



Universidade de Évora

Departamento de Química

Mestrado em Análises Químicas Ambientais

**“Desenvolvimento de métodos
eletroquímicos para quantificação de
pesticidas neonicotinóides em
amostras de água contaminadas”**

Dissertação de Mestrado

Realizado por:

Pedro Nogueira Duro nº 8439

Orientadores:

Professor Doutor Jorge Ginja Teixeira

Professora Doutora Ana Paula Pinto

Évora, março de 2013



Universidade de Évora

Departamento de Química

Mestrado em Análises Químicas Ambientais

**“Desenvolvimento de métodos
eletroquímicos para quantificação de
pesticidas neonicotinóides em
amostras de água contaminadas”**

Dissertação de Mestrado

Realizado por:

Pedro Nogueira Duro nº 8439

Orientadores:

Professor Doutor Jorge Ginja Teixeira

Professora Doutora Ana Paula Pinto

Évora, março de 2013

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível realizar sem o apoio e contribuição de algumas pessoas, a quem não posso deixar de expressar o meu agradecimento:

- Ao Professor Jorge Teixeira, pela oportunidade oferecida, pela competência, dedicação, disponibilidade e excelente orientação prestada durante o meu estágio.
- À Professora Ana Paula Pinto, como co-orientadora, no apoio e disponibilidade que sempre demonstrou ao longo da realização deste trabalho.
- À Alfredina e restantes pessoas do laboratório de Eletroquímica e Corrosão que sempre me ajudaram nas situações mais difíceis.
- À Escola Secundária de André de Gouveia (ESAG) de Évora, pelo empréstimo do posto voltamétrico *VA Stand da Metrohm*, utilizado nas medições voltamétricas.
- À empresa *Bayer*[®] por facultar as formulações de pesticidas utilizadas neste trabalho.
- A todos os meus amigos que direta ou indiretamente me ajudaram a conseguir atingir este objetivo.
- Aos meus pais e ao meu irmão, por terem feito todos os esforços, apoiando e incentivando, para eu ultrapassar todos os obstáculos nesta etapa. Um muito obrigado.

Abstract

“Development of electrochemical methods for the quantification of neonicotinoid pesticides in contaminated water samples”

The aim of this work consists in developing electrochemical methods to determine a particular class of pesticides – Neonicotinoid insecticides in spiked water samples.

In this work we purpose the development of a voltammetric procedure for determining Thiachloprid, an important neonicotinoid insecticide used worldwide and whose methods for its determination have not yet been thoroughly explored.

The developed procedure was based on the cathodic voltammetric response of Thiachloprid at a multi-wall carbon nanotubes film-modified glassy carbon electrode, in an aqueous solution of Britton-Robinson buffer.

Using cyclic voltammetry and square wave voltammetry it was confirmed that Thiachloprid undergoes an irreversible electro-reduction process at the modified glassy carbon electrode.

Under the optimized conditions (solution pH, pre-concentration conditions and frequency) a square wave voltammetry method was developed for the quantification of Thiachloprid. The proposed method presented a good performance for the determination of the insecticide and its applicability was demonstrated in spiked samples of creek water.

Resumo

Este trabalho consistiu em desenvolver métodos eletroquímicos capazes de determinar e quantificar uma classe particular de pesticidas - Inseticidas neonicotinóides, em amostras de água contaminadas.

O inseticida selecionado para este trabalho foi o Tiaclopride, um composto recente e cujos métodos de determinação foram pouco explorados, sendo do conhecimento geral o papel fundamental da monitorização ambiental e do controle de qualidade dos produtos agroalimentares.

O procedimento desenvolvido foi baseado na resposta voltamétrica do Tiaclopride na zona catódica, utilizando um eléctrodo de carbono vítreo modificado com um filme de nanotubos de carbono de parede múltipla, numa solução aquosa tampão de Britton-Robinson. Recorrendo à voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada, foi confirmado um processo de redução irreversível do composto no eléctrodo modificado. Sob as várias condições otimizadas, o método de voltametria de onda quadrada foi desenvolvido com sucesso para a deteção e quantificação de Tiaclopride, e a sua aplicação foi demonstrada em amostras de água contaminadas.

Lista de Abreviaturas e símbolos

APA- Associação Portuguesa do Ambiente

BDDE- Eléctrodo de diamante dopado com boro (*Boron doped diamond electrode*)

BR- Tampão Britton- Robinson

CNTs- Nanotubos de carbono (*Carbon nanotubes*)

CV- Voltametria cíclica (*Cyclic voltammetry*)

DHP- Dihexadecilhidrogenofosfato (*dihexadecyl hydrogen fosfate*)

E_{acc.}- Potencial de acumulação

E_p- Potencial de pico

EPA- Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (*United States environmental protection agency*)

E_{p,a}- Potencial de pico anódico

E_{p,c}- Potencial de pico catódico

FAO- Organização das Nações Unidas para a agricultura e alimentação (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*)

f- Frequência

GCE- Eléctrodo de carbono vítreo (*Glassy carbon electrode*)

I_p- Corrente de pico

I_{p,a}- Corrente de pico anódico

I_{p,c}- Corrente de pico catódico

IUPAC- União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LC 50- Índice de concentração letal necessário para matar metade indivíduos de uma população-teste

LD 50- Índice de dose letal necessário para matar metade indivíduos de uma população-teste

Log P_{ow}- Coeficiente de partição octanol-água

LSV- Voltametria de varrimento linear (*Linear sweep voltammetry*)

MWCNTs- Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (*Multi-walled carbon nanotubes*)

MWCNTs-BDDE- Eléctrodo de diamante dopado com boro modificado com um filme de nanotubos de carbono de paredes múltiplas

MWCNTs-GCE- Eléctrodo de carbono vítreo modificado com um filme de nanotubos de carbono de paredes múltiplas

SPCE- Eléctrodo de tinta impressa de carbono (*Screen-printed electrode*)

SWV- Voltametria de onda quadrada (Square wave voltammetry)

SWCNTs- Nanotubos de carbono de parede simples (*single walled carbon nanotubes*)

t- Tempo

t_{acc.}- Tempo de acumulação

TIA- Tiaclopride

v- Velocidade de varrimento

Índice geral

Agradecimentos.....	i
Abstract.....	ii
Resumo.....	iii
Lista de Abreviaturas e símbolos.....	iv
Índice geral.....	vi
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas.....	xi
1- Introdução.....	12
1.1- Pesticidas no contexto geral.....	12
1.2- Toxicidade de Pesticidas.....	14
1.3- Classificação de Pesticidas.....	14
1.4- Inseticidas.....	15
1.5- Inseticidas Neonicotinóides.....	16
1.5.1- Características dos neonicotinóides.....	17
1.5.2- Toxicidade.....	20
1.5.3- O enigma do declínio das abelhas.....	21
1.5.4- Tiaclopride.....	22
1.6- Métodos de determinação de pesticidas.....	25
1.6.1- Voltametria cíclica.....	27
1.6.2- Voltametria de onda quadrada.....	30
1.6.3- Tipos de elétrodos.....	32
1.6.3.1- Elédrodo de carbono vítreo.....	32
1.6.3.2- Elédrodos quimicamente modificados- Nanotubos de carbono.....	34
2- Parte Experimental.....	36
2.1- Introdução.....	36
2.2- Equipamento.....	36
2.2.1- Potencióstato.....	36
2.2.2- Célula para medições voltamétricas.....	37
2.2.3- Elédrodos de Trabalho.....	38
2.2.3.1- Não modificados	38
2.2.3.2- Modificados com nanotubos de carbono parede múltipla (MWCNTs).....	39
2.2.4- Elédrodo de Referência.....	40
2.2.5- Elédrodo Auxiliar.....	41
2.2.6- Equipamento auxiliar.....	42

2.3- Preparação de soluções.....	42
2.3.1- Eletrólitos de suporte.....	42
2.3.1.1- Tampão Fosfato.....	42
2.3.1.2- Tampão Britton-Robinson.....	43
2.3.2- Tiaclopride.....	43
2.4- Procedimento experimental.....	44
2.4.1- Medições voltamétricas.....	44
2.4.2- Teste de dopagem para a amostra ambiental.....	45
3- Apresentação e Discussão de resultados.....	47
3.1- Estudos prévios.....	47
3.1.1- Estudo do comportamento eletroquímico do tiaclopride no eletrodo de diamante dopado com boro (BDDE).....	47
3.1.2- Estudo do comportamento eletroquímico do tiaclopride no eletrodo de tinta de carbono impressa (SPCE).....	49
3.2- Estudo do comportamento voltamétrico do tiaclopride utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNTs.....	50
3.2.1- Voltametria cíclica.....	51
3.2.2- Voltametria de onda quadrada.....	53
3.2.3- Estudo de variáveis eletroquímicas que influenciam a resposta do TIA no eletrodo de MWCNTs-GCE.....	54
3.2.3.1- Estudo do efeito de pH.....	54
3.2.3.2- Efeito da velocidade de varrimento.....	56
3.2.3.3- Efeito da frequência.....	59
3.2.3.4- Efeito do tempo e potencial de acumulação.....	60
3.2.3.5- Efeito do eletrólito de suporte.....	62
3.2.3.6- Estudo da influência de potenciais interferentes na resposta voltamétrica do tiaclopride.....	63
3.3- Quantificação de Tiaclopride utilizando o MWCNTs-GCE.....	65
3.3.1-Curva de calibração.....	65
3.3.2- Determinação de tiaclopride em amostra ambiental.....	67
4 – Conclusões.....	69
5 – Perspetivas futuras.....	71
6- Referências bibliográficas.....	72
7- Anexos.....	77

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Vias de dispersão de pesticidas no ambiente (adaptado da ref. ^[19]).....	12
Figura 1.2 - Exemplos de espécies de 8 ordens diferentes de insetos: 1) Ischnura elegans (Odonata), 2) Gammarus pulex (Amphipoda), 3) Cloeon dipterum (Ephemeroptera), 4) Nemoura cinérea (Plecoptera), 5) Limmephilus lunatus (Trichoptera), 6) Enochrus testaceus (Coleoptera), 7) Asellus aquaticus (Isopoda), 8) Notonecta glauca (Heteroptera) ^[20]	17
Figura 1.3 - Diferenças nas estruturas dos neonicotinóides de primeira e segunda geração (adaptado da ref. ^[17]).....	18
Figura 1.4 - Moléculas de Imidaclopride e Tiaclopride.....	23
Figura 1.5 - Estrutura do Tiaclopride em 2D (esquerda) e em 3D (direita).....	23
Figura 1.6 - Aspectos característicos da voltametria cíclica. (a) Ciclo de potencial ao longo do tempo, com o potencial inicial e o potencial de inversão. A voltametria cíclica pode consistir em um ou mais ciclos, assim como o potencial inicial não tem de ser obrigatoriamente negativo. (b) Voltamograma cíclico obtido mostrando as medições dos picos de corrente (I_p) e os picos de potencial (E_p). (adaptado da ref. ^[28])	28
Figura 1.7 - Forma dos voltamogramas cíclicos numa reação reversível e irreversível (adaptada da ref. ^[29]).....	29
Figura 1.8 - Voltamogramas cíclicos obtido a velocidade de varrimento (a) Rápida (b) Lenta (adaptada da ref. ^[28]).....	29
Figura 1.9 - Esquema de aplicação de potenciais no voltametria de onda quadrada (SWV) ^[30]	31
Figura 1.10 - Perfil voltamétrico de Corrente (I) vs. Potencial (E) (adaptado da ref. ^[29]).....	31
Figura 1.11 - Intervalo de potencial aproximado para os elétrodos de platina (Pt), mercúrio (Hg), Carbono Vítreo (C) e diamante dopado com Boro (BDDE) ^[29]	32
Figura 1.12 - Representação estrutural esquemática de um plano basal do carbono vítreo. (a) Visão frontal (b) Visão lateral ^[33]	33
Figura 1.13 - Representação esquemática dos nanotubos de carbono- (a) Parede Múltipla (MWCNTs) e (b) Parede Simples (SWCNTs) ^[36]	35
Figura 2.1 - Potencióstato/Galvanostato AUTOLAB PGSTAT302N (em baixo) e a interface eletrónica IME663 (em cima).....	36
Figura 2.2 - Posto eletroquímico.....	37

Figura 2.3 - Célula de vidro.....	37
Figura 2.4 - Eléctrodo de diamante dopado com boro.....	38
Figura 2.5 - Eléctrodo de tinta impressa de carbono.....	38
Figura 2.6 - Eléctrodo de carbono vítreo.....	39
Figura 2.7 - Esquema ilustrativo do procedimento experimental na modificação do eléctrodo de carbono vítreo.....	40
Figura 2.8 - Eléctrodo de referência.....	40
Figura 2.9 - Eléctrodo auxiliar.....	41
Figura 2.10 – Célula eletroquímica utilizada nas determinações voltamétricas.....	41
Figura 2.11 - Local de recolha da amostra ambiental.....	45
Figura 2.12 – Esquema do procedimento adotado para a análise voltamétrica da amostra dopada	46
Figura 3.1 - Voltamogramas cíclicos obtidos para 0 μM de TIA (linha verde) e 20 μM de TIA (linha verde) no eléctrodo de BDDE em tampão Britton-Robinson 0.1 M pH 7, a $v= 100 \text{ mV/s}^{-1}$	48
Figura 3.2 - Voltamogramas de SWV obtidos para o eléctrodo de BDDE (a) modificado com MWCNTs e (b) sem ser modificado, na presença de 40 μM de TIA em tampão BR 0.1 M pH 7, com $f=25 \text{ Hz}$, $t_{\text{acc.}}=20 \text{ seg}$, $E_{\text{acc.}}= -0.8 \text{ V}$	49
Figura 3.3 - Voltamogramas cíclicos obtidos em 100 μM de TIA no eléctrodo de tinta de carbono impressa modificado com MWCNTs (linha laranja) e sem ser modificado com MWCNTs (linha verde), em tampão BR 0.1 M pH 6.5, a $v=100 \text{ mV/s}^{-1}$	50
Figura 3.4 - Voltamogramas cíclicos da solução tampão BR 0.1 M pH 7 no GCE (a), da solução tampão com 40 μM de TIA no GCE (b) e MWCNTs-GCE (c); Velocidade de varrimento: 100 mV/s^{-1}	51
Figura 3.5 - Voltamograma cíclico de 20 ciclos sucessivos obtido com o eléctrodo de MWCNTs-GCE com tampão BR 0.1 M pH 7, $v= 100 \text{ mV/s}^{-1}$	52
Figura 3.6 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o intervalo de [TIA]: 1,64 - 4,76 mg/L, em eléctrodo de MWCNTs-GCE no tampão BR 0.1 M pH 7; $E_{\text{acc.}}=-1 \text{ V}$, $T_{\text{acc.}}= 20 \text{ s}$, $f=50 \text{ Hz}$	53
Figura 3.7 - Efeito do pH do meio na resposta voltamétrica de TIA, num eléctrodo de MWCNTs-GCE. [TIA]= 19.6 μM ; pH: 6.24, 6.51, 7.07 e 7.48.....	54

Figura 3.8 - Efeito do pH na intensidade de corrente de pico (I_p) e no pico de potencial (E_p) de 19.6 μM de TIA; pH: 5.94, 6.24, 6.51, 7.07, 7.48, 7.65, 8.44 e 8.89.....	55
Figura 3.9 - Efeito da velocidade de varrimento na intensidade de corrente de pico de 40 μM TIA no elétrodo de MWCNTs-GCE, em tampão BR 0.1 M pH 7, no intervalo de valores indicados no gráfico.....	56
Figura 3.10 - Variação da intensidade de corrente de pico (I_p) de TIA em função da raiz quadrada da velocidade varrimento ($v^{1/2}$ / (V s^{-1}) ^{1/2}). Condições experimentais idênticas às reportadas na Figura 3.9.....	57
Figura 3.11 - Relação log I_p vs log v. Condições experimentais idênticas às reportadas na Figura 3.9.....	58
Figura 3.12 - Relação log E_p vs log v. Condições experimentais idênticas às reportadas na Figura 3.9.....	58
Figura 3.13 - Variação da intensidade de corrente de pico dos voltamogramas de SWV em função da frequência; [TIA] = 40 μM	59
Figura 3.14 - Variação da intensidade de corrente de pico dos voltamogramas de SWV em função do tempo de acumulação (tacc.); Eacc.= -0.8V, Frequência= 50 Hz, [TIA] = 40 μM	60
Figura 3.15 - Variação da intensidade de corrente de pico dos voltamogramas de SWV em função do potencial de acumulação (Eacc.); tacc.= 20 s, Frequência= 50 Hz, [TIA] = 40 μM	61
Figura 3.16 - Voltamogramas de SWV para os dois eletrólitos de suporte: Britton-Robinson 0.1 M pH 7 e Fosfato 0.1 M pH 7; [TIA] = 40 μM , v = 100 mV/s^{-1}	63
Figura 3.17 - Estruturas químicas dos interferentes: terbutilazina (a) e tembotrione (b).....	64
Figura 3.18 - Variação do sinal de TIA (%) em função da concentração de interferente (mg/L^{-1}), usando as condições otimizadas para a quantificação voltamétrica do TIA. O gráfico inserido na figura apresenta os voltamogramas de SWV obtidos para o tiaclopride e o interferente terbutilazina.....	65
Figura 3.19 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o intervalo de concentrações de TIA entre 4.35 μM e 18.84 μM . O voltamograma a azul representa a resposta para o tampão BR 0.1 M pH 7.....	66
Figura 3.20 - Curva de calibração do TIA, no intervalo de concentração 4.35 -18.84 μM (1.10 - 4.76 mg/L^{-1}).....	66
Figura 3.21 - Curva de calibração utilizando o método da adição padrão, obtida na determinação de TIA na amostra ambiental.....	68

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Classificação de toxicidade dos pesticidas segundo a EPA ^[5]	14
Tabela 1.2 - Classificação de pesticidas e organismo-alvo.....	15
Tabela 1.3 - Comparação das propriedades físicas dos neonicotinóides e da nicotina ^[21]	19
Tabela 1.4 - Perfil toxicológico dos neonicotinóides e da nicotina ^[21]	20
Tabela 1.5 - Características e propriedades do Tiaclopride na formulação comercial ^[5]	24
Tabela 1.6 – Perfil toxicológico do Tiaclopride comercial ^[5]	25
Tabela 2.1 – Massas utilizadas na preparação de 250 mL da solução tampão fosfato 0.1 M pH 7.....	43
Tabela 2.2 - Condições instrumentais utilizadas na voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada.....	44
Tabela 3.1 – Resultados obtidos para a gama de linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e % de recuperação de TIA na amostra dopada.....	68

1- Introdução

1.1- Pesticidas no contexto geral

De acordo com a IUPAC os pesticidas são substâncias químicas, naturais ou sintéticas, utilizadas com a finalidade de prevenir, controlar ou eliminar pragas, tais como insetos, fungos, ervas daninhas, ácaros, bactérias, nematoides, roedores, entre outras formas de vida, que são indesejáveis ou prejudiciais às atividades económicas agroflorestais e de produção e sanidade animal. Basicamente os pesticidas são usados na agricultura com os seguintes objetivos fundamentais: fazer produção em larga escala com o maior rendimento possível, boa qualidade dos produtos, redução do trabalho manual e dos gastos com energia.

O uso crescente destes agroquímicos, especialmente herbicidas e inseticidas na agricultura, produção animal e outras atividades, acarreta também consequências colaterais muito sérias e perigosas para o Homem e para outros seres vivos ^[1]. Os produtos resultantes do seu metabolismo ou degradação originam resíduos que se podem infiltrar e acumular no ambiente, sendo frequente encontrar vestígios em águas superficiais ou lençóis freáticos, no solo, em produtos agrícolas e agroalimentares e também no ar. A Figura 1.1 esquematiza as vias de disseminação mais comuns de pesticidas no ambiente.

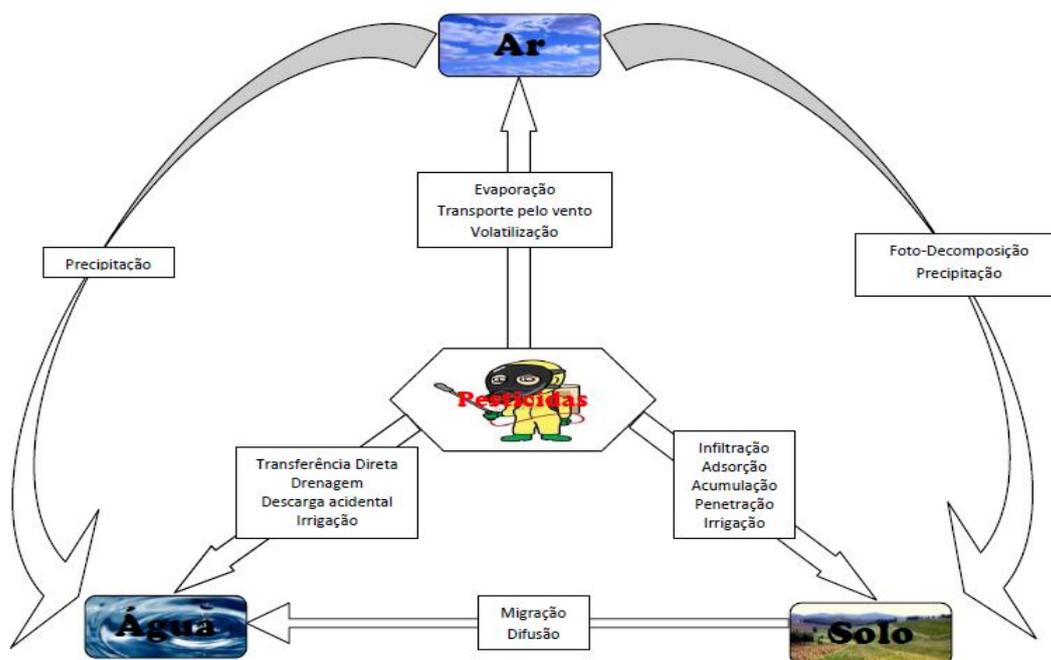


Figura 1.1 – Vias de dispersão de pesticidas no ambiente (adaptado da ref. ^[19]).

Os riscos para o meio ambiente, resultantes da aplicação de pesticidas, são dependentes das suas propriedades físicas e químicas, de processos de dissipação e degradação e de outros fatores como o grau de toxicidade, a quantidade de pesticida aplicada, a formulação utilizada, método e tempo de aplicação e a extensão do seu uso. Os efeitos da aplicação de pesticidas são bastante variados e de acordo com um inquérito realizado pela Federação Europeia de Sindicatos dos Trabalhadores Agrícolas, os efeitos mais comuns nos trabalhadores expostos a este tipo de substâncias incluem: dores de cabeça/enxaquecas, vômitos, dores de estômago e diarreia ^[2]. Outros estudos indicaram que a exposição a pesticidas está associada, a longo prazo, com vários problemas de saúde, tais como: cancro, problemas de memória, problemas dermatológicos, dificuldades respiratórias, depressão, etc ^[3].

O consumo de pesticidas no mundo tem aumentado exponencialmente nos últimos anos. Atendendo à dimensão territorial, Portugal, relativamente a outros países é um dos grandes consumidores de pesticidas na Europa. Embora exista alguma controvérsia em torno destes dados, pela dificuldade em obter informações credíveis e coerentes neste domínio, a análise comparativa do consumo de pesticidas em Portugal e nos outros países da União Europeia (UE), atribui a Portugal um lugar de destaque, comparando-se com países como a França e Itália ^[4]. Segundo dados da Associação Portuguesa do Ambiente (APA), num relatório do estado do ambiente referentes a 2012, as vendas de produtos fitofarmacêuticos em Portugal atingiram as 13 795 toneladas, expressas em teor de substância ativa, o que representa um decréscimo no volume de vendas de cerca de 1 % relativamente a 2009.

Em resultado do consumo elevado e à semelhança do que acontece noutros países, tem havido em Portugal alguma preocupação no sentido de limitar a utilização de pesticidas, procurando otimizar-se os seus efeitos positivos e eliminar ou reduzir os seus efeitos adversos. Para isso, a legislação referente a pesticidas tem vindo a ser continuamente ajustada por todos os estados da União Europeia, com esforços comuns a serem levados a cabo no sentido de adotar medidas oficiais adequadas ao controlo na monitorização e fiscalização de pesticidas. Este controle na monitorização de resíduos de pesticidas assume extrema importância quando alguns compostos têm uma elevada toxicidade, tanto para o ambiente como para o ser humano.

1.2- Toxicidade de Pesticidas

Como já foi referido os pesticidas podem contaminar os produtos agrícolas e, dependendo do grau de contaminação, podem trazer danos irreversíveis à saúde humana, podendo causar efeitos adversos ao sistema nervoso central e periférico, além de problemas cancerígenos.

A toxicidade de pesticidas é medida através do valor de LD 50 (dose de pesticida administrada de que resulta na morte de 50 % da totalidade dos animais testados), que de acordo com os critérios da EPA, os classifica em grupos distintos de toxicidade dependendo da via de introdução no organismo: Oral, Dérmica ou por Inalação (Tabela 1.1) ^[5]. De acordo com estes critérios, a Tabela 1.1 apresenta as classificações relativas à toxicidade de pesticidas.

Tabela 1.1 – Classificação de toxicidade dos pesticidas ^[5].

