



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Sorocaba

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

Ciências Ambientais

Marina Madid Micheletti Caetano

**DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA DGT COM MEMBRANA LIGANTE
DE QUITOSANA NATURAL E MEMBRANA DIFUSIVA DE AGAROSE**

Sorocaba

2022

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

ciências
ambientais



Marina Madid Micheletti Caetano

**DESENVOLVIMENTO DA TÉCNICA DGT COM MEMBRANA LIGANTE
DE QUITOSANA NATURAL E MEMBRANA DIFUSIVA DE AGAROSE**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na Área de Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sergio Tonello

Sorocaba

2022

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

ciências ambientais
unesp
Sorocaba

C128d

Caetano, Marina Madid Micheletti

Desenvolvimento da técnica dgt com membrana ligante
de quitosana natural e membrana difusiva de agarose /
Marina Madid Micheletti Caetano. -Sorocaba, 2023
56 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia,
Sorocaba

Orientador: Paulo Sérgio Tonello

1. Monitoramento Ambiental. 2. Metais
Potencialmente Tóxicos. 3. Contaminação.
4.DGT. 5. Gel de quitosana. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.

Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba. Dados fornecidos
pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Impacto potencial desta pesquisa

Esta pesquisa pode ser aplicada para avaliar a qualidade da água, e contribuir para a preservação dos recursos hídricos. Também tem a possibilidade de impactar positivamente a sociedade, pois a concentração de poluentes na água pode afetar a saúde humana e o meio ambiente. A metodologia desenvolvida pode ser utilizada por órgãos regulatórios e empresas, pois está alinhada aos objetivos do desenvolvimento sustentável.

Potential impact of this research

This research can be applied to assess water quality, contributing to the preservation of water resources. It also has the possibility of positively impacting society, as the concentration of pollutants in water can affect human health and the environment. The methodology developed can be used by regulatory agencies and companies, as it is aligned with the goals of sustainable development.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Sorocaba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Desenvolvimento da técnica DGT com membrana ligante de quitosana natural e membrana difusiva de agarose

AUTORA: MARINA MADID MICHELETTI CAETANO

ORIENTADOR: PAULO SERGIO TONELLO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Ambientais, área: Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO SERGIO TONELLO (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Ambiental / Instituto de Ciência e Tecnologia UNESP Sorocaba

Prof. Dr. ANDRÉ HENRIQUE ROSA (Participação Virtual)
Departamento Engenharia Ambiental / Instituto de Ciência e Tecnologia Campus de Sorocaba Unesp

Profª. Drª. DANIELE FRASCARELI (Participação Virtual)
Faculdade Anhanguera - Sorocaba

Sorocaba, 22 de dezembro de 2022

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos aqueles que contribuíram para a realização desta dissertação de mestrado. Em primeiro lugar, quero agradecer à Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), por ter proporcionado as condições necessárias para a realização desta pesquisa.

Aos meus pais, Heloísa e Virgílio, e minha irmã, Mariana, pelo amor e apoio incondicional ao longo desses anos, eu não teria conseguido sem eles. São minha primeira fonte de inspiração e motivação, e eu sou eternamente agradecida por tudo o que fizeram por mim.

Um agradecimento especial ao meu orientador, o professor doutor Paulo Sérgio Tonello, pelos conselhos valiosos, incentivo e orientação incansáveis. Sua paixão pela pesquisa e dedicação à docência são uma fonte de inspiração para mim. Mas, além da admiração intelectual, seu grande coração e amizade, me permitiram até apelidá-lo carinhosamente de "papinello"! Em muitos momentos, seu carinho e atenção me fizeram sentir como se ele fosse um verdadeiro pai para mim. Muito obrigado por tudo, "papis"!

Quero agradecer também ao professor doutor André Henrique Rosa, inspiração profissional e acadêmica, presença fundamental em todas as etapas desta pesquisa. Suas observações aprimoraram minha visão e a utilização de seu laboratório foram imprescindíveis para esta pesquisa.

Também sou grata à professora doutora Elidiane Rangel que permitiu-me o acesso ao Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais (LMCMat) em um momento crucial desta pesquisa.

Toda gratidão à minha querida amiga, a doutora Daniele Frascareli, por seu carinho e orientação, por estar sempre de portas abertas, pela paciência em revisar o texto com observações essenciais e pelos cafés mais bem servidos!

A todos da sessão técnica da Unesp: Letícia, Susan, Sandra, Sereia, Sandrão, Lucas e Claudião. Eles foram uma fonte diária de apoio, motivação e ajuda. Eu gostei demais do

tempo que passamos juntos, e sou muito grata pela atenção e amizade que vocês me dedicaram.

Por fim, gostaria de agradecer aos meus amigos próximos, meus amores na vida, vocês sabem que moram no meu coração e que fazem parte de mim! Sempre presentes nos momentos mais felizes! E também nos mais difíceis. Eu sou muito sortuda por ter pessoas tão incríveis em minha vida.

Agradeço a todos, de coração.

RESUMO

Frente à evolução da industrialização, aliada com o crescimento intenso da agricultura e dos principais centros urbano-industriais, os corpos hídricos vêm sofrendo com a entrada de grandes quantidades de contaminantes e compostos químicos, como os metais potencialmente tóxicos. O monitoramento dos corpos hídricos é de grande importância, uma vez que são utilizados para abastecimento público e diversas outras atividades como irrigação e pesca, e a técnica de difusão em filmes finos por gradientes de concentração (DGT) tem se mostrado eficiente no auxílio ao monitoramento destes metais em meios aquosos. Técnica baseada na 1ª Lei de Difusão de Fick, convencionalmente utiliza a membrana ligante feita com resina Chelex-100 e a membrana difusiva de acrilamida-agarose. Entretanto, esta resina é artificial e seus resultados são limitados. Uma alternativa para esta questão seria utilizar materiais de origem natural para fabricação do gel ligante, como a quitosana, que se trata de um polímero natural, biodegradável e atóxico. Sendo assim, nesse trabalho o dispositivo DGT foi confeccionado com materiais alternativos, sendo eles: filme de quitosana natural como agente ligante e gel de agarose como gel difusivo para a determinação dos coeficientes de difusão e adsorção dos analitos Cd (II), Cu (II) e Zn (II) em ambientes aquáticos. Os dispositivos montados com os materiais alternativos foram validados a partir de curvas de imersão nos diferentes analitos analisados, onde foram obtidas retas que comprovam o cumprimento da Lei de Fick, ou seja, comprovam que podem ser utilizados para a técnica DGT. No teste de câmara de difusão, o gel de agarose apresentou coeficiente de difusão para os íons Cd (II), Cu (II) e Zn (II), respectivamente, de $5,09 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$; $2,83 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $1,70 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Os mesmos coeficientes foram determinados utilizando diretamente os dispositivos DGT e os valores de coeficiente de difusão foram de $2,45 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$; $3,56 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $1,27 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, para Cd (II), Cu (II) e Zn (II), respectivamente. Os resultados dos coeficientes de difusão obtidos em ambos os testes foram mais semelhantes para Cu (II) e Zn (II) quando comparados a diferença entre ambos os coeficientes obtidos para o Cd (II), sendo assim concluiu-se que o dispositivo DGT com os materiais alternativos foi efetivo, mas deve ser feita uma otimização do processo para obter resultados mais eficientes.

Palavras-chave: Gel de agarose. Géis alternativos. DGT. Membranas ligantes de quitosana.

ABSTRACT

Faced with the evolution of industrialization, combined with the intense growth of agriculture and the main urban-industrial centers, water bodies have been suffering from large amounts of contaminants and chemical compounds such as potentially toxic metals. The monitoring of water bodies is of great importance, since they are used for public supply and several other activities such as irrigation and fishing, and the thin film diffusion technique by concentration gradients (DGT) has been shown to be efficient in helping to monitor these metals in aqueous media. Technique based on Fick's 1st Law of Diffusion, conventionally uses the binding membrane made with Chelex-100 resin and the diffusive membrane of acrylamide-agarose. However, this resin is artificial and its results are limited. An alternative to this issue would be to use materials of natural origin to manufacture the binding gel, such as chitosan, which is a natural, biodegradable and non-toxic polymer. Therefore, in this work, the DGT device was made with alternative materials, namely: natural chitosan film as a binding agent and agarose gel as a diffusive gel for the determination of diffusion and adsorption coefficients of Cd (II), Cu (II) and Zn (II) analytes in aquatic environments. The devices assembled with alternative materials were validated based on immersion curves in the different analyzed analytes, where straight lines were obtained that prove compliance with Fick's Law, that is, they prove that they can be used for the DGT technique. In the diffusion camera assay, the agarose gel presented a diffusion coefficient for Cd (II), Cu (II) and Zn (II) ions, respectively, of $5,09 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$; $2,83 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ and $1,70 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. The same diffusion coefficient were directly determined by DGT devices and the values of diffusion coefficient were $2,45 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$; $3,56 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ and $1,27 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, for Cd (II), Cu (II) and Zn (II), respectively. The results of the diffusion coefficients obtained in both tests were more similar for Cu (II) and Zn (II) when comparing the difference between both coefficients obtained for Cd (II), so the conclusion is that the DGT device with alternative materials was effective, but an optimization of the process should be done to obtain results that are more efficient.

Key words: Agarose gel. Alternative gels. DGT. Chitosan binding membranes.

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Usos industriais e efeitos toxicológicos de alguns metais.....	19
Tabela 2 – Limite máximo de concentração de metal em águas de classe 1	19
Tabela 3 – Principais bandas de adsorção de das membranas de quitosana obtidas por absorção no infravermelho.....	37
Tabela 4 – Funções lineares obtidas da relação massa por tempo de Cd (II), Cu (II) e Zn (II).....	43
Tabela 5 – Coeficientes de difusão (D) para Cd (II), Cu (II) e Zn (II) medidos em câmara de difusão a 25 °C (0,01 mol L ⁻¹ NaNO ₃ , pH 5,0). Unidade de valores encontrados (10 ⁻⁶ cm ² s ⁻¹)	43
Tabela 6 – Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ)	46
Tabela 7 – Coeficientes de difusão (D) para Cd (II), Cu (II) e Zn (II) medidos pelo teste de adsorção de massa e câmara de difusão a 25 °C (0,01 mol L ⁻¹ NaNO ₃ , pH 5,0). Unidade de valores encontrados (10 ⁻⁶ cm ² s ⁻¹). Diferença entre os valores obtidos na adsorção de massa e na câmara de difusão (%)	47

Lista de Figuras

Figura 1 – Esquema do dispositivo DGT	21
Figura 2 - Estrutura da Agarose	25
Figura 3 – Estrutura da quitina	26
Figura 4 – Estrutura molecular da quitosana.....	26
Figura 5 – Câmara de difusão	30
Figura 6 – Membranas de quitosana natural secas na placa de Petri	31
Figura 7 – Ensaio de DGT (A) Dispositivo DGT (B) Equipamento para teste de difusão pelo método de adsorção de massa	34
Figura 8 – Gel translúcido de agarose.....	35
Figura 9 – Disco de quitosana natural	36
Figura 10 – Espectro de absorção no infravermelho de membranas de quitosana.....	37
Figura 11 – Imagens da membrana de quitosana através da técnica de espectroscopia de raios X por energia dispersiva (A) Mapeamento EDS da membrana de quitosana em carbono (B) Mapeamento EDS da membrana de quitosana em oxigênio (C) Espectros de EDS.....	38
Figura 12 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura da membrana de quitosana natural (A) Magnificação 250x – escala 100 μm (B) Magnificação 450x – escala 100 μm	39
Figura 13 – Difrátômetro de raios X das membranas de quitosana	40
Figura 14 – Ponto de carga zero das membranas de quitosana	41
Figura 15 – Curva massa x tempo do cádmio	42
Figura 16 – Curva massa x tempo do cobre.....	42
Figura 17 – Curva massa x tempo do zinco	43
Figura 18 – Curva padrão do cádmio	44
Figura 19 – Curva padrão do cobre.....	45
Figura 20 – Curva padrão do zinco	45

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
2. Revisão bibliográfica.....	17
2.1. A presença de metais-traço nos ecossistemas aquáticos e seu monitoramento	17
2.2. <i>Diffusive gradients in thin films</i>	21
2.3. Coeficiente de difusão	23
2.5. Quitosana	25
3. Objetivos.....	28
3.1. Objetivo geral.....	28
3.2. Objetivos específicos.....	28
4. Metodologia.....	29
4.1. Filme gel difusivo de agarose.....	29
4.1.1. Confecção do filme gel difusivo de agarose	29
4.1.2. Determinação do coeficiente de difusão pela câmara de difusão	29
4.2. Filme gel ligante de quitosana.....	30
4.2.1. Confecção do filme gel ligante de quitosana natural	30
4.2.2. Caracterização dos discos de quitosana.....	31
4.2.2.1. Espectroscopia de infravermelho	31
4.2.2.2. Microscopia eletrônica de varredura e Espectroscopia por Energia Dispersiva	32
4.2.2.3. Difractometria de raios X.....	32
4.2.2.4. Determinação do pH de carga zero	32
4.2.3. Montagem dos dispositivos DGT e curva de imersão	33
5. Resultados.....	35
5.1. Gel difusivo de agarose.....	35
5.2. Gel ligante de quitosana	35
5.2.1. Caracterização das membranas de quitosana natural.....	36
5.2.1.1. Composição química da membrana de quitosana.....	36
5.2.1.2. Análise da superfície das membranas de quitosana.....	38
5.2.1.3. Cristalinidade das membranas de quitosana.....	39
5.2.1.4. Ponto de carga zero.....	40
5.3. Cálculo do coeficiente de difusão	41
5.3.1. Método da câmara de difusão com gel de agarose.....	41

5.3.2. Método de adsorção de massa.....	44
5.3.2.1. Curva padrão dos metais	44
5.3.2.2. Coeficiente de difusão pelo teste de adsorção de massa	46
6. Conclusão.....	49
Referências bibliográficas.....	51

1. Introdução

Ficou famosa a citação publicada no Relatório do Banco Mundial, em agosto de 1995: "Muitas das guerras deste século foram fruto da disputa pelo petróleo. As do próximo século serão causadas pela luta por água" (FALCÃO; DIMENSTEIN, 1996). Infelizmente, a crise hídrica pode ser objetivamente constatada em muitos lugares do planeta, além do que, existe uma verdadeira batalha entre as forças de degradação dos recursos hídricos e o esforço da pesquisa científica, para evitar que esse bem tão indispensável à vida, se torne ainda mais escasso.

