electrólito de suporte. Por outro lado, explorou-se a capacidade de redução do pesticida, usando um eléctrodo de mercúrio de gota suspensa. Compararam-se os sinais analíticos obtidos com diferentes técnicas voltamétricas de modo a seleccionar a metodologia analítica mais eficiente a implementar no controlo do molinato.

### 3.2 - Oxidação do molinato em solução aquosa

#### 3.2.1- Influência do pH

O estudo do comportamento electroquímico do molinato utilizando a voltametria de onda quadrada, foi efectuado em solução aquosa para um intervalo de pH compreendido entre 1,9 e 7,4 unidades. As soluções tampão eram constituídas por meio de cultura, e o ajuste de pH e força iónica (I) foram efectuados adicionando ácido nítrico ou ácido clorídrico e nitrato de potássio ou cloreto de potássio, respectivamente. Como se pode observar na figura 3.1 a evolução do solvente (solução electrolítica) ocorre a potenciais mais positivos quando se usa ácido nítrico e nitrato de potássio, permitindo deste modo observar um pico de oxidação mais bem definido, que ocorre a +1,63 V vs AgCl/Ag e é independente do pH. Optou-se por se usar ácido nítrico e nitrato de potássio para ajustar o pH e a força iónica, respectivamente.

Observou-se ainda que para pH compreendido entre 3,0 e 7,4 unidades o molinato não é electroactivo em eléctrodo de carbono vítreo. Para pH menor que 3,0 o molinato apresenta um pico de oxidação cuja intensidade de corrente aumenta com a diminuição de pH, apresentando um valor máximo a pH 1,9 ( figura 3.2).

Na figura 3.3 está representado, a título de exemplo, um voltamograma de onda quadrada de molinato obtido em solução tampão a pH 1,9 e força iónica  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ .

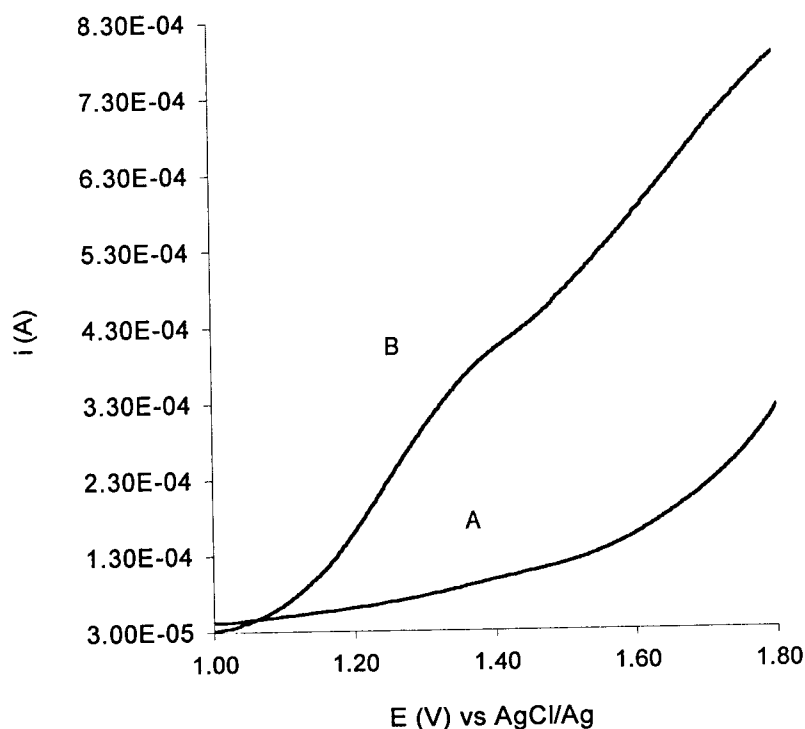


Figura 3.1 - Voltamograma de onda quadrada da solução electrolítica a pH 1,9: A – meio de cultura acidificado com  $\text{HNO}_3$  e força iónica ajustada com  $\text{KNO}_3$ ; B – meio de cultura acidificado com  $\text{HCl}$  e força iónica ajustada com  $\text{KCl}$ .

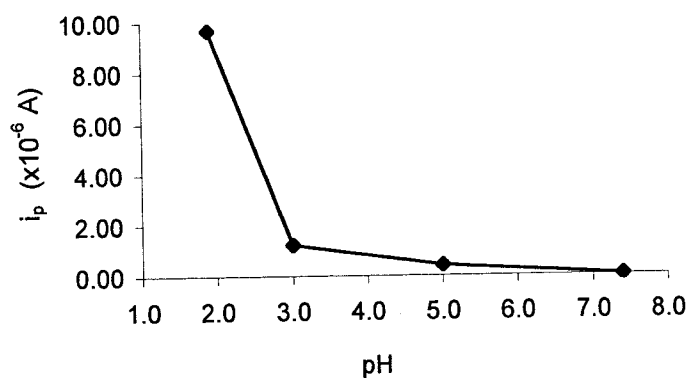


Figura 3.2 – Estudo da variação da intensidade da corrente de pico de oxidação com o pH de uma solução de molinato de concentração  $7,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> em meio de cultura, à frequência de 50 Hz, amplitude 50 mV e incrementos de potencial de 1 mV.

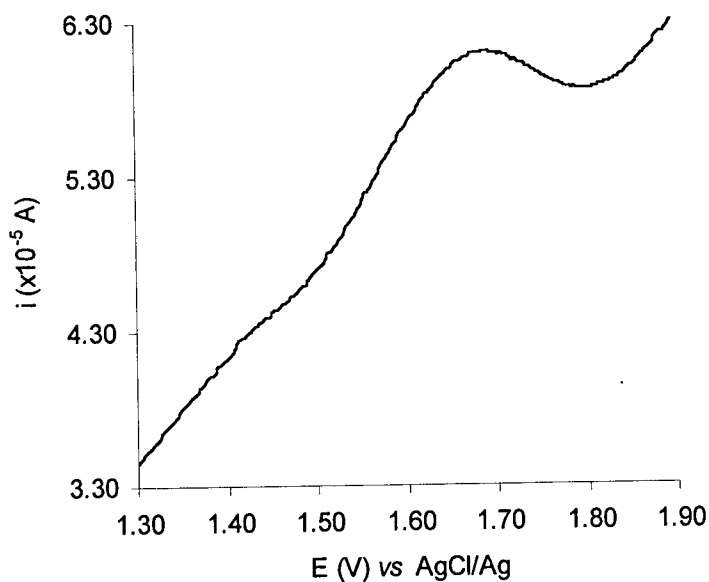


Figura 3.3 – Voltamograma de onda quadrada de uma solução de molinato de concentração  $5,0$  mol L<sup>-1</sup> em meio de cultura com pH 1,9 utilizando uma frequência de 50 Hz, amplitude 50 mV e incrementos de potencial de 1 mV.

### 3.2.2- Mecanismo de oxidação

Para estudar o mecanismo de oxidação do molinato em meio de cultura traçaram-se voltamogramas cíclicos num eléctrodo de carbono vítreo para velocidades de varrimento entre 20 e 250  $\text{mV s}^{-1}$ . Na figura 3.4 apresenta-se um voltamograma cíclico do molinato observando-se um pico de oxidação a um potencial próximo de +1,63 V vs AgCl/Ag, não se obtendo o correspondente pico de redução no varrimento inverso. A representação gráfica da variação da intensidade de corrente de pico  $i_p$  em função de  $v^{1/2}$  é uma recta que passa pela origem do referencial (figura 3.5), indicando que o processo é controlado por difusão obtendo-se valores de  $E_p - E_{p/2}$  médios de 0,10 V. Na tabela 3.1 apresentam-se os valores de  $i_p$ ,  $E_p$  obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos traçados a diferentes velocidades de varrimento.

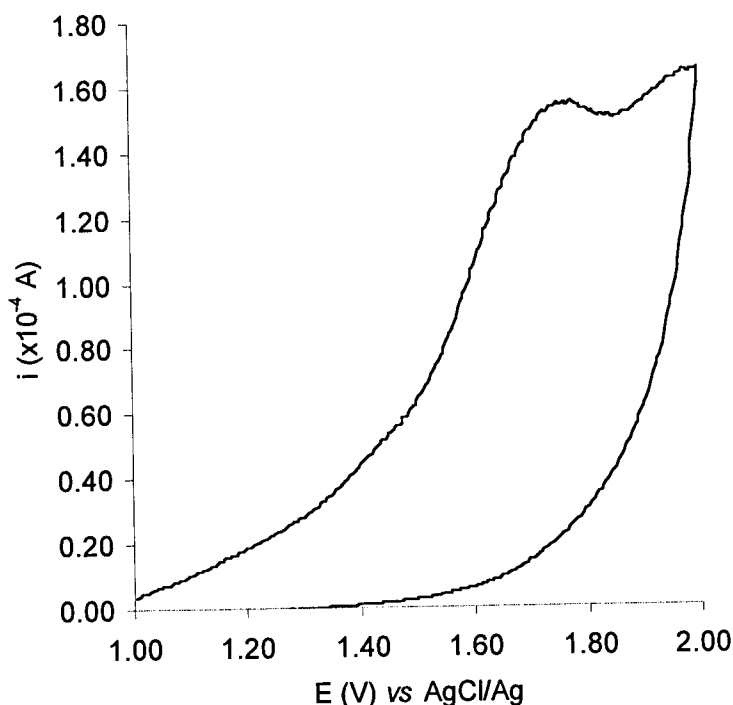


Figura 3.4 – Voltamograma cíclico de uma solução de molinato de concentração  $2,0 \times 10^{-3}$   $\text{mol L}^{-1}$  em meio de cultura a pH 1,9 e força iónica  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ , usando uma velocidade de varrimento de  $150 \text{ mV s}^{-1}$ .

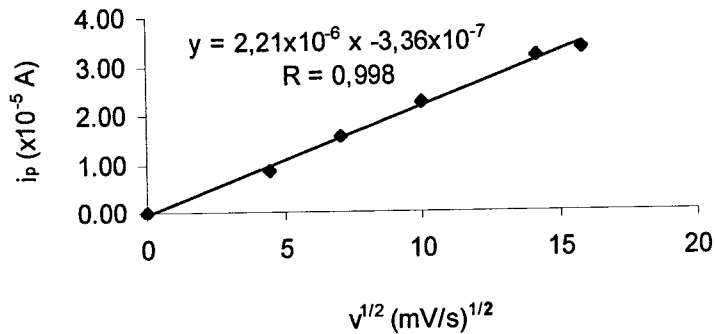


Figura 3.5 – Gráfico de  $i_p$  vs  $v^{1/2}$  para uma solução de molinato de concentração  $2,0 \times 10^{-3}$  mol  $\text{L}^{-1}$  em meio de cultura de pH 1,9 e força iónica  $0,3$  mol  $\text{L}^{-1}$ .

Tabela 3.1 - Dados de voltametria cíclica para uma solução de molinato de concentração  $2,0$  mol  $\text{L}^{-1}$  em meio de cultura com pH 1,9 e força iónica  $0,3$  mol  $\text{L}^{-1}$ .

$v$ ( $\text{mV s}^{-1}$ )	$i_p$ ( $x10^{-5}$ A)	$E_p$ (V) vs AgCl/Ag
20	0,84	1,68
50	1,55	1,68
100	2,26	1,60
200	3,20	1,63
250	3,35	1,63

Utilizando a voltametria de onda quadrada registaram-se os voltamogramas para uma solução de molinato a pH 1,9 no varrimento directo ( $i_f$ ) e inverso ( $i_b$ ) e ainda a curva correspondente à corrente total ( $i_t$ ) (figura 3.6). Confirmou-se que a oxidação deste composto corresponde a um processo irreversível e representando  $i_p$  em função de  $w^{1/2}$  obtém-se uma relação linear (figura 3.7), indicando que as reacções de eléctrodo são controladas por difusão.