Classificação	Classe	LD ₅₀ 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

1.3- Classificação de Pesticidas

É indiscutível que todos os pesticidas têm a função comum de bloquear um processo metabólico vital dos organismos para os quais são tóxicos. Nesse contexto, entre as mais variadas formas de classificação de pesticidas, a Tabela 1.2 apresenta a mais comum com o organismo-alvo de cada tipo de pesticida.

Tabela 1.2 – Classificação de pesticidas e organismo-alvo.

Tipo de Pesticida	Organismo-alvo
Acaricida	Ácaros
Algicida	Algas
Avicida	Pássaros
Bactericida	Bactérias
Fungicida	Fungos
Herbicida	Ervas e Plantas
Inseticida	Insetos
Raticida	Roedores (ratos)
Nematicida	Nematoides

1.4- Inseticidas

Os inseticidas são uma classe de pesticidas com o objetivo de prevenir, destruir e controlar pragas de insetos, formigas ou larvas. Durante muitos anos o controle de pesticidas apenas estava associado a inseticidas. As formulações comerciais foram produzidas como uma tentativa de melhorar o controle de insetos, mas efeitos indesejáveis foram surgindo durante este tempo, como a elevada atuação tóxica e resistência dos insetos.

Segundo a FAO (Organização de Alimentação e Agricultura das Nações Unidas), em 2010, o uso de inseticidas era estimado em mais de 1 milhão de toneladas /ano, sendo 28 % do total de pesticidas usado. A maior parte dos inseticidas são produzidos e usados na América do Norte, Europa e Japão, mas países como a China e Índia perfilam-se como líderes na produção de inseticidas para os próximos anos. Apesar do uso de inseticidas em países desenvolvidos se ter mantido constante ou mesmo diminuído, devido a restrições na legislação em favor de novas técnicas agrícolas, os países em desenvolvimento continuam a produzir grandes quantidades de inseticidas antigos e com elevada toxicidade. Por exemplo, na Europa os inseticidas usados

perfazem 7% de todos os pesticidas, 19% nos EUA, enquanto nos países asiáticos 38% e em África 86% [6].

Antes de surgir a necessidade do uso de inseticidas, eram utilizadas substâncias químicas altamente tóxicas, como o arsénio, o mercúrio e o tabaco. Durante a segunda guerra mundial, foram desenvolvidos vários gases tóxicos para serem usados como arma, e num desses foi possível observar um efeito tóxico para os insetos, daí surgirem os inseticidas. Em 1948, o cientista Paul Muller ganhou o prémio Nobel da Medicina, tendo também descoberto o mais famoso inseticida de todos os tempos, o DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano).

O modo de ação mais comum dos inseticidas é ao nível do sistema nervoso, bloqueando os processos fisiológicos e bioquímicos dos insetos. Os inseticidas podem ser classificados em grupos químicos, entre os quais: Organofosforados, Carbamatos, Organoclorados, Piretróides e Neonicotinóides.

1.5- Inseticidas Neonicotinóides

Hoje em dia os neonicotinóides são uma das categorias mais importantes de inseticidas introduzidas no mercado desde os piretróides sintéticos. Na última década estes compostos tiveram uma grande expansão, tornando-se na maior classe de inseticidas usada na prevenção, controlo e tratamento de pestes quer a nível veterinário como ambiental [7]. Estão registados em mais de 120 países, sendo bastante eficazes no controlo de insetos da ordens *Hemiptera* e *Coleoptera*, como os afídios, moscas-brancas, fulgoromorfos que são insetos que se parecem com as folhas e plantas como por exemplo o gafanhoto, tripes (insetos da ordem da *Thysanoptera*), joaninhas, besouros e escaravelhos [8].

A Figura 1.2 apresenta alguns exemplos de espécies mais vulneráveis aos inseticidas neonicotinóides.

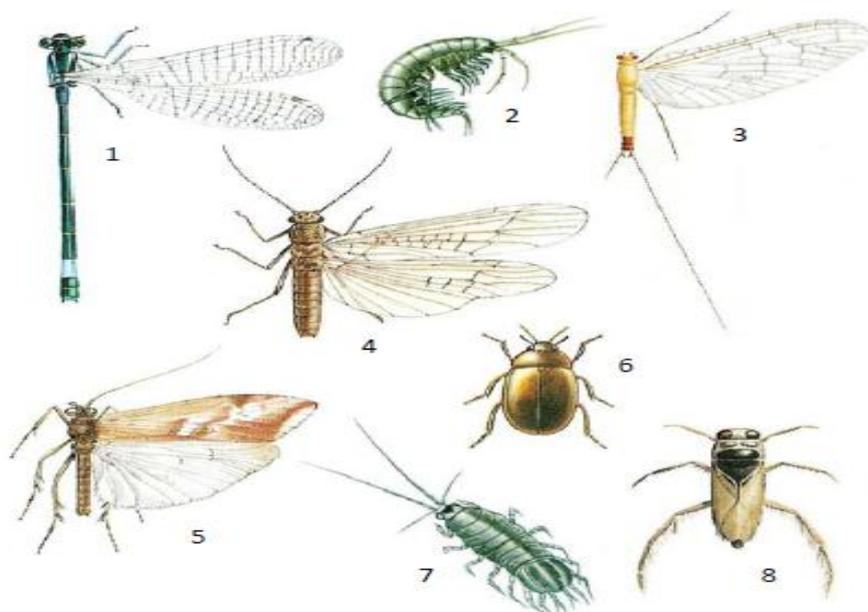


Figura 1.2 – Exemplos de espécies de 8 ordens diferentes de insetos: 1) *Ischnura elegans* (Odonata), 2) *Gammarus pulex* (Amphipoda), 3) *Cloeon dipterum* (Ephemeroptera), 4) *Nemoura cinérea* (Plecoptera), 5) *Limmephilus lunatus* (Trichoptera), 6) *Enochrus testaceus* (Coleoptera), 7) *Asellus aquaticus* (Isopoda), 8) *Notonecta glauca* (Heteroptera) ^[20].

Os compostos desta classe atuam como agonistas de recetores nicotínicos dos insetos e têm como principal representante o Imidaclopride, sendo o Tiaclopride também um composto de grande relevo nesta classe ^[7]. A aparente segurança destes compostos deve-se, em grande parte, à sua grande seletividade para atuar nos recetores nicotínicos dos insetos, sendo inativos no dos vertebrados e por este motivo apresentam menos efeitos secundários que outras classes de inseticidas ^[9,10].

1.5.1- Características dos neonicotinóides

Os neonicotinóides tiveram origem na molécula de nicotina, um alcalóide de ocorrência natural proveniente das folhas da planta do tabaco (*Nicotiana tabacum*), onde atinge níveis entre 2 a 7 %, e é um constituinte ativo do fumo do tabaco.

Na sua forma concentrada é também usada como inseticida, já que é um agente tóxico nervoso potente.

Na década de 1980 esta classe de inseticidas foi desenvolvida pela Shell e em 1990 pela Bayer ^[11]. A Shell demonstrou pela primeira vez a capacidade inseticida dos compostos, sendo a base deste estudo um derivado heterocíclico do nitrometileno, que resultou na descoberta da Nitiazina. Foi assim o primeiro neonicotinóide e que serviu de composto-base para a síntese de todos os neonicotinóides, apesar de nunca

ter sido comercializado. Em 1990 foi introduzido no Japão e na Europa o primeiro neonicotinóide desta classe, o Imidaclopride, sendo comercializado nos EUA em 1992 [12]. O Imidaclopride é atualmente o composto mais usado a nível mundial, como inseticida. É um inseticida sistêmico, usado nas plantações de arroz, algodão, batatas, vegetais e pomares, para o controlo de insetos no solo tais como moscas brancas e térmitas, com elevada taxa de sucesso [13]. Outros compostos pertencentes a esta classe são o Acetamipride, Tiametoxam, Nitempiram, Clotianidina, Dinotefurano e o Tiaclopride. O Acetamipride, Tiametoxam e o Tiaclopride foram introduzidos no mercado apenas em 2002 (Figura 1.3) [17].

Estruturas base de Neonicotinóides



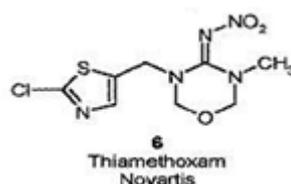
Neonicotinóides de 1ª geração

Sub-classe: Compostos cloronicotinil



Neonicotinóides de 2ª geração

Sub-classe: Compostos Tianicotinil



Produtos Neonicotinóides Desenvolvidos

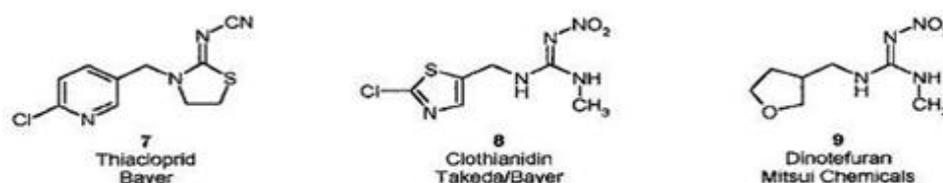


Figura 1.3 - Diferenças nas estruturas dos neonicotinóides de primeira e segunda geração (adaptado de [17]).

Os estudos de relação estrutura-atividade provaram que o aumento da atividade dos compostos neonicotinóides de segunda geração, relativamente aos de primeira, se deveu essencialmente à substituição do anel imidazolidina pelo anel tiazolidina ou oxadiazinano e o cloropiridinilmetil pelo clorotiazolilmetil ou tetra-hidrofuranometil. Alterações no nitrometileno, nitroguanidil ou cianoamidina provocam foto-estabilidade e formação de produtos muito ativos [14,15,16]. As duas gerações de neonicotinóides distinguem-se pelo facto de os de 1ª geração possuírem um grupo cloropiridinil, o qual foi substituído pelo clorotiazolidil nos de segunda geração [17,18]. Em 1998, a Novartis® lançou o Tiametoxam, um neonicotinóide com uma estrutura diferente, original e com grande atividade inseticida. O Tiametoxam foi o primeiro neonicotinóide de segunda geração e possui o grupo tianicotinil característico desta classe. Outros três produtos foram desenvolvidos pela Bayer®: o Tiaclopride, a Clotianidina e o Dinotefurano [17].

Tabela 1.3 - Comparação das propriedades físicas dos neonicotinóides e da nicotina (adaptado de [21]).

Composto	Massa Molar (g/mol⁻¹)	Solubilidade em Água (g/L)	Log P_{ow} a 21°C
Neonicotinóides			
Acetamipride	222.7	4.25	0.80
Clotianidina	249.7	0.30 - 0.34	0.7
Dinotefurano	202.2	54.3	-0.64
Imidaclopride	255.7	0.61	0.57
Nitempiram	270.7	> 590	-0.66
Nitiazina	160.1	200	-0.60
Tiaclopride	252.7	0.185	1.26
Tiametoxam	291.7	4.1	-0.13
Nicotinóide			
Nicotina	162.2	∞	0.93 (base livre)

Desde a introdução no mercado do Imidaclopride, os neonicotinóides tiveram o maior crescimento alguma vez visto na classe dos inseticidas. Este enorme sucesso pode ser explicado devido às características únicas, quer químicas quer biológicas destes compostos (Tabela 1.3). Entre elas sobressaem o seu largo espetro de ação, as pequenas quantidades necessárias para atuarem e a grande seletividade para os insetos.

1.5.2- Toxicidade

Os neonicotinóides têm propriedades físicas e toxicológicas únicas quando comparados com as anteriores classes de inseticidas. O perfil toxicológico de cada composto neonicotinóide e da nicotina apresentam-se na Tabela 1.4.

O índice de dose letal 50 (LD₅₀) para os ratos varia entre os 50-60 mg/Kg para a nicotina e mais de 5000 mg/Kg para a Clotianidina. Tendo em conta a análise toxicológica e de toxicidade crónica destes compostos para os ratos verifica-se que estes compostos não apresentam níveis capazes de provocar efeitos adversos ^[21]. O Tiaclopride e o Tiametoxam têm os valores mais baixos de NOAEL (nível máximo de exposição sem efeitos adversos), entre 0,6-1,2 mg/Kg/dia e são compostos potencialmente cancerígenos para os humanos. Valores intermédios são observados para o Acetamipride, Clotianidina e Imidaclopride, enquanto o Dinotefurano apresenta os valores mais elevados. Dos neonicotinóides comercializados, o Acetamipride, o Imidaclopride e o Tiaclopride são os mais tóxicos para as aves, sendo o Tiaclopride o mais tóxico para os peixes ^[21].

Tabela 1.4 - Perfil toxicológico dos neonicotinóides e da nicotina ^[21].

Composto	Mamífero			Pássaros	Peixes
	LD ₅₀ Oral (mg/Kg)	NOAEL ^a (mg/Kg/dia)	Cancerígeno	LD ₅₀ Oral (mg/Kg)	LC ₅₀ (ppm)
Neonicotinóides					
Acetamipride	182	7.1	Não	180	> 100
Clotianidina	> 5000	9.8	Não	> 2000	> 100
Dinotefurano	2400	127	Não	> 2000	> 40
Imidaclopride	450	5.7	Não	31	211
Nitempiram	1628	-	Não	> 2250	> 1000
Nitiazina	300	-	Não	-	150
Tiaclopride	640	1.2	Sim	49	31
Tiametoxam	1563	0.6	Sim	1552	> 100
Nicotinóide					
Nicotina	50-60	-	-	Tóxico	4

a) No Observed Adverse Effect Level

1.5.3- O enigma do declínio das abelhas

Muitos investigadores acreditam que o declínio no número das abelhas que vem ocorrendo nos últimos anos pode estar relacionado com a popularização de inseticidas neonicotinóides, amplamente utilizados nos últimos 20 anos. Grande parte dos pesticidas utilizados atualmente prejudicam as abelhas, mas ao contrário do que já se anunciava, a exposição a esses pesticidas pode não ser suficiente para provocar os colapsos de colónias de abelhas por todo o mundo, não resolvendo assim um dos enigmas ecológicos que mais chamaram a atenção nos últimos tempos. Recentemente alguns investigadores puseram em causa estudos anteriores apontando falhas nos resultados da mortalidade das abelhas. Concluíram que as falhas na estimativa dos neonicotinóides colapsarem as colónias de abelhas se devia ao facto de não terem em conta a taxa de recuperação, por parte das colónias, das perdas individuais de abelhas. É verdade que a ingestão de inseticidas, com neonicotinóides como agente ativo, aumenta a taxa de mortalidade das abelhas, mas os trabalhos anteriores estariam a utilizar uma taxa de nascimento demasiado baixa na estimativa do colapso das colónias.

Michael Henry et Al. ^[22] analisou a relação inseticida entre o tiametoxam e a abelha-europeia (*Apis mellifera*), e descobriu que o pesticida tem uma ação no mecanismo de orientação dos insetos, que não os permite sair da colmeia para buscar alimento e depois voltar ao grupo. Na primeira parte da pesquisa, foram colocados transmissores nas abelhas para rastreá-las e parte dos insetos foi submetida a uma dieta com tiametoxam, enquanto a outra parte foi alimentada normalmente. O resultado mostrou que as abelhas nutridas com tiametoxam tinham duas a três vezes mais hipóteses de se perderem e não voltarem à colmeia do que as que não haviam sido expostas ao pesticida. Na segunda parte da pesquisa, os investigadores criaram um modelo baseado nos dados do teste para estimar como a colmeia seria afetada pela perda dessas abelhas. Sob essas condições, concluíram que a população da comunidade poderia cair 60 % ou mais, dependendo de quantas abelhas operárias eram expostas ao tiametoxam.

Já numa investigação conduzida por *Penelope Whitehorn et Al.* ^[23] foi observada a ligação entre o imidaclopride e a *Bombus terrestris*, popularmente conhecida como mamangaba ou abelhão. Os resultados mostraram que o pesticida tem um efeito

direto na busca de alimentos por parte das abelhas-operárias, e afeta também o desenvolvimento de abelhas-rainha, responsáveis pela criação de novas colmeias.

Na fase inicial da pesquisa, os investigadores expuseram um grupo de abelhas ao imidaclopride, e passadas seis semanas, pesaram as colmeias que haviam sido expostas e fizeram o mesmo com ninhos de abelhas que não haviam entrado em contato com o inseticida. Os resultados mostraram que as colmeias das abelhas expostas pesavam menos 8 a 12 %, o que indicava que as abelhas tinham recolhido menos alimento. De seguida o estudo analisou o número de abelhas-rainha que se desenvolveram em cada colónia, e chegou a conclusões alarmantes: as colmeias expostas ao imidaclopride haviam produzido uma ou duas rainhas, enquanto as que não tinham sido expostas tinham criado 14, ou seja, houve uma redução de 85 % no número de rainhas.

Em conclusão, sabe-se que os neonicotinóides afetam as abelhas e são uma das causas significativas mas não a única, já que os problemas com parasitas, degradação de habitat e uso excessivo de outras classes de pesticidas continuarão a trazer problemas. Algumas autoridades governamentais como a EPA, declararam que continuarão a fazer mais pesquisas para avaliar os riscos que os neonicotinóides apresentam, e que irão proceder a mudanças na legislação caso seja necessário.

1.5.4 - Tiaclopride

O tiaclopride é um inseticida neonicotinóide, pertencendo à classe química dos clonicotinóides. O seu mecanismo de ação é idêntico ao dos outros neonicotinóides e atua seletivamente no sistema nervoso dos insetos, como agonista de recetores nicotínicos da acetilcolina (nAChR). O tiaclopride foi desenvolvido pela Bayer® CropScience para uso agrícola e foi obtido por síntese, tendo por base a molécula de imidaclopride (Figura 1.4), sendo particularmente útil em horticultura e em modernos sistemas de proteção de cultura. Este composto apresenta grande atividade inseticida, combinando essa atividade com um perfil eco biológico favorável e sem apresentar qualquer dano para as abelhas.

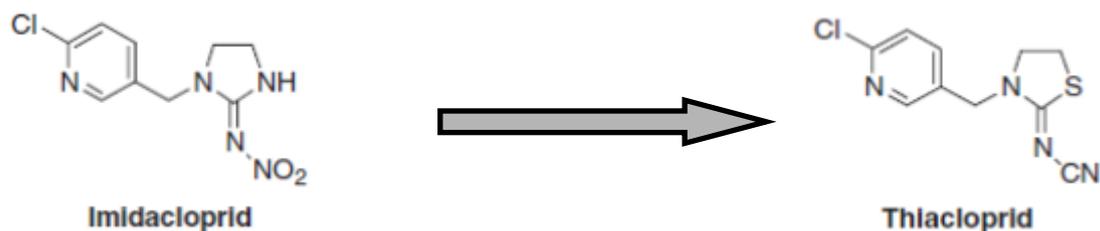


Figura 1.4 – Moléculas de Imidaclopride e Tiaclopride

O tiaclopride possui um anel 1,3-tiazolidina (Z=S) e foi o primeiro inseticida cloronicotinil a ter atividade não apenas contra afídios e moscas brancas mas também contra besouros, picadores de folhas e *Cydia pomonella* ^[24]. A Figura 1.5 apresenta a estrutura do tiaclopride.

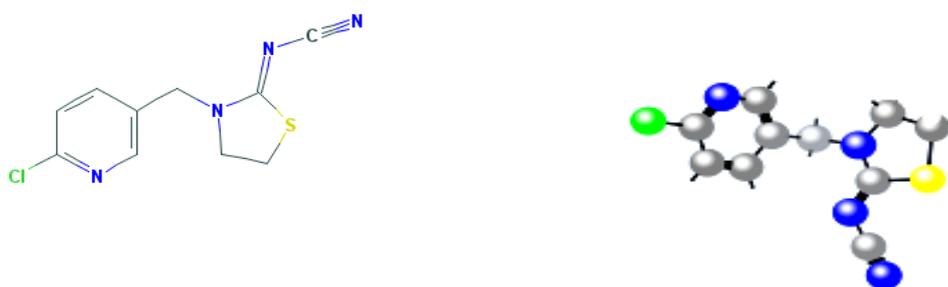


Figura 1.5 – Estrutura do Tiaclopride em 2D (esquerda) e 3D (direita).

O tiaclopride é um inseticida de contato e combina baixas doses administradas com grande eficácia. É comercializado em todo o mundo para aplicação foliar sob os nomes comerciais Pestanal®, Calypso®, Bariard® e Alanto®. A Tabela 1.5 apresenta as principais características deste inseticida.

Tabela 1.5 – Características e propriedades do Tiaclopride na sua formulação comercial ^[5]

Tiaclopride	
Nome IUPAC	(Z)-N-{3-[(6-Cloro-3-piridinil)metil]-1,3-tiazolano-2-ilideno}cianamida
Fórmula Molecular	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S
Massa Molar	252.72 g/mol
Cor	Amarelado
Estado físico	Pó cristalino
Ponto de fusão	136 °C
Densidade relativa	1.46 g/cm ³
Solubilidade em Água	0.185 g/L @ 20°C
Absorção máxima UV/VIS	290 nm
Classe Toxicidade	Classe II

A interação do tiaclopride com o meio ambiente é feita geralmente no solo por degradação microbial, tendo um tempo de meia-vida de 0.6 a 3.8 dias. É estável em condições anaeróbias com um tempo de meia-vida de mais de um ano, e é degradado em condições aquáticas aeróbias com um tempo de meia-vida de 10 a 63 dias ^[5]. Em relação aos metabolitos mais relevantes produzidos como a amida e o ácido sulfónico, não se esperam encontrar em concentrações significativas nas águas subterrâneas. Devido à solubilidade relativamente elevada do tiaclopride em água, existe a possibilidade de uma potencial contaminação de águas superficiais após fenómenos de precipitação ^[5]. A toxicidade aguda do tiaclopride é considerada moderada, tanto por via oral como por inalação, não sendo considerada tóxica por via dermatológica. Não causa irritamento da pele e dos olhos, não sendo perigoso para os humanos em condições normais.

As características toxicológicas do tiaclopride são apresentadas na Tabela 1.6.

Tabela 1.6 – Perfil toxicológico do Tiaclopride comercial ^[5]

Estudo (ratos)		Resultados	Classificação Toxicológica
LD₅₀ Oral	Machos	621 mg/Kg	II
	Fêmeas	396 mg/Kg	
LD₅₀ Dermatológica	Machos	2000 mg/Kg	III
	Fêmeas		
LC₅₀ Inalação	Machos	>0.481 mg/L	III
	Fêmeas		

1.6 – Métodos de determinação de pesticidas

Nos últimos anos, o número de publicações na área da análise de pesticidas e dos seus produtos de degradação aumentou significativamente. Apesar de se terem verificado grandes avanços no desenvolvimento de novas metodologias de doseamento destes compostos, ainda existe uma grande procura por controlo, técnicas de análise e informação sobre legislação e uso de pesticidas. Um dos aspetos fundamentais quanto à sua utilização é a necessidade de ter métodos de análise sensíveis, confiáveis, de baixo custo e fácil utilização, uma vez que é fundamental ter um grande número de análises para o controlo ambiental (solos, plantas, águas superficiais e subterrâneas) e dos resíduos presentes nos produtos agrícolas (frutas, legumes, verduras e cereais).

Os métodos mais usados na determinação de pesticidas são aqueles que envolvem técnicas de separação como a cromatografia de fase gasosa (GC), cromatografia de fase líquida (LC) e a eletroforese capilar, mas a colorimetria também é uma alternativa ^[19].

As técnicas cromatográficas são muito eficazes, mas normalmente caras e não permitem a análise de amostras *in-situ* e em campo, exigindo preparação prévia da

amostra, recorrendo a extrações líquido-líquido ou sólido-líquido, purificação da amostra e pré-concentração.

As técnicas eletroquímicas apresentam-se como uma boa alternativa para a análise qualitativa e quantitativa de pesticidas. Apresentam uma boa sensibilidade e seletividade, sendo uma grande vantagem a possibilidade de realizar medições diretamente na amostra sem necessidade de etapas de separação e pré-concentração. O curto tempo de análise e o baixo custo do método são outras das vantagens dos métodos eletroquímicos.

Na década de 70, *Hance* ^[25] publicou o primeiro trabalho na área de determinação de pesticidas, utilizando técnicas eletroanalíticas na análise de resíduos de pesticidas em águas. Entre as diversas técnicas eletroanalíticas utilizadas, as mais comuns são as voltamétricas devido às altas sensibilidades (baixos limites de deteção), como a voltametria de onda quadrada, voltametria de impulso diferencial e a voltametria de redissolução (anódica ou catódica) ^[19].

As técnicas voltamétricas encontram larga aplicação em estudos nas mais diversas áreas da ciência: química ambiental, medicina, bioquímica, biologia molecular e química-física. Estas técnicas permitem uma avaliação do tipo de reação eletroquímica do pesticida no eléctrodo, contribuindo para o melhor conhecimento da seletividade do composto quanto aos seus potenciais redox e como podem ser influenciados pela presença de interferentes em amostras reais.

Os métodos voltamétricos permitem ainda estudar a cinética e termodinâmica dos processos de transferência de electrões e iões ^[26], e investigar os fenómenos de adsorção que possam ocorrer na superfície do eléctrodo ^[27].