Como sabemos, a água é um recurso indispensável em seus múltiplos usos: geração de energia elétrica, irrigação de lavouras, lazer, turismo, pesca, agricultura e proteção ambiental, além de constituir a base de todos os processos bioquímicos e fisiológicos dos organismos vivos. Porém, segundo dados da UNESCO, as águas doces disponíveis para o consumo humano, agrícola e industrial, presentes em rios, lagos e aquíferos, representam menos de 1% de toda a água existente no planeta (PEREIRA DOS SANTOS; FERREIRA; FREITAS FERREIRA, 2017). Aparentemente, a água é um recurso renovável e perene, mas é preciso levar em conta a sua distribuição no espaço geográfico e o seu uso inadequado, que aumentou exponencialmente com o crescimento populacional e a revolução agrícola. A poluição das águas é, portanto, um dos mais graves problemas ambientais e sua contaminação pode resultar em graves problemas para o equilíbrio ecológico, para a saúde dos seres vivos (GURGEL, 2007) e também, na sua disponibilidade para os usos múltiplos.

A humanidade sempre tratou os recursos naturais como sendo infinitos. Nas últimas décadas, a revolução industrial em escala global e o aumento populacional sem precedentes, comprometeu de forma radical a qualidade de nosso ambiente. Mesmo na atualidade, com toda a divulgação sobre a necessidade de gerir melhor esses recursos, sobretudo a água, ainda são recorrentes diversas práticas perniciosas como o desperdício, a poluição dos corpos d'água com resíduos domésticos e industriais, o uso abundante na extração de minérios, a destruição das matas ciliares, o desperdício e a má gestão governamental (PEREIRA DOS SANTOS; FERREIRA; FREITAS FERREIRA, 2017).

Especificamente em ambientes aquáticos, impactos ambientais como a contaminação dos corpos hídricos por metais potencialmente tóxicos são um dos principais desafios enfrentados pela pesquisa científica (CARDOSO-SILVA et al., 2021; WANG et al., 2022). A industrialização desenfreada é responsável por liberar uma série de poluentes como pesticidas, petróleo hidrocarbonetos, metais, policlorados e corantes sintéticos (BILAL et al., 2019). Tais poluentes e suas características de difícil degradação, alta toxicidade e acúmulo biológico, podem causar efeitos tóxicos, cancerígenos, teratogênicos e mutagênicos em humanos ou outros organismos (LIU et al., 2019), além de problemas patológicos como: encefalopatia, comprometimento cognitivo, distúrbios comportamentais, danos nos rins, anemia, entre outros (SARAVANAN; RAVIKUMAR, 2015). Dada a sua elevada toxicidade, os íons metálicos podem afetar todo um ecossistema e prejudicar atividades relacionadas ao turismo, à pesca e ao transporte, dentre outras (MA et al., 2014). A origem desses contaminantes hídricos inorgânicos são sobretudo fontes antropogênicas tais como indústria de galvanoplastia, produção de pigmentos, soldas, equipamentos eletrônicos, lubrificantes, combustíveis, acessórios fotográficos, entre outros, além da poluição difusa causada por fertilizantes (AHMAD et al., 2014).

Não obstante, a popularidade que ganhou o termo “desenvolvimento sustentável”, qualquer atividade humana causa impactos ambientais. E esses impactos são cada vez mais preocupantes e abrangem mesmo todo o planeta, como a ameaça do aquecimento global. O que caracteriza um fenômeno como impacto ambiental é a sua intensidade, abrangência e recorrência (tempo de duração), para além da capacidade do ambiente em questão, absorver as influências maléficas que colocam em risco todo o ecossistema e a sua perpetuação (CANETTIERI, 2004).

Por outro lado, existem inúmeras possibilidades para a recuperação dos recursos naturais degradados, assim como, prevenir sua dispersão para os arredores, mantendo um ambiente mais saudável. Vários métodos químicos podem ser utilizados, como a oxidação/redução, neutralização, precipitação, absorção e eletroquímica; assim como tratamentos físicos tais como a adsorção, filtração, floculação/coagulação e flotação

(MALDONADO; WENDLING, 2009), e métodos biológicos onde são utilizados microrganismos e enzimas para o tratamento (LIU et al., 2019).

Especificamente, em ambientes aquáticos, as espécies metálicas estão presentes sob diversas formas físico-químicas. No entanto, somente algumas destas espécies podem ser consideradas biodisponíveis ou realmente tóxicas para a biota aquática em questão. A distribuição, o transporte e a biodisponibilidade de metais em águas naturais dependem de processos físicos e químicos inerentes à coluna d'água e o sedimento, dependendo, portanto, da característica do metal e da composição do meio aquático receptor (CHOSTAK et al., 2015).

Sendo assim, a análise de quantificação de metais em ambientes aquáticos é primordial para elucidar o comportamento, o destino e sobretudo, o real impacto das espécies metálicas à biota aquática. A fim de se medir, quantitativamente, metais livres e lábeis presentes em ambientes aquáticos. A técnica DGT (do inglês *diffusive gradients in thin films*), apresentada por Zhang e Davison em 1995, demonstra-se ser uma ferramenta eficiente e promissora para remediação de ecossistemas aquáticos com um grau de poluição por metais. Logo, a partir de um amostrador passivo, que quando imerso no meio aquático, permite a difusão dos íons metálicos por um gel poroso até um gel ligante, o qual retém os íons para posterior quantificação em laboratório. Neste trabalho, a técnica DGT será apresentada com o gel difusivo e o gel ligante modificados, a fim de aprimorar a adsorção de algumas espécies metálicas.

2. Revisão bibliográfica

2.1. A presença de metais-traço nos ecossistemas aquáticos e seu monitoramento

A água um recurso indispensável para os seres humanos, considerando o abastecimento doméstico, produção industrial, geração de energia e agricultura. Assim, a degradação aquática é um dos problemas ambientais mais graves enfrentados pela sociedade (GURGEL, 2007), cujo comprometimento da qualidade da água e redução da sua disponibilidade está fortemente atrelado às ações antrópicas (ALMUKTAR; ABED; SCHOLZ, 2018).

Dessa forma, apesar da dependência da água pelos seres humanos, sua relação é extremamente negativa e predatória, devido a expansão urbana, agrícola e industrial, causando queimadas e desmatamento, má gestão de recursos naturais e o lançamento de resíduos domésticos e/ou industriais nos corpos d'água (SANTOS et al., 2017). Assim, o crescimento populacional, o saneamento básico precário e a demanda por recursos, como água e alimentos, contribuem para o lançamento de contaminantes nos sistemas aquáticos, como, compostos inorgânicos, compostos orgânicos de difícil degradação e metais potencialmente tóxicos (ALMUKTAR; ABED; SCHOLZ, 2018).

Dentre os metais, existem os essenciais para a saúde humana, pois apresentam papel biológico quando ingeridos em doses baixas, como por exemplo o cobre, o cobalto e o zinco, e, os não essenciais, que não possuem papel biológico conhecido, como o cádmio, o chumbo e o níquel (WILLIAMS et al., 2000). Esses compostos são potencialmente tóxicos, pois dependendo da concentração da espécie metálica na água e da sua especiação, o grau da toxicidade pode aumentar e causar sérios danos à saúde humana, como distúrbios neurológicos, genéticos e carcinogênicos (AMOUEI et al., 2020; VILAS-BOAS et al., 2020). Além disso, metais potencialmente tóxicos são persistentes e não biodegradáveis, causando bioacumulação e transmissão ao longo da cadeia alimentar (biomagnificação) (KHAN et al., 2021).

A contaminação de ecossistemas aquáticos por metais tem fonte natural e antrópica (SIMUL BHUYAN et al., 2019). A forma natural inclui ciclos geológicos, através

de intemperismo e erupções vulcânicas, além de corrosão de metais, deposição atmosférica, erosão, lixiviação e evaporação (ALI; KHAN; ILAHI, 2019; TCHOUNWOU et al., 2012). Já as atividades antrópicas incluem mineração, fundição, processamento de metais em refinarias, emissões industriais (plástico, têxtil, eletrônica, madeira e papel), queima de carvão e combustíveis fósseis, agricultura, através do uso de fertilizantes e pesticidas (SUN et al., 2020; TCHOUNWOU et al., 2012).

Dentre os metais potencialmente tóxicos, os mais estudados são arsênico (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cobre (Cu), cromo (Cr), mercúrio (Hg), níquel (Ni) e zinco (Zn) (MASINDI; MUEDI, 2018). O Cd pode acumular-se no fígado e rins, inibir atividade enzimática, causar danos em órgãos sexuais, afetar a pressão arterial e efeitos tetatogênicos e carcinogênicos (MUSILOVA et al., 2016).

O Cu no ambiente aquático pode ser encontrado em concentrações de 4 a 10 µg/L (MENG et al., 2016). Esse elemento é um micronutriente essencial para plantas e animais, envolvido em diversos processos biológicos, como o funcionamento de muitas enzimas, sendo essencial para o metabolismo (MUSILOVA et al., 2016). Mas, quando ingerido em excesso pode causar vômitos, câimbras, convulsões e até morte, além de danos no sistema gastrointestinal e respiratório (MENG et al., 2016; MUSILOVA et al., 2016; PAULINO et al., 2006).

O Zn é um oligoelemento essencial para muitos processos bioquímicos em plantas e animais, e auxilia em funções fisiológicas do tecido vivo. No entanto, se consumido em excesso, causa cólicas estomacais, irritações na pele, vômitos, anemia e danos nos sistemas gastrointestinal, respiratório e hematológico (FU; WANG, 2011; MUSILOVA et al., 2016).

Alguns usos industriais e os efeitos toxicológicos causados por alguns metais selecionados podem ser encontrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Usos industriais e efeitos toxicológicos de alguns metais

Metal	Uso industrial	Principal efeito toxicológico
Cádmio	Baterias, plástico, chapeamento	Danos nos rins, câncer de pulmão, distúrbios ósseos
Cobre	Fiação elétrica, encanamento, ligas	Relativamente não tóxico
Zinco	Baterias, ligas, galvanização, corantes, produtos farmacêuticos	Efeitos gastrointestinais, anemia

Fonte: Phillip et al., 2000, p. 326.

O CONAMA 357/2005 traz as concentrações máximas permitidas de espécies inorgânicas em diferentes classes de água. A Tabela 2 apresenta os limites de concentração permitidos dos metais selecionados para água de classe 1.

Tabela 2 – Limite máximo de concentração de metal em águas de classe 1

Metal	Valor Máximo (mg L⁻¹)
Cádmio total	0,001
Cobre dissolvido	0,009
Zinco total	0,18

Fonte: CONAMA 357/2005.

Apesar desta norma apresentar valores para frações totais e dissolvidas, muitas normas de programas de monitoramento ambiental utilizam apenas a fração total dos metais (TONELLO, 2009). Essa informação não é suficiente para tomada de decisões já que o potencial de toxicidade se dá pela biodisponibilidade do metal, ou seja, pela forma como a espécie química está presente na natureza (M. BERNHARD, F. E. BRINCKMAN, 1986). Podem ser elas: livre, sais inorgânicos, óxidos, hidróxidos, entidades organometálicas carregadas ou neutras e também podem ser encontrados integrados em estruturas moleculares maiores, como aminoácidos e proteínas (DONARD; CARUSO, 1998).

Considerando a demanda por água, a contaminação aquática e a manutenção da qualidade da água que não acompanha o crescimento populacional, é esperado que até 2025 cerca de 2 bilhões de pessoas enfrentem problemas com a escassez de água e até 2030, 40% da população mundial enfrentará esse problema (ALMUKTAR; ABED; SCHOLZ, 2018). Dessa forma, para garantir melhor proteção do meio ambiente e da saúde da população, os corpos d'água deve ser monitorados, no caso, dos metais, através de métodos analíticos que apresentem informações sobre a concentração das espécies metálicas que possam causar efeitos toxicológicos (SIMUL BHUYAN et al., 2019). O monitoramento constante de corpos d'água para fins de avaliação e quantificação dos níveis de poluição é vital para análise de qualidade de água e determinação de seus usos (KHAN et al., 2021).

No Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras (CETESB, 2011) tem-se os procedimentos necessários para a realização correta e a devida preservação das amostras para análise da água, seja ela *on site* ou *in situ*, qualquer erro pode acarretar em alterações das condições originais de equilíbrio e com isso a obtenção de resultados analíticos errados. O guia também aponta que independente da natureza da amostra, a estabilidade completa para cada constituinte nunca pode ser obtida. As técnicas de preservação apenas retardam a alteração dos compostos químicos, que podem ocorrer, principalmente, decorrente das condições físico-químicas da amostra. Os metais, por exemplo, podem precipitar-se como hidróxido, formar complexos com outros constituintes, ou serem adsorvidos pelo frasco, dependendo do material.

A amostragem passiva vem se tornando mais usada como um método de monitorar compostos ambientais no ar, sedimentos e água visto que novas abordagens e amostradores vêm oferecendo soluções para diferentes problemas técnicos relacionados à amostragem *in situ*. Por assim, ser, a técnica de difusão em filmes finos por gradiente de concentração tem se mostrado como uma alternativa, pois por se tratar de um amostrador passivo, a técnica *in situ* é possível, e com isso, erros de amostragem são minimizados.

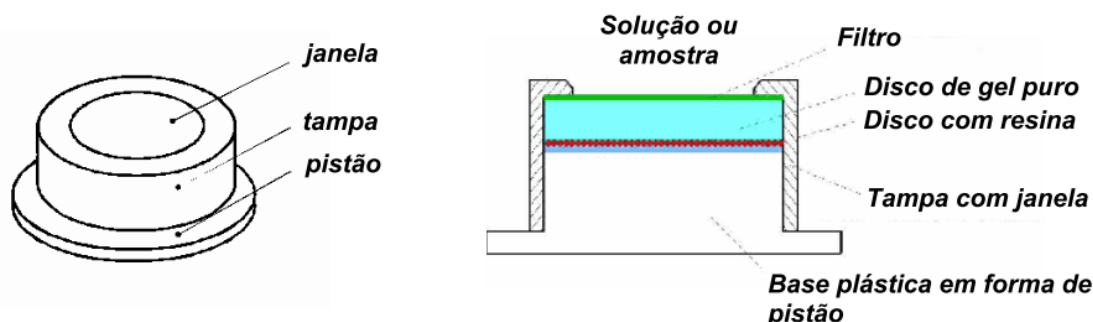
2.2. Diffusive gradients in thin films

A técnica DGT (do inglês *diffusive gradients in thin films*) surgiu para melhorar a sensibilidade da técnica DET (do inglês *diffusive equilibrium in thin films*), que mede os solutos que passam através de um gel difusivo e se equilibram com a solução (PRADIT et al., 2013).