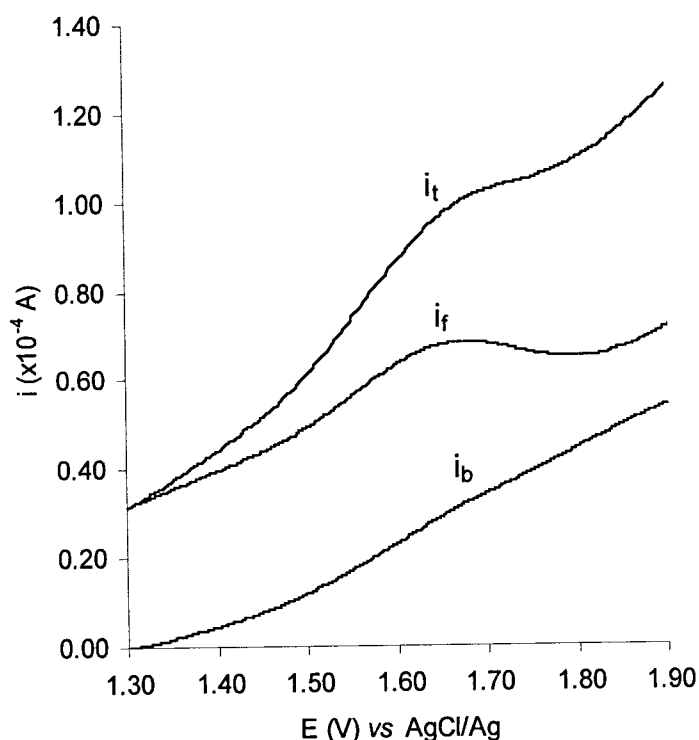


Figura 3.6 – Voltamograma de onda quadrada de uma solução de molinato de concentração  $7,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de cultura a pH 1,9 e força iônica de  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ , utilizando uma frequência de 50 Hz, amplitude 50 mV e incremento de potencial de 1 mV.

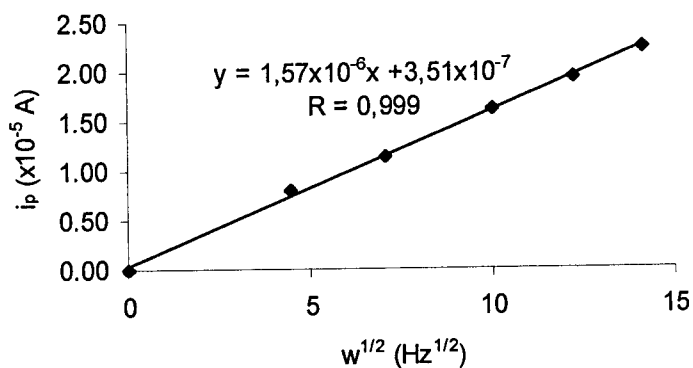


Figura 3.7 – Gráfico de  $i_p$  vs  $w^{1/2}$  para uma solução de molinato de concentração  $7,0 \text{ mol L}^{-1}$  a pH 1,9 e força iônica  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ .

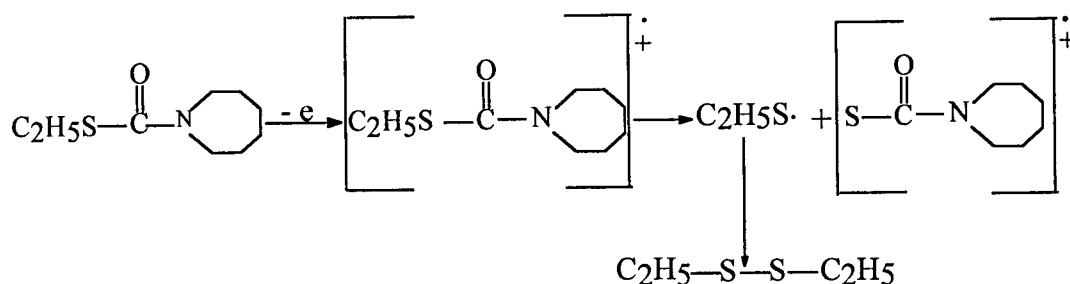
Todos estes resultados sugerem a ocorrência de uma reacção de oxidação no eléctrodo, a que se segue uma reacção química rápida em solução.

A fim de determinar o número de electrões envolvidos na reacção de oxidação, traçaram-se voltamogramas cíclicos para uma solução de tiocianato de ferro com igual concentração à da solução de molinato, ambas preparadas em meio de cultura. Admitindo que em condições experimentais idênticas as espécies apresentam coeficientes de difusão próximos, e conhecendo as características reversíveis do tiocianato de ferro, em que o processo de eléctrodo envolve 1 electrão/ molécula, é possível a partir das equações (3.1) e (3.2) próprias de um processo irreversível, determinar o número de electrões envolvido na reacção de oxidação do molinato. O resultado confirmou tratar-se de um processo que envolve 1 electrão / molécula de molinato.

$$i_p = 2,99 \times 10^5 n (\alpha n_\alpha)^{1/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad (3.1)$$

$$E_p - E_{p/2} = 0,048 / \alpha n_\alpha \quad (3.2)$$

Os estudos electroquímicos realizados permitem verificar que o mecanismo de oxidação do molinato em meio de cultura, envolve um electrão e o pH não influencia o potencial de pico. Os resultados estão de acordo com o mecanismo proposto na literatura (Garrido, 2000), em que se obtém como produto final um dímero ( esquema 3.1).



Esquema 3.1 – Mecanismo de oxidação do molinato em meio de cultura num eléctrodo de carbono vítreo (Garrido, 2000).

### 3.2.3- Curva de calibração

Atendendo a que o sinal analítico é exaltado em voltametria de onda quadrada, usou-se esta técnica para traçar as curvas de calibração. As condições óptimas de análise, ou seja a melhor razão sinal/ruído para a solução de molinato em meio de cultura com pH 1,9 ajustado com ácido nítrico, e força iônica  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  conseguidas com nitrato de potássio foram: frequência 50 Hz, amplitude 50 mV, incremento de potencial de 1 mV correspondendo a velocidade de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

Estas condições foram usadas para estabelecer as curvas de calibração a partir dos voltamogramas obtidos para soluções de molinato de concentrações compreendidas entre  $4,0 \times 10^{-4}$  e  $9,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  (figura 3.8).

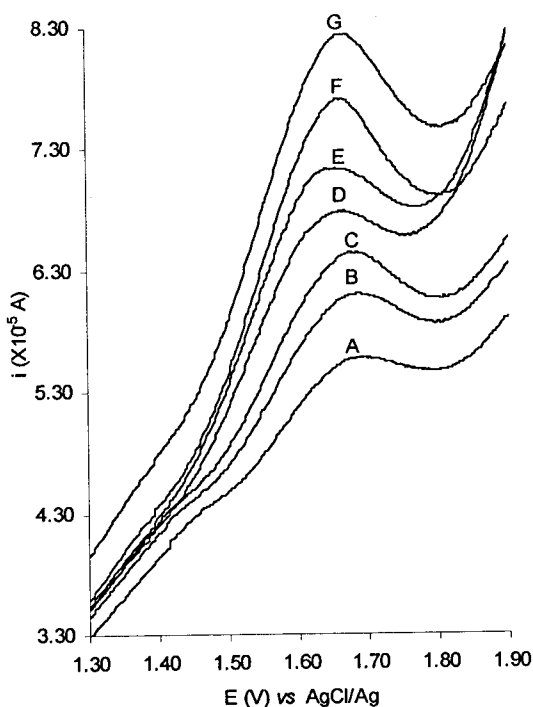


Figura 3.8 - Voltamogramas de onda quadrada de soluções aquosas de molinato a pH 1,9: A -  $4,0 \times 10^{-4}$ ; B -  $5,0 \times 10^{-4}$ ; C -  $6,0 \times 10^{-4}$ ; D -  $7,0 \times 10^{-4}$ ; E -  $8,0 \times 10^{-4}$ ; F -  $9,0 \times 10^{-4}$ ; e G -  $9,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , utilizando-se uma frequência de 50 Hz, amplitude 50 mV e incremento de potencial de 1 mV.

O intervalo estreito de concentrações utilizado deve-se ao facto de o pesticida ser fortemente adsorvido à superfície do eléctrodo provocando o envenenamento deste e dificultando a obtenção de reprodutibilidade. A figura 3.9 apresenta a curva de calibração correspondente aos voltamogramas obtidos, sendo o coeficiente de correlação de 0,999. Na tabela 3.2 são apresentados os valores médios e os erros associados ao declive e ordenada na origem para as rectas de calibração, com um intervalo de confiança de 95%. Com esta metodologia determinou-se o limite de detecção, tendo-se obtido o valor de  $5,67 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  (Miller et al., 2000).

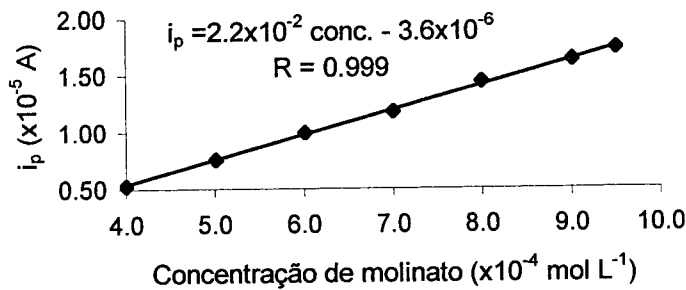


Figura 3.9 – Curva de calibração para soluções aquosas de molinato a pH 1,9.

Tabela 3.2 – Equação da recta de calibração e respectivo declive e ordenada na origem.

Equação da recta	Declive $b \pm t_{sb} \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$	Ordenada na origem $a \pm t_{sa}$
$2,2 \times 10^{-2} x - 3,6 \times 10^{-6}$	$2,2 \times 10^{-2} \pm 0,2 \times 10^{-2}$	$-3,6 \times 10^{-6} \pm 0,6 \times 10^{-6}$

$b$  – declive;  $s_b$  – erro associado ao declive;  $a$  – ordenada na origem;  $s_a$  – erro associado à ordenada na origem.

### 3.3- Oxidação do molinato em meio orgânico

O reduzido sinal analítico obtido na oxidação do molinato em solução aquosa, nas condições experimentais anteriormente descritas, levou a alargar o estudo do comportamento electroquímico do molinato em solvente orgânico, acetonitrilo, permitindo assim estender o intervalo de varrimento de potencial até valores mais positivos (+3,00 V).

#### 3.3.1- Estudo do comportamento electroquímico em acetonitrilo

A figura 3.10 apresenta um conjunto de voltamogramas cíclicos para uma solução  $2,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de molinato em acetonitrilo/ $\text{NaClO}_4$  ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) obtidos num eléctrodo de carbono vítreo, a diferentes velocidades de varrimento. Como se pode observar existem três picos de oxidação mal definidos, irreversíveis, a potenciais próximos de +1,81 V, +1,96 V e + 2,28 V vs AgCl/Ag, que se deslocam para valores mais positivos com o aumento da velocidade de varrimento. Na tabela 3.3 apresentam-se os dados recolhidos a partir da figura 3.10. Atendendo à forma dos voltamogramas usaram-se os dados relativos ao 2º pico de oxidação para traçar a curva de calibração figura (3.11) tendo-se obtido um coeficiente de correlação de 0,998. Com base em informações recolhidas na literatura (Baizer et al., 1993) propõe-se que o 2º pico corresponde à formação de sulfóxido e o terceiro à conversão em sulfona, sendo no entanto necessário proceder a estudos complementares para confirmar a formação dos produtos referidos.