Na maioria dos métodos voltamétricos, a célula eletroquímica consiste em três eléctrodos ^[26,27]:

- (i) Eléctrodo de Trabalho no qual se dá a reação eletroquímica de interesse, e outros processos não faradaicos.
- (ii) Eléctrodo de Referência caracterizado por um potencial constante ao longo do tempo.
- (iii) Eléctrodo Auxiliar, onde ocorre um processo faradaico oposto aquele que se dá no eléctrodo de trabalho, que permite fazer o balanço da carga em todo o sistema eletroquímico. Na prática, este eléctrodo conjuntamente com o eléctrodo de

trabalho são dois elementos fundamentais do circuito elétrico por onde circula corrente elétrica, cuja intensidade é medida e correlacionada com a concentração do analito.

A detecção de um pesticida por técnicas voltamétricas baseia-se na medição da intensidade de corrente que resulta da eletroatividade dessa substância, normalmente na corrente elétrica que tem origem na oxidação ou redução da espécie química na superfície do eletrodo de trabalho, durante a aplicação de uma diferença de potencial na célula eletroquímica ^[19].

De entre todas as técnicas voltamétricas disponíveis, utilizamos neste trabalho a voltametria cíclica e a voltametria de onda quadrada. Em seguida são apresentadas algumas considerações teóricas sobre as técnicas utilizadas neste trabalho.

1.6.1 - Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é normalmente a técnica escolhida para se estudar eletroquimicamente um sistema pela primeira vez. Facilmente se obtém um voltamograma, a partir do qual é possível recolher informação quanto aos potenciais em que ocorrem os processos de transferência de eletrões e é detetada a existência de reações químicas acopladas e identificados os fenómenos de adsorção ^[28]. Possibilita ainda avaliar a reversibilidade de processos eletroquímicos, favorecendo a realização de estudos exploratórios quando não se tem informações sobre a eletroatividade do analito em estudo ^[28]. Na voltametria cíclica o varrimento de potencial é realizado alternada e sucessivamente para potenciais negativos e potenciais positivos, ou seja, em ambos os sentidos. Quando o varrimento é feito para potenciais mais positivos ao longo do tempo e o potencial do eletrodo de trabalho é mais positivo que o potencial formal do par redox O/R, resulta a reação oxidação (Figura 1.6a):



Quando o potencial chega ao potencial de inversão, o varrimento é realizado no sentido de potenciais mais negativos (Figura 1.6a); quando o potencial do eletrodo de trabalho é mais negativo que o potencial formal do par redox O/R é provocada a reação de redução:



De salientar que o varrimento inicial pode ser positivo ou negativo.

Qualquer que seja a reação redox que ocorre no eletrodo, esta é naturalmente acompanhada da transferência de elétrons e movimento orientado de carga elétrica na célula eletroquímica. As regiões de potencial onde as reações ocorrem a uma taxa significativa traduzem-se na circulação de uma quantidade elevada de carga elétrica (coulomb) por unidade de tempo (s), isto é, de uma intensidade de corrente elétrica elevada (coulomb/s = ampère). Em conformidade, as reações de oxidação e de redução de um par redox num eletrodo polarizado podem ser detetadas, avaliando as regiões de potencial em que a intensidade de corrente aumenta de um modo característico (i.e., pico de corrente). Salvo alguns casos particulares, a região de potencial em que os dois processos redox ocorrem não é coincidente, devido a diferenças de natureza termodinâmica e cinética entre a reação de oxidação e a de redução.

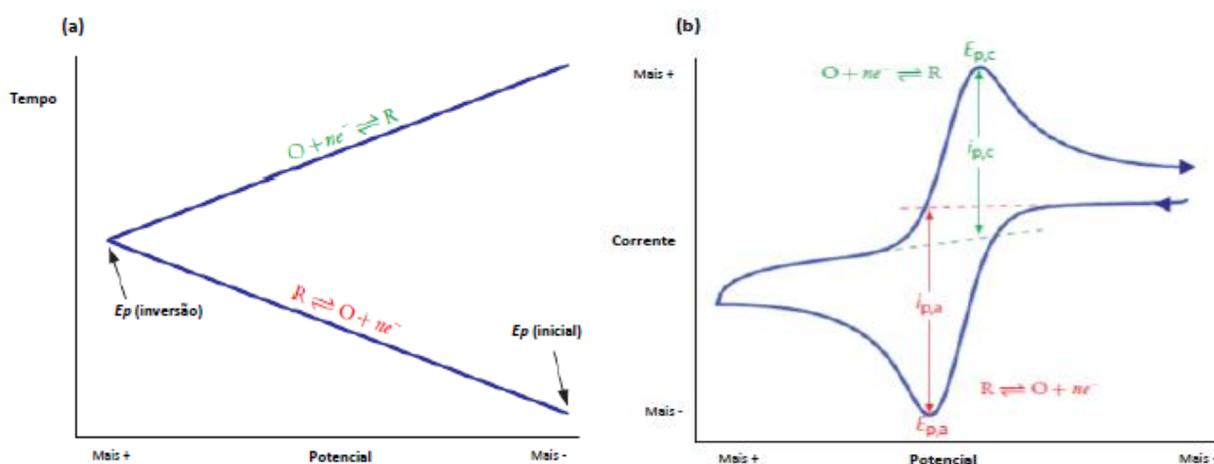


Figura 1.6 – Aspectos característicos da voltametria cíclica. **(a)** Ciclo de potencial ao longo do tempo, com o potencial inicial e o potencial de inversão. A voltametria cíclica pode consistir em um ou mais ciclos, assim como o potencial inicial não tem de ser obrigatoriamente negativo. **(b)** Voltamograma cíclico obtido mostrando as medições dos picos de corrente (i_p) e os picos de potencial (E_p). (adaptado da ref. [28])

Na Figura 1.6b é possível verificar a separação dos picos correspondentes à reação de oxidação e à reação de redução de um par redox de espécies solúveis, cada uma caracterizada por um pico de corrente e um pico de potencial. Assim temos um pico de corrente anódico ($I_{p,a}$) e catódico ($I_{p,c}$), e os picos de potencial respetivos, anódico ($E_{p,a}$) e catódico ($E_{p,c}$).

A Figura 1.7 apresenta os voltamogramas cíclicos característicos de um processo reversível e 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 [29].

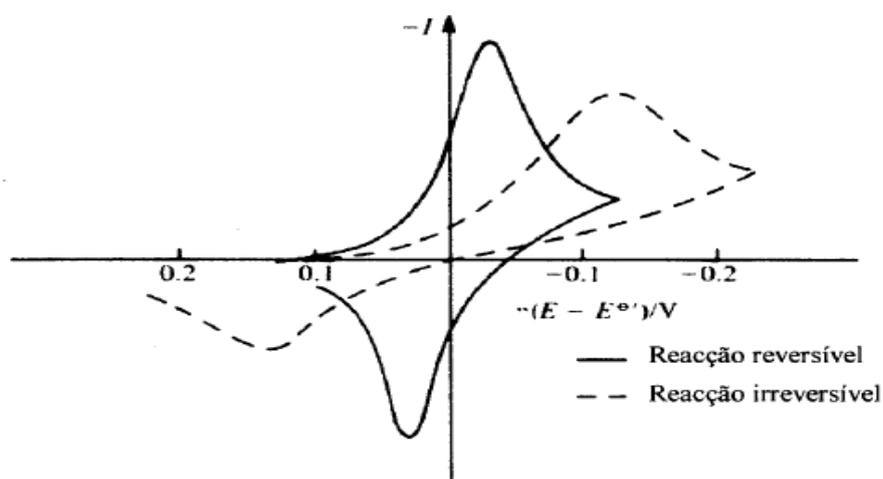


Figura 1.7 - Forma dos voltamogramas cíclicos numa reação reversível e irreversível. (adaptada da ref. [29])

Um dos critérios para a reversibilidade é que $I_{p,c}$ seja igual à $I_{p,a}$. Contudo, um aumento da velocidade de varrimento pode conduzir a uma diminuição da corrente de pico catódica e o sistema pode parecer irreversível (Figura 1.8) [29].

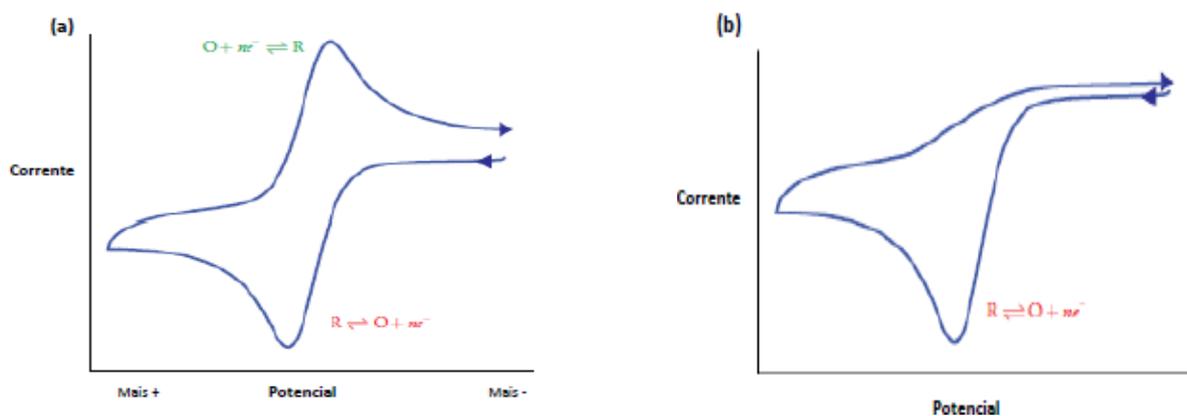


Figura 1.8 - Voltamogramas cíclicos obtidos a velocidade de varrimento (a) Rápida (b) Lenta. (adaptado da ref. [28])

1.6.2- Voltametria de onda quadrada

O desenvolvimento da eletrónica e computação possibilitou o controlo digital da perturbação imposta ao eléctrodo de trabalho, bem como a aquisição e tratamento de dados, levando a um maior desenvolvimento das técnicas voltamétricas, em especial das técnicas de pulso que, na década de 50, começaram a substituir técnicas polarográficas clássicas utilizadas até aí ^[30].

A voltametria de onda quadrada (SWV), é uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis. Os limites de deteção podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Nos processos eletroquímicos, a intensidade da corrente total deve-se não só a fenómenos faradaicos mas também a capacitivos. Os fenómenos capacitivos relacionam-se com a distribuição e separação de carga eléctrica que está associada à formação da dupla camada eléctrica, enquanto os faradaicos devem-se a reações de transferência electrónica, em que está envolvido o analito, produtos da sua eletrólise, ou outras espécies eletroativas constituintes da solução do eletrólito de suporte (incluindo o oxigénio dissolvido) ou presentes na superfície do eléctrodo. Na ausência do analito eletroativo, a intensidade de corrente eléctrica medida, denominada de corrente de fundo, é essencialmente o somatório da corrente capacitiva e da corrente residual faradaica (devida às reações redox de impurezas eletroativas vestigiais) ^[31]. A voltametria de onda quadrada é uma técnica onde a variação de potencial é o somatório de uma variação de potencial em escada (com degrau de potencial, ΔE_s , e comprimento de degrau, t), com uma variação de potencial em forma de onda quadrada. A onda quadrada, com amplitude ΔE_p e período $2t_p$, é sobreposta à escada de potencial, de modo que cada degrau de potencial corresponde a $\Delta E_p = 0$ e $t = 2t_p$. As correntes eléctricas são medidas ao final dos pulsos direto (A – sentido direto do varrimento de potencial) e inverso (B-sentido inverso ao varrimento de potencial) (Figura 1.9) ^[27].

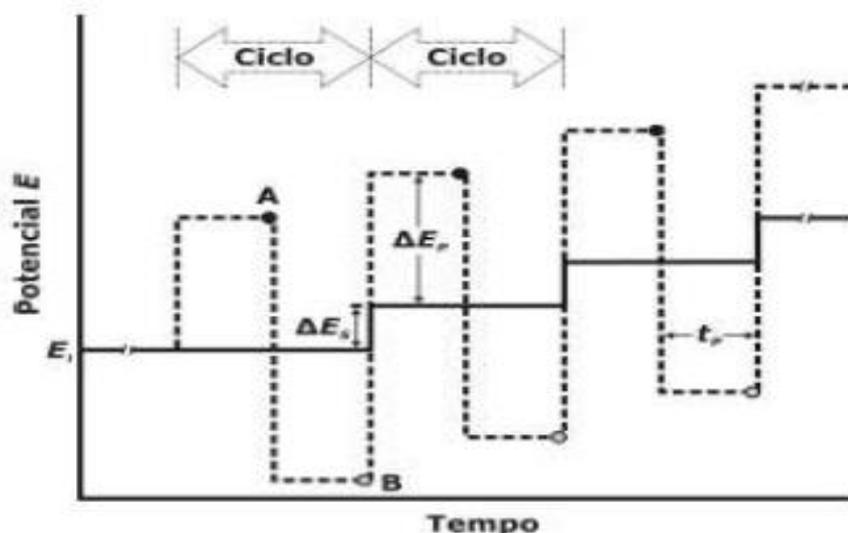


Figura 1.9 – Esquema de aplicação de potenciais na voltametria de onda quadrada (SWV) ^[30].

A Figura 1.10 mostra o perfil voltamétrico de intensidade de corrente (I) vs. potencial (E), onde a corrente total (I_t) corresponde à diferença entre a corrente observada no final do impulso direto (I_f) e a corrente observada no final do impulso inverso (I_b), obtendo-se para I_t um valor efetivo igual à diferença das duas correntes, o que justifica o facto de ser uma das técnicas voltamétricas mais sensíveis ^[29].

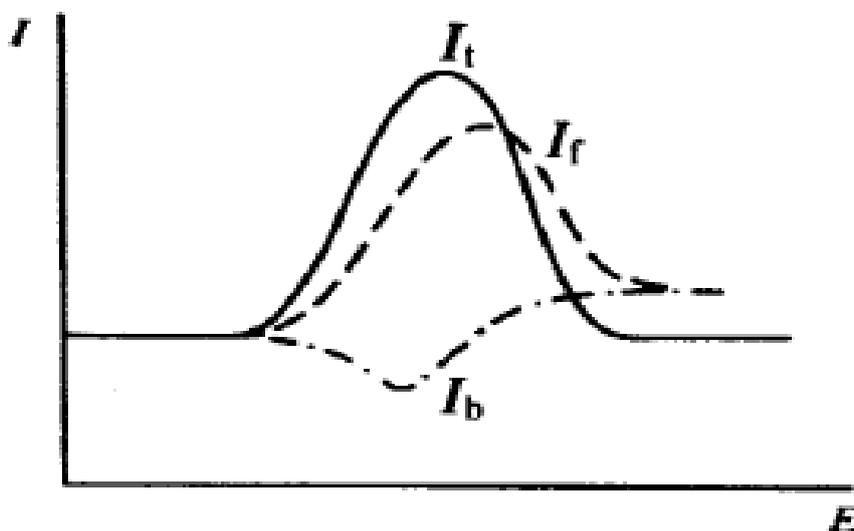


Figura 1.10 – Perfil voltamétrico de corrente (I) vs. Potencial (E) (adaptado de ref. ^[29])

A voltametria de onda quadrada tem como características principais a rapidez e a sensibilidade, tornando este método particularmente útil, além de permitir a realização de determinações sem necessidade de remoção do oxigénio da solução.

1.6.3- Tipos de elétrodos

No desenvolvimento de métodos electroanalíticos para a determinação de pesticidas, é de primordial importância a escolha do material do elétrodo, tendo em vista a zona de potencial que é necessário utilizar para a deteção destes compostos. O elétrodo de mercúrio, tem em soluções aquosas um intervalo útil de trabalho à volta de + 0.3 a - 2.8 V relativamente ao elétrodo de calomelanos (SCE) ^[27]. Estes elétrodos são especialmente usados em estudos de redução e apresentam algumas vantagens como a possibilidade de fazer inúmeras determinações num curto espaço de tempo, mas por outro lado tem como limitações o facto de poder ocorrer a adsorção de espécies interferentes na sua superfície, que afeta a transferência eletrónica entre o próprio elétrodo e o analito eletroativo, e em consequência, o valor do sinal analítico que se pretende medir. Relativamente aos elétrodos sólidos, existe uma variedade de materiais que podem ser utilizados, tais como a platina, o ouro e o carbono, o bismuto entre outros, que apresentando outras vantagens e limitações são uma alternativa importante aos elétrodos de mercúrio ^[27, 28, 44].

1.6.3.1- Elétrodo de carbono vítreo

De todos os materiais utilizados nos elétrodos, o carbono vítreo é particularmente útil devido à sua elevada condutividade elétrica, impermeabilidade a gases, elevada resistência química, elevada estabilidade mecânica, e com uma janela de potencial de trabalho relativamente ampla ^[32]. A Figura 1.11 mostra o intervalo de potencial de trabalho aproximado para alguns tipos de elétrodos.

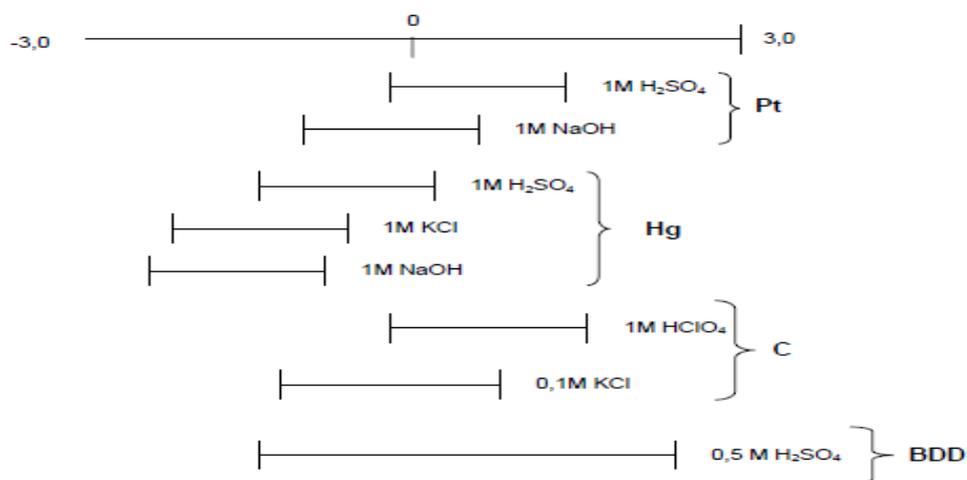


Figura 1.11 - Intervalo de potencial aproximado para os elétrodos de platina (Pt), mercúrio (Hg), carbono vítreo (C) e diamante dopado com boro (BDD) ^[29].

O nome carbono vítreo é dado ao material desordenado que apresenta aparência vítrea quando polido. Este material apresenta uma grande variedade de propriedades, que dependem principalmente do precursor polimérico e das condições experimentais do processo de degradação térmica desse precursor. A representação estrutural esquemática do carbono vítreo é apresentada na Figura 1.12.

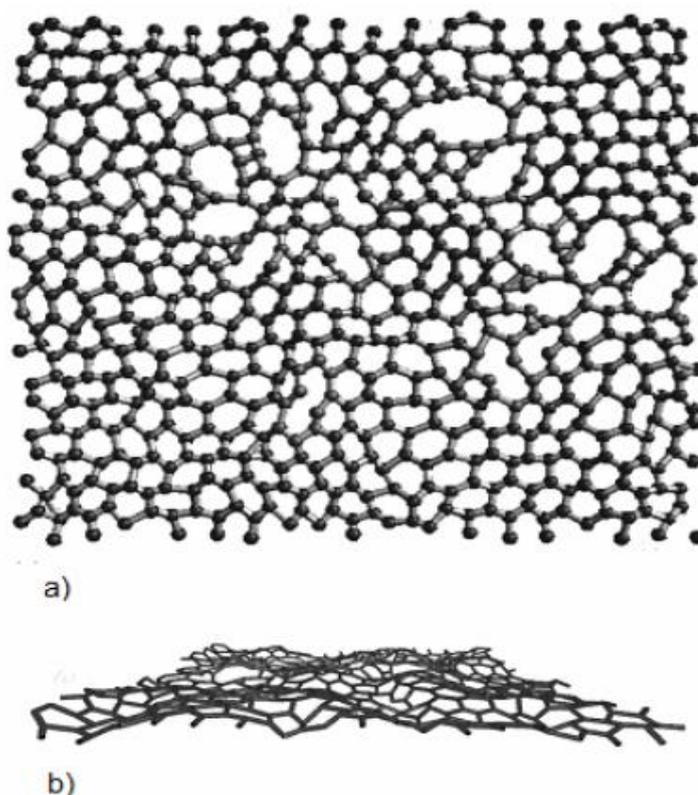


Figura 1.12 – Representação estrutural esquemática de um plano basal do carbono vítreo. **(a)** Visão frontal **(b)** Visão lateral ^[33].

O eletrodo de carbono vítreo (GCE), devido às suas propriedades electrocatalíticas, é frequentemente o mais utilizado para monitorizar reações de oxidação electroquímica. O intervalo de atividade electroquímica do eletrodo de carbono vítreo é dependente do eletrólito de suporte e do estado da sua superfície. No entanto, é comum observar-se um intervalo de trabalho de cerca de 3 V, direcionado na maior parte das vezes, para a zona de oxidação. Apesar disto, também pode ser utilizado para potenciais mais negativos, aumentando a sensibilidade do eletrodo quando a sua superfície é modificada.

1.6.3.2 - Eléttodos quimicamente modificados – Nanotubos de carbono

No desenvolvimento de sensores, a sensibilidade, seletividade, tempo de resposta, facilidade de uso e baixo custo constituem as características mais importantes. O avanço nas áreas de medicina, indústria e meio ambiente exigem o desenvolvimento dos mais variados sensores. No entanto, a regeneração da superfície após o uso é o maior entrave para o desenvolvimento de elétrodos sólidos comerciais. A preparação destes novos elétrodos tem por objetivo aumentar a sensibilidade e seletividade, catalisar reações que não ocorrem diretamente na superfície dos elétrodos sólidos, ou ainda contribuir para a ocorrência de fenômenos de adsorção, facilitando a pré-concentração dos compostos que se visam determinar ^[29, 45]. Um eléttodo modificado consiste em duas partes, o eléttodo base (por exemplo o eléttodo de carbono vítreo) e uma camada do modificador químico (como os nanotubos de carbono).

Os nanotubos de carbono (CNTs, carbon nanotubes em inglês) foram obtidos por Iijima ^[34] em 1991 como subproduto na síntese de fulerenos. A estrutura química básica dos CNTs é formada por uma folha de grafeno enrolada, onde existe um arranjo bidimensional de átomos de carbono com hibridação sp^2 , ligados em hexágonos cujo empilhamento resulta na estrutura da grafite, em dimensões nanométricas ^[35]. A constituição base dos nanotubos são as ligações covalentes C-C, e podem ser classificados em nanotubos de carbono de parede simples (SWCNTs) e nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNTs) – Figura 1.13. Os nanotubos de carbono de parede múltipla são constituídos por vários cilindros de grafite, espaçados entre si com uma dimensão de 0.34 a 0.36 nm, enquanto os nanotubos de carbono de parede simples apresentam apenas uma camada cilíndrica.

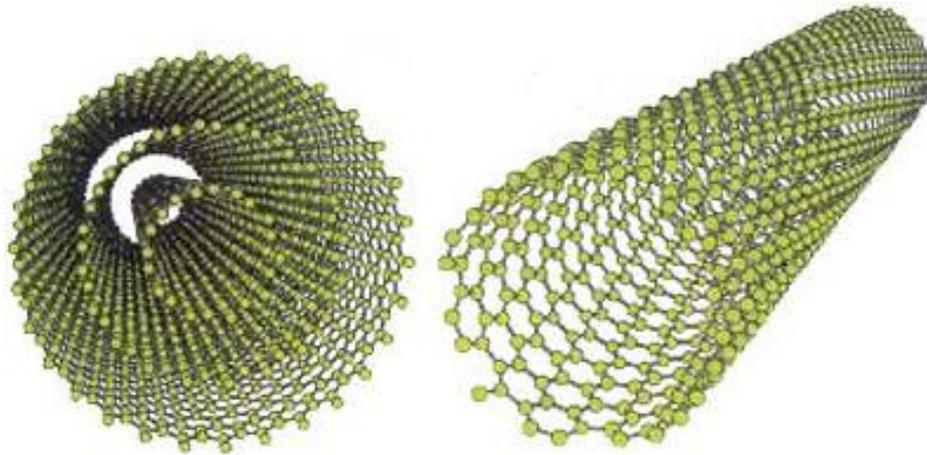


Figura 1.13 – Representação esquemática dos nanotubos de carbono- **(a)** parede múltipla (MWCNTs) e **(b)** parede simples (SWCNTs) ^[36].

Os CNTs possuem assim uma infinidade de aplicações, desde catalisadores, materiais compósitos, sensores, dispositivos nanoeletrônicos, etc ^[35,45]. A extensa aplicabilidade destes materiais prende-se com a variedade e excelência de propriedades físico-químicas que apresentam, tais como as suas propriedades eletrónicas, alta resistência mecânica e alta condutividade térmica.

2-Parte Experimental

2.1- Introdução

Neste capítulo será feita uma descrição detalhada dos materiais, reagentes, equipamento e metodologias eletroquímicas utilizadas ao longo do trabalho experimental. É referido o procedimento experimental efetuado no estudo voltamétrico do tiaclopride, desde a preparação e limpeza dos elétrodos até à determinação eletroquímica do inseticida, bem como a preparação das diferentes soluções de eletrólito de suporte utilizadas. Também é descrito o modo de preparação e imobilização dos nanotubos de carbono no elétrodo de carbono vítreo e elétrodo de diamante dopado com boro.

