



RICE HUSK

**SOY BEAN
OIL**

BIODIESEL

Orbital

OCTOBER–DECEMBER, 2014
VOLUME 6, NUMBER 4
ISSN 1984–6428

The Electronic Journal of Chemistry

*Cascas de Arroz:
Uma Alternativa Promissora*

Published by the
Institute of Chemistry of the Federal
University of Mato Grosso do Sul
Campo Grande, Brazil

www.orbital.ufms.br

Orbital - Vol. 6 No. 4 - October-December 2014

Table of contents

FULL PAPERS

<u>Application of Ultraviolet and Ultrasound Irradiation for the Degradation of Pyridine in Wastewater: A Comparative Study</u>	
<i>Mohamed Elsayed</i>	195-204
<u>Study of Density, Viscosity and Ultrasonic properties of Ethyl/methyl-4-(aryl)-6-methyl-2-oxo/thioxo-1, 2, 3, 4-tetrahydropyridimidine-5-carboxylate</u>	
<i>Sonal Dilip Bajaj, Pradip V. Tekade</i>	205-2014
<u>In vitro antioxidant and cell viability of <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers)</u>	
<i>Thales D. P. Altoé, Gustavo M. de Amorim, João Victor D. Gomes, Augusto S. Borges, Iuri C. Valadão, Ian Victor Silva, Letícia B. A. Rangel, Paulo Cezar Vieira, Claudia M. Jamal, Rodrigo R. Kitagawa, Warley de Souza Borges</i>	215-222
<u>Adsorption Kinetics of Cd(II) and Pb(II) Ions from Aqueous Solutions by Bamboo-Based Activated Charcoal and Bamboo Dust</u>	
<i>Stevens Azubuike Odoemelam, Francis Kalu Onwu, Christopher Uchechukwu Sonde, Mgbeahuruike A. Chinedu</i>	223-232
<u>Actividad Biológica de <i>Combretum laurifolium</i></u>	
<i>Ismael Fernández Montero, Francisco Santos Silva, Habel Nasser Rocha Costa, Antônio Alves Melo Filho, Ricardo Carvalho Santos, Gilzonia V. Costa, Carlos Alberto C. Lima</i>	233-239
<u>Green Synthesis and Characterization of Thymol-guanidine-formaldehyde Terpolymer Resin</u>	
<i>Suraj Diwakarrao Kukade, Ritesh Ramdasji Naik, Sheshrao Vitthalrao Bawankar</i>	240-245
<u>Propiedades Físico-químicas por RMN de ¹H y Constituyentes en el Aceite de <i>Carapa guianensis</i> por ESI-MS</u>	
<i>Elson Farias Silva, Ismael F. Montero, Antônio Alves Melo Filho, Ricardo Carvalho Santos, Pedro Romulo Estevam Ribeiro, Diana M. Sangama, Ane Karina Porto Costa, Ana Cristina Gonçalves Melo</i>	246-254
<u>Determinação Voltamétrica do Antioxidante Galato de Propila em Biodiesel Empregando Eletrodos de Pasta de Carbono Modificados com Líquido Iônico</u>	
<i>Luiz Henrique de Oliveira, Ana Caroline Dias Souza, Lucas Pizzuti, Valdir Souza Ferreira, Lauro Antonio Pradela Filho, Regina Massako Takeuchi, André Luiz dos Santos, Magno A. G. Trindade</i>	255-266

REVIEWS

<u>Cascas de Arroz: Uma Alternativa Promissora</u>	
<i>Heloá Santos, Danielle Lessa Junger, Ana Brígida Soares</i>	267-275

SHORT COMMUNICATIONS

<u>Condutividade da Polianilina e Poliacrilonitrila Dopadas com Fe(II) e Fe(III)</u>	
<i>Yonis Fornazier Filho, Eloi Alves Silva Filho, Vadilson Malaquias dos Santos, Evaristo Nunes Filho, Carlos Gilmar Zucolotto Junior, Alfredo Gonçalves Cunha</i>	276-281

Application of Ultraviolet and Ultrasound Irradiation for the Degradation of Pyridine in Wastewater: A Comparative Study

Mohamed A. Elsayed

Chemical Engineering Department, Military Technical College, Egyptian Armed Forces, Cairo, Egypt.

Article history: Received: 04 December 2013; revised: 26 August 2014; accepted: 10 October 2014. Available online: 28 December 2014.

Abstract: The photochemical and sonochemical degradation of aqueous solutions of pyridine, a common refractory pollutant in wastewater effluents, have been investigated by means of ultraviolet (UV), ultrasound (US), UV/H₂O₂, and US/H₂O₂ irradiation processes. The pure photochemical process were demonstrated to be efficient for degradation of low initial concentrations of pyridine (10 ppm). Sonochemical degradation proceeded very slowly, leading to less than 53% of pyridine removal after 200 min. The degradation efficiency was increased with increasing H₂O₂ concentration; however, the marginal benefit became decreasing with further increasing of H₂O₂ due to the scavenging effect of excess H₂O₂. The kinetics of photochemical and sonochemical degradation of pyridine were found to follow a first-order rate law. A possible degradation pathway for pyridine was also proposed.

Keywords: pyridine; sonochemical degradation; photochemical degradation; wastewater treatment

1. INTRODUCTION

Ultraviolet and ultrasound irradiation are highly efficient and novel methods for the rapid oxidation/degradation of many organic and inorganic substances. In the recent years, these advanced oxidation processes (AOPs) have emerged as potentially powerful methods for transforming organic pollutants into non-toxic substances [1]. The most widely adopted AOPs include photodegradation, Fenton, photo-Fenton, ultrasonication, and ozonation (O₃). AOPs are based on physicochemical processes that produce powerful free radical species *in situ*, principally hydroxyl radicals (HO•), by using chemical and/or other forms of energy, and have a high efficiency for organic matter oxidation. It is a highly powerful oxidizing agent having an oxidation potential of 2.33 V, which can undergo rapid and non-selective reaction with most organic and many inorganic pollutants. Hydroxyl radicals exhibit faster rates of oxidation reactions comparing to conventional oxidants such as H₂O₂ or KMnO₄ [2]. Hydroxyl radicals (HO•) are effective in destroying organic chemicals because they are reactive electrophiles (electron-preferring species) that react rapidly and non-selectively with nearly all electron-rich organic compounds. Once generated, hydroxyl

radicals can attack organic chemicals by radical addition (Eq. 1), hydrogen abstraction (Eq. 2), and electron transfer (Eq. 3). In the following reactions, R is used to describe the reacting organic compound [3].



R is used to describe the organic pollutant.

Unlike conventional physicochemical processes, AOPs provide faster reaction rates; at the same time, AOPs are effective in the removal of various bio-refractory organics present in water and wastewater [4, 5].

The increasing contamination of wastewater streams by organic species refractory to conventional methods has promoted the development of newer technologies that are able to degrade these contaminants. Advanced oxidation processes (AOPs) are efficient novel methods useful to accelerate the non-selective oxidation and thus the destruction of a wide range of organic substances resistant to conventional technologies [2, 6, 7]. Since pyridine is a common refractory pollutant in wastewater effluents, the conventional volatile organic compound (VOC)

*Corresponding author. E-mail: aboelfotoh@googlemail.com

controlling technologies, including condensation, adsorption [8], extraction, membrane separation, and so on, have been commonly utilized to control its escaping. However, these technologies require high operating costs or secondary disposal treatments [9]. Biological means of treatment transforms the pollutants present in the waste to certain intermediate compounds, which are further mineralized/utilized in the metabolic pathway. Even though the biological methods are highly practical and advantageous, the toxic and hazardous compounds encountered in the waste inhibit the process [10, 11].

A lack was noticed in the relevant literature regarding the safe removal of pyridine, their transformation products, and a comparison of different degradation techniques. On the basis of the previous considerations, this study focused on the photochemical and sonochemical degradation of pyridine in aqueous media. A variety of different operating conditions were examined. The effects of different initial concentration and H_2O_2 on kinetic rate constants were also examined in order to gain insight into the kinetics of the degradation of pyridine.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Materials

Pyridine standard solution was supplied by Fluka with a purity better than 98.0%. It was used to prepare a synthetic wastewater specimen. Aqueous solutions were made using deionized water, which was prepared by an Elga B114 Deionizer using C114 cartridges, (EC = 5 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}@25^\circ\text{C}$ and TDS=3.5 ppm). All other reagents were of reagent grade obtained from Fluka and used as received.

2.2 Ultrasonic Reactor Setup

The degradation experiments were carried out in an ultrasonic cleaner bath (Honda Electronics PS-60, Capacity 15 L). The bath operates at 360 W and 40 KHz. An Erlenmeyer flask was used as the reaction vessel. The volume of the solution was 100 mL. The bath temperatures were maintained by proper recirculation of water. The solution temperature was also monitored regularly. The efficiency of a reaction occurring in the vessel under ultrasonic conditions depends strongly on the distance of the bottom of the reaction vessel to the bottom of water bath. The distance was carefully measured through preliminary experiments, so that the ultrasonic intensity reached the maximum at the

bottom of the flask. For an ultrasonic frequency of 40 KHz, this distance was measured to be 1 cm. The reactor was sealed with a silicone stopper wrapped with an aluminium foil to ensure the minimum loss due to the evaporation of the volatile compounds. The syringe needle was pierced through the septum of the stopper for sampling purposes. All sonochemical experiments were conducted in duplicate. The averages of the parallel experimental data were calculated and taken into account in the analyses of sonochemical kinetics. The error of all parallel experiments was under 5%.

2.3 Photochemical Reactor Setup

The experiments were carried out in a 250 mL glass immersion-based photochemical reactor, charged with 100 mL of aqueous solution, where the solution was illuminated by means of a low-pressure, 10 W mercury lamp with 90% emittance at 254 nm, located axially and held in a quartz immersion tube. The source was turned on and the time count was initiated. Samples (*ca.* 5 mL) were withdrawn at regular times for UV-Vis analyses.

2.4 Quantitative analyses

Samples periodically drawn from the vessel were quantitatively analyzed by measuring their absorbances using a Shimadzu UV-Visible spectrophotometer. Initially, tests were carried out by UV scans from a wavelength of 200 to 500 nm to determine the absorption maxima of the pyridine molecule.

2.5 Qualitative analysis of the degradation products by GC-MS

GC-MS analyses were performed on a Shimadzu QP 2000 instrument, equipped with an Equity-5 column (Supelco) (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm), coated with 5% phenyl/95% methyl polysiloxane. Separation of the by-products was conducted under the following chromatographic conditions: Injector temperature, 240 $^\circ\text{C}$; oven temperature program, 50 $^\circ\text{C}$ ramped at 5 $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ – 250 $^\circ\text{C}$ followed by another ramp of 10 $^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ – 290 $^\circ\text{C}$ held for 2 min. High-purity helium was used as the carrier gas at a flow of 1 mL min^{-1} . The temperatures of the ion source and the interface were set at 240 $^\circ\text{C}$ and 290 $^\circ\text{C}$, respectively. The MS was operated in electron ionization mode with a potential of 70 eV and the spectra were obtained at a scan range from m/z 50–450 (full scan mode). The scan time was 46 min and 1.0- μL injections were introduced, using a split ratio varying from 1/2 to 1/20.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Optimization of the Operating Conditions

3.1.1 Effect of Initial Pyridine Concentration

Since the industrial wastewater contains pollutants in varying concentrations, the effect of the initial concentrations on the reaction rate was tested for pyridine. The effect of solute concentration on the degradation of pyridine was investigated at initial concentrations of 10 and 100 mg/L for both photochemical and sonochemical experiments.

As shown in Figure 1, the increase in irradiation time causes a decrease of the concentration of pyridine in the solution and thus, the removal increases. It follows from the data obtained that degradation of pyridine depends upon the time of irradiation. For the sonochemical irradiation experiments, the removal rates of pyridine decreased from 43% to 13% with an increase of the initial concentration from 10 to 100 mg/L, respectively, as

shown in Figure 2. This suggests that increasing the initial concentration of the solution would decrease the removal rates of pyridine. This is because the increase of initial concentration of the volatiles results in the weakening effect of cavitation [12]. However, the total amount of pyridine degraded after 60 min at 100 mg/L which was as much as three times larger than that degraded at 10 mg/L. On the other hand, the photochemical experiments show a better removal of pyridine. The removal rates of pyridine decreased from 90% to 60% with increasing the initial concentration from 10 to 100 mg/L, respectively. These indicate that ultraviolet irradiation is far more effective than ultrasound irradiation in the degradation of pyridine in aqueous solutions. The results show that the removal efficiency using photochemical process is approximately 90% at pyridine's initial concentration at 10 ppm, so it can be said that we achieved a complete degradation of pyridine. The sonochemical process achieves an efficiency of 43% for the same initial concentration with an irradiation time of 60 min.

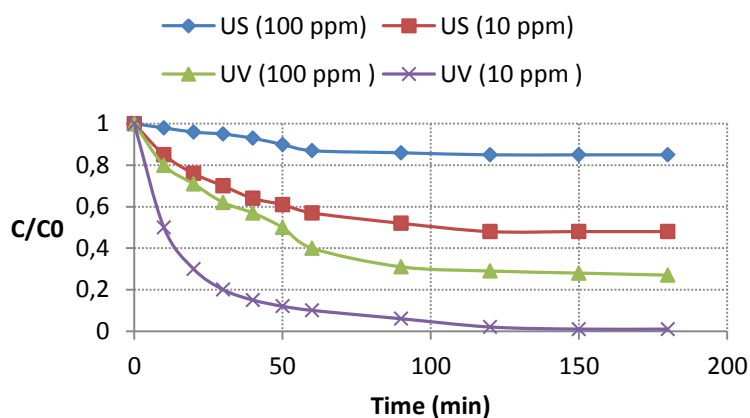


Figure 1. The effect of initial concentration on the degradation of pyridine for both ultrasound (US) and ultraviolet (UV) experiments.

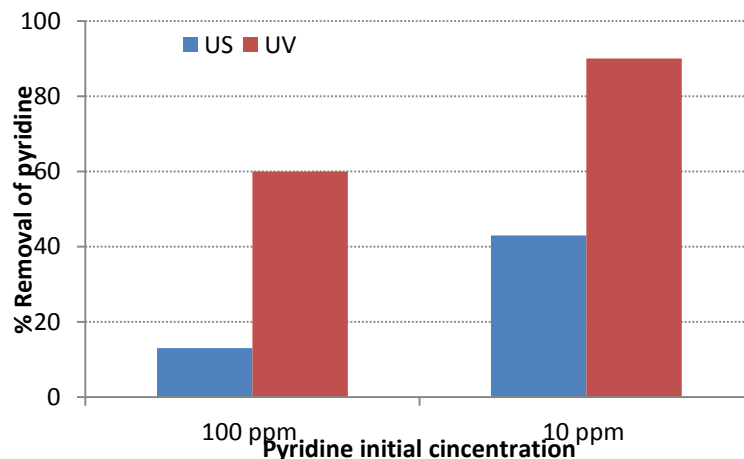


Figure 2. % Removal of pyridine after 60 min irradiation time for both ultrasound (US) and ultraviolet (UV)

experiments.

The degradation curves of pyridine by UV and US radiation are well fitted by a mono-exponential curve, suggesting that a first-order homogeneous reaction model can be taken in consideration for describing the kinetic behavior. Considering that the UV and US radiation are solely responsible for pyridine removal from the solution, according to Eqs. (1) – (3), and considering that the limiting step is the scission of the starting material, the kinetic equation that describes the process is $-\frac{dC}{dt} = KC$ (4)

In Equation (4), k is the first-order rate constant and C is the concentration of pyridine at each

moment when $t > 0$. Integration of Eq. (4), with the usual restriction of $C = C_0$ at $t = 0$, will lead to a linear plot of $\ln(C_0/C)$ versus t with a slope of k being the first-order rate constant in Figure 3. The photochemical and sonochemical experiments, under the conditions of constant irradiating flux for different initial concentrations of pyridine, show a variation in the k values (Table 1). The apparent first order rate constants decreased with an increasing initial concentration of the pyridine, indicating a non-elementary nature of the sonochemical and photochemical reactions. This dependence of reaction rate constants on the initial concentration are compared well with the existing literature [13-15].

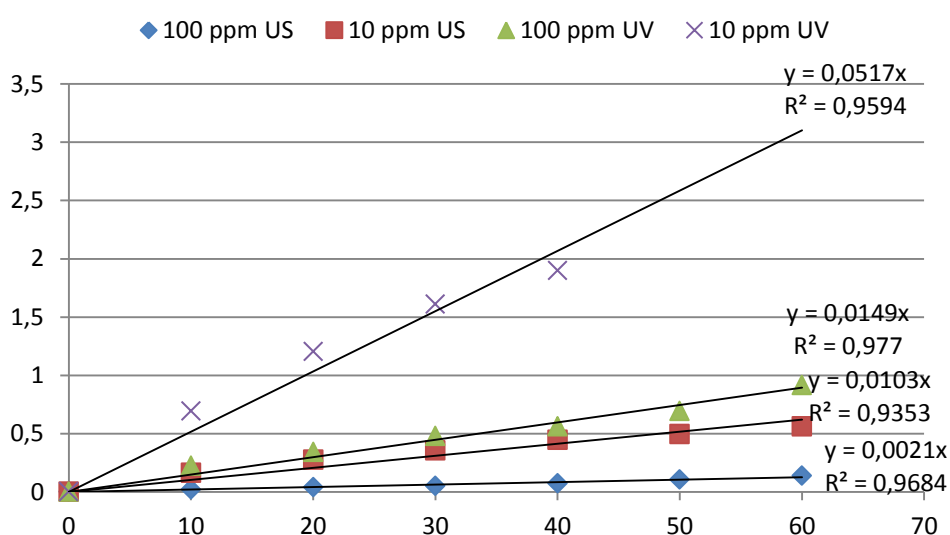


Figure 3. The first order kinetics of pyridine degradation at an initial concentration of 10 and 100 mg/L for both photochemical and sonochemical experiments.

Table 1. The apparent first order rate constants and half-life for the pyridine's degradation processes.

Type of process/ Initial pyridine concentration (ppm)	Rate constant K (min^{-1})	$T_{1/2}$ (min)	R^2
US (10 ppm)	0.01	90	0.93
US (100 ppm)	0.002	>200	0.97
UV (10 ppm)	0.051	10	0.95
UV (100 ppm)	0.014	50	0.98

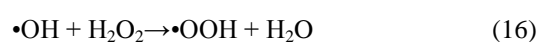
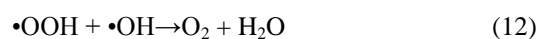
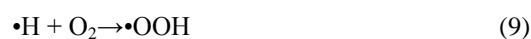
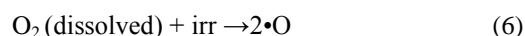
For sonochemical experiments, a 10-fold increase in the initial concentration of pyridine leads to a 5-fold decrease on the rate constant of the process. Meanwhile, for the photochemical experiment, a 10-fold increase in the initial concentration of pyridine leads to a 4-fold decrease on

the rate constant. The observed decrease on k as the initial concentration of pyridine increases can be explained in terms of the less availability of oxidizing species, such as OH radicals, through the direct photolysis or sonolysis of H_2O as the concentration of the solution gets more intense. An efficiency

comparison of the processes of photo-degradation and sono-degradation showed that the photo-degradation of pyridine was more efficient than sono-degradation. It can also be observed from the results that UV had a potential to degrade pyridine. More than 90% degradation was achieved after about 60 min at 10 ppm concentration of pyridine. The poor effects of US alone on the degradation efficiency may be attributed to the fact that low ultrasound frequencies, hindering the development of hydroxyl radicals [16]. Hence, for pyridine, being a volatile and highly soluble compound, reactions inside or in the vicinity of the bubble, where fast thermal decomposition and increased concentrations of radicals exist, are unlikely to occur to an appreciable extent and, therefore, its degradation will be driven by hydroxyl radical-mediated secondary activity in the liquid bulk. Thus, US irradiation process generally demands a high contact time for significant degradation efficiency [17]. On the other hand, UV irradiation had a high potential to produce the highly reactive hydroxyl radical. This would explain the discrepancies in the reactivity of pyridine between sonochemical and photolytic reactions since the latter involves the participation of a more diverse range of reactive species (*i.e.*, radicals and electrons) than the former [18, 19]. Generally, the photolytic degradation can be defined as a cyclic photo-process in which pyridine undergoes photodegradation, but the catalyst is regenerated spontaneously to allow the sequence to continue indefinitely until all the substrate is destroyed [20].

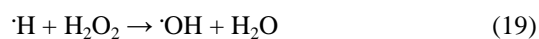
3.1.2 The effect of UV/H₂O₂ and US/H₂O₂ irradiation processes

Hydroxyl radicals generated in water by ultrasonication and photolysis can produce hydrogen peroxide in the system according to equations (5)-(17). In these reactions "irr" denotes the UV or US irradiation. Whether additional hydrogen peroxide has a synergistic effect on the overall degradation of pollutants [21, 22], for this purpose some experiments were conducted at various concentrations of added H₂O₂.



In this part of study, sonicative and photolytic experiments were repeated with pyridine solutions including H₂O₂ to study the effect of H₂O₂ addition for the degradation of pyridine. H₂O₂ was added to 100 mL of pyridine solution with an initial concentration of 100 ppm in such an amount that its concentration was 100 ppm, 300 ppm or 500 ppm in the solution. Figure 4 displays the effect of H₂O₂ amount added in the sonochemical degradation of pyridine, while the inset shows the reaction kinetics for the degradation, in which for all reactions, the kinetics followed first-order rate laws ($R^2 > 93$). As seen from Figure 4, in the concentration range studied, the amount of H₂O₂ added has a positive contribution on the degradation of pyridine when compared with the absence of H₂O₂. Increasing the amount of H₂O₂ increases the degradation of pyridine.

According to the hot spot theory, the temperature and pressure of localized hot spots formed can excessively reach 5000 K and 1000 atm, respectively, in ultrasonic cavitation. Under these conditions, hydrogen peroxide readily decomposes into hydroxyl radicals, according to the following equations, causing a high degradation rate [23].



The amount of H₂O₂ that can be produced by ultrasound itself is too small to dissociate into large amounts of $\cdot\text{OH}$. Thus, an additional amount of H₂O₂ is generally needed to significantly accelerate the degradation process. H₂O₂ will increase the formation of $\cdot\text{OH}$ in two ways. It could either through the self-decomposition as a result of ultrasound irritation or as the reduction of H₂O₂ at the conduction band as shown in reactions (18) and (19), respectively [24].

Figure 5 shows the effect of different H₂O₂ concentrations on the degradation of pyridine with respect to the irradiation time. It can be seen that photodegradation increases with an increase in the amount of H₂O₂ concentration, up to the optimum

value and then decreases when the H_2O_2 concentration is increased. This trend can be explained by the fact that H_2O_2 itself acts as an

effective hydroxyl radical scavenger at concentrations that are specific for the pollutant in question.

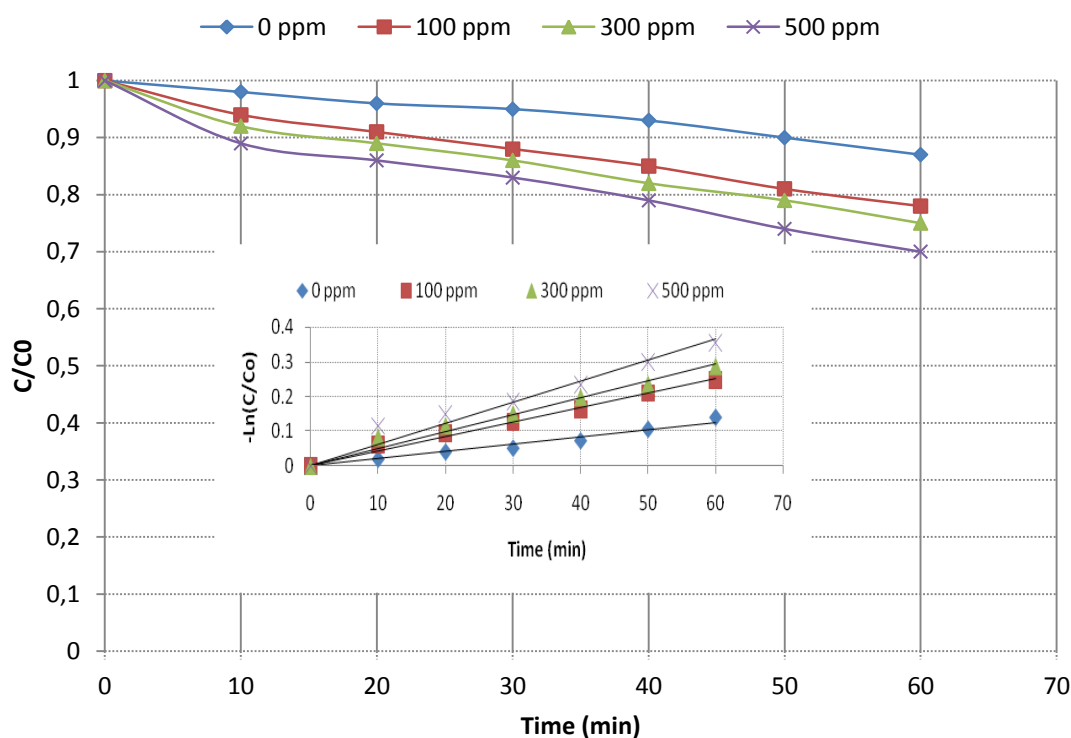


Figure 4. The effect of H_2O_2 on the sonochemical degradation of pyridine at an initial concentration of pyridine $C_0 = 100$ ppm. The embedded curve shows the first order kinetics of pyridine degradation.

Figure 6 displays the effect of H_2O_2 amount added on the rate of photochemical degradation of pyridine in aqueous solution. As it can be seen from the result, the addition of 100 ppm and 300 ppm H_2O_2 can enhance the degradation when compared with the

absence of H_2O_2 . However, 500 ppm H_2O_2 has a negative contribution on the decomposition of pyridine. So there may be an optimum amount of H_2O_2 to increase the degradation rate.

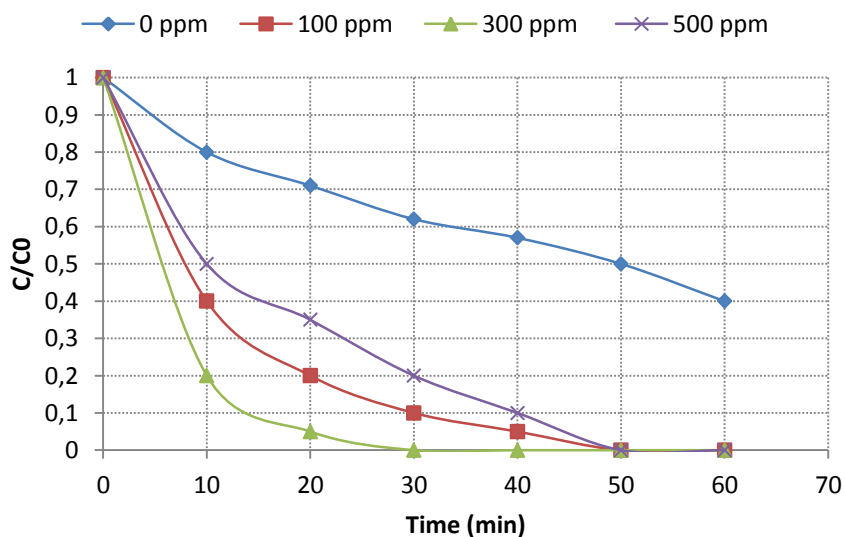


Figure 5. The effect of H₂O₂ on the photochemical degradation of pyridine at an initial concentration of pyridine, C₀= 100 ppm.

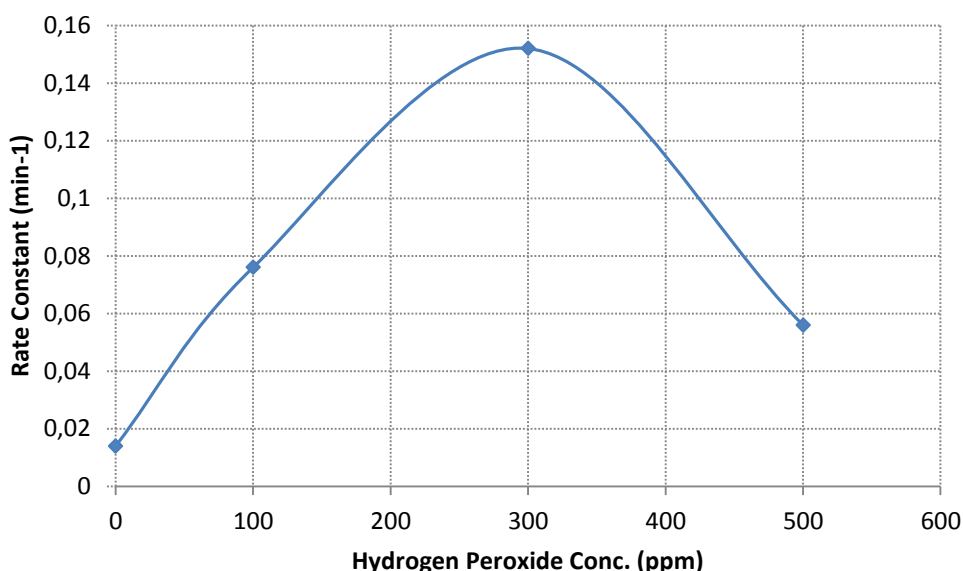
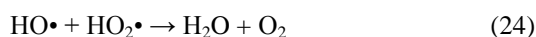


Figure 6. The effect of H₂O₂ on the rate of photochemical degradation of pyridine at an initial concentration of pyridine, C₀= 100 ppm.

During this process, ultraviolet radiation is used to cleave the O-O bond in hydrogen peroxide and generate the hydroxyl radical. The reactions describing UV/H₂O₂ process are presented below [25].



In the previous equations, Eq. 19 is the rate-limiting reaction because the rates of the other reactions are much higher than that of Eq. 19. Theoretically, in the UV/H₂O₂ process, a higher initial hydrogen peroxide concentration produces a higher concentration of hydroxyl radicals, which causes even more degradation of pyridine. However, an optimal hydrogen peroxide concentration exists because overdosing of hydrogen peroxide would lead to a reaction with hydroxyl radical and the formation of HO₂• (Eq. 20). Moreover, there is an optimum concentration for H₂O₂. Beyond this limit, the presence of H₂O₂ is detrimental to the degradation reaction due to a scavenging action. Therefore, the combination of UV with H₂O₂ was necessary for the

production of hydroxyl radicals to initiate the degradation of pyridine at a reasonable time scale even for the higher pyridine concentrations. These results are in good agreement with other findings in the literature, such as the one by Aleboye *et al.* [26], who showed that a combination of UV plus H₂O₂ in comparison with UV alone increases the removal rates of Acid Orange 8 and Methyl Orange, for 172 and 137 times respectively. In this view, the UV radiation is combined with a powerful oxidant, H₂O₂; the degradation efficiency of pyridine is significantly enhanced due to hydroxyl radical production caused by the photolysis of H₂O₂, as reported by other researchers [27].

In conclusion, results with UV/H₂O₂ and US/H₂O₂ processes indicate that the oxidation was exclusively due to the attack of hydroxyl radical when hydrogen peroxide was in excess. Pyridine degradation rate by US and US/H₂O₂ was strongly dependent on initial concentration of hydrogen peroxide, as shown in Figure 4. Figure 5 shows that UV/H₂O₂ is more efficient than UV light alone for the degradation of pyridine. A comparison of photo-degradation and sono-degradation rate constant in Table 2, showing that the photo-degradation of pyridine was more efficient than sono-degradation. The results indicated that in the cases of UV/H₂O₂ and US/H₂O₂, a sufficient amount of H₂O₂ was necessary, but a very high H₂O₂ concentration would inhibit the

reaction rate. The optimum H_2O_2 concentration was achieved in the range of 100 - 300 ppm at a pyridine concentration of 100 mg/L. A degradation of 99% was obtained with UV/ H_2O_2 within 5 minutes while degradation efficiency by using UV (< 20%), US (< 2%), and US/ H_2O_2 (<10%) processes were negligible for this kind of pollutant at these operating conditions specified.

3.2. GC-MS analyses of the degradation products

Figure 7(a) shows the GC-MS response of an injected pyridine sample (10 mg/L) which was previously subjected to ultrasonic irradiation for 10 min. The retention time for pyridine is at 4.43 min. On the other hand, Figure 7(b) shows the response of

an injected pyridine sample (10 mg/L) which was previously subjected to ultraviolet irradiation for 10 min. Pyridine appears at the same retention time at 4.43 min. The chromatogram shows two other peaks which could be attributed to the degradation products of pyridine. The results show that the ultrasonic and photolytic irradiations cause a cleavage of the pyridine ring to produce acetylene and diacetylene at 26 and 52 m/z, respectively, as degradation products. These are the only barely detectable degradation products found. In addition, comparing the abundance of pyridine (concentration) in cases of UV and US irradiations indicate that the UV process is far more effective for pyridine degradation than US does.

Table 2. The apparent first-order rate constants and half-life for the sonochemical and photolytic degradation processes at various conditions of pyridine solution with an initial concentration of 100 ppm.

Type of process	Rate constant K (min^{-1})	$T_{1/2}$ (min)	R^2
US	0.002	> 200	0.97
US/ H_2O_2 (100 ppm)	0.004	> 120	0.99
US/ H_2O_2 (300 ppm)	0.005	> 90	0.97
US/ H_2O_2 (500 ppm)	0.006	> 60	0.95
UV	0.014	50	0.98
UV/ H_2O_2 (100 ppm)	0.076	< 10	0.99
UV/ H_2O_2 (300 ppm)	0.152	< 5	0.99
UV/ H_2O_2 (500 ppm)	0.056	10	0.99

Having a look at the literature regarding the degradation of pyridine and pyridine derivatives, one sees that there are inconsistencies about the reaction mechanism through holes or hydroxyl radicals. Therefore, Agrios and Pichat [28] suggest that pyridine reacts over TiO_2 predominantly *via* the

formation of a radical centered on the pyridine ring. Some researchers reported that free radicals would be generated by applying ultraviolet irradiation simultaneously with oxidants [15, 20]. Figure 8 shows the tentative degradation pathway proposed for UV/US degradation of pyridine.

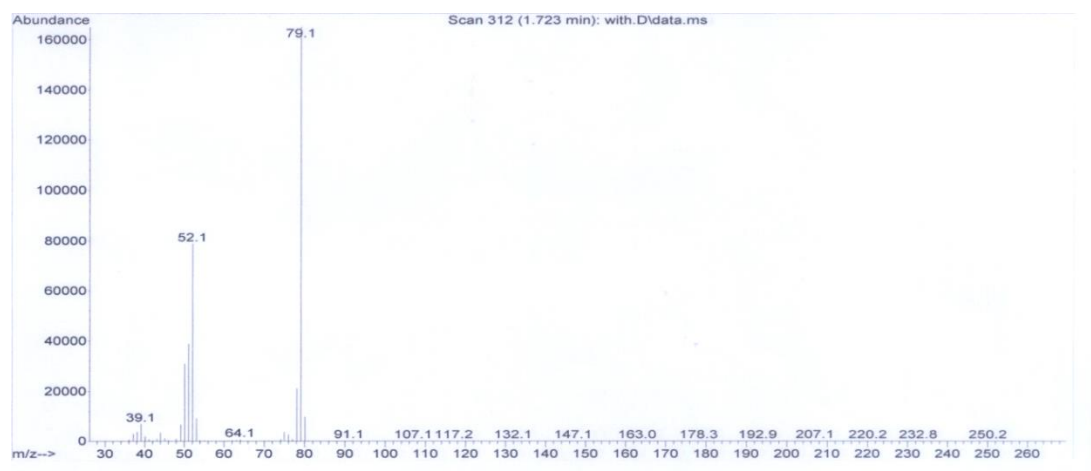


Figure 7(a). GC/MS analysis (10 min sonication time, 40 kHz, 20 ± 1 °C, 360 W and initial concentration of pyridine, $C_0 = 10$ ppm).