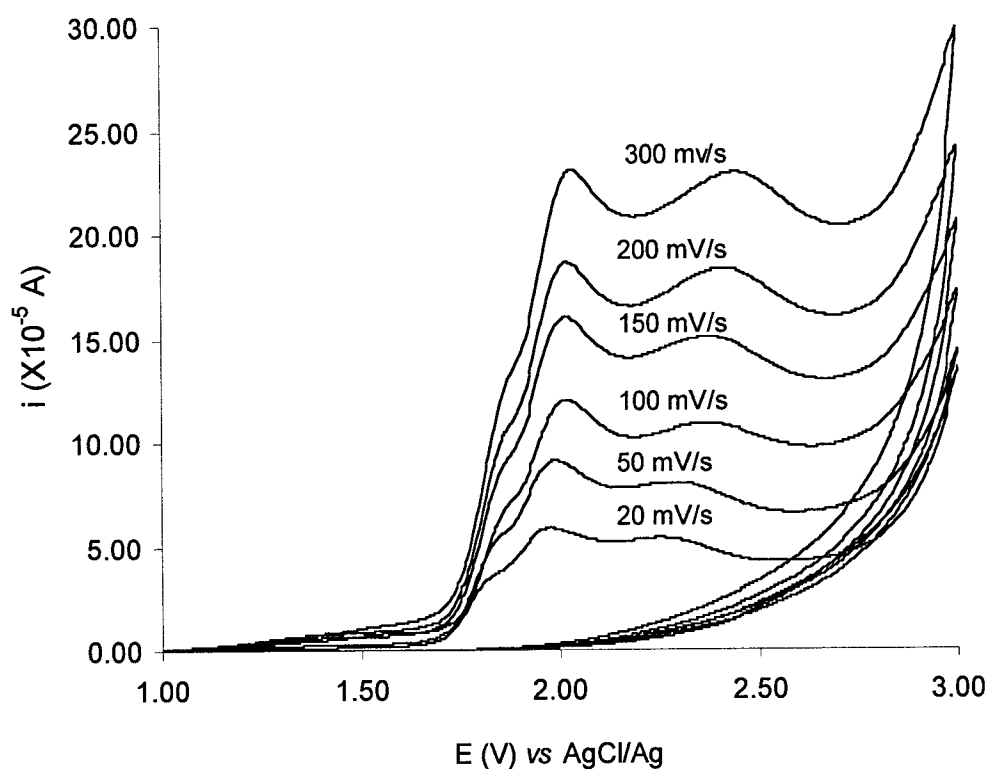


Figura 3.10 - Voltamogramas cíclicos para uma solução  $2,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de molinato em acetronitrilo/perclorato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) num eléctrodo de carbono vítreo e às velocidades indicadas no gráfico.

Tabela 3.3 – Valores de  $i_p$  e  $E_p$  obtidos com a técnica de voltametria cíclica para os três picos de oxidação do molinato em acetronitrilo/perclorato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

$v \text{ (V s}^{-1}\text{)}$	$i_p^1 \text{ (x}10^{-5}\text{ A)}$	$E_p^1 \text{ (V)}$	$i_p^2 \text{ (x}10^{-5}\text{ A)}$	$E_p^2 \text{ (V)}$	$i_p^3 \text{ (x}10^{-5}\text{ A)}$	$E_p^3 \text{ (V)}$
0,02	0,55	1,81	1,44	1,96	0,57	2,28
0,05	0,81	1,83	2,38	1,98	0,63	2,32
0,10	0,91	1,85	3,58	2,01	0,94	2,37
0,15	1,17	1,85	4,48	2,01	1,49	2,39
0,20	1,53	1,85	4,93	2,01	1,94	2,41
0,30	1,89	1,86	6,06	2,02	2,24	2,44

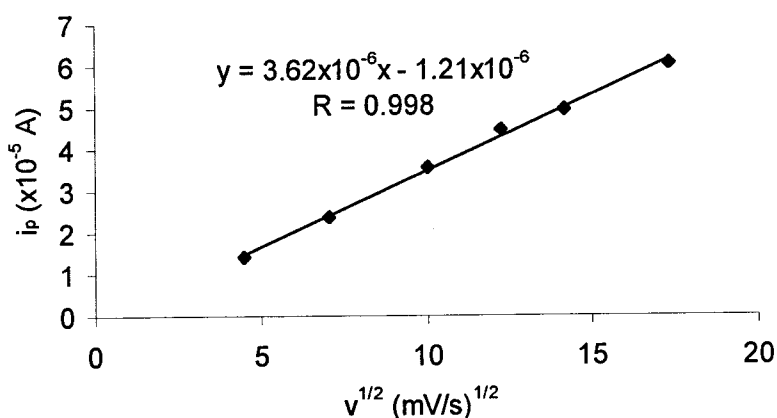


Figura 3.11 – Gráfico  $i_p$  vs  $v^{1/2}$  de uma solução  $2,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de molinato em acetonitrilo/perclorato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

### 3.3.2- Curva de calibração

Para tentar aumentar a intensidade do sinal analítico, recorreu-se à voltametria de onda quadrada e registaram-se os voltamogramas para soluções de molinato de concentrações compreendidas entre  $4,9 \times 10^{-4}$  e  $2,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  preparadas em acetonitrilo/perclorato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ). A partir da figura 3.12 recolheram-se os dados que se apresentam na tabela 3.4. Atendendo à forma dos voltamogramas usaram-se os dados relativos ao 2º pico de oxidação para traçar a curva de calibração (figura 3.13) tendo-se obtido uma relação linear com coeficiente de correlação de 0,996. Na tabela 3.5 apresentam-se os valores médios e os erros associados ao declive e ordenada na origem para as rectas de calibração, com um intervalo de confiança de 95%. Com esta metodologia determinou-se o limite de detecção, tendo-se obtido o valor  $1,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  (Miller et al., 2000).

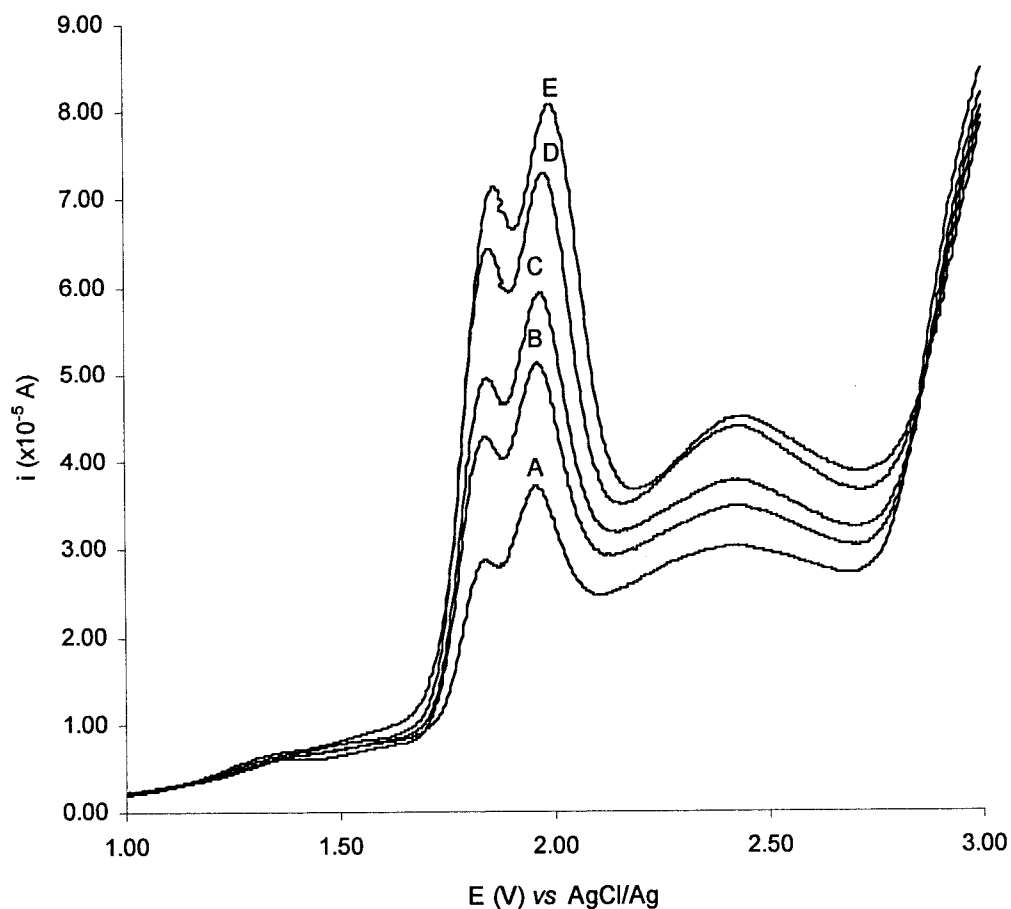


Figura 3.12 - Voltamogramas de onda quadrada de soluções de molinato em acetonitrilo/perclorato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ): A -  $4,9 \times 10^{-4}$ ; B -  $7,8 \times 10^{-4}$ ; C -  $9,8 \times 10^{-4}$ ; D -  $1,5 \times 10^{-3}$  e E -  $2,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

Tabela 3.4 – Valores de  $i_p$  e  $E_p$  obtidos com a técnica de SWQ para os três picos de oxidação do molinato em acetonitrilo/perclorato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

Concentração ( $\times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ )	$i_p^1$ ( $\times 10^{-5} \text{ A}$ )	$E_p^1$ (V)	$i_p^2$ ( $\times 10^{-5} \text{ A}$ )	$E_p^2$ (V)	$i_p^3$ ( $\times 10^{-5} \text{ A}$ )	$E_p^3$ (V)
4,9	0,57	1,80	1,18	2,00	0,41	2,40
7,9	1,31	1,80	1,50	2,00	0,52	2,40
9,8	1,36	1,80	1,65	2,00	0,53	2,40
1,5	2,10	1,80	2,02	2,00	0,82	2,40
2,1	2,11	1,80	2,36	2,00	0,75	2,40



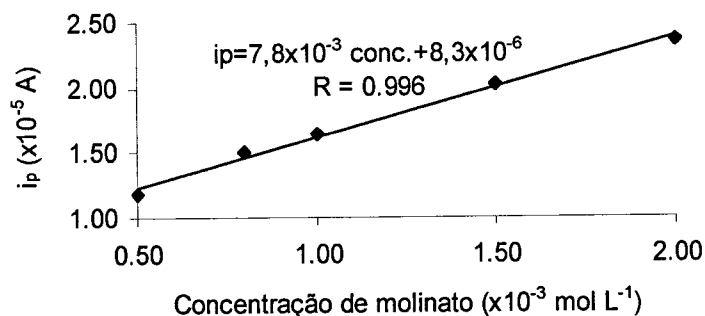


Figura 3.13 – Curva de calibração para o segundo pico de oxidação para soluções de molinato em acetonitrilo/perclorato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ).

Tabela 3.5 – Equação da recta de calibração e respectivo declive e ordenada na origem.

Equação da recta	Declive $b \pm t_{sb} \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$	Ordenada na origem $a \pm t_{sa}$
$7,8 \times 10^{-3}x + 8,3 \times 10^{-6}$	$7,8 \times 10^{-3} \pm 0,4 \times 10^{-3}$	$8,3 \times 10^{-6} \pm 0,4 \times 10^{-6}$

Também em acetonitrilo os sinais electroquímicos obtidos para soluções de molinato têm baixas intensidades, o que não permite aplicar a metodologia analítica no controlo directo do molinato, ao longo do processo de biodegradação atendendo aos níveis de concentração esperados.

A oxidação electroquímica do molinato vem comprovar a possibilidade de dosear alguns carbamatos recorrendo a técnicas electroanalíticas, usando eléctrodos de carbono vítreo (Batley et al., 1981; Guiberteau et al., 1995).