Dessa forma, a técnica apresenta uma forma para se medir, quantitativamente, metais livres e lábeis em ambientes aquáticos, baseada na 1ª Lei de Fick da difusão. Nessa técnica, as espécies metálicas sofrem difusão através de um hidrogel formando um gradiente de concentração no interior deste. Estes metais serão acumulados em um segundo hidrogel formado por um agente ligante (ZHANG et al., 1995).

Apresentada por Davison e Zhang (1995), a técnica DGT acrescenta uma camada de gel ligante para capacitar a pré concentração dos analitos, permitindo assim a quantificação principalmente de íons metálicos livres e lábeis encontrados em pequenas concentrações em ambientes aquáticos. Seu amostrador é formado por um pistão de polipropileno, sobre o qual é colocado um disco de gel ligante, seguido de um disco de gel difusivo e uma membrana filtrante (0,45 µm). O sistema é então fixado com uma luva de polipropileno que possui uma janela de 20 mm de diâmetro, a qual permite a difusão das espécies metálicas para dentro do dispositivo (Figura 1).

Figura 1 – Esquema do dispositivo DGT



Fonte: Tonello, 2009.

Quando imerso o dispositivo DGT, os íons metálicos presentes no ambiente aquático se difundem pela camada de gel difusiva em direção a camada de gel ligante, em seu interior é estabelecido um gradiente de concentração. Após o tempo de imersão, é feita a quantificação dos metais acumulados na camada ligante por técnica analítica apropriada.

A concentração de analitos quantificada pela técnica é baseada na Lei de Difusão de Fick (1ª Lei de Fick) descrita em (1):

$$F = D(C_b - C')/\Delta g \quad (1)$$

Na expressão D é o coeficiente de difusão do analito no meio (hidrogel), C_b é a concentração do analito lábil + livre no meio, C' é a concentração do analito retido no gel ligante, Δg é a medida da espessura da camada de gel difusivo mais a membrana filtrante.

Quando em condições de equilíbrio, $C' = 0$, portanto:

$$F = \frac{DC_b}{\Delta g} \quad (2)$$

De acordo com a definição de fluxo:

$$F = \frac{M}{At} \quad (3)$$

M é a massa do analito retido no interior do dispositivo, no gel ligante, A é a área da janela do dispositivo, t é o tempo de imersão do dispositivo no meio a ser monitorado. Assim, a concentração do analito no meio pode ser calculada pela expressão (3):

$$C_b = \frac{M\Delta g}{DtA} \quad (4)$$

O design do dispositivo possibilita que sua aplicabilidade seja no local, ou seja, é uma técnica *in situ* que pode ser utilizada em águas naturais (PRICE; TEASDALE; JOLLEY, 2013; DOS ANJOS; ABATE; GRASSI, 2017; ABDULBUR-ALFAKHOURY; VAN ZUTPHEN; LEERMAKERS, 2019) sedimentos (ZHANG et al., 1995; SUN et al., 2019) e solos (ZHANG et al., 1998; CIFFROY et al., 2021). Essas características permitem que a técnica seja usada em

programas de monitoramentos (WARNKEN; DUNN; TEASDALE, 2004; WARNKEN et al., 2009).

2.3. Coeficiente de difusão

Uma característica importante da DGT, é que os solutos passam por uma camada difusiva antes de chegar na camada ligante. Essa camada difusiva é formada por um hidrogel estável em uma faixa determinada de força iônica, temperatura e pH. Comumente são utilizados três tipos de gel na DGT, agarose, policrilamida reticulada com bis-acrilamida e o mais utilizado, conhecido como APA, policrilamida reticulada com um derivado de agarose (DAVISON, 2016).

Trabalhos foram publicados com diferentes usos de materiais para o gel difusivo, como por exemplo policrilamida (DAVISON; ZHANG, 1994; TONELLO et al., 2007; ZHANG; DAVISON, 1995), policrilamida reticulada com agarose (GARMO et al., 2003; ODZAK et al., 2002; U; SHERWOOD; LEYDEN, 1999; WILLIAMS et al., 2012; ZHANG; DAVISON, 1995, 1999), papel cromatográfico (MENEGÁRIO; TONELLO; DURRANT, 2010).

O coeficiente de difusão varia com o material utilizado na confecção do hidrogel e com o analito que irá atravessar esta camada. Também depende da temperatura e da força iônica do meio (COLAÇO et al., 2012).

No site da DGT Research encontra-se uma relação com os coeficientes de difusão encontrados para o hidrogel APA padrão vendido pela empresa com variação de temperatura de 1 a 35 °C para determinados analitos.

Para a determinação do D, pode ser utilizada a técnica da câmara de difusão. Formada por dois compartimentos de igual volume (A e B), a câmara possui uma parede fixa que contém um orifício que permite a ligação dos dois compartimentos, onde é fixado o gel difusivo.

Na realização do experimento, no compartimento A é colocada a solução fonte, ou seja, que contém o analito. E no compartimento B é colocado o mesmo volume de uma solução com a mesma composição da solução fonte, sem o analito, chamada de receptora. Com as soluções dos dois compartimentos mantidas sob agitação constante, em intervalos de tempo

pré-estabelecidos, devem ser retiradas alíquotas de mesmo volume de cada lado, e a concentração de analito determinada.

Conhecendo as variáveis necessárias, temperatura das soluções, massa do analito que foi difundida, espessura do gel difusivo e concentração inicial de analito adicionada a solução do compartimento A, que se mantém praticamente inalterada, pode-se determinar o coeficiente de difusão segundo a expressão (ZHANG; DAVISON, 1999):

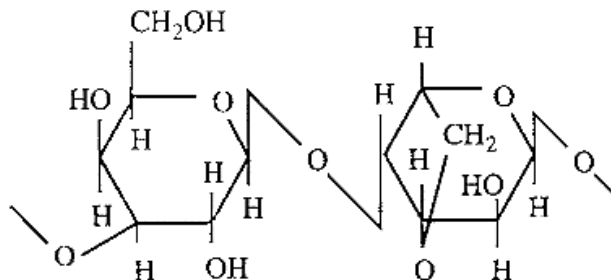
$$D = \frac{a\Delta g}{C_A A} \quad (5)$$

Sendo: “a” o coeficiente angular da relação entre a massa do analito determinada para o compartimento B e o intervalo de tempo da amostragem; “ Δg ” é a espessura do gel difusivo; “ C_A ” é a concentração do analito no compartimento A; e “A” é a área exposta do gel ou a área do orifício na parede entre os compartimentos.

Uma outra forma para calcular-se o coeficiente de difusão é pelo uso de diferentes dispositivos DGT. Esta técnica consiste em colocar diferentes dispositivos montados com os géis de análise em uma solução contendo o analito em questão. Estes dispositivos são retirados um a um em diferentes tempos e desmontados. Então é realizada a quantificação do analito retido no gel ligante plota-se um gráfico de massa x tempo. Se a relação das duas variáveis for linear, quer dizer que obedece a Lei de Fick e pode ser aplicada a equação da DGT diretamente.

2.4. Agarose

A agarose é um polissacarídeo obtido a partir de algas marinhas pertencentes aos gêneros *Gelidium* e *Gracilaria*, que são amplamente cultivadas em regiões costeiras praticamente no mundo todo. Estas algas são coletadas, desidratadas e purificadas para remover componentes como sais e proteínas, resultando na agarose pura, que é composta por unidades de agarobiose alternadas de β -D-galactose e 3,6-anidro-L-galactose (figura 2) e é considerada um polímero natural. Vendida como pó branco, a agarose é dissolvida em água quente para formar a matriz de gel utilizada na técnica de difusão em gel de agarose (DGT) (ROBERTS; MARTENS, 2016).

Figura 2 - Estrutura da Agarose

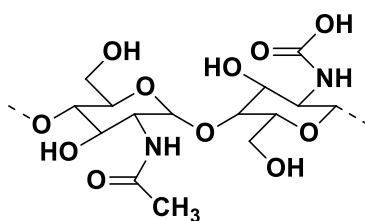
Fonte: Gustavsson, 2003.

O gel de agarose é ideal para uso na DGT devido à sua natureza inerte, que não interfere nas reações químicas da amostragem, e sua capacidade de manter uma concentração estável de elementos em uma região definida por um período prolongado de tempo. Além disso, o gel de agarose é permeável a íons e outras moléculas, permitindo que os elementos de interesse difundam e sejam concentrados para análise posterior (MENEGÁRIO et al., 2017).

Em suma, o uso de gel de agarose na DGT fornece uma ferramenta precisa e confiável para amostrar elementos tóxicos em corpos d'água, contribuindo para a monitorização ambiental e avaliação da qualidade da água.

2.5. Quitosana

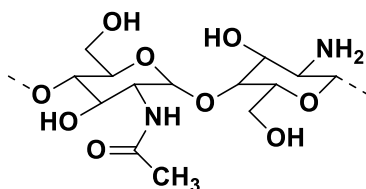
A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, perde apenas para a celulose. Encontrada em exoesqueletos de insetos, caranguejos, camarões, nas estruturas internas de alguns invertebrados e na parede celular da maioria dos fungos, o polímero β -(1-4)2-acetamido-2-deoxi-D-glicose (N-acetilglicosamina) (Figura 2) foi descoberto pelo professor francês Henri Braconnot, em 1811 (SANTOS; CIRILO; NUNES, 2011).

Figura 3 – Estrutura da quitina

Fonte: Autoria Própria.

Durante o processamento do camarão para consumo, grandes quantidades de resíduos são geradas. Este resíduo costuma ser clandestinamente enterrado ou jogado no mar e em rios, o que causa grandes problemas ambientais. O reaproveitamento destas partes para obtenção de quitina tem sido uma alternativa para minimizar os impactos ambientais causados em países produtores de camarão (VIEIRA CARVALHO, 2006).

A quitosana (CS) é um biopolímero de caráter catiônico e hidrofílico obtido por meio da desacetilação da quitina, onde ocorre a transformação parcial dos grupos acetamina ($R-NHCOCH_3$) da quitina em grupos amina ($R-NH_2$). Formada por unidades de β -[(1-4)-2-amino-2-desoxi-d-glicopirranose] (Figura 3), é um heteropolissacarídeo insolúvel em soluções aquosas de pH neutro e alcalino e em solventes orgânicos, e solúvel em ácidos fracos (FARIA, 2017). Os ácidos acético e fórmico são os mais comumente utilizados na sua solubilização. O seu caráter catiônico dá-se após a dissolução do biopolímero em meio ácido, onde os grupos amino livres tornam-se protonados. (GONSALVES, A. A. G; ARAÚJO, C. R. M; SOARESS, N. A. S; GOULART, M. O. F; ABREU, 2011).

Figura 4 – Estrutura molecular da quitosana

Fonte: Autoria Própria.

A formação da quitosana é considerada bem-sucedida quando o seu nível de desacetilação é maior de 50% (TSURKAN et al., 2021)

Graças às suas propriedades de coagulação e floculação, a quitosana tem sido muito utilizada para a remoção de sólidos suspensos e para a separação seletiva de proteínas. E por ser abundante, destaca-se entre outros absorventes como o carvão ativo, para remover compostos orgânicos e corantes. Possui também características que a torna apta para adsorver metais potencialmente tóxicos. A interação da quitosana com os íons metálicos está sujeita à alguns parâmetros, como a quantidade de grupos amino e hidroxilas disponíveis, o grau de desacetilação, a cristalinidade, a modificação química e a sua forma, que pode variar entre membranas, filmes, esferas, túbulos, scaffolds, etc. (VIEIRA CARVALHO, 2006).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral desenvolver um dispositivo DGT com materiais alternativos, sendo eles: gel de agarose como gel difusivo e filme de quitosana natural como agente ligante para a determinação de metais potencialmente tóxicos em ambientes aquáticos.

3.2. Objetivos específicos

- Confeccionar filme gel difusivo de agarose e determinar os coeficientes de difusão dos analitos no filme gel difusivo de agarose utilizando uma câmara de difusão projetada e construída no laboratório;
- Confeccionar filmes géis de quitosana natural e fazer suas caracterizações físico-químicas, sendo elas espectroscopia de infravermelho, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por Energia Dispersiva, difratometria de raios X, e determinação do pH de carga zero;
- Avaliar as capacidades de adsorção dos filmes géis produzidos de quitosana natural para os íons metálicos (Cd, Cu e Zn);
- Aplicar a técnica DGT com o novo ligante;
- Calcular o coeficiente de difusão real praticado pelos analitos na DGT montada;
- Comparar os resultados de coeficientes de difusão calculados;
- Desenvolver protocolo de laboratório.

4. Metodologia

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, a água ultrapura (18,18 MΩcm) e os materiais descontaminados em solução ácida de HCl 20% enxaguados com água ultrapura e secos em câmara de fluxo laminar com filtro HEPA. A agarose e a quitosana, de baixo peso molecular, foram adquiridas da Sigma-Aldrich. O filtro de nitrato de celulose (0,45 µm) foi adquirido da Sartorius Biolab Products.

4.1. Filme gel difusivo de agarose

4.1.1. Confeção do filme gel difusivo de agarose

Para a confecção da camada difusiva de agarose, foi utilizada como referência a metodologia apresentada por ZHANG; DAVISON (1999). O gel de agarose (1,5 % m/v) foi preparado dissolvendo-se 0,75 g de agarose em 50 mL de água ultrapura. A solução foi aquecida a aproximadamente 80 °C e mantida em agitação até que toda a agarose fosse dissolvida e a solução tornou-se transparente. Verteu-se a solução quente entre duas placas de vidro que são pré-aquecidas à 60 °C para que não forme bolhas nas membranas, descontaminadas com ácido, com espaçamento de 1 mm para delimitar a espessura do gel, e ficou em repouso até a temperatura ambiente. Após o resfriamento, o gel foi cortado em discos de 2,5 cm de diâmetro, utilizando-se um cortador próprio feito de plástico, e hidratado em água ultrapura com várias lavagens para remoção do excesso de agarose e então foram armazenados imersos em solução de NaNO₃ (0,01 mol L⁻¹) a 4 °C para que não houvesse deterioração do material.