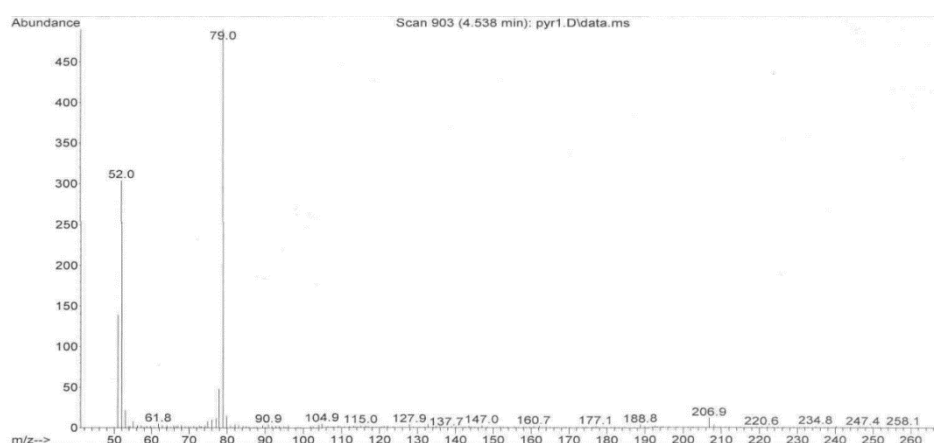


Figure 7(b). GC/MS analysis (10 min photolysis time and initial concentration of pyridine, $C_0 = 10$ ppm).

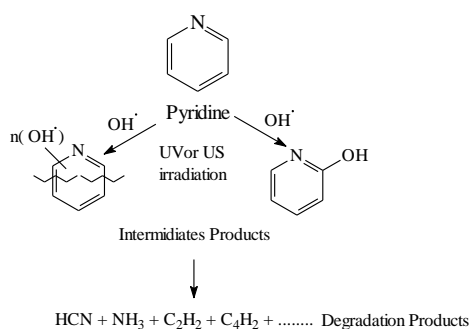


Figure 8. Tentative degradation pathways proposed for UV/US degradation of pyridine.

In a previous work, Zechmeister *et al.* reported the ultrasonic cleavage of the pyridine ring in aqueous silver nitrate [29]. Roughly 5% of the ring atoms are precipitated as a mixture of silver acetylide, silver diacetylide, and silver cyanide. It has been shown that similar cleavage reactions can also be realized in the absence of silver, with pyridine and pyrrole. Under these conditions, free acetylene and hydrogen cyanide

were reported to evolve [30]. Very volatile products are directly formed through the degradation of pyridine. C₄H₄ and C₄H₂ are the most common hydrocarbon products formed [21, 22, 32]. It has been previously proven that acetylene, diacetylene, and hydrogen cyanide can be formed during aquasonolyses of pyrrole, N-methylpyrrole, and pyridine [29-31]. In the future, products from sonolyses and/or photolysis of pyridine should be further investigated.

4. CONCLUSION

In this experimental study, the degradation of pyridine was investigated by using several advanced oxidation processes: US, US plus H₂O₂, UV, and UV plus H₂O₂. The optimal operating condition for each process was established. The conclusions drawn from this study can be summarized as follows: The degradation efficiency proceeded very slowly when US, US plus H₂O₂, and UV processes were used. UV

plus H₂O₂ process was found to be a suitable treatment method for complete degradation for pyridine within very short time. The reaction rate constant was increased with increasing H₂O₂ concentration; however, the marginal benefit became decreasing with further increasing of H₂O₂ due to the scavenging effect of excess H₂O₂. Pseudo-first order kinetics with respect to pyridine concentrations were found to fit all the experimental data. The results show that the ultrasonic and photolytic irradiations cause the cleavage of the pyridine ring to produce acetylene and diacetylene at 26 and 52 m/z, respectively, as main degradation products barely detected by GC-MS.

5. REFERENCE AND NOTES

- [1] Klán, P.; Vavrik, M. *J. Photochem. Photobiol. A*, **2006**, *177*, 24. [[CrossRef](#)]
- [2] Gogate, P. R.; Pandit, A. B. *Adv. Environ. Res. (Oxford, U. K.)* **2004**, *8*, 501. [[CrossRef](#)]
- [3] Markham, The UV/Oxidation Handbook. Solarchem Environmental Systems, Ontario, Canada, 1994.
- [4] Yang, S.; Wang, P.; Yang, X.; Wei, G.; Zhang, W.; Shan, L. *J. Environ. Sci.* **2009**, *21*, 1175. [[CrossRef](#)]
- [5] Lai, T.-L.; Lee, C. -C.; Huang, G. -L.; Shu, Y. -Y.; Wang, C. -B. *Appl. Catal. B* **2008**, *78*, 151. [[CrossRef](#)]
- [6] Vogelpoh, A. K.; Kim, S. M. *J. Ind. Eng. Chem.* **2004**, *10*, 33.
- [7] Gogate, P. R.; Pandit, A. B. *Adv. Environ. Res. (Oxford, U. K.)* **2004**, *8*, 553. [[CrossRef](#)]
- [8] Zhu, S.; Bell, P. R. F.; Greenfield, P. F. *Water Res.* **1988**, *22*, 1331. [[CrossRef](#)]
- [9] Paige, H.; Oyama, S. T.; Control of volatile organic compound emissions: conventional and emerging technologies. New York: Wiley, 2000.
- [10] Mathur, A. K.; Majumder, C. B.; Chatterjee, S.; Roy, P. *J. Hazard. Mater.* **2008**, *157*, 335. [[CrossRef](#)]
- [11] Padoley, K. V.; Rajvaidya, A. S.; Subbarao, T. V.; Pandey, R. A. *Bioresour. Technol.* **2006**, *97*, 1225. [[CrossRef](#)]
- [12] De Visscher, A.; Van Eenoo, P.; Drijvers, D.; Van Langenhove, H. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 11636. [[CrossRef](#)]
- [13] Jiang, Y.; Pétrier, C.; Waite, T. D. *Ultrason. Sonochem.* **2002**, *9*, 317. [[CrossRef](#)]
- [14] Da Silva, C. G.; Faria, J. L. S. *J. Photochem. Photobiol. A*, **2003**, *155*, 133. [[CrossRef](#)]
- [15] Stapleton, D. R.; Mantzavinos, D.; Papadaki, M. *J. Hazard. Mater.* **2007**, *146*, 640. [[CrossRef](#)]
- [16] Vinodgopal, K.; Peller, J.; Makogon, O.; Kamat, P. V. *Water Res.* **1998**, *32*, 3646. [[CrossRef](#)]
- [17] Ince, N. H.; Tezcanlı, G. *Dyes and Pigments* **2001**, *49*, 145. [[CrossRef](#)]
- [18] Mahvi, A. H.; Maleki, A.; Alimohamadi, M.; Ghasri, A. *Korean J. Chem. Eng.* **2007**, *24*, 79. [[CrossRef](#)]
- [19] Naffrechoux, E.; Chanoux, S.; Petrier, C.; Suptil, J. *Ultrason. Sonochem.* **2000**, *7*, 255. [[CrossRef](#)]
- [20] Stapleton, D. R.; Emery, R. J.; Mantzavinos, D.; Papadaki, M. *Process Saf. Environ. Prot.* **2006**, *84*, 313. [[CrossRef](#)]
- [21] Pang, Y. L.; Abdullah, A. Z.; Bhatia, S. *Desalination* **2011**, *277*, 1. [[CrossRef](#)]
- [22] Agustina, T. E.; Ang, H. M.; Vareek, V. K. *J. Photochem. Photobiol. C* **2005**, *6*, 264. [[CrossRef](#)]
- [23] Gong, C.; Hart, D. P. *J. Acoust. Soc. Am.* **1998**, *104*, 2675. [[CrossRef](#)]
- [24] Abbasi, M.; Asl, N. R. *J. Hazard. Mater.* **2008**, *153*, 942. [[CrossRef](#)]
- [25] Buxton, G. V.; Greenstock, C. L.; Helman, W. P.; Ross, A. B. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1988**, *17*, 513. [[CrossRef](#)]
- [26] Aleboyeh, A.; Aleboyeh, H.; Moussa, Y. *Dyes and Pigments* **2003**, *57*, 67. [[CrossRef](#)]
- [27] Tarr, M. A. Chemical Degradation Methods for Wastes and Pollutants: Environmental and Industrial Applications. New York: CRC Press, 2003.
- [28] Agrios, A.G.; Pichat, P. *J. Photochem. Photobiol. A* **2006**, *180*, 130. [[CrossRef](#)]
- [29] Zechmeister, L.; Magoon, E. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 2149. [[CrossRef](#)]
- [30] Currell, D. L.; Zechmeister, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 205. [[CrossRef](#)]
- [31] Currell, D. L.; Wilhelm, G.; Nagy, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 127. [[CrossRef](#)]

Study of Density, Viscosity and Ultrasonic Properties of Ethyl/methyl-4-(aryl)-6-methyl-2-oxo/thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyridimidine-5-carboxylate

Sonal D. Bajaj, Pradip V. Tekade*, Om A. Mahodaya

Department of Chemistry, Jankidevi Bajaj College of Science, Jannalal Bajaj Marg, Civil lines, Wardha, India-442001(MS)

Article history: Received: 16 March 2014; revised: 28 August 2014; accepted: 30 October 2014. Available online: 29 December 2014.

Abstract: Density (ρ) and viscosity (η) and ultrasonic velocity (v) of some substituted pyrimidines viz. ethyl 4-(4-chlorophenyl)-6-methyl-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyridimidine-5-carboxylate, Ethyl-4-(4-chlorophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyridimidine-5-carboxylate, ethyl 4-(furan-2-ylmethyl)-6-methyl-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyridimidine-5-carboxylate, ethyl 4-(furan-2-ylmethyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyridimidine-5-carboxylate, ethyl 4-(2-hydroxy-phenyl)-6-methyl-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyridimidine-5-carboxylate have been measured in ethanolic solution of different concentrations (0.1%, 0.05%, 0.025%, 0.0125%, 1.0%, 0.5%, 0.25%, 0.125%). Various acoustical parameters such as adiabatic compressibility (β_{ad}), intermolecular free length (L_f), relaxation time (T), free volume (V_f), internal pressure (Π_i), acoustic impedance (Z), surface tension (S), attenuation (a/f^2), Rao's constant (R), molar volume (V_m), cohesive energy (CE) of these solutions were computed from the experimental velocity, viscosity and density measurements. The changes in the acoustical properties have been used to interpret various molecular interactions in these solutions. Solute solvent interaction seems to be significant in system studied.

Keywords: density; viscosity; ultrasonic velocity; acoustical properties; molecular interactions

1. INTRODUCTION

A series of compounds ethyl/methyl-4-(aryl)-6-methyl-2-oxo/thioxo-1, 2, 3, 4-tetrahydropyridimidine-5-carboxylate under investigation for acoustical parameters in the present paper was synthesized by the previously published method [1] they were synthesized by the reaction of ethyl acetoacetate, urea / thiourea and p-chlorobenzaldehyde / Salicylaldehyde / furaldehyde by using solid supported K-10 Montmorillonite clay as a catalyst.

Pyrimidine and its derivatives are of biological significance and study of molecular interactions in solution will be helpful for understanding their biological applications. Ultrasonic deals with study and application of high frequency sound waves usually in excess of 20 KHz (20,000 cycles per second). It works on the basis of piezoelectric effect [2-4]. Ultrasound has come to play an important role in our daily life. Due to its non-destructive nature [5-7] it has

wide range of application in different fields like chemical industries, consumer industries, medical field, process industries, physics, chemistry, biology etc [8-13]. Further, it is one of the most rapid and reliable technique for the characterization of materials. In medical field, ultrasound was used to detect gall stones and foreign bodies in soft tissues. It is also used for various diagnosis such as pediatrics [14], vascular diseases [15], brain diseases [16], ophthalmology [17], in urology [18], in cancer cell [19] etc. It is also useful to obtain the information about lung microstructure [20] and biological structures [21]. It is safe for both patient and operator. It is also applied for inactivation of microorganisms in food [22] and dairy industry [23-25]. More recently, a lot of interest has been generated on the use of ultrasound radiation in synthetic organic chemistry, which includes decrease of reaction time, increase of yield, lower reaction temperature,

*Corresponding author. E-mail: pradiptekade@gmail.com

avoidance of phase transfer catalysis etc [26-28]. Another area where ultrasonic is now a day being used, is to obtain the information microstructures [29]. It is reported that these ultrasonic waves provide valuable information about the structure of solids [30]. By ultrasonic velocity measurements, the molecular interactions in pure liquids [31-34], aqueous solutions [35-37] and liquid mixtures [38-39] can also be studied. However, very little work has been done for solid organic compounds [40].

Since, no work has been reported on the study of molecular interactions in ethanolic solution of Ethyl/methyl-4-(aryl)-6-methyl-2-oxo/thioxo-1, 2, 3, 4-tetrahydropyridimidine-5-carboxylate. Therefore, the present work is undertaken to know the sound velocities and various acoustical parameters for the said compounds in different concentrations at 313 K. The applications of these pyrimidine derivatives in different fields of science developed our interest in the measurement of their velocities and viscosities and to compute acoustical parameters to understand their interactions with organic solvent at different concentrations.

2. MATERIAL AND METHODS

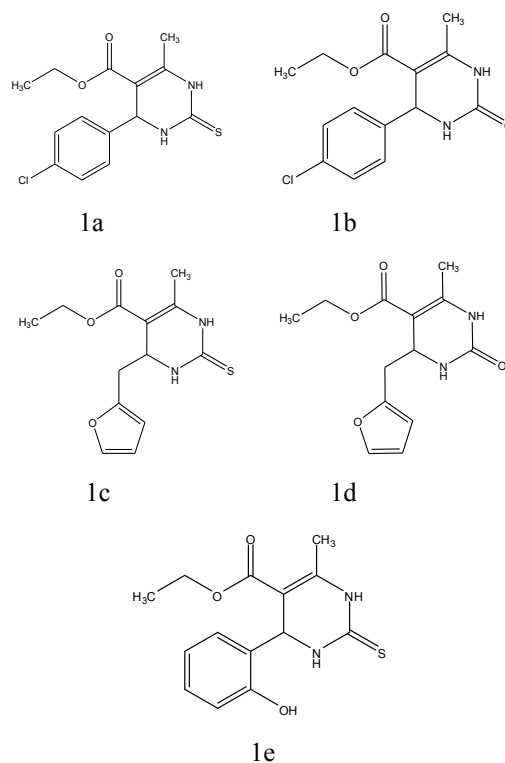
The chemicals used were of analytical grade. Double distilled water was used for preparation of solutions. Pyrimidines derivatives used were recrystallized before use. IR spectra were recorded on Bruker Alpha model (make: Germany). ^1H NMR at 300.13 and ^{13}C NMR at 75.5 MHz spectra of the representative compound was recorded in CDCl_3 on NMR instrument (Bruker DRX 300) at CDRI Lucknow using TMS as internal standard.

General procedure for the synthesis of ethyl/methyl-4-(aryl)-6-methyl-2-oxo/thioxo-1, 2, 3, 4-tetrahydropyridimidine-5-carboxylate

A mixture of substituted aromatic aldehydes (1a-e) (0.01M), ethyl acetoacetate/methyl acetoacetate (0.01M) and urea/thiourea (0.01M) and K-10 Montmorillonite clay were taken in a round bottom flask and was shaken for two minutes. The reaction mixture was then heated in a water bath at about 90 °C for about 30 to 70 minutes. With the progress of a reaction, a solid started to deposit. The solid was washed with cold water (1 mL) and then recrystallized from rectified spirit to get a colourless solid.

The compounds, which are under investigation,

are as follows:



The solutions of these compounds (1a-1e) was prepared by adding accurate amount of solute in ethanol (99%) so as to prepare different concentration 0.1%, 0.05%, 0.025%, 0.0125%, 1.0%, 0.5%, 0.25%, 0.125%. The densities (ρ) of solutions were determined using specific gravity bottles of capacity 25 mL. The ultrasonic velocity measurement was carried out at different concentrations of solution by using multifrequency ultrasonic interferometer (Mittal Enterprises, model F-81) operating at the frequency of 1 MHz with the accuracy of $\pm 0.01 \text{ ms}^{-1}$. The ultrasonic interferometer was calibrated with doubly distilled water. Viscosity (η) measurements was carried out by using Oswald's viscometer. The temperature was 313 K during measurements.

The ultrasonic waves of known frequency are produced by a quartz crystal fixed at the bottom of the cell. The measuring cell is connected to the output terminal of the high frequency generator through the spherical cable. A movable metallic plate kept parallel to the quartz crystal reflects these waves. If the separation between these two plates is exactly a whole multiple of the sound wavelength, standing waves are formed in the medium. This acoustic resonance gives rise to an electrical reaction on the generator, driving the quartz crystal and anode current of the generator becomes a maximum. The high frequency generator is designed to excite the quartz crystal fixed at the bottom of the measuring cell at its resonant frequency to

generate ultrasonic waves in the experimental liquid filled in the measuring cell. The least count of micrometer used for measuring the wavelength is 0.001 mm. The ultrasonic velocity is obtained if the wavelength is known. With the help of measurements of ultrasonic velocity, density, viscosity, and various acoustical parameters were calculated by using the following expressions.

1. Ultrasonic velocity (v): The relation used to determine the ultrasonic velocity is given by,

$$v = f\lambda \text{ ms}^{-1}$$

Where, f - Frequency of ultrasonic waves, λ - Wave length

2. Adiabatic compressibility (κ): Adiabatic compressibility, which is defined as,

$$\kappa = (1/v^2 \rho) \text{ kg}^{-1} \text{ ms}^2$$

Where, v - Ultrasonic velocity, ρ - Density of the solution.

3. Free volume (Vf): Free volume in terms of the ultrasonic velocity (v) and the viscosity of the liquid (η) as

$$Vf = (M v/k\eta)^{3/2} \text{ m}^3$$

Where, M is the molecular weight and 'k' is a temperature independent constant equal to 4.28×10^9 for all liquids.

4. Acoustic impedance (Z): The acoustic impedance is computed by the formula

$$Z = v \times \rho \text{ kg m}^{-2} \text{ s}^{-1}$$

5. Free length (Lf): It is calculated by using formula,

$$Lf = (K/v \rho^{1/2}) \text{ m}$$

K - Jacobson temperature dependent constant defined as $K = (93.875 + 0.345T) \times 10^{-8}$

6. Absorption coefficient (α/f^2): It is calculated by,

$$\alpha/f^2 = 8\pi^2\eta/3\rho v^3$$

7. Viscous relaxation time (T): It is calculated using the relation, $T = 4\eta/3\rho v^2$

8. Rao's Constant (R): Rao's constant is calculated by using formula,

$$R = V \cdot v_3^1 \quad \text{or} \quad R = \left(\frac{M}{\rho}\right) v_3^1$$

M = Molecular Weight.

9. Surface Tension (S): Surface tension is calculated formula given below,

$$v = (S/6.3 \times 10^{-4} \rho)^{2/3}$$

10. Internal pressure (Pi): Internal pressure is calculated by formula given below,

$$Pi = b RT \left[\frac{k \eta}{v}\right]^{1/2} \frac{\rho_3^2}{M_6^2}$$

11. Molar volume: It is the ratio of density verses molecular weight.

$$Vm = \frac{M}{\rho}$$

3. RESULTS AND DISCUSSION

¹H NMR and ¹³C NMR data of representative compound is as follows,

Ethyl 4-(4-chlorophenyl)-6-methyl-2-thioxo-1,2,3,4 tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (1a): M.Pt. 135°C: IR (cm⁻¹): 3100-3500 (2 N-H stretching vibration); 1568 (C=C of aromatic ring); 1280 (N-C=S stretching vibration of thioamides); 1087 (s-m; C=S stretching vibration); 711 (C-Cl): ¹H NMR (300.13 MHz, δ): 9.989 (N-H); 7.099-8.411 (Ar-H); 5.379 (NH); 4.111 (CH); 2.198 (CH₂); 1.287 (CH₃); ¹³C NMR (75.5 MHz, δ): 191.21 (C=O); 174.57 (C=S); 128.39-143.31 (Ar-C); 60.78 (CH); 55.06 (CH); 18.49 (CH₂); 14.31 (CH₃).

Experimentally measured values of ultrasonic velocity (U) and density (ρ) and calculated values of various acoustical parameters for ethanolic solution of 1a-1e at different concentrations are reported in Table 1 to Table 10.

Table 1. Ultrasonic velocity, Density, viscosity, Adiabatic compressibility, Intermolecular free length, Free volume, Rao's constant of different % concentration of Solution of Ethyl 4-(4-chlorophenyl)-6-methyl-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (1a) in ethanol at 313 K.

Concentration (%)	Density (Kg ^m ⁻³)	Viscosity x10 ³ (Nsm ⁻²)	Ultrasonic Velocity (m/s)	Adiabatic compressibility x10 ⁻¹¹ (m ² /N)	Intermolecular free length x10 ⁻¹¹ (m)	Free Volume x10 ⁻² (m ³ mol ⁻¹)	Rao's constant
0.125	807.0	3.549	1230	8.1871	1.82648	2.6471	4.339
0.25	803.2	4.094	1196	8.7009	5.95435	2.2307	4.312
0.5	801.1	4.154	1168	9.1416	6.10326	2.1476	4.296
1.0	800.4	4.291	1150	9.4388	6.20169	2.0466	4.278

Table 2. Ultrasonic velocity, Density, viscosity, Adiabatic compressibility, Intermolecular free length, Free volume, Rao's constant of different % concentration of Solution of Ethyl-4-(4-chlorophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (1b) in ethanol at 313 K.

Concentration (%)	Density (Kg ^m ⁻³)	Viscosity x10 ³ (Nsm ⁻²)	Ultrasonic Velocity (m/s)	Adiabatic compressibility x10 ⁻¹⁰ (m ² /N)	Intermolecular free length x10 ⁻¹¹ (m)	Free Volume x10 ⁻² (m ³ mol ⁻¹)	Rao's constant
0.125	876.96	2.993	1093	9.5450	6.2364	2.6511	3.651
0.25	876.56	3.022	1062	10.1150	6.4199	2.5516	3.617
0.5	876.36	3.086	1050	10.3499	6.4941	2.3198	3.605
1.0	836.56	3.136	875	15.6130	7.9761	2.1302	3.539

Table 3. Ultrasonic velocity, Density, viscosity, Adiabatic compressibility, Intermolecular free length, Free volume, Rao's constant of different % concentration of Solution of Ethyl 4-(furan-2-ylmethyl)-6-methyl-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (1c) in ethanol at 313 K.

Concentration (%)	Density (Kg ^m ⁻³)	Viscosity x10 ³ (Nsm ⁻²)	Ultrasonic Velocity (m/s)	Adiabatic compressibility x10 ⁻¹⁰ (m ² /N)	Intermolecular free length x10 ⁻¹¹ (m)	Free Volume x10 ⁻² (m ³ mol ⁻¹)	Rao's constant
0.125	812.2	3.998	1213	8.3580	5.8358	1.9874	3.68167
0.25	809.2	4.068	1197	8.6187	5.9261	1.9274	3.67872
0.5	804.2	4.128	1187	8.8191	5.9946	1.8836	3.66925
1.0	800.4	4.136	1148	9.4705	6.2121	1.8184	3.66787

Table 4. Ultrasonic velocity, Density, viscosity, Adiabatic compressibility, Intermolecular free length, Free volume, Rao's constant of different % concentration of Solution of Ethyl 4-(furan-2-ylmethyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate(1d) in ethanol at 313 K.

Concentration (%)	Density (Kg m^{-3})	Viscosity $\times 10^3$ (Nsm $^{-2}$)	Ultrasonic Velocity (m/s)	Adiabatic compressibility $\times 10^{-10}$ (m 2 /N)	Intermolecular free length $\times 10^{-11}$ (m)	Free Volume $\times 10^{-2}$ (m 3 mol $^{-1}$)	Rao's constant
0.125	850.04	4.291	1128	9.2457	6.1379	1.62275	3.23627
0.25	847	4.323	1120	9.4119	6.1928	1.60043	3.24018
0.5	846.4	4.359	1103	9.7112	6.2905	1.56203	3.22599
1.0	835.6	4.363	1092	10.0358	6.3948	1.54504	3.25679

Table 5. Ultrasonic velocity, Density, viscosity, Adiabatic compressibility, Intermolecular free length, Free volume, Rao's constant of different % concentration of Solution of Ethyl 4-(2-hydroxyphenyl)-6-methyl-2-thio-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (1e) in ethanol at 313 K.

Concentration (%)	Density (Kg m^{-3})	Viscosity $\times 10^3$ (Nsm $^{-2}$)	Ultrasonic Velocity (m/s)	Adiabatic compressibility $\times 10^{-10}$ (m 2 /N)	Intermolecular free length $\times 10^{-11}$ (m)	Free Volume $\times 10^{-2}$ (m 3 mol $^{-1}$)	Rao's constant
0.125	836.6	4.349	1182	8.5541	5.90295	1.87371	3.69509
0.25	832.2	4.345	1178	8.6475	5.93603	1.85145	3.71094
0.5	804.2	4.227	1069	10.8812	6.65871	1.72704	3.71704
1.0	800.6	4.306	1060	11.1166	6.73039	1.68108	3.72325

Table 6. Internal pressure, Acoustic Impedance, Relaxation time, Ultrasonic attenuation, Surface tension, Cohesive energy and Molar volume of Solution of Ethyl 4-(4-chlorophenyl)-6-methyl-2-thio-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (1a) at 313 K.

Concentration (%)	Internal pressure (Nm $^{-2}$)	Acoustic Impedance (Kg $^{-1}$ m 2 S $^{-1}$)	Relaxation time $\times 10^{-12}$ (S)	Ultrasonic attenuation $\times 10^{-10}$ (s 2 m $^{-1}$)	Surface tension (N/m)	Cohesive energy (KJ/Mole)	Molar volume (m 3 /mol)
0.125	58440.2	992869	3.8730	6.2083	85.004	23666.41	0.40496
0.25	63457.7	960787	4.7495	7.8296	83.241	25822.49	0.40692
0.5	64564.3	936155	5.0632	8.5400	81.867	26339.68	0.40796
1.0	66096.4	920688	5.4002	9.2611	80.980	26990.28	0.40834

Table 7. Internal pressure, Acoustic Impedance, Relaxation time, Ultrasonic attenuation, Surface tension, Cohesive energy and Molar volume of Solution of Ethyl-4-(4-chlorophenyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (1b) at 313 K.

Concentration (%)	Internal pressure (Nm ⁻²)	Acoustic Impedance (Kg ⁻¹ m ² S ⁻¹)	Relaxation time x10 ⁻¹² (S)	Ultrasonic attenuation x10 ⁻¹⁰ (s ² m ⁻¹)	Surface tension (N/m)	Cohesive energy (KJ/Mole)	Molar volume (m ³ /mol)
0.0125	63815.2	958517	3.8091	6.877	81.5121	22619.5	0.35445
0.025	65033.0	930906	4.0530	7.567	79.9473	23061.7	0.34461
0.05	66050.3	920178	4.2545	7.990	79.3359	23427.5	0.35469
0.1	70720.8	731990	6.5283	14.71	68.8194	26277.83	0.37157

Table 8. Internal pressure, Acoustic Impedance, Relaxation time, Ultrasonic attenuation, Surface tension, Cohesive energy and Molar volume of Solution of Ethyl 4-(furan-2-ylmethyl)-6-methyl-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate(1c) at 313 K.

Concentration (%)	Internal pressure (Nm ⁻²)	Acoustic Impedance (Kg ⁻¹ m ² S ⁻¹)	Relaxation time x10 ⁻¹² (S)	Ultrasonic attenuation x10 ⁻¹⁰ (s ² m ⁻¹)	Surface tension (N/m)	Cohesive energy (KJ/Mole)	Molar volume (m ³ /mol)
0.125	75020.6	985778	4.45539	7.23866	84.4784	25893.30	0.34514
0.25	75999.7	968958	4.67482	7.69847	83.5834	26328.48	0.34642
0.5	76562.8	954929	4.85406	8.06086	82.8887	26688.64	0.34858
1.0	77676.8	919316	5.22271	8.96646	80.9000	27205.35	0.35023

Table 9. Internal pressure, Acoustic Impedance, Relaxation time, Ultrasonic attenuation, Surface tension, Cohesive energy and Molar volume of Solution of Ethyl 4-(furan-2-ylmethyl)-6-methyl-2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate(1d) at 313 K.

Concentration (%)	Internal pressure in (Nm ⁻²)	Acoustic Impedance (Kg ⁻¹ m ² S ⁻¹)	Relaxation time x10 ⁻¹² (S)	Ultrasonic attenuation x10 ⁻¹⁰ (s ² m ⁻¹)	Surface tension (N/m)	Cohesive energy (KJ/Mole)	Molar volume (m ³ /mol)
0.125	89026.38	958845	5.28980	9.2474	82.0976	27677.52	0.310891
0.25	89431.31	948640	5.42129	9.5449	81.5789	27903.20	0.312007
0.5	90480.96	933579	5.64415	9.8803	80.7259	28250.71	0.312228
1.0	89480.59	912475	5.83821	10.5435	79.7319	27086.41	0.316263

Table 10. Internal pressure, Acoustic Impedance, Relaxation time, Ultrasonic attenuation, Surface tension, Cohesive energy and Molar volume of Solution of Ethyl 4-(2-hydroxyphenyl)-6-methyl-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate(1e) at 313 K.

Concentration (%)	pressure		Relaxation time $\times 10^{-12}$ (S)	Ultrasonic attenuation $\times 10^{-10}$ (s^2m^{-1})	Surface tension (N/m)	Cohesive energy (KJ/Mole)	Molar volume (m^3/mol)
	Internal (Nm^{-2})	Acoustic Impedance ($\text{Kg}^{-1}\text{m}^2\text{S}^{-1}$)					
0.0125	76640.42	989099	4.91307	8.20000	84.11296	26478.50	0.349450
0.025	76824.33	981066	5.00980	8.37912	83.75458	26987.56	0.351289
0.05	77751.12	859689	6.13269	11.3126	77.28159	28264.78	0.363528
0.1	78571.39	848636	6.38242	9.05972	76.69414	28691.41	0.365163

The variation of Density, Viscosity, Velocity, adiabatic compressibility (β_{ad}), intermolecular free length (L_f), relaxation time (T), free volume (V_f), internal pressure (Π_i), acoustical impedance (Z), constant (W), ultrasonic attenuation

(α/f^2), Rao's constant (R), molar volume (V_m), and cohesive energy (CE) of pyrimidine derivatives at 313 K in different concentrations are shown in Figures 1 to 13.

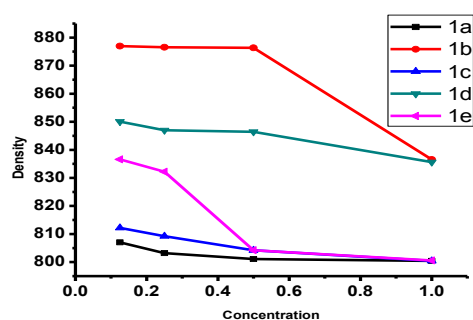


Figure 1. Variation of density with concentration.

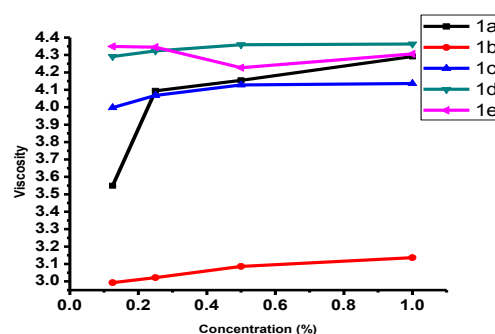


Figure 2. Variation of viscosity with concentration.

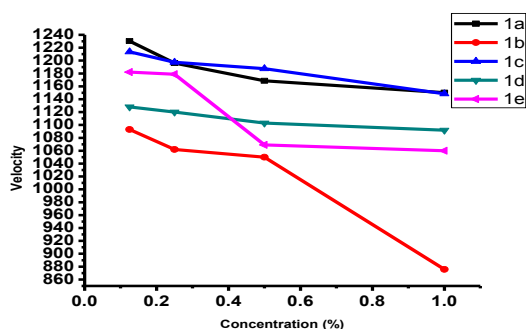


Figure 3. Variation of velocity with concentration.

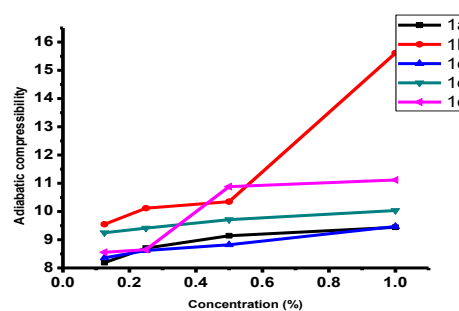


Figure 4. Variation of Adiabatic compressibility with concentration.

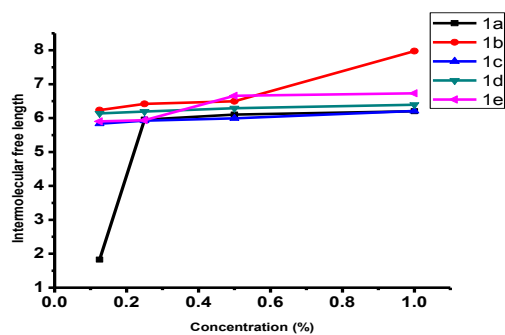


Figure 5. Variation of Intermolecular free length with concentration.

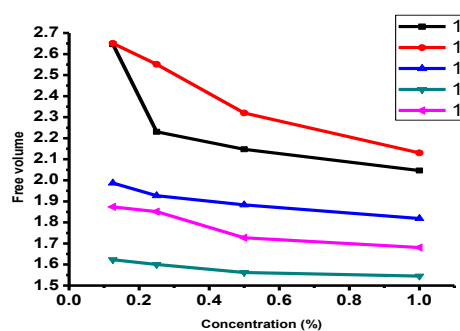


Figure 6. Variation of Free volume with concentration.

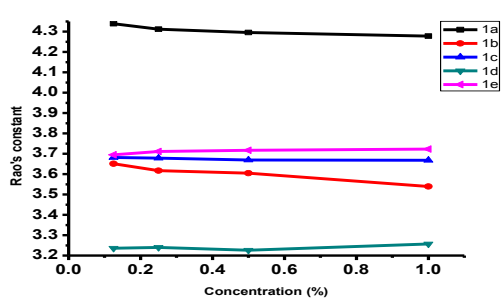


Figure 7. Variation of Rao's constant with concentration.

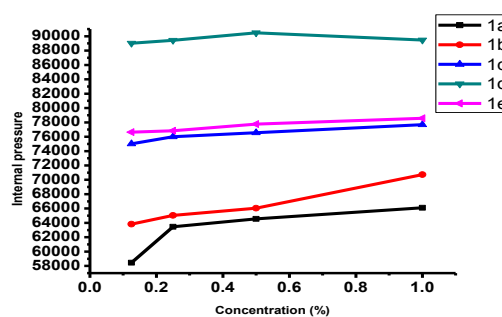


Figure 8. Variation of Internal pressure with concentration.

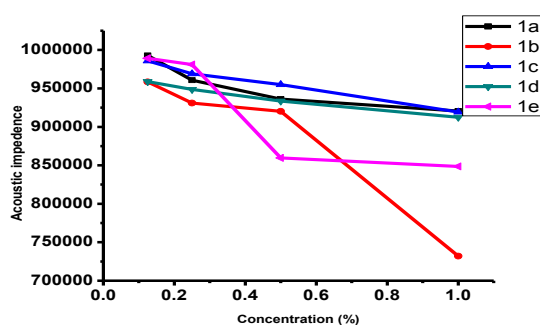


Figure 9. Variation of Acoustic impedance with concentration.

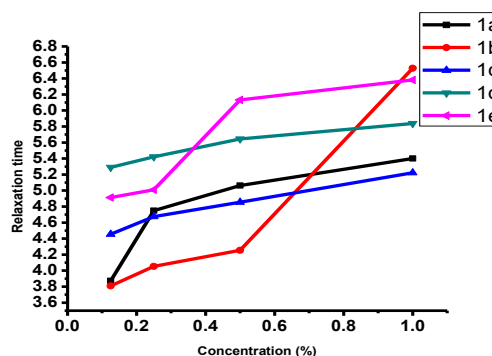


Figure 10. Variation of Relaxation time with concentration.

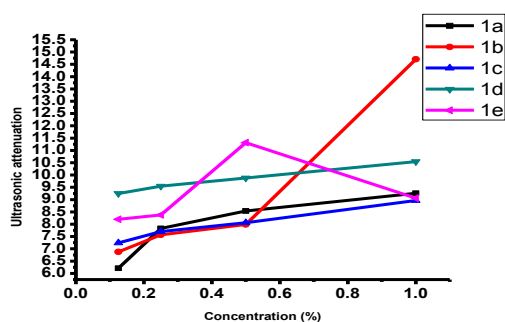


Figure 11. Variation of ultrasonic attenuation with concentration.