Batley e seus colaboradores (1981), estudaram os processos de oxidação de 13 carbamatos e analisaram os sinais obtidos quer por voltametria directa quer por detecção electroquímica em HPLC. Nenhum destes pesticidas apresentou pico de redução e apenas quatro (aminocarbe, zectran, metiocarbe e pirimicarbe) foram oxidados, no entanto os pesticidas metiocarbe e pirimicarbe apresentavam interferências do oxigénio. Assim

sendo Batley e seus colaboradores apenas propuseram uma metodologia para quantificar aminocarbe e zectran para uma gama de concentrações de 0,5 a 10 mg L<sup>-1</sup>. O limite de detecção usando a voltametria de diferencial de pulso foi de 30 µg L<sup>-1</sup>.

A bentazona é um exemplo de outro carbamato cuja oxidação electroquímica foi estudada usando a voltametria cíclica, onda quadrada e diferencial de pulso, tendo-se obtido um limite de detecção de 1,5x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> (Garrido, 2000).

Conforme se pode verificar a oxidação electroquímica de carbamatos usando o eléctrodo de carbono vítreo não apresenta limites de detecção baixos, do qual o molinato não é excepção.

### 3.4 - Redução do molinato em solução aquosa

Para testar a capacidade de redução do molinato utilizou-se um eléctrodo de mercúrio de gota suspensa (HMDE), tendo-se verificado que este tiocarbamato é electroquimicamente activo, ocorrendo redução deste pesticida a um potencial de -0,320 V vs AgCl/Ag. Utilizando este eléctrodo, estudou-se a influência da adsorção da espécie, optimizou-se o potencial e o tempo de deposição, tendo em conta que estes parâmetros são determinantes nas respostas electroquímicas. O efeito do pH da solução também foi estudado, visto ser um factor importante para a interpretação do comportamento do molinato.

#### 3.4.1 - Optimização do potencial e do tempo de acumulação

A figura 3.14 ilustra a influência do tempo de acumulação na intensidade da corrente de pico para uma solução 2,2x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> de molinato em meio de cultura a pH 7,4, verificando-se que o tempo de deposição tem bastante influência na forma do pico de redução.

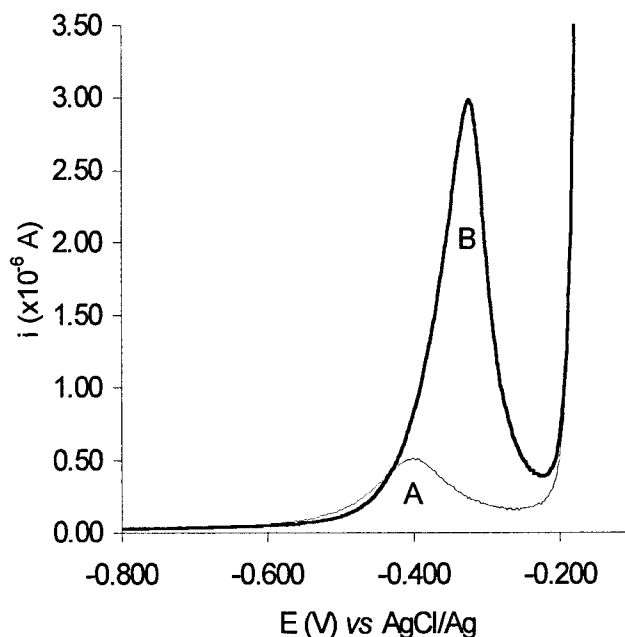


Figura 3.14 - Voltamogramas de onda quadrada para uma solução  $2,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de molinato em meio de cultura a pH 7,4 e força iônica  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ , utilizando-se uma frequência de 150 Hz ao potencial de deposição ( $E_d$ ) de  $-0,800 \text{ V}$  e amplitude 50 mV. Tempo de acumulação: A – 0 s; B – 10 s.

Estudos sistematizados permitiram traçar o gráfico apresentado na figura 3.15 onde se observa o efeito do tempo de acumulação na forma do pico de redução em função da concentração da solução de molinato. É possível concluir que quanto mais baixa for a concentração maior é o intervalo de resposta linear entre a intensidade de corrente de pico e o tempo de acumulação. Para estudos posteriores foi escolhido um tempo de acumulação de 10 s, visto ser nesta situação que se obtém uma intensidade de corrente de pico máxima quando se usa uma solução de molinato de concentração  $2,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .

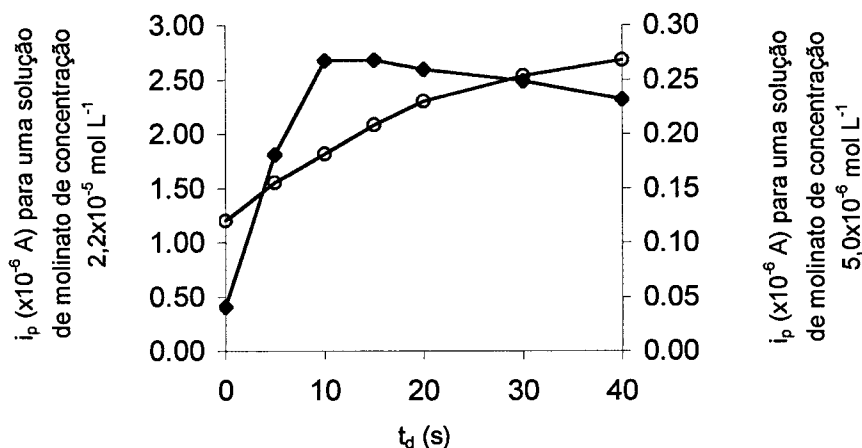


Figura 3.15 – Efeito do tempo de deposição na intensidade da corrente de pico ( $i_p$ ) numa solução aquosa de molinato de concentração:  $2,2 \times 10^{-5}$  mol L $^{-1}$  (◆) e  $5,0 \times 10^{-6}$  mol L $^{-1}$  (○). pH 7,4 frequência 150 Hz e potencial de deposição  $-0,800$  V.

Para estudar a influência do potencial de deposição, fixou-se o tempo de acumulação em 10 s e fez-se variar o valor do potencial entre  $-0,60$  V e  $-1,20$  V vs AgCl/Ag. Como se pode verificar na figura 3.16 a intensidade de corrente de pico máxima corresponde a um potencial de deposição de  $-0,800$  V vs AgCl/Ag pelo que se fixou este valor para estudos posteriores.

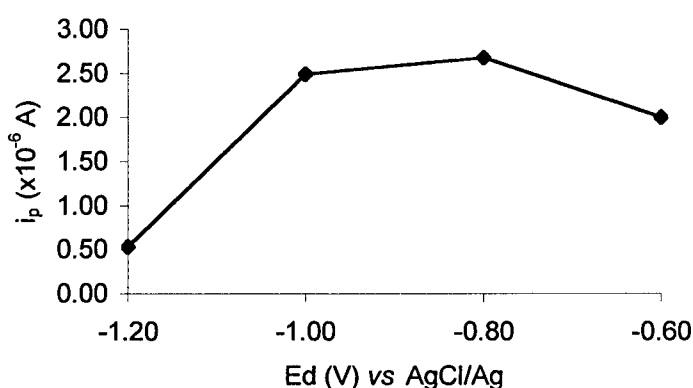


Figura 3.16 – Efeito do potencial de deposição ( $E_d$ ) na intensidade de corrente de pico ( $i_p$ ) numa solução de molinato de concentração  $2,2 \times 10^{-5}$  mol L $^{-1}$  em meio de cultura a pH 7,4 à frequência de 150 Hz e tempo de deposição ( $t_d$ ) 10 s.

### 3.4.2 - Influência do pH

A influência do pH no comportamento electroquímico do molinato foi estudada para o intervalo compreendido entre 1,9 e 11,0 unidades usando a voltametria de onda quadrada e mantendo-se as restantes condições experimentais. A figura 3.17 representa o efeito do pH sobre os valores de potencial de pico ( $E_p$ ) e os valores de intensidade de corrente de pico ( $i_p$ ) para o molinato. Verificou-se que para a gama de valores de pH estudada este herbicida é electroactivo, tendo actividade máxima a pH 1,9. No entanto, dado que a pH 7,4 se obtêm bons resultados fixou-se este valor para estudos posteriores, pois assim não é necessário recorrer à acidificação das amostras. Verifica-se também que o potencial de pico ( $E_p$ ) é praticamente independente do pH.

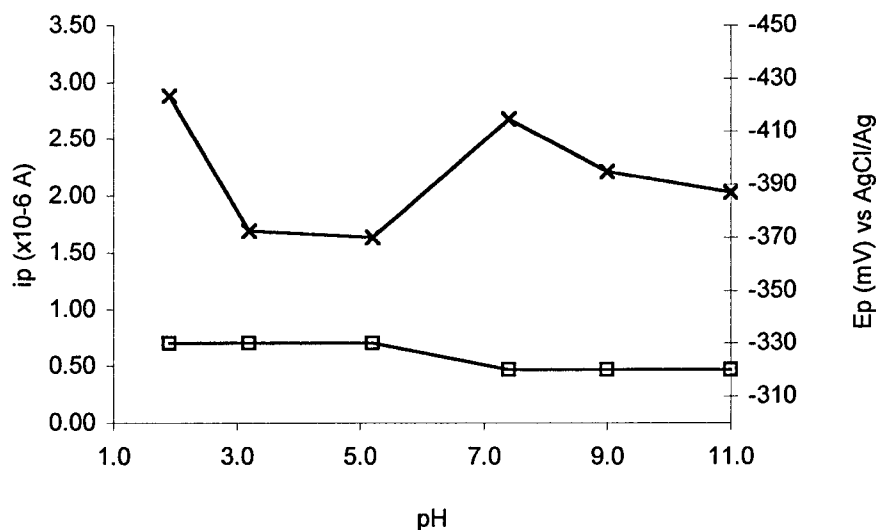


Figura 3.17 - Efeito do pH sobre os valores de  $E_p$  (□) e  $i_p$  (x) para soluções de molinato de concentração  $2,2 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> usando a técnica de voltametria de onda quadrada. Frequência 150 Hz, amplitude 50 mV,  $t_d$  10 s e  $E_d$  - 0,800 V.

### 3.4.3- Estudos por voltametria cíclica

A voltametria cíclica foi a técnica utilizada no sentido de caracterizar a reversibilidade do processo de eléctrodo do molinato. Começou por se traçar vários voltamogramas cíclicos para uma solução de molinato de concentração  $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  a pH 7,4 com força iónica ajustada a  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  com cloreto de potássio, fazendo-se variar a velocidade de varrimento entre  $20 \text{ mV s}^{-1}$  e  $600 \text{ mV s}^{-1}$ . Na figura 3.18 apresenta-se os voltamogramas cíclicos obtidos com esta técnica. Na tabela 3.6 apresentam-se alguns resultados obtidos da análise dos voltamogramas cíclicos para esta solução de molinato.