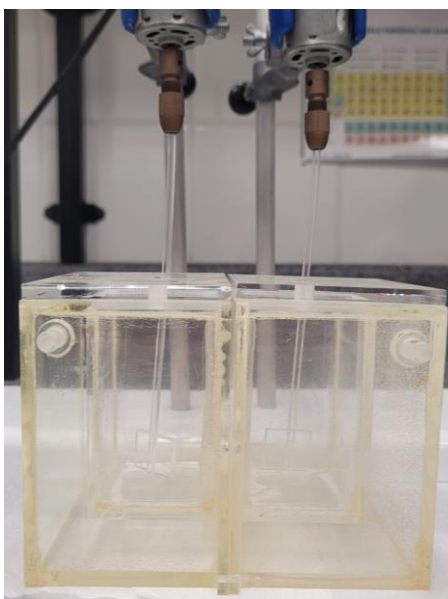
4.1.2. Determinação do coeficiente de difusão pela câmara de difusão

Para o cálculo das concentrações dos analitos nas soluções utilizando-se a técnica DGT, é necessário o conhecimento dos coeficientes de difusão dos metais através da membrana de agarose (ZHANG; DAVISON, 1999). Para isso foi utilizada uma câmara de difusão similar à descrita na literatura, formada por dois compartimentos idênticos (A e B), com capacidade de 130 mL cada, ligados por um orifício de 2,0 cm de diâmetro por onde os analitos podem se difundir (Figura 4). Colocou-se o gel de agarose neste orifício juntamente com um espaçador adequado (1 mm) de forma que uma área de 1,77 cm² do gel ficou exposta aos dois compartimentos.

No compartimento A colocou-se 120 mL de uma solução contendo um tampão de ácido acético e acetato de sódio de pH 5,0 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$), NaNO_3 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e padrão de cádmio (1 mg L^{-1} em HNO_3 2%). No compartimento B colocou-se o mesmo volume de tampão de ácido acético e acetato de sódio, e nitrato de sódio, mas no lugar do metal, colocou-se o mesmo volume de HNO_3 2% para que os dois compartimentos ficassem com o mesmo volume e mesmo pH. A solução foi mantida sob agitação constante e a temperatura foi mantida a 25°C .

Alíquotas das soluções dos dois compartimentos foram retiradas a cada 10 minutos, acidificadas e as respectivas concentrações de cádmio foram determinadas por espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). O valor do coeficiente de difusão foi determinado a partir da primeira lei de Fick descrito na equação 5. A mesma metodologia foi repetida para zinco e cobre.

Figura 5 – Câmara de difusão



Fonte: Autoria Própria.

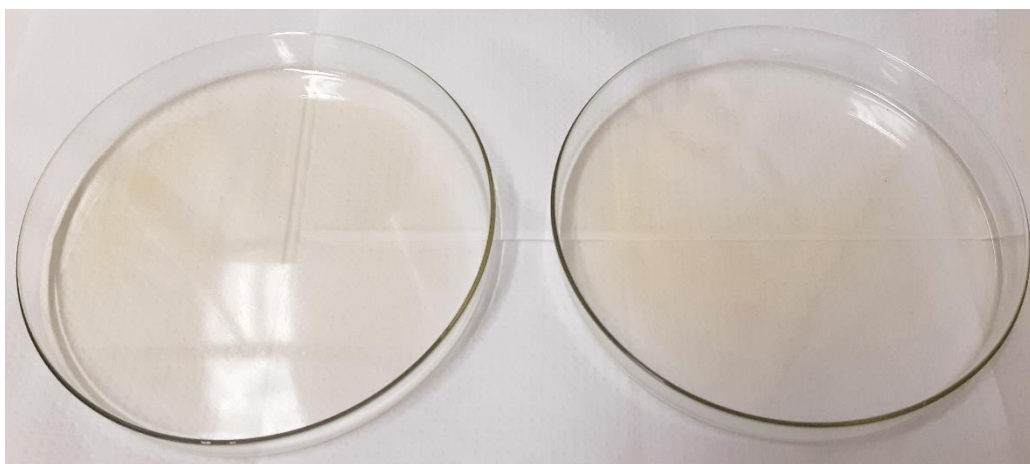
4.2. Filme gel ligante de quitosana

4.2.1. Confeção do filme gel ligante de quitosana natural

Para a confecção do filme gel de quitosana baseou-se na metodologia de Beppu (1999) e Vieira (2008). Preparou-se uma solução de quitosana pela dissolução de 5 g de quitosana em 800 mL de ácido acético 2% (v/v). Manteve-se a solução sob agitação magnética constante

por 24 horas, à temperatura ambiente para dissolução homogênea da quitosana. Posteriormente, o filme gel foi confeccionado, vertendo-se 150 mL da solução obtida sobre placa de Petri de 13,5 cm de diâmetro, a qual foi levada à estufa a 60 °C até peso constante (Figura 5). Após a secagem, hidratou-se o filme gel de quitosana com solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ por 24 horas para que as membranas soltem das placas de Petri. Após hidratação, o filme gel foi lavado com água ultrapura várias vezes para retirada do excesso de NaOH, cortado em discos de 2,5 cm de diâmetro e armazenado sob refrigeração a 4 °C em béquer contendo água ultrapura.

Figura 6 – Membranas de quitosana natural secas na placa de Petri



Fonte: Autoria Própria.

4.2.2. Caracterização dos discos de quitosana

4.2.2.1. Espectroscopia de infravermelho

Para a caracterização dos grupos ligantes da quitosana utilizou-se a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), técnica que compara os valores de energia de radiação infravermelha absorvida. Foi utilizado um espectrômetro modelo Jasco FTIR – 410, com transformador de Fourier, utilizando a técnica de KBr, na variação de número de onda de 4000 a 400 cm⁻¹. Tirou-se o excesso de água dos discos de quitosana antes de coloca-los no equipamento.

4.2.2.2. Microscopia eletrônica de varredura e Espectroscopia por Energia Dispersiva

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica importante normalmente empregada na análise microestrutural de sólidos. Através das imagens, foi possível verificar a morfologia dos filmes géis ligantes, tais como sua superfície e seus poros. As imagens foram obtidas a partir do microscópio eletrônico de varredura modelo JSM-6010 da JEOL com tensão de aceleração 2,5 kV. As membranas de quitosanas analisadas primeiramente passaram por uma metalização com paládio para facilitar a condutividade e melhorar a qualidade das imagens obtidas, sendo utilizada a magnificação de 250x (escala 100 μm) e de 450x (escala 100 μm).

A espectroscopia por energia dispersiva (EDS) é uma técnica analítica utilizada para caracterização química e análise elementar de materiais, é baseada na interação de um feixe de alta energia de partículas carregadas que gera uma fonte de Raio-X que excita a amostra. Como cada elemento possui uma estrutura atômica única, é possível identificar os picos em um espectro de emissão. Realizou-se o EDS para os discos de quitosana natural para identificar os elementos de sua estrutura.

4.2.2.3. Difratometria de raios X

Para a identificação das estruturas cristalinas presentes nos géis de quitosana natural, utilizou-se a difratometria de raios X (difratômetro Panalytical X'pert Pro), com tensão e corrente de operação 40 Kv e 30 mA, respectivamente. Um feixe de radiação Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) foi usado para escanear as amostras com ângulos de visão na faixa de 10° a 80° e tamanho do passo de 0,02°. Estes padrões foram selecionados após alguns testes durante a análise para uma melhor visualização da estrutura.

4.2.2.4. Determinação do pH de carga zero

Para identificação do valor do pH de carga zero (pH_{PZC}) da membrana de quitosana, ou seja, o pH onde a sua carga total é zero. Essa técnica mostra as cargas superficiais do composto de quitosana com diferentes pHs, podendo explicar o comportamento do material no processo de adsorção de metais. Para isso, preparou-se 11 erlenmeyers contendo solução de cloreto de sódio 0,01 mol L⁻¹. Acertou-se o pH de cada um em uma

faixa de 2 a 12 e em cada um adicionou-se 3 discos de quitosana. Manteve-se sobre temperatura ambiente e agitação mecânica constante durante 24 horas e então mediu-se o pH de cada um novamente. Plotou-se um gráfico de Δ_{pH} por $\text{pH}_{\text{inicial}}$, e pH_{PZC} foi identificado. A metodologia foi previamente descrita por CARVALHO (2021) e SANTOS (2021).

4.2.3. Montagem dos dispositivos DGT e curva de imersão

Os dispositivos alternativos de DGT (Figura 6) foram montados de acordo com os procedimentos descritos por ZHANG; DAVISON (1999), colocando-se as membranas confeccionadas de quitosana e agarose, respectivamente, no pistão de polipropileno, seguido da membrana filtrante de nitrato de celulose e tudo foi fixado com a luva de polipropileno que possui uma janela de 20 mm de diâmetro pela qual acontece a difusão dos analitos para o interior do dispositivo.

Foi feita uma solução contendo nitrato de sódio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e adicionado o volume de analito para uma concentração final de 1 mg L^{-1} , corrigiu-se o pH para 5,0 e adicionou-se os dispositivos DGT de modo que ficaram completamente imersos na solução. O sistema foi mantido sob agitação magnética durante todo o experimento (Figura 6). Os dispositivos foram retirados em tempos pré-estabelecidos, desmontados e a membrana de quitosana foi lavada com água ultrapura e adicionada a um tubo falcon contendo 5 mL de ácido nítrico 0,1 M e mantido em temperatura ambiente. Após total dissolução da membrana de quitosana no ácido, levou-se a amostra para quantificação da massa adsorvida em ICP-OES (DE FARIA et al., 2020).

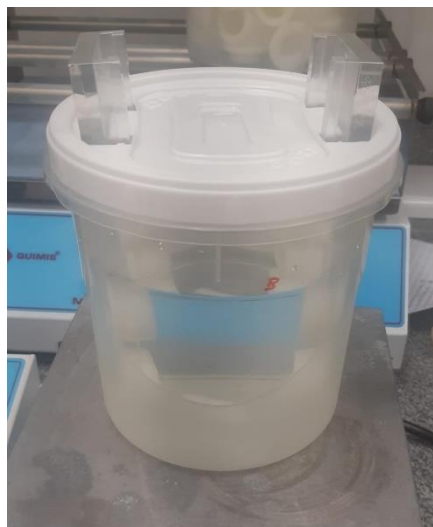
Os valores de coeficiente de difusão dos analitos foram calculados com base na equação 5 e comparados com os valores obtidos pela câmera de difusão.

Figura 7 – Ensaio de DGT (A) Dispositivo DGT (B) Equipamento para teste de difusão pelo método de adsorção de massa

a)



b)



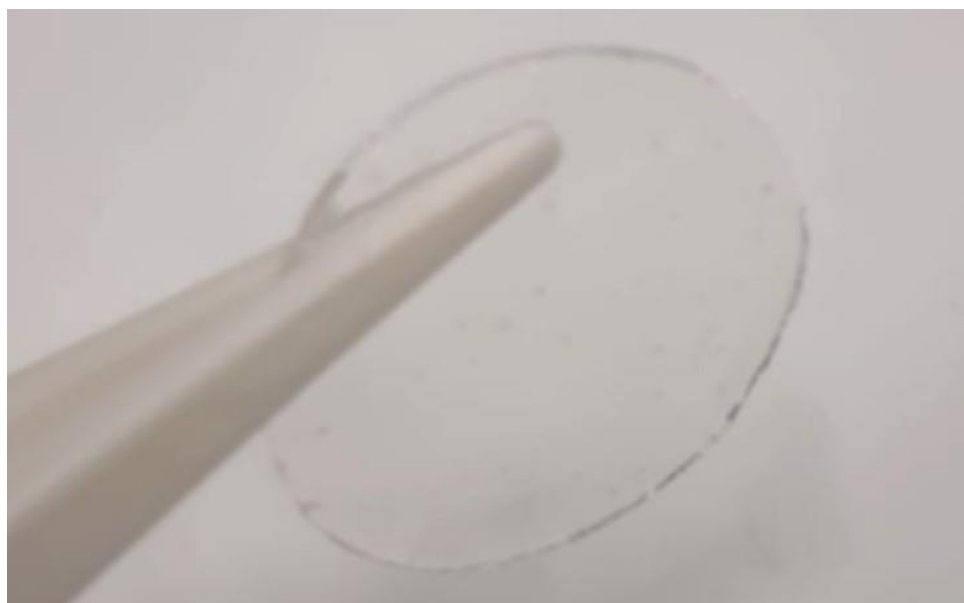
Fonte: Autoria Própria.

5. Resultados

5.1. Gel difusivo de agarose

O gel difusivo de agarose 15% (m/v) apresentou-se como um gel translúcido (Figura 7), homogêneo e de consistência satisfatória para ser manuseado nos dispositivos.

Figura 8 – Gel translúcido de agarose



Fonte: Autoria Própria.

5.2. Gel ligante de quitosana

O gel obtido de quitosana apresentou-se homogêneo e de consistência satisfatória para ser manuseado e cortado em discos para serem utilizados nos dispositivos DGT, como apresenta a Figura 8.