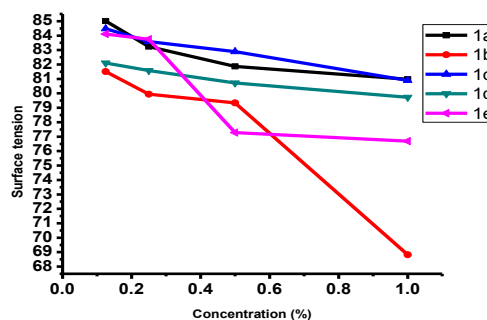


Figure 12. Variation of surface tension with concentration.

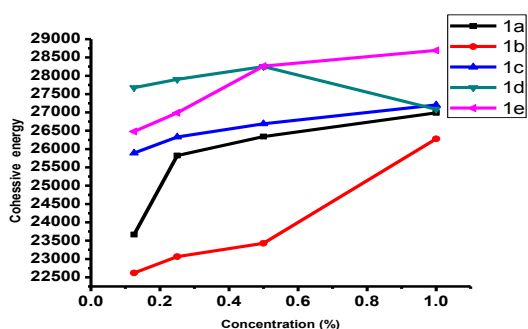


Figure 13. Variation of cohesive energy with concentration.

Ultrasonic velocity and density of the binary mixtures along with thermodynamic values such as adiabatic compressibility, free length, and impedance at different concentration were determined. Decreases in density (figure-1) with increase in concentration indicates the structure-making and breaking property of solvent due to the formation and weakening of H-bonds. Figure 2 depicts that viscosity of the liquid increases with the increase in concentration. It is observed from figure-3 that the ultrasonic velocity increases with increase in concentration, and this is probably due to solute-solvent interactions. The opposite trend of ultrasonic velocity (figure-3) and adiabatic compressibility indicates the association among interacting pyrimidine derivatives and water molecules. The adiabatic compressibility (figure-4) increases with an increase in concentration shows that there is a strong solute solvent interaction. In the present system of pyrimidine derivatives, free length (figure-5) varies nonlinearly with increase in molar concentration which suggests the significant interaction between solute and solvent due to which structural arrangement is also affected. The free volume decreases (figure-6) and internal pressure increases (figure-8) with an increase in molar concentration, indicating that there is a weak interaction between solute and solvent molecules. Rao's constant (figure-7) decrease with increasing concentration, which indicates that there is a weak interaction between solute and solvent molecules. Acoustical impedance (figure-9) shows a nonlinearly increasing variation with an increase in molar concentration. This indicates the complex formation and intermolecular weak association which may be due to hydrogen bonding. Thus complex formation can occur at these molar concentrations between the component molecules. Relaxation time increases (figure-10) with an increase

in concentration. On the other hand ultrasonic attenuation is directly proportional (as shown in fig.11) to concentration studied. It was observed that there is significant solute solvent interaction in the solutions studied. Figure-12 shows that surface tension is inversely proportional to the concentration of solution. Cohesive energy (as shown in fig.13) increases with increase in concentration.

4. CONCLUSION

In the present paper, we have reported the ultrasonic velocity (v), density (ρ) and viscosity (η) for the solutions of ethyl/methyl-4-(aryl)-6-methyl-2-oxo/thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyridimidine-5-carboxylate (1a-1e) in ethanol as a solvent in different concentrations. The results obtained in this study on ultrasonic velocity, density, viscosity and calculated acoustical parameters viz. adiabatic compressibility (β_{ad}), intermolecular free length (L_f), relaxation time (T), free volume (V_f), internal pressure (Π_i), acoustic impedance (Z), surface tension (S), attenuation (a/f^2), Rao's constant (R), molar volume (V_m), cohesive energy (CE) showed that there are presence of specific molecular interactions in ethanol and ethyl/methyl-4-(aryl)-6-methyl-2-oxo/thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyridimidine-5-carboxylate molecules, which are responsible to increase absorption and transmission. It may be concluded that the solute solvent interaction seems to be significant in system studied.

5. ACKNOWLEDGMENTS

The authors are very thankful to faculties, Department of Chemistry, Jankidevi Bajaj College of Science, Wardha for their kind support in the present research work.

6. REFERENCES AND NOTES

- [1] Tekade, P. V.; Thakkar, M. S.; Bajaj, S. D.; Mahodaya, O. A.; Patil, V. B.; (National Conference on Green Chemistry) VNIT, Nagpur, (March 22, 2013).
- [2] Cracknell, A. P. Ultrasonics. London: Wykeham Publications. Chapter 6, 92, 1980.
- [3] Curie, J.; Curie P. *Compt. Rend.* **1880**, *91*, 294.
- [4] Curie, J.; Curie, P. *Compt. Rend.* **1881**, *93*, 1137.
- [5] Gefen, Y.; Rosen, M.; Rosen A. *Mater. Sci. Eng.* **1971**, *8*, 246. [[CrossRef](#)]
- [6] Chimankar, O. P.; Rewatkar, K. G.; Tabhane, V. A. *Ind. J.*

- Phy. B* **2001**, 75B, 141.
- [7] Chandrasekhar, G.; Venkatesu, P.; Rao, M. V. P. *J. Chem. Eng. Data*, **2000**, 45, 590. [[CrossRef](#)]
- [8] Goberman, G. L. The English Universities Press Ltd. London: EC4, 1968.
- [9] Pethrick, R. A. *J. Macromol. Sci.* **1973**, 9, 91. [[CrossRef](#)]
- [10] Well, W.; Pathrick, R. A. *Polymer* **1982**, 23, 369. [[CrossRef](#)]
- [11] Woldan, M. *Zeitschrift fuer Physikalische Chemie*, **1988**, 269, 628.
- [12] Pandey, J. D.; Jain P.; Vyas, V. *Can. J. Chem.* **1994**, 72, 2486. [[CrossRef](#)]
- [13] Diao, J.; Hess, D. W. *J. Phy. Chem. B* **2005**, 109, 12800. [[CrossRef](#)]
- [14] Ramsey, K. W.; Halm, B. M. *Hawaii J. Med. Public Health.* **2014**, 73, 58.
- [15] Slyper, A. H. *J. Clini. Endocrinology Meta.* **2004**, 89, 3089. [[CrossRef](#)]
- [16] Burns, R. P.; Cofer, J. B.; Russell, W. L.; Clements, J. B. *Southern Medi. J.* **1985**, 78, 518. [[CrossRef](#)]
- [17] Ren, H.; Wang, W.; Ge, Z.; Zhang, J. *Chinese Medical J.* **2001**, 114, 387.
- [18] Toufic, N.; Ilic, B. *J. Francais d'ophtalmologie* **1981**, 4, 487.
- [19] Kaneko, S.; Nagai, N.; Matsuura, T.; Kohri, K.; Iguchi, M.; Minami, K.; Kadowaki, T.; Akiyama, T.; Yachiku, S.; Kurita, T. *Jpn. J. Urology* **1978**, 69, 572.
- [20] Zhou, M.; Yang, D. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* **2003**, 11, 763.
- [21] Ossant, F.; Lebertre, M.; Pourcelot, L.; Patat, F. *Ultrasound Med. Biol.* **2001**, 27, 157. [[CrossRef](#)]
- [22] Braginskaia, F. I.; Floid, D. *Biofizika* **1981**, 26, 542.
- [23] McClements, D. J. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1997**, 37, 1. [[CrossRef](#)]
- [24] Ayadi, M.; Caja, G.; Such, X. K.; Christopher, H. *J. Dairy Research* **2003**, 70, 1. [[CrossRef](#)]
- [25] Corredig, M.; Alexander, M.; Dalgleish, D. G. *Food Res. Int.* **2004**, 37, 557. [[CrossRef](#)]
- [26] Palmowski, L.; Simons, L.; Brooks, R. *Water Sci. Tech.* **2006**, 53, 281. [[CrossRef](#)]
- [27] Katoh, R.; Yokoi, H.; Usuba, S.; Kakudate, Y.; Fujiwara, S. *Ultrason. Sonochem.* **1998**, 5, 69. [[CrossRef](#)]
- [28] Mexiarová, M.; Kiripolský, M.; Toma, S. *Ultrason. Sonochem.* **2005**, 12, 401. [[CrossRef](#)]
- [29] Hakulinen, M. A.; Day, J. S.; Toyras, J.; Weinans, H.; Jurvelin, J. S. *Phys. Med. Biol.* **2006**, 51, 1633. [[CrossRef](#)]
- [30] Mukherjee, S.; Basu, C.; Ghosh, U. S. *J. Non-Cryst. Solids.* **1992**, 144, 159.
- [31] Kim, M. G.; Kemp, K. A.; Letcher, S. V. *J. Acoustical Soc. Am.* **1971**, 49, 706. [[CrossRef](#)]
- [32] Raman, S.; Tipnis, C. B. *Ind. J. Pure App. Phys.* **1982**, 20, 79.
- [33] Inoue, N.; Hasegawa, T.; Matsuzawa, K. *Acustica* **1991**, 74, 128.
- [34] Ayachit, N. H.; Vasani, S. T.; Sannaningannavar, F. M.; Deshpande, D. K. *J. Mol. Liq.* **2007**, 133, 134. [[CrossRef](#)]
- [35] Pancholy, M.; Singal, S. P. *J. Sci. Ind. Res.* **1962**, 21B, 70.
- [36] Sasaki, K.; Arakawa, K. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **1973**, 46, 2738. [[CrossRef](#)]
- [37] Laux, D.; Leveque, G.; Cereser, C. V. *Ultrasonics* **2009**, 49, 159. [[CrossRef](#)]
- [38] Prabakar, S.; Rajagopal, K. *J. Pure Appl. Ultrason.* **2005**, 27, 41.
- [39] Rao, R. B.; Rao, K. S. *Procee. Phys. Soc.* **1959**, 73, 239. [[CrossRef](#)]
- [40] Wankhede, D. S.; Wankhede, N. N.; Lande, M. K.; Arbad, B. R. *J. Mol. Liq.* **2008**, 138, 124. [[CrossRef](#)]

***In vitro* antioxidant and cell viability of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers)**

Thales D. P. Altoé^a, Gustavo M. de Amorim^b, João Victor D. Gomes^b, Augusto S. Borges^b, Iuri C. Valadão^b, Ian Victor Silva^c, Letícia B. De A. Rangel^b, Paulo Cezar Vieira^d, Claudia M. Jamal^b, Rodrigo R. Kitagawa^b, Warley de S. Borges^{a,*}

^aDepartment of Chemistry, Exact Sciences Center, Federal University of Espírito Santo (UFES), 29075-910, Vitória, ES, Brazil.

^bDepartment of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo (UFES), 29040-090, Vitória, ES, Brazil.

^cDepartment of Morphology, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo (UFES), 29040-090, Vitória, ES, Brazil.

^dDepartment of Chemistry, Federal University of São Carlos (UFSCar), 13565-905, São Carlos, SP, Brazil.

Article history: Received: 24 July 2014; revised: 13 November 2014; accepted: 18 November 2014. Available online: 30 December 2014.

Abstract: Many diseases are associated with oxidative stress and inflammatory processes. The current research is directed toward evaluating the antioxidant potential and phytochemistry composition of *P. venusta* leaves. In this study, *P. venusta* leaves were dried and macerated, and the crude extract was partitioned. Phytochemical analysis was performed using standard methodologies, and the total flavonoid content was measured using a calibration curve with rutin. We evaluated the antioxidant potential of *P. venusta* leaves using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2, 2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), and a Trolox-like standard. Cell viability (CV) assays were done using macrophage RAW 264.7 cell lines and compared to four commercial anti-inflammatories (acetylsalicylic acid, Indometacina, Betametasona, and Piroxicam). Phytochemical analysis revealed the presence of steroids, coumarins, and flavone. The flavonoid content was 148.5 ± 7.65 μg as a rutin equivalent/mg of crude extract. The ethyl acetate fraction showed the best antioxidant activity in the methodologies of DPPH inhibition ($\text{IC}_{50} = 38.62$ $\mu\text{g/mL}$) and ABTS radical ($\text{IC}_{50} = 28.58$ $\mu\text{g/mL}$). Samples of *P. venusta* had CV values that were better than the commercial anti-inflammatory, which showed CV values below the negative control. The crude extract and the ethyl acetate fraction, showed CV values below the negative control and the hexane fraction obtained values above the negative control, these being best results.

Keywords: *Pyrostegia venusta*; leaves; antioxidant; DPPH; ABTS; cell viability

1. INTRODUCTION

Oxygen is essential for many biological process, including the production of energy in heterotrophic organisms (Kreb's Cycle) and others involved in electron transfer [1-2]. This process results in free radicals and other compounds like reactive oxygen species (ROS). The body naturally neutralizes this species, but the imbalance between neutralization and formation can induce oxidative damage to biomolecules, known as oxidative stress [1, 3-5].

Many diseases such as cancer, diabetes mellitus, cardiovascular diseases, degenerative disorders, arthrosclerosis, and inflammatory diseases

are reported to involve this imbalance of free radicals [1, 6-8]. During an inflammatory process, an organism causes an oxidative stress for defense, known as a respiratory burst [9, 10].

The phagocytic leukocytes (macrophages, neutrophils and eosinophils), when activated by a pro-inflammatory mediator, are the most likely source of ROS. Initially, an NADPH oxidase catalyzes a large amount of superoxide radical (O_2^\bullet) production; this reactive species is used in enzymatic reactions to produce other ROS like HClO (hypochlorous acid), H_2O_2 (hydrogen peroxide), and OH^\bullet (hydroxyl radical), and these ROS kill pathogens as well as

*Corresponding author. E-mail: warley.borges@ufes.br

adjacent cells [10-12]. However, inflammation can result in serious tissue damage; to prevent this, it is necessary use anti-inflammatory and antioxidant supplements [9, 12].

Many of these synthetic supplements are very effective, but they possess certain side effects [1, 13, 14]. Antioxidants like butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT), for example, are carcinogenic [1, 13-15].

Recently, there has been increasing interest in plants used in alternative medicine for their potential antioxidant and anti-inflammatory effects [1, 3].

Pyrotegia venusta (Ker Gawl.) Miers is a member of the family Bignoniaceae, popularly known as “cipó de São João” and widely distributed in the Brazilian ecosystems of Amazonia, the Atlantic forest, and Cerrado [16, 17]. This plant is commonly used in folk medicine for the treatment of vitiligo, diarrhea, cough, flu, jaundice, infections, and inflammatory diseases of the respiratory system [18-20]. Previous investigations have shown that flower and root extracts of *P. venusta* have antioxidative, antimicrobial, and anti-inflammatory activity properties (4,7-O- β -D-rutinosil-3',5-dihydroxy-4'-methoxyflavanona) [21, 22], and the methanolic extract of roots contain allantoin (anti-oxidative and anti-inflammatory activities) [23], steroids, hesperidin (4,7-O- β -D-rutinosil-3',5-dihydroxy-4'-methoxyflavanona) (anti-oxidative), and 3- β -D-glucopyranosyl-sitosterol [1].

There are many studies on the roots and flowers of *P. Venusta* due to their extensive use in folk medicine; however, little has been studied regarding the leaves.

This paper describes the investigation of crude extract of leaves of *P. venusta*, hexane and ethyl partitions. Phytochemical analysis was used to determine the biocompound classes present, and the total flavonoid content was measured for the crude extract. The tree extract was evaluated as a source of natural antioxidants (DPPH and ABTS tests) and using a RAW 246-7 (macrophages murines cell) in vitro to verify the safety of its use (immunotoxicology).

2. MATERIAL AND METHODS

Plant material

The leaves of *Pyrostegia venusta* were collected from Altinópolis-SP (Brazil), August 2012, and authenticated through the herbarium VIES of Federal

University of Espírito Santo (UFES), Vitória, Brazil.

Extraction and fractionation

The *P. venusta* leaves were dried at a temperature below 40 °C for 7 days and powdered. The *P. venusta* crude extract was obtained by maceration in ethanol (96% (v/v)) for 24 h, and this procedure was repeated twice with ethanol and three times with ethyl acetate. The extracts (ethyl acetate and ethanol) were mixed and concentrated on a rotary evaporator generating the crude extract (yield 6.9% (w/w)). Part of the crude extract was reserved.

The concentrated extract was mixed with methanol: water (3:1) (v/v) and partitioned three times with hexane, the residual methanol: water layer was partitioned three times with ethyl acetate. The hexane and ethyl acetate layers were evaporated on a rotary evaporator under reduced pressure to produce the hexane and ethyl acetate extracts.

Phytochemical analysis

The presence of phytochemical compounds like alkaloids, steroids, terpenoids, tannins, saponins, coumarins, flavonoids, and naphthoquinones was qualitatively evaluated. The extracts were subjected to pharmacognostics classical tests to detect the classes of metabolites present [36, 37].

We prepared EtOH and CHCl₃ solutions of the extracts for the tests.

Alkaloids

1 mL of EtOH solution of the extracts was mixed with 1 mL of HCl (p.a.) and treated with a few drops of Dragendorff's reagent. Orange precipitation indicated the presence of alkaloids.

Steroids and triterpenes

1 mL of chloroform solution of the extracts was mixed with 2 mL of Acetic anhydride and treated with a 3 drops of H₂SO₄ (p.a.). The change in color from blue or green indicates the presence of steroids, and the change from reddish-brown indicates the presence of triterpenes.

Tannins

The gelatine test was used to check the presence of tannins. 2 mL of the EtOH solution of the extracts was mixed with 5 mL of gelatine (2.5% (w/v)) and sodium chloride (10% (w/v)) solution. A precipitate

indicated the presence of tannins.

Saponins

The presence of saponins was evaluated by the frothing test. 20 mL of EtOH solution of the extracts was mixed with 15 mL of distilled water and one mL of saturated solution of sodium carbonate and was boiled. 2 mL of the boiled mixture was filtrate taken aside a graduated cylinder; 98 mL of distilled water was added and shaken vigorously. The formation of stable and persistent froth indicated the presence of saponins.

Coumarins

In a filter paper, 1 drop of each EtOH solution of extract and after dried, the blots was observed in a UV chamber, in sequence, was added upon the blots, KOH (10% (w/v)) and was observed in the UV chamber again. The fluorescence indicates the presence of coumarins.

Naphthoquinones

1 mL of CHCl_3 solution of the extracts was mixed with 2 mL of NH_4OH (10% (v/v)) and shaken vigorously. The presence of a red halo in the water layer indicates the presence of naphthoquinones.

Flavonoids

Cyaniding reaction (Shinoda test): 1 mL of EtOH solution of the extracts was mixed with 1 mL of HCl (p.a.) and added to Mg powder. A change in color varying from brown until red indicates presence of flavonoids.

Estimation of the total flavonoid content in the crude extract

The flavonoid quantitative analysis of *P. venusta* was done using the rutin equivalent. The method was based on a calibration curve using rutin and the formation of a flavonoid-aluminium complex [34].

Calibration curve: a 0.5 mg/mL of methanolic solution of rutin was placed in 5 aliquots (0.25, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 mL), methanol was added to each one until a volume of 2 mL was reached; then, 0.6 mL of acetic acid (p.a.), 10 mL of pyridine: water (2:8) (v/v) solution, and 2.5 mL of AlCl_3 methanolic solution (6.5% (w/v)) were added sequentially. Water was then added until reaching a volume of 25 mL. The negative control was made using 2 mL and the other reagents. After incubation at room temperature for 30 min, the

samples' absorbance was measured at 430 nm.

Sample: a 0.5 mg/mL methanolic solution of the extracts was placed in an aliquot of 1 mL and was prepared and measured in the same manner described for the calibration curve procedure.

Antioxidant activity of the extracts

DPPH radical scavenging activity

The free radical scavenging effects of the extracts on DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (SIGMA cod D9132) radicals was determined using method of Rufino *et al.* [38]. Each extract was dissolved in EtOH, and serial dilution (300, 150, 75, 37.5, 18.75, and 9.375 $\mu\text{g/mL}$, 4 mL for each one) was prepared. Then, 1 mL of each concentration was mixed with 2 mL of 0.004% (w/v) DPPH EtOH solution (final concentration 100, 50, 25, 12.5, 6.25, and 3.125 $\mu\text{g/mL}$), and the negative control was made by mixing 1 mL of each concentration with 2 mL of EtOH. The control was prepared using 1 mL of EtOH and 2 mL of 0.004% (w/v) DPPH EtOH solution. Trolox (SIGMA cod 238813) was used as an antioxidant standard. The samples were allowed to incubate for 30 min in the dark at room temperature, and the absorbance (Abs) was measured in 517 nm. The percentage inhibition is calculated by the following equation:

$$\% \text{ inhibition} = \left[\frac{(\text{Abs}_{\text{Cont.}} - \text{Abs}_{\text{Samp.}}) - \text{Abs}_{\text{Neg.}}}{\text{Abs}_{\text{Cont.}} - \text{Abs}_{\text{Neg.}}} \right] * 100$$

IC_{50} values were calculated from the linear or logarithmic regression of inhibition data.

ABTS radical scavenging activity

The free radical scavenging effects of the extracts on ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (SIGMA codA1888) radicals was determined using the method of Rufino *et al.* [39]. Each extract was dissolved in EtOH and serial dilution (300, 150, 75, 37.5, 18.75, and 9.375 $\mu\text{g/mL}$) was prepared. The ABTS solution radical cation was regenerated by mixing 7 mM of ABTS stock solution with 140 mM of potassium persulfate and incubated for 16 h in the dark at room temperature until the reaction was complete. The absorbance of the ABTS solution radicals was equilibrated to 0.70 (70%) by dilution in EtOH.

Then, 30 μL of each concentration of extract solution was mixed with 1 mL of ABTS radical solution (final concentration 100, 50, 25, 12.5, 6.25, and 3.125 $\mu\text{g/mL}$) and the negative control was made

by mixing 30 μL of each concentration with 1 mL of EtOH. The control was prepared using 30 μL mL of EtOH and 1 mL of ABTS radical solution. Trolox was used as an antioxidant standard. The absorbance (Abs) was measured in 734 nm. The percentage inhibition is calculated by the equation:

$$\% \text{inhibition} = \left[\frac{(Abs_{Cont.} - Abs_{Samp.}) - Abs_{Neg.}}{Abs_{Cont.} - Abs_{Neg.}} \right] * 100$$

IC₅₀ values were calculated from the linear or logarithmic regression of inhibition data.

Immunotoxicology

Cell culture

The RAW 264.7 murine macrophage cell line was obtained from Cell Bank of Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brazil). These cells were grown at 37 °C in DMEM medium supplemented with 10% FBS, penicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and streptomycin sulfate (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in a humidified atmosphere of 5% CO₂ [40].

MTT assay for cell viability

RAW 264.7 cells were mechanically scraped and plated at 2x10⁵ cells/well. The well plates containing 100 μL of DMEM were supplemented and

incubated for 2 h [41]. The extracts were dissolved in DMSO (10000, 7500, 5000, and 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [40]. After 2 h of incubation, the medium was discarded, 90 μL of DMEM supplemented was added to all well plates, the test material was added (10 μL of each concentration), the same volume of DMSO was added to the negative control, the same volume of commercial anti-inflammatory solutions was added (positive controls), and the plates were incubated for 24 h; for the control, just DMEM supplemented was added (100 μL). After being stored overnight, the medium was discarded and 15 μL of MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and 5 mg/mL of phosphate buffered saline (PBS) solution was added and incubated for 4 h at 37 °C. Then, the medium was discarded and the formazan blue that formed in the cells was dissolved in 100 μL of DMSO. The optical density was measured at 540 nm [41].

3. RESULTS AND DISCUSSION

Phytochemical analysis

The screening of *P. venusta* extracts revealed the presence of steroids, coumarins, and flavonoids. (Table 1).

Table 1. Phytochemical screening of *P. venusta* leaves.

Test	Crude	Hexane	EtOAc
1. Alkaloids			
Dragendorff's test	(-)	(-)	(-)
2. Steroids and triterpenes	(+) steroids(green color)	(-)	(+) steroids(green color)
3. Tannins			
Gelatin test	(-)	(-)	(-)
4. Saponins			
trothing test	(-)	(-)	(-)
5. Coumarins	(+) Blue	(-)	(+) yellow/greenish
6. Naphthoquinones	(-)	(-)	(-)
7. Flavonoids	(+)	(-)	(+)

(+) presence, (-) absence.

Table 1 shows that the phytochemical profile of the crude extract and the ethyl acetate fraction are very similar: both contain steroids, flavonoids, and coumarins, while the hexane fraction had no detectable amount of any of the classes of compounds discussed. A comparison of these results with the flowers and roots of *P. venusta* done by Roy *et al.* [1] in which the presence of terpenoids, alkaloids, tannins, steroids, and saponins was verified, showed several differences against the present work, like the presence of

coumarins; these compounds have been reported in the literature as anticlotting, hypotensive, antimicrobial, anti-inflammatory, and antitumor activities [1, 24]. The antimicrobial activities of *P. venusta* leaves describe by Fernandes *et al.* were consistent with the presence of coumarins [25].

Steroids are partly responsible for anti-diarrheal activity [26, 27], and their presence in the leaves, as

well as in the flowers and roots, may justify their use in folk medicine for the treatment of diarrhea [19].

The antioxidant activity of *P. venusta* described in the works of Roy *et al.* [1], Veloso *et al.* [22], and Roy *et al.* [21] can be correlated with the presence of flavone (a polyphenol) in the phytochemical analysis and the presence of rutin in the leaves described by Blatt *et al.* [28].

Antioxidant activity of extracts

A substance shows antioxidant activity when it significantly delays or inhibits the oxidation process.

The rate of inhibition of an oxidative process can be measured by an oxidative process in the presence of an antioxidant. Antioxidants' efficiency is associated with their ability to scavenge free radicals [29, 30].

DPPH radical scavenging activity

DPPH is a very stable organic nitrogen radical with ultraviolet-visible absorption (515–520 nm). If an active antioxidant compound is present, these radicals are inhibited and the absorbance of a sample decays.

The results at various concentrations of *P. venusta* extracts are shown in Figure 2.

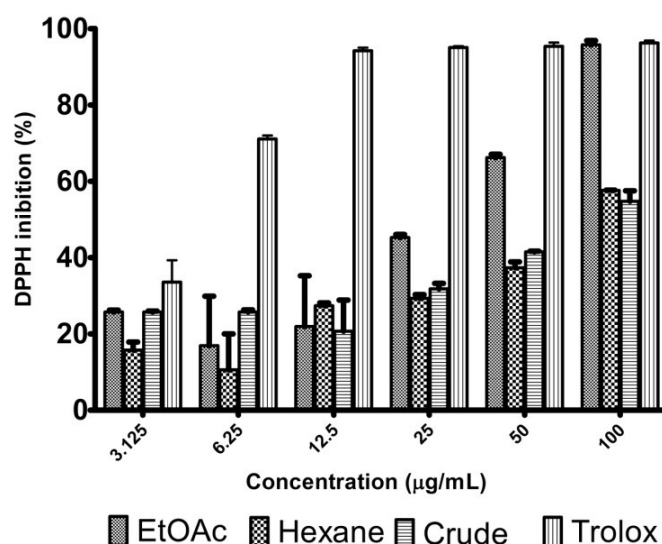


Figure 2. DPPH inhibition (%) ± standard deviation, for *P. venusta* extracts.

IC₅₀ values (concentrations of samples required for 50% inhibition) were calculated by linear regression for the extracts: 38.62 µg/mL for the ethyl acetate fraction, 79.72 µg/mL for the hexane fraction, and 83.04 µg/mL for the crude extract. The IC₅₀ value of Trolox was calculated by logarithmic regression, to provide higher linearity than the linear regression, resulting in a value of 2.55 µg/mL.

When comparing the activity of extracts to each other, the striking predominance of antioxidant activity by the ethyl acetate, in the three highest concentrations, is clear over the crude and hexane extracts. The antioxidant activity is linked to the presence of phenolic compounds such as flavonoids and coumarins. The results of phytochemical tests showed that these compounds (flavonoids and coumarins) are only present in the crude extract and ethyl acetate fraction, possibly being concentrated in this fraction by

the fractionation process, which explains the higher values of DPPH inhibition to this fraction (ethyl acetate).

ABTS radical scavenging activity

The ABTS radical is a blue chromophore (absorbance measured in 734 nm); if an active antioxidant compound is present, these radicals are inhibited and the absorbance of a sample decays. The results are shown in Figure 3.

Because of the complexity of plant extracts, the antioxidant activity should be evaluated by more than one method [31]. In this case, the mechanism used to evaluate antioxidant activity in the ABTS radical test was the same as that used for the DPPH test, but the ABTS method is better when applied to a variety of plant foods containing high-pigmented antioxidant compounds (hydrophilic or lipophilic). As extracts of

P. venusta have marked pigmentation, this second method was used to confirm and determine the

reliability of the results obtained in the DPPH test [3, 32, 33].

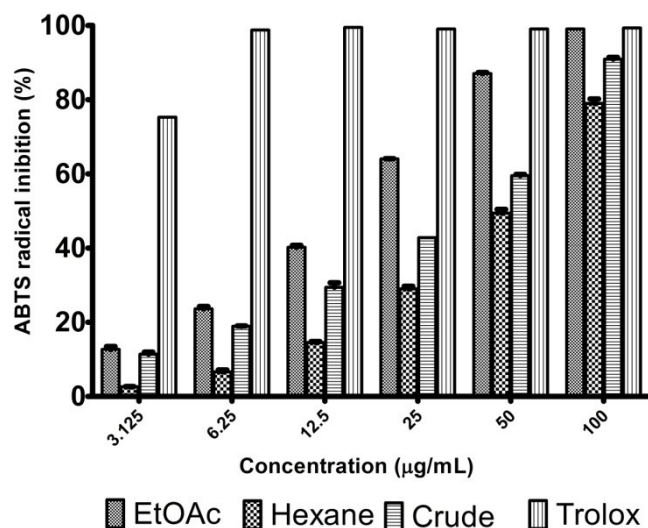


Figure 3. ABTS inhibition (%) \pm standard deviation, for *P. venusta* extracts.

As expected, acetate extract had the best results, in all tested concentrations. IC_{50} values were calculated by linear regression for the extracts: 27.58 $\mu\text{g/mL}$ for the ethyl acetate fraction, 58.09 $\mu\text{g/mL}$ for the hexane fraction and 42.86 $\mu\text{g/mL}$ for the crude extract. The IC_{50} value of Trolox was calculated by logarithmic regression, to provide higher linearity than the linear regression, resulting in a value of 0.59 $\mu\text{g/mL}$.

These results confirm that *P. venusta* is considered a natural source of antioxidants.

Estimation of the total flavonoid content in the crude extract

Phytochemical analysis confirmed the presence of flavonoids in the crude extract, which are known to be antioxidants; the amount of these could justify, or not, this biological activity. Thus, an experiment to quantify these compounds was carried out.

The flavonoid content was calculated using a calibration curve of rutin (Figure 4) ($r^2 = 0.999$) and found to be $148.5 \pm 7.65 \mu\text{g/mg}$ of extract as the rutin equivalent [34].

In relation to the mass of dried leaves obtained in a proportion of $1.02 \pm 0.05\%$ (w/w) equivalent of rutin, a low value, confirming that described by Blatt, Salantino and Santos [28], and Santos and Blatt [35], who indicated that the leaves of *P. venusta* had low

levels of flavonoids. However, the content of the rutin equivalent relative to the mass of extract $148.5 \pm 7.65 \text{ mg/mg}$ (14.85% (w/w)) showed that the steeping process was effective in extracting and concentrating these compounds, showing that flavonoids may be responsible for the observed antioxidant activity.

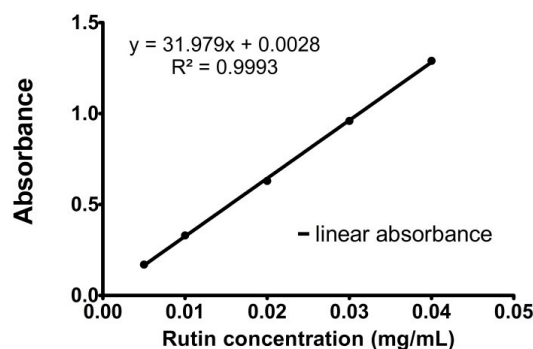


Figure 4. Rutin calibration curve. The absorbance (430nm) was plotted against the rutin concentration.

MTT assay for cell viability (Immunotoxicology)

The effect of the extracts from *P. venusta* on RAW264.7 in cell viability (CV) was determined by the formation of formazan blue. As a preliminary study, the results were compared with four commercial anti-inflammatories (acetylsalicylic acid, Indometacina, Betametasona, and Piroxicam). The results are shown in Figure 5.

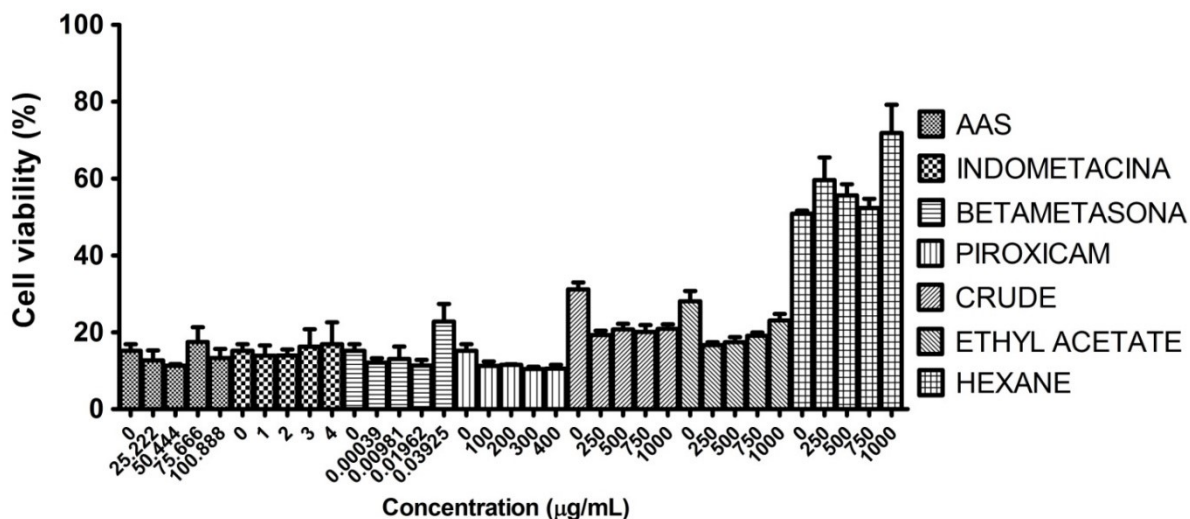


Figure 5. % of Cell viability for commercial anti-inflammatories and *P. venusta* extracts.

The crude extract and the ethyl acetate fraction reached lower values of solvent viability (negative control, 0 mg / mL), demonstrating that these have a toxic effect on cells. However, the hexane fraction had positive values of cell viability over the respective negative controls.

When analyzing the results of the commercial anti-inflammatory, it is observed that all CV, in at least one of the tested concentrations, resulted in negative values of CV, below the negative control. As occurred for the crude extract and ethyl acetate fraction, this

4. CONCLUSION

The phytochemical analysis revealed the presence of steroids, flavonoids, and coumarins in the *P. venusta* leaf extract. The total flavonoid content of crude extract was $148.5 \pm 7.65 \mu\text{g}/\text{mg}$ (14.85 % (w/v)) in rutin equivalents.

When analyzing the results of the commercial anti-inflammatory, it is observed that all CV, in at least one of the tested concentrations, resulted in negative values of cell viability, below the negative control. As occurred for the crude extract and ethyl acetate fraction, this indicates that they also have a certain degree of toxicity to macrophages.

Although only the results of the hexane fraction can be considered good in terms of cell viability, a subsequent study of inflammation (such as model-stimulated macrophages) should certainly include the crude extract and the ethyl acetate fraction, as the anti-inflammatory also presented immunotoxicity, which is

indicates that they also have a certain degree of toxicity to macrophages.

Although only the results of the hexane fraction can be considered good in terms of cell viability, a subsequent study of inflammation (such as model stimulated macrophages) should certainly include the crude extract and the ethyl acetate fraction, since the anti-inflammatory also presented immunotoxicity, which is not an exclusion criterion in further studies using these samples.

not then an exclusion criterion in further studies using these samples.

The results of antioxidant activity tests confirm that *P. venusta* can be considered a natural source of antioxidants, and in both approaches the ethyl acetate fraction showed the highest antioxidant potential.

5. ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq - 563286/2010-5), the “Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo” (FAPES), the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES), the “Programa de Pós-Graduação em Química - UFES” (PPGQUI-UFES), the “Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UFES (PPGCFAR-UFES), and Criobanco (Santa Rita Hospital).