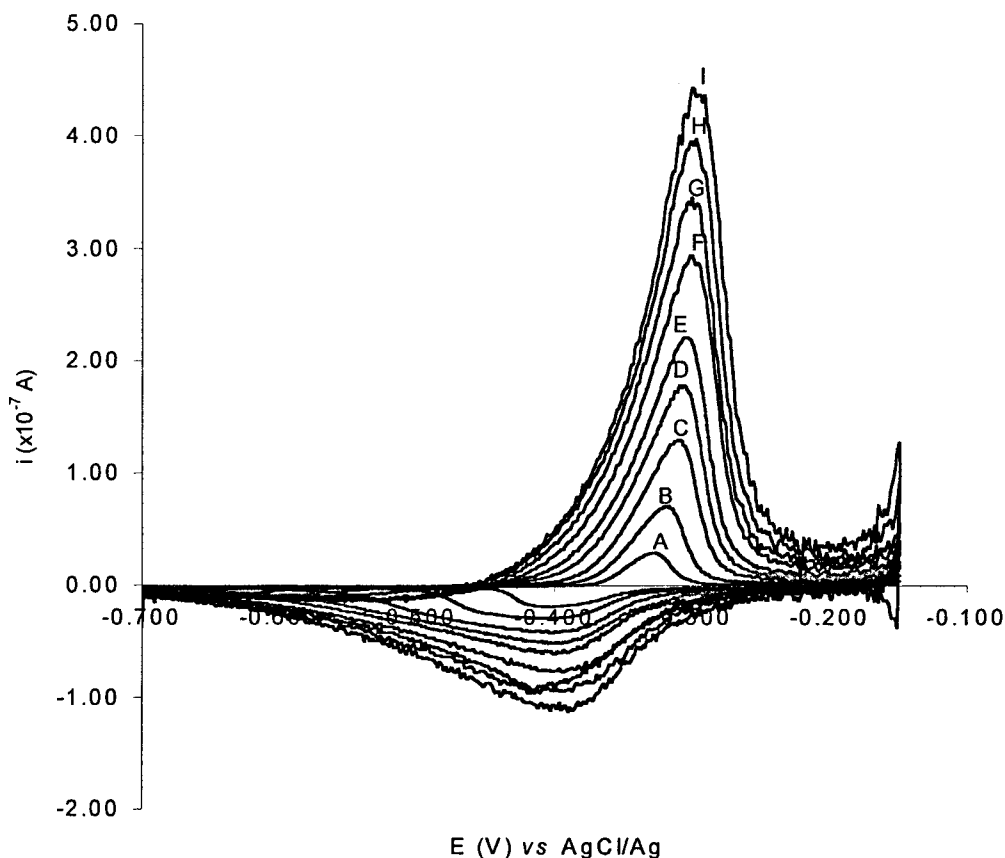


Figura 3.18 – Voltamogramas cíclicos de uma solução aquosa de molinato de concentração  $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em eléctrodo de mercúrio de gota suspensa: A - 20; B - 50; C - 100; D - 150; E - 200; F - 300; G - 400; H - 500 e I -  $600 \text{ mV s}^{-1}$ .

Tabela 3.6 - Dados de voltametria cíclica para uma solução de molinato de concentração  $8,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de cultura com pH 7,4 e I  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ .

$v \text{ (V s}^{-1}\text{)}$	$i_p \text{ (} \times 10^{-7} \text{ A)}$	$E_p \text{ (V) vs AgCl/Ag}$
0,02	0,28	-0,326
0,05	0,69	-0,320
0,10	1,23	-0,309
0,15	1,70	-0,306
0,20	2,11	-0,305
0,30	2,85	-0,302
0,40	3,27	-0,300
0,50	3,76	-0,300
0,60	4,21	-0,300

#### 3.4.4- Estudos por voltametria de onda quadrada

A voltametria de onda quadrada foi também utilizada para estudar o comportamento da redução do molinato em meio de cultura no eléctrodo de mercúrio de gota suspensa a pH 7,4 e força iónica  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ . O efeito da frequência da onda quadrada na intensidade da corrente de pico, para uma solução de molinato com concentração de  $2,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  foi avaliada para a gama de frequência entre 20 e 200 Hz (figura 3.19).

A figura 3.20 mostra o voltamograma obtido para o herbicida em estudo, onde a corrente total ( $i_t$ ) é a diferença entre a corrente directa e a corrente inversa, ou seja, entre a corrente catódica e a corrente anódica ( $i_f - i_b$ ).

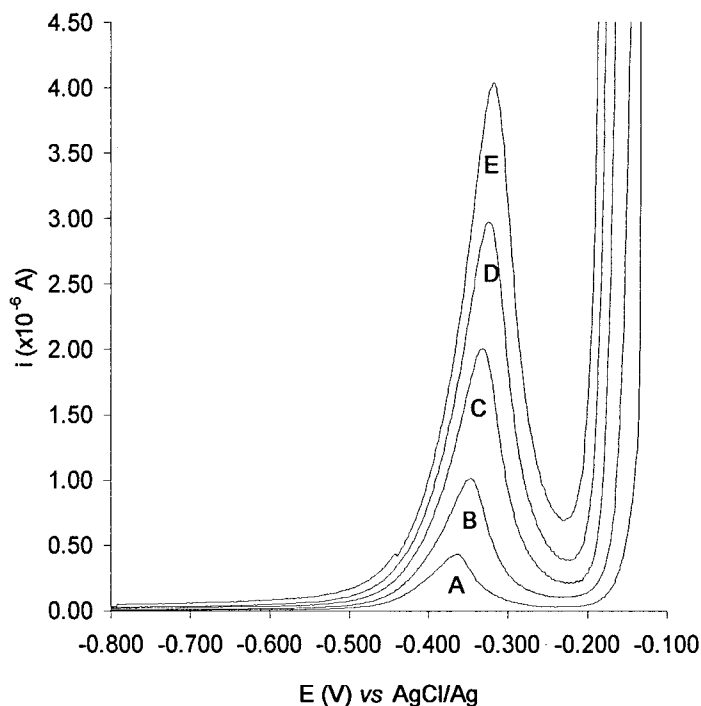


Figura 3.19 – Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de molinato de concentração  $2,2 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> com pH 7,4 às frequências de: A - 20; B - 50; C - 100; D - 150 e E - 200 Hz. Potencial de deposição ( $E_p$ ) - 0,800 V aplicado durante 10 s.

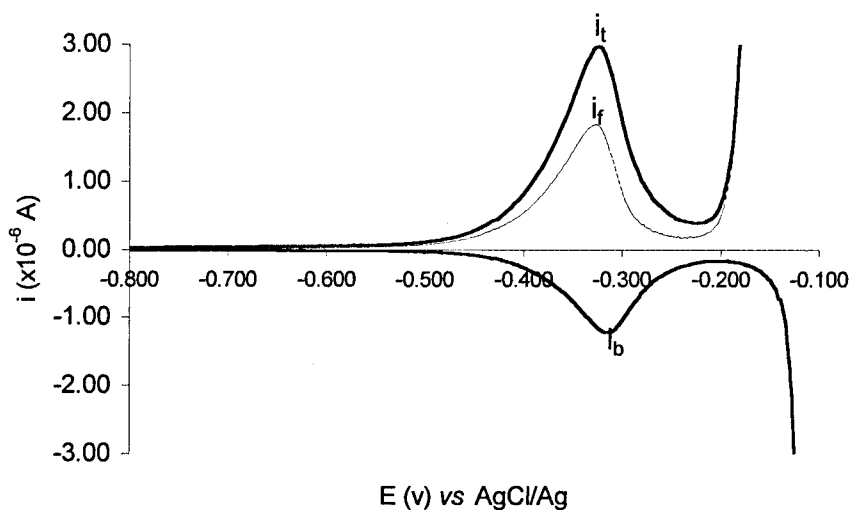


Figura 3.20 – Voltamograma de onda quadrada de uma solução de molinato de concentração  $2,2 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> em meio de cultura com pH 7,4 utilizando uma frequência de 50 Hz, amplitude 50 mV e incremento de potencial de 1 mV.



### 3.5 - Determinação do molinato

O método usado para a quantificação do molinato ao longo do processo de biodegradação foi o método voltamétrico, usando-se como critério de comparação o método cromatográfico (HPLC). De seguida apresentam-se os resultados e curvas de calibração obtidos por estas duas técnicas.

#### 3.5.1 - Curva de calibração em HPLC

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por espectrofotometria de ultravioleta foi utilizada como método analítico de comparação na quantificação do molinato ao longo do processo de biodegradação. As determinações em HPLC foram efectuadas a um comprimento de onda de 210 nm e com caudal de eluente de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ . Na figura 3.21 apresenta-se um cromatograma de uma solução de molinato de concentração  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Nestas condições verificou-se que este pesticida tem um tempo de retenção ( $t_r$ ) médio de 8,8 minutos.

Traçou-se uma curva de calibração para soluções de molinato de concentrações compreendidas entre  $1,0 \times 10^{-6}$  e  $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  (figura 3.22). Na tabela 3.7 apresentam-se os valores médios e os erros associados ao declive para um intervalo de confiança de 95%.

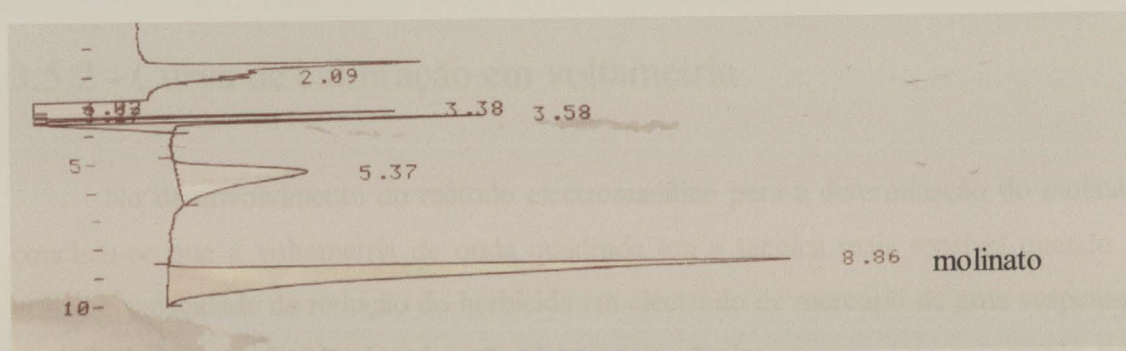


Figura 3.21 – Cromatograma de uma solução padrão de molinato de concentração  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  em meio de cultura a pH 7,4, usando um caudal de eluente de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$  e a detecção a um comprimento de onda de 210 nm.

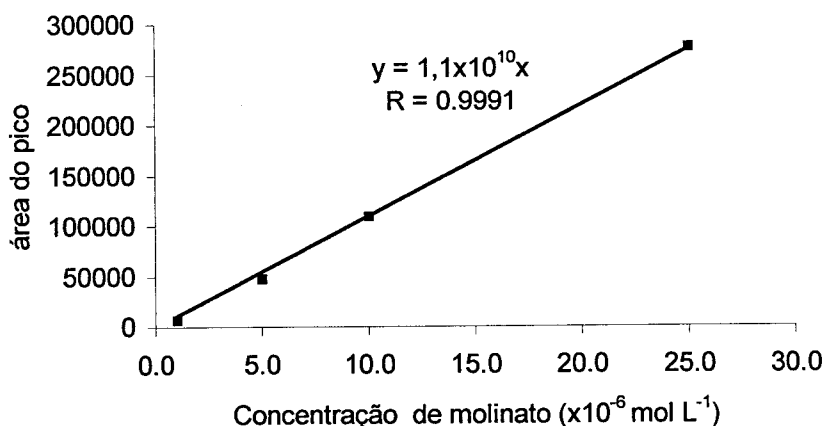


Figura 3.22 – Curva de calibração para soluções padrão de molinato em meio de cultura a pH 7,4 usando o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Tabela 3.7 – Equação da recta e respectivo erro associado ao declive obtido por HPLC para soluções padrão de molinato.

Equação da recta	Declive $b \pm t_{sb} (\text{mol L}^{-1})$
$1,1 \times 10^{10} x$	$1,1 \times 10^{10} \pm 0,1 \times 10^{10}$

B – declive; sb – erro associado ao declive.