Em relação às técnicas utilizadas, são descritas as condições instrumentais analíticas utilizadas na voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada.

2.2 – Equipamento

2.2.1- Potencióstato

As determinações voltamétricas foram efetuadas num Potencióstato/Galvanóstato AUTOLAB PGSTAT302N (Figura 2.1) da marca Eco Chemie, acoplado a um computador e controlado pelo software NOVA, versão 1.7. O posto eletroquímico utilizado foi um aparelho da marca Metrohm, modelo 663 VA Stand (Figura 2.2), sendo a interface de ligação com o potencióstato, assim como o controlo de desarejamento e agitação da solução na célula, feita pelo IME 663 (Eco Chemie) (Figura 2.1).



Figura 2.1- Potencióstato/Galvanóstato AUTOLAB PGSTAT302N (em baixo) e a interface eletrónica IME663 (em cima).



Figura 2.2 - Posto eletroquímico.

2.2.2- Célula para medições voltamétricas

Os ensaios voltamétricos foram realizados numa célula de vidro da marca METROHM (Figura 2.3), de um só compartimento, com um volume máximo de aproximadamente 40 mL. Na célula foi possível fazer circular um gás inerte, que neste trabalho foi o azoto (tipo C-50 da marca Gasin, com pureza de 99.995 % e $O_2 < 4$ ppm), de modo a desarejar as soluções e evitar a interferência eletroquímica do oxigénio aí existente. Antes e depois de cada determinação eletroquímica a célula era minuciosamente lavada com acetona e água Mili-Q, de modo a evitar a contaminação de possíveis resíduos de analitos.



Figura 2.3 – Célula de vidro.

2.2.3- Elétrodos de Trabalho

Foi adotado um sistema de três elétrodos para as medições voltamétricas, com um eletrodo de referência, eletrodo auxiliar e eletrodo de trabalho.

2.2.3.1- Não modificados

Um dos elétrodos de trabalho utilizado foi o eletrodo de diamante dopado com boro (BDDE) (Figura 2.4; Ref. D-0256-SA da Windsor-Scientific), com 10 mm de diâmetro total e 3 mm de diâmetro efetivo do disco.



Figura 2.4 - Eletrodo de diamante dopado com boro.

O eletrodo de tinta impressa de carbono (SPCE) incorpora todo o sistema eletroquímico: eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e eletrodo auxiliar. Na Figura 2.5 apresenta-se o eletrodo utilizado (Ref. 110, da DropSens) com um comprimento de 34 mm e um diâmetro de disco do eletrodo de trabalho de 4 mm.



Figura 2.5- Eletrodo de tinta impressa de carbono.

Outro dos elétrodos de trabalho utilizados foi o eletrodo de carbono vítreo (Figura 2.6; Ref. 6.1204.110 da Metrohm), com 52,5 mm de comprimento, 7 mm de diâmetro total e 2 mm de diâmetro efetivo do disco de carbono vítreo.



Figura 2.6 - Eletrodo de carbono vítreo.

2.2.3.2- Modificados com nanotubos de carbono parede múltipla (MWCNTs)

O eletrodo de diamante dopado com boro (BDDE) e o eletrodo de carbono vítreo (GCE) foram modificados com MWCNTs, mas antes de cada um ter sido quimicamente modificado foram submetidos a um polimento com alumina de granulometria 0.3 μm , e posteriormente lavado com água Mili-Q.

Os nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNTs) foram adquiridos à Aldrich® (Referência 694185). A preparação de uma suspensão de MWCNTs foi efetuada começando por dissolver 1 mg de dihexadecilfosfato (DHP; Ref. D2631 da Aldrich®) em 1 mL de água desionizada. Em seguida adicionou-se a esta mistura 1 mg de MWCNTs. A suspensão resultante foi colocada num banho de ultra-sons por 3 horas para garantir a total dispersão dos MWCNTs, e por fim guardada num eppendorf. Finalmente, a superfície previamente tratada de cada um dos elétrodos foi modificada colocando, com ajuda de uma micropipeta, um volume otimizado ^[45] de 10 μL da suspensão de MWCNTs na superfície ativa do GCE e 20 μL de MWCNTs na superfície do disco do BDDE.

A Figura 2.7 esquematiza a imobilização dos nanotubos de carbono na superfície ativa (disco preto) do eletrodo de carbono vítreo, recorrendo à ajuda de uma micropipeta P20 (20 μL). Foi adotado o mesmo procedimento experimental para a imobilização dos MWCNTs na superfície ativa do BDDE, mas utilizando um volume de 20 μL de MWCNTs.

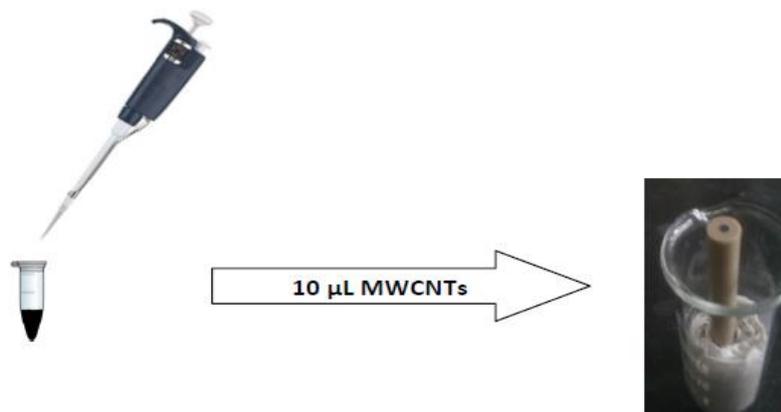


Figura 2.7 – Esquema ilustrativo do procedimento experimental utilizado na modificação do eletrodo de carbono vítreo.

2.2.4- Eletrodo de Referência

O eletrodo de referência utilizado foi o de Ag/AgCl (Figura 2.8; Ref. 6.0728.000 da Metrohm), com eletrólito interno de KCl (3M). O eletrodo foi montado numa ponte salina, contendo o mesmo eletrólito de suporte que foi utilizado dentro da célula eletroquímica.



Figura 2.8 – Eletrodo de referência.

2.2.5- Eléctrodo Auxiliar

As determinações voltamétricas foram realizadas utilizando uma vareta de carbono vítreo como eléctrodo auxiliar (Figura 2.9; Ref. 6.1245.000 da Metrohm), com 65 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro. A vareta de carbono vítreo é montada depois num suporte também da marca METROHM e depois, introduzida na célula.

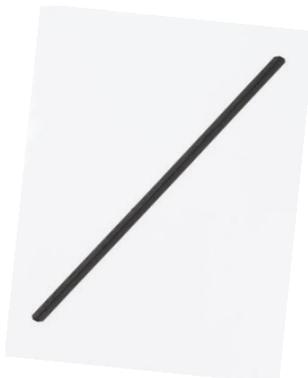


Figura 2.9 - Eléctrodo auxiliar.

A Figura 2.10 mostra a célula electroquímica utilizada com os três eléctrodos introduzidos na célula de vidro utilizada.

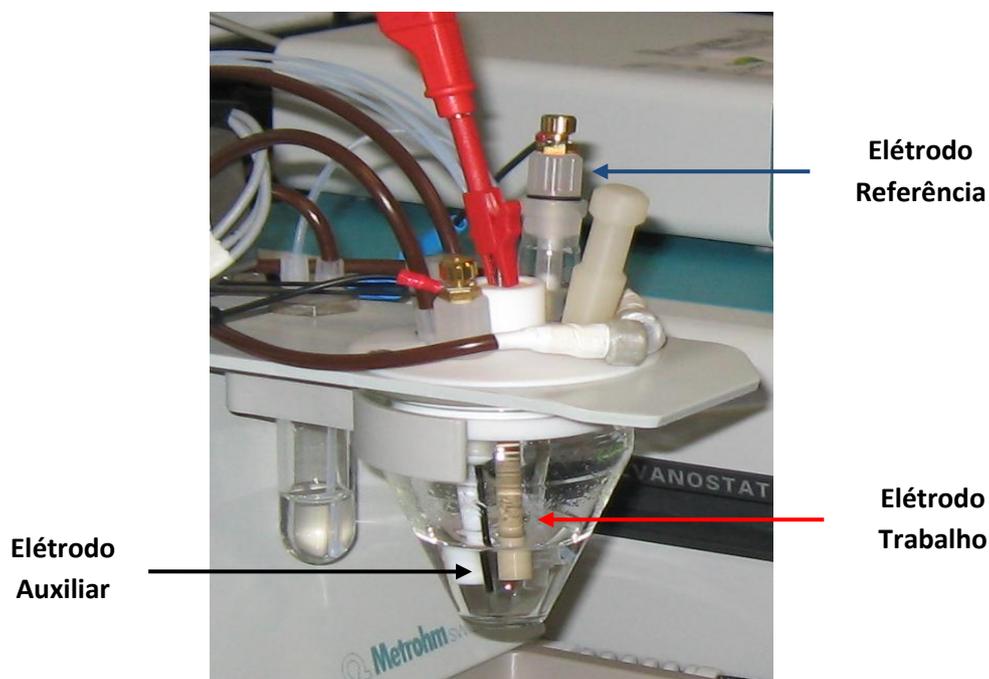


Figura 2.10 – Célula electroquímica utilizada nas determinações voltamétricas.

2.2.6- Equipamento auxiliar

Em relação ao restante equipamento utilizado, as medições de pH foram realizadas num aparelho METROHM modelo 632, com um elétrodo de vidro combinado da mesma marca.

As pesagens foram efetuadas numa balança analítica da marca METTLER-TOLEDO, modelo AB204.

Para a medição rigorosa de volumes foram usadas pipetas de vidro graduadas de diferentes capacidades, e micropipetas de volume regulável da marca GILSON, modelos P20, P100 e P1000, com capacidade máxima para 20, 100 e 1000 μL , respetivamente.

2.3 – Preparação de soluções

Todas as soluções foram preparadas com água de elevada pureza, obtida a partir do sistema Mili-Q, Simplicity® UV, Milipore Corp., France.

2.3.1- Eletrólitos de suporte

Neste trabalho experimental foram utilizados dois eletrólitos de suporte, o tampão Britton-Robinson (BR) e o tampão fosfato. O primeiro foi escolhido devido à vasta gama de tamponização de pH que permite e o segundo devido à gama de pH coincidente com a maioria das águas naturais.

2.3.1.1 – Tampão Fosfato

A solução de tampão fosfato 0.1 M, com pH 7, foi preparada num balão volumétrico de 250 mL, dissolvendo hidrogenofosfato de sódio di-hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), reagentes da Merck. A quantidade de cada um dos reagentes apresenta-se na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Massas utilizadas na preparação de 250 mL da solução tampão fosfato 0.1 M pH 7.

Reagentes	Massa (g)
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	1,6909
KH ₂ PO ₄	2,0414

2.3.1.2- Tampão Britton-Robinson

A solução tampão Britton-Robinson ^[38], é constituída por uma mistura dos seguintes reagentes: 100 mL Ácido Bórico (H₃BO₃), 100 mL Ácido Fosfórico (H₃PO₄) e 100 mL Ácido Acético (CH₃COOH), todos com uma concentração de 0.04M .

Foi preparada uma solução de Britton-Robinson num balão de 500mL, e adicionando NaOH 6M aos reagentes descritos anteriormente para ajustar ao valor de pH pretendido.

2.3.2- Tiaclopride

O tiaclopride utilizado foi o padrão analítico - PESTANAL[®] (N^o Produto 37905) da marca FLUKA (Sigma-Aldrich[®]). Para os primeiros ensaios voltamétricos e otimização da metodologia, foi preparado uma solução de 100 ppm de tiaclopride pesando 5 mg de PESTANAL[®], adicionando 5 mL de acetonitrilo e ajustando o volume com água Mili-Q.

Para o estudo de dopagem de amostra real foi utilizado a fórmula comercial de tiaclopride, o Calypso[®], fornecido pela Bayer AG, constituído por uma suspensão com 480 gL⁻¹ em tiaclopride.

2.4- Procedimento Experimental

2.4.1- Medições voltamétricas

Todas as medições voltamétricas foram realizadas à temperatura ambiente (aprox. 20° C), com um volume de eletrólito de suporte dentro da célula eletroquímica de 18 mL. Antes de iniciar qualquer medição o eletrólito de suporte foi desarejado durante 20 minutos com azoto, e entre medições posteriores era colocado em agitação 3 minutos e novamente desarejado por alguns segundos. O passo do desarejamento durante o procedimento experimental é de extrema importância, já que mantendo a atmosfera de azoto sobre a solução, impedimos que o oxigênio se dissolva na solução e interfira nas medições.

Para fazer a determinação eletroquímica do tiaclopride foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica (CV), voltametria de varrimento linear (LSV) e voltametria de onda quadrada (SWV). Na Tabela 2.2 estão descritas as condições experimentais adotadas para cada uma das técnicas, com os vários parâmetros e valores ou intervalo de valores correspondentes.

Tabela 2.2 – Condições instrumentais utilizadas na voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada.

Parâmetros	Voltametria Cíclica (Voltametria de Varrimento Linear)	Voltametria de Onda Quadrada
Tempo de acumulação (s)		0 - 360
Potencial de acumulação (V)		-0.5 - -1.3
Potencial de equilíbrio (V)	-0.8 (-0.8)	-1
Potencial inicial (V)	-0.8 (-0.8)	-1
Potencial final (V)	-0.8 (-1.7)	-1.7
Potencial de 1ª inversão (V)	-1.7	
Degrau de potencial (mV)	2.44 (2.44)	4
Frequência (Hz)		5 - 200
Velocidade de varrimento efetiva (mV s ⁻¹)	100 (80 -500)	20 - 800
Nº ciclos	2 - 20	
Amplitude de onda (mV)		20

2.4.2 – Teste de dopagem para a amostra ambiental

Um dos objetivos principais deste trabalho foi a determinação do tiaclopride numa matriz ambiental real. Para isso foi recolhida uma amostra num curso de água perto de Nossa Sr^a. de Machede, a cerca de 15 Km de distância de Évora. A amostra foi armazenada num frasco de vidro e mantida a uma temperatura de 4° C até à realização do estudo eletroquímico.

A Figura 2.11 mostra o local de amostragem, caracterizada por possuir uma forte produção agrícola e animal, estando sujeita a inúmeras fontes de contaminação, tanto por resíduos de produtos usados na agricultura como também na produção animal.



Figura 2.11- Local de recolha da amostra ambiental.

Estas matrizes ambientais possuem um grande número de interferentes. Neste caso não era esperado encontrar o inseticida em estudo, e para isso procedeu-se à dopagem da amostra com tiaclopride.

A amostra recolhida foi utilizada na determinação eletroquímica tal como recolhida, sem qualquer pré-tratamento físico-químico.

O procedimento experimental para a amostra dopada está esquematizado na Figura 2.12. A suspensão de Calypso®, formulação comercial, contém 480 gL^{-1} em tiaclopride e daqui foram transferidas as alíquotas necessárias à preparação das amostras dopadas. Inicialmente foi transferido um volume de $300 \mu\text{L}$ de Calypso® para um balão volumétrico de 10 mL e ajustou-se o resto do volume com água Mili-Q, ficando esta solução com uma concentração de $567 \mu\text{M}$ em tiaclopride. Desta última solução transferiu-se $86 \mu\text{L}$ para um novo balão de 10 mL , perfazendo o volume com a amostra de efluente recolhido, ficando esta solução com uma concentração de tiaclopride de $488 \mu\text{M}$. Por fim retirou-se 0.5 mL da amostra dopada contendo uma concentração de $488 \mu\text{M}$ para a célula eletroquímica, já com um volume de 17.5 mL de eletrólito de suporte.

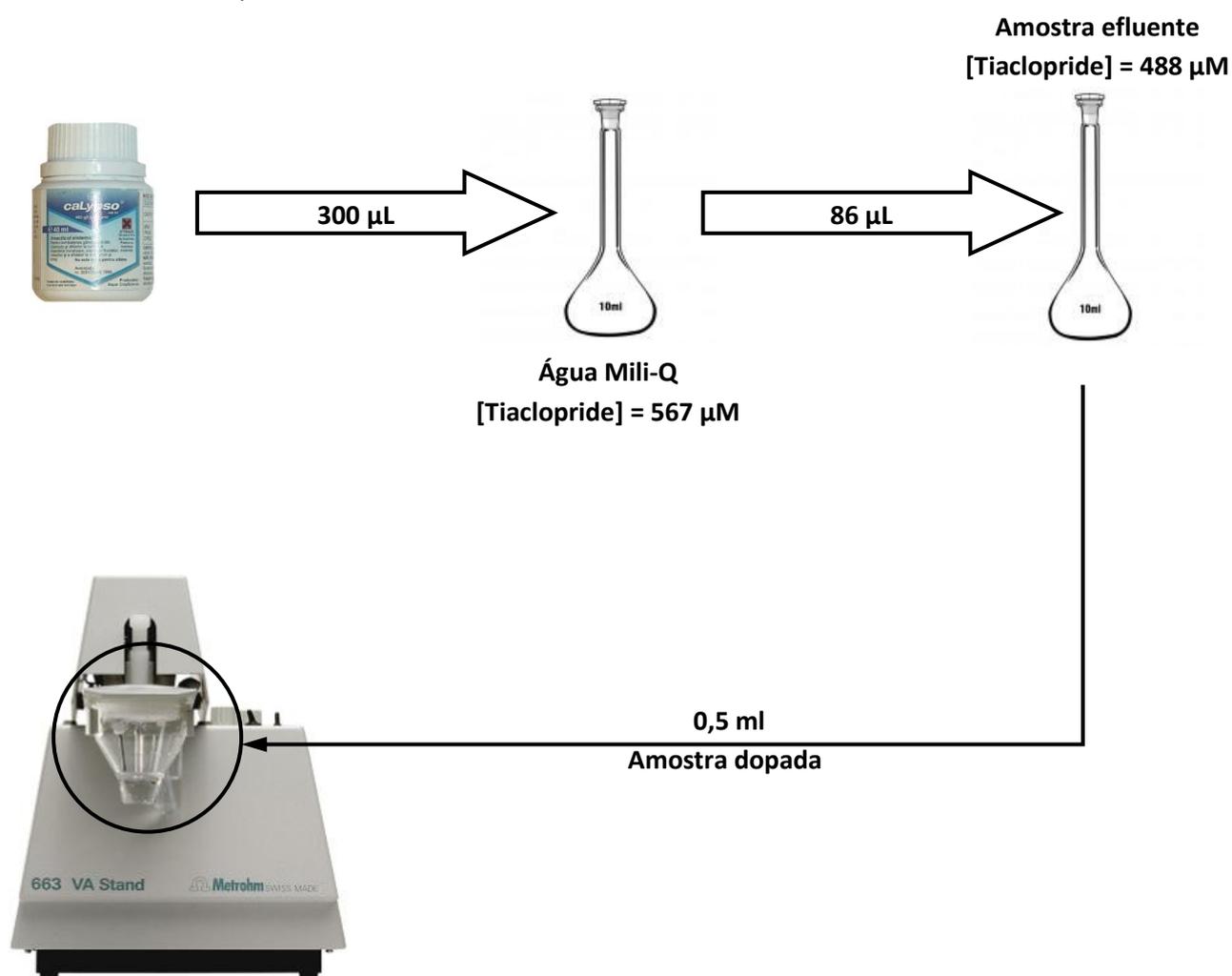


Figura 2.12 – Esquema do procedimento experimental adotado para a análise voltamétrica da amostra dopada

3. Apresentação e Discussão de Resultados

Neste capítulo são apresentados os resultados experimentais obtidos com uma série de eléctrodos de trabalho. Foi avaliada a eficiência dos seguintes eléctrodos na caracterização e determinação voltamétrica do tiaclopride (TIA): eléctrodo de diamante dopado com boro (BDDE) sem ser modificado e modificado com um filme de nanotubos de carbono (MWCNTs-BDDE), eléctrodo de tinta de carbono impressa (SPCE), eléctrodo de carbono vítreo sem ser modificado (GCE) e modificado (MWCNTs-GCE).

Pretendeu-se principalmente estudar o comportamento voltamétrico do inseticida numa janela de potencial bastante negativa, permitindo o estudo na região catódica.

Na parte inicial foi feito um estudo prévio, com o objetivo de fazer a otimização dos vários parâmetros eletroquímicos de modo a melhorar a sensibilidade do método analítico proposto.

A última parte do trabalho consistiu em quantificar o inseticida, assim como fazer a sua determinação numa amostra ambiental dopada com tiaclopride.

3.1- Estudos prévios

Brycht et al ^[37] identificaram processos eletroquímicos do tiaclopride utilizando como eléctrodo de trabalho um filme sólido de amálgama de prata (Hg(Ag)Fe), num eletrólito de suporte Britton-Robinson (BR). Este sensor é bastante tóxico e poluente para o ambiente devido à utilização de mercúrio. Devido a este facto recorreu-se a outros eléctrodos de trabalho produzidos com outro tipo de material, para avaliar a possibilidade de utilização na determinação eletroquímica do TIA.

3.1.1- Estudo do comportamento eletroquímico do tiaclopride no eléctrodo de diamante dopado com boro (BDDE)

O eléctrodo de diamante dopado com boro (BDDE) tem como principal vantagem a ampla janela de potencial de trabalho, tendo sido este o eléctrodo escolhido para obter uma informação preliminar acerca do comportamento do TIA tanto na zona de potenciais negativos como positivos.

A Figura 3.1 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos, entre 1.4 V e -1.3 V, com eletrólito de suporte Britton-Robinson (BR) 0.1 M pH 7, na ausência (linha verde) e na presença de 20 μM de TIA (linha azul), a uma velocidade de varrimento de 100 mV/s^{-1} . É possível verificar que não existe diferença entre os dois voltamogramas, não existindo nenhum pico visível tanto a potenciais negativos como positivos.

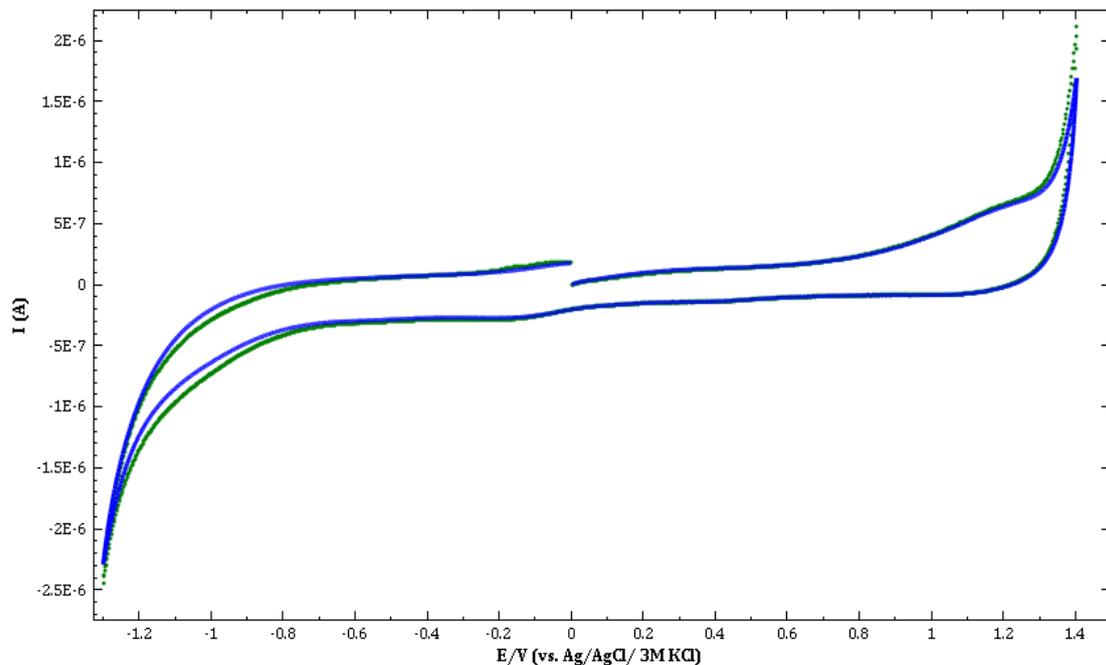


Figura 3.1- Voltamogramas cíclicos obtidos para 0 μM de TIA (linha verde) e 20 μM de TIA (linha verde) no eletrodo de BDDE em tampão Britton-Robinson 0.1 M pH 7, a $v = 100 \text{ mV/s}^{-1}$.

Não sendo visível qualquer pico referente ao TIA, e portanto, qualquer sinal que permita a sua detecção e quantificação voltamétrica neste eletrodo, o próximo passo consistiu em modificar a superfície ativa do BDDE com nanotubos de carbono. Foi imobilizado um volume de 20 μL de MWCNTs na superfície do eletrodo de BDDE, que tem 3 mm de diâmetro efetivo de disco.

A Figura 3.2 mostra os voltamogramas de SWV obtidos com uma solução 40 μM em TIA, no eletrodo modificado com MWCNTs (Figura 3.2a) e sem ser modificado (Figura 3.2b), num intervalo de potencial de -0.8 V a -1.7 V. Analisando os voltamogramas verifica-se que não é detetado qualquer pico corresponde a reações de redução do TIA, sendo notado apenas, o aumento da corrente de fundo para o voltamograma correspondente ao eletrodo de MWCNTs-BDDE.