6. REFERENCE AND NOTES

- [1] Roy, P.; Amdekar, S.; Kumar, A.; Singh, V. *BMC Compl. Altern. Med.* **2011**, *11*, 69. [[CrossRef](#)]
- [2] Alves, C.; David, J.; David, J. P.; Bahia, M.; Aguiar, R. *Quim. Nova.* **2010**, *33*, 2202. [[CrossRef](#)]
- [3] Hazra, B.; Biswas, S.; Mandal, N. *BMC Complement. Altern. Med.* **2008**, *8*, 63. [[CrossRef](#)]
- [4] Feki, H.; Koubaa, I.; Damak, M. *Mediterr. J. Chem.* **2014**, *2*, 639. [[CrossRef](#)]
- [5] Perez-Jimenez, J.; Saura-Calixto, F. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *53*, 5036. [[CrossRef](#)]
- [6] Di Matteo, V.; Esposito, E. *Curr. Drug Targets: CNS Neurol. Disord.* **2013**, *2*, 95. [[CrossRef](#)]
- [7] Geber, M.; Boutron-Ruault, M. C.; Hercberg, S.; Riboli, E.; Scalbert, A.; Siess, M. H. *Bull. Cancer* **2002**, *89*, 293. [[Link](#)]
- [8] Serafini, M.; Bellocchio, R.; Wolk, A.; Ekstrom, A. M. *Gastroenterol.* **2002**, *123*, 985. [[CrossRef](#)]
- [9] Bogliolo, L. *Bogliolo patologia*, 7ªEd. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- [10] Bonacorsi, C.; Raddi, M. S. G.; Fonseca, L. M.; Sannomiya, M.; Vilegas, W. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 133. [[CrossRef](#)]
- [11] Mandal, P.; Misra, T. K.; Ghosal, M. *Int. J. Integr. Biol.* **2009**, *7*, 80.
- [12] Conner, E. M.; Grisham, M. B. *Nutrition* **1996**, *12*, 274. [[CrossRef](#)]
- [13] Gülçin, I.; Bursa, E.; Şehitoğlu, M. H.; Bilsel, M.; Gören, A. C. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 2227. [[CrossRef](#)]
- [14] Gülçin, I.; Topal, F.; Çakmakçı, R.; Bilsel, M.; Gören, A. C.; Erdogan, U. *J. Food Sci.* **2011**, *76*, 585. [[CrossRef](#)]
- [15] Pal, R.; Girhepunje, K.; Shrivastav, N.; Hussain, M. M.; Thirumoorthy, N. *Ann. Biol. Res.* **2011**, *2*, 127. [[Link](#)]
- [16] Olmstead, R. G.; Zjhra, M. L.; Lohmann, L. G.; Grose, S. O.; Eckert, A. *J. Am. J. Bot.* **2009**, *96*, 1731. [[CrossRef](#)]
- [17] Lomann, L. G. *Am. J. Bot.* **2006**, *93*, 304. [[CrossRef](#)]
- [18] Veloso, C. C.; Cabral, L. D. M.; Bitencourt, A. D.; Franqui, L. S.; Santa-Cecilia, F. V.; Dias, D. F.; Soncini, R.; Vilela, F. C.; Giusti-Paiva, A. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2012**, *22*, 162. [[CrossRef](#)]
- [19] Ferreira, D. T.; Alvares, P. S.; Houghton, P. J.; Braz-Filho, R. *Quim. Nova* **2000**, *23*, 42. [[CrossRef](#)]
- [20] Scalon, S. P.; Vieira, M.C.; Lima, A. A.; Souza, C. M.; Mussury, R. M. *Rev. Bras. Plant. Med.* **2008**, *10*, 37. [[Link](#)]
- [21] Roy, P.; Amdekar, S.; Kumarb, A.; Singhc, R.; Sharmad, P.; Singh, V. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *140*, 186. [[CrossRef](#)]
- [22] Veloso, C. C.; Bitencourt, A. D.; Cabral, L. D. M.; Franquia, L.S.; Dias, D. F.; Santos, M. H.; Soncinia, R.; Giusti-Paiva, A. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *132*, 355. [[CrossRef](#)]
- [23] Ahn, Y. J.; Parka, S.J.; Wooa, H.; Leea, H. E.; Kimb, H. J.; Kwona, G.; Gao, Q.; Janga, D. S.; Ryua, J. H. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *64*, 210. [[CrossRef](#)]
- [24] Leal, L. K. A. M.; Ferreira, A. A. G.; Bezerra, G.A.; Matos, F. J. A.; Viana, G. S. B. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *70*, 151. [[CrossRef](#)]
- [25] Fernandes, A.P.; Ribeiro, G. E.; Rufino, L. R. A.; Silva, L. M.; Boriollo, M. F. G.; Oliveira, N. M. S.; Fiorini, J. E. *Rev. AMMG.* **2011**, *21*, 267.
- [26] Choudhury, S.; Datta, S.; Talukdar, A. D.; Choudhury, M. D. *Biological and Environmental Sciences* **2011**, *7*, 145.
- [27] Jeeva, S.; Joselin, J.; Brintha, T. S. S.; Florence, A. R. *J. Chem. Pharma. Res.* **2013**, *5*, 106. [[Link](#)]
- [28] Blatt, C. T. T.; Santos, M. D.; Salatino, A. *Plant Syst. Evol.* **1998**, *210*, 289. [[CrossRef](#)]
- [29] Harborne, J. B. *Phytochemistry* **1967**, *6*, 1643. [[CrossRef](#)]
- [30] Hendra, R.; Ahmad, S.; Oskoueian, E.; Sukari, A.; Shukor, M. Y. *BMC Complement. Altern. Med.* **2011**, *11*, 110. [[CrossRef](#)]
- [31] Choi, C. W.; Kim, S. C.; Hwang, S. S.; Choi, B. K.; Ahn, H. J.; Lee, M. Y.; Park, S. H.; Kim, S. K. *Plant Sci.* **2002**, *163*, 1161. [[CrossRef](#)]
- [32] Diouf, P. N.; Stevanovic, T.; Cloutier, A. *Food Chem.* **2009**, *113*, 897. [[CrossRef](#)]
- [33] Teow, C. C.; Truong, V. D.; McFeeter, R. F.; Thompson, R. L.; Pecota, K. V.; Yench, G. C. *Food Chem.* **2007**, *103*, 829. [[CrossRef](#)]
- [34] Marques, G. S.; Monteiro, R. P. M.; Leão, W. F.; Lyra, M. A. M.; Peixoto, M. S.; Neto-Rolim, P. J.; Xavier, H. S.; Soares, L. A. L. *Quim. Nova* **2012**, *35*, 517. [[CrossRef](#)]
- [35] Santos, M. D.; Blatt, C. T. T. *Rev. Bras. Bot.* **1998**, *21*, 135. [[CrossRef](#)]
- [36] Costa, A. F. *Farmacognosia*. Lisboa: Fundação Calouste Grilbenkian, 1986.
- [37] Wagner, H. M.; Bladt, S.; Zgainki, E. M. *Plant drug analysis*. Berlin: Springer, 1984.
- [38] Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Morais, S. M.; Sampaio, C. G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. D. *Comunicado Técnico 127, EMBRAPA*, 2007. [[Link](#)]
- [39] Rufino, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Morais, S. M.; Sampaio, C. G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. D. *Comunicado Técnico 128, EMBRAPA*, 2007. [[Link](#)]
- [40] Syahida, A.; Israf, D. A.; Permana, D.; Lajs, N. H.; Irah, A. K.; Afiza, A. W.; Khaizur, I. T.; Somchit, M. N.; Sulaiman, M. R.; Nasaruddin, A. A. *Immunol. Cell Biol.* **2006**, *84*, 250. [[CrossRef](#)]
- [41] Kim, I. T.; Park, H. J.; Nam, J. H.; Park, Y. I.; Won, J. H.; Choi, J.; Choe, B. K.; Lee, K. T. *J. Pharm. Pharmacol.* **2005**, *57*, 607. [[CrossRef](#)]

Adsorption Kinetics of Cd(II) and Pb(II) Ions from Aqueous Solutions by Bamboo-Based Activated Charcoal and Bamboo Dust

Odoemelam A. Stevens^a, Onwu K. Francis^{a*}, Sonde C. Uchechukwu^b, and Mgbeahuruike A. Chinedu^b

^aDepartment of Chemistry, Michael Okpara University of Agriculture, Umudike, P.M.B 7267, Umuahia, Abia State, Nigeria.

^bDepartment of Chemistry/Biochemistry/Molecular Biology, Federal University, Udufu-Alike Ikwo, P.M.B 1010 Abakaliki, Ebonyi State, Nigeria.

Article history: Received: 04 August 2014; revised: 22 September 2014; accepted: 25 September 2014. Available online: 30 December 2014.

Abstract: The use of bamboo dust (BD) and bamboo-based activated charcoal for adsorption of Pb(II) and Cd(II) ions from aqueous solutions were assessed in this work. The effect of contact time on the uptake of these metal ions was studied in batch process. The adsorption data were correlated with pseudo first-order, pseudo second-order and diffusivity kinetic models. Results show that pseudo second-order kinetic model gave the best description for the adsorption process. Kinetic studies further showed that the adsorption transport mechanism was particle-diffusion controlled for the adsorption process. Results obtained generally showed that lead(II) ions were better adsorbed onto both adsorbents as compared to cadmium(II). Comparison of sorption capacity for the two adsorbents shows that bamboo-based activated charcoal exhibited better removal for the metal ions than the bamboo dust.

Keywords: adsorption; activated charcoal; bamboo dust; kinetic models; metal ions

1. INTRODUCTION

The study of harmful effects on our environment by pollutants has gained proper intensity for the past few decades. The proliferation of industries has further increased the drive towards seeking for cheaper and more effective technique for treatment of these pollutants from wastewater. These wastewaters are produced in large volumes containing varying proportions of heavy metal ions and must therefore be properly treated before discharge. Most of these heavy metal ions are toxic to plants and other living organisms and apart from their toxic nature, they are also non-biodegradable and are persistent in the environment. Heavy metals such as arsenic, nickel, cadmium, chromium, lead, copper and mercury have been ranked so high as having serious toxic effects on humans [1]. Among these toxic metal ions, lead, cadmium and mercury have been exclusively ranked as the “big three” due to their great impact on the environment [2]. Lead and cadmium have also been classified as potent neurotoxic metals [3]. Kawarada *et al.* [4] had stated that concentrations of 0.005 mg L⁻¹

(for Pb²⁺ and Cr³⁺), 0.001 mg L⁻¹ (for Cd²⁺, Ni²⁺, As⁵⁺) and 0.1 mg L⁻¹ (for Cu²⁺), would cause illness in humans and can even be fatal. There is therefore an urgent need to treat these metal ions to protect public health. Adsorption, which is a well-known equilibrium separation process, is considered as a very effective, efficient and economical process for metal ion removal from wastewater and for analytical separation purposes. This usually involves the transfer of substances from a mobile phase usually of liquid or gaseous nature to a solid phase and is considered a universal phenomenon among the mobility of substances in aqueous porous media and aquatic environments. A number of materials have been employed as adsorbents for the removal of metal ions from aqueous solutions and wastewater. These adsorbents may be grouped under mineral, organic or biological origin and some examples include: Activated carbons [5-9], zeolites [10-12], biosorbents [13-20], polymeric materials [21-23] and other materials such as chitosan [24] and Schiff base-containing immobilized silica gel [25, 26].

Recently, numerous approaches have been

*Corresponding author. E-mail: frank4kalu2007@yahoo.com

studied for the development of cheaper, efficient and effective eco-friendly adsorbents for decontamination of wastewaters. The use of biosorbents has been investigated for the past few decades as a good replacement for conventional adsorbents for treating pollutants from aqueous solutions and wastewater because of their low cost and abundance in nature. This paper investigates the potential of an agricultural waste, bamboo dust and its carbonized activated component in scavenging metal ions from aqueous solutions. The interest in the use of these adsorbents has been stimulated by the results that have been obtained [27, 28]. Bamboo is renewable and grows continuously in abundance in the tropics and temperate regions within latitude of 40°S and 40°N, from jungle to high mountainsides [28], of which Nigeria falls within the above-described location and this explains why there is an abundance of bamboo in the country. Activated charcoal (also known as activated carbon or activated coal) is a form of carbon that has been processed to make it extremely porous and thus have a large surface area for sorption or other chemical applications. Fu *et al.* [29] had observed that 1 g of bamboo charcoal has approximately 400 m² surface area, which is indicative of high adsorptive capacity for bamboo waste in scavenging metal ions from aqueous solutions and for possible wastewater treatment. In our present study, the effect of particle size and contact times were studied and evaluation of adsorption rate and mechanism of adsorption of these metal ions by the two adsorbents were carried out by monitoring the percentage removal of these ions against the different contact times and by employing different adsorption kinetic models.

2. MATERIALS AND METHODS

The source of the adsorbents, which is a bamboo tree, was acquired from a building site at Umudike near the Michael Okpara University of Agriculture in Abia State. The waste bamboo materials were cut into small pieces, washed for several times to remove external waste particles and then dried under the sun. It was divided into two parts; one part was grinded to produce bamboo dust while the second part was carbonized.

Preparation of Activated Bamboo Dust

The bamboo dust (BD) was produced by crushing the waste bamboo material into small particle

sizes using a manual blender and then performing sieve analysis using the sieve screen to obtain five sample sizes of 0.3, 0.5, 0.6, 1.0 and 2.0 mm. Thereafter, 40 g of each of these sample sizes were soaked in excess of 0.5 M HNO₃ solution for 24 h at a temperature of 30 °C. It was then filtered through a filter paper and rinsed copiously with deionized water until a pH 7 was obtained. The adsorbent was finally dried in the oven at 105 °C for 6 h. The essence of treatment of the adsorbent with 0.5 M HNO₃ solution was to remove any debris or soluble biomolecules that might interact with the metal ions during the adsorption process and to open-up the micropores of the adsorbent in readiness for the adsorption process. This is referred to as the chemical activation of the bamboo dust.

Carbonization and Activation of the waste bamboo

The bamboo-based activated charcoal (BBAC) was first carbonized by heating the bamboo waste to a temperature of 200 °C for 2 h in a Gallenkamp muffle furnace and after which the charred product was allowed to cool to room temperature. The charred sample was grinded and sieved and 40 g of each of the different sample sizes (0.3, 0.5, 0.6, 1.0, and 2.0 mm) were activated by the activating agent HNO₃. This was carried out by mixing 50 mL of 0.5 M HNO₃ with 40 g of each of the different particle sizes of charred bamboo product in a 250 mL beaker for 30 min and then activated for 2 h at a temperature of 350°C. The activated samples were then cooled at room temperature, washed copiously with deionized water until a pH of 6.8 was obtained. Both adsorbents, bamboo dusts (BD) and bamboo-based activated charcoal (BBAC) were finally stored in different airtight plastic vessels and carefully labeled in readiness for the adsorption process.

Preparation of adsorbates (metal ions)

Stock solutions of 1000 mg L⁻¹ of each of the metal ions, cadmium and lead were prepared from their salts Cd(NO₃)₂ and PbCl₂. From the stock solutions, a working concentration of 100 mg L⁻¹ was obtained by dilution. The residual concentration after adsorption was measured using buck scientific Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS) model 969 502369 v5.66. The pH of the adsorbate solutions was kept at 6.0. The concentrations of the metal ions adsorbed were calculated by difference. The analysis was carried out in triplicates and mean residual concentration analyzed.

Kinetic Measurements

Kinetic adsorption studies were carried out for the two metal ions at a pH 6.0, temperature of 30 °C and an initial concentration of 100 mg L⁻¹. 50 mL of standard solutions of each metal ions were transferred into various 250 mL conical flasks which were corked and labeled. Thereafter, 1.0 g of each adsorbents was weighed and put into the different flasks and agitated in a rotary shaker at different contact times (10, 30, 60, 90 and 120 min.). At the end of agitation time, the content of each flask was filtered with a filter paper, centrifuged and the residual concentration of each of the metal ions analyzed using the atomic absorption spectrometer (AAS). The amount adsorbed was then calculated by difference. Blank solutions were also prepared and analyzed.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Effect of particle size

The adsorption of Pb(II) and Cd(II) ions was found to increase from 4.29 mg g⁻¹ (corresponding to 85.78% removal) to 4.67 mg g⁻¹ (93.40% removal) and 4.04 mg g⁻¹ (80.08% removal) to 4.57 mg g⁻¹ (91.35 % removal) for adsorption of the Pb(II) and Cd(II) ions respectively onto the BBAC as the particle size increased from 0.3 mm to 0.6 mm while that of adsorption onto the bamboo dust follows from 3.94 mg g⁻¹ (78.70 % removal) to 4.42 mg g⁻¹ (88.40 % removal) and 3.76 mg g⁻¹ (75.14 % removal) to 4.16 mg g⁻¹ (83.14 % removal) for the two metal ions following the previous order, at a pH 6.0, temperature 30 °C and initial metal ion concentration of 100 mg L⁻¹. From Figures 1 and 2, it can be observed that the percentage of metal ions adsorbed increased with increase in particle size (from 0.3 mm to 0.6 mm) and decreased as the particle size increased from 1.0 mm to 2.0 mm for both metal ions onto the two adsorbents.

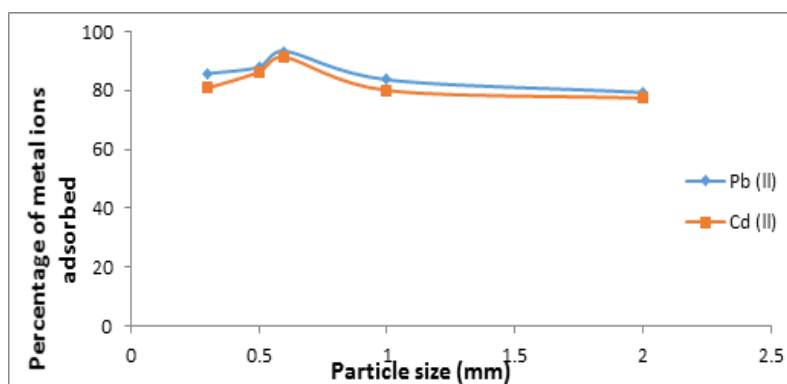


Figure 1. Variation of percentage metal ions adsorbed with particle size for the adsorption of Pb²⁺ and Cd²⁺ onto BBAC.

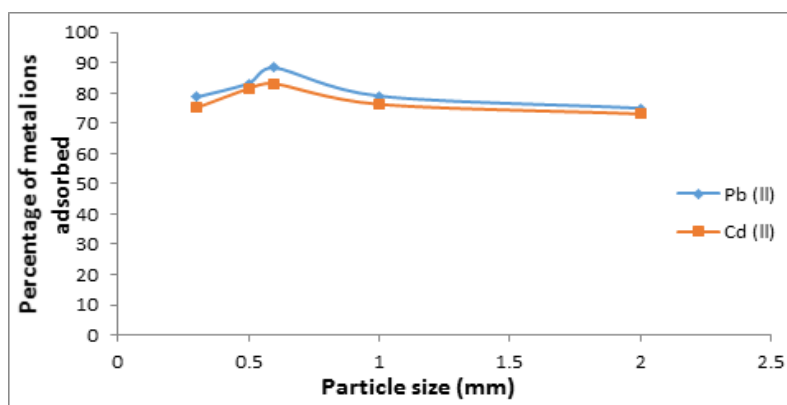


Figure 2. Variation of percentage metal ions adsorbed with particle size for the adsorption of Pb²⁺ and Cd²⁺ onto BD.

However, the maximum adsorption capacities for the two metal ions by the adsorbents occurred at a particle size of 0.6 mm. The higher percentage adsorption with smaller particle sizes may be attributed to the fact that smaller particle sizes provide a larger surface area. There is a considerable effect of particle size on specific surface area: as the particle size decreases, the specific surface area increases [30]. The high rate of adsorption by adsorbents with smaller particle sizes had been generally attributed to the availability of more specific surface areas on the adsorbent. Results further show that BBAC exhibited a greater adsorption for the metal ions than the BD. The equilibrium time was also found to remain unaffected by the change in adsorbent particle size.

Effect of contact time

The adsorption of the metal ions Cd(II) and Pb(II) onto the adsorbents, namely BBAC and BD, was observed to increase with increasing contact time for the fixed initial metal ion concentration and adsorbent mass. Figures 3 and 4 show that the initial adsorption rate increased rapidly and that optimal adsorption occurred within 90 min. It can be observed that the adsorption rate increased from 86.5 % to 94.34 % for Pb(II) ions onto BBAC and 80.04% to 91.00% for Pb(II) ions onto BD with increased contact time of 10 to 90 min while that of Cd(II) increased from 82.24% to 93.6% for adsorption onto BBAC and from 80% to 89.98% for adsorption onto BD for the same increasing contact time of 10 to 90 min.

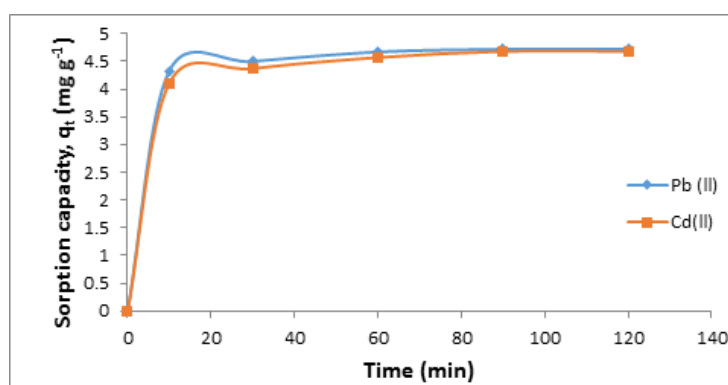


Figure 3. Effect of contact time on the adsorption of the metal ions by the based-bamboo activated charcoal (BBAC)

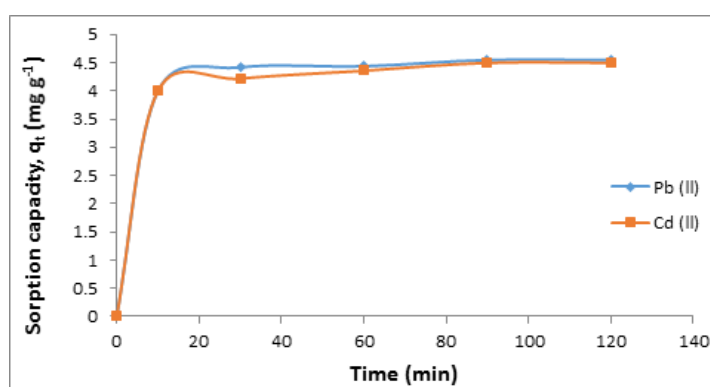


Figure 4. Effect of contact time on the adsorption of the metal ions by the bamboo dust (BD).

However, the equilibrium value was obtained at around 90 min, after which the concentrations of the metal ions became almost constant. This maximum adsorption within 90 min may be explained by the fact

that initially for the adsorption process, a large number of vacant adsorption sites were available and these decreased gradually due the saturation of these surface sites as the contact time increased as well as the

repulsive forces existing between the solute molecules and bulk phase. The variations of adsorption capacity with contact time are shown in Figures 3 and 4.

Table 1 contains heavy metal adsorption capacities (mg g^{-1}) of different adsorbents in comparison with the bamboo dust and its activated counterpart used in our study. The variations in the adsorption capacities of the different adsorbents could result from the type of functional groups present on the biosorbents, which may have different affinities for metal ions and the variations in the particle size of the

adsorbents which equally affect their surface area as well as the porosity of the activated adsorbents. The adsorption capacities (mg g^{-1}) of 4.42 and 4.16 for Pb^{2+} and Cd^{2+} by the bamboo dust and 4.67 and 4.57 respectively for the metal ions by the bamboo based activated charcoal in our study in comparison with some other adsorbents presented in the literature (Table 1), shows that the bamboo wastes are good adsorbents for the removal of these metal ions from aqueous solutions and may be employed in wastewater decontamination.

Table 1. Heavy metal adsorption capacities (mg g^{-1}) of different adsorbents.

Material	Adsorption capacities (mg g^{-1}) for the metals							Sources
	Pb^{2+}	Cd^{2+}	Cr^{3+}	Cr^{6+}	Cu^{2+}	Ni^{2+}	Zn^{2+}	
Modified Pine bark (NaOH)	11.9	11.2	-	-	-	-	-	Argun and Dursun [31]
Activated carbon	-	1.51	-	-	2.23	-	1.23	Ücer et al. [32]
Rice husk	-	-	-	-	-	8.86	-	Bansal et al. [33]
Silverleaf nightshade	20.6	18.9	2.3	2.2	-	6.5	-	Baig et al. [34]
Rice husk ash	-	20.24	-	-	-	-	-	Kumar and Bandyopadhyay[35]
Waste tea		1.63	-	1.55	-	-	-	Orhan and Buyukgungor [36]
Maple sawdust	3.19	-	-	-	1.79	-	-	Yu et al. [37]
Bamboo dust	4.42	4.16	-	-	-	-	-	In this study
Bamboo-based activated carbon	4.67	4.57	-	-	-	-	-	In this study

Adsorption Kinetics

The study of adsorption dynamics gives an insight into the rate of adsorption and an interpretation of the mechanisms of the metal ions adsorption process as well as determining the main parameters governing the adsorption kinetics. The adsorption kinetics of the metal ions, Pb(II) and Cd(II) , were studied for contact times ranging between 10-120 min by monitoring the percentage removal of these metal ions by the adsorbents. The data obtained for the adsorption processes in the solid/liquid systems were regressed against both the Lagergren's pseudo first-order equation and pseudo second-order kinetic model.

The pseudo first-order equation

The pseudo first order equation is generally expressed as follows [38]:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t) \quad (1)$$

Where k_1 is the pseudo first-order rate constant for the

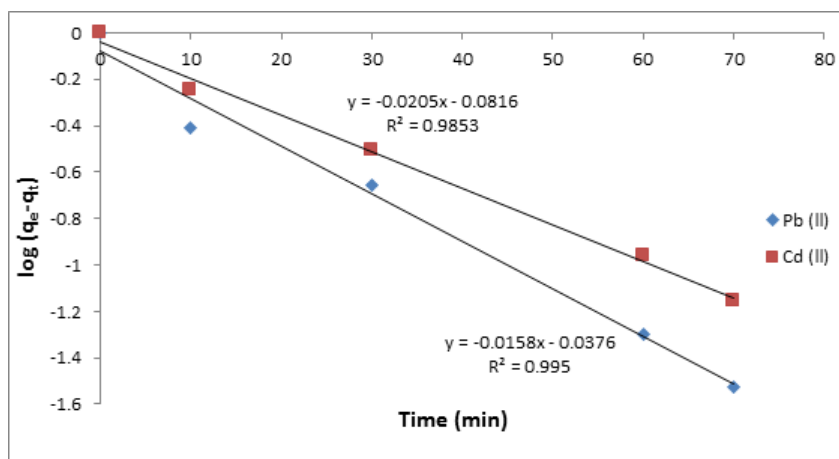
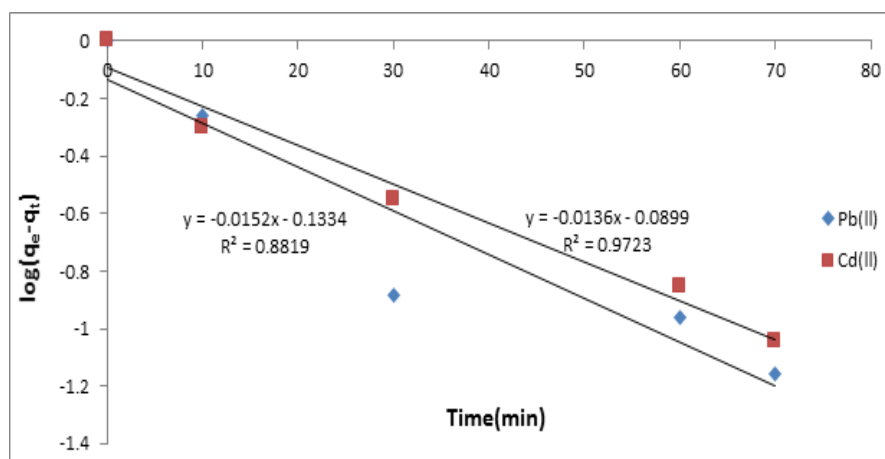
adsorption process (min^{-1}), q_e and q_t are the adsorption capacities (mg g^{-1}) at equilibrium and at time, t (min), respectively. After integration of this kinetic expression and applying the boundary conditions at $t = 0$ to $t = t$ and $q_t = 0$ to $q_t = q_t$, the integrated form of equation (1) becomes

$$\log(q_e - q_t) = \log(q_e) - \frac{k_1}{2.303} t \quad (2)$$

The values of $\log(q_e - q_t)$ were linearly correlated with t . The plot of $\log(q_e - q_t)$ vs t gave a linear relationship from which k_1 and q_e were determined from the slope and intercept of the linear plots and are presented in Table 2. Figures 5 and 6 show the linear plots for the pseudo first-order model. The pseudo first-order constants and the correlation coefficients (R^2 values) are shown in Table 2. The values for the pseudo first-order rate constants were found to increase for the adsorption of the metal ions onto the surfaces in the order ($\text{BD} < \text{BBAC}$) showing that there was a greater adsorption of the metal ions by the bamboo-based activated charcoal than the Bamboo dust.

Table 2. Kinetic rate constants for pseudo first-order reaction at 30 °C.

Pb(II)		
ADSORBENTS	k_1 (min ⁻¹)	R^2
BBAC	4.72×10^{-2}	0.9853
BD	3.64×10^{-2}	0.9950
Cd(II)		
BBAC	3.50×10^{-2}	0.8819
BD	3.13×10^{-2}	0.9723

**Figure 5.** Pseudo-first order plot of $\log(q_e - q_t)$ vs t for adsorption of the metal ions onto BBAC.**Figure 6.** Pseudo-first order plot of $\log(q_e - q_t)$ vs t for adsorption of the metal ions onto BD.

Pseudo second-order kinetic model

Kinetic data were also analyzed by Ho's pseudo second-order kinetic model [39]. This model is based on the assumption that the sorption follows second order chemisorptions and the integrated equation is

usually given as:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (3)$$

where $h_0 = k_2 q_e^2$ is usually described as the initial

adsorption rate as t approaches zero. The pseudo second-order model was applied in this analysis and a plot of t/q_t vs t gave linear plots, from which the parameters q_e , k_2 and h_0 were evaluated. Since the plots of t/q_t vs t follow linear relationship, then the rate-limiting step for the adsorption process may be described as chemisorption. Figures 7 and 8 are the theoretical plots indicating high correlation

coefficients (R^2 values > 0.999) and these high R^2 values suggest that the pseudo second-order kinetic model describes the adsorption of the metal ions on the adsorbents in this study. Therefore, the possibility of chemical adsorption involving valency forces through sharing or exchange of electrons between adsorbents and metal ions may assume the rate-limiting step of the process.

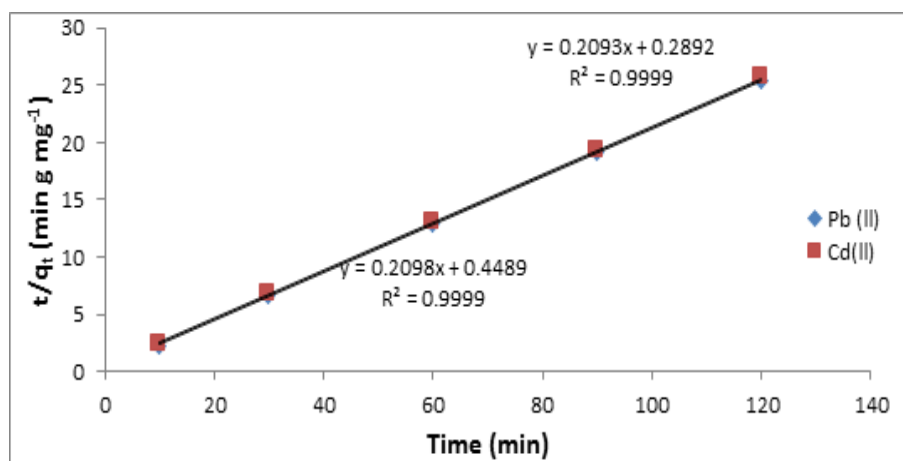


Figure 7. Pseudo-second order plot of t/q_t vs t for adsorption of the metal ions on BBAC

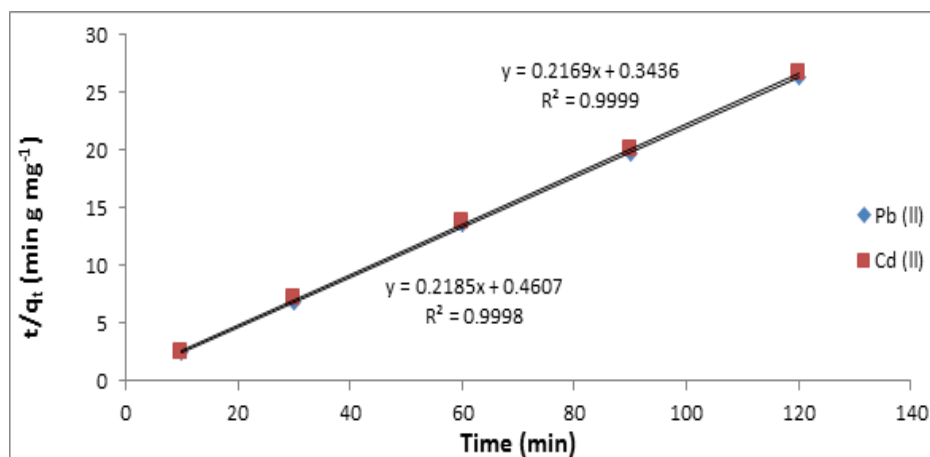


Figure 8. Pseudo-second order plot of t/q_t vs t for adsorption of the metal ions on BD.

Table 3 shows the rate constant, k_2 , the equilibrium adsorption capacity, q_e and the initial adsorption rate, h_0 , of the adsorption of the metal ions. These parameters were calculated from the intercept and slope of the linear plots of t/q_t versus t . The equilibrium adsorption capacities, q_e calculated from the pseudo second-order kinetic model agree very closely with the experimentally measured values.

A comparison of the two kinetic models-pseudo first-order and pseudo second-order was assessed using the R^2 values to determine the best fit. As shown in Tables 2 and 3, the correlation coefficients (R^2 values) for the two models confirmed that pseudo second-order provides a better description of the kinetics of the metal adsorption with R^2 values greater than 0.998 and higher than that for the pseudo first-order rate equation.

Therefore, the fitting of the adsorption data into pseudo second-order model shows that the rate of occupation of active sites is proportional to the square of the

number of unoccupied sites. The data obtained indicate that Pb(II) ions were better adsorbed than Cd(II) ions.

Table 3. Kinetic Rate Constants for pseudo second-order reaction at 30 °C.

ADSORBENTS	q_e (mg g ⁻¹)	Pb(II)		
		k_2 (g.mg ⁻¹ min ⁻¹)	h_0 (mg.g ⁻¹ min ⁻¹)	R^2
BBAC	4.78	15.10 x 10 ⁻²		0.9999
BD	4.77	9.79 x 10 ⁻²		0.9999
Cd(II)				
BBAC	4.61	13.69 x 10 ⁻²		0.9999
BD	4.58	10.35 x 10 ⁻²		0.9998

Furthermore, the rate of attainment of equilibrium was assessed in terms of adsorption being controlled by film-diffusion or particle-diffusion. A linear driving force concept developed by Vinod and Anirudvan [40] for the rate equation was used to assess the fractional attainment of equilibrium using the equation:

$$\ln(1 - \alpha) = k_n t \quad (4)$$

Where α is the fractional attainment of equilibrium and k_p is the rate constant or diffusion time constant. The fractional attainment of equilibrium, α , is the ratio of the amount of metal ion adsorbed from solution after a certain time to that adsorbed when adsorption equilibrium is attained. If the plot of $\ln(1-\alpha)$ versus time is linear, then adsorption is controlled by particle diffusion and the diffusion of the metal ions onto the adsorbent surface is independent of the extent of adsorption while a non-linear plot indicates adsorbent film-diffusion controlled process, *i.e.* the time of uptake is dependent on the initial metal ion

concentration. The plots of particle diffusivity versus time for the metal ions are shown in Figs. 9 and 10 while plots for variation of film-diffusivity versus time are displayed in Figures 11 and 12. The plots (Figures 9 and 10) revealed that the relationship between metal ion diffusivity $\ln(1-\alpha)$ and time, t are all linear indicating that the diffusivity of the metal ions onto the adsorbents may mostly be particle-diffusion controlled. Figures 9 and 10 further confirmed that the rate of attainment of equilibrium for the adsorption of the metal ions is particle-diffusion controlled. Hence, the time for ion uptake is independent on the initial metal ion concentration. The plots also show that the values of α increase with time of agitation, indicating that increased time of agitation provides the metal ions more opportunity to be taken up by the adsorbents. Agitation time facilitates proper contact between the metal ions in solution and the adsorbent binding sites and thereby promotes effective transfer of metal ions to the adsorbent sites. However, in about 90 min, the adsorption process had attained the equilibrium.