Figura 9 – Disco de quitosana natural

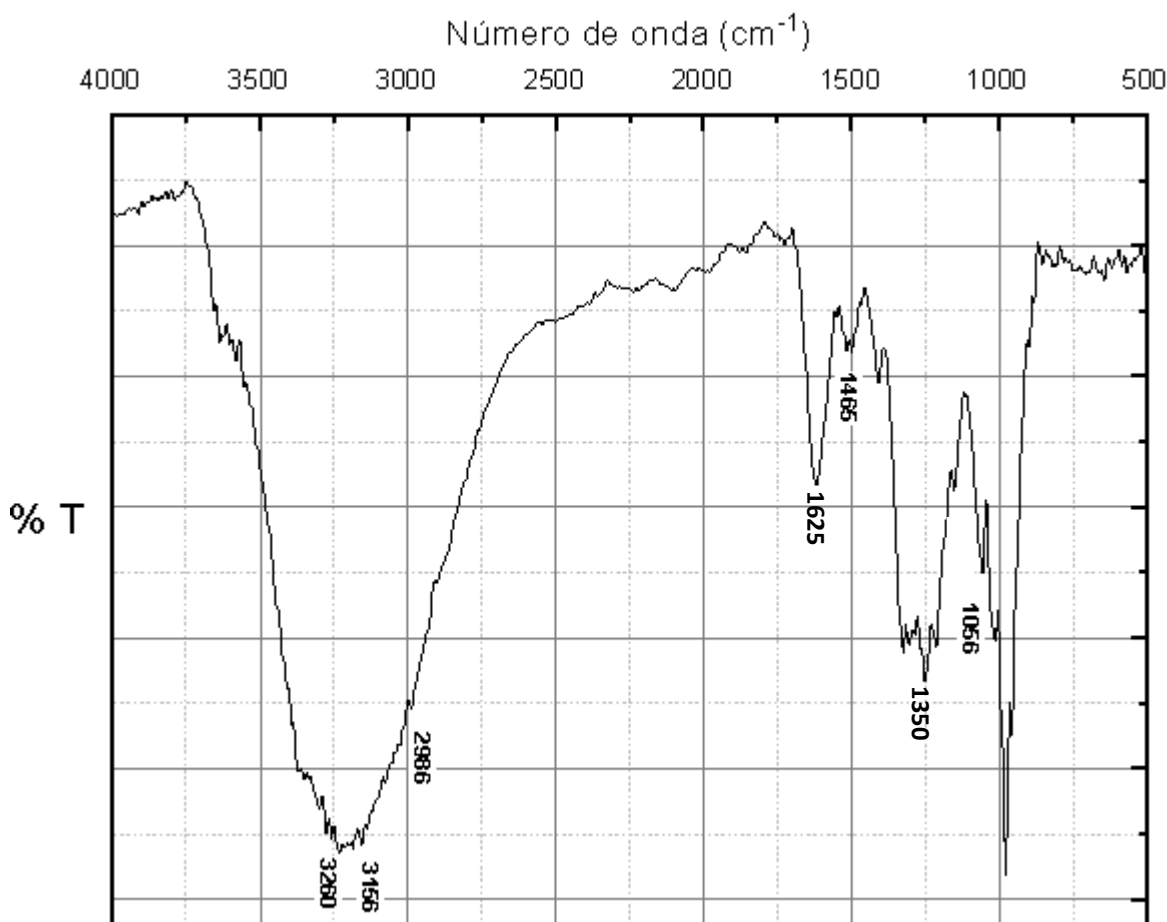


Fonte: Autoria Própria.

5.2.1. Caracterização das membranas de quitosana natural

5.2.1.1. Composição química da membrana de quitosana

Por meio da técnica FTIR foi realizada a identificação das bandas características e dos agrupamentos químicos das membranas de quitosana (Figura 9 e Tabela 3). Os estiramentos na região de 3000 cm^{-1} , estão associados a ligações hidrogênio, sendo elas N–H e O–H. As bandas de 2896 cm^{-1} , 1465 cm^{-1} , 1150 cm^{-1} e 1056 cm^{-1} , indicam estiramentos de ligações de C–H, CH_2 , C–N, C–O, respectivamente (GHAEE et al., 2012). Esses valores são semelhantes aos da quitosana pura para as mesmas bandas, conforme indicado na literatura (ASGARI; SHEIKHMOHAMMADI; YEGANEH, 2020; BABAZADEH et al., 2021; KYZAS; LAZARIDIS, 2009).

Figura 10 – Espectro de absorção no infravermelho de membranas de quitosana

Fonte: Autoria Própria.

Tabela 3 – Principais bandas de adsorção de das membranas de quitosana obtidas por absorção no infravermelho

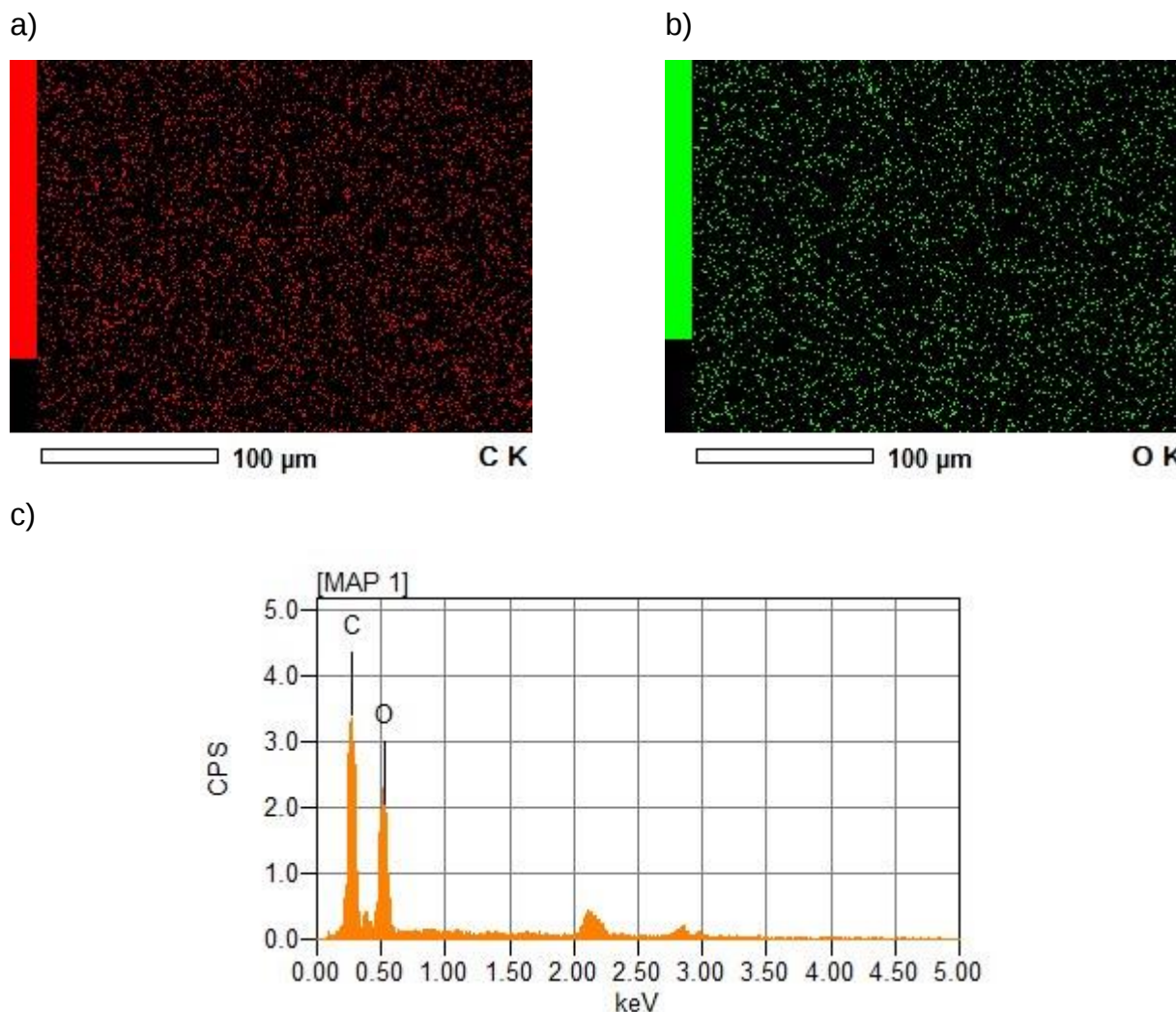
Número de Onda (cm ⁻¹)	Atribuição
1056	Estiramento de C–O de álcool primário
1350	Estiramento de alquil amina C–N
1465	Deformação Tesoura CH ₂
1625	Grupo Carbonila
2896	Estiramento de C–H
3156	Estiramento de O–H
3260	Estiramento de amina primária N–H

Fonte: Autoria Própria.

Além do FTIR, a análise de EDS foi realizada para analisar a composição química da membrana de quitosana, e as imagens e o perfil estão apresentados na Figura 10. O perfil de EDS (Figura 10 c) mostra um pico mais intenso de carbono e oxigênio. Entre

esses picos, há a presença de nitrogênio, atribuída aos grupos amina ($-\text{NH}_2$) da quitosana (AWODE et al., 2020). É esperado que a quitosana apresente esses elementos em sua estrutura, como já foi reportado previamente na literatura (BADR; ABDEL-SATTAR; KESHK, 2014; RAFIGH; HEYDARINASAB, 2017).

Figura 11 – Imagens da membrana de quitosana através da técnica de espectroscopia de raios X por energia dispersiva (A) Mapeamento EDS da membrana de quitosana em carbono (B) Mapeamento EDS da membrana de quitosana em oxigênio (C) Espectros de EDS



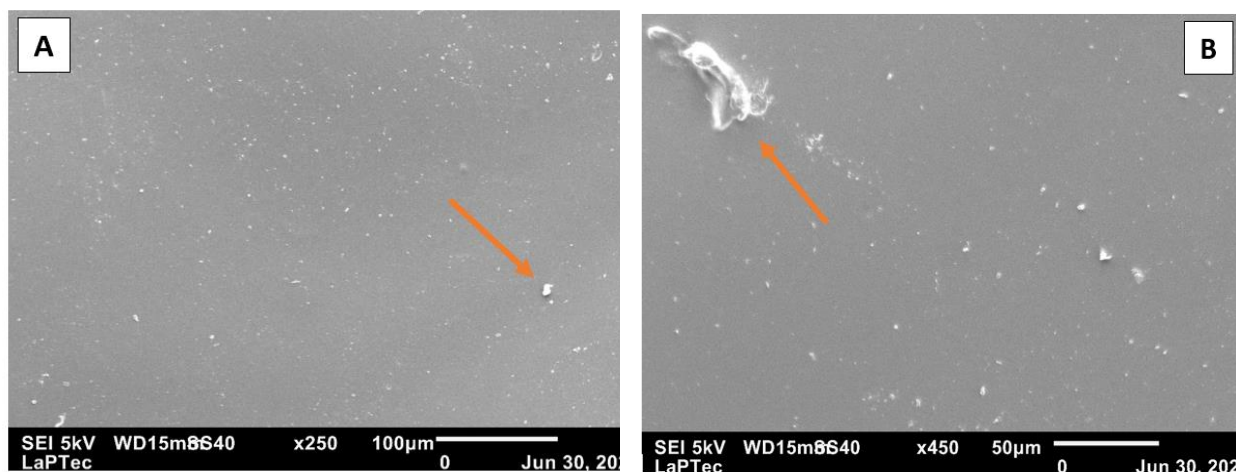
Fonte: Autoria Própria.

5.2.1.2. Análise da superfície das membranas de quitosana

Por meio das imagens de MEV foi possível analisar as imagens das superfícies das membranas de quitosana natural. A Figura 11 apresenta as imagens da superfície da membrana de quitosana natural, a qual apresentou uma superfície sem rugosidade, sem

poros aparentes e com alguns grânulos de quitosana não diluída, apontados pelas setas laranjas.

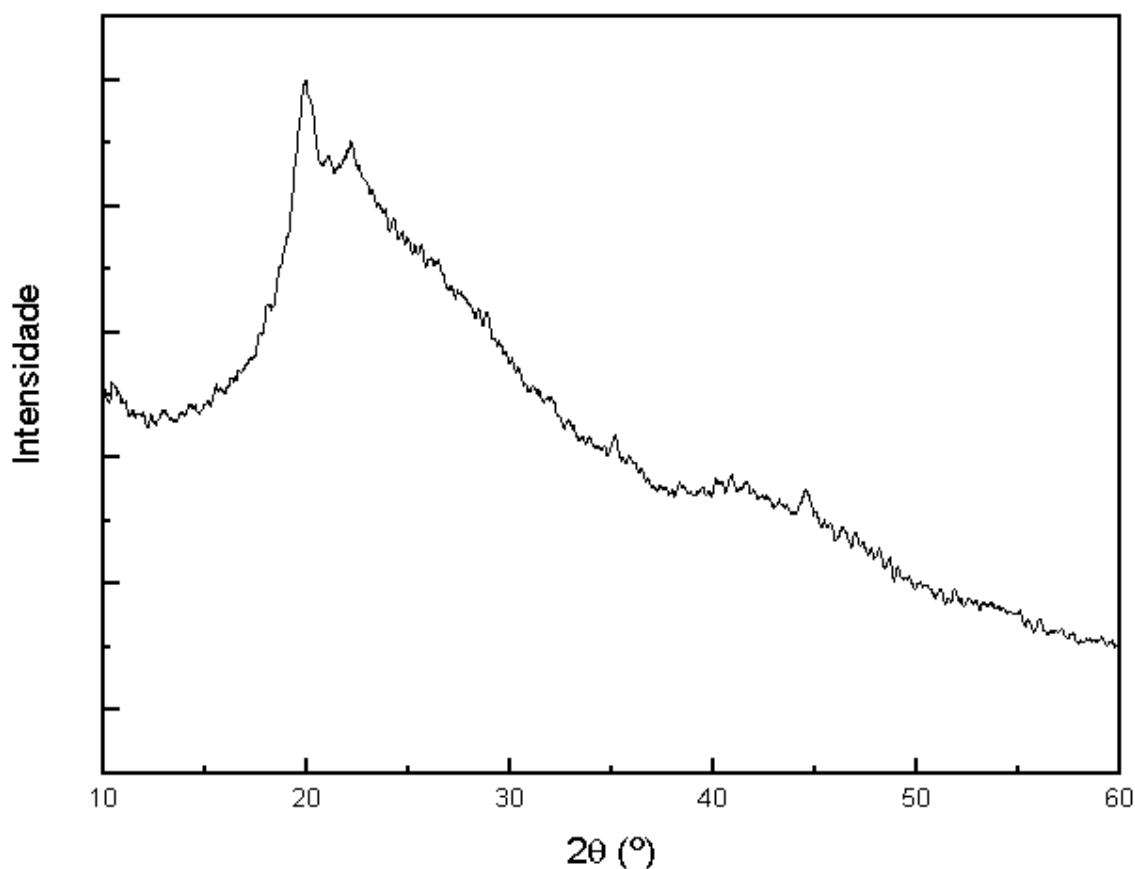
Figura 12 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura da membrana de quitosana natural (A) Magnificação 250x – escala 100 μm (B) Magnificação 450x – escala 100 μm



Fonte: Autoria Própria.