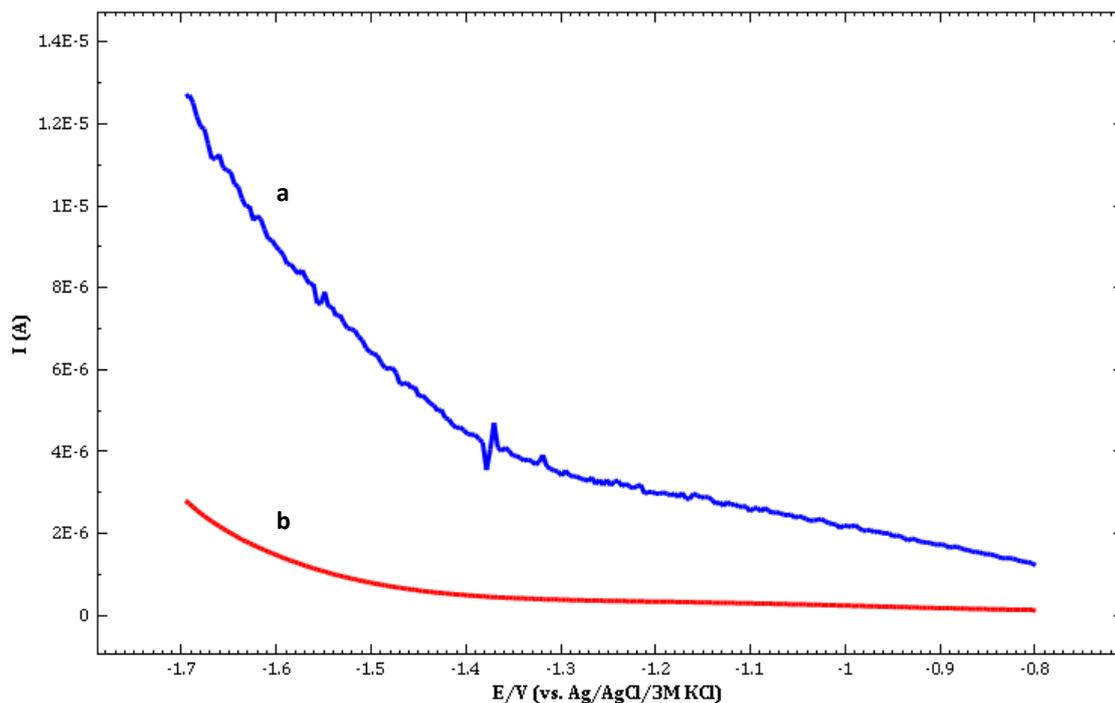


Figura 3.2- Voltamogramas de SWV obtidos para o elétrodo de BDDE (a) modificado com MWCNTs e (b) sem ser modificado, na presença de 40 μM de TIA em tampão BR 0.1 M pH 7, com $f=25$ Hz, $t_{\text{acc.}}=20$ s, $E_{\text{acc.}}=-0.8$ V.

3.1.2- Estudo do comportamento eletroquímico do tiaclopride no elétrodo de tinta de carbono impressa (SPCE)

O comportamento voltamétrico do TIA foi estudado também com o elétrodo de tinta de carbono impressa, bastante utilizado nos últimos anos. Entre as diversas vantagens destacam-se o facto de serem descartáveis, de baixo custo e possuírem elétrodo de trabalho, elétrodo auxiliar e elétrodo de referência todos impressos no mesmo suporte.

A Figura 3.3 mostra os voltamogramas cíclicos de 100 μM de TIA, em eletrólito de suporte BR 0.1 M pH 6.5, para o elétrodo de SPCE modificado com MWCNTs (linha laranja) e sem ser modificado com MWCNTs (linha verde).

Não foi possível determinar o TIA nestas condições experimentais, para o elétrodo de tinta de carbono impressa.

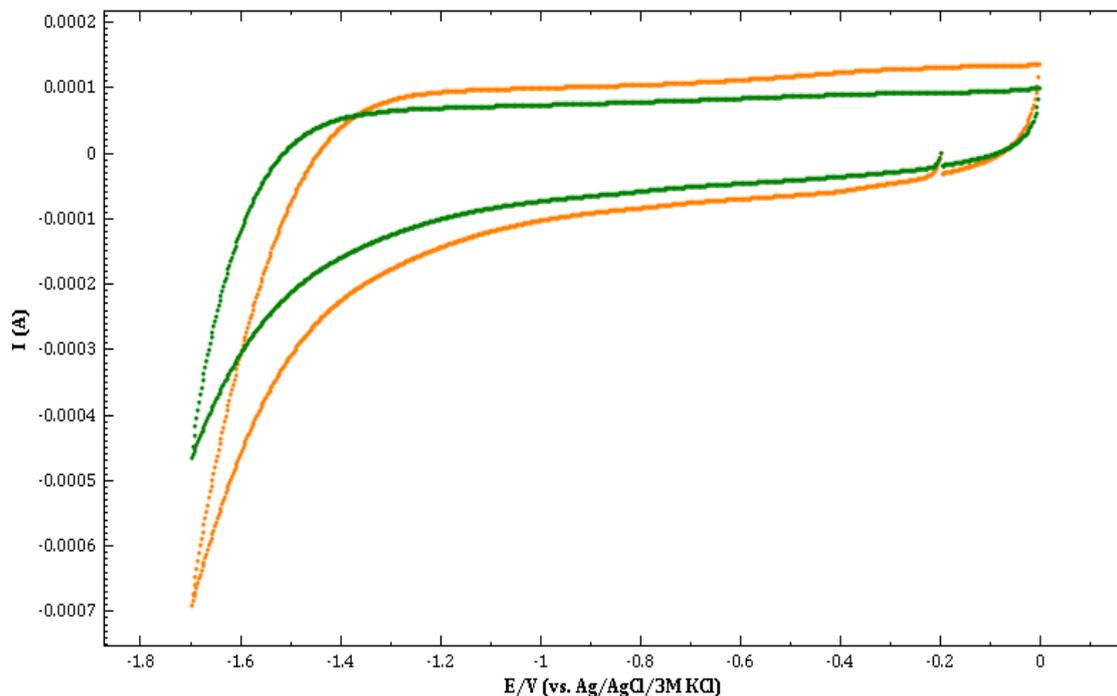


Figura 3.3- Voltamogramas cíclicos obtidos com 100 μM de TIA no eletrodo de tinta de carbono impressa modificado com MWCNTs (linha laranja) e sem ser modificado com MWCNTs (linha verde), em tampão BR 0.1 M pH 6.5, a $v=100 \text{ mV/s}^{-1}$.

3.2- Estudo do comportamento voltamétrico do tiaclopride utilizando o eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNTs

Com o objetivo principal de determinar o TIA recorreu-se ao eletrodo de carbono vítreo modificado com MWCNTs e também sem ser modificado com MWCNTs. Foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica (CV) e voltametria de varrimento linear (LSV), e outras técnicas de impulso como a voltametria de onda quadrada (SWV), mais sensíveis que a voltametria cíclica. Como eletrólitos de suporte foram utilizados o tampão fosfato e o tampão Britton-Robinson.

Numa fase posterior do trabalho foram otimizadas todas as variáveis analíticas que influenciam a resposta voltamétrica do TIA.

3.2.1- Voltametria cíclica

O comportamento voltamétrico do TIA foi estudado utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono e sem ser modificado.

Neste estudo inicial utilizou-se a voltametria cíclica para se obter informação preliminar em relação ao comportamento do TIA na zona de potenciais negativos, e para se avaliar comparativamente o desempenho dos dois eletrodos.

Na Figura 3.4 apresentam-se os voltamogramas cíclicos obtidos com a solução do eletrólito de suporte BR 0.1 M pH 7 sem TIA no GCE não modificado (a), na presença de 40 μ M de TIA com eletrodo de GCE não modificado (b) e GCE modificado com MWCNTs (c).

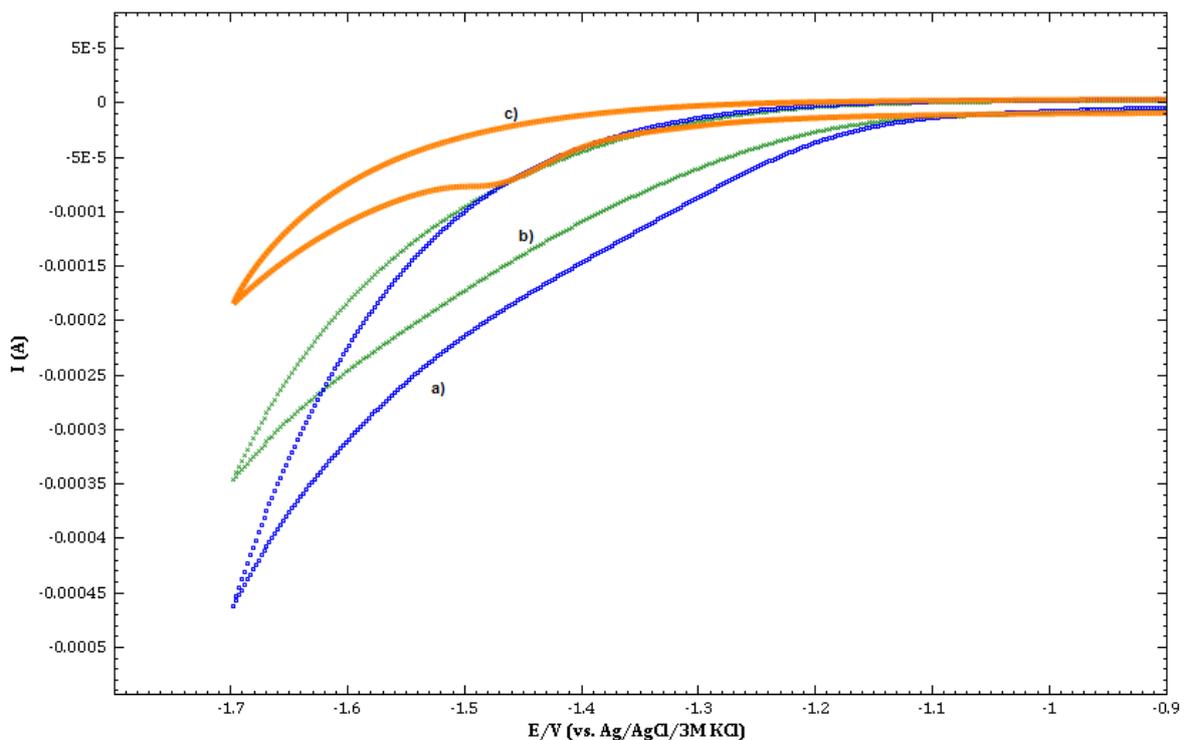


Figura 3.4- Voltamogramas cíclicos da solução tampão BR 0.1 M pH 7 no GCE (a), da solução tampão com 40 μ M de TIA no GCE (b) e MWCNTs-GCE (c); Velocidade de varrimento: 100 mV/s.

Analisando a Figura 3.4 pode-se concluir que o GCE modificado com MWCNTs é um sensor eletroquímico mais vantajoso que o GCE não modificado, apresentando uma boa sensibilidade e seletividade para a determinação de TIA. O pico de potencial por volta de -1.45 V para o eletrodo de MWCNTs-GCE (Figura 3.4c), deve-se muito possivelmente à redução do TIA. A forma do pico parece estar relacionada com

fenômenos faradâicos, ou seja, de transferência de carga eletrônica. Na literatura referente a este tema ainda não é conhecida a verdadeira natureza química e estrutural deste produto de redução do TIA. A identificação deste produto será objeto de estudo num estudo posterior. O voltamograma da Figura 3.4a, dá-nos a linha de base do eletrólito de Britton-Robinson sem TIA no GCE não modificado, sendo possível afirmar que a corrente de fundo é relativamente baixa. O voltamograma cíclico de 40 μM de TIA no eletrodo de GCE não modificado não dá qualquer resposta eletroquímica, provando assim que os nanotubos potenciam as interações com as espécies eletroativas e neste caso o processo redox do TIA. O voltamograma cíclico de TIA relativo ao MWCNTs-GCE mostra ainda que o processo de redução corresponde a uma reação irreversível, dado não se observar um pico quando o varrimento é realizado no sentido inverso.

Com o objetivo de ativar o eletrodo e avaliar a sua repetibilidade fizeram-se medições voltamétricas sucessivas com a solução tampão de BR 0.1 M pH 7. A Figura 3.5 apresenta a voltametria cíclica de varrimentos sucessivos (20 ciclos) obtidas entre -0.9 V e -1.7 V, na mesma medição voltamétrica.

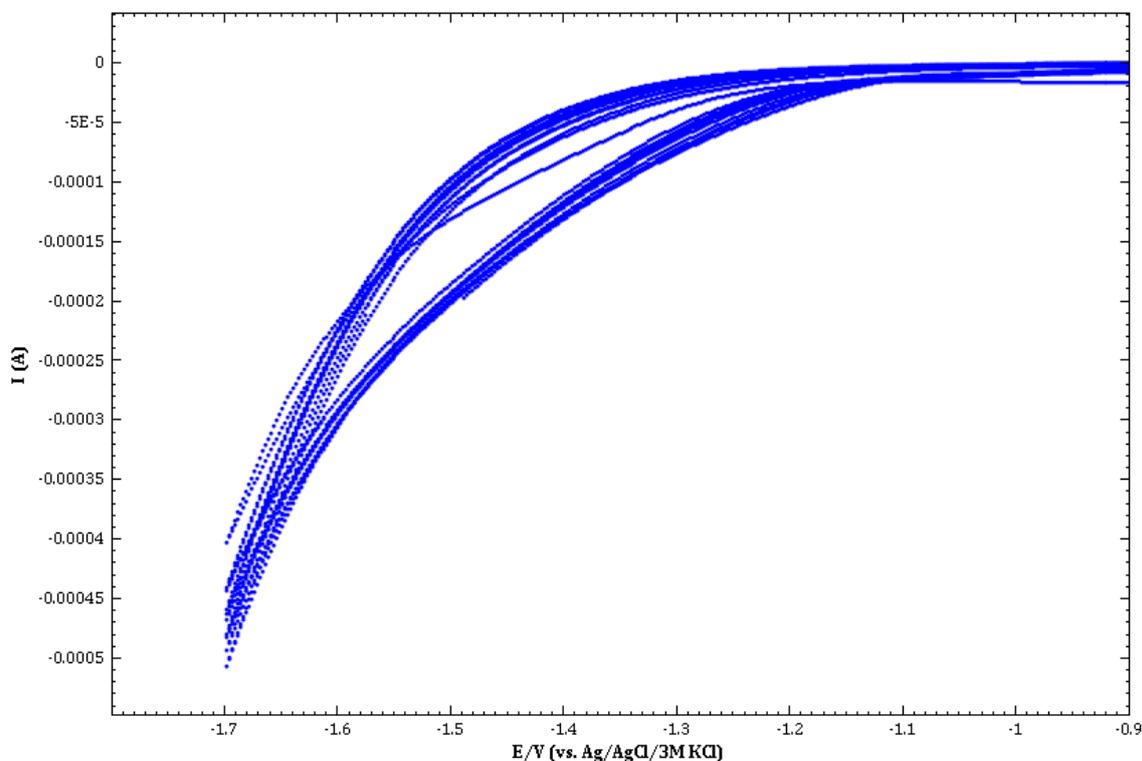


Figura 3.5- Voltamogramas cíclicos de 20 ciclos sucessivos obtido com o eletrodo de MWCNTs-GCE com tampão BR 0.1 M pH 7, $v = 100 \text{ mV/s}^{-1}$.

3.2.2- Voltametria de onda quadrada

Para se estudar melhor o comportamento catódico do TIA no eletrodo de MWCNTs-GCE, recorreu-se a uma técnica voltamétrica de impulso com uma sensibilidade mais elevada que a voltametria cíclica, a voltametria de onda quadrada.

A Figura 3.6 mostra os voltamogramas obtidos com a SWV para as concentrações entre $1,64 \text{ mg/L}^{-1}$ ($6,48 \text{ }\mu\text{M}$) e $4,76 \text{ mg/L}^{-1}$ ($18,84 \text{ }\mu\text{M}$) de tiaclopride no eletrodo de MWCNTs-GCE. Através da análise dos voltamogramas verificamos a existência de um pico resultante da redução de TIA, que ocorre a um potencial de -1.48 V . Como esperado à medida que a concentração de tiaclopride aumenta maior é a intensidade do pico resultante.

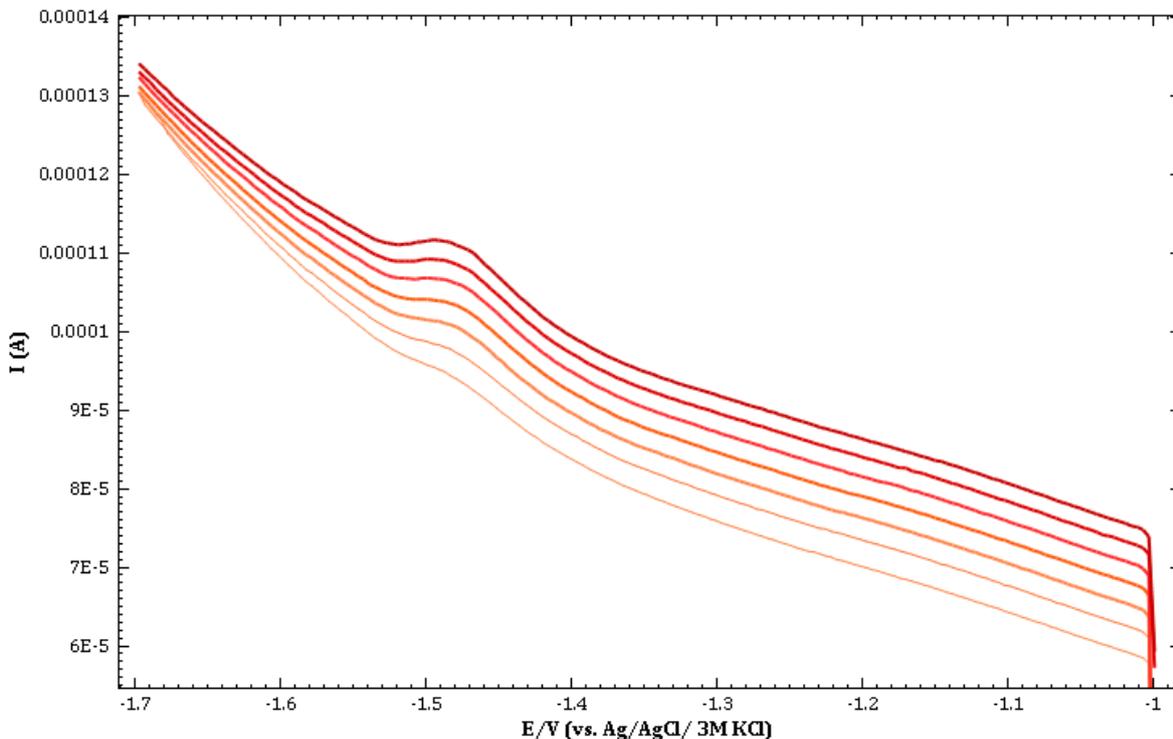


Figura 3.6- Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o intervalo de [TIA]: $1,64 - 4,76 \text{ mg/L}^{-1}$, em eletrodo de MWCNTs-GCE no tampão BR $0.1 \text{ M pH } 7$; $E_{\text{acc.}} = -1 \text{ V}$, $t_{\text{acc.}} = 20 \text{ s}$, $f = 50 \text{ Hz}$.

A técnica de SWV é bastante sensível, e sabe-se que a intensidade de corrente de pico e resposta obtida é influenciada por um conjunto de variáveis eletroanalíticas como: efeito do pH do meio, a velocidade de varrimento, efeito do eletrólito de suporte, etc.

3.2.3- Estudo de variáveis eletroquímicas que influenciam a resposta do TIA no eletrodo de MWCNTs-GCE

De seguida é apresentado o estudo de cada uma das variáveis eletroanalíticas na voltametria de onda quadrada utilizando o eletrodo de MWCNTs-GCE, de modo a otimizar as condições experimentais na determinação do inseticida em estudo.

3.2.3.1- Estudo do efeito de pH

A Figura 3.7 apresenta os voltamogramas de SWV obtidos para os valores de pH 6.24, 6.51, 7.07 e 7.48, próximos de pH 7, em 19.6 μM de TIA no eletrólito de suporte BR 0.1 M. É possível observar que a intensidade do pico é maior a pH neutro do que a valores de pH mais extremos, notando-se também uma tendência para o potencial de pico se deslocar para potenciais mais negativos quanto mais alcalina for a solução.

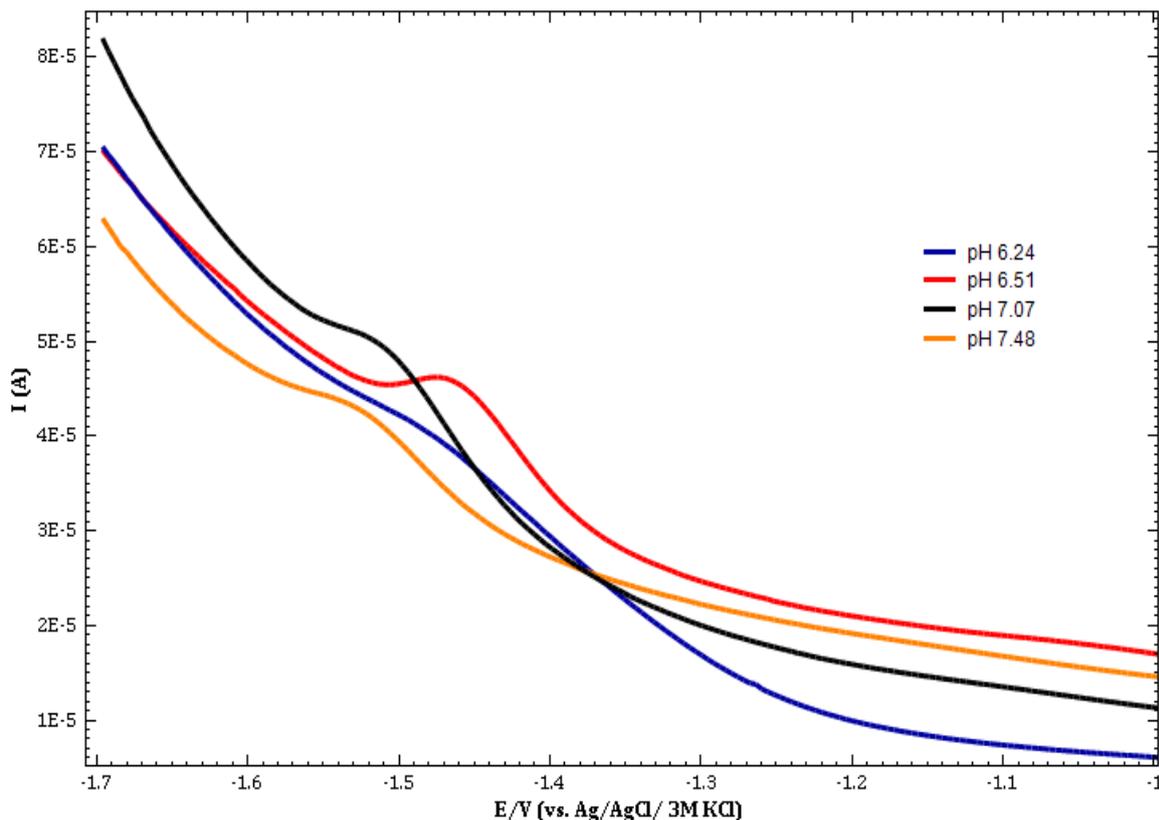


Figura 3.7- Efeito do pH do meio na resposta voltamétrica de TIA, num eletrodo de MWCNTs-GCE. [TIA]= 19.6 μM ; pH: 6.24, 6.51, 7.07 e 7.48.

Na Figura 3.8 apresenta-se a dependência da intensidade de corrente de pico (I_p) e potencial de pico (E_p), em função do pH do meio. No intervalo de pH entre 5.94 e 8.89, o potencial de pico varia linearmente com o aumento de pH, de acordo com a equação: $E_p = -0,0556 \text{ pH} - 1,1082$ com um $R^2 = 0,9926$. O valor do declive desta relação sugere que neste intervalo de pH, o número de prótons envolvido na redução do tiaclopride é igual ao número de eletrões que o próprio tiaclopride aceita na reação do elétrodo [39]. De referir que para valores fora do intervalo de pH descrito na Figura 3.8 não existe qualquer resposta voltamétrica para o TIA, confirmando a importância que o pH do meio assume neste tipo de deteção eletroquímica. Em relação à intensidade de corrente de pico verifica-se que a redução é favorecida a pH neutro, a um pH efetivo de 6.51.

O facto de o pH otimizado como ótimo neste estudo se aproximar do pH natural da amostra de água contaminada constitui uma vantagem, tendo em conta que o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento do método eletroquímico para determinação e quantificação de tiaclopride neste tipo de amostras.