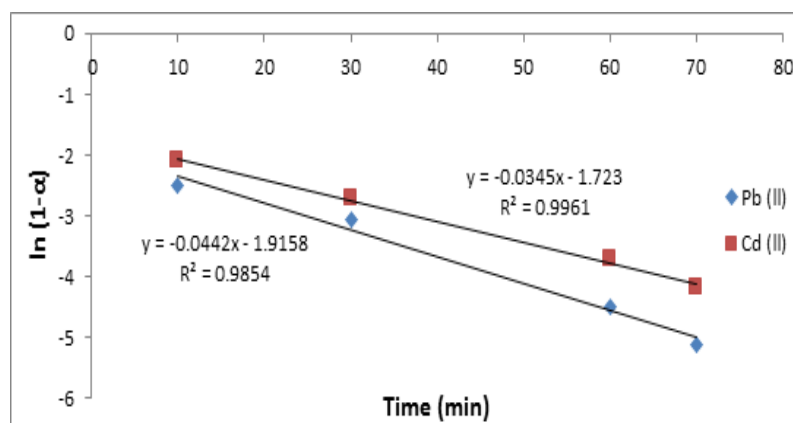


Figure 9. A plot of Particle diffusivity versus time (t) for the metal ions on BBAC.

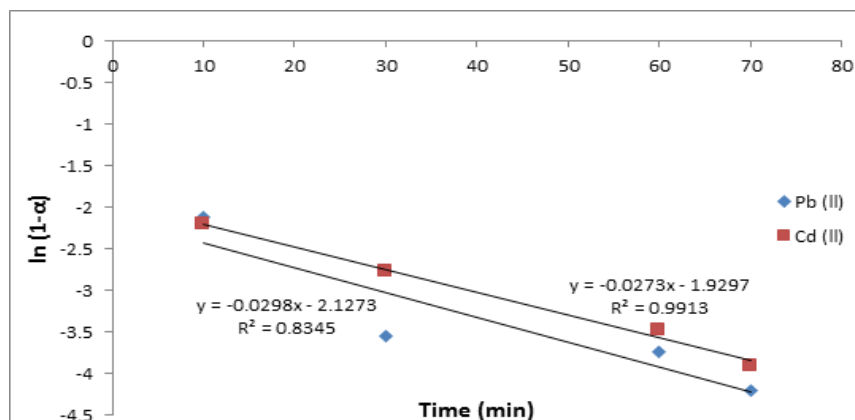


Figure 10. A plot of Particle diffusivity versus time (t) for the metal ions on BD.

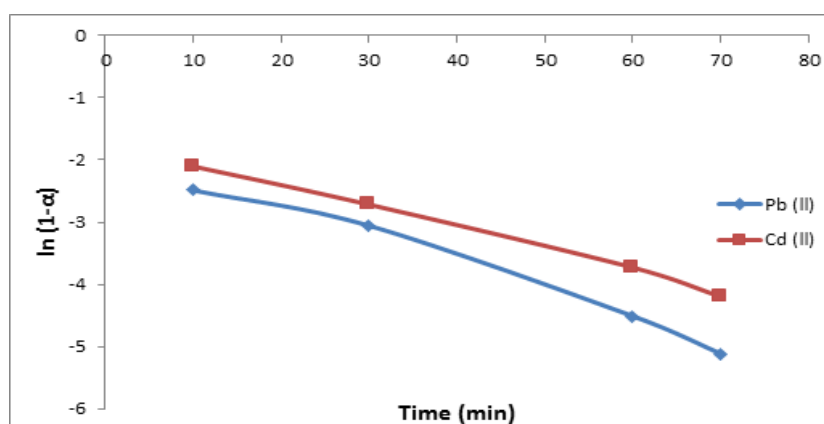


Figure 11. A plot of film diffusivity versus time (t) for the metal ions on BBAC.

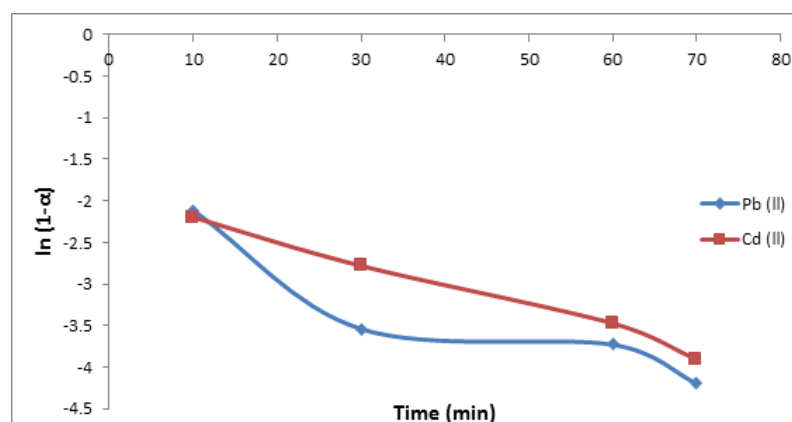


Figure 12. A plot of film diffusivity versus time (t) for the metal ions on BD.

4. CONCLUSIONS

The effect of contact time on the adsorption of

these metal ions showed that the adsorption process increases with increase in contact time, reaching equilibrium in about 90 min. Kinetics of the adsorption

show that the process follows pseudo second-order kinetic model, indicating that the rate-limiting step of the process could be by chemical reaction. Kinetic studies also showed that the adsorption transport mechanism was particle-diffusion controlled for adsorption of the metal ions onto the adsorbents. Maximum removal of these metal ions by the adsorbents occurs at a particle size of 0.6 mm. Results from this study show that bamboo dust and the bamboo-based activated charcoal can be used for the removal of Pb(II) and Cd(II) ions from aqueous solutions and may be employed in wastewater decontamination.

5. REFERENCES AND NOTES

- [1] World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. In. Chemical Fact Sheet. World Health Organization, Geneva, 2004.
- [2] Volesky, B. *Microbiol. Rev.* **1994**, *14*, 291. [[PubMed](#)]
- [3] Puranik, P. R.; Paknikar, K. M. *J. Biotechnol.* **1997**, *55*, 113. [[CrossRef](#)]
- [4] Kawarada, K.; Haneishi, K.; Iida, T. *Wood Ind.* **2005**, *60*, 398.
- [5] Graydon, J. W.; Zhang, X.; Kirk, D. W.; Jia, C. Q. *J. Hazard. Matter.* **2009**, *168*, 978. [[CrossRef](#)]
- [6] Khalkhal, A. N.; Omidvari, R. *Pol. J. Environ. Stud.* **2005**, *14*, 185.
- [7] Kouakou, U.; Ello, A. S.; Yapou, J. A.; Trokourey, A. *J. Environ. Chem. and Ecotoxicol.* **2013**, *5*, 168.
- [8] Malik, P.K. *Dyes pigments*, **2003**, *56*, 239. [[CrossRef](#)]
- [9] Selvi, K.; Pattabhi, S.; Kadirvelu, K. *Bioresource. Technol.*, **2001**, *80*, 87. [[CrossRef](#)]
- [10] Chutia, P.; Kato, S.; Kojima, T.; Satokawa, S. *J. Hazard Matter.*, **2009**, *162*, 204. [[CrossRef](#)]
- [11] Wang, Y. F.; Lin, F.; Pang, W. Q. *J. Hazard Matter.* **2007**, *142*, 160. [[CrossRef](#)]
- [12] Inglezakis, V. J.; Loizidou, M. D.; Grigoropoulou, H. P. *J. Colloid Int. Sci.* **2003**, *261*, 49. [[CrossRef](#)]
- [13] Argun, M. E.; Dursun, S.; Ozdemir, C.; Karatas, M. *Journal of Hazardous Materials*, **2007**, *141*, 77. [[CrossRef](#)]
- [14] Bansal, M.; Singh, D.; Garg, V. K.; Rose, P. *International Journal of Environmental Science and Engineering*, **2009**, *1*, 108.
- [15] Hossain, M. A.; Rahman, M. A. *Orbital: Electron. J. Chem.* **2012**, *4*, 187. [[Link](#)]
- [16] Park, D.; Yun, Y. S.; Jo, J. H.; Park, J. M. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2006**, *45*, 5059. [[CrossRef](#)]
- [17] Ong, S. A.; Seng, C. E.; Lim, P. E. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* **2007**, *6*, 1764.
- [18] Hussein, H.; Ibrahim, S. F.; Kandeel, K.; Moawad, H. *Electronic Journal of Biotech.* **2004**, *7*, 38. [[CrossRef](#)]
- [19] Ahalya, N.; Kanamadi, R. D.; Ramachandra, T. V. *Electronic Journal of Biotech.* **2005**, *8*, 258. [[CrossRef](#)]
- [20] Srivastava, S. K.; Tyagi, R.; Pant, N. *Water Res.* **1989**, *23*, 116. [[CrossRef](#)]
- [21] Zhang, A.; Asakura, T.; Uchiyama, G. *React. Funct. Polym.*, **2003**, *57*, 67. [[CrossRef](#)]
- [22] Pan, B. C.; Xiong, V.; Su, Q.; Li, A. M.; Chen, J. L.; Zhang, Q. X. *Chemosphere*, **2003**, *51*, 953. [[CrossRef](#)]
- [23] Azanova, V. V.; Hradil, J. *React. Funct. Polym.* **1999**, *41*, 163. [[CrossRef](#)]
- [24] Findon, A.; McKay, G.; Blair, H. S. *J. Environ. Sci. Health part A Environ. Sci. Eng. Toxic Hazard. Subst. Control* **1993**, *28*, 173.
- [25] Kumar, R.; Abraham, T. N.; Jain, S. K. *2nd International Conference on Environmental Science and Development* **2011**, *4*, 48.
- [26] Kim, J. S.; Chah, S.; Yi, J. *Korean J. Chem. Eng.* **2000**, *17*, 118. [[CrossRef](#)]
- [27] Lo, S.; Wang, S.; Tsai, M.; Lin, L. *Chemical Engineering Research and Design* **2012**, *90*, 1397. [[CrossRef](#)]
- [28] Ijaola, O. O.; Ogedengbe, K.; Sangodoyin, A. Y. *International Journal of Engineering Inventions* **2013**, *2*, 29.
- [29] Fu, J.; Teng-Wang, Q.; Zeng, X. Z.; Qing-Fu, A.; Shu-Qing, Z. *H. Journ. Environ. Technol.* **2010**, *6*, 1.
- [30] Onwu, F. K.; Ogah, S. P. I. *African Journal of Biotechnology* **2010**, *9*, 7086.
- [31] Argun, M. E.; Dursun, S. *J. Int. Environ. Appl. Sci.* **2006**, *1*, 27.
- [32] Ücer, A.; Uyanik, A.; Aygun S. F. *Sep. Puri. Technol.* **2006**, *47*, 113. [[CrossRef](#)]
- [33] Bansal, M.; Singh, D.; Garg, V. K.; Rose, P. J. *Environ. Sci. Eng.* **2009**, *1*, 108.
- [34] Baig, T. H.; Garcea, A. E.; Tiemann, K. J.; Gardea-Torresdey, J. L. *Proceedings of the 1999 Conference on Hazardous Waste Research* **1999**, 131.
- [35] Kumar, U.; Bandyopadhyay, M. *Biores. Technol.* **2006**, *97*, 104. [[CrossRef](#)]
- [36] Orhan, Y.; Buyukgungor, H. *Wat. Sci. Technol.* **1993**, *28*, 247.
- [37] Yu, B.; Zhang, Y.; Shuklar A.; Shuklar, S. S.; Dorris, K. L. *J. Hazard Mater* **2001**, *B84*, 83. [[CrossRef](#)]
- [38] Demirbas, E.; Kobya, M.; Senturk, E.; Ozkan, T. *Water SA* **2004**, *30*, 532. [[CrossRef](#)]
- [39] Ho, Y. S.; McKay, G.; Wase, D. A. J.; Foster, C. F. *Adsorp. Sci. Technol.* **2000**, *18*, 639. [[CrossRef](#)]
- [40] Vinod, V. P.; Anirudhan, J. S. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2001**, *77*, 92. [[CrossRef](#)]

Actividad Biológica de *Combretum laurifolium*

Ismael F. Montero^{*a,c}, Francisco S. Silva^b, Habel Nasser R. Costa^c, Antônio A. Melo Filho^c, Ricardo C. Santos^d, Gilzonia V. Costa^d, Carlos Alberto C. Lima^e

^aPrograma Intercambio Santander: Universidad de Extremadura (España) y Universidade Federal de Roraima (Brasil).

^bPrograma Graduação em Química, UFRR. Av. Cap. Ene Garcez, 2413, Bairro Aeroporto. CEP: 69310-000. Boa Vista, RR, Brasil.

^cPrograma Post-Graduação em Química, UFRR. Av. Cap. Ene Garcez, 2413, Bairro Aeroporto. CEP: 69310-000. Boa Vista, RR, Brasil.

^dPrograma Post-Graduação em Recursos Naturales (PRONAT), UFRR. Av. Cap. Ene Garcez, 2413, Bairro Aeroporto. CEP: 69310-000. Boa Vista, RR, Brasil.

^eInstituto Federal de Ciência e Tecnologia de Roraima, IFRR. Av. Cap. Ene Garcez, 2413, Bairro Aeroporto. CEP: 69310-000. Boa Vista, RR, Brasil.

Article history: Received: 30 August 2014; revised: 14 November 2014; accepted: 15 November 2014. Available online: 30 December 2014.

Abstract: In this paper, we conducted various phytochemical studies of the species *Combretum laurifolium* Mart. in the region of the city of Amajari in Roraima, Brazil, aiming to study the biological properties such as antibacterial activity, and inhibition of acetylcholinesterase activity. The results were interesting to the antimicrobial activities against *S. typhimurium*, *E. coli*, *S. Sanguinis*, *S. aureus*, *C. albicans* and acetilcolesterasa, the phytochemical prospecting is present tannins, flavonoids, steroids, triterpenes and saponins in the species.

Keywords: acetilcolinesterasa; antimicrobial agents; phytochemical prospectation

1. INTRODUCCIÓN

Especies pertenecientes al género *Combretum* presentan gran cantidad de metabolitos secundarios. Este género, es el mayor de la familia *Combretaceae* y se encuentra distribuido en las regiones tropicales y subtropicales [1].

Así, el género *Combretum*, se destaca por estar constituido por amplias clases de compuestos y actividad biológica, tales como actividad antibacteriana, anticancerígenos, citotóxica, analgésica, antiinflamatorio, actividades hepatoprotectora y antiviral [2].

El primer objetivo de este estudio, es llevar a cabo estudios preliminares para determinar la presencia de los distintos metabolitos secundarios en la planta, efectuar estudios fitoquímicos de las fracciones etanólicas y hexanoicas de las hojas de *Combretum laurifolium* Mart., en la región del municipio de Amajari, en Roraima, Brasil, así como bioensayos de inhibición de acetilcolinesterasa, para

estudiar sus propiedades para combatir enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de los extractos

En primer lugar se realizó la colecta de las hojas de *C. laurifolium*, en la región del municipio de Amajari, posteriormente, fueron secadas, pesadas, molidas e liofilizadas. Los extractos fueron preparados para la realización de los estudios fitoquímicos usuales [3]. El material recolectado fue 10,2 kg, incluyendo las hojas, flores, fruto y semilla. De ahí se separaron las distintas partes y sólo se usó las hojas. La cantidad de material fue preparada para la extracción en frío, maceración, con hexano y después con etanol. Dichos extractos fueron concentrados en el rotavapor tras la eliminación del solvente, y por último fueron pesados y guardados

*Corresponding author. E-mail: ismofe04@alumnos.unex.es

para estudios fitoquímicos posteriores.

Para los estudios fitoquímicos, se tomó con espátula una pequeña cantidad de la fracción etanólica de las hojas de *C. laurifolium*, y se colocaron en un erlenmeyer de 125 mL adicionándose 30 mL de etanol y agitando hasta que la disolución es homogénea, resultando una coloración amarillo-verdosa.

Los ensayos fitoquímicos para fenoles, taninos, flavonoides, flavonas, xatonas, esteroides y triterpenoides fueron realizados según los métodos descritos por Matos [4].

Cromatografía en capa fina

Las placas cromatográficas en capa fina (CCF), fueron preparadas en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Universidade Federal de Roraima, UFRR, con un espesor de 1 mm de sílica de marca Merck sobre lámina de vidrio. La lámpara de revelado empleada fue una lámpara de luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm, revelador de enlaces dobles conjugados y reveladores químicos tales como vapor de yodo, solución de *p*-anisaldehído (como revelador universal) y vainilina/ácido sulfúrico calentado lentamente a 110°C.

Cromatografía em columna del extracto etanólico de las hojas de *C. laurifolium*

Las extracciones en cromatografía en columna (CC) fueron llevadas a cabo en columnas de vidrio con elución a presión atmosférica con hexano, diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, etanol y metanol, en orden creciente de polaridad, usando como fase estacionaria, sílica gel 60 (70 a 230 Mesh-ASTM, Merck). Del extracto etanólico, fueron tomados 3.500 gramos y mezclados con sílica gel y posteriormente colocado en una columna de separación filtrante de 1000 mL sobre una capa de empaquetamiento cromatográfico de sílica gel.

Bioensayo de mínima concentración inhibitoria (MIC) para bacterias gram-positivas, gram-negativas y hongo

Las bacterias gram-positivas utilizadas en el test fueron *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Staphylococcus Sanguinis* (ATCC 49456), las bacterias gram-negativas fueron *Escherichia coli* (62517) y *Salmonella triphymurium* (42122) y el

hongo *Candida albicans*.

Las muestras fueron pesadas y solubilizadas en dimetilsulfóxido (DMSO), preparando una disolución con concentración de 50 mg/mL de extractos y 12,5 mg/mL de sustancias puras. Se pipetearon 40 μ L de esta disolución a un tubo de ensayo que contenía 960 μ L de medio de cultivo BHI como solución de trabajo. Por otra parte, se preparó una pre incubación en la que las bacterias (levaduras) guardadas en tubos de ensayo conteniendo 3,0 mL de medio de cultivo BHI (*Brain Heart Infusion*, infusión de cerebro y corazón). A continuación, los tubos fueron incubados en estufa a 37°C durante 18 horas. Con la ayuda de una micropipeta, 500 μ L de las bacterias pre incubadas fueron transferidas a tubos de ensayo conteniendo 4,5 mL de agua destilada. Los tubos fueron homogeneizados y la concentración que contenía cada tubo fue comparada con el tubo de 0,5 en la escala Mc Farland de turbidez patrón (10^8 UFC/mL), obteniéndose así los incubados bacterianos utilizados en el test.

Los test fueron realizados en placas de 96 microporos por duplicado. En cada cavidad, fueron adicionados 100 μ L del medio de cultivo BHI. En la cavidad primera, fueron adicionados también 100 μ L de la solución de trabajo. Se homogeneizó la disolución y 100 μ L fueron transferidos para la siguiente cavidad y así sucesivamente, despreciándose los 100 μ L finales. Fueron probadas ocho concentraciones de cada muestra: concentración 01 (500 μ g), 02 (250 μ g), 03 (125 μ g), 04 (62,5 μ g), 05 (31,25 μ g), 06 (15,625 μ g), 07 (9,375 μ g), 08 (3,90625 μ g). Después, 100 μ L de los microorganismos incubados, fueron adicionados en cada pozo. Fueron realizados dos controles, uno para el control de crecimiento del microorganismo, en el cual no hubo adición de la disolución de trabajo, para verificar, así la viabilidad celular y el blanco, al que no se le adicionó la incubación bacteriana, para eliminar el efecto de la coloración de la solución de trabajo. Una placa de control que contiene 100 μ L del medio de cultivo BHI y 100 μ L de agua destilada, fueron adicionados al experimento como control de esterilidad del medio de cultivo BHI.

Las microplacas fueron sometidas a una primera lectura en el lector de placa de Elisa (492 nm), inmediatamente después de la realización del experimento (lectura a 0 h). Posteriormente, fueron incubadas en estufa a 37°C y después de 24 horas fue realizada una nueva lectura de las mismas cerrando así el test.

Bioensayo para hongos filamentosos *Aspergillus flavus* y *Fusarium proliferatum*

El solvente utilizado en la preparación de este tipo de muestras es dimetilsulfóxido, cuyas concentraciones de las muestras en el test es de 250 µg/mL. El medio utilizado para el crecimiento de los microorganismos es el caldo *Sabouraud*, empleando una concentración de esporas de $5 \cdot 10^{-5}$ esporas/mL, siendo el tiempo de incubación de las muestras de 48 horas.

Los datos de las medidas de las lecturas fueron realizadas en un lector de placas de microtitulación, empleando una longitud de onda de 490 nm.

Para el tratamiento de resultados, empleamos el test de Outlier y dentro del mismo aplicamos el test de Grubbs para un nivel de significancia del 95 %.

$$\%inhibición = 100 - \frac{(EC - CC) \times 100}{CH - CM}$$

siendo EC a absorbancia del test, CC la absorbancia de control de la muestra, CH la absorbancia de control del hongo e CM la absorbancia de control del medio de cultivo.

Bioensayo de inhibición de acetilcolinesterasa

Para llevar a cabo dicho ensayo se tomaron 25 µL de la solución de trabajo (muestra disuelta en

DMSO 10 mg/mL) y se colocan en las cavidades de una placa Elisa para hacer los test de control positivo y negativo. En las cinco primeras cavidades de la columna de control positiva, se adicionaron 25 µL de la solución de eserina (10 mg/mL en tampón Tris/HCl pH 8,0). Se adicionaron a cada cavidad, 25 µL de la solución de yoduro de acetilcolina (ATCI), 125 µL de la solución de DTNB (5',5-dithio-bis-(2-nitrobenzoate, Sigma), y 50µL de Tris/HCl (50mM) con albúmina sérica bovina. La absorbancia fue medida a 405 nm en intervalos de 1 minuto durante 8 minutos. Se adicionaron 25 µL de la solución de AChE (0,226 U/mL) en Tris/HCl a cada cavidad y se midió la absorbancia a 405 nm durante 10 minutos [5-6].

3. RESULTS AND DISCUSSION

Análisis preliminar de los ensayos fitoquímicos

Los análisis fitoquímicos fueron realizados conforme a Matos [4] para intentar verificar los constituyentes químicos en las hojas de la planta. Al no tener estudios químicos sobre la especie en que se inició el estudio, se recogen en la Tabla 1 de forma cualitativa, los grupos de metabolitos secundarios relevantes presentes en la planta.

Tabla 1. Prospección fitoquímica de los constituyentes en el extracto etanólico

Compuestos	Fenoles	Taninos	Flavonoides	Esteroides	Triterpenos	Saponinas
Hojas	0	+++	+++	++	+++	+++

0 = no se encuentran en la muestra; +++ = Se encuentran en concentración alta; ++ = se encuentran en baja concentración.

Dichos metabolitos secundarios están de acuerdo con los constituyentes aislados mediante otros estudios fitoquímicos para esta planta [2].

Una vez visto que los ensayos de prospección fitoquímica presentaban resultados positivos para los taninos, flavonoides, esteroides y saponinas, así se inició el fraccionamiento, se procedió a recoger en un Erlenmeyer de 125 mL la solución de la columna, eliminándose el solvente en el rotavapor. Las fracciones se recogieron en distintos frascos y se le hizo una cromatografía en capa fina, para verificar qué sustancias son semejantes de acuerdo con el *r_f* para continuar con el fraccionamiento y purificación del extracto de las hojas de *C. laurifolium* recogiendo once fracciones diferentes extraídas con

distintas proporciones de hexano y triclorometano en orden de polaridad creciente.

Análisis de los ensayos biológicos

Al analizar los procedimientos de los ensayos de prospección fitoquímica, se verificó la presencia de metabolitos secundarios importantes como fenoles, esteroides, taninos, triterpenos alcaloides y saponinas. Partiendo de estos datos, se seleccionaron las fracciones que contenían mayor cantidad de eluato y además las de mayor pureza, observándose sus manchas en cromatografía de capa fina, son los subgrupos 3, 5 y 8.

Las levaduras que pertenecen al género

Candida son las responsables de causar varias infecciones en su huésped cuando no se han tomado excesivos cuidados higiénicos, atacando a individuos que tengan principalmente una baja inmunidad, por lo

que las infecciones causadas por la especie *C. albicans*, son principalmente en la piel, uñas, mucosas, tracto intestinal e urinario [6].

Tabla 2. Resultados de MIC (% de inhibición) para *C. albicans*.

<i>C. albicans</i>					
% de inhibición	Subgrupo 5	Subgrupo 8	Subgrupo 3	Miconazol	Nistanina
01 (500 µg)	90,8	92,2	90,2	92,3	93,3
02 (250 µg)	90,6	91,3	91,1	91,0	90,7
03 (125 µg)	91,4	91,1	90,9	90,7	90,1
04 (62,5 µg)	91,3	91,9	90,7	90,5	90,2
05 (31,25 µg)	91,3	91,6	91,5	91,1	90,9
06 (15,625 µg)	91,9	92,2	92,1	91,6	91,5
07 (9,375 µg)	92,3	91,9	92,3	91,5	91,3
08 (3,90625 µg)	92,0	93,8	92,6	91,3	91,4

Como puede observarse en la Tabla 2 el subgrupo 8 fue el que presentó mayor porcentaje de inhibición alcanzando un total del 93,8%, con un valor de menor concentración inhibitoria de 3,9065 µg y comparando con los patrones de Miconazol e Nistanina, la misma presenta un porcentaje de inhibición superior. Krieg, Chan e Michael [7], afirman que la primera exigencia para un buen antimicrobiano es aquella que posee la capacidad de inhibir o matar microorganismos. Teniendo este compuesto químico una baja concentración y poseyendo un amplio espectro de actividad, es decir, puede actuar matando o inhibiendo los más variados tipos de microorganismos.

Todavía se observa, que tanto el subgrupo 3 y el subgrupo 5, también presentan un porcentaje de

inhibición para la *C. albicans* elevado con relación a los antimicrobianos ya utilizados en el mercado, presentando así la oportunidad descubierta de este potente antimicrobiano.

Al analizar la Tabla 3, se puede verificar que el antibiótico ampicilina todavía es bien eficiente para *S. aureus* y que las fracciones de *C. laurifolium* presentan un porcentaje de inhibición inferior al 50%, pudiéndose verificar que las bajas concentraciones de las fracciones presentan resultados próximos a los de ampicilina, principalmente en el subgrupo 8, para las concentraciones de porcentaje de inhibición 06 (15,625µg). Souto [11], constató que el extracto bruto etanólico de partes aéreas de *C. laurifolium* (Loefl) Stuntz, presenta un porcentaje de inhibición bien próximo al utilizado como control.

Tabla 3. Resultados de MIC (% de inhibición) para *S. aureus*.

<i>S. aureus</i>				
% de inhibición	Subgrupo 5	Subgrupo 8	Subgrupo 3	Miconazol
01 (500 µg)	38,7	31,4	1,6	104,6
02 (250 µg)	32,1	28,6	10,8	106,0
03 (125 µg)	30,4	31,4	32,3	105,5
04 (62,5 µg)	18,8	28,4	23,4	104,1
05 (31,25 µg)	14,1	25,7	17,7	101,9
06 (15,625 µg)	12,6	24,7	17,6	86,7
07 (9,375 µg)	16,2	21,7	15,2	34,7
08 (3,90625 µg)	6,9	8,3	8,3	14,8

Por otra parte, el género *Staphylococcus*, posee varias bacterias patógenas en los seres humanos y en los demás mamíferos, una de ellas es la *S. aureus*, que puede ella capacidad de causar diversas infecciones, de varios niveles de gravedad [8]. Dentro de ellas pueden ser citadas, heridas infecciosas, fiebres e infecciones alimentarias [9]. Es importante observar

que las cepas de esta bacteria son en la mayoría de las veces muy resistentes a los antibióticos. El primer utilizado fue la penicilina, pero los mismos pasaron por un proceso de mutación y no son más vulnerables a ella [10]. Así el descubrimiento de nuevos antibióticos lo hace de suma importancia.

Por otra parte, en la garganta se encuentra una

variada concentración de microorganismos, que poseen unas condiciones favorables para el crecimiento de los mismos. Así, las bacterias se forman en los restos de alimentos que quedan concentrados entre los dientes. Dentro de los principales grupos de microorganismos están los hongos, protozoos, bacterias y virus. Dentro de las bacterias podemos encontrar *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Neisseria* y *Veillonella*.

[12]. Para la *S. sanguinis*, se verifica en la Tabla 4, que el subgrupo 8 fue el que presentó mayor porcentaje de inhibición.

En la Tabla 5, se verifica que el porcentaje de inhibición para *E. coli*, más significativo, fue el subgrupo 5, que fue del 42,754% para concentración de 500 µg, resultando relevante una vez verificado que las bacterias están en contactes mutaciones y se vuelven cada vez más resistentes a los antibióticos.

Tabla 4. Resultados de MIC (% de inhibición) para *S. sanguinis*.

% de inhibición	<i>S. sanguinis</i>			
	Subgrupo 5	Subgrupo 8	Subgrupo 3	Miconazol
01 (500 µg)	49,9	54,2	13,4	102,9
02 (250 µg)	47,8	26,6	18,6	3,2
03 (125 µg)	14,1	26,6	31,2	2,7
04 (62,5 µg)	15,8	25,5	24,5	0,0
05 (31,25 µg)	21,0	23,7	25,6	0,0
06 (15,625 µg)	19,7	23,0	23,9	0,0
07 (9,375 µg)	30,0	29,4	33,2	0,0
08 (3,90625 µg)	20,7	23,7	31,5	0,0

Tabla 5. Resultados de MIC (% de inhibición) para *E. coli*.

% de inhibición	<i>E. coli</i>			
	Subgrupo 5	Subgrupo 8	Subgrupo 3	Miconazol
01 (500 µg)	42,8	21,9	39,8	186,9
02 (250 µg)	27,3	15,7	22,1	140,9
03 (125 µg)	15,4	12,6	13,4	118,6
04 (62,5 µg)	16,9	7,7	10,5	104,9
05 (31,25 µg)	16,4	14,7	15,2	96,2
06 (15,625 µg)	20,6	20,3	18,9	95,4
07 (9,375 µg)	16,9	22,1	21,9	94,6
08 (3,90625 µg)	26,6	21,8	23,6	79,6

La especie *E. coli* pertenece al género *Escherichia* y la familia Enterobacteriaceae [13], una bacteria gram-negativa, anaeróbica facultativa [14].

Debido al uso indiscriminado de antibióticos, por largo período de duración, y hasta el mismo falso concepto de seguridad en relación a la eficacia de estos, muchos patógenos están sufriendo mutaciones y se vuelven más resistentes a los antibióticos. Factores como estos, facilitan las infecciones hospitalarias causadas por microorganismos, tales como *S. aureus*, *E. coli* y *Pseudomonas*, que cuando actúan en conjunto provocan infecciones urinarias, quemaduras, infecciones respiratorias y cirúrgicas. [15].

El resultado de MIC para la bacteria *S. tiphyurium* sigue la Tabla 6, donde se destaca resultados satisfactorios. Se define la *S. tiphyurium*, como bacilos gram-positivos, anaeróbicos facultativos, fermentadores y oxidantes negativos

[16]. Se verifica que después de la ingestión y/o contaminación por bacterias del género *Salmonella*, el huésped pasa a sentir náuseas, cefalea, vómitos y diarrea. Cuando se trata del intestino delgado, generalmente ocurren lesiones inflamatorias, siendo este caso tratado en un período de 2 a 3 días [17].

Al analizar la Tabla 6, se verifica que las tres fracciones presentan un porcentaje de inhibición bien satisfactorio, destacando que para el subgrupo 5 que inhibió el 100% en concentración de 500 µg, mostrando ser una sustancia bastante eficaz contra este tipo de bacteria.

Los hongos son microorganismos eucariotas, no fotosintéticos que son saprofitos y parásitos. En los más diversos ambientes es común la existencia de hongos, pero en determinadas situaciones, pueden dejar de ser saprofitos y se transforman en patógenos, en la mayoría de las veces, causando cuadros clínicos

variables, desde procesos febriles benignos y algunas veces fatales [18]. Muchos factores están ligados al ataque de hongos que van desde los cuidados con la higiene en los ambientes donde el huésped se encuentra así, como el estado del mismo,

generalmente, los pacientes se encuentran hospitalizados por un período largo, pacientes con tratamiento quimioterápico, pacientes con HIV, son los casos de pacientes más vulnerables y favorecen los hongos saprófitos pasen a ser patógenos [19].

Tabla 6. Resultados de MIC (% de inhibición) para *S. tiphymurium*.

<i>S.tiphymurium</i>				
% de inhibición	Subgrupo 5	Subgrupo 8	Subgrupo 3	Miconazol
01 (500 µg)	105,8	31,4	59,3	228,4
02 (250 µg)	87,8	30,9	46,6	180,0
03 (125 µg)	78,5	38,7	45,5	142,1
04 (62,5 µg)	65,6	54,4	60,1	123,3
05 (31,25 µg)	58,5	45,2	44,8	102,1
06 (15,625 µg)	43,9	40,0	27,1	101,2
07 (9,375 µg)	69,9	63,5	54,1	108,6
08 (3,90625 µg)	60,6	62,8	22,	100,932

El *A. flavus* produce toxinas y puede provocar aspergilose pulmonar alérgica o dolencia diseminada [20].

Analizando la Tabla 7 se verifica nuevamente que el subgrupo 8, presenta un porcentaje de inhibición del 28,42%, siendo este el mejor de los tres tanto para *A. flavus* y para *F. proliferatum*.

En la Tabla 8, se recogen los datos del test de inhibición de acetilcolinesterasa nuevamente para los subgrupos 5, 8 y 3 respectivamente, donde se observa un porcentaje de inhibición bueno, especialmente la muestra del subgrupo 3.

Tabla 7. Resultados de la inhibición sobre *A. flavus* y *F. proliferatum*.

	<i>A. flavus</i>	<i>F. proliferatum</i>
	% inhibición	% inhibición
Subgrupo 5	2,21	5,26
Subgrupo 8	28,42	26,14
Subgrupo 3	13,34	6,51

Tabla 8. Resultados de los testes de inhibición de acetilcolinesterasa.

	% Inhibición Acetilcolinesterasa
Subgrupo 5	65,2
Subgrupo 8	42,8
Subgrupo 3	46,3
Galantamina*	90,31

* Medicamento de uso clínico

La acetilcolinesterasa, es una enzima crucial que juega un importante papel fisiológico en la sinapsis interneuronal del sistema nervioso [21], por lo que se pone de manifiesto que *C. laurifolium*, puede ser empleado para combatir enfermedades

como el Alzheimer.

Extractos que presentan un porcentaje de inhibición enzimática $\geq 50\%$ pueden ser aislados como sustancias potencialmente inhibitorias de AChE [22]. Los extractos que presentan inhibición $>50\%$ son considerados potentes, inhibidores moderados 30-50% de inhibición e inhibidores débiles $<30\%$ de inhibición [23].

4. CONCLUSIONES

La prospección fitoquímica presentó resultados positivos para algunas sustancias presentes en las hojas de *C. laurifolium*, se verificó que el extracto bruto etanólico de la planta, posee en su constitución sustancias como: taninos, flavonoides, esteroides y saponinas.

En cuanto a los resultados indican que las fracciones de *C. laurifolium* estudiados, contienen compuestos de acción fungicida y se verifica que el subgrupo 8 que presentó en la mayoría de los ensayos biológicos un potencial de inhibición bien elevado en diferentes concentraciones.

5. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la profesora Jacqueline Aparecida Takahashi del Departamento de Química de la Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), la realización de los ensayos microbiológicos y de inhibición de acetilcolinesterasa que se muestran en este trabajo. Por otra parte, hemos de agradecer también al Banco Santander, CAPES, CNPq, UFRR y al Núcleo de

Pesquisa e Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia (NPPGCT).