### 3.5.2 - Curva de calibração em voltametria

No desenvolvimento do método electroanalítico para a determinação do molinato concluiu-se que a voltametria de onda quadrada era a técnica mais sensível quando se utiliza a capacidade de redução do herbicida em eléctrodo de mercúrio de gota suspensa e se optimiza as condições de adsorção da espécie. Assim usou-se esta associação para dosear o molinato em meio de cultura ao longo do processo de biodegradação.

Por voltametria de onda quadrada, usaram-se as seguintes condições análise: frequência 150 Hz, amplitude 50 mV, incremento de potencial de 1 mV, pH 7,4 e  $I$  0,3 mol L<sup>-1</sup> a um potencial de deposição de -0,800 V durante 10 s.

Nestas condições estabeleceram-se as rectas de calibração. Na figura 3.23 estão representados os voltamogramas de onda quadrada obtidos na calibração, para soluções de molinato de concentrações compreendidas entre  $5,0 \times 10^{-6}$  e  $9,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. A partir dos dados recolhidos da análise dos voltamogramas traçou-se a curva de calibração (figura 3.24) apresentando-se na tabela 3.8 os valores médios e os erros associados respectivamente ao declive e ordenada na origem, para um intervalo de confiança de 95%.

Com esta metodologia determinou-se o limite de detecção, tendo-se obtido o valor  $3,5 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> (Miller et al., 2000).

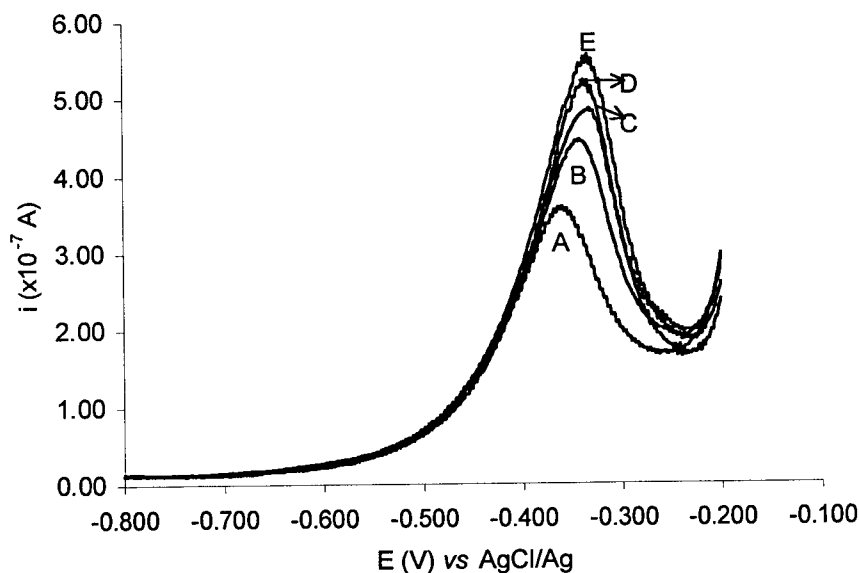


Figura 3.23 - Voltamogramas de onda quadrada de soluções padrão de molinato em meio de cultura a pH 7,4: A-  $5,0 \times 10^{-6}$ ; B-  $6,0 \times 10^{-6}$ ; C-  $7,0 \times 10^{-6}$ ; D-  $8,0 \times 10^{-6}$  e E-  $9,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>.

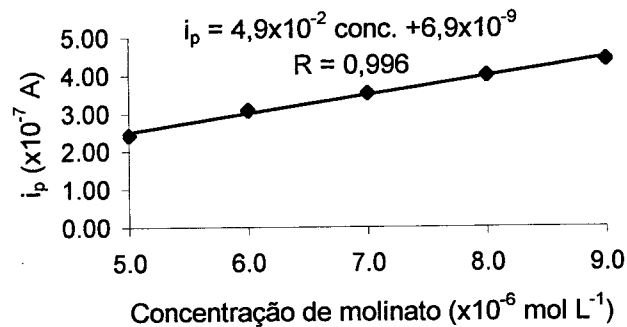


Figura 3.24 – Curva de calibração para soluções de molinato a pH 7,4 usando o método voltamétrico.

Tabela 3.8 – Equação da recta de calibração e respectivo declive e ordenada na origem.

Equação da recta	Declive $b \pm t_{sb} \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$	Ordenada na origem $a \pm t_{sa}$
$4,9 \times 10^{-2} + 6,9 \times 10^{-9}$	$4,9 \times 10^{-2} \pm 0,3 \times 10^{-2}$	$6,94 \times 10^{-9} \pm 6,6 \times 10^{-8}$

$b$  – declive;  $s_b$  – erro associado ao declive;  $a$  – ordenada na origem;  $s_a$  – erro associado à ordenada na origem.

### 3.5.2 - Doseamento do molinato ao longo do processo de biodegradação

Nas condições optimizadas fez-se o doseamento do molinato no sobrenadante da cultura de crescimento ao longo do processo de biodegradação. A precisão da metodologia desenvolvida foi testada através do cálculo do desvio padrão relativo para três determinações da mesma amostra. A exactidão do método foi avaliada comparando os valores obtidos por voltametria de onda quadrada em eléctrodo de mercúrio de gota suspensa com os obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC.

Na figura 3.25 apresenta-se um cromatograma de uma amostra biológica retirada ao sobrenadante da cultura do consórcio III.

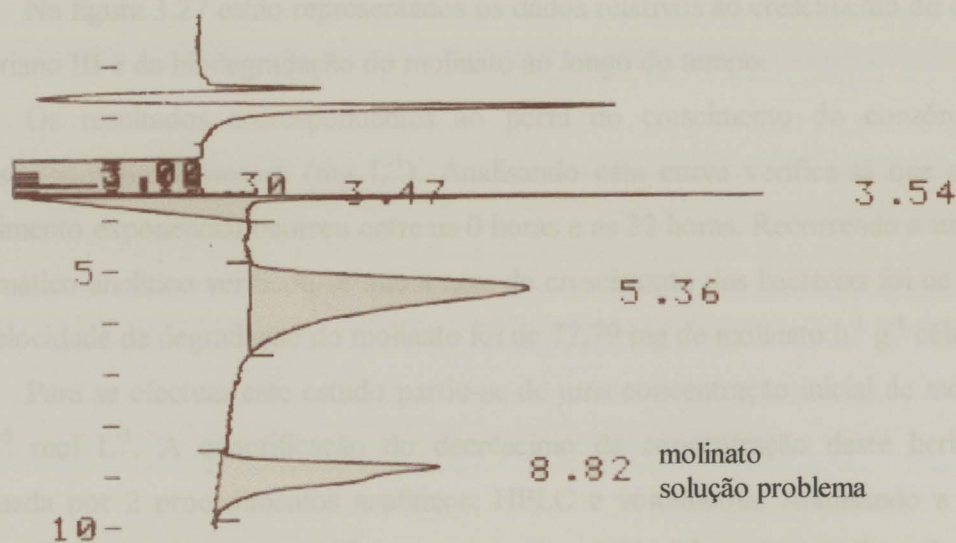


Figura 3.25 – Cromatograma de uma amostra biológica retirada ao sobrenadante da cultura do consórcio III após 26 horas de incubação (pH 7,4) utilizando-se um caudal de eluente 0,8 mL min<sup>-1</sup> e detecção a um comprimento de onda de 210 nm.

Na figura 3.26 apresenta-se um voltamograma de onda quadrada para uma amostra retirada ao sobrenadante da cultura de crescimento do consórcio III.

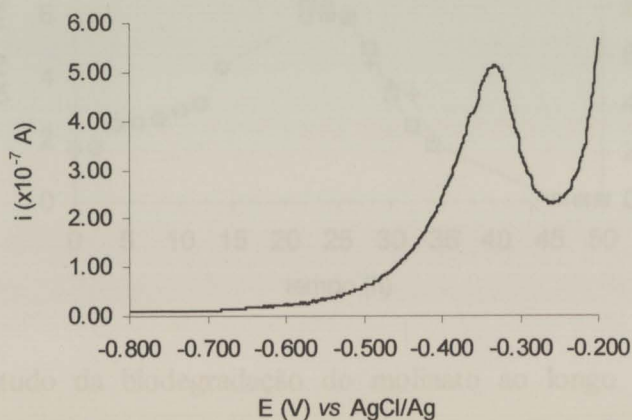


Figura 3.26 - Voltamograma de onda quadrada de uma amostra biológica retirada ao sobrenadante da cultura de crescimento do consórcio III após 26 horas de incubação a um pH 7,4 utilizando-se uma frequência de 150 Hz com um potencial de deposição de -0,800 V aplicado durante 10 s.

Na figura 3.27 estão representados os dados relativos ao crescimento do consórcio bacteriano III e da biodegradação do molinato ao longo do tempo.

Os resultados correspondentes ao perfil do crescimento do consórcio estão representados em biomassa ( $\text{mg L}^{-1}$ ). Analisando esta curva verifica-se que a fase de crescimento exponencial ocorreu entre as 0 horas e as 32 horas. Recorrendo a um modelo matemático analítico verificou-se que a taxa de crescimento das bactérias foi de  $0,055 \text{ h}^{-1}$  e a velocidade de degradação do molinato foi de  $77,79 \text{ mg de molinato h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ células}$ .

Para se efectuar este estudo partiu-se de uma concentração inicial de molinato de  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . A quantificação do decréscimo da concentração deste herbicida foi efectuada por 2 procedimentos analíticos: HPLC e voltametria. Analisando a curva de biodegradação do molinato verifica-se que este pesticida foi totalmente degradado em 46 horas.

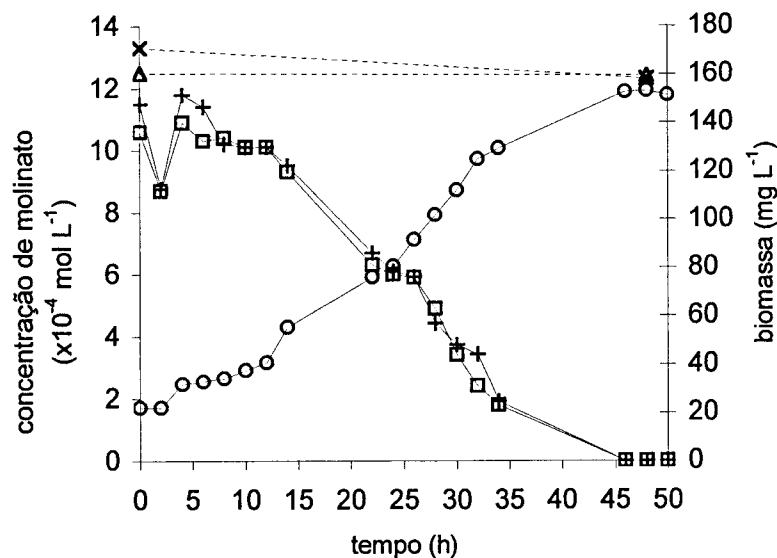


Figura 3.27 – Estudo da biodegradação do molinato ao longo do tempo. Perfil de crescimento da cultura do consórcio III (biomassa) (O); perfil de degradação do molinato quantificado por cromatografia (+); perfil de degradação do molinato quantificado por voltametria (□); controlo abiótico quantificado por cromatografia (x); controlo abiótico quantificado por voltametria (△).

A tabela 3.9 resume todos os resultados obtidos. Como se pode verificar os desvios relativos são sempre inferiores 9,6%. A figura 3.28 representa a relação encontrada entre os valores obtidos voltametricamente e os obtidos cromatograficamente. Pelos parâmetros da recta (declive próximo de 1 e ordenada na origem próxima de zero) é possível concluir existir uma boa concordância entre as duas metodologias analíticas.

Aplicando o teste t-student (Miller et al., 2000) com um intervalo de confiança de 95%, o valor encontrado de t (2,70) foi sempre inferior ao valor tabelado 4,30. Consequentemente os valores médios relativos à concentração de molinato obtidos pelos dois métodos independentes são estatisticamente iguais.