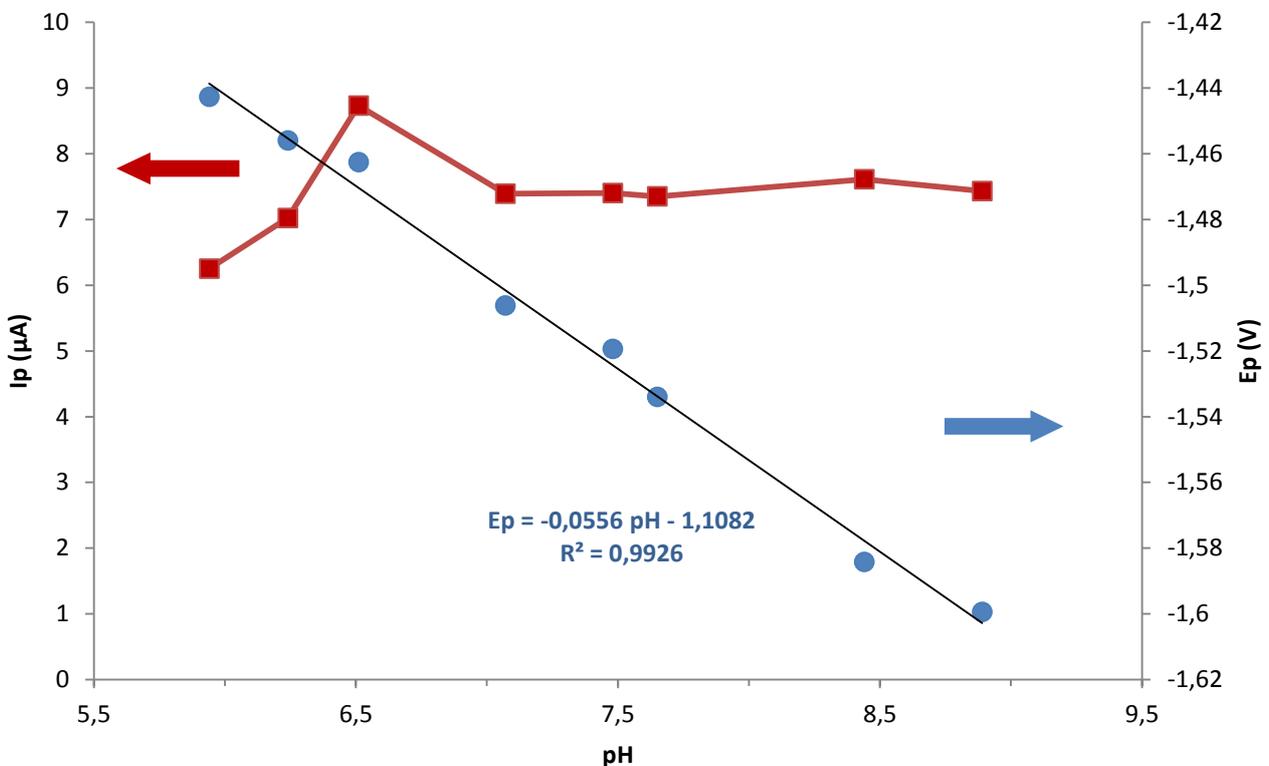


Figura 3.8- Efeito do pH na intensidade de corrente de pico (I_p) e no potencial de pico (E_p) de 19.6 μM de TIA; pH: 5.94, 6.24, 6.51, 7.07, 7.48, 7.65, 8.44 e 8.89.

3.2.3.2- Efeito da velocidade de varrimento

O efeito da velocidade de varrimento no comportamento voltamétrico do TIA no MWCNTs-GCE foi investigado para valores entre 80 e 500 mV/s^{-1} . Este estudo foi feito utilizando 10 mg/L^{-1} ($40 \text{ }\mu\text{M}$) de TIA no eletrólito de suporte Britton-Robinson 0.1 M pH 7. Os voltamogramas de varrimento linear foram obtidos numa janela de potencial de -0.8 V a -1.7 V. A Figura 3.9 mostra que a altura do pico catódico em estudo aumenta com a velocidade de varrimento.

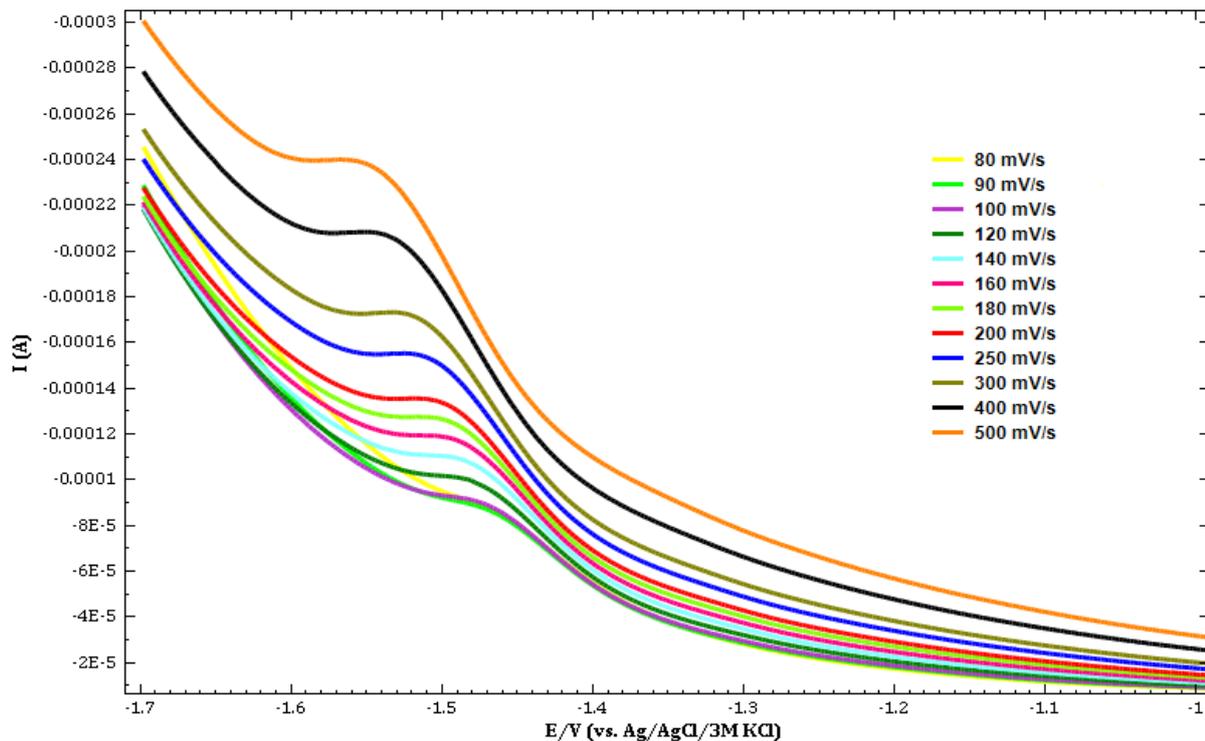


Figura 3.9- Efeito da velocidade de varrimento na intensidade de corrente de pico de $40 \text{ }\mu\text{M}$ TIA no elétrodo de MWCNTs-GCE, em tampão BR 0.1 M pH 7, no intervalo de valores indicados no gráfico.

Na Figura 3.10 está representado graficamente I_p em função da raiz quadrada da velocidade de varrimento, $v^{1/2}$, onde se observa uma relação de linearidade traduzida pela equação: $I_p = 2,5833 (v)^{1/2} - 14,727$, com $R^2 = 0,9928$. Este facto sugere que o processo de transferência de eletrões é controlado por difusão de espécies eletroativas da solução para o elétrodo. Porém, a reta que traduz a relação entre I_p e $v^{1/2}$ não interceta o eixo Y na posição zero, indicando que o processo não é totalmente controlado por difusão, mas também por adsorção de espécies nos centros ativos dos nanotubos de carbono imobilizados no elétrodo de carbono vítreo.

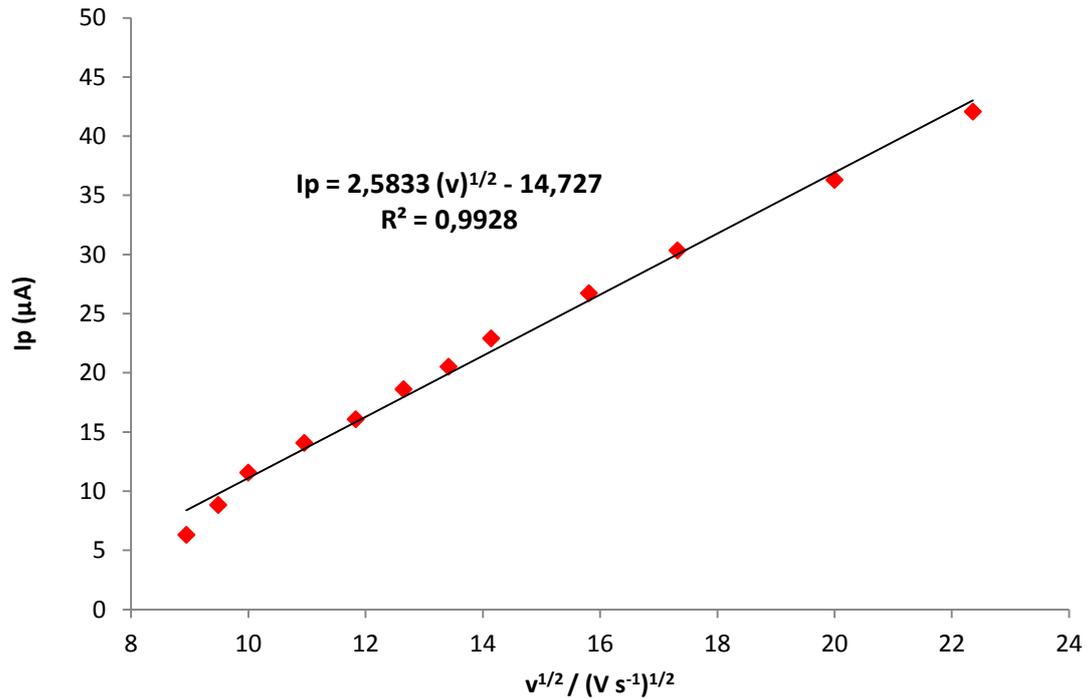


Figura 3.10- Variação da intensidade de corrente de pico (I_p) de TIA em função da raiz quadrada da velocidade de varrimento ($v^{1/2} / (V s^{-1})^{1/2}$). Condições experimentais idênticas às reportadas na Figura 3.9.

Assim construiu-se um gráfico $\log I_p$ vs $\log v$ (Figura 3.11) para concluir se existe alguma influência da adsorção de TIA no processo do eléctrodo, o que de facto se verifica. É possível verificar que existe uma linearidade para a gama de velocidade entre 120 e 500 mV/s^{-1} . A relação $\log I_p$ vs $\log v$ apresenta um valor de declive intermédio entre 0.5 (controlo por difusão) e 1.0 (controlo por adsorção) ^[40]. Podemos afirmar assim que a redução de TIA procede por um mecanismo misto ^[40], controlado por difusão de espécies até junto do eléctrodo mas influenciado em grande parte por adsorção ou interações com os centros ativos dos MWCNTs.

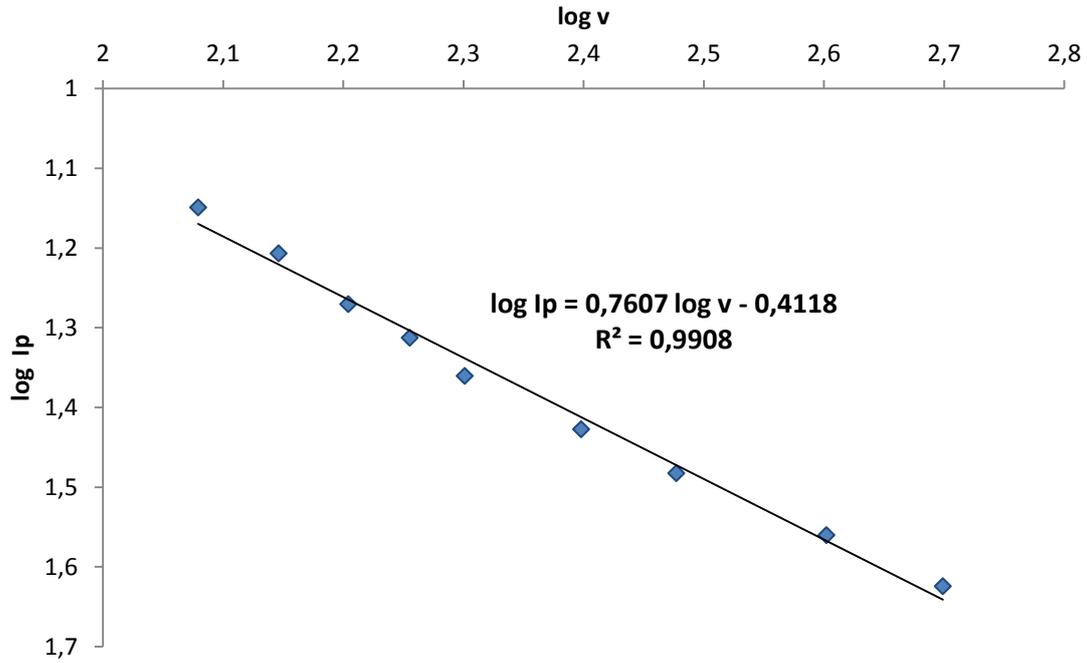


Figura 3.11- Relação $\log I_p$ vs $\log v$. Condições experimentais idênticas às reportadas na Figura 3.9.

Relativamente à dependência do potencial de pico de redução (E_p) da velocidade de varrimento, observa-se que existe uma linearidade característica de processos irreversíveis ^[41] (Figura 3.12).

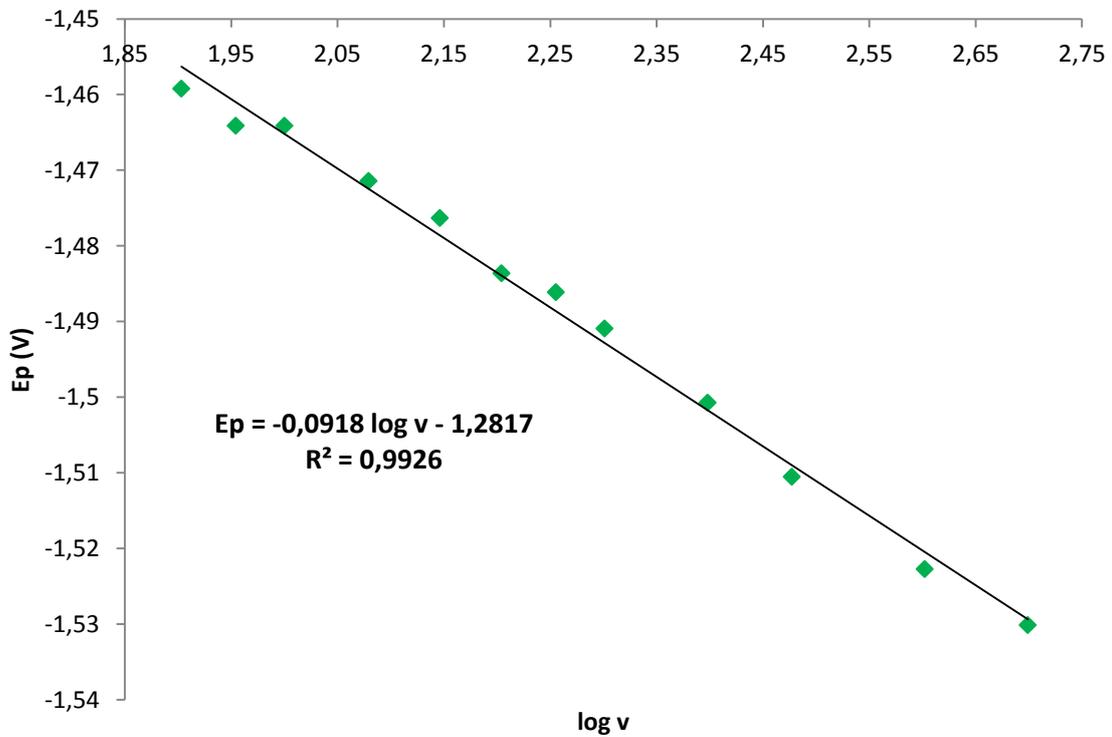


Figura 3.12- Relação $\log E_p$ vs $\log v$. Condições experimentais idênticas às reportadas na Figura 3.9.

3.2.3.3- Efeito da frequência

A frequência (f) é uma das variáveis eletroanalíticas mais importantes na voltametria de onda quadrada, sendo esta determinante na intensidade do sinal analítico e conseqüentemente na sensibilidade do método.

O estudo da variação de frequência foi feito entre 5 e 200 Hz, usando como eletrólito de suporte o tampão Britton-Robinson 0.1 M pH 7 e com uma concentração de 40 μM de TIA na célula, obtidos num intervalo de potencial entre -0.8 V e -1.7 V.

Analisando a Figura 3.13, que mostra a variação da intensidade do pico de corrente (I_p) em função das várias frequências estudadas, percebemos que a 50 Hz a intensidade do pico é destacadamente maior. Até 50 Hz existe um aumento gradual da intensidade do pico de corrente com a frequência, enquanto para valores mais elevados que 50 Hz a intensidade do pico de corrente diminui assim como o ruído associado é maior.

Foi selecionado assim para estudos posteriores a frequência de 50 Hz por apresentar a melhor performance no que diz respeito a intensidade do pico de corrente e reduzido ruído associado.

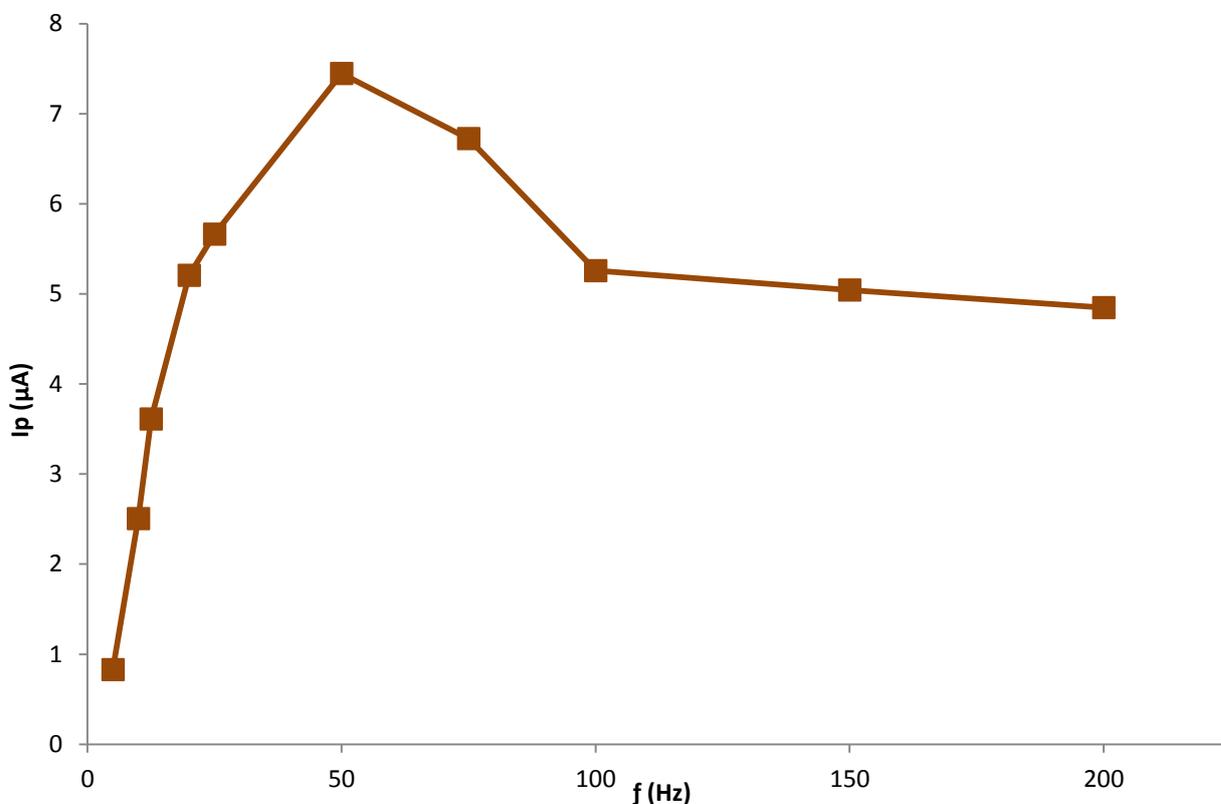


Figura 3.13- Variação da intensidade de corrente de pico dos voltamogramas de SWV em função da frequência; [TIA] = 40 μM .

3.2.3.4- Efeito do tempo e potencial de acumulação

Também foi efetuado o estudo do efeito do tempo de acumulação ($t_{acc.}$) e potencial de acumulação ($E_{acc.}$), na intensidade de corrente de pico. Estas variáveis podem tornar-se bastante relevantes caso seja possível fazer aumentar a sensibilidade analítica do método, como a intensidade de corrente de pico.

O estudo do tempo de acumulação ($t_{acc.}$) foi feito no intervalo de tempo entre 0 e 360 s (Figura 3.14). Este estudo foi feito a uma concentração de TIA de 40 μ M, com o mesmo eletrólito de suporte dos estudos anteriores. Os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos a uma frequência de 50 Hz e utilizado como potencial de acumulação o valor de -0.8 V. Analisando os resultados obtidos na Figura 3.14, foi escolhido o tempo de acumulação de 20 s. É possível verificar que para tempos de acumulação mais elevados a intensidade de corrente de pico mantém-se constante, não se justificando utilizar outro tempo de acumulação que só iria aumentar o tempo total de análise.

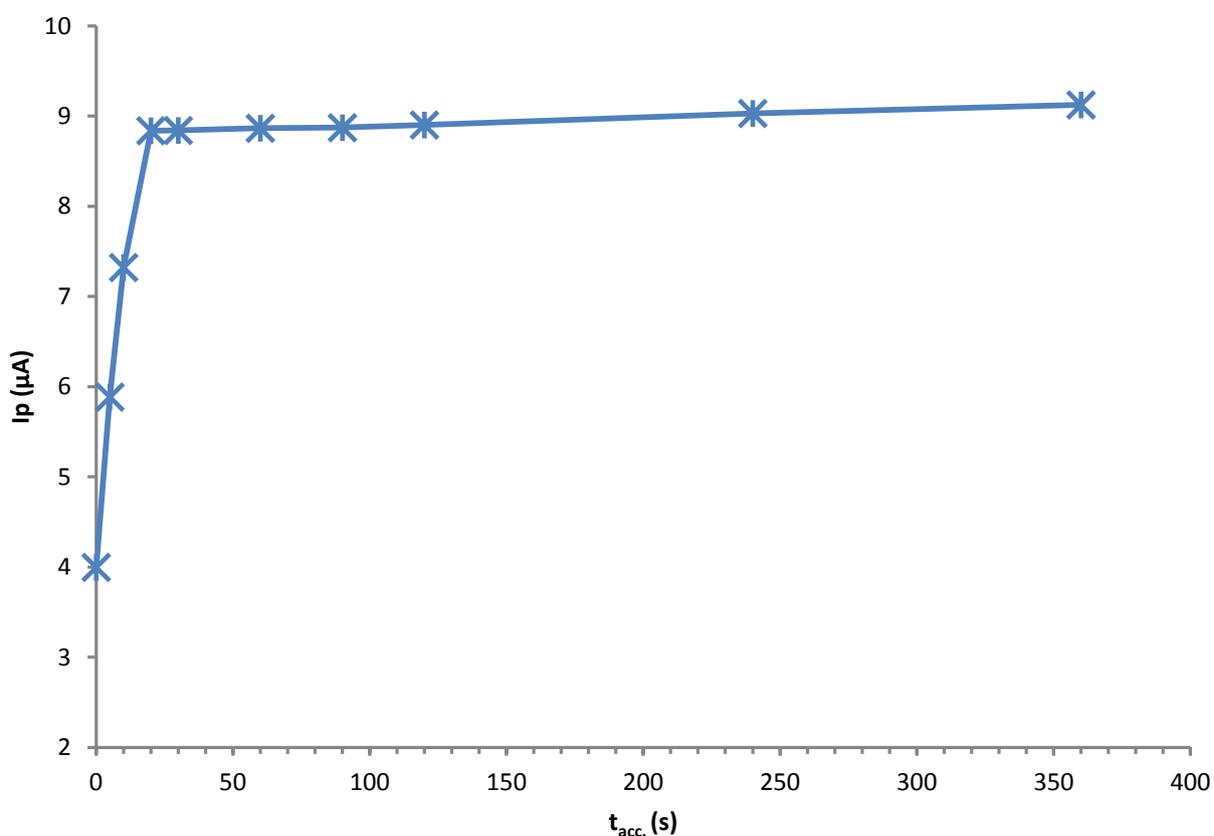


Figura 3.14- Variação da intensidade de corrente de pico dos voltamogramas de SWV em função do tempo de acumulação ($t_{acc.}$); $E_{acc.}$ = -0.8 V, Frequência = 50 Hz, [TIA] = 40 μ M.