6. REFERENCIAS Y NOTAS

- [1] Pietrovski, E. F.; Rosa, K. A.; Facundo, V. A.; Rios, K.; Marques, M. A. C.; Santos, A. R. *Pharmacol. Biochem. Be.* **2006**, *83*, 99. [[CrossRef](#)]
- [2] Rodrigues, M. G.; Praxedes, S. I.; Dutra, C. M.; Taveira, J. N.; Souza, F. H.; Barbosa, F. J.; Guedes, S. A.; Lopes, S. A.; Fechine, T. J.; Batista, L. M. *Molecules* **2012**, *17*, 9142. [[CrossRef](#)]
- [3] Kulisic, T.; Radonic, A.; Katalinic, V.; Millos, M. *Food Chem.* **2004**, *85*, 663. [[CrossRef](#)]
- [4] Matos, F. J. A. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. 2ª Ed - Fortaleza: UFCE, 141 p., 1997.
- [5] Frank, B.; Gupta, S. *Ann. Clin. Psychiatry* **2005**, *17*, 269. [[CrossRef](#)]
- [6] Ellman, G. L. *Biochem Pharmacol.* **1961**, *7*.
- [7] Burton, R. W. B.; Engelkirk, P. G. *Microbiologia para as ciências da saúde*, 1998.
- [8] Michael J. Pelczar J. R., M. J.; Chan, E. C. S.; Krieg, N. R. *Microbiologia, conceitos e aplicações*. Makron Books, 2 ed., vol. 2, 1997.
- [9] Burton, R. W. B.; Engelkirk, P. G. *Microbiologia para as ciências da saúde*, 1998.
- [10] Jawetz.; Melnick.; Adelberg. *Microbiologia médica*. LANGE, 1998.
- [11] Shiota, S.; Shimizu, M.; Mizushima, T.; Ito, H.; Hatano, T.; Yoshida, T. *Biol. Pharm. Bull.* **1999**, *22*, 12. [[CrossRef](#)]
- [12] Souto, A. L. *Constituintes químicos de Combretum fruticosum* (Loefl.) Stuntz (combretaceae). 2011. 151p. Dissertação (Pós-graduação em produtos naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2011.
- [13] Burton, R. W. B.; Engelkirk, P.G. *Microbiologia para as ciências da saúde*, 1998.
- [14] Bier, O. *Microbiologia e Imunologia*. São Paulo: Melhoramentos, 1994.
- [15] Kaper, J. B.; Nataro, J. P.; Mobley, H. L. T. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 123. [[CrossRef](#)]
- [16] Burton, R. W. B.; Engelkirk, P. G. *Microbiologia para as ciências da saúde*, 1998.
- [17] Murray, P. R. *Microbiologia Médica*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- [18] Brooks, G. F.; Butel, J. S.; Morse, S. A. *Microbiologia Médica*. 21 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- [19] Lacaz, C. S.; Porto, E.; Martins, J. E. C.; Heins-Vaccari, E. M.; De Melo, N. T. *Tratado de Micologia Médica*. São Paulo: Sarvier, 2002.
- [20] Schaechter, M.; Engleberg, N. C.; Eisenstein, B. I.; Medoff, G. *Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- [21] Fisher, F.; Cook, N. B. *Microbiologia: Fundamentos e diagnósticos*. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.
- [22] Trevisan, M. T. S.; Macedo, F. V. V. *Quím. Nova* **2003**, *26*, 301. [[CrossRef](#)]
- [23] Vinutha, B.; Prashanth, D.; Salma, K.; Sreeja, S. L.; Pratiti, D.; Padmaja, R.; Radhika, S.; Amit, A.; Venkateshwarlu, K.; Deepak, M. *J. Ethnopharmac.* **2007**, *109*, 359. [[CrossRef](#)]

Green Synthesis and Characterization of Thymol–guanidine–formaldehyde Terpolymer Resin

Suraj Diwakarrao Kukade*, Ritesh Ramdas Naik, and Sheshrao Vitthalrao Bawankar

Department of Chemistry, Jankidevi Bajaj College of Science, Jannalal Bajaj Marg, Civil lines, Wardha-442001-M.S. India.

Article history: Received: 23 July 2014; revised: 25 November 2014; accepted: 27 November 2014. Available online: 30 December 2014.

Abstract: This paper presents the green synthesis of a terpolymer resin by using the microwave irradiation technique. The resin have been prepared by condensing thymol and guanidine hydrochloride with formaldehyde in 2M HCl using 1:1:2 molar proportions of the reacting monomers in 15 minutes. The synthesized terpolymer resin was purified and then characterized by different spectral methods like ¹H-NMR, FT-IR, and UV-visible to elucidate the structure of the obtained TGF resin.

Keywords: green synthesis; microwave irradiation; spectral analysis; TGF resin

1. INTRODUCTION

Green chemistry for chemical synthesis involves the design and redesign of chemical synthesis and processes to prevent pollution and consume a minimum amount of materials and energy while producing little or no waste material, thereby rendering the products environmentally friendly [1] and it does so in a manner that is economically feasible and cost-effective. More recently, microwave-assisted organic synthesis is a newly developed method to obtain more efficient compounds in a short period of reaction time. After 1990s, this method has begun to be preferred for organic synthesis and polymer synthesis [2]. A huge number of research papers have appeared over the last decades on the application of microwave technology in organic synthesis [3-5].

In recent years, microwave irradiation technique has had much importance in step-growth polymerizations, ring-opening polymerizations as well as radical polymerizations [6-7].

The obtained copolymers are high molecular weight compounds containing covalent bonds, yet they are different from macromolecules. These copolymers are reported to have better acid resistance, better thermal stability, and improved electrical properties. Terpolymer resins having good thermal

stability have enhanced the scope for development of some polymeric materials. Michael and his coworkers have synthesized, characterized, and studied the thermal degradation of a terpolymer prepared from salicylic acid, guanidine, and formaldehyde [8] and 8-hydroxyquinoline–guanidine–formaldehyde [9]. Numerous researchers have synthesized terpolymer resins using microwave irradiation technique and have also characterized by using different spectral methods [10-11]. The spectral analysis of 8-hydroxyquinoline–melamine–formaldehyde resin has been carried out by Gurnule and his coworkers [12] and also reported the thermal degradation of the resin prepared from 4-hydroxyacetophenone and catechol with formaldehyde [13]. Rahangdale et al. have synthesized and studied the resin prepared from 2,2'-dihydroxybiphenyl-biuret-formaldehyde [14]. The preparation and characterization of 2-hydroxy-4-methoxypropiofenone-urea-formaldehyde copolymers have been reported by Patel and his coworkers [15]. Terpolymers prepared by condensation of *o*-cresol and urea with formaldehyde in the presence of an acidic catalyst have also been studied [16]. Chauhan et al. have reported the synthesis of self-crosslinked terpolymer derived from 4-acetylpyridine oxime and formaldehyde with acetophenone and studied the relevant characterization [17]. The synthesis and

*Corresponding author. E-mail: surajdkukade142@gmail.com

characterization of different terpolymer resins have been carried out by many researchers [18-24]. Burkanudeen et al. have reported the synthesis and spectral characterization of anthranilic acid, urea, and formaldehyde in DMF as reaction medium [25-26].

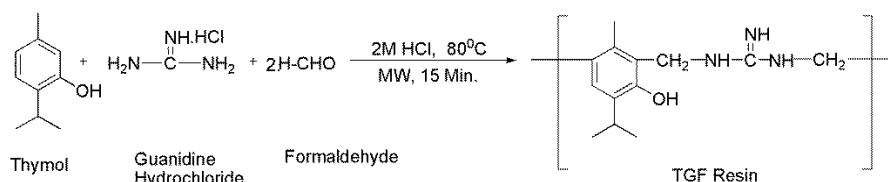
Extensive research work has been carried out on the synthesis, characterization, and stability of different terpolymers by various researchers [27-29].

Thymol (2-isopropyl-5-methylphenol) is an antibacterial agent which has been used in the synthesis and polymerization of certain unsaturated derivatives of thymol [30].

However, literature survey has shown that no polymer resin has been synthesized using the monomers thymol, guanidine hydrochloride, and formaldehyde. Therefore, the present work reports the synthesis of TGF terpolymer resin and their characterization by using various spectral methods.

2. MATERIAL AND METHODS

All the chemicals used as starting materials in



Scheme 1. Synthetic route of thymol-guanidine-formaldehyde terpolymer resin.

Spectral analysis

A Bruker (Model Alpha) spectrometer was used for recording the FT-IR spectrum of the TGF resin to identify the linkages and functional groups. The UV-Visible spectrophotometric studies were carried out on a Shimadzu instrument to identify the types of electronic transitions. The proton NMR spectrum of the TGF terpolymer resin was recorded in CDCl_3 solvent using an FT-NMR spectrometer model Avance-II Bruker at 400 MHz.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The terpolymer resin TGF is yellow in color, insoluble in cold and hot water, but completely soluble in ethanol, diethyl ether, *N,N*-dimethyl formamide, dimethyl sulfoxide, chloroform, carbon

tetrachloride, benzene, acetone, cyclohexane, 1,4-dioxane, and petroleum ether.

Green synthesis of TGF terpolymer resin

The TGF terpolymer resin was synthesized by microwave irradiation technique using monomer thymol (0.1 mol) and guanidine hydrochloride (0.1 mol) with formaldehyde (0.2 mol) in the presence of 2 M HCl medium at 80 ± 2 °C for 15 minutes using a Ragatech Microwave system at 700 W. After completion of the reaction, the mixture was kept overnight at room temperature. The precipitate obtained was filtered and washed with cold water to remove the thymol-formaldehyde copolymer and unreacted materials. The terpolymer was purified by dissolution in 8% NaOH and re-precipitated by drop-wise addition of 1:1 (v/v) of 2 M HCl. The precipitated product was filtered off, washed with cold water, and dried in a vacuum dessicator over anhydrous calcium chloride. The reaction route is shown in Scheme 1. Melting point = 413K. Yield = 1.2993 g.

tetrachloride, benzene, acetone, cyclohexane, 1,4-dioxane, and petroleum ether.

FT-IR spectroscopy

The FT-IR spectrum provides useful information about the linkages and the functional group present in the terpolymer. The FT-IR spectrum of the TGF terpolymer resin is shown in Figure 1 and the data are summarized in Table 1.

The broad band in the region of 3451-3420 cm^{-1} may be due to the stretching vibration of the phenolic hydroxy groups (O-H stretch). The sharp band at 1200 cm^{-1} and another at 1410-1300 cm^{-1} may be due to a C-O stretch. The band in the region 3500-3300 (m) may be due to an N-H stretch (sym. and asym.). The band in the region 3100-3000 cm^{-1} may

be attributed as a C-H stretch and the band appearing in the region 1650-1450 cm^{-1} might appear from a C=C stretch which is a characteristic feature of the aromatic region. The peak in the region 2960-2850 cm^{-1} may be due to a C-H stretch in CH_3 . The band appearing at 1485-1440 (m) is attributed as a C-H

deformation in $-\text{CH}_2-$. The band obtained near 1300 cm^{-1} may be considered as a C-H deformation signal in $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$. The band appearing at 1611 cm^{-1} is probably due to the $-\text{C}=\text{N}$ stretch (imines). The band appearing in the region 850-690 cm^{-1} may be thought to be arising from the substituted benzene ring.

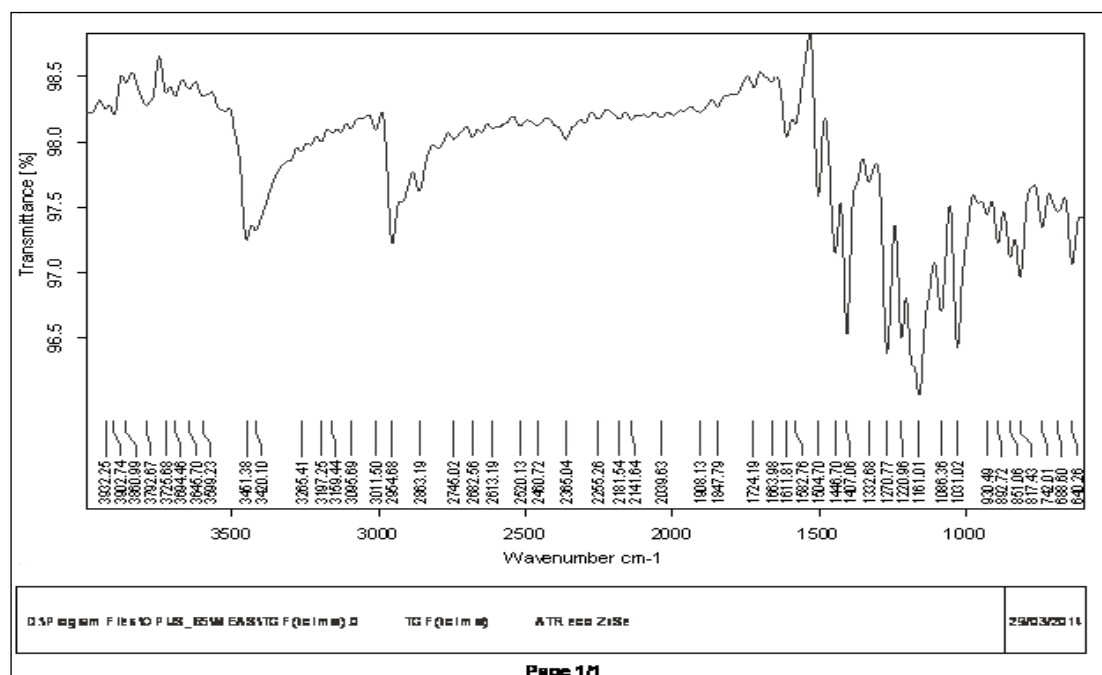


Figure 1. FT-IR spectrum of the TGF terpolymer resin.

Table 1. FT-IR spectral data of the TGF terpolymer resin.

Assignment	Observed band wavenumber (cm^{-1})	Expected band wavenumber (cm^{-1})	References
Phenolic $-\text{OH}$ stretch	3451-3420	3750-200	[8, 9]
-N-H stretch (imide)	3500-3300	3500-800	[8, 9]
-N-H bend(imide)	680	800-600	[8, 9]
Aromatic C=C stretch	1650-1450	1600-450	[8, 9, 32, 34, 35]
Phenolic C-O stretch	1400-1300	1410-1310	[8, 36, 39]
Methylic bridge ($-\text{CH}_2$) modes Rock	741	800-710	[8, 9]
Methylic bridge ($-\text{CH}_2$) modes Bend	1420	1460	[8, 9]
Methylic bridge ($-\text{CH}_2$) modes Wagging	1320	1300-200	[8, 9]
C=N (imines)	1611	1690-630	[9]
-substituted benzene ring	850-690	850-690	[8, 9]

Electronic spectra

The UV-Visible absorption spectrum of the TGF terpolymer resin was recorded in 95% ethanol and shown in Figure 2.

This resin gives rise to two characteristic bands

in the region 200-400 nm. These observed positions of bands indicate the $n-\sigma^*$ transition which may be due to the presence of the C-O moiety of the phenolic OH group. The band at 235 nm indicates the $\pi-\pi^*$ transitions in aromatic moieties as well as the C=N group while the band at 285 nm may be due to the

presence of $n-\pi^*$ transitions in the C=N group. This observation is in good harmony with the most probable structures of such types of a terpolymer.

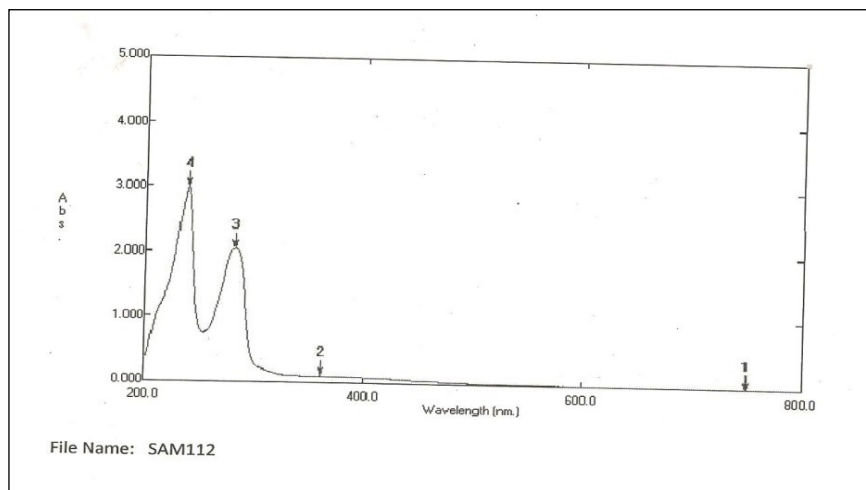


Figure 2. Electronic spectrum of TGF terpolymer resin.

$^1\text{H-NMR}$ spectra

The $^1\text{H-NMR}$ spectrum of TGF terpolymer

resin is depicted in Figure 3 and the data are tabulated in Table 2.

TGF-1

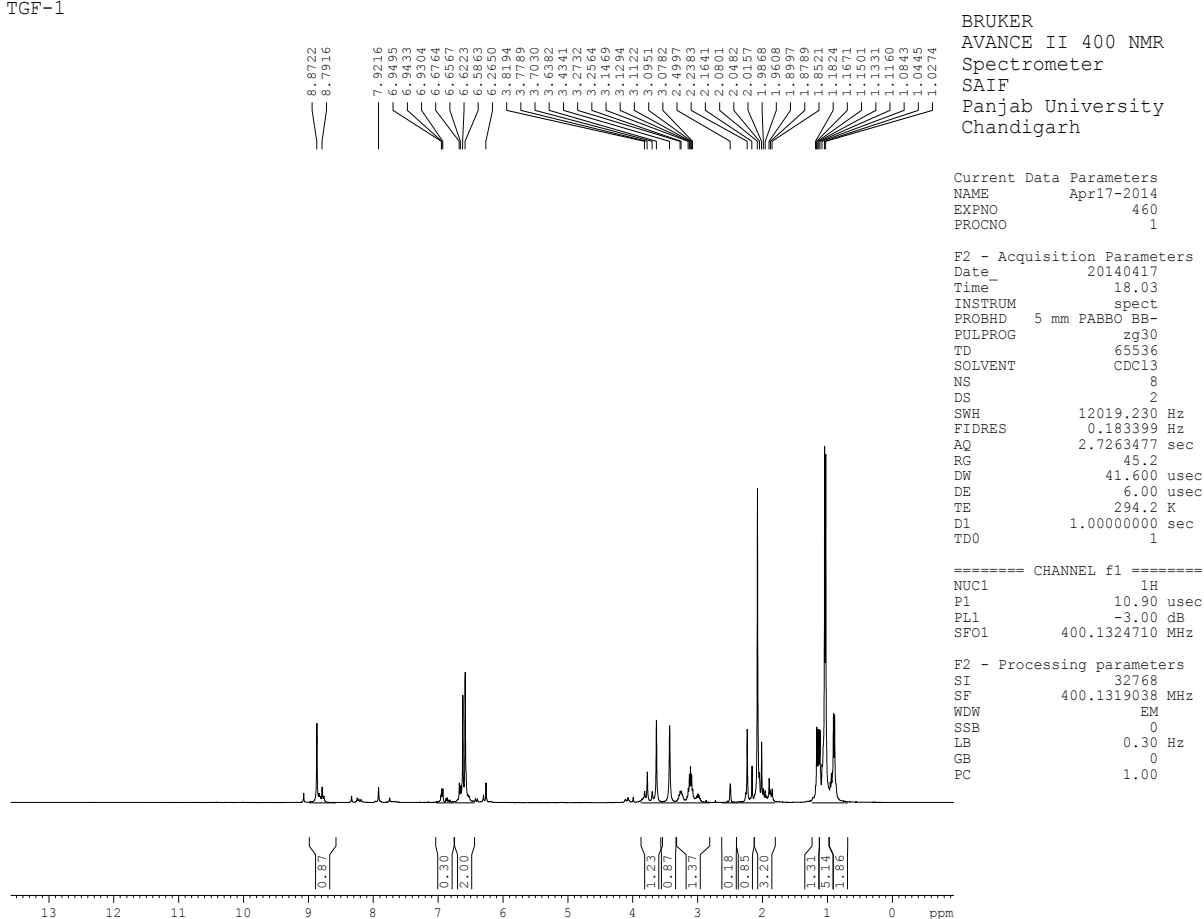


Figure 3. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of TGF terpolymer resin.

Table 2. ¹H-NMR spectral data of TGF terpolymer resin.

Nature of proton assigned in the NMR spectrum	Observed Chemical shift (δ) in the terpolymer (ppm)	Expected chemical shift (δ) (ppm)	References
Aromatic (Ar-H)	6.5-6.8	6-9	[8, 9, 32, 35]
phenolic (Ar-OH)	8.8	4-12	[8, 9, 32]
C=NH proton	6.5	6.5-8	[9]
Ar-CH ₂ -N moiety	3.2	2.5-4.5	[8]
-NH bridging	6.7	5-8	[9, 36]
Ar-CH ₃	2.3	2.2-2.4	[30, 31, 33]
-CH(CH ₃) ₂	2.2-3.2	2-4	[30, 31, 33]
-CH(CH ₃) ₂	1.3	0.9-2	[30, 31, 33]

The signals within the range δ 6.5-6.8 ppm may be caused by the aromatic ring protons (Ar-H). A broad signal appearing about δ 8.8 ppm corresponds to the phenolic (-OH) proton. The signal present in the region δ 2.5-4.5 is attributed to the Ar-CH₂-N moiety. The signal appearing in the range δ 5-8 ppm is considered to be due to -NH- bridging. The sharp signal at δ 1.3 ppm is probably due to the methyl group of thymol moiety in the resin. The signal between δ 2-4 ppm similarly can be thought to originate from the proton of the isopropyl moiety of the resin. The C=NH proton (imine) is thought to originate between δ 6.5-8 ppm.

4. CONCLUSION

The resin TGF was synthesized by the condensation of thymol and guanidine hydrochloride with formaldehyde, in the presence of an acidic catalyst using microwave irradiation. This method is energy-saving as well as time-saving as compared to the conventional method which requires 5 hours for the completion of the reaction. The resin is yellow in color, insoluble in water, and completely soluble in ethanol, diethyl ether, *N,N*-dimethyl formamide, dimethyl sulfoxide, chloroform, carbon tetrachloride, benzene, acetone, cyclohexane, 1,4-dioxane, and petroleum ether. Through FT-IR, UV-visible and ¹H-NMR spectral studies, the proposed structure of the TGF terpolymer resin was confirmed.

5. ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to express their sincere thanks to the Principal, J. B. College of Science, Wardha (India) for providing the necessary facilities and rendering their valuable guidance. The authors also like to thank SAIF, Punjab University, Chandigarh, SAIF, IIT, Bombay and Principal, Institute of Pharmaceutical Education and Research,

Borgaon (Meghe), Wardha, for their services for spectral analysis.

6. REFERENCE AND NOTES

- [1] Dua, R.; Shrivastava, S.; Shrivastava, S.L.; Srivastava, S.K. *Middle-East Journal of Scientific Research* **2012**, *11*, 846.
- [2] Lin, S.Y.; Isome, Y.; Stewart, E.; Liu, J.F.; Yohannes, D.; Yu, L. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 2883. [[CrossRef](#)]
- [3] Shah, B.A.; Shah, A.V.; Patel, N. B. *Iran. Polym. J.* **2008**, *17*, 3.
- [4] Singh, P.; Quraishi, M. A.; Ebenso, E. E. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013**, *8*, 10890.
- [5] Karabulut, E.; Ozdemir, Z. O.; Yolacan, C.; Saricay, Y.; Mustafaeva, Z. *Hacettepe J. Biol. Chem.* **2008**, *36*, 319.
- [6] Mallakpour, S.; Rafiee, Z. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36*, 1754. [[CrossRef](#)]
- [7] Mallakpour, S.; Dinari, M. *Polym. Adv. Technol.* **2008**, *19*, 1334. [[CrossRef](#)]
- [8] Michael, P. E. P.; Lingala, P. S.; Juneja, H. D.; Paliwal, L. *J. J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *92*, 2278. [[CrossRef](#)]
- [9] Michael, P. E. P.; Barbe, J. M.; Juneja, H. D.; Paliwal, L. *J. Eur. Polym. J.* **2007**, *43*, 4995. [[CrossRef](#)]
- [10] Manawwer, A.; Naser, M. A. *J. Polym. Environ.* **2011**, *19*, 784. [[CrossRef](#)]
- [11] Azarudeen, R. S.; Riswan Ahamed, M. A.; Jeyakumar, D.; Burkanudeen, A. R. *Iran. Polym. J.* **2009**, *18*, 821.
- [12] Gurnule, W. B.; Juneja, H. D.; Paliwal, L. *J. Asian J. Chem.* **2000**, *12*, 51.
- [13] Gurnule, W. B.; Mandavgade, S. K.; Dontulwar, J. R. *Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci.* **2012**, *3*, 534.
- [14] Rahangdale, S. S.; Gurnule, W. B. *Chem. Sci. Trans.* **2013**, *2*, 287. [[CrossRef](#)]
- [15] Patel, G. C.; Patel, M. M. *Proc. Indian Acad. Sci.* **1991**, *103*, 539.
- [16] Karunakaran, M.; Magesh, C. *Arabian J. Chem.* **2011**, *4*, 339. [[CrossRef](#)]
- [17] Chauhan, N. P. S.; Ameta, S. C. *Polym. Degrad. Stab.* **2011**, *96*, 1420. [[CrossRef](#)]
- [18] Gurnule, W. B.; Katkamwar, S. S. *E-J. Chem.* **2010**, *7*, 1380.
- [19] Masram, D. T. *E-J. Chem.* **2009**, *6*, 830.

- [20] Masram, D. T.; Kariya, K. P.; Bhave, N. S. *Elixir Appl. Chem.* **2013**, 57A, 14470.
- [21] Masram, D. T.; Kariya, K. P.; Bhave, N. S. *Elixir Appl. Chem.* **2012**, 48, 9557.
- [22] Riswan Ahamed, M. A.; Azarudeen, R. S.; Karunakaran, M.; Burkanudeen, A. R. *Iran. Polym. J.* **2010**, 19, 635.
- [23] Nandekar, K. A.; Dontulwar, J. R.; Gurnule, W. B. *Rasayan J. Chem.* **2012**, 5, 261.
- [24] Kushwaha, A. D.; Hiwase, V. V.; Kalambe, A. B.; Kapse, S. K. *Arch. Appl. Sci. Res.* **2012**, 4, 1502.
- [25] Burkanudeen, A. R.; Azarudeen, R. S.; Riswan Ahamed, M. A.; Gurnule, W. B. *Polym. Bull.* **2011**, 67, 1553. [[CrossRef](#)]
- [26] Dharkar, K. P.; Khamborkar A. K.; Kalambe, A. B. *Res. J. Chem. Sci.* **2012**, 2, 11.
- [27] Kushwaha, A. D.; Hiwase, V. V.; Kalambe, A. B. *Chem. Sin.* **2012**, 3, 794.
- [28] Ingle, S. S.; Hiwase, V. V.; Kalambe, A. B. *Arch. Appl. Sci. Res.* **2012**, 4, 1932.
- [29] Singru, R. N.; Gurnule, W. B. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2010**, 100, 1027. [[CrossRef](#)]
- [30] Moszner, N.; Salz, U.; Rheinberger, V. *Polym. Bull.* **1994**, 33, 7. [[CrossRef](#)]
- [31] Nagle, P. S.; Pawar, Y. A.; Sonawane, A. E.; Nikum, A. P.; Patil, U. D.; More, D. H. *IAJPR* **2013**, 3, 7549.
- [32] Sharma, Y. R.; Elementary Organic Spectroscopy: Principles and Chemical Applications, 5th ed. New Delhi: S. Chand and company Ltd., 2011.
- [33] Zee, O. P.; Kim, D. K.; Lee, K. R. *Arch. Pharm. Res.* **1998**, 21, 618. [[CrossRef](#)]
- [34] Silverstein, R. M.; Bassler, G. C. Spectroscopic Identification of Organic compounds, 2nd ed. New York: Wiley, 1969.
- [35] Kemp, W. Organic Spectroscopy, 3rd ed. Hong Kong: Macmillan, 1975.
- [36] Strupinska, M.; Suchar, G. R.; Chaber, E. P.; Stables, J. P.; Jiang, J.; Paruszewski, R. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research* **2013**, 70, 681.

Propiedades Físico-químicas por RMN de ^1H y Constituyentes en el Aceite de *Carapa Guianensis* por ESI-MS

Elson F. da Silva^a, Ismael F. Montero^{*b,c}, Antônio A. Melo Filho^{c,d,e}, Ricardo C. Santos^d, Pedro Romulo E. Ribeiro^c, Ane Karina Porto Costa^e, Ana Cristina Gonçalves de Melo^c

^aPrograma Post-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiales. Universidade Federal de Sergipe. UFS. Av. Mal. Rondon s/n, São Cristóvão, SE, Brasil.

^bPrograma Intercambio Santander: Universidad de Extremadura (España) y Universidade Federal de Roraima (Brasil).

^cPrograma Post-Graduação em Química, UFRR. Av. Cap. Ene Garcez, 2413, Bairro Aeroporto. CEP: 69310-000. Boa Vista, RR, Brasil.

^dPrograma Doctorado en Biodiversidad y Biotecnología (BIONORTE), UFRR. Boa Vista, RR, Brasil.

^eDepartamento de Química, UFRR. Boa Vista, RR, Brasil.

Article history: Received: 23 September 2014; revised: 21 October 2014; accepted: 13 November 2014. Available online: 30 December 2014.

Abstract: The andiroba belongs to the botanical family Meliaceae, found in the Amazon mainly two varieties, *Carapa guianensis* and *C. procera*. They are species with large logging utility and extracted oil has many uses, especially in lighting, such as healing use, insecticide and anti-inflammatory. In this paper the physico-chemical properties of oil of *C. guianensis* in São João da Beacon, Roraima through calculations from ^1H NMR spectrum using the computer program PROTÓLEOS properties are studied by ESI-MS technique to determine the constituents of said oil are linolenic acid (9.99%), linoleic acid (13.14%), oleic acid (47.32%), unsaturated (70.45%) fatty acid and saturated fatty acids (29.55%). The extracted oil of andiroba oil has a yield of 67.03% being the physicochemical properties of the oil as follows: 48.4 mg I_2/g of iodine; 161.67 mg KOH/g of saponification; 1.84% of acid; 1004.02 g/mol average molecular weight; 159.83 mg KOH/g of ester value; 98.87% percent of ester and 0.9166 g/cm³ for the density at 25 °C. Constituents determined by ESI-MS include: 1,1'-methyl-2,2'-dicarboxylate diantraquinona, dimethyl pirofosfosantoninate, 2,4,6-tris-(3,5-di-butyl-4-tec-hidroxi-bencil)styrene, (2,3,7,8,12,13,17,18-octanoilporfirinate) - Mg(II).

Keywords: fatty acids; andiroba; ESI-MS, ^1H NMR

1. INTRODUCCIÓN

La andiroba, se encuentra desde América Central hasta Paraguay, pero es más predominante en la región amazónica, donde están presentes dos especies de andiroba distintas, que son *Carapa guianensis* y *C. procera*, ambas destacan por ser árboles de gran tamaño llegando a alcanzar los treinta metros de altura, pertenecientes a la familia de las *Meliaceae*s, importante familia productora de buenas maderas, entre las que destacan el cedro rosa y caoba. Es considerado noble, es fácil de trabajar y muy buscada en el mercado interno y externo, presentando excelente calidad en la fabricación de muebles, piezas decorativas y como piezas internas en construcciones

navales [1].

Por tanto, la andiroba es una de las especies florales, no maderera destacada en el norte de Brasil, debido al uso de su óleo que es extraído de las semillas y tiene demanda nacional e internacional, ya que es usado en la iluminación, en la confección de jabón y velas, en la industria de cosméticos y en la medicina popular, presentando funciones cicatrizantes, antiinflamatorias e insecticidas [2].

La exploración de productos forestales no madereros, tiende a aumentar, presentándose como una alternativa para el desenvolvimiento socioeconómico de una región con bajo impacto

*Corresponding author. E-mail: ismofe04@alumnos.unex.es

ambiental. El interés mundial por los productos forestales no madereros, representan un gran potencial para el uso múltiple en las flores, evidenciando por el creciente interés por productos naturales sumándose a la preocupación con la conservación de los ecosistemas forestales [3].

El óleo de andiroba está compuesto básicamente por ácidos grasos mayoritarios como: mirístico, esteárico, oléico (G-9), linoléico (G-6) e linolenico (G-3). Presenta color amarillo claro transparente, solidifica a temperaturas inferiores a 25 °C, tiene sabor amargo y es considerado impropio para la alimentación [4-5]. Es reconocido oficialmente por el Ministerio de Salud de Brasil como poseedor de propiedades fitoterápicas. Posee propiedades medicinales en la aplicación para combatir principalmente los síntomas de gripe, infección en la garganta e hinchazón [6]. También se le considera como un repelente natural de insectos, velas repelentes, y jabones [7].

Las áreas con mayor cantidad de andiroba en Roraima, se localizan al sur del Estado, en los municipios de São João da Baliza, Caroebe e Rorainópolis. Las muestras de semillas para este estudio fueron recolectadas en poblaciones de andiroba nativas en la época de invierno con producción de frutos en el municipio de São João da Baliza, que a su vez fue monitorizado por EMBRAPA-RR.

A pesar de la andiroba ser un árbol en la región Amazónica, y en especial en la región sur del estado de Roraima, donde su óleo presenta beneficios para la salud, todavía presenta pocas informaciones y datos en la literatura con respecto a estudios químicos. Por tanto, este trabajo, tiene como objetivo determinar las propiedades físico-químicas de los óleos de la simiente de andiroba por resonancia magnética nuclear de hidrogeno, RMN ^1H , así como realizar la caracterización de los constituyentes presentes en dicho óleo mediante la técnica espectrometría de masas en electrospray, ESI-MS, en el municipio de São João de Baliza, en Roraima.

2. MATERIAL Y MÉTODO

Obtención de las muestras

Las muestras de semillas de andiroba (*C. guianensis*), identificadas por EMBRAPA-RR, fueron recolectada en período de invierno, por ser época de producción de frutos, siendo tomadas de árboles

adultos localizados al sur del estado de Roraima, en el municipio de São João da Baliza, a 313 Km de la capital Boa Vista.

El clima en la región, es clasificado como tropical lluvioso con pequeño periodo de sequía, con precipitación anual media entre 1700-2000 mm. El periodo lluvioso ocurre con mayor frecuencia de abril a agosto con precipitaciones mensuales superiores a los 100 mm. A partir del mes de septiembre ocurre una sensible reducción, con periodo característicamente seco durante los meses de noviembre a marzo, siendo la temperatura anual media de 27 °C [8].

Extracción por soxhlet

Para este proceso, es empleado un matraz de fondo redondo que contiene el solvente, un condensador, una manta calefactora y el equipo de extracción Soxhlet, cuyo interior tiene un recubrimiento que contiene la muestra. La ventaja de este método es el hecho de que la muestra y el solvente están en contacto íntimo y continuo, y a la par de eso, el solvente empleado para la extracción es el hexano, puede ser recuperado, a través de una destilación, empleando un rotavapor. En cuanto a las desventajas de este método es que requiere mucho tiempo en la extracción, pudiendo variar entre 3-8 horas dependiendo de la materia prima.

Estudio químico de las propiedades de andiroba mediante RMN de ^1H

Para realizar el análisis químico por RMN de ^1H , aproximadamente 10 mg de muestra fue solubilizada en 0.6 mL de cloroformo deuterado CDCl_3 , y a sus espectros de RMN de ^1H (400 MHz), fueron obtenidos utilizándose un espectrómetro de RMN de 11.7 Tesla.

Para los núcleos de ^1H , fueron utilizados los siguientes parámetros de trabajo: pulso; 45°, tiempo de reflexión: 1 s, tiempo de adquisición: 2.049 s; ancho de barrido: 7997.6 Hz, ancho de línea; 0.2 Hz. Fueron acumuladas 64 repeticiones para cada decaimiento inducido libre (FID) con un tiempo total de 3 min y 21 s.

Las propiedades físico químicas fueron evaluadas por medio de la técnica de RMN de ^1H , realizadas en el centro de Biotecnología da Amazonia (CBA).

El índice de yodo (IY), índice de acidez (IA), índice de saponificación (IS) y masa molecular media (MM), pueden ser medidos cuantitativamente a través de dicha técnica [5].