Tabela 3.9 – Resultados obtidos na determinação de molinato no sobrenadante da cultura do consórcio III ao longo do tempo usando o método voltamétrico e HPLC.

Tempo Horas	Voltametria ( $\times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$ )	HPLC ( $\times 10^{-4}$ mol L $^{-1}$ )	Desvio relativo (%)
0	10,6 $\pm$ 0,6	11,5	-7,8
2	8,7 $\pm$ 0,1	8,8	-1,1
4	10,9 $\pm$ 0,6	11,8	-7,6
6	10,3 $\pm$ 0,3	11,4	-9,6
8	10,4 $\pm$ 0,2	10,2	+2,0
10	10,1 $\pm$ 0,1	10,1	0,0
12	10,1 $\pm$ 0,4	10,1	0,0
14	9,3 $\pm$ 0,1	9,5	-2,1
22	6,3 $\pm$ 0,1	6,7	-6,0
24	6,0 $\pm$ 0,1	6,1	-1,6
26	5,9 $\pm$ 0,1	5,9	0,0
28	4,8 $\pm$ 0,5	4,4	+9,1
30	3,4 $\pm$ 0,1	3,7	-8,1
32	2,4 $\pm$ 0,1	2,4	0,0
34	1,8 $\pm$ 0,1	1,9	-5,3
46	Não se detectou	Não se detectou	----
48	Não se detectou	Não se detectou	----
50	Não se detectou	Não se detectou	----
C <sub>1</sub>	12,5 $\pm$ 0,2	13,3	-6,0
C <sub>2</sub>	12,4 $\pm$ 0,2	12,3	+0,8

C<sub>1</sub> – controlo abiótico no tempo 0 horas, C<sub>2</sub> – controlo abiótico no tempo 48 horas.

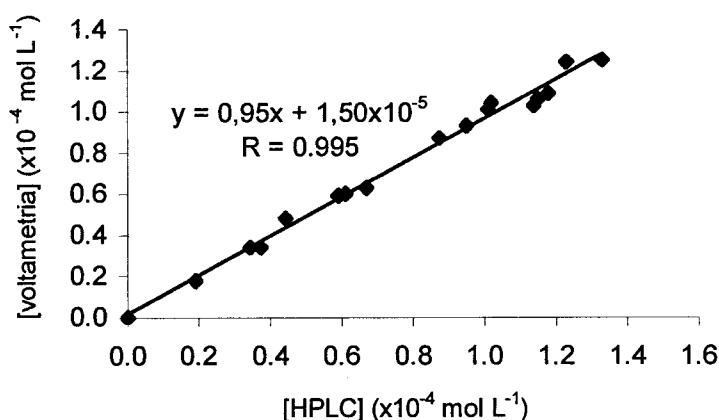


Figura 3.28 – Comparação dos resultados obtidos na determinação de molinato em amostras biológicas usando o método voltamográfico e o método cromatográfico (HPLC).

Nas amostras correspondentes ao tempo 46, 48 e 50 não se detectou molinato quer pelo método cromatográfico quer pelo método electroquímico. No entanto, detectou-se um outro composto, que provavelmente corresponde a um produto de biodegradação do molinato que foi detectado quer por cromatografia (HPLC) quer por voltametria.

Na figura 3.29 apresenta-se o cromatograma obtido para a amostra retirada ao fim de 46 horas de incubação, detectando-se um composto não identificado com tempo de retenção de 9,52 minutos.

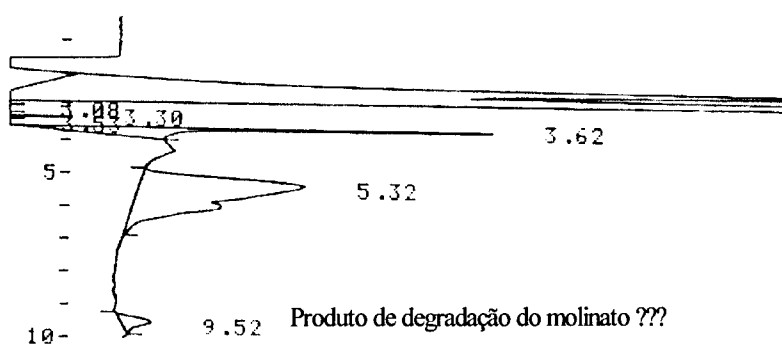


Figura 3.29 – Cromatograma obtido para a amostra biológica retirada ao sobrenadante da cultura do consórcio III após 46 horas de incubação (pH 7,4) usando-se um caudal de eluente de 0,8 mL min<sup>-1</sup> e a detecção espectrofotométrica a um comprimento de onda de 210 nm.



Na figura 3.30 apresentam-se os voltamogramas obtido para as amostras retiradas ao sobrenadante da cultura do consórcio III um período de incubação de 46 e 48 horas de incubação, observando-se dois picos de redução mal definidos, a potenciais próximos de  $-0,600$  V e  $-0,670$  V vs AgCl/Ag. Estes picos de redução correspondem a um composto desconhecido que provavelmente será um metabolito formado durante a degradação biológica do molinato.

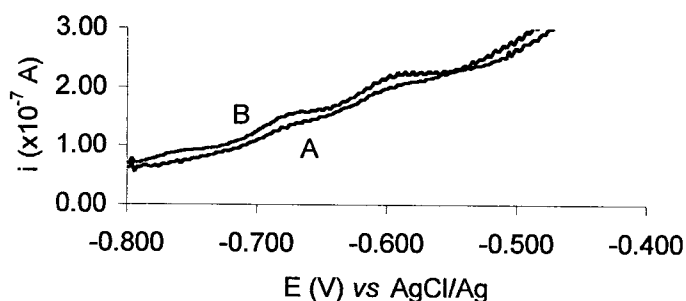


Figura 3.30 – Voltamogramas das amostras biológicas retiradas ao sobrenadante da cultura do consórcio III após: A – 46 e B – 48 horas de incubação. pH 7,4, frequência 150 Hz, potencial de deposição  $-0,800$  V aplicado durante 10 s.

Yañez-Sedeño e seus colaboradores em 1990 propuseram um método polarográfico sensível e selectivo para a determinação de pirimicarbe em água para uma gama de concentrações de  $3,0 \times 10^{-7}$  a  $8,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, tendo-se obtido um limite de detecção de  $2,8 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>.

Recorrendo à polarografia de pulso diferencial também foi estudado por Hitchman e seus colaboradores em 1984, o processo de redução do carbamato Bendiocarbe, confirmando-se que este composto apresenta um pico de redução a um potencial de  $-0,94$  V vs AgCl/Ag. Assim sendo, foi proposto um método analítico para a quantificação deste carbamato em solos para a gama de concentrações de 10 a 50 mg L<sup>-1</sup>.

Vários carbamatos não são directamente activos em eléctrodo de mercúrio, sendo necessário derivatizar o composto, de modo a torná-lo electroquimicamente activo, como

disso é exemplo, o carbamato carbaril, que apenas é reduzido quando sofre um processo de nitrção. O produto formado neste processo tem a capacidade de ser reduzido em elctrodo de mercúrio, tendo-se por isso desenvolvido um método electroanalítico para a determinação deste pesticida em águas naturais e solos para uma gama de concentrações entre 1,81 a 24,14 mg L<sup>-1</sup> (Pérez- López et al., 1994; Meyer et al., 1995).

Neste estudo verifica-se que a redução do molinato em elctrodo de mercúrio é um processo directo, não sendo necessário derivatizar, ao contrário da maioria dos carbamatos. Constata-se também que o método desenvolvido correlaciona-se bem com o HPLC, com a vantagem de não ser necessário acidificar as amostras.

## **Capítulo 4**

## **Conclusões**

---

---

## Conclusões

Neste trabalho desenvolveu-se um método analítico alternativo para dosar molinato ao longo de um processo de biodegradação efectuado por um consórcio bacteriano.

O método desenvolvido baseou-se em técnicas voltamétricas tendo-se efectuado o estudo electroquímico da oxidação e redução do molinato num eléctrodo de carbono vítreo, e num eléctrodo de mercúrio de gota suspensa, respectivamente.

O estudo electroanalítico da oxidação do molinato, usando como electrólito de suporte o meio de cultura, num eléctrodo de carbono vítreo permitiu concluir que este tiocarbamato é electroactivo com actividade máxima a pH 1,9 apresentando um pico de oxidação a um potencial elevado de +1,60 V vs AgCl/Ag sendo independente do pH.

A oxidação deste pesticida usando este tipo de eléctrodo é um processo controlado por difusão e é irreversível envolvendo 1 electrão/molécula, confirmando-se assim os estudos efectuados por Garrido em 2000.

Após se terem optimizado as condições de análise traçou-se uma curva de calibração, usando a técnica de voltametria de onda quadrada, para concentrações de molinato compreendidas entre  $4,0 \times 10^{-4}$  e  $9,5 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, com um limite de detecção de  $5,67 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>.

Atendendo a que a concentração de molinato nas amostras biológicas variam entre  $1 \times 10^{-3}$  e  $1 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, houve necessidade de alargar o estudo do comportamento electroquímico deste herbicida por um intervalo de varrimento de potencial até 3,00 V usando-se o acetonitrilo/perclorato de sódio (0,1 mol L<sup>-1</sup>) como electrólito de suporte.

A oxidação do molinato em meio orgânico apresenta três picos mal definidos, irreversíveis a potencial próximo de 1,80 V, 2,00 V e 2,40 V, não sendo possível propor um mecanismo de oxidação. Também neste caso o sinal electroquímico obtido é de baixa intensidade. Deste modo alargou-se o estudo electroquímico para a zona da redução do pesticida utilizando um eléctrodo de mercúrio de gota suspensa.

A redução do molinato utilizando este tipo de eléctrodo ocorre a um potencial de -0,340 V vs AgCl/Ag e é independente do pH. O processo de eléctrodo é controlado por

---

---

adsorção e é quase-reversível, confirmado por voltametria de onda quadrada e voltametria cíclica, respectivamente.

Após se terem optimizado as melhores condições de análise (pH 7,4, frequência 150 Hz a um potencial de deposição de  $-0,800$  V aplicado durante 10 s), traçou-se uma curva de calibração utilizando a voltametria de onda quadrada para soluções de molinato em meio de cultura para concentrações compreendidas entre  $5,0 \times 10^{-6}$  e  $9,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, com um limite de detecção de  $3,45 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>.

Esta técnica voltamétrica utilizando o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa foi aplicada na monitorização do decréscimo da concentração do molinato ao longo do processo de biodegradação.

Os resultados obtidos por esta metodologia foram comparados com os obtidos pelo método de comparação (HPLC) tendo-se obtido erros relativos inferiores a 9,6 %.

Usando o HPLC e a técnica voltamétrica foi possível detectar um composto desconhecido que talvez corresponda a um metabolito formado durante a biodegradação do pesticida em estudo.

Os resultados obtidos permitem concluir que o método electroquímico desenvolvido neste trabalho é, de facto, um método alternativo ao método de comparação (HPLC), sendo mais económico, mais rápido (1 minuto/análise) e menos poluente.