Em relação ao estudo do potencial de acumulação ($E_{acc.}$), outra das variáveis que pode influenciar a resposta voltamétrica do analito, foi feita utilizando um intervalo de -0.5 V a -1.3 V (Figura 3.15). Foi escolhido o tempo de acumulação de 20 s e utilizadas as mesmas condições experimentais que os estudos anteriores. Sabendo que o pico de redução referente ao TIA ocorre entre -1.4 V e -1.5 V, optou-se por não fazer o estudo para valores mais negativos que -1.3V, podendo influenciar o pico de redução do TIA. Analisando a Figura 3.15 concluímos que o valor ótimo é de -1 V, mostrando ter o melhor resultado para a intensidade de corrente de pico e não se situar muito perto da zona onde ocorre o pico de redução do TIA. O potencial de acumulação, -1 V, foi também escolhido como potencial inicial.

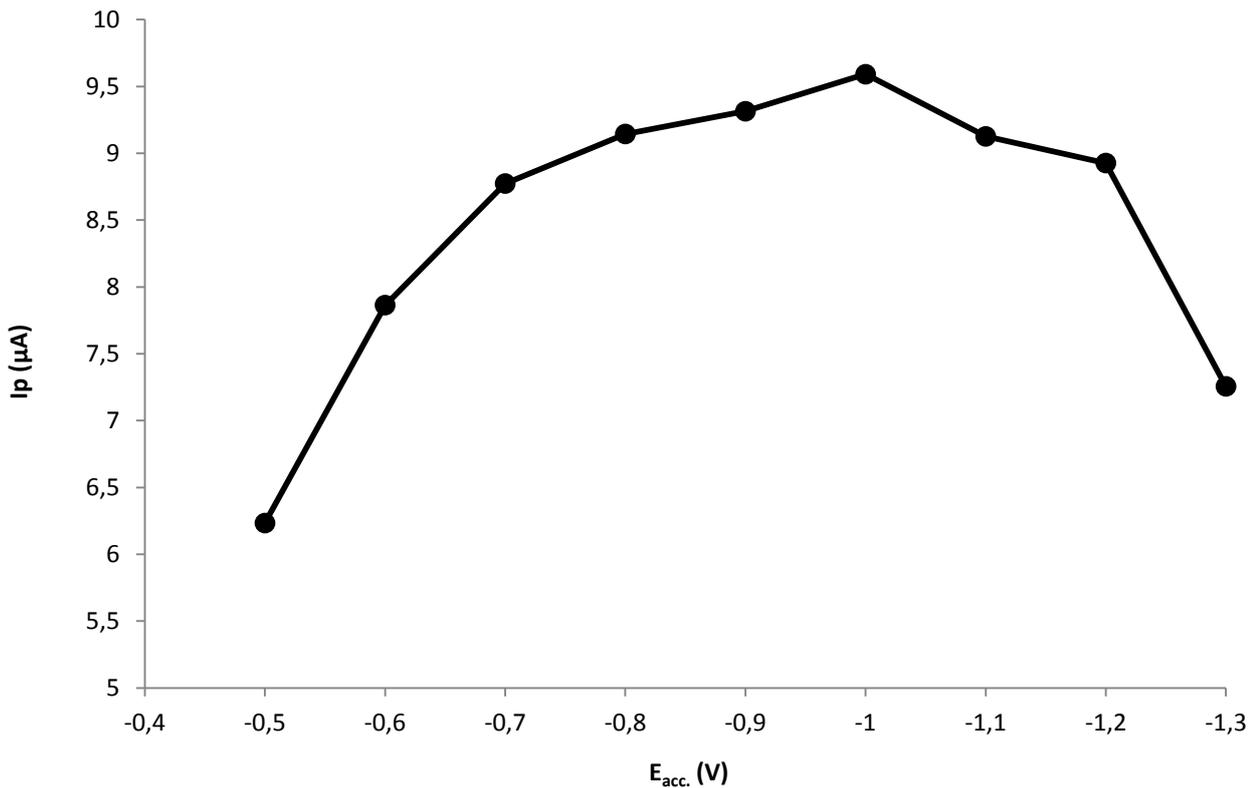


Figura 3.15- Variação da intensidade de corrente de pico dos voltamogramas de SWV em função do potencial de acumulação ($E_{acc.}$); $t_{acc.}$ = 20 s, Frequência = 50 Hz, [TIA] = 40 μM .

3.2.3.5- Efeito do eletrólito de suporte

Nos sistemas eletroquímicos o eletrólito de suporte é adicionado em concentrações elevadas, cerca de cem vezes mais elevadas do que as espécies eletroativas, de modo a garantir que o número de transporte destas seja mínimo. A concentração do eletrólito de suporte varia entre 0.01 M e 1.0 M e tem como função conferir certas propriedades ao meio eletroquímico. A principal é minimizar o fenómeno da migração dos iões eletroativos causada pelo campo elétrico e contribuir para a diferença de potencial interfacial à distância de maior aproximação de iões solvatados ao eléctrodo ^[42]. O eletrólito de suporte deve ser escolhido consoante as espécies químicas presentes na solução, e deve apresentar as seguintes características: elevada solubilidade, elevado grau de ionização e ser estável química e eletroquimicamente no solvente a ser empregue. Um eletrólito de suporte pode ser um sal inorgânico ou orgânico, um ácido ou uma base, ou ainda uma solução tampão como acetato, citrato ou fosfato ^[42].

Neste estudo foram testados dois eletrólitos de suporte, uma solução tampão de fosfato 0.1 M pH 7 e uma solução de Britton-Robinson 0.1 M pH 7. Recorreu-se à voltametria de onda quadrada para comparar os voltamogramas dos dois eletrólitos de suporte em 40 µM de TIA (Figura 3.16). Como podemos observar na Figura 3.16 a solução tampão de fosfato também pode ser utilizada na determinação voltamétrica de TIA, mas o eletrólito Britton-Robinson é o que apresenta uma melhor performance na sensibilidade do método, desde logo pelo seu valor de intensidade de corrente de pico (I_p), mais elevado que para o tampão fosfato. De referir que o tipo de eletrólito de suporte utilizado também tem uma grande influência nas propriedades eletroquímicas dos MWCNTs, e por consequente, na sensibilidade do método analítico. O tampão fosfato pode ainda assim ser utilizado devido à sua gama de pH coincidente com a maioria das águas naturais.

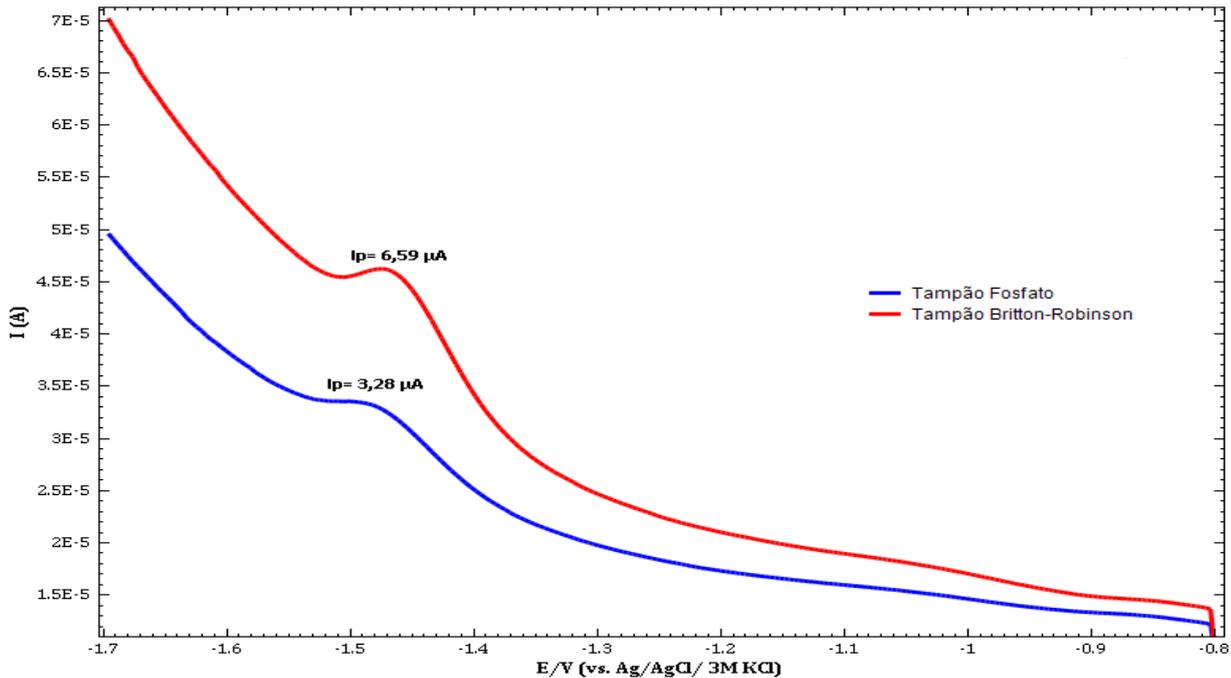


Figura 3.16- Voltamogramas de SWV para os dois eletrólitos de suporte: Britton-Robinson 0.1 M pH 7 e Fosfato 0.1 M pH 7; [TIA] = 40 μM , v = 100 mV/s.

3.2.3.6- Estudo da influência de potenciais interferentes na resposta voltamétrica do tiaclopride

Para realizar um estudo de potenciais interferentes na resposta voltamétrica do TIA foram selecionados dois pesticidas, a terbutilazina e o tembotrione. Foi assim avaliada a interferência de cada um dos pesticidas no sinal voltamétrico de TIA, uma vez que estes pesticidas podem ser encontrados no mesmo meio ambiente que o inseticida em estudo. A terbutilazina (N-Ter-butil-6-Cloro-N'-etil-1,3,5-triazina-2,4-diamina) é um herbicida/algicida seletivo bastante utilizado em Portugal e no mundo, e é considerado perigoso para organismos aquáticos, não sendo recomendada a sua aplicação em terrenos agrícolas adjacentes a cursos de água. É comercializado como Gardoprim® e Primatol® entre outros, e é usado principalmente em sistemas de tratamento e bombeamento de água das piscinas [5]. O tembotrione (2-{2-Cloro-4-(metilsulfonilo)-3-[(2,2,2-Trifluoroetoxi)metil]Benzoílo}1,3-Ciclohexanodiona) é um herbicida de absorção, essencialmente foliar e com aplicação específica para ervas daninhas e folhas largas presentes nas culturas de milho [5]. Este composto foi registado e lançado no mercado em 2007, com os nomes comerciais de Laudis® e

Soberan®. As estruturas químicas dos compostos interferentes apresentam-se na Figura 3.17.

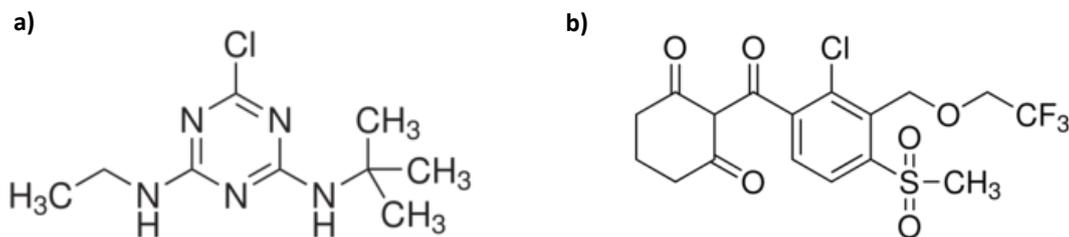


Figura 3.17- Estruturas químicas dos interferentes: terbutilazina (a) e tembotrione (b).

Este estudo foi realizado utilizando a voltametria de onda quadrada com os parâmetros otimizados dos estudos anteriores, em tampão Britton-Robinson 0.1 M pH 7, com uma concentração fixa de tiaclopride de 4.9 mg/L^{-1} ($19.4 \text{ }\mu\text{M}$). Para a terbutilazina foram utilizadas concentrações no intervalo de 0.07 mg/L^{-1} ($0.28 \text{ }\mu\text{M}$) a 1.38 mg/L^{-1} ($5.46 \text{ }\mu\text{M}$), e para o tembotrione de 0.07 mg/L^{-1} ($0.28 \text{ }\mu\text{M}$) a 1.56 mg/L^{-1} ($6.17 \text{ }\mu\text{M}$). Os resultados obtidos apresentam-se na Figura 3.18, onde se observa uma relação entre a concentração de interferente e a variação correspondente (%) no sinal da intensidade de corrente de pico do TIA. Analisando os resultados conclui-se que a terbutilazina influencia negativamente o sinal voltamétrico do tiaclopride a partir de uma concentração de 0.55 mg/L^{-1} de interferente. O gráfico inserido na Figura 3.18 apresenta os voltamogramas de SWV obtidos para a terbutilazina e tiaclopride, onde podemos observar a presença de dois picos referentes à resposta voltamétrica do interferente e o pico referente ao TIA. Já com o tembotrione não parece haver grande influência no sinal voltamétrico do tiaclopride, sendo que a variação máxima na resposta do analito é de 8,77 %. De referir que além de se ter feito o estudo da variação da intensidade de corrente de pico do TIA com a concentração de interferente, também foi investigado a variação do pico de potencial, e concluiu-se que não existe variações no pico de potencial do TIA com os interferentes estudados.

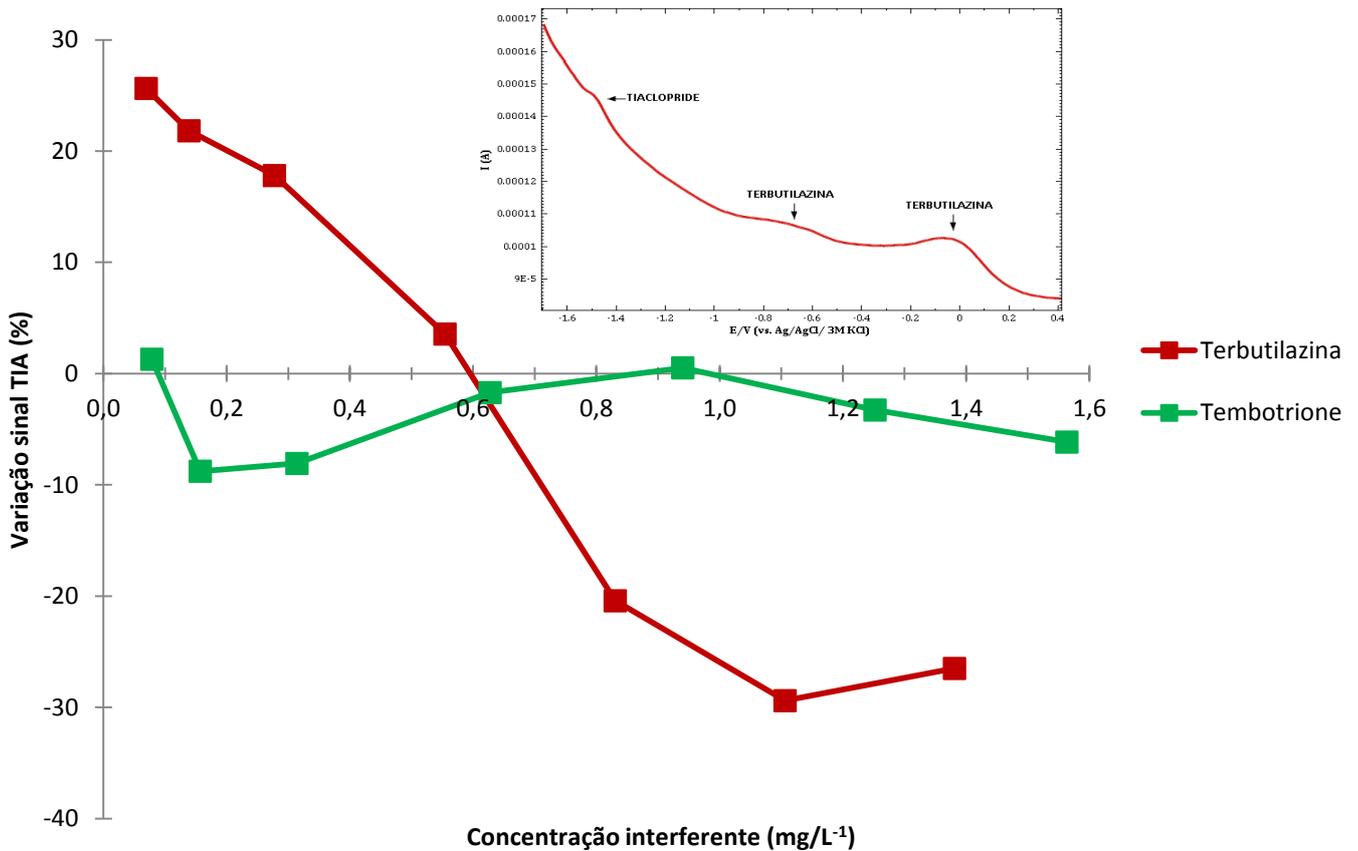


Figura 3.18- Variação do sinal de TIA (%) em função da concentração de interferente (mg/L⁻¹), usando as condições otimizadas para a quantificação voltamétrica do TIA. O gráfico inserido na figura apresenta os voltamogramas de SWV obtidos para o tiaclopride e o interferente terbutilazina.

3.3- Quantificação de tiaclopride utilizando o MWCNTs-GCE

3.3.1- Curva de Calibração

Depois de se ter feito a otimização das variáveis experimentais utilizando a SWV, estudou-se a relação I_p vs. [TIA], de forma a averiguar qual a região de linearidade para a quantificação de tiaclopride, utilizando o MWCNTs-GCE. Com o objetivo de se obter uma curva de calibração, realizaram-se medições voltamétricas no intervalo de concentração de TIA entre 4.35 μM (1.10 mg/L⁻¹) e 18.84 μM (4.76 mg/L⁻¹). Os voltamogramas obtidos entre -1 V e -1.7 V, a uma frequência de 50 Hz, apresentam-se na Figura 3.19. Foram escolhidos como potencial de acumulação e tempo de acumulação, -1 V e 20 s, respetivamente.

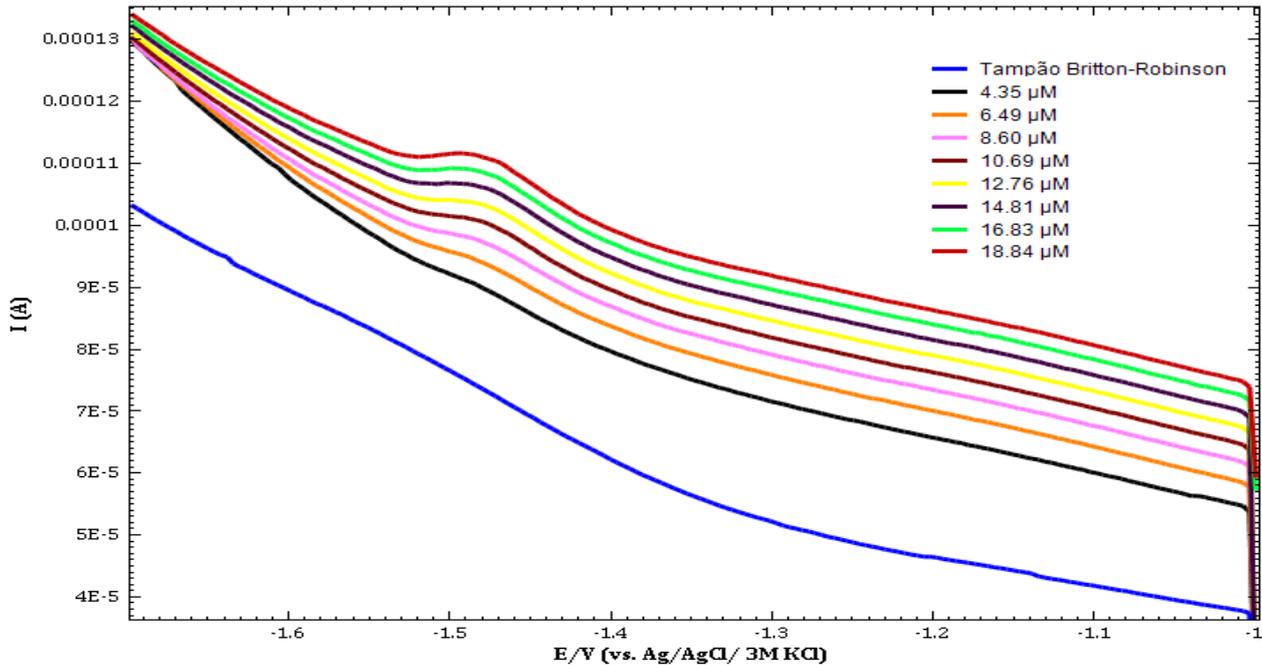


Figura 3.19- Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o intervalo de concentrações de TIA entre 4.35 μM e 18.84 μM . O voltamograma a azul representa a resposta para o tampão BR 0.1 M pH 7.

Como se pode observar na Figura 3.19 os voltamogramas de SWV mostram um aumento da corrente de pico com o aumento da concentração de tiaclopride na solução. Construiu-se assim uma curva de calibração (Figura 3.20) i_p vs. [TIA], onde a curva obtida apresenta um comportamento linear para a gama de concentração 4.35 - 18.84 μM (1.10 - 4.76 mg/L^{-1}). Apartir da concentração de 18.84 μM não existe linearidade. A relação linear é descrita pela seguinte equação de regressão linear: $i_p = 0,2625 [\text{TIA}] - 0,3034$ com um $R^2 = 0,995$.

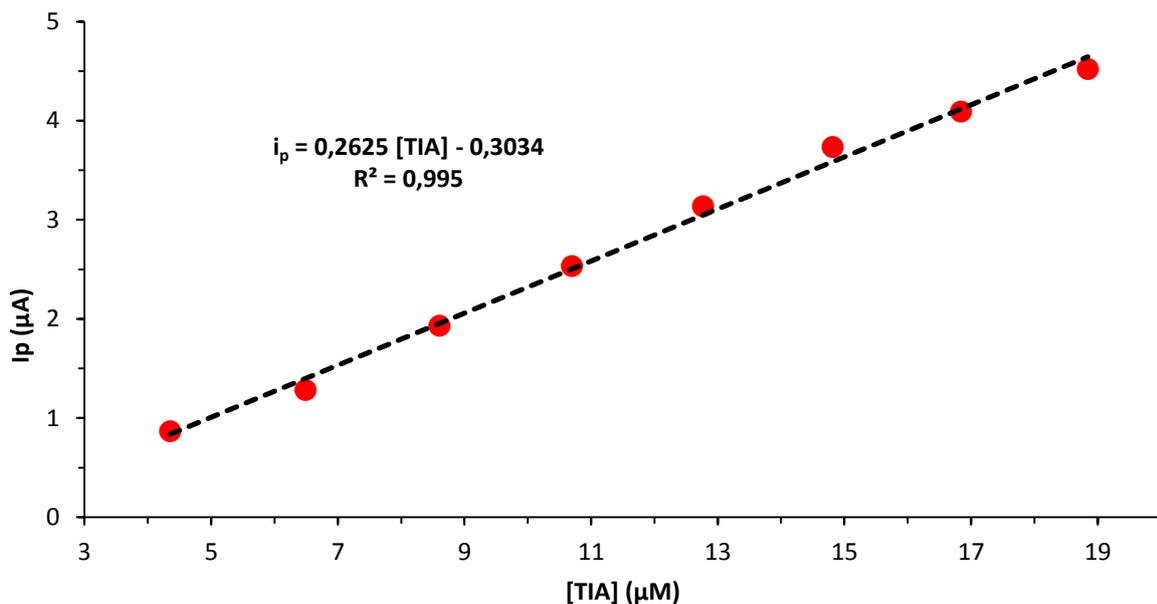


Figura 3.20- Curva de calibração do TIA, no intervalo de concentração 4.35 -18.84 μM (1.10 - 4.76 mg/L^{-1}).

A partir da curva de calibração obtida, calculou-se o limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ), tendo-se obtido os valores de 1.1 μM (0.28 mg/L^{-1}) e 3.6 μM (0.91 mg/L^{-1}), respectivamente. O LOD e o LOQ foram calculados usando as seguintes equações: $\text{LOD} = 3s/m$ e $\text{LOQ} = 10s/m$, em que o s é o desvio padrão da corrente de pico do branco e o m é o declive da curva de calibração [43].

Com base nas condições experimentais otimizadas na análise de SWV e na linearidade obtida, entre o sinal voltamétrico e a concentração do TIA, o passo seguinte consistiu em efetuar a quantificação de TIA numa amostra real de água dopada, utilizando o método da adição padrão.

3.3.2- Determinação de Tiaclopride em amostra ambiental

Tendo em conta o objetivo principal do trabalho, e para confirmar a validade do método voltamétrico na determinação de tiaclopride em amostra real, procedeu-se à dopagem de uma amostra ambiental de um curso de água numa zona agrícola (ver ponto 2.4.2). Para a determinação de TIA na amostra real foi utilizado o método da adição padrão, sem recurso a qualquer tipo de pré-tratamento físico-químico da amostra. A concentração de TIA na célula eletroquímica era de 13.55 μM , e após adições de uma solução padrão de TIA de 100 ppm (395.7 μM), detetaram-se 14.10 μM de TIA (Figura 3.21), havendo uma taxa de recuperação de 104 %. Esta concentração de 14.10 μM de TIA foi determinada por extrapolação da reta: $I_p = 0,2494 [\text{TIA}]_{\text{amostra dopada}} + 3,5184$, com $R^2 = 0,9928$. Estes resultados vieram assim confirmar a possibilidade, importância e utilidade deste método analítico, utilizando o eletrodo de MWCNTs-GCE na determinação voltamétrica de TIA.