5.2.1.3. Cristalinidade das membranas de quitosana

A cristalinidade das membranas de quitosana foi estudada pela técnica de DRX, e os resultados de difratômetros de raios x estão apresentados na Figura 12. O difratômetro da quitosana natural apresenta dois picos intenso característicos desses materiais, confirmando sua característica semicristalina (Walke et al., 2015). O primeiro em $2\theta = 10^\circ$, refere-se ao plano cristalográfico (020), atribuído ao plano de reflexão da molécula, enquanto o segundo pico, em $2\theta = 20^\circ$, referentes ao plano cristalográfico (200), que pode ser atribuído a região amorfa da quitosana (Becerra et al., 2022).

Figura 13 – Difratorômetro de raios X das membranas de quitosana

Fonte: Autoria Própria.

5.2.1.4. Ponto de carga zero

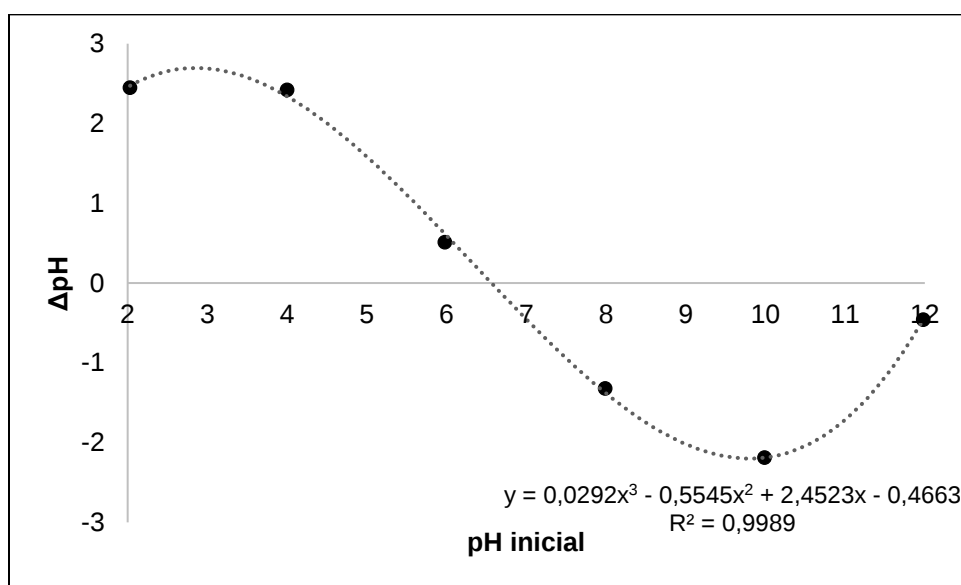
O ponto de carga zero (pH_{PZC}), ou seja, o pH onde a carga do material é zero é uma análise importante para entender o comportamento do material. O pH da solução afeta os sítios ligantes da superfície do material, podendo afetar o processo de adsorção de metais, neste caso, Cd, Cu e Zn, através dos materiais adsorventes, neste caso, membrana ligante de quitosana (SHAZWANI et al, 2021).

Neste trabalho, foi determinada o pH_{PZC} através da curva apresentada na Figura 13. Pode-se observar que, neste estudo, o pH_{PZC} foi de 6,56, sendo que abaixo deste valor a superfície da membrana de quitosana estava positivamente carregada, no pH_{PZC} as cargas positivas e negativas são iguais e acima de pH_{PZC} , a membrana encontrou-se

negativamente carregada. No caso da quitosana isso ocorre pois em pH ácido as aminas encontram-se protonadas ($-\text{NH}_3^+$) (KAUSAR et al., 2019).

Assim, estas características são comuns para materiais baseados em quitosana. SHAZWANI et al. (2021) produziram esferas de quitosana e montmorilonita sulfonada com pH_{PZC} de 7,2, KAUSAR et al. (2019) produziram um compósito baseado em quitosana e argila, cujo pH_{PZC} foi de 7, e ESSAWY; SAYYAH; EL-NGGAR (2016) produziram nanopartículas de polimetilanilina/quitosana/ TiO_2 , cujo pH_{PZC} foi de $\sim 4,3$.

Figura 14 – Ponto de carga zero das membranas de quitosana



Fonte: Autoria Própria.

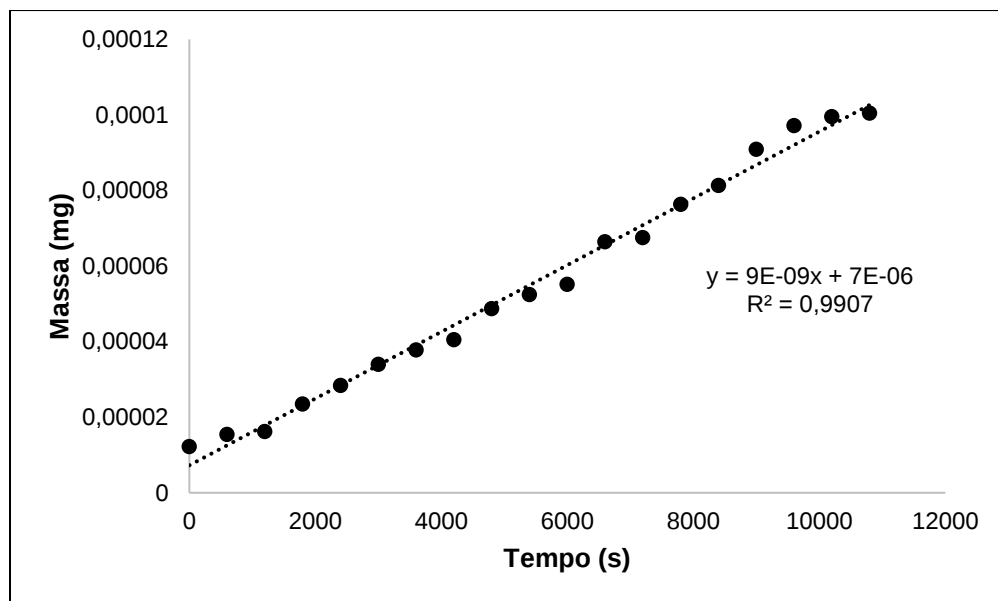
5.3. Cálculo do coeficiente de difusão

5.3.1. Método da câmara de difusão com gel de agarose

As curvas de massa x tempo geradas pelo método da câmara de difusão estão apresentadas nas Figuras 14, 15 e 16, para cádmio, cobre e zinco, respectivamente. A Tabela 4 apresenta as funções lineares das massas de Cd (II), Cu (II) e Zn (II) difundidas através do gel de agarose por unidade de tempo nas alíquotas retiradas dos testes realizados com a câmara de difusão e analisadas por ICP OES. As relações entre a massa difundida e o tempo de amostragem mostraram uma relação aceitável (R^2 entre

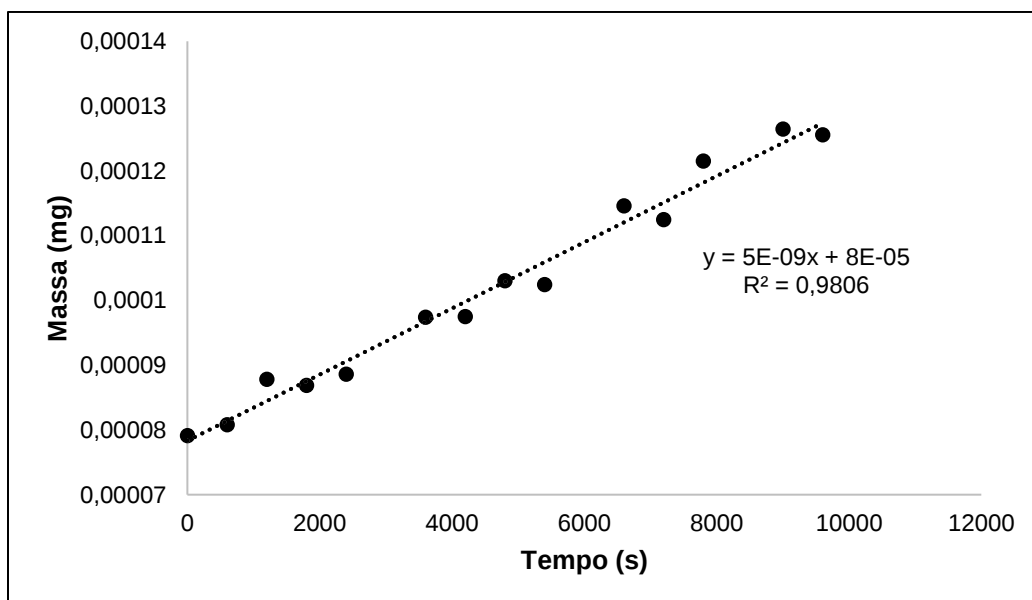
0,97-0,99), o que indica o cumprimento da Lei de Fick. Os coeficientes de difusão são apresentados na Tabela 5.

Figura 15 – Curva massa x tempo do cádmio

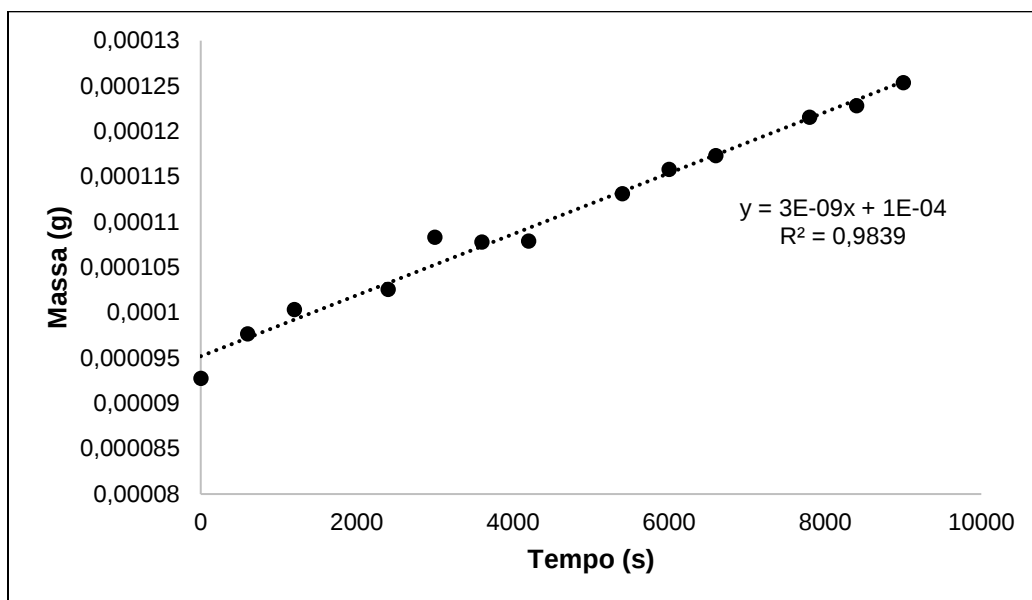


Fonte: Autoria Própria.

Figura 16 – Curva massa x tempo do cobre



Fonte: Autoria Própria.

Figura 17 – Curva massa x tempo do zinco

Fonte: Autoria Própria.

Tabela 4 – Funções lineares obtidas da relação massa por tempo de Cd (II), Cu (II) e Zn (II)

Analitos	Coeficientes		
	Angular	Linear	R ²
Cd (II)	$9,0 \times 10^{-9}$	$7,0 \times 10^{-6}$	0,9907
Cu (II)	$5,0 \times 10^{-9}$	$8,0 \times 10^{-5}$	0,9806
Zn (II)	$3,0 \times 10^{-9}$	$1,0 \times 10^{-4}$	0,9839

Fonte: Autoria Própria.

Tabela 5 – Coeficientes de difusão (D) para Cd (II), Cu (II) e Zn (II) medidos em câmara de difusão a 25 °C (0,01 mol L⁻¹ NaNO₃, pH 5,0). Unidade de valores encontrados (10⁻⁶ cm² s⁻¹)

Analito	Valores de coeficiente de difusão	Valores de Referência
Cd (II)	5,09	5,22 ^a
Cu (II)	2,83	4,82 ^a
Zn (II)	1,70	

^aDados para Cd (II) e Cu (II) em agarose 1,5% (m/v), pH = 5,1 e força iônica 0,05 mol L⁻¹ NaNO₃ a 25 °C (COLAÇO et al., 2012).

Fonte: Autoria Própria.

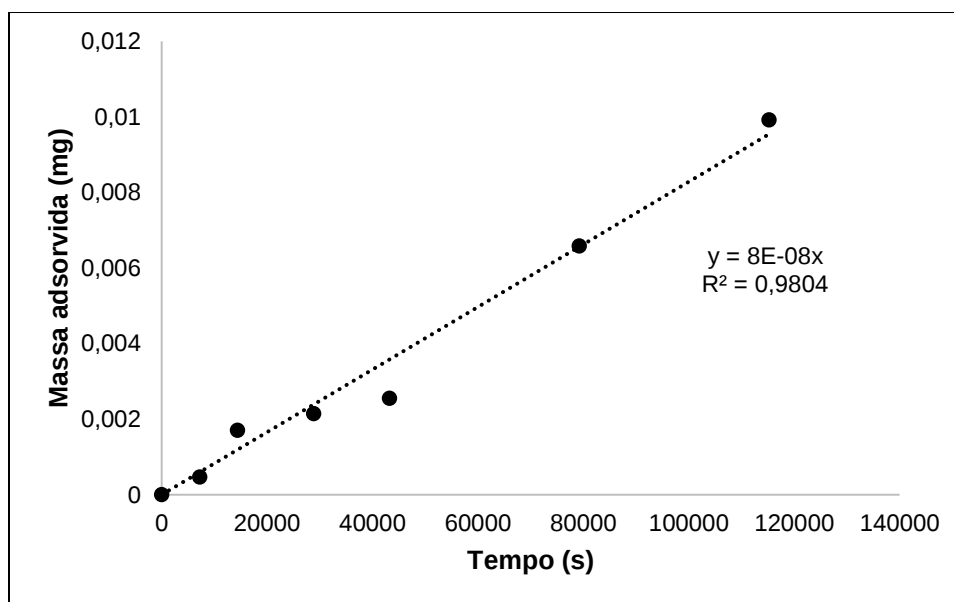
Comparando-se com os valores da literatura, os coeficientes de difusão encontrados para os analitos comprovam o funcionamento da câmara de difusão, portanto, o valor encontrado para Zn (II) pode-se considerar válido.