## **Capítulo 5**

## **Bibliografía**

- Aguilar, C., Borrull, F., Marcé, R.M. (1997), Determination of pesticides in environmental waters by solid-phase extraction and gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection, *Journal of Chromatography A*, **771**, 221-231.
- Baizer, M.M., Lund, H. (1993), *Organic electrochemistry*, 2ª edição, Marcel Dekker Inc, New York, E.U.A.
- Batley, G.E., Afgan, B.K. (1981), Voltammetric analysis of some carbamate pesticides, *J. Electroanal. Chem.*, **125**, 437-445.
- Bayer (1995), *Protecção das Plantas, Manual de Utilização*, Carnaxide.
- Brett, A.M.O., Garrido, E.M., Lima, J.L.F.C., Delerue-Matos, C. (1997), Electroanalytical determination of molinate, *Portugaliae Electrochimica Acta*, **15**, 315-319.
- Carrasco, J.M., Planta, M. (1987), Pesticide residues in lake Albufera, Valencia, Spain, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 752-753.
- Carrasco, J.M., Sabater, C., Alonso, J.L., Gonzalez, J., Botella, S., Amoros, I., Ibañez, M.J., Boira, H., Ferrer, J. (1992), Molinate decontamination processes in effluent water from rice fields, *The Science of the Total Environment*, **123/124**, 219-232.
- Casida, J.E., Kimmel, E.C., Ohkawa, H., Ohkawa, R. (1974), Sulfoxidation of thiocarbamate herbicides and metabolism of thiocarbamate sulfoxides in living mice and liver enzyme systems, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **5**, 1-11.
- Cerejeira, M.J., Pereira, T., Silva-Fernandes, A. (1998), use a new microbiotests with *Daphnia magna* and *Selenastrum capricornutum* immobilized forms, *Chemosphere*, **37**, 2949-2955.

---

---

Chapalamadugu, S., Chaudhry, G.R. (1992), Microbiological and biotechnological aspects of metabolism of carbamates and organophosphates, *Critical Reviews in Biotechnology*, **12**, 357-389.

Cochran, R.C., Formoli, T.A., Pfeifer, K.F., Aldous, C.N. (1997), Characterization of risks associated with the use of molinate, *Regulatory toxicology and pharmacology*, **25**, 146-157.

Correia, M.M.B. (1997), Influência da atrazina sobre a degradação biológica de efluentes vitícolas, Tese de Mestrado em Engenharia do Ambiente pela Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Correia, P., Boaventura, R., Reis, M.A., Nunes, O.C. (2001), Biological degradation of molinate: Kinetic characterization, *Proceedings of First European Bioremediation Conference*, Chania, Crete, Greece, 135-138.

Crosby, D.G. (1983), The fate of herbicides in California rice culture, *IUPAC pesticide chemistry: human welfare and the environment*, Pergamon Press, New York, 339-346.

Daffonchio, D., Baggi, G., Molinari, G.P., Ranalli, G., Sorlini, C. (1996), Effects of the herbicide molinate on the metabolic activities of a degradative *streptomyces griseus* strain, *J. Environ. Sci. Health B31*, **2**, 257-268.

Deuel, L.E., Turner, F.T., Brown, K.W., Price, J.D. (1978), Persistence and factors affecting dissipation of molinate under flooded rice culture, *J. Environ. Qual.*, **7**, 373-377.

Garrido, E.M. (2000), Estudo da oxidação electroquímica de herbicidas usados nas culturas de arroz. Doseamento em produtos fitofarmacêuticos, Tese de Doutoramento pela Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.



---

---

Garrido, E.M., Lima. J.L.C., Delerue-Matos, C.M., Brett, A.M.O. (1999), Electrochemical behaviour and square wave voltammetry of the rice herbicides, molinate, bensulfuron methyl, mefenacet and thiobencarb, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **75**, 149-157.

Gee, S.J., Miyamoto, T., Goodrow, M.H., Buster, D., Hammock, B.D. (1988), Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of the thiocarbamate herbicide molinate, *J.Agric. food Chem.*, **36**, 863-870.

Golovleva, L.A., Finkelstein, Z.I., Popovich, N.A., Skryabin, G.K. (1981), Transformation of ordram by microorganisms, *Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Biol.* **3**, 348,358.

Guiberteau, A., Díaz, T.G., Salinas, F., Ortiz, J.M. (1995), Indirect voltammetric determination of carbaryl and carbofuran using partial least squares calibration, *Anal. Chim. Acta*, **305**, 219-226.

Hitchman, M.L. Ramanathan, S., (1984) The determination of a carbamate insecticide in soil samples by differential pulse polarography, *Anal., Chim. Acta*, **157**, 349-354.

Imai, Y., Kuwatsuka, S. (1982), Degradation of the herbicide molinate in soils, *J. Pesticide Sci.*, **7**, 487-497.

Imai, Y., Kuwatsuka, S. (1986a), Characteristics of microflora degrading the herbicide molinate in soil, *J. Pesticide Sci.*, **11**, 57-63.

Imai, Y., Kuwatsuka, S. (1986b), The mode of metabolism of the herbicide molinate by four strains of microorganisms isolated from soil, *J. Pesticide Sci.*, **11**, 111-117.

Imai, Y., Kuwatsuka, S. (1986c), Metabolic pathways of the herbicide molinate in four strains of isolated soil microorganisms, *J. Pesticide Sci.*, **11**, 245-251.

---

---

Imai, Y., Kuwatsuka, S. (1988), Residues of the herbicide molinate and its degradation products in pot soil and rice plants, *J. Pesticide Sci.*, **13**, 247-252.

Instituto da Água da Região Norte (1998), Curso de curta duração: Contaminação orgânicos prioritários em águas e efluentes industriais, preparação e análise de amostras, 2º volume, Lisboa.

Jewell, W.T., Hess, R.A., Miller, M.G. (1998a), Testicular toxicity of molinate in the rat: metabolic activation via sulfoxidation, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **149**, 159-166.

Jewell, W.T., Miller, M.G. (1998b), Identification of a carboxylesterase as the major protein bound by molinate, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **149**, 226-234.

Jewell, W.T., Hess, R.A., Miller, M.G. (1999) Comparison of human and rat metabolism of molinate in liver microsomes and slices, *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 842-847.

Julli, M., Krassoi, F.R., (1995), Acute and chronic toxicity of the thiocarbamate herbicide, molinate, to the Cladoceran *Moina australiensis* Sars, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **54**, 690-694.

Klysheva, A.L., Golovleva, L.A., Ilyaletdinov, A.N. (1980), Transformation of ordram by microorganisms isolated from soils of Kazakhstan rice paddies, *Izv. Akad. Nauk. SSSR Ser. Biol.*, **4**, 29-34.

Knarr, R.D., Cooper, G.L., Brian, E.A., Kleinschmidt, M.G., Graham, D.G. (1985), Worker exposure during aerial application of a liquid and a granular formulation of ordram® selective herbicide to rice, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **14**, 523-527.

Kuroda, K., Yamaguchi, Y., Endo, G. (1992), Mitotic toxicity, sister chromatid exchange, and rec assay of pesticides, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **23**, 13-18.

Li, Q.X., Gee, S.J., McChesney, M.M., Hammock, B.D., Seiber, J.N. (1989), Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay and a gas chromatographic procedure for the determination of molinate residues, *Anal. Chem.*, **61**, 819-823.

Mabury, S.A., Cox, J.S., Crosby, D.G. (1996), Environmental fate of rice pesticides in California, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **147**, 71-117.

Machado, C. (1997), Herbicidas para a cultura do arroz, Direcção- Geral de Protecção das Culturas, Ministério da Agricultura do Desenvolvimento e das Pescas, Oeiras, 1997.

Meyer, A., Henze, G., (1995), Spurenanalyse von Pestiziden durch Stripping-Voltammetrie, Trace analysis of pesticides by stripping voltammetry, *GIT Fachz. Lab.*, **11**, 1051-1054.

Miller, J.N., Miller, J.C. (2000), *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, 4ª edição, Pearson Education, Londres, Reino Unido.

Ministério do Ambiente (2000), *Relatório do Estado do Ambiente 1999*, Direcção Geral do Ambiente.

Ministério do Ambiente e dos Recursos Naturais (1995), *Relatório do Estado do Ambiente 1994*, Direcção Geral do Ambiente.

Molinari, G.P., Sorlini, C., Daffonchio, D., Baggi, G., Ruffo, L. (1992), Activity and evolution of mixed microbial culture degrading molinate, *The Science of the Total Environment*, **123/124**, 309-323.

Nunes, O.C., Reis, M.A., Alves, A., Boaventura, R., Vital, J., Costa, M.S. (2000), Biological degradation of pesticides- molinate, *PRAXIS/P/BIO/12193/1998*.

Pepper, I.L., Gerba, C.P., Brusseau, M.L. (1996), *Pollution Science*, San Diego, California, Academic Press.

Puig, D., Barceló, D. (1994), Comparative study of various size-exclusion chromatographic columns for the clean-up of selected pesticides in soil samples, *Journal of Chromatography A*, **673**, 55-64.

Rajagopal, B.S., BrahmaPrakash, G.P., Reddy, B.R., Singh, U.D., Sethunathan, N. (1984), Effect and persistence of selected carbamate pesticides in soil, *Residue Rev.*, **93**, 1-199.

Redondo, M.J., Ruiz, M.J., Boluda, R., Font, G. (1996), Optimization of a solid-phase extraction technique for the extraction of pesticides from soil samples, *Journal of Chromatography A*, **719**, 69-76.

Ross, L.J., Sava, R.J. (1986), Fate of thiobencarb and molinate in rice fields, *J. Environ. Qual.*, **15**, 220-224.

Ruiz, M.J., Marzin, D. (1997a), Genotoxicity of six pesticides by salmonella mutagenicity test and sos chromotest, *Mutation Research*, **390**, 245-255.

Ruiz, M.J., Redondo, M.J., Font, G. (1997b), solid-phase extraction disks for determining pesticides from soil leachates, *Journal of Chromatography A*, **776**, 348-354.

Soderquist, C.J., Bowers, J.B., Crosby, D.G. (1977), Dissipation of molinate in a rice field, *J. Agri. Food Chem.*, **25**, 940-945.

Stevens, J.T., Sumner, D.D. (1991), *Herbicides, Handbook of pesticide toxicology*, Academic Press. Inc, San Diego, California, **3**, 1346-1348.

---

Thomas, V.M., Holt, C.L. (1980), The degradation of [ $^{14}\text{C}$ ] molinate in soil under flooded and nonflooded conditions, *J. Environ. Sci. Health*, **5**, 475-484.

Tjeerdema, R.S., Crosby, D.G. (1988), Disposition, biotransformation, and detoxication of molinate in whole blood of the common carp (*Cyprinus carpio*), *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **31**, 24-35.

Tomlin, C.D.S. (1997), *The pesticide Manual: A World Compendium*, 11<sup>a</sup> edição, British Croups Protection Council, Londres, Reino Unido.

Tsuda, T., Kojima, M., Harada, H., Nakajima, A., Aoki, S. (1998), Pesticides and their oxidation products in water and fish from rivers flowing into lake Biwa, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **60**, 151-158.

Ware, G.W. (1994), *The pesticide book*, Thomson Publications, Fresno, Arizona, E.U.A.

Yáñez-Sedeño, P. Pingarrón, J.M., Polo Díez, L.M. (1985), Determination of methylviologen (paraquat) by Differential-Puls-Polarographie, *Mikrochim. Acta*, III, 279-287.

Yarita, T., Nomura, A., Horimoto, Y., Gonda, S. (1996), On-line coupled supercritical fluid extraction and chromatography for the determination of thiocarbamate herbicides in soil matrix, *Journal of Chromatography A*, **750**, 175-181.

Younos, T.M., Weigmann, D.L. (1988), Pesticides: a continuing dilemma, *Journal Wat. Poll. Cont. Fed.*, **60**, 1199-1205.

Zeneca Agro (1999), *Manual Técnico*, Lisboa.

Zyakun, A.M., Nefedova, M.Y., Baskunov, B.P., Finkelstein, Z.I. (1983), The new products of ordram microbial degradation, *Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Biol.*, **1**, 126-130.



FACULDADE DE ENGENHARIA

UNIVERSIDADE DO PORTO

BIBLIOTECA



0000060193