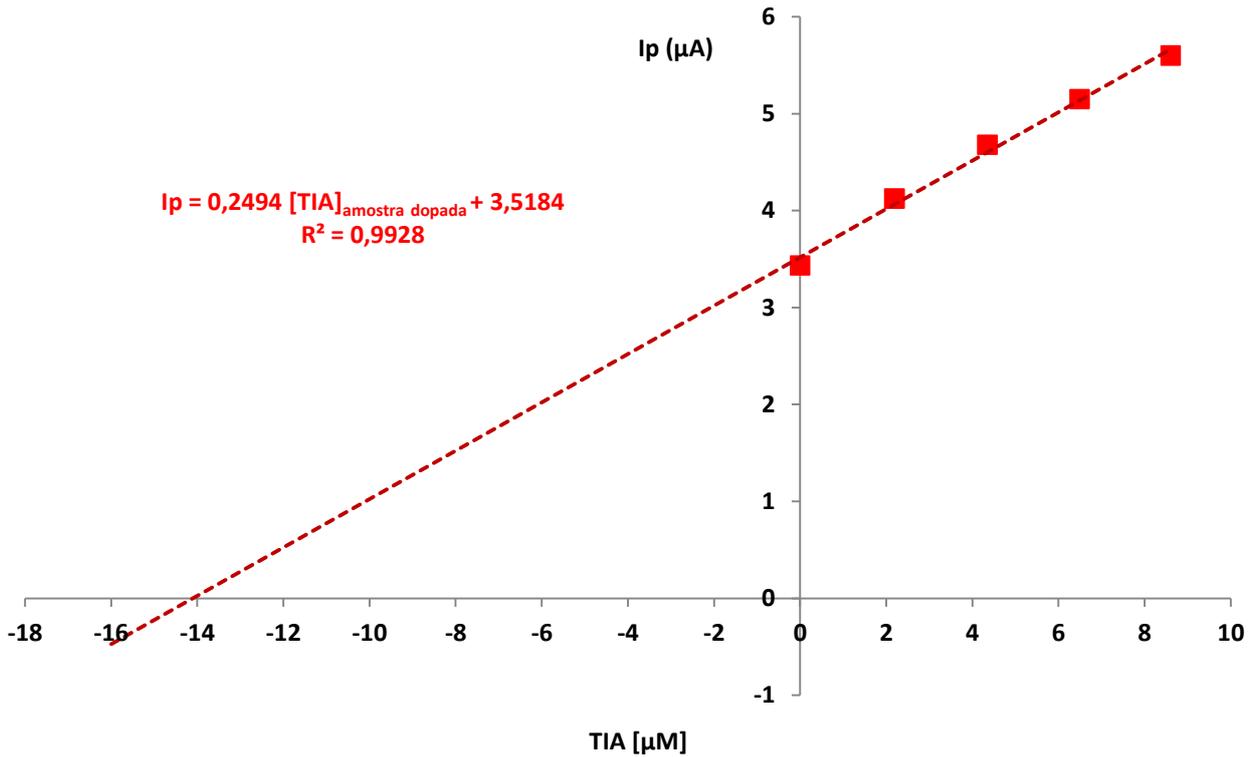


Figura 3.21- Curva de calibração utilizando o método da adição padrão, obtida na determinação de TIA na amostra ambiental.

A Tabela 3.1 apresenta os resultados obtidos da curva de calibração (gama de linearidade, LOD e LOQ) e a percentagem de recuperação de TIA na amostra dopada, utilizando o método analítico desenvolvido com o elétrodo de MWCNTs-GCE.

Tabela 3.1 – Resultados obtidos para a gama de linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e % de recuperação de TIA na amostra dopada.

Gama de linearidade μM (mg L^{-1})	4.35 - 18.84 (1.1 - 4.8)
LOD / μM (mg L^{-1})	1.1 (0.28)
LOQ / μM (mg L^{-1})	3.6 (0.91)
% Recuperação	104.0 (Amostra dopada)

4- Conclusões

Neste trabalho desenvolveu-se um método analítico para determinar e quantificar um pesticida neonicotinóide, o tiaclopride. O método desenvolvido baseou-se em técnicas voltamétricas como a voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada, tendo-se efetuado o estudo eletroquímico da redução do TIA num eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono (MWCNT-GCE). Dos principais resultados obtidos conclui-se que:

- o método analítico desenvolvido demonstrou ser um método viável na quantificação de um pesticida neonicotinóide, o tiaclopride, utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de parede múltipla, utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada.
- o TIA é eletroreduzido aproximadamente a - 1.47 V vs. Ag/AgCl/3M KCl, no eletrólito de suporte Britton-Robinson 0.1 M pH 7.
- o pH do meio influencia o comportamento eletroquímico do TIA, assim como a sensibilidade do método analítico. Foi otimizado como valor ótimo o pH efetivo de 6.51, sendo a região de pH neutro onde a intensidade de corrente de pico é maior.
- entre os dois eletrólitos de suporte testados (tampão fosfato e tampão Britton-Robinson), o BR revelou ser o mais adequado na determinação de TIA, apresentando valores de altura de pico mais elevados que o tampão fosfato.
- o pico catódico obtido com maior intensidade, selecionado para a determinação voltamétrica de TIA, corresponde a um processo de redução irreversível que parece proceder por um mecanismo misto, controlado por difusão e influenciado também por adsorção.
- depois de se terem otimizado todas as variáveis eletroanalíticas traçou-se uma curva de calibração, usando a técnica de voltametria de onda quadrada, para concentrações de TIA compreendidas entre 4.35 e 18.84 μM (1.10 - 4.76 mg/L^{-1}). Obteve-se um limite

de detecção (LOD) de 1.1 μM (0.28 mg/L^{-1}), e um limite de quantificação (LOQ) de 3.6 μM (0.91 mg/L^{-1}), o que comprova a excelente resposta do MWCNTs-GCE para a quantificação de TIA.

- foram estudados dois pesticidas que podem ser encontrados em conjunto com o TIA numa matriz ambiental real, e que podem ser potenciais interferentes na sua determinação voltamétrica, a terbutilazina e o tembotrione. O tembotrione não parece influenciar significativamente a resposta voltamétrica do TIA nas concentrações estudadas. A terbutilazina influencia negativamente a resposta voltamétrica do TIA a partir de uma concentração de 0.55 mg/L^{-1} de interferente.

- o eléctrodo de MWCNTs-GCE revelou ser capaz de determinar o TIA numa amostra ambiental dopada, onde se obteve uma percentagem de 104 % nos ensaios de recuperação realizados. De referir que a amostra não foi submetida a nenhum tratamento prévio antes da realização das medições voltamétricas.

Em conclusão final, pode afirmar-se que o eléctrodo MWCNTs-GCE e o método eletroanalítico aqui proposto para a determinação e quantificação do TIA, é um método alternativo aos métodos cromatográficos, sendo mais económico, mais rápido e menos poluente. De salientar que a modificação efetuada no eléctrodo de trabalho com os nanotubos de carbono tornou-se fundamental, comprovando que as suas propriedades únicas trazem vantagens neste tipo de determinações voltamétricas, aumentando a eletroatividade do eléctrodo.

5- Perspetivas futuras

Tendo em conta os resultados obtidos e apesar de o objetivo do trabalho ter sido alcançado, surgiram várias questões ao longo deste estudo. De seguida apresentam-se alguns tópicos de interesse que podem vir a ser alvo de estudo no futuro:

- investigar e identificar o produto resultante da redução do tiaclopride, e estudar os fenómenos de cinética e termodinâmica dos processos de transferência de eletrões.
- estudar a possibilidade de recuperação de TIA numa matriz ambiental mais complexa, sujeita a um maior número de interferentes.
- fazer um estudo comparativo entre os resultados obtidos com o método voltamétrico proposto e os métodos cromatográficos correntes como o HPLC-UV e a LC-MS.
- aplicação da técnica voltamétrica desenvolvida para determinar e quantificar o pesticida terbutilazina, um dos potenciais interferentes estudados e onde foi possível obter uma resposta voltamétrica no MWCNTs-GCE.
- investigação da possibilidade de utilização de outros sensores voltamétricos modificados com nanotubos de carbono.
- investigação da possibilidade de utilizar outros filmes modificadores no GCE (por exemplo, filme de bismuto).

6- Referências bibliográficas

- [1] Plimmer, J.R.; Gammon, D.W. and Ragsdale, N.N. , *Encyclopedia of Agrochemicals*, Wiley Interscience, New Jersey, USA, 1, **2013**.
- [2] McCauley, Linda A. ; Anger, W. Kent ; Keifer, Matthew ; Langley, Rick ; Robson, Mark G.; Rohlman, Diane, *Workplace, Household, and Personal Predictors of Pesticide Exposure for Farmworkers*, *Environmental Health Perspectives*, 114, **2006**, 943.
- [3] Arcury, T.A. ; Quandt, S.A.; Mellen, B.G. ; *An exploratory analysis of occupational skin disease among latino migrant and seasonal farmworkers in North Carolina*, *Journal of Agricultural Safety and Health*, 9, **2003**, 221.
- [4] Vieira, Maria Margarida; *Venda de produtos fitofarmacêuticos em Portugal 2001-2008*, Direção Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (DGADR), **2009**, Oeiras.
- [5] EPA - *Agência Proteção Ambiental dos Estados Unidos América*, **2013**.
- [6] Perveen, Farzana; *Insecticides – Advances in Integrated Pest Management*, InTech, **2011**.
- [7] Tomizawa, M. ; Casida, E; *Thiacloprid, Imidacloprid and Their Imine derivatives Up-Regulate the $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptor in M10 Cells*, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 169, **2000**, 114.
- [8] Jeschke, P; Nauen, R.; *Pest Management Science*, 64, **2008**, 1084.
- [9] Yamamoto, I. ; Tomizawa, M.; Saito, T. ; Miyamoto, T. ; Walcott, E. C. ; Sumikawa, K. ; *Factors contributing to insecticidal and selective actions of neonicotinoids*; *Archive Insect Biochemistry Physiology*, 37, **1998**, 24.

[10] Tomizawa, M. ; Casida, J. E. ; *Selective Toxicity of Neonicotinoids Attributable to Specificity of Insects and Mammalian Nicotinic Receptors*; Annual Review of Entomology, 48, **2003**, 339.

[11] Kollmeyer, Willy D.; Flattum, Roger F.; Foster, James P.; Powell, James E.; Schroeder, Mark E.; Soloway, S. Barney; *"Discovery of the Nitromethylene Heterocycle Insecticides". Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor*, Tokyo: Springer-Verlag, 3, **1999**, 71.

[12] Obana, H.; Okihashi, M.; Akutso, K. ; Kitagawa, Y.; Hori, S.; *Determination of Neonicotinoid Pesticide Residues in Vegetables and Fruits with Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography Mass Spectrometry*, Journal of Agriculture Food Chemistry, 51, **2003**, 2501.

[13] Ware, George W.; *The Pesticide Book*, Fresno California, **2000**, 418.

[14] Kagabu, S. ; *Chloronicotinyln insecticides-discovery, application and future perspectives*; Reviews in Toxicology, 1, **1997**, 75.

[15] Kagabu, S.; Medej, S.; , *Stability comparison of imidacloprid and related compounds under simulated sunlight, hydrolysis conditions, and to oxygen*, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 59, 1995 , 980.

[16] Kagabu, S.; Akagi, T.; *Quantum chemical consideration of photostability of imidacloprid and related compounds*, Journal of Pesticide Science , 22, **1997** , 84.

[17] Yamamoto, I.; Casida, J. E. ; *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor* ,Springer-Verlag, Tokyo, **1999**, 300.

[18] Maiensch, P.; Brandl, F.; Kobel, W.; Rindlisbacher, A.; Senn, R.; *A novel, broad-spectrum neonicotinoid insecticide in Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor*, Springer, **1999**, 177.

[19] Stoytcheva, Margarita; *Pesticides in Modern World – Trends in Pesticide Analysis*; InTech, **2011**.

[20] Chinery, Michael; Jong, R. de ; *Elseviers insektengids voor West-Europa*, Elsevier, **1975**.

[21] Tomizawa, M.; Casida, E.; *Neonicotinoid Insecticide Toxicology: Mechanisms of selective Action*, Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 45, **2005**, 247.

[22] Henry, Michael; Béguin, M.; Requier, F.; Rollin, O.; Odoux, J.F.; Aupinel, P.; Aptel, J.; Tchamitchian, S.; Decourtye, A.; *A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees*; Science, 336, **2012**, 348.

[23] Whitehorn, Penelope R.; O'Connor, S.; Wackers, F.L.; Goulson, Dave; *Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production*; Science, 336, **2012**, 351.

[24] Elbert, A.; Erdelen, C.; Kuhnhold, J.; Nauen, R.; Schmidt, H.; Hattori, Y.; *Thiacloprid, a novel neonicotinoid insecticide for foliar application*; British Crop Protection Council Conference, Pests & Diseases; 1, **2000**, 21.

[25] Hance, R.J.; *Pesticide Science*, 1, **1970**, 112.

[26] Bagotsky, V.S. ; *Fundamentals of electrochemistry*, 2nd Edition, Wiley, **2005**.

[27] Bard, A.J. ; Faulkner, L.R. ; *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*, 2nd Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, **2001**.

[28] Harvey, David ; *Modern Analytical Chemistry-Electrochemical Methods*; McGraw-Hill Education, **1999**, 667.

- [29] Oliveira- Brett, A.M. ; Brett, C.M.A. ; *Electrochemistry, Principles, Methods and Applications*; Oxford University Press, Oxford, **1996**.
- [30] Souza, D. ; Machado, S . ; Avaca, L. ; *Voltametria de onda quadrada: Aspectos teóricos*, Química Nova, 26, **2003**, 81.
- [31] Skoog, D.A. ; Holler, F.J. ; Nieman, T.A. ; *Princípios de análise instrumental*, Porto Alegre: Bookman, **2002**.
- [32] McCreery, R.L. ; *Electroanalytical Chemistry*, Dekker, **1991**, 221.
- [33] Oâmalley, B. ; Snook, I. ; McCulloch, D. ; *Reverse Monte Carlo analysis of the structure of glassy carbon using electron-microscopy data*, Physical Review, 57, **1998**, 14148.
- [34] Iijima, S. ; *Helical microtubules of graphitic carbon*, Nature, 354, **1991**, 56.
- [35] Ajayan, P.M. ; *Nanotubes from Carbon*, Chemical Reviews, 99, **1999**, 1787.
- [36] <http://ramonflores.br.tripod.com/ler-portugues/mozilla/nanotubos.html> (acesso em 15/01/2013).
- [37] Brycht, Mariola; Vajdle, Olga; Zbiljic, Jasmina; Guzsany, Valeria; Skrzypek, Slawomira; *Renewable Silver-Amalgam Film Electrode for Direct Cathodic SWV Determination of Clothianidin, Nitenpyram and Thiacloprid Neonicotinoid Insecticides Reducible in a Fairly Negative Potential Range*, International Journal of Electrochemical Science, 7, **2012**, 10652.
- [38] Britton, H.T.S ; Robinson, R.A ; *The use of the antimony-antimonous oxide electrode in the determination of the concentration of hydrogen ions and in potentiometric titrations*, Journal of Chemical Society, 287, **1931**, 458.

[39] Kissinger, P.T. ; Heineman, W.R. ; *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, Marcel Dekker, New York, **1996**.

[40] Gosser Jr., D.K. ; *Cyclic Voltammetry Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms*, VCH Publishers, New York; **1993**.

[41] Lingane, J.J. ; *Electroanalytical Chemistry*, Interscience Publishers Inc.; **1958**.

[42] Wang, J. ; *Analytical Electrochemistry*, 3rd Edition, Wiley-VCH, New York ; **2006**.

[43] Miller, N. ; Miller, J.C. ; *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4Ed., Pearson-Prentice Hall, London, **2000**.

[44] Sur, Ujjal Kumar; *Recent Trend in Electrochemical Science and Technology*, **2012**, InTech.

[45] Veiga, Alfredina ; Dordio, Ana ; Carvalho, A.J. Palace; Teixeira, Dora Martins; Teixeira, Jorge Ginja; *Ultra-sensitive voltammetric sensor for trace analysis of carbamazepine*, *Analytica Chimica Acta*, 674, **2010**, 182.

7- ANEXOS

Em anexo apresenta-se uma comunicação em painel apresentada no 18º Encontro da Sociedade Portuguesa de Eletroquímica, que decorreu entre 25 e 27 de Março de 2013 no Porto, Portugal. Este poster é resultado do trabalho desenvolvido nesta tese.



Voltammetric Determination of Insecticide Thiacloprid with a Multi-Walled Carbon Nanotubes/Glassy Carbon Electrode

Pedro Duro^a, Jorge Ginja Teixeira^{a,b,c*}, A. Paula Pinto^{a,d} and Dora Martins Teixeira^{a,c,d}

^aDepartamento de Química, Universidade de Évora, Portugal; ^bCQE - Centro de Química de Évora, Portugal; ^cLaboratório HERCULES, Évora, Portugal; ^dICAAM – Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Portugal; *jmgmt@uevora.pt



Introduction

It is generally known that the chemical analysis of anthropic substances plays a vital role in the environmental monitoring and in the safety and quality control of agri-food products. Especially, because many of these substances and their degradation products can have a negative impact on public health and on other forms of life that we want to preserve. Therefore, the interest in developing new methods (simple, rapid, sensitive, accurate and inexpensive) for the determination of such substances is renewed every day.

Among the harmful anthropic substances used today, and which can be found in environmental samples or on agricultural food, it is important to take into account the class of the insecticides [1]. In particular, those insecticides that entered the market in the last fifteen years, and whose methods for its determination have not yet been thoroughly explored. In this context, we propose in this work the development of a voltammetric procedure for determining Thiacloprid (THIA; IUPAC name: ((2Z)-3-[[6-Chloropyridin-3-yl)methyl]-1,3-thiazolidin-2-ylidene)cyanamide), an important neonicotinoid insecticide used worldwide [2]. The developed procedure was based on the cathodic voltammetric response of THIA at a multi-wall carbon nanotubes film-modified glassy carbon electrode (MWCNTs/GCE), in an aqueous solution of Britton-Robinson (BR) buffer. Using cyclic voltammetry (CV) and square wave voltammetry (SWV) it was confirmed that THIA undergoes an irreversible electro-reduction process at the MWCNTs/GCE, as observed with other electrodes [3]. The cathodic peak produced, which develops at very negative potentials (vs. Ag/AgCl, 3M KCl), is significantly improved at the MWCNTs/GCE, when compared with the bare GCE. Under the optimized conditions (solution pH, preconcentration conditions and frequency) a SWV method was developed for the quantification of THIA. The proposed method presented a good performance for the determination of THIA and its applicability was demonstrated in spiked samples of creek water.

Experimental

Electrochemical Techniques: Cyclic Voltammetry (CV) and Square Wave Voltammetry (SWV).

Electrochemical Equipment: Potentiostat/Galvanostat AUTOLAB with IME663 from Ecochemie B.V. (Holland), model PGSTAT302N controlled by software NOVA, version 1.7; 663 VA Stand (Metrohm).

Preparation and use of the modified glassy carbon electrode: 1mg of multi-walled carbon nanotube (MWCNTs; Ref. 694185 from Aldrich) was mixed with 1 mg of dihexadecyl phosphate (DHP; Ref. D2631 from Sigma) in a 2.0 mL eppendorf. Then, 1 mL of deionised water was added to this mixture to form a black suspension of MWCNTs/DHP. This suspension was dispersed in an ultrasonic bath for about 45 min. Finally, an optimized volume of 10 µL of the MWCNTs/DHP suspension was cast on the clean surface of a glassy carbon electrode (GCE; Ref. 6.1204.110 from Metrohm) and air dried.

Electrodes (standard three-electrode cell configuration): Working electrode – Modified Glassy Carbon Electrode; Reference electrode – Ag/AgCl/3M KCl; Auxiliary electrode – Glassy carbon rod.

Reagent and supporting electrolyte solution: Thiacloprid (from FLUKA; Product Number 37905 - PESTANAL[®]) and Britton-Robinson solution (deoxygenated with nitrogen), respectively.

Sample preparation: An appropriate volume of a commercial formulation of the insecticide [Calypso[™] from Bayer AG, suspension with 480 g L⁻¹ in thiacloprid] was diluted previously; Afterwards, an appropriate aliquot of the diluted solution was added to 100 mL of a creek water (as collected, without any cleaning or treatment operation).

Results and Discussion

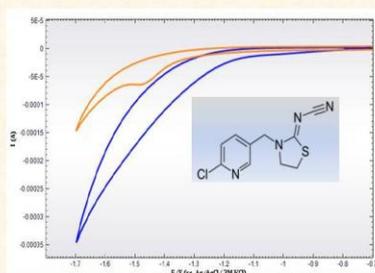


Fig. 1 – Cyclic voltammograms of 40 µM THIA obtained in a Britton-Robinson buffer solution (pH 6.51) at: MWCNT-GCE and bare GCE. Scan rate: 100 mV s⁻¹.

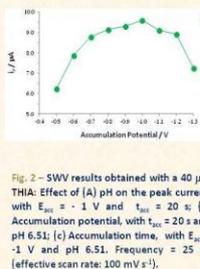
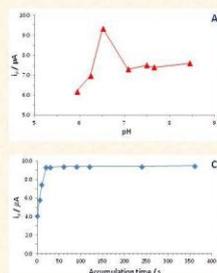


Fig. 2 – SWV results obtained with a 40 µM THIA: Effect of (A) pH on the peak current, with $E_{acc} = -1$ V and $t_{acc} = 20$ s; (B) Accumulation potential, with $t_{acc} = 20$ s and pH 6.51; (c) Accumulation time, with $E_{acc} = -1$ V and pH 6.51. Frequency = 25 Hz (effective scan rate: 100 mV s⁻¹).

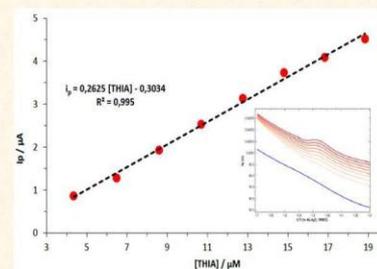


Fig. 3 – Calibration curve of THIA (range 4.35 – 18.84 µM). The inset figure illustrates the SW voltammograms of THIA at MWCNT-GCE (pH 6.51, $E_{acc} = -1$ V, $t_{acc} = 20$ s) and the blank response (blue line).

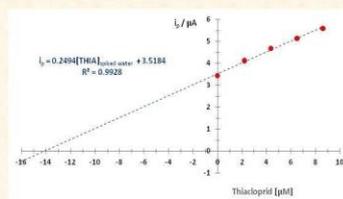


Fig. 4 – Standard additions calibration curve for determination of THIA in spiked water sample by SWV. Same voltammetric conditions as in Fig. 3.

Table 1. Linear range, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) and recovery of THIA using the developed sensor.

Linear range / µM (mg L ⁻¹)	4.35 - 18.84 (1.1 - 4.8)
LOD / µM (mg L ⁻¹)	1.1 (0.28)
LOQ / µM (mg L ⁻¹)	3.6 (0.91)
% Recovery	104.0 (Spiked creek water)

☑ The voltammetric response of THIA at the MWCNT-GCE showed a cathodic peak around -1.5 V, that can be used for its electroanalytical determination (Fig. 1). When compared with the response of THIA at the bare GCE, this signal is greatly enhanced.

☑ The voltammetric determination of THIA should be performed at pH values around pH 7. The optimal conditions for its SWV determination were: $t_{acc} = 20$ s and $E_{acc} = -1$ V (Fig. 2), using a frequency of 25 Hz (effective scan rate: 100 mV s⁻¹). At these conditions the peak current varies linearly with the concentration of THIA in the range 4.35 - 18.84 µM (Fig. 3), and the limits of detection and quantification are fairly good (Table 1).

☑ The proposed electrode proved to be suitable for the determination of THIA in environmental water samples (Fig. 4), showing a good recovery (Table 1).

Conclusions

1. A multi-wall carbon nanotubes film-modified glassy carbon electrode (MWCNTs/GCE) is primarily described for the quantification of thiacloprid using cyclic voltammetry and square wave voltammetry.
2. In the tested conditions, the developed sensor showed good response and a relatively low limits of detection and quantification for thiacloprid.
3. The electrode was applied in the analysis of thiacloprid in an environmental sample, presenting an excellent recovery.

References

- [1] JR Plimmer, DW Gammon and NR Ragsdale (Eds.), Encyclopedia of Agrochemicals, Vol. 1, 2013, Wiley Interscience, New Jersey, USA.
- [2] Pesticide residues in Food – 2006: Evaluations, Part I – Residues, 189/1 – JMPR Report, Rome, Italy, 3-12 October 2006. World Health Organization (WHO) and Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, Rome, 2007, pp. 983-1148.
- [3] M Brycht, O Vajdle, J Zbiljić, Z Papp, V Guzván and S Skrzypek, Int J Electrochem Sci, 7 (2012) 10652-10665.