5.3.2. Método de adsorção de massa

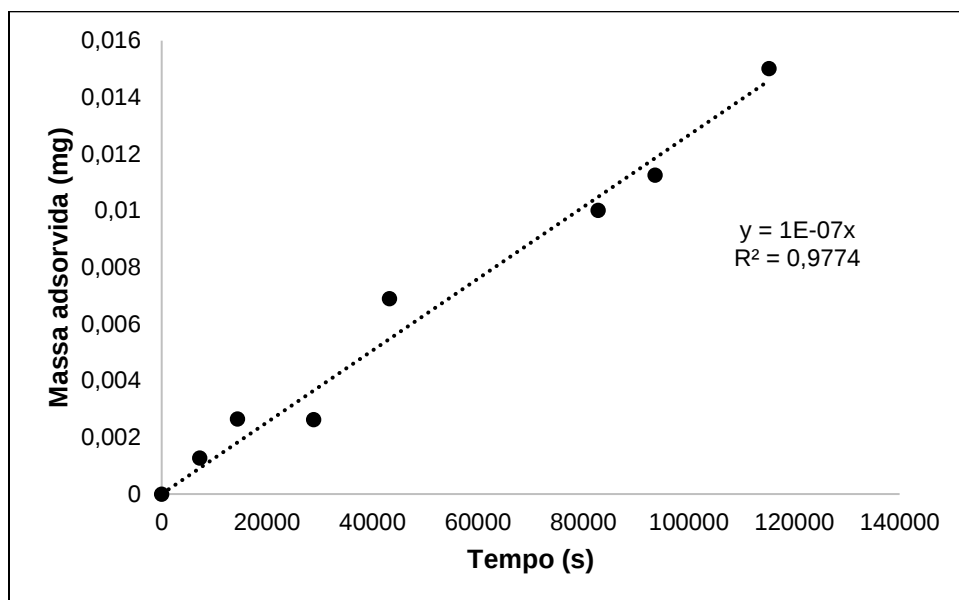
5.3.2.1. Curva padrão dos metais

Para o cádmio a concentração inicial e final foi de $1,03 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,00 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. A curva padrão (massa adsorvida x tempo) pode ser observada na Figura 17. Já para o cobre a concentração inicial e final foram ambas de $1,01 \text{ mg L}^{-1}$ e sua curva padrão (massa adsorvida x tempo) pode ser observada na Figura 18. Para o zinco a concentração inicial e final foi de $1,13 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,09 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. A curva padrão (massa adsorvida x tempo) pode ser observada na Figura 19. Os limites de detecção e quantificação para os três metais estão apresentados na Tabela 6.

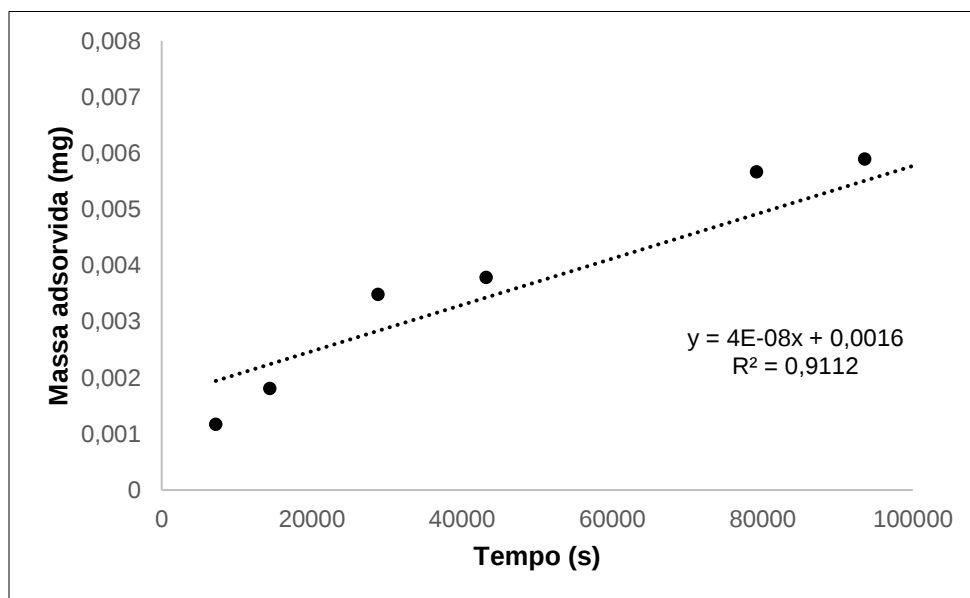
Figura 18 – Curva padrão do cádmio



Fonte: Autoria Própria.

Figura 19 – Curva padrão do cobre

Fonte: Autoria Própria.

Figura 20 – Curva padrão do zinco

Fonte: Autoria Própria.

Tabela 6 – Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ)

	Cd (mg L⁻¹)	Cu (mg L⁻¹)	Zn (mg L⁻¹)
LD	0,000924	0,001469	0,002243
LQ	0,00308	0,004896	0,007476

Fonte: Autoria Própria.

As retas apresentadas acima, de massa adsorvida por tempo, obtidas a partir do experimento, comprovam que os dispositivos montados obedecem a Lei de Fick, e com isso podem ser aplicados na técnica DGT para a análise de analitos em ambientes aquáticos (DOCEKALOVA; DIVIS, 2004). Em experimentos semelhantes, como em PESCIM (2011), a Lei de Fick também foi validada, nesse caso, foram obtidas curvas de imersão para Cd, Cu e Zn, utilizando dispositivos montados com gel ligante Chelex-100 e gel difusivo de poliacrilamida. Em FARIA et al. (2020), realizou-se a curva de imersão de Cd²⁺ e Cu²⁺ utilizando quitosana natural como gel ligante e acrilamida-agarose como gel difusivo, obtendo uma relação linear entre a massa adsorvida dos analitos e o tempo.

5.3.2.2. Coeficiente de difusão pelo teste de adsorção de massa

A Tabela 7 apresenta os coeficientes de difusão obtidos pelo método de adsorção de massa, e uma comparação com os valores obtidos pela câmara de difusão. Para estes cálculos foi utilizada a Equação 5 do coeficiente de difusão (D). O coeficiente angular foi obtido a partir das curvas padrão dos metais (Figura 17-19), sendo 8×10^{-8} mg/s, 1×10^{-7} mg/s e 7×10^{-8} mg/s, para cádmio, cobre e zinco, respectivamente. Δg é a espessura do gel de agarose (0,113 cm). C_A é a concentração inicial do analito (mg/cm³), que foi de $1,03 \times 10^{-3}$ mg/cm³, $1,13 \times 10^{-3}$ mg/cm³ e $1,01 \times 10^{-3}$ mg/cm³, para cádmio, cobre e zinco, respectivamente. A é a área (3,14 cm²), sendo que para esse cálculo o diâmetro considerado foi de 2 cm.

Tabela 7 – Coeficientes de difusão (D) para Cd (II), Cu (II) e Zn (II) medidos pelo teste de adsorção de massa e câmara de difusão a 25 °C (0,01 mol L⁻¹ NaNO₃, pH 5,0). Unidade de valores encontrados (10⁻⁶ cm² s⁻¹). Diferença entre os valores obtidos na adsorção de massa e na câmara de difusão (%)

Analito	Valores de coeficiente de difusão (DGT)	Valores coeficiente de difusão (Câmara de difusão)	Diferença (%)
Cd (II)	2,79	5,09	-82,44
Cu (II)	3,56	2,83	20,50
Zn (II)	1,27	1,70	-33,86

Fonte: Autoria Própria.

Assim, pode-se notar que os valores de coeficiente de difusão pelo método da câmara de difusão e pela adsorção de massa usando membrana ligante de quitosana para os três metais foram mais semelhantes para o zinco e cobre. Para Cd (II) os coeficientes de difusão foram de $5,09 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $2,79 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ pelo método da câmara de difusão e adsorção de massa, respetivamente. Já para Cu (II) os coeficientes de difusão foram de $2,83 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $3,56 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ pelo método da câmara de difusão e adsorção de massa, respetivamente. E, para o Zn (II) os coeficientes de difusão foram de $1,70 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $1,27 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ pelo método da câmara de difusão e adsorção de massa, respetivamente.

O gel de agarose puro havia sido utilizado como gel difuso em COLAÇO et al, (2012), onde obteve-se um resultado semelhante para cádmio e cobre, mas o zinco não foi um analito de estudo. Dessa forma, outros géis baseados em agarose também foram utilizados como comparativos aos resultados aqui obtidos. De acordo com os dados do site DGT Research (<https://www.dgtresearch.com/diffusion-coefficients/>) é recomendado que os valores de coeficiente de difusão para Cd (II), Cu (II) e Zn (II) a 25 °C sejam de $6,09 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $6,23 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $6,08 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, considerando o gel de poliacrilamida reticulado com agarose.

Outros trabalhos na literatura utilizaram a técnica de DGT para cálculo *in situ* do coeficiente de difusão de metais. REICHSTÄDTER et al. (2021) desenvolveram uma resina de sílica e cisteína como amostradores de DGT para metais traço. Os valores de

coeficiente de difusão para cisteína/sílica funcionalizada com amina e cisteína/sílica funcionalizada com 3-aminopropil, respectivamente foram de $4,24 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $4,78 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, respectivamente, para o Cd (II) e $4,23 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $5,51 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, respectivamente, para o Cu (II). DING; YANG; CAI (2018) desenvolveram membranas ligantes de carboximetilquitosana guanidinilada para técnica de DGT para metais. Para o Cu (II) os valores de coeficiente de difusão variaram de $4,8 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a $1,61 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, para o Cd (II) esses valores variaram de $5,6 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a $1,7 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, conforme variação da concentração do íon metálico. CINDRIĆ et al. (2020) utilizaram suportes DGT a partir de polietileno de alta densidade e obtiveram coeficientes de difusão de $6,18 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $6,23 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $6,08 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para Cd (II), Cu (II) e Zn (II), respectivamente.

Nota-se que para o cobre e o zinco, os coeficientes de difusão foram semelhantes para ambos os testes. No caso do cádmio, o valor do coeficiente de difusão no teste de adsorção de massa corresponde à metade do valor obtido do teste da câmara de difusão. Foi especulado que a membrana ligante de quitosana pode não ter adsorvido todo o metal que foi difundido no dispositivo DGT no teste de adsorção de massa, sendo necessário realizar um teste de otimização da adsorção dos metais ou gerar membranas ligantes funcionalizadas para aumentar a capacidade de adsorção do material pelo metal.

6. Conclusão

Este trabalho teve como objetivo geral desenvolver um dispositivo DGT com materiais alternativos, sendo eles: gel de agarose como membrana difusiva e filme de quitosana como membrana ligante para determinação de metais potencialmente tóxicos em ambientes aquáticos.

O gel de agarose foi desenvolvido e utilizado nos testes de difusão de metais. Para o teste de DGT, foram desenvolvidas membranas ligantes de quitosana, como membrana de adsorção de metais. As membranas de quitosana foram caracterizadas por FTIR, MEV, EDS, DRX e pH_{PZC} e os resultados obtidos foram comparados com a literatura para confirmar a presença de quitosana, sem impurezas. No FTIR foram identificadas bandas referentes a presença de grupos de álcool (C–O), amina (C–N, N–H) e hidroxila (O–H), conforme reportado para quitosana. Similarmente, o EDS mostrou picos mais intensos indicando a presença de carbono e oxigênio, e, em menor intensidade de nitrogênio (grupos amina da quitosana). O MEV mostrou uma membrana sem rugosidade ou poros. O DRX mostrou característica de um material amorfo e o pH_{PZC} mostrou que abaixo de 6,56 o material tem características catiônicas, devido a protonação dos grupos amina da quitosana, e abaixo de 6,56 o material encontra-se carregado negativamente.

O gel de agarose foi utilizado com sucesso pela câmara de difusão, cujos coeficientes de difusão calculados foram de $5,09 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $2,83 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $1,70$, para cádmio, cobre e zinco, respectivamente. O gel de agarose também foi utilizado como membrana de difusão nas curvas de imersão dos dispositivos DGT, em conjunto com a quitosana como membrana ligante para os metais. Neste teste foi comprovado o funcionamento dos dispositivos a partir da linearidade entre a adsorção de massa dos analitos e o tempo, mostrando que o dispositivo obedece a Lei de Fick e pode ser utilizado para técnica DGT.

Com as retas obtidas nas curvas de imersão, os coeficientes de difusão foram novamente calculados e os valores obtidos foram de $2,45 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, $3,56 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $1,27 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, para cádmio, cobre e zinco, respectivamente. Comparando-se os dois métodos obteve-se uma diferença de -82,44%, 20,5% e -33,86%,

respectivamente, para cádmio, cobre e zinco. Provavelmente, a quitosana não conseguiu adsorver todo o metal difundido, sendo indicado uma otimização do procedimento de adsorção sob variação de diferentes parâmetros, como pH e temperatura; ou a geração de um material funcionalizado capaz de adsorver maior massa de cádmio.

Referências bibliográficas

ABDULBUR-ALFAKHOURY, E.; VAN ZUTPHEN, S.; LEERMAKERS, M. Development of the diffusive gradients in thin films technique (DGT) for platinum (Pt), palladium (Pd), and rhodium (Rh) in natural waters. **Talanta**, v. 203, p. 34–48, 2019.

AHMAD, M. et al. Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review. **Chemosphere**, v. 99, p. 19–33, 2014.

ALI, H.; KHAN, E.; ILAHI, I. Environmental Chemistry and Ecotoxicology of Hazardous Heavy Metals: Environmental Persistence, Toxicity, and Bioaccumulation. **Journal of Chemistry**, p. 1–15, 2019.

ALMUKTAR, S. A. A. A. N.; ABED, S. N.; SCHOLZ, M. Wetlands for wastewater treatment and subsequent recycling of treated effluent : a review. **Environmental Science and Pollution Research**, n. 25, p. 23595–23623, 2018.