Perfil de los ésteres metílicos de ácidos grasos por RMN de ^1H

Para la cuantificación de los ácidos grasos del aceite de andiroba, fueron utilizadas las ecuaciones, estudiadas por:

Knothe y Kenar [9] para:

$$\text{Ácido oleico: } \omega_9 (\%) = 100 \cdot [(k/3) - 4 \cdot \omega_6 - 6 \cdot \omega_3] / 2$$

Guillén y Ruiz (2003) para:

$$\text{Ácido linoleico: } \omega_6 (\%) = 100 \cdot [(g/f) - 2[b / (a + b)]]$$

$$\text{Ácido linolénico: } \omega_3 (\%) = 100 \cdot [b / (a + b)]$$

Kirb, Fofana y McCallum [10]:

$$\text{Ácidos Grasos Saturados (AGS \%)} = 100 \cdot (1 - \omega_3 - \omega_6 - \omega_9)$$

Cuanto la caracterización físico-química del IY, IS, IA y MM, se aplica las siguientes ecuaciones, presentadas por Reda y Carneiro [16]:

$$\text{IY} = (126.91 \cdot 100 \cdot V) / \text{MM} \quad (\text{en que } V \text{ es el número de protones vinílicos})$$

$$\text{IS} = 398.42 - (\text{MM} \cdot 0.2358)$$

$$\text{IA} = 3.0597 \cdot r^2 - 6.3181 \cdot r + 3.3381$$

$$\text{MM} = 11.97 + 7.036 \cdot T + 5.983 \cdot V$$

Para realizar las ecuaciones presentadas, se desarrolló un programa computacional, no registrado, llamado PROTÓLEOS. Este fue utilizado apenas para cálculos de las integrales del espectro de RMN de ^1H , reduciendo, por tanto, el tiempo de análisis.

Análisis de los constituyentes de andiroba mediante ESI-MS

Los análisis de espectroscopia de masas, fueron llevados a cabo en un espectrómetro de masas en electrospray. El barrido de relaciones m/z osciló entre 90 y 1000 empleando modo negativo y positivo y los parámetros empleados fueron: gas de nebulización 500 L/h a 140 °C, el gas sale por el cono a una velocidad de 50L/h y la temperatura de la fuente es de 100 °C. El voltaje de capilaridad y el voltaje del cono oscila entre $\pm 4.0 - 4.5$ kV (-4.0 kV para iones en modo negativo y 4.0 kV para iones en modo positivo). El análisis fue realizado empleando una solución de LockSpray y ácido fosfórico (0.1 % en acetonitrilo /agua 1:1). La solución simple, fue preparada en acetonitrilo por adición de 20 μL de ácido fórmico e hidróxido de amonio. Las muestras de aceite de andiroba, para ambos modos, fueron analizadas en tres solventes diferentes: hexano, etanol y metanol.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1, se muestran los resultados obtenidos para las propiedades físico-químicas del aceite de andiroba obtenido por hexano, comparando con resultados de la bibliografía.

Tabla 1. Caracterización físico-química del aceite de andiroba comparado con datos bibliográficos.

Aceite Vegetal	IY (mg I ₂ / g)	IS (mg KOH / g)	IA (mg KOH / g)	MM (g / Mol)
Andiroba (Estudio actual)	48.41	161.67	1.84	1004.02
Pereira et al., 2008 [11] Colares/PA	Na	214.76	2.13	Na
Pereira et al., 2008 [11] Baía do Sol/PA	Na	218.62	8.12	Na
Pereira et al., 2008 [11] Ilha das Onças/PA	Na	226.29	3.18	Na
Fereira et al., 2005 [12] Mazagão/PA	70.23	190.70	6.95	Na
Costa et al., 1995[13]	56.75	148.36	1.17	Na

Na = No analizado

La cantidad de ésteres en el óleo de andiroba en hexano presentó un valor de 159.83 mg KOH/g siendo inferior al encontrado por Silva [5] con 191.97

mg KOH/g, pero el porcentaje de ésteres en la muestra da un valor elevado, ya que el contenido de triglicéridos es superior al 98 %.

Hidrógenos olefínicos/alifáticos

Para calcular la acidez, fue necesario en primer lugar calcular la relación entre hidrógenos olefínicos y alifáticos. Esa relación es un parámetro que indica el grado de insaturación y el estado de oxidación de los aceites, siendo más preciso que el índice de peróxido.

La relación hidrógenos olefínicos/alifáticos encontrada para el aceite de andiroba fue de 0.27 siendo un valor inferior al del aceite de aguacate estudiado por Feitosa [14]. Cuya razón molar obtenida fue 0.57 y ambos inferiores al óleo de limón siciliano con 0.69 en el trabajo de Reda; Carneiro (2005) [15].

Para la relación hidrógenos olefínicos/alifáticos con valor ≥ 0.66 significa que el óleo vegetal puede ser considerado apropiado para el consumo humano [15]. Luego conforme a los datos obtenidos en este estudio, el aceite de andiroba no es apropiado para tal uso, pero si podría usarse en pequeñas cantidades para uso medicinal.

Composición química del aceite de andiroba mediante RMN de H^1

El espectro integrado del aceite de andiroba, es similar al de otros óleos vegetales y a partir de la intensidad de las señales de dicho espectro, puede ser calculada la composición de ácidos grasos insaturados y saturados.

Según Reda y Carneiro [16] el espectro de RMN de 1H , presenta 11 señales (A-K) con intensidades significativas, estando estas señales de acuerdo con los hidrógenos de los principales componentes en los óleos, o en los triglicéridos. La atribución general de las señales en el espectro, ya fueron estudiadas previamente por algunos investigadores como Johnson y Schoolery (1962), [17] Sachi et al. (1996), [18] Miyake et al. (1998), [19] Vigli et al. (2003), Knothe y Kenar (2004) [20] y Kirby et al. (2011) [10].

Las principales señales que muestra el espectro se muestran en la Figura 1 y los respectivos desdoblamientos se recogen en la Tabla 2.

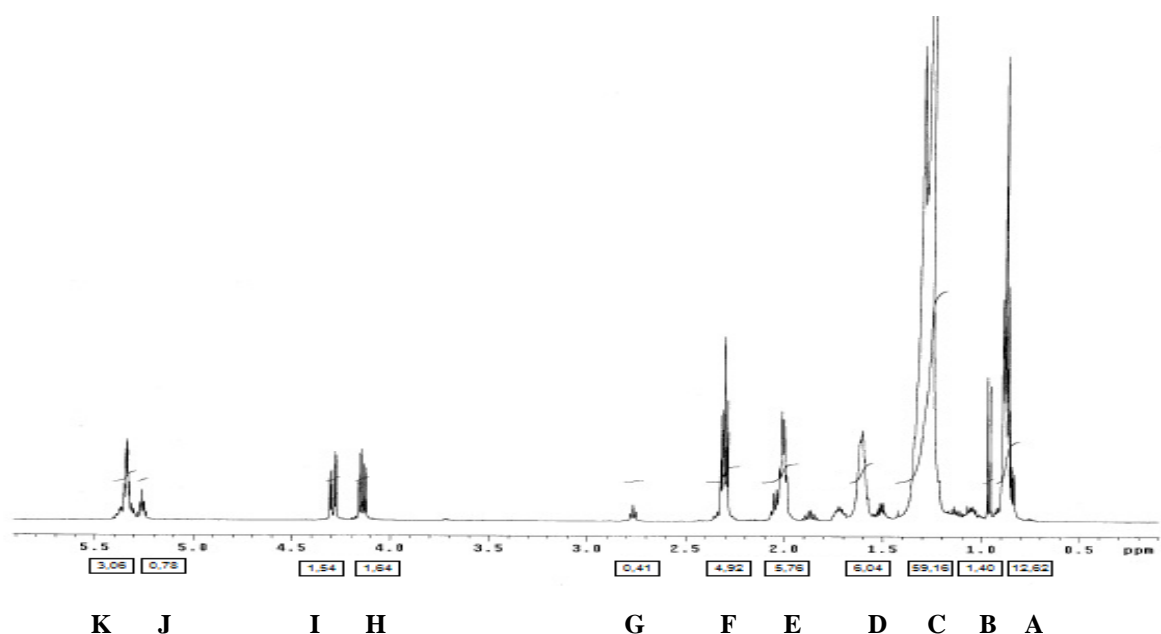


Figura 1. Espectro del aceite de andiroba obtenido en cloroformo, usando como patrón interno el TMS.

Es importante reseñar que la integral de las señales, es proporcional al número de hidrógenos presentes en cada grupo funcional [21].

En la Tabla 2, se pueden encontrar las señales características de los óleos vegetales con su respectivo protón. El espectro de andiroba se refiere al aceite no refinado [5, 20].

Como puede observarse, en la Tabla 2, los hidrógenos metílicos de los ácidos saturados, oléico, linoléico y linolenico, aparecen registrados con la señal "a" entre 0.83 y 0.93 ppm. Estas señales, referentes a estos componentes, fueron posteriormente confirmadas mediante su análisis en cromatografía gaseosa.

Tabla 2. Hidrógenos característicos de los aceites esenciales.

Señal	Desplazamiento (δ) ppm	Hidrógeno (H)	Grupo funcional
A	0.83 - 0.93	-CH ₃	Hidrógenos metílicos
B	0.93 - 1.03	-CH ₃	Hidrógenos metílicos del ácido linoléico
C	1.22 - 1.42	-(CH ₂) _n -	Hidrógenos metilénico dos ácidos grasos de triacilglicerol
D	1.52 - 1.70	-OCO-CH ₂ -CH ₂ -	Hidrógenos beta-carboxílicos
E	1.94 - 2.14	-CH ₂ -CH=CH-	Hidrógenos alílicos externos
F	2.23 - 2.36	-OCO-CH ₂ -	Hidrógenos alfa-carboxílicos
G	2.70 - 2.84	=HC-CH ₂ -CH=	Hidrógenos alílicos internos
H	4.10 - 4.25	-CH ₂ OCOR	Hidrógenos metilénicos de glicerol
I	4.25 - 4.32	-CH ₂ OCOR	Hidrógenos metilénicos de glicerol
J	5.20 - 5.26	>CHOCOR	Hidrógenos H-2 metilénicos de glicerol
K	5.26 - 5.40	-CH=CH-	Hidrógenos olefínicos

Los óleos vegetales, presentan diferentes proporciones de ácidos grasos saturados (AGS), ácido oleico (G-9), ácido linoléico (G-6) y linoléico (G-3), de manera que las señales resultantes son consecuencia de la sobreposición de protones metílicos de tripletes, formando diferentes desplazamientos químicos y presentan tamaños

distintos dependiendo de la proporción de ácidos grasos.

Las proporciones de los diferentes ácidos grasos, pueden ser determinados mediante el espectro de RMN de ¹H [10]. Recogiéndose los resultados en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición de ácidos grasos en el aceite de andiroba y comparación con otros aceites.

Ácidos grasos (%)	Andiroba (Estudio actual)	Girasol [22]	Aguacate [14]	Limón [15]
Linoléico (G-3)	9.99	0.37	Nd	10.70
Linoléico (G-6)	13.14	57.20	13.00	30.80
Oleico (G-9)	4.32	38.60	64.00	29.20
Insaturación	70.45	96.17	77.00	70.70
Saturados	29.55	3.83	23.00	29.30

Nd = no detectado

Al analizar la Tabla 3, se verifica que el ácido linoléico, fue detectado en el aceite de andiroba con hexano al 9.99%, valor próximo al aceite de limón, encontrado por Carneiro et al. [22] con un valor de 10.70%. Según Lehninger [23], este ácido no puede ser sintetizado por los mamíferos, pero sí obtenido de fuentes vegetales, que son bastante abundantes, teniendo importancia para la salud en la prevención de diabetes, ansiedad, estrés y ciertos tipos de cáncer.

Para el ácido linoleico el aceite de andiroba, presentó 13.14% y fue obtenido en una concentración próxima a la del aceite de aguacate con 13.00%. Superior al del aceite de oliva e inferior al aceite de limón, girasol y soja [14]. Al comparar los datos de este trabajo con los resultados de la literatura, el contenido de ácido linoleico presente en el aceite de limón, [15] soja y girasol [5] presentan valores

superiores al encontrado en el óleo de andiroba, siendo respectivamente de 30.80%, 56.20% y 57.20%.

La concentración de ácido oleico en el aceite de andiroba fue de 47.32%, estando dentro del intervalo de 26.40% - 84.60% de los aceites presentados en la Tabla 3. El ácido oleico es el principal ácido graso del grupo de los ácidos grasos monoinsaturados, de forma que un aceite rico en oleico ayuda a disminuir la concentración plasmática de lipoproteína de baja densidad (LDL) lo que conlleva a la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares [24].

El grado de insaturación fue del 70.45% para el aceite de andiroba, encontrándose dentro de los valores para los aceites estudiados. Según Santos [25] la presencia de ácidos grasos insaturados es la

responsable de la calidad de aceites vegetales usados en el consumo humano.

En la Tabla 4, se muestran los valores de ácidos grasos de aceites de andiroba encontrados en la bibliografía.

Tabla 4. Composición de ácidos grasos mayoritarios en el aceite de andiroba.

Ácido graso (%)	Andiroba (Estudio actual)	Oliveira, 2008 [26]	García, 2006 [25]	Silva, 2005 [5]	Costa et al., 1999 [13]
GD-3	9.99	0.17	Nd	0.24	Nd
GD-6	13.14	9.60	10.30	8.30	9.08
GD-9	47.32	53.49	52.20	51.81	46.15
Insaturados	70.45	63.26	62.50	60.35	55.23
Saturados	29.55	34.69	37.30	36.45	36.41

Nd = no detectado

Se observa en la tabla 4 que el ácido linolénico fue detectado para un aceite de andiroba. Olivera [26] y Silva [5] con valores del 9.99 %, 0.17% y 0.24% respectivamente, no encontrándose en los estudios de García [27] y Costa. [13]

Para el ácido linoleico fue encontrado la mayor concentración con 13.14% en el aceite de andiroba, seguido por García (2006), [27] Oliveira (2008), [26] Costa et al. (1995) [13] y Silva (2005) [28] con valores de 10.30%, 9.60%, 9.08% y 8.30%, respectivamente.

La concentración de ácido oleico en el aceite de andiroba en hexano con un valor de 47.32% presentó un valor próximo al encontrado por Costa y colaboradores [13] con 46.15%, no entando menor que Oliveira (2008), [26] García (2006) [27] y Silva (2005) [5].

El grado de insaturación para el aceite de andiroba en hexano fue superior a todos los demás

con un valor del 70.45%, seguido por Oliveira (2008), [26] García (2006), [27] Silva (2005) [5] y Costa et al. (1995) [13] con valores de 63.26%, 62.50 %, 60.35% y 55.23% respectivamente.

La composición de ácidos grasos saturados del aceite de andiroba en hexano, presentó un valor inferior a los demás valores estudiados, mostrados en la Tabla 4 con un valor del 29.55%.

Determinación de la composición química de los constituyentes presentes en dicho aceite empleando la técnica ESI-MS

Mediante la técnica ESI-MS, se pudieron determinar hasta 155 constituyentes en el aceite de andiroba, empleando modo negativo y modo positivo para distintos solventes: metanol, etanol y hexano. En la Figura 3, se muestra el espectro de masas obtenido para la muestra de aceite de andiroba obtenido mediante ESI-MS.

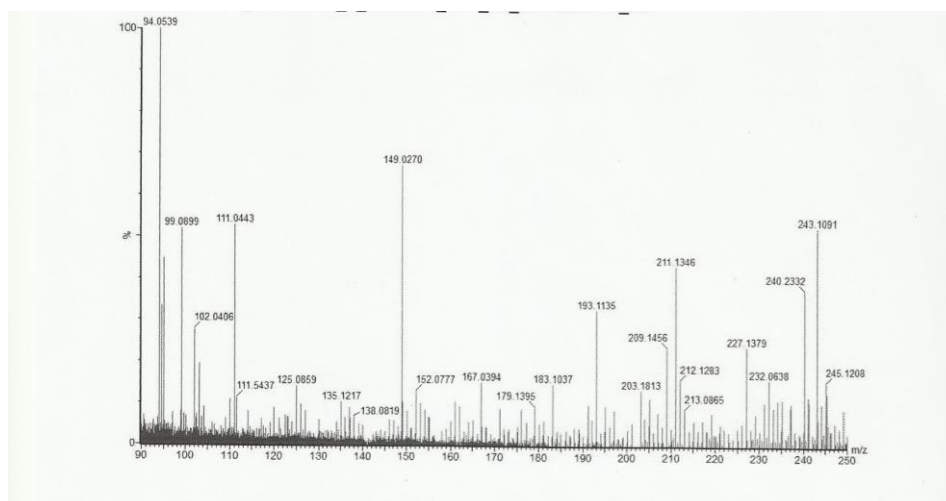


Figura 3. Espectro de andiroba obtenido mediante ESI-MS.

En la Tabla 5, se muestran los constituyentes mayoritarios determinados mediante dicha técnica, no

existiendo datos bibliográficos para poder llevar a cabo una comparativa.

Tabla 5. Constituyentes mayoritarios en el aceite de andiroba determinados mediante ESI-MS.

Masa	intensidad	Fórmula molecular	compuesto
471	100	C ₃₂ H ₁₈ O ₈	Metil 1,1'-diantraquinona-2,2'-dicarboxilato
509	100	C ₃₁ H ₄₀ O ₇	dimetil pirofosfosantoininato
755	53	C ₅₄ H ₇₈ O ₃	2,4,6-tris-(3,5-di- <i>terc</i> -butil-4-hidroxi-bencil)-estireno
557	90	C ₃₆ H ₄₄ MgN ₄	(2,3,7,8,12,13,17,18-octaetilporfirinato)-magnésio (II)
439	42	C ₂₄ H ₂₂ O ₄ S ₂	Dimetil 5',6'-bis-(tiometil)-p-terfenil-2'-3'-dicarboxilato
453	33	C ₂₇ H ₂₃ N ₃ O ₂ S	p-(bencimidazol-2-il)-N,N-dibencilbencenosulfonamida

4. CONCLUSIONES

Es de destacar la importancia de la técnica de RMN de ¹H en este trabajo para el análisis de ácidos grasos, permitiendo cuantificar el total de ácidos grasos saturados en la muestra, así como los ácidos grasos insaturados en menores concentraciones desarrollando una metodología analítica no destructiva para el estudio de las propiedades físico-químicas de los aceites vegetales en comparación con las técnicas convencionales para determinar dichas propiedades en esos óleos.

Los valores de dichas propiedades estudiadas mediante RMN de ¹H, están en concordancia con los obtenidos por los métodos de análisis convencionales.

El análisis de los componentes en su aceite esencial mediante ESI-MS, abre grandes posibilidades para llevar a cabo aislamiento de dichos constituyentes y estudio de sus propiedades farmacológicas.

5. AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Doctor Ângelo da Cunha Pinto, professor titular del Departamento de Química de la Universidad Federal de Río de Janeiro, por realizar análisis ESIMS, a EMBRAPA Roraima y al CBA, CAPES, CNPq y a UFRR/NPPGCT.

6. REFERENCIAS Y NOTAS

- Gonzaga, A. L.; Madeira: uso e conservação. Brasília: IPHAN/ MONUMENTA, 2006.
- Tonini, H.; Rutinéia, M.; Pereira, N. *Ciê. Flor.* **2012**, *22*, 47.
- Querino, R. B.; Tonini, H.; Marsaro Junior, A. L.; Teles, A. S.; Costa, J. A. M.; Predação de sementes de Andiroba (*Carapa* ssp.) por *Hypsipyla ferrealis* Hampson (Lepidoptera, Pyralidae) em Roraima. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Boa Vista: EMBRAPA Roraima, 2008.
- Carvalho, J. C. T.; Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004.
- Silva, C. L. M.; Obtenção de ésteres etílicos a partir de transesterificação do óleo de andiroba com etanol. [Master's thesis.] Campinas, Brazil: Universidade Estadual de Campinas, 2005. [\[Link\]](#)
- Tonini, H. Costa, P. Kaminski, P. E. *Ciê. Flor.* **2009**, *19*, 1.
- Pena, Jorge W. P.; Frutificação, produção e predação de sementes de *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae) na Amazônia Oriental Brasileira. [Master's thesis.] Belém, Brazil: Universidade Federal Rural da Amazônia, 2007. [\[Link\]](#)
- Fundação do Meio Ambiente Ciência e Tecnologia do Estado de Roraima, FEMACT. O Brasil do hemisfério norte: Diagnóstico científico e tecnológico para o desenvolvimento. Boa Vista: Ambitec, 1993.
- Knothe, G.; Kenar, J. A. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2004**, *106*, 88. [\[CrossRef\]](#)
- Kirby, C. W.; Hccallum, J. L.; Fosfana, B. *Can. J. Chem.* **2001**, *89*, 1138. [\[CrossRef\]](#)
- Pereira, R. A. N.; Ferreira, W. N.; Garcia, S. K.; Pereira, M. N.; Bertechini, A. G. *Ciênc. Agrotec.* **2008**, *32*, 573. [\[CrossRef\]](#)
- Ferreira, E. S.; Lucien, V. G.; Silveira, C. S.; Estudo físico-químico do óleo fixo da semente de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.). Abstract of the 2º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas. Óleos, gorduras e Biodiesel, Varginha, Brazil, 2005. [\[Link\]](#)
- Costa, G. M.; Santos, G. R.; Villarreyes, J. A.; Estudo das variáveis operacionais no processo térmico de óleo de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) através do projeto fatorial de experimentos, 1995.
- Feitosa, G. B.; Lenson, E.; Carneiro, E. B. B.; Carneiro, P. I. B.; *Caracterização do óleo e dos polissacarídeos do fruto de Persea americana Mill (abacate)*. Abstract of the Encontro anual de iniciação científica, São Paulo, Brazil, 2007.
- Carneiro, P. I. B.; Reda, S. Y.; Carneiro, E. B. B. *Ann. Magn. Reson.* **2005**, *4*, 64.
- Reda, S. Y.; Carneiro, P. I. B. Parâmetros físico-químicos do óleo de milho *in natura* e sob aquecimento calculado pelo programa PROTEUS RMN ¹H, UEPG Exact. *Earth Sci. Agr. Sci. Eng.*, **2006**, *1*, 31-36.
- Johson, L. F.; Shoolery, J. N. *Anal. Chem.* **1962**, *34*, 1136. [\[CrossRef\]](#)
- Sacchi, R.; Patumi, M.; Fontanazza, G. ; Barone, P.;

- Fiodiponti, P.; Mannina, L., Rossi, E.; Segre, A. L., *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73*, 747. [[CrossRef](#)]
- [19] Vigli, G.; Phecippidis, A.; Spyros, A.; Dais, P. *J. Agr. Food Chem.* **2003**, *51*, 5715. [[CrossRef](#)]
- [20] Knothe, G.; Kenar, J. A. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2004**, *106*, 88. [[CrossRef](#)]
- [21] Mannina, L.; Segre, A. *Grasas Aceites* **2006**, *53*, 22.
- [22] Carneiro, P. I. B.; Reda, S. Y.; Carneiro, E. B. B. *Ann. Magn. Reson.*, **2005**, *4*, 64.
- [23] Lehninger, A. L. *Bioquímica*, 2ª ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1976.
- [24] Salgado, J. M.; Bin, C.; Cornélio, A. R. Efeito do abacate (*Persea americana* Mill) variedade Hass na lipídemia de ratos hipercolesterolêmicos. Abstract of the Simpósio Latino Americano de Ciências dos Alimentos, Campinas, Brasil, 2005.
- [25] Santos, C. X.; Caracterização físico-química e análise da composição química da semente de goiaba oriunda de resíduos agroindustriais. [Master's thesis.] Itapetinga, Brazil: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2011. [[Link](#)]
- [26] Oliveira, B. R.; Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa guianensis* e *Copaifera* sp. e estudo da ação repelente frente a *Aedes aegypti*. [Master's thesis.] Ribeirão Preto, Brazil: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2008. [[Link](#)]
- [27] Garcia, J. U.; Santos, H. I.; Fialho, A. P.; Garro, F. L. T.; Antoniosi Filho, N. R.; Leles, M. I. G. *Eclét. Quím.*, **2004**, *29*, 41. [[CrossRef](#)]

Determinação Voltamétrica do Antioxidante Galato de Propila em Biodiesel Empregando Eletrodos de Pasta de Carbono Modificados com Líquido Iônico

Luiz Henrique de Oliveira^a, Ana Caroline Dias Souza^a, Lucas Pizzuti^a, Valdir Souza Ferreira^b, Lauro Antonio Pradela Filho^{c,d}, Regina Massako Takeuchi^c, André Luiz dos Santos^c, Magno Aparecido Gonçalves Trindade^{*a}

^aFaculdade de Ciências e tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados - Itahum, Km 12, Caixa Postal 533, CEP 79804-970, Dourados-MS.

^bInstituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Filinto Muller, 1555, Caixa postal 549, CEP 79074-460, Campo Grande-MS.

^cInstituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Av. João Naves de Ávila, 2121, Santa Mônica. CEP 38400-902 Uberlândia-MG.

^dFaculdade de Ciências Integradas do Pontal, Universidade Federal de Uberlândia, Rua 20, 1600, Tupã. CEP 38304-402 Ituiutaba-MG, Brasil.

Article history: Received: 21 October 2014; revised: 13 November 2014; accepted: 27 November 2014. Available online: 30 December 2014.

Abstract: In this work a carbon paste electrode chemically modified with an ionic liquid (CPE-IL) was used to quantify the antioxidant propyl gallate (PG) in spiked soybean biodiesel samples by square wave voltammetry. Under the optimized conditions, the proposed method have presented a linear range from 2.0 to 47.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, with limit of detection equal to 0.397 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Recovery studies were performed in biodiesel samples spiked with two levels of PG. In all cases, satisfactory recovery percentages and low relative standard deviation values were obtained which is a clear demonstration of the accuracy of the proposed method. It was observed that IL provides a remarkable intensification of PG voltammetric response compared to a non-modified conventional CPE, improving, therefore, the detectability of the voltammetric method. The CPE-IL used in this work does not require an IL completely free from residual water. This is a very attractive feature because time-consuming procedures for water elimination are avoided during the synthesis of the IL. Thus, the proposed CPE-IL can be prepared in a simple, fast and inexpensive way making these electrodes very practical and competitive compared to other chemically modified electrodes proposed in the literature for PG quantification.

Keywords: biodiesel; carbon paste electrodes; square wave voltammetry; propyl gallate; electroanalysis

1. INTRODUÇÃO

A busca por fontes alternativas de energia, que sejam renováveis e biodegradáveis, para substituição parcial ou total dos derivados do petróleo tem aumentado significativamente a utilização de óleos vegetais como matéria-prima na produção de biodiesel [1-3]. Uma das principais contribuições do biodiesel é seu potencial para substituir o petrodiesel para uso em veículos automotores, uma vez que as propriedades físico-químicas de ambos são semelhantes [4-5]. Entretanto, existem algumas limitações no uso do biodiesel em substituição ao

diesel de petróleo, sendo a principal delas o fato do biodiesel apresentar grande tendência ao processo de degradação, o que leva a drásticas e alterações em suas propriedades físico-químicas, as quais podem ser decorrentes da exposição ao ar, luz, umidade, metais, calor e do próprio período de armazenagem [5-6]. Estudos apontam que a adição de agentes antioxidantes sintéticos aumenta a estabilidade química do biodiesel frente ao ar atmosférico, além de aumentar também a estabilidade térmica deste combustível [5-6]. Dentre estes antioxidantes, destaca-se o galato de propila (GP, Figura 1), cuja

*Corresponding author. E-mail: magnotr@gmail.com

adição ao biodiesel pode suprimir ou impedir a degradação, garantindo uma maior estabilidade durante a etapa de manuseio e armazenamento [5].

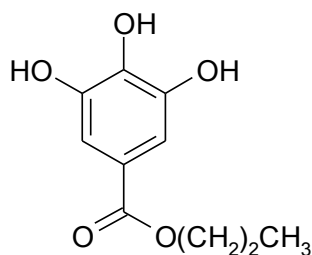


Figura 1. Formula estrutural do antioxidante galato de propila (GP).

A adição destes antioxidantes ao biodiesel é de fundamental importância, uma vez que estes são capazes de preservar ou mesmo intensificar a eficiência de uma série de compostos do biodiesel garantindo melhores condições para o armazenamento deste biocombustível, influenciando positivamente no desempenho dos motores e aumentando a vida útil de peças complexas [5, 7-8]. Portanto, a qualidade do biodiesel está diretamente relacionada à presença e a concentração destes antioxidantes. Sendo assim, o controle das concentrações de antioxidantes no biodiesel é de extrema importância, pois permite monitorar, rigorosamente, a qualidade do biodiesel comercializado no país [7-9]. Para este controle, são necessários métodos analíticos confiáveis, altamente sensíveis e capazes de quantificar estes antioxidantes em baixíssimas concentrações. O desenvolvimento destes métodos analíticos não é uma tarefa trivial, uma vez que o biodiesel é uma matriz relativamente complexa e que, portanto, exige que os métodos analíticos apresentem também elevada seletividade [9-10]. Embora existam vários trabalhos descrevendo a determinação de antioxidantes em amostras alimentícias tais como cebola, mamão, batata frita, refrigerantes, margarina, maionese e óleos comestíveis, [11-13] pouca atenção tem sido dedicada à quantificação destes antioxidantes em amostras de biodiesel. O desenvolvimento de métodos analíticos para a quantificação de antioxidantes em biodiesel é altamente desejável, a fim de desenvolver metodologias mais simples, precisas e exatas e que possam cumprir todos os requisitos exigidos na detecção e quantificação de espécies nesta amostra complexa [14].

No desenvolvimento de métodos para a determinação de antioxidantes em níveis mais baixos, destacam-se as técnicas voltamétricas e os eletrodos de pasta de carbono modificados (EPCM), os quais,

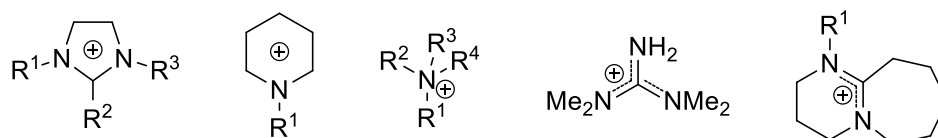
combinados, apresentam características extremamente atrativas, tais como: sensibilidade, precisão, rapidez e estabilidade de resposta, praticidade de uso e baixo custo [15]. A crescente demanda por praticidade nos métodos analíticos de análise incentivou o desenvolvimento dos mais variados tipos de eletrodos quimicamente modificados, sensores eletroquímicos e dispositivos eletrônicos miniaturizados. O principal desafio encontrado para o emprego de eletrodos sólidos convencionais em eletroanálise é o fato de muitas reações redox produzirem espécies que bloqueiam a superfície eletródica, levando a uma gradativa perda de sinal. Assim, a regeneração eficiente da superfície eletródica é um pré-requisito essencial para que um método voltamétrico tenha êxito. Neste contexto, os eletrodos de pasta de carbono (EPC) apresentam-se como uma alternativa vantajosa aos eletrodos sólidos convencionais. Dentre as vantagens associadas aos EPC, pode-se citar: baixo custo, facilidade de construção, manipulação e modificação química, baixas correntes residuais, amplo intervalo útil de potencial e estabilidade química [16-18]. No entanto, um dos aspectos mais atrativos dos EPC é a possibilidade de modificação interna do material, o que permite que a renovação da superfície possa ser realizada de maneira rápida e simples. Portanto, uma superfície de um EPC modificado que tenha sido bloqueada por produtos ou intermediários de uma reação redox, pode ser prontamente regenerada por um simples polimento do eletrodo. As características vantajosas dos EPC têm feito com que o uso destes eletrodos tenha aumentado significativamente, de modo que estes vêm substituindo gradativamente os eletrodos sólidos convencionais [19-21].

No preparo dos EPC, os agentes aglutinantes não iônicos convencionais, como óleo mineral e vaselina líquida, apresentam algumas limitações, tais como: elevada resistividade elétrica, instabilidade em solventes orgânicos, além de não promoverem uma compactação eficiente, o que compromete a resistência mecânica e a condutividade elétrica do eletrodo final [22-24]. Um aglutinante alternativo capaz de contornar muitos destes problemas são os líquidos iônicos à temperatura ambiente (usualmente chamados de RTIL, do inglês, room temperature ionic liquid) [22, 23], cujas propriedades físico-químicas diferenciadas têm despertado um crescente interesse em aplicações eletroanalíticas [22, 23, 25-28]. Dentre as propriedades físico-químicas diferenciadas dos líquidos iônicos (LI), destacam-se: imiscibilidade em soluções aquosas, pressão de vapor e inflamabilidade

negligenciáveis, além de alta estabilidade química e térmica e, em alguns casos, elevada viscosidade. Outra característica extremamente atrativa dos LI é sua baixa toxicidade [29]. Além disso, é possível ajustar as propriedades dos LI conforme a necessidade pela combinação de cátions e ânions diferentes. A literatura apresenta uma grande variedade de LI com

destaque para os cátions e ânions apresentados na Figura 2. Este conjunto de propriedades torna os LI extremamente promissores como aglutinantes alternativos, os quais apresentam elevada potencialidade para o preparo de EPC com desempenho muito superior aos EPC convencionais. [22, 23].

Cátions:



Ânions:

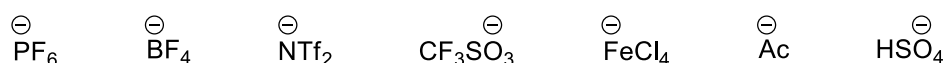


Figura 2. Alguns exemplos de cátions e ânions comumente encontrados nas estruturas dos LIs [26].

Tem sido relatado em diversos trabalhos que a presença de água residual nos LI é um grave problema, principalmente quando o objetivo é utilizá-los em estudos eletroquímicos. Embora os LI constituídos pelo cátion 1-etil-3-metilimidazólio e ânions como tetrafluorborato, nitrato ou sulfato sejam mais resistentes à umidade [24], elevados teores de água podem comprometer suas propriedades. Quantidades significativas de água residual podem permanecer no LI mesmo após os processos de purificação e secagem sob pressão reduzida [22,23,25], o que pode afetar drasticamente as propriedades físico-químicas dos LI, tais como viscosidade e condutividade, comprometendo seriamente o desempenho destes compostos nos sensores eletroquímicos [30-32]. Assim, em várias aplicações eletroanalíticas é desejável o uso de LI com elevada pureza, os quais fornecem resultados satisfatórios e altamente reproduzíveis. Para a obtenção de LI de alta pureza, são realizados procedimentos de secagem sob pressão reduzida, aquecimento por longos períodos com temperatura controlada entre 70 e 80°C para reduzir o teor de água abaixo de 100 mg L⁻¹, que é o mínimo aceitável para não comprometer as propriedades dos LIs, principalmente, em aplicações eletroquímicas [26, 32].

Desta maneira, observa-se que a eliminação da água residual dos LI é um processo demorado e que torna a síntese dos LI complicada e laboriosa. Portanto, neste trabalho, foi explorada a possibilidade

de uso de um LI, preparado sem preocupação excessiva com a eliminação de resíduos de água. Os LI obtidos por este procedimento foram empregados como modificadores químicos em EPC preparados com óleo mineral como aglutinante e foram empregados para determinação voltamétrica do antioxidante galato de propila (GP) em amostras de biodiesel de soja.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes, soluções e amostras

Como eletrólito suporte, foram avaliadas as seguintes soluções: tampão acetato 0,04 mol L⁻¹ preparado pela mistura entre acetato de sódio anidro (Merck) e ácido acético (Merck); tampão fosfato 0,04 mol L⁻¹ preparado com fosfato de sódio dibásico mono-hidratado (Merck) e fosfato de sódio monobásico di-hidratado (Merck) e o tampão Britton-Robinson 0,04 mol L⁻¹ preparado com ácido acético (Merck), ácido bórico (Merck) e ácido fosfórico (Merck). O ajuste do pH desejado foi realizado com ácido clorídrico (Vetec) ou hidróxido de sódio (Vetec), ambos na concentração de 0,10 mol L⁻¹, sendo o intervalo de pH estudado de 2,0 a 10,0. No preparo das soluções estoque do padrão de GP (1,00 e 10,0 mmol L⁻¹) foram dissolvidas quantidades apropriadas do sólido em etanol (Vetec), sendo as soluções resultantes acondicionadas em frascos âmbar e armazenadas sob refrigeração em temperatura de 4,0 ± 1,0 °C.

As amostras de biodiesel foram obtidas a partir da extração e transesterificação do óleo de soja, empregando etanol anidro e NaOH como catalisador. O biodiesel foi separado pelo método de decantação e neutralizado com sucessivas lavagens com o uso de uma solução aquosa de HCl 0,50 % (v:v). Para eliminação da água de lavagem, empregou-se a decantação e, após este processo, qualquer resíduo de umidade foi retirado com o uso do agente secante sulfato de sódio anidro.