AMOUEI, A. et al. Comparison of heavy metals contamination and ecological risk between soils enriched with compost and chemical fertilizers in the North of Iran and ecological risk assessment. **Environmental Health Engineering and Management**, v. 7, n. 1, p. 7–14, 2020.

ASGARI, E.; SHEIKHMOHAMMADI, A.; YEGANEH, J. Application of the Fe₃O₄-chitosan nano-adsorbent for the adsorption of metronidazole from wastewater: Optimization, kinetic, thermodynamic and equilibrium studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 694–706, 2020.

AWODE, A. U. et al. Fabrication of trichlorovinylsilane-modified-chitosan film with enhanced solubility and antibacterial activity. **Polymer Bulletin**, v. 77, p. 5811–5824, 2020.

BABAZADEH, M. et al. Comprehensive batch and continuous methyl orange removal studies using surfactant modified chitosan-clinoptilolite composite. **Separation and Purification Technology**, v. 267, p. 118601, 2021.

BADR, I. H. A.; ABDEL-SATTAR, R.; KESHK, S. M. A. S. Enhancing biocompatibility of some cation selective electrodes using heparin modified bacterial cellulose.

Carbohydrate Polymers, v. 99, p. 783–790, 2014.

BECERRA, J. et al. Chitosan-collagen-hydroxyapatite membranes for tissue engineering. **Journal of Materials Science: Material in Medicine**, v. 33, n. 18, 2022.

BEPPU, M. M. **Estudo da Calcificação in vitro de quitosana**. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA, 1999.

BILAL, M. et al. Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation – A review. **Environment International**, v. 124, p. 336–353, 2019.

CANETTIERI, E. V. **Obtenção dos Parâmetros e Estudo Cinético da Hidrólise àcida dos resíduos Florestais de Eucalipto**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2004.

CARDOSO-SILVA, S. et al. Paleolimnological evidence of environmental changes in seven subtropical reservoirs based on metals, nutrients, and sedimentation rates. **Catena**, v. 206, p. 105432, 2021.

CARVALHO, J. T. T. et al. Nanommodified sugarcane bagasse biosorbent: synthesis, characterization, and application for Cu(II) removal from aqueous medium. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 24744–24755, 2021.

CHOSTAK, C. L. et al. Dispositivos DGT modificados com materiais alternativos para uso na especiação de elementos traço. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 356–363, 2015.

CIFFROY, P. et al. Evaluation of DGT and DGT-PROFS modeling approach to estimate desorption kinetics of Cs in soils. **Journal of Environmental Radioactivity**, p. 235–236, 2021.

CINDRIĆ, A. M. et al. Evaluation of diffusive gradients in thin films (DGT) technique for speciation of trace metals in estuarine waters - A multimethodological approach. **Science of the Total Environment**, v. 721, 2020.

COLAÇO, C. D. et al. Coeficientes de difusão de metais em materiais não convencionais (agarose e acetato de celulose) usados na técnica de difusão em filmes finos por gradientes de concentração. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1360–1364, 2012.

DAVISON, W. **Diffusive gradients in thin-films for environmental measurements**.

Cambridge: Cambridge University Press, 2016.

DAVISON, W.; ZHANG, H. In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. **Nature**, v. 367, p. 546–548, 1994.

DE FARIA, C. C. et al. Application of chitosan film as a binding phase in the diffusive gradients in thin films technique (DGT) for measurement of metal ions in aqueous solution. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, n. 3, p. 703–714, 2020.

DING, Y.; YANG, J.; CAI, J. Preparation of guanidinylated carboxymethylchitosan and its application in the diffusive gradients in thin films (DGT) technique for measuring labile trace metals in water. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 98, n. 14, p. 1275–1291, 2018.

DONARD, O. F. X.; CARUSO, J. A. Trace metal and metalloid species determination: Evolution and trends. **Spectrochimica acta, Part B: Atomic spectroscopy**, v. 53, n. 2, p. 157–163, 1998.

DOS ANJOS, V. E.; ABATE, G.; GRASSI, M. T. Determination of labile species of As(V), Ba, Cd, Co, Cr(III), Cu, Mn, Ni, Pb, Sr, V(V), and Zn in natural waters using diffusive gradients in thin-film (DGT) devices modified with montmorillonite. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, n. 7, p. 1963–1972, 2017.

ESSAWY, A. A.; SAYYAH, S. M.; EL-NGGAR, A. M. Ultrasonic-mediated synthesis and characterization of TiO₂-loaded chitosan-grafted-polymethylaniline nanoparticles of potent efficiency in dye uptake and sunlight driven self-cleaning applications. **RSC Advances**, v. 6, p. 2279–2294, 2016.

FALCÃO, D.; DIMENSTEIN, G. Água será estopim de guerras no século 21. **Folha de São Paulo**, 1996.

FARIA, C. C. DE. **Estudo comparativo de adsorção de íons metálicos em meio aquoso por membranas de quitosana reticuladas**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2017.

FU, F.; WANG, Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 3, p. 407–418, 2011.

GARMO, Ø. A. et al. Performance study of diffusive gradients in thin films for 55 elements. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 14, p. 3573–3580, 2003.

GHAEE, A. et al. Adsorption of copper and nickel ions on macroporous chitosan membrane: Equilibrium study. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 19, p. 7732–7743, 2012.

GONSALVES, A. A. G; ARAÚJO, C. R. M; SOARESS, N. A. S; GOULART, M. O. F; ABREU, F. C. Diferentes Estratégias para a Reticulação da Quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215–1223, 2011.

GURGEL, L. V. A. **Mercerização e modificação química de celulose e bagaço de cana-de-açúcar com anidrido succínico e trietilenotetramina: Preparação de novos materiais quelantes para a adsorção de Pb (II), Cd (II), Cr (VI) e Cu (II)**. [s.l.] Universidade Federal de Ouro Preto, 2007.

KAUSAR, A. et al. Preparation and characterization of chitosan/clay composite for direct Rose FRN dye removal from aqueous media: Comparison of linear and non-linear regression methods. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 8, n. 1, p. 1161–1174, 2019.

KHAN, R. et al. Environmental contamination by heavy metals and associated human health risk assessment: a case study of surface water in Gomti River Basin, India. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 56105–56116, 2021.

KYZAS, G. Z.; LAZARIDIS, N. K. Reactive and basic dyes removal by sorption onto chitosan derivatives. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 331, n. 1, p. 32–39, 2009.

LIU, L. et al. Mitigation of environmental pollution by genetically engineered bacteria — Current challenges and future perspectives. **Science of the Total Environment**, v. 667, p. 444–454, 2019.

M. BERNHARD, F. E. BRINCKMAN, P. J. S. **The Importance of Chemical “Speciation” in Environmental Processes**. 1. ed. Berlim: [s.n.]. v. 1

MA, Y. et al. Polyethylenimine modified biochar adsorbent for hexavalent chromium

removal from the aqueous solution. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 403–408, 2014.

MALDONADO, A. C. D.; WENDLING, B. Manejo de ecossistemas aquáticos contaminados por metais pesados. **Agropecuária Técnica**, v. 30, n. 1, p. 21–32, 2009.

MASINDI, V.; MUEDI, K. L. Environmental Contamination by Heavy Metals. In: **Heavy Metals**. IntechOpen ed. London: [s.n.]. p. 412.

MENEGÁRIO, A. A.; TONELLO, P. S.; DURRANT, S. F. Use of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in agarose gel as a binding agent for diffusive gradients in thin films. **Analytica Chimica Acta**, v. 683, n. 1, p. 107–112, 2010.

MENG, L. et al. Toxicity and bioaccumulation of copper in *Limnodrilus hoffmeisteri* under different pH values: Impacts of perfluorooctane sulfonate. **Journal of Hazardous Materials**, v. 305, p. 219–228, 2016.

MUSILOVA, J. et al. Environmental Contamination by Heavy Metals in Region with Previous Mining Activity. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 97, p. 569–575, 2016.

ODZAK, N. et al. In situ trace metal speciation in a eutrophic lake using the technique of diffusion gradients in thin films (DGT). **Aquatic Sciences**, v. 64, n. 3, p. 292–299, 2002.

PAULINO, A. T. et al. Novel adsorbent based on silkworm chrysalides for removal of heavy metals from wastewaters. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 301, n. 2, p. 479–487, 2006.

PEREIRA DOS SANTOS, M. T.; FERREIRA, E. J.; FREITAS FERREIRA, M. F. Estudo de caso da degradação ambiental do rio Gortuba no município de Francisco Sá. **Revista Cerrados**, v. 15, n. 1, p. 265–284, 2017.

PRADIT, S. et al. Application of DET (diffusive equilibrium in thin films) and DGT (diffusive gradients in thin films) techniques in the study of the mobility of sediment-bound metals in the outer section of Songkhla Lake, Southern Thailand. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 5, p. 4207–4220, 2013.

PRICE, H. L.; TEASDALE, P. R.; JOLLEY, D. F. An evaluation of ferrihydrite- and MetsorbTM-DGT techniques for measuring oxyanion species (As, Se, V, P): Effective capacity, competition and diffusion coefficients. **Analytica Chimica Acta**, v. 803, p. 56–65, 2013.

RAFIGH, S. M.; HEYDARINASAB, A. Mesoporous Chitosan-SiO₂ Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and CO₂ Adsorption Capacity. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 5, n. 11, p. 10379–10386, 2017.

REICHSTÄDTER, M. et al. Cysteine-modified silica resin in DGT samplers for mercury and trace metals assessment. **Chemosphere**, v. 263, p. 128320, 2021.

SANTOS, M. C.; CIRILO, A. T. D. O.; NUNES, M. L. Determinação do grau de desacetilação de quitosana obtida de camarão “ Saburica ” (*Macrobrachium jelskii* , Miers , 1877). **Scientia plena**, v. 7, n. 9, p. 3–5, 2011.

SANTOS, O. S. H. et al. Demulsification and Oil Removal from Metalworking Fluids by Polyurethane Foam as Sorbent. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 29, p. 441–449, 2021.

SARAVANAN, R.; RAVIKUMAR, L. The Use of New Chemically Modified Cellulose for Heavy Metal Ion Adsorption and Antimicrobial Activities. **Journal of Water Resource and Protection**, v. 07, n. 06, p. 530–545, 2015.

SHAZWANI, N. et al. Microwave Enhanced Synthesis of Sulfonated Chitosan-Montmorillonite for Effective Removal of Methylene Blue. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 29, p. 4027–4039, 2021.

SIMUL BHUYAN, M. et al. Monitoring and assessment of heavy metal contamination in surface water and sediment of the Old Brahmaputra River, Bangladesh. **Applied Water Science**, v. 9, p. 125, 2019.

SUN, H. et al. Using diffusive gradients in thin films (DGT) and DGT-induced fluxes in sediments model to assess the dynamic release of copper in sediment cores from the Three Gorges Reservoir, China. **Science of the Total Environment**, v. 672, p. 192–200, 2019.

SUN, M. et al. Ecological risk assessment of soil cadmium in China's coastal economic development zone: a meta-analysis. **Ecosystem Health and Sustainability**, v. 6, n. 1, 2020.

TCHOUNWOU, P. B. et al. Heavy Metal Toxicity and the Environment. **Experientia Supplementum**, v. 101, 2012.

TONELLO, P. S. et al. Use of diffusive gradients in thin films and tangential flow ultrafiltration for fractionation of Al(III) and Cu(II) in organic-rich river waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 598, n. 1, p. 162–168, 2007.

TONELLO, P. S. **Uso das técnicas de difusão em filmes finos por gradiente de concentração (DGT) e ultrafiltração com fluxo tangencial no estudo da labilidade de Al (III) e Cu em sistemas aquáticos**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2009.

TSURKAN, M. V. et al. Progress in chitin analytics. **Carbohydrate Polymers**, v. 252, n. October 2020, p. 117204, 2021.

U, S. D.; SHERWOOD, J.; LEYDEN, J. In situ measurements of labile Cu , Cd and Mn in river waters using DGT. **Science of The Total Environment**, v. 239, n. 1–3, p. 71–80, 1999.

VIEIRA CARVALHO, T. **Biomateriais À Base De Quitosana De Camarão E Bactérias Para Remoção De Metais Traços E Petróleo**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, 2006.

VIEIRA, R. S. **Adsorção competitiva dos íons cobre e mercúrio em membranas de quitosana natural e reticulada**. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA, 2008.

VILAS-BOAS, J. A. et al. Ciliates as model organisms for the ecotoxicological risk assessment of heavy metals: A meta-analysis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 199, p. 110669, 2020.

WANG, Y. et al. Assessment of heavy metals in surface water, sediment and macrozoobenthos in inland rivers: a case study of the Heihe River, Northwest China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 23, p. 35253–35268, 2022.

WALKE, S. et al. Fabrication of chitosan microspheres using vanillin/TPP dual crosslinkers for protein antigens encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 128, p. 188-198, 2015.

WARNKEN, J.; DUNN, R. J. K.; TEASDALE, P. R. Investigation of recreational boats as a source of copper at anchorage sites using time-integrated diffusive gradients in thin film and sediment measurements. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, n. 9–10, p. 833–843, 2004.

WARNKEN, K. W. et al. In situ speciation measurements of trace metals in headwater streams. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 19, p. 7230–7236, 2009.

WILLIAMS, P. L. et al. **Principles of toxicology: Environmental and Industrial Applications**. 2nd. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc, 2000.

WILLIAMS, P. N. et al. Evaluation of in situ DGT measurements for predicting the concentration of Cd in Chinese field-cultivated rice: Impact of soil cd:Zn ratios. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 15, p. 8009–8016, 2012.

ZHANG, H. et al. In situ high resolution measurements of fluxes of Ni, Cu, Fe, and Mn and concentrations of Zn and Cd in porewaters by DGT. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 59, n. 20, p. 4181–4192, 1995.

ZHANG, H. et al. In situ measurements of solution concentrations and fluxes of trace metals in soils using DGT. **Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 5, p. 704–710, 1998.

ZHANG, H.; DAVISON, W. Performance Characteristics of Diffusion Gradients in Thin Films for the in Situ Measurement of Trace Metals in Aqueous Solution. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 19, p. 3391–3400, 1995.

ZHANG, H.; DAVISON, W. Diffusional characteristics of hydrogels used in DGT and DET techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 398, n. 2–3, p. 329–340, 1999.