Para o preparo das amostras enriquecidas com 200 e 500 mg L⁻¹ do antioxidante GP, adicionaram-se quantidades apropriadas da solução estoque padrão (10 mmol L⁻¹ de GP) às amostras de biodiesel isentas de qualquer espécie de antioxidante. Em seguida, para dissolução do antioxidante e homogeneização, as amostras permaneceram por cerca de 20 minutos, primeiramente, em ultrassom (UltraCleaner, modelo 800), em seguida, sob agitação em agitador magnético (IKA, modelo Color Squid). Depois deste processo, o volume da amostra foi ajustado para 10 mL com biodiesel e novamente submetido ao processo de homogeneização por mais 20 minutos. Para análise da solução de 200 mg L⁻¹ não foi necessária à diluição, de modo que alíquotas de 20 µL foram adicionadas diretamente na célula eletroquímica e realizados os experimentos eletroquímicos. Entretanto, para as amostras contendo 500 mg L⁻¹ do antioxidante GP, realizou-se a diluição para uma concentração de 1,00 mmol L⁻¹ e, posteriormente, alíquotas de 20 µL dessa solução diluída foram adicionadas à célula eletroquímica.

Preparo dos eletrodos

Preparam-se os EPC mediante mistura de pó de grafite e óleo mineral, sendo a mistura resultante macerada em almofariz até obter-se uma pasta consistente. Para a obtenção dos EPCM foram preparadas diferentes proporções (m:m) de pó de grafite (Aldrich), óleo mineral (Aldrich) e o modificador LI. O agente modificador, LI, foi sintetizado tendo como base a metodologia desenvolvida por Schrekker et al. [33]. Para a síntese, inicialmente realizou-se a mesilação do etanol (1 equivalente), com cloreto de metanossulfonila (1,05 equivalente) e trietilamina (1,10 equivalente) dissolvidos em diclorometano e, posteriormente, realizou-se a alquilação do 1-metilimidazol. Finalmente, o sal obtido foi submetido à troca aniônica com KPF₆ e, a seguir, foi realizado um processo de filtração através de uma coluna de sílica.

Para evaporação de solvente e purificação do LI, o mesmo foi submetido a vácuo a uma temperatura de 70 °C durante 8 horas. O LI [C₄C₁Im]PF₆ foi obtido com um rendimento superior a 90 %.

Posteriormente, a mistura contendo a proporção apropriada foi macerada por aproximadamente 20 minutos, para garantir a completa homogeneização e obtenção de uma consistência satisfatória. Em todos os casos, as pastas de carbono com e sem modificação foram armazenadas em refrigerador com temperatura controlada de 4,0 ± 1,0 °C. Para a construção dos eletrodos de trabalho, uma pequena quantidade da pasta foi introduzida em uma seringa de insulina com capacidade de 1,00 mL, tendo como contato elétrico um fio de cobre.

Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato portátil da DropSens (modelo µStat 400) interfaceado a um microcomputador para aquisição dos dados. Uma célula eletroquímica com capacidade de até 10,0 mL, contendo uma tampa de teflon com orifícios para o acoplamento dos eletrodos foi utilizada. Nestes orifícios foi acoplado o eletrodo auxiliar composto por um fio de Pt, o eletrodo de referência de Ag/AgCl/KCl 3 mol L⁻¹ (Ag/AgCl) e o eletrodo de trabalho, sendo estes constituídos pelos EPC com e sem a modificação.

Para registro dos voltamogramas, o eletrodo de trabalho foi introduzido na célula eletroquímica contendo 5,00 mL do tampão no pH desejado, cujo intervalo de varredura de potencial avaliado foi de -0,20 a 0,65 vs. Ag/AgCl. Entre cada medida, a superfície do eletrodo foi renovada a partir da remoção da camada superficial e posterior polimento em papel sulfite. Antes de cada medida experimental, o oxigênio dissolvido foi removido da solução eletrolítica via borbulhamento de nitrogênio por cerca de 10 minutos. A resposta voltamétrica do GP foi avaliada empregando-se as técnicas de voltametria de varredura linear, pulso diferencial e de onda quadrada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, estudou-se o efeito da composição da pasta de carbono com e sem modificação, sobre a resposta voltamétrica do GP. Para tais estudos, os EPCM modificados com LI

(EPCM-LI) foram preparados em diferentes proporções, com ênfase na variação da quantidade de grafite (entre 60 e 80%) e da mistura óleo mineral/LI (entre 40 e 20%), com variações do LI na mistura de 10; 7,5; 5,0 e 2,5%. Depois de avaliada a quantidade de cada componente da pasta, verificou-se que a melhor proporção para o EPC foi de 75 % (m:m) de grafite e 25 % (m:m) de óleo mineral e para o EPCM foi de 70 % (m:m) de grafite, 25 % (m:m) de óleo mineral e 5,0 % (m:m) do modificador LI. A melhor composição de pasta, na ausência e presença do modificador, foi avaliada em termos de consistência durante o processo de maceração e da resistência ao ataque pela solução do eletrólito suporte. Além disso,

avaliou-se o perfil voltamétrico e a intensidade do sinal analítico gerado pelo uso da melhor proporção da pasta durante a oxidação do antioxidante GP. Posteriormente, otimizaram-se as condições de trabalho por estudo dos parâmetros experimentais e instrumentais, sendo a melhor condição escolhida após avaliação da intensidade do sinal e da largura do pico a meia altura, a qual foi chamada de resolução voltamétrica.

Os estudos do comportamento voltamétrico do antioxidante GP foram realizados comparando-se a resposta voltamétrica do GP sobre a superfície dos EPC e dos EPCM-LI, conforme apresentado na Figura 3.

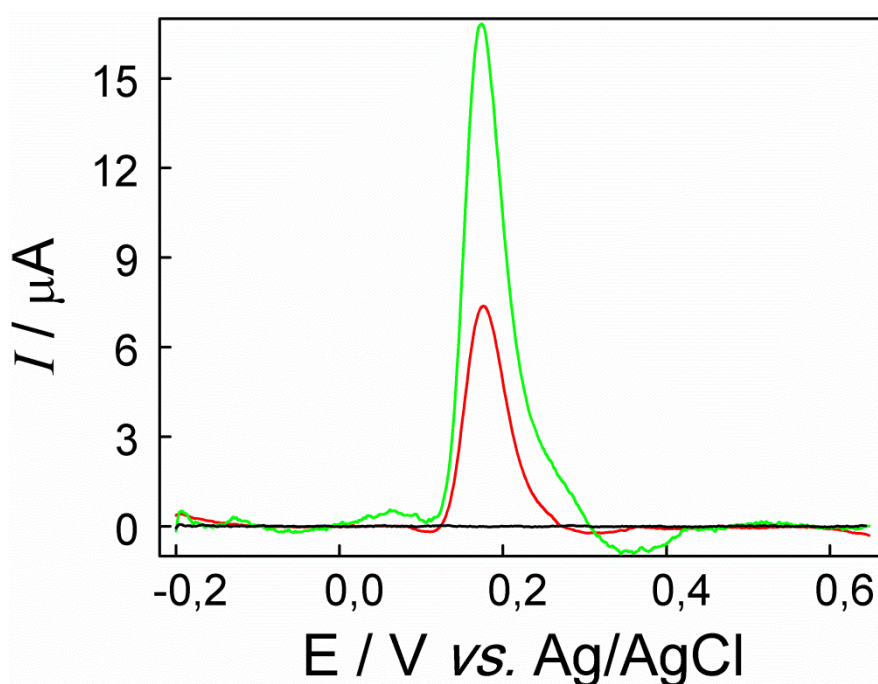


Figura 3. Voltamogramas de onda quadrada registrados em tampão fosfato (pH = 7,0). (—) EPCM na ausência de GP. (—) EPC na presença de $29 \mu\text{mol L}^{-1}$ de GP. (—) EPCM-LI na presença de $29 \mu\text{mol L}^{-1}$ de GP. Condições voltamétricas: frequência (f) = 10 Hz, amplitude de pulso (E_{sw}) = 25 mV e incremento de potencial (ΔE_s) = 2,0 mV.

A Figura 3 mostra que o voltamograma registrado com o EPCM na ausência do GP (curva em preto) não apresenta qualquer processo faradáico, o que é um excelente indicativo da elevada pureza dos reagentes empregados para o preparo da solução do eletrólito de suporte bem como dos componentes da pasta de carbono. Por outro lado, os voltamogramas registrados na presença do GP apresentaram um pico anódico bem definido no potencial de +0,17 V vs. Ag/AgCl_{sat}. É bem estabelecido que a eletro-oxidação de antioxidantes fenólicos envolve a oxidação dos

grupos hidroxila, levando às quinonas correspondentes, em um mecanismo do tipo EC com reações de protonação acopladas às transferências eletrônicas [14, 34, 35]. Assim, a oxidação dos grupos hidroxila do GP é provavelmente o processo responsável pelo pico anódico observado nos voltamogramas apresentados na Figura 3.

De acordo com a Figura 3, verifica-se ainda que o voltamograma registrado sobre a superfície do EPCM-LI apresenta uma melhor resposta em termos

de intensidade de corrente de pico anódica (I_{pa}) quando comparado com o EPC. Ademais, juntamente com um ganho significativo de sinal do EPCM-LI ($I_{pa} = 18,80 \mu A$) em relação ao EPC ($I_{pa} = 7,35 \mu A$), a qual apresentou um valor quase três vezes superior, observa-se um melhor perfil voltamétrico. Estudos envolvendo medidas sucessivas mostraram que, além de fornecer melhor resposta voltamétrica, os EPCM-LI, forneceram também uma melhor repetibilidade da resposta. Assim, considerando estas características vantajosas, os estudos subsequentes foram realizados utilizando o EPCM-LI como eletrodo de trabalho.

No estudo do comportamento voltamétrico do antioxidante GP, também foram utilizadas as técnicas de voltametria de varredura linear (VVL) e

voltametria de pulso diferencial (VDP), cuja finalidade foi avaliar a detectabilidade destas técnicas na detecção do GP sobre a superfície do EPCM-LI. Na Figura 4 (curva em preto) verifica-se que o voltamograma obtido com a técnica de VPD não apresentou um perfil satisfatório, o que pode ser comprovado pela baixa intensidade da I_{pa} . Da mesma forma, o perfil voltamétrico obtido com a técnica de VVL (curva em vermelho) também não foi satisfatório, embora tenha sido um pouco melhor do que o obtido pela técnica de VPD. Contudo, na Figura 4 (curva em verde), observa-se que a VOQ apresentou um desempenho analítico superior às demais técnicas com intensidade da corrente de pico anódica acentuadamente maior.

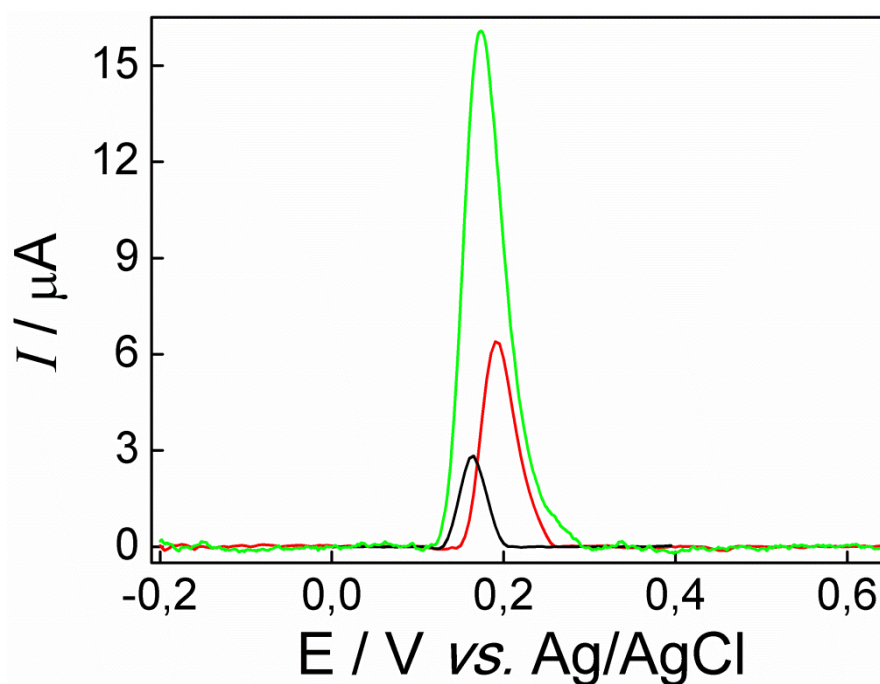


Figura 4. Voltamogramas registrados em tampão fosfato (pH = 7,0) com o EPCM-LI na presença de $29 \mu\text{mol L}^{-1}$ de GP. (—) Voltamogramas de pulso diferencial ($\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$). (—) Voltamogramas de varredura linear ($\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$). (—) Voltamogramas de onda quadrada ($f = 25 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 10 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$).

Uma vez definida a composição do EPCM-LI e a técnica eletroanalítica a ser utilizada, avaliou-se o efeito de diferentes soluções tampões, como eletrólitos suporte, no comportamento voltamétrico do antioxidante GP. Para tal, registraram-se voltamogramas de onda quadrada em tampão Britton-Robinson ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) e tampão fosfato ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$), ambos em pH 7,0, para oxidação de $29 \mu\text{mol L}^{-1}$ do GP sobre a superfície do EPCM-LI. A melhor

resposta voltamétrica foi obtida em tampão fosfato, o qual além de fornecer um pico mais intenso apresentou uma menor corrente residual. Portanto, o tampão fosfato foi escolhido como a solução do eletrólito suporte e adotado nas medidas subsequentes. O desempenho analítico do EPCM-LI também foi avaliado registrando-se voltamogramas em diferentes valores de pH. Na Figura 5 é apresentado o efeito do pH sobre o potencial de pico e

sobre a corrente de pico para oxidação eletroquímica de $29 \mu\text{mol L}^{-1}$ de GP. De acordo com os resultados apresentados na Figura 5, verifica-se que os maiores valores de corrente de pico são obtidos em meio ácido em valores de pH entre 3,0 e 7,0. Entretanto, em pH 7,0 observa-se que a eletrooxidação do GP ocorre em potenciais significativamente menos positivos, o que contribui para aumentar a seletividade do método, sendo este valor de pH considerado a melhor condição para os estudos analíticos. A Figura 5 mostra um deslocamento linear do potencial de pico anódico (E_{pa}) para valores menos positivos com o aumento do pH, indicando que o processo de eletrooxidação do GP envolve reações de protonação acopladas às transferências eletrônicas, o que é concordante com o observado para a eletrooxidação

de outros antioxidantes fenólicos [14,34,35]. Uma relação linear foi observada em todo intervalo de pH estudado (Figura 5B) com equação de regressão linear: $E_{pa}(\text{V}) = -0,54 - 0,051 \times \text{pH}$, com coeficiente de correlação linear (r) igual 0,999. O coeficiente angular desta equação é muito próximo a 0,059, valor esperado para processos eletródicos envolvendo o mesmo número de elétrons e de prótons. Este resultado é também concordante com a oxidação de grupos fenólicos às correspondentes quinonas, processo que envolve dois elétrons e dois prótons por grupo hidroxila oxidado [14,34,35]. Assim, os resultados obtidos sugerem fortemente que a oxidação do GP envolva a oxidação de seus grupos fenólicos à quinona correspondente.

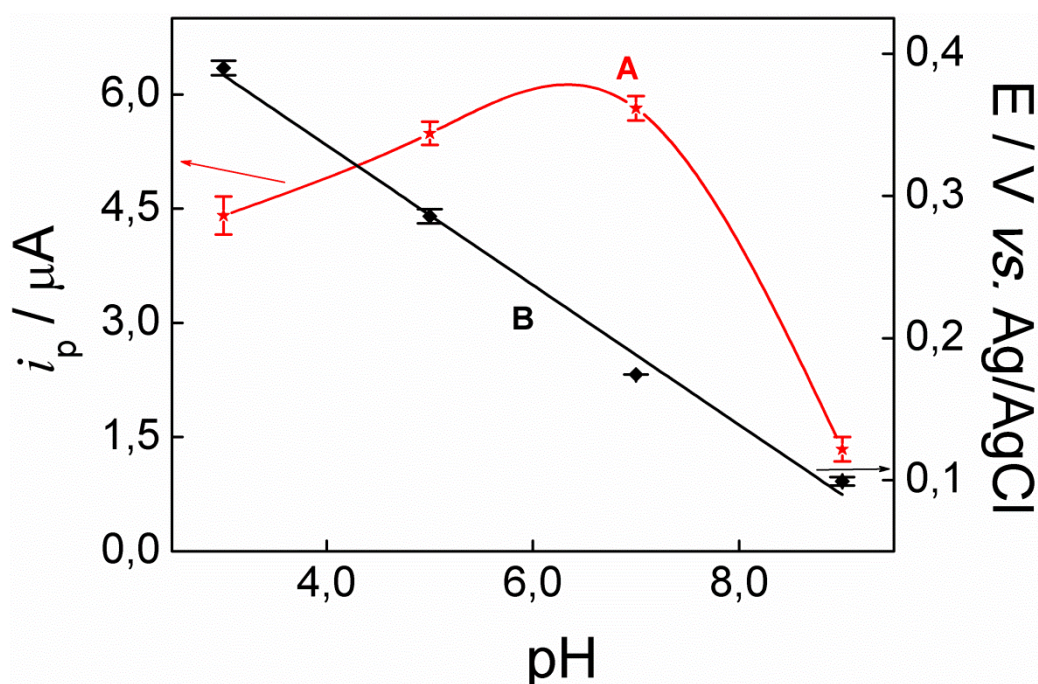


Figura 5. Efeito do pH na resposta da corrente de pico (A) e do potencial de pico (B) registrados em solução tampão fosfato ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) para oxidação eletroquímica de $29 \mu\text{mol L}^{-1}$ do antioxidante GP sobre a superfície do eletrodo EPCM-LI. Condições voltamétricas: $f = 10 \text{ Hz}$, $E_{sw} = 25 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

Os Parâmetros instrumentais inerentes à técnica de VOQ desempenham um papel importante no aumento da detectabilidade e, conseqüentemente, na aplicabilidade analítica. Assim sendo, como alternativa para melhorar satisfatoriamente a sensibilidade de um sistema de detecção durante o desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica, otimiza-se todos os parâmetros instrumentais, uma vez que a intensidade dos picos voltamétricos depende fortemente dos sinais de excitação da técnica. Com isso, os estudos seguintes foram direcionados na

otimização dos parâmetros instrumentais inerentes à técnica de VOQ, sendo estudada a variação da amplitude de aplicação de pulsos (E_{sw}) no intervalo de 10 a 75 mV, o incremento de potencial (ΔE_s) no intervalo de 2 a 12 mV, a frequência de aplicação dos pulsos de potenciais (f) no intervalo e 10 a 80 Hz e o tempo de equilíbrio, no intervalo de 0 e 50 segundos, durante a oxidação eletroquímica do GP. Estes estudos foram conduzidos em tampão fosfato $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0, na presença de $19,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de GP, empregando-se o EPCM-LI. Para avaliar a melhor

condição de trabalho, levaram-se em consideração os parâmetros que apresentassem melhorias significativas na intensidade da corrente de pico sem comprometer a resolução voltamétrica. Neste caso, avaliou-se como resolução voltamétrica a largura do pico a meia altura ($W_{1/2}$), sendo considerado como fator decisivo um

sinal com intensidade satisfatória e sem alargamento. Na Tabela 1 estão apresentados os intervalos e as condições experimentais otimizadas, as quais foram adotadas para o desenvolvimento da metodologia eletroanalítica para a determinação do antioxidante GP sobre a superfície do EPCM-LI.

Tabela 1. Condições experimentais e parâmetros instrumentais otimizados no desenvolvimento do método eletroanalítico usando a VOQ com o EPCM-LI.

Parâmetros	Intervalo estudado	Valor escolhido
Eletrólito de Suporte	Tampão Fosfato e B-R	Tampão fosfato
pHs	3,0 – 9,0	7,0
Frequência (Hz)	10 – 80	25
Incremento de potencial (mV)	2 – 12	2
Amplitude de pulso (mV)	10 – 75	25
Tempo de equilíbrio (s)	0 – 50	0

Empregando as melhores condições de trabalho, foram registrados voltamogramas de onda quadrada em diferentes concentrações do antioxidante GP, no intervalo de 2,0 a 47,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A Figura 6 reúne os voltamogramas registrados neste estudo, bem como a curva analítica obtida nestas condições, a qual apresentou linearidade em todo intervalo de concentração estudado para a resposta da corrente em

função da concentração do antioxidante GP. Os parâmetros e cálculos obtidos a partir dos dados extraídos desta curva estão reunidos na Tabela 2, os quais mostram que a equação de regressão linear foi $I_{pa} (\mu\text{A}) = -0,41 + 3,40 \times 10^{-5} \times C (\text{mol L}^{-1})$ ($r = 0,998$, $n = 10$) e evidenciam um desempenho analítico satisfatório para utilização do EPCM-LI na detecção do GP.

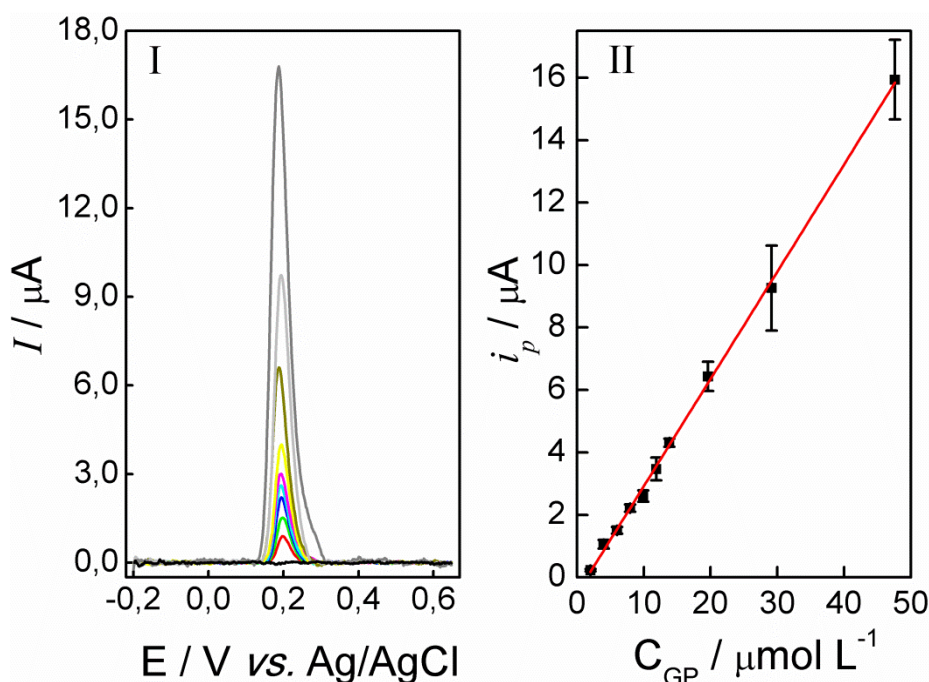


Figura 6. (I) Voltamogramas de onda quadrada registrados com o EPCM-LI em tampão fosfato 0,04 mol L⁻¹ (pH = 7,0) na presença de diferentes concentrações de GP no intervalo de 2,0 a 47,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Condições voltamétricas: $f = 10$ Hz, $E_{sw} = 25$ mV e $\Delta E_s = 2$ mV. (II) Curva analítica obtida para o GP.

Na Tabela 2 é apresentada uma análise comparativa dos parâmetros analíticos obtidos na determinação do antioxidante GP empregando o EPCM-LI com aqueles previamente descritos na

literatura e obtidos com um eletrodo de pasta de carbono modificada com o complexo 3,4-metilenodioxicinamato de manganês [16].

Tabela 2. Comparação entre os parâmetros analíticos obtidos com o método proposto e com um método descrito na literatura [19].

Parâmetros Analíticos	Métodos	
	Proposto	Referência [16]
Intervalo linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	2,0–47,5	4,0–22,0
Intercepto (μA)	-0,41	-0,21
Inclinação ($\mu\text{A L mol}^{-1}$)	$3,40 \times 10^5$	$1,64 \times 10^5$
Coefficiente de Correlação (r)	0,998	0,998
Limite de Detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,397	0,680

A partir dos parâmetros extraídos da curva analítica e apresentados na Tabela 2, também foi possível estimar o limite de detecção (LD) do método voltamétrico proposto, empregando a seguinte relação matemática: $3 \times SD_A / b$. O parâmetro SD_A representa o desvio padrão do intercepto e o b a inclinação da curva analítica [17]. O LD obtido foi de $0,397 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Tabela 2), indicando detectabilidade satisfatória e atendendo as expectativas para a utilização da metodologia eletroanalítica para a quantificação de GP em amostras de biodiesel.

Aplicação do método

O procedimento desenvolvido foi empregado para a determinação do antioxidante GP em amostras de biodiesel contaminadas com 200 e 500 mg L^{-1} deste analito. Para tanto, foram realizados estudos de adição e recuperação do GP nas amostras de biodiesel isento de qualquer tipo de antioxidante e, na sequência, as análises foram realizadas após um simples procedimento de preparo da amostra, conforme descrito na parte experimental. A quantificação do GP nas amostras de biodiesel enriquecido foi realizada pelo método de adição de padrões, sendo os voltamogramas de onda quadrada registrados nas análises e as respectivas curvas de adição de padrão apresentadas nas Figuras 7 e 8.

Os voltamogramas apresentados nas Figuras 7 e 8 mostram que o procedimento de preparo das amostras bem como de determinação do antioxidante foi eficiente e a detecção não foi afetada por problemas associados às interferências de

componentes da matriz. Como podem ser observados, os voltamogramas registrados na amostra sem enriquecimento não apresentaram nenhum pico que possa interferir na detecção do GP. Verifica-se também que os picos voltamétricos obtidos para o GP na amostra de biodiesel apresentam-se intensos e bem definidos, indicando que nenhum dos componentes da matriz afeta a resposta voltamétrica do GP. Para as curvas de adição de padrão apresentadas nas Figuras 7 e 8, os pontos equivalem ao valor médio de três medidas.

A Tabela 3 reúne os resultados dos estudos de adição e recuperação realizados nas amostras de biodiesel enriquecidas com os dois níveis de GP.

Tabela 3. Resultados obtidos para as determinações de GP em biodiesel empregando o método proposto.

Adicionado (mg L^{-1})	Encontrado ^[a] (mg L^{-1})	Recuperação (%)	DPR (%)
500	528	105,6	3,29
200	167	83,50	9,34

^[a]: média de três determinações (n=3); DPR: Desvio padrão relativo.

Os resultados apresentados na Tabela 3 demonstram que para os dois níveis de enriquecimento da amostra de biodiesel foram obtidas porcentagens de recuperação satisfatórias com valores de DPR relativamente baixos. Estes resultados indicam que a exatidão e a precisão fornecidas pelo método proposto são satisfatórias. Além disso,

verificou-se que não há qualquer espécie na amostra de biodiesel que afete o perfil voltamétrico do GP. Portanto, este conjunto de resultados demonstra que o método proposto pode ser empregado com êxito para

a quantificação de GP, em amostras de biodiesel de soja, em concentração abaixo do comumente encontrado nesta matriz, a qual pode se situar entre 500 e 2000 mg L⁻¹.

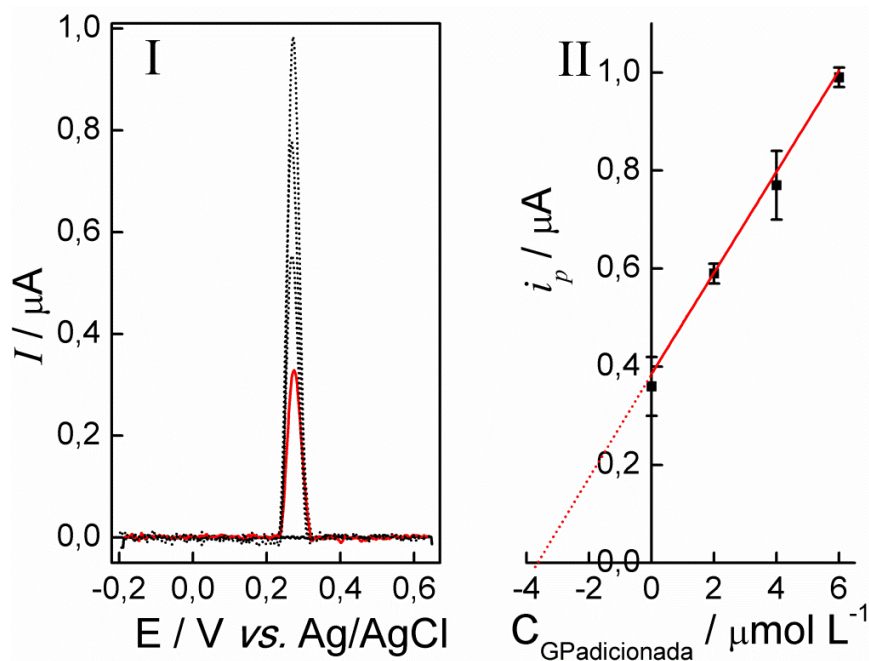


Figura 7. (I) Voltamogramas de onda quadrada registrados com o EPCM-LI em tampão fosfato 0,04 mol L⁻¹ (pH = 7,0). (—) Após a adição de uma alíquota de 20 μL da amostra de biodiesel sem enriquecimento. (—) Após a adição de uma alíquota de 20 μL da amostra de biodiesel enriquecida com 500 mg L⁻¹ de GP. (.....) Sucessivas adições de 2 μmol L⁻¹ de GP. (II) Curva de adição de padrão.

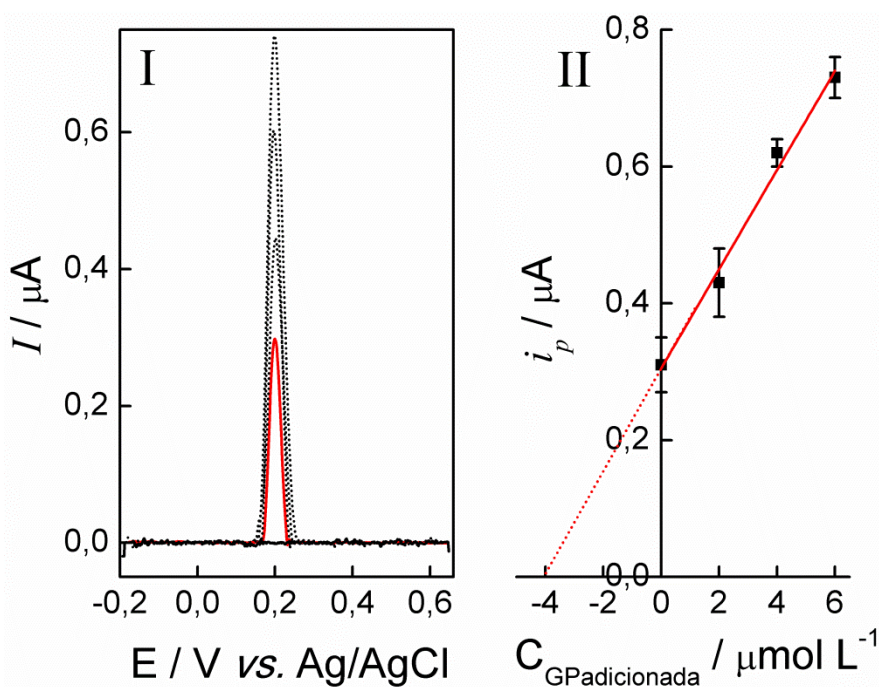


Figura 8. (I) Voltamogramas de onda quadrada registrados com o EPCM-LI em tampão fosfato 0,04 mol L⁻¹ (pH = 7,0). (—) Após a adição de uma alíquota de 20 μL da amostra de biodiesel sem enriquecimento. (—) Após a adição de uma alíquota de 20 μL da amostra de biodiesel enriquecida com 200 mg L⁻¹ de GP. (.....) Sucessivas adições de 2 μmol L⁻¹ de GP. (II) Curva de adição de padrão.

É importante destacar que o EPCM utilizado neste trabalho apresentou excelente desempenho analítico mesmo utilizando-se como modificador químico um LI que não foi submetido a procedimentos minuciosos de purificação e eliminação de água. Embora a literatura indique que para aplicações em eletroquímica e eletroanalítica há a necessidade de se empregar LI altamente puros e isentos de água [22, 23, 25, 30-33], os resultados obtidos neste trabalho mostraram que mesmo um LI de moderada pureza é capaz de produzir um EPCM de desempenho analítico superior ao de um EPC convencional. Este resultado é muito importante, pois demonstra que uma metodologia mais simples e mais rápida, como a proposta por Schrekker *et al.* [33], pode ser eficientemente utilizada para produzir LI para aplicações em eletroanálise. Assim, os eletrodos quimicamente modificados com LI poderiam ser produzidos mais facilmente e com menores custos o que é altamente desejável do ponto de vista de aplicação prática dos métodos eletroanalíticos.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o EPCM-LI pode ser empregado com êxito para a quantificação do antioxidante GP em amostras de biodiesel de soja, sem a necessidade de procedimentos elaborados de preparo de amostra. O desempenho analítico do EPCM-LI foi muito superior ao de um EPC convencional, sendo a corrente de pico - para a oxidação do GP obtida com o eletrodo modificado - quase três vezes maior do que a obtida com um EPC convencional. Um ponto extremamente vantajoso do EPCM proposto é que ele não requer um LI extremamente puro e com baixíssimos teores de água residual. Isso simplifica drasticamente a síntese do LI, permitindo, portanto, que o EPCM-LI seja preparado de forma mais simples, rápida e com menores custos, conferindo grande praticidade ao EPCM-LI, tornando-o competitivo quando comparado a outros sistemas de detecção envolvendo eletrodos modificados. Verificou-se que a eletrooxidação do GP parece envolver a oxidação de seus grupos fenólicos à correspondente quinona em um processo envolvendo o mesmo número de prótons e de elétrons. Dentre as técnicas voltamétricas avaliadas, verificou-se que a VOQ foi a mais adequada para a quantificação do GP por combinar elevada detectabilidade com elevada velocidade de análise.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FUNDECT (Processo: 23/200.680/2012), CAPES, UFGD, FAPEMIG (APQ-02497-12 e APQ-01557-13) e PIBIC/CNPq pelo suporte financeiro.

6. REFERÊNCIAS E NOTAS

- [1] Padula, A. D.; Santos, M. S.; Ferreira, L.; Borenstein, D. *Energy Policy* **2012**, *44*, 395. [[CrossRef](#)]
- [2] Atilgan, B.; Azapagic, A. *J. Cleaner Prod.* **2014**, *2010*, 1.
- [3] Ramadhas, A. S. ã.; Jayaraj, S.; Muraliedharan, C. *Renewable Energy* **2014**, *29*, 727. [[CrossRef](#)]
- [4] Bunce, M.; Snyder, D.; Adi, G.; Hall, C.; Koehler, J.; Davila, B.; Kumar, S.; Garimella, P.; Stanton, D.; Shaver, G. *Fuel* **2011**, *90*, 2560. [[CrossRef](#)]
- [5] Sousa, L. S.; Moura, C. V. R.; Oliveira, J. E.; Moura, E. M. *Fuel* **2014**, *134*, 420. [[CrossRef](#)]
- [6] Rizwanul Fattah, I. M.; Masjuki, H. H.; Kalam, M. A.; Hazrat, M. A.; Masum, B. M.; Imtenan, S.; Ashraf, A. M. *Renewable Sustainable Energy Rev.* **2014**, *30*, 356. [[CrossRef](#)]
- [7] Batista, L. N.; Silva, V. F.; Fonseca, M. G.; Pissurno, E. C. G.; Daroda, R. J.; Cunha, V. S.; Kunigami, C. N.; Maria, S. L. C. *Microchem. J.* **2013**, *106*, 17. [[CrossRef](#)]
- [8] Caramit, R. P.; Andrade, A. G. F.; Souza, J. B. G.; Araujo, T. A.; Viana, L. H.; Trindade, M. A. G.; Ferreira, V. S. *Fuel* **2013**, *105*, 306. [[CrossRef](#)]
- [9] Yaakob, Z.; Narayanan, B. N.; Padikkaparambil, S.; Unnik. S.; Akbar, P. M. *Renewable Sustainable Energy Rev.* **2014**, *35*, 136. [[CrossRef](#)]
- [10] Araujo, T. A.; Barbosa, A. M. J.; Viana, L. H.; Ferreira, V. S. *Fuel* **2011**, *90*, 707 - 712. [[CrossRef](#)]
- [11] Barroso, M. F.; Álvarez, N. S.; Delerue-Matos, C.; Oliveira, M. B. P. P. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *30*, 1. [[CrossRef](#)]
- [12] Lin, X.; Ni, Y.; Kokot, S. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *765*, 54. [[CrossRef](#)]
- [13] Xue, J.; Grift, T. E.; Hansen, A. C. *Renewable Sustainable Energy Rev.* **2011**, *15*, 1098. [[CrossRef](#)]
- [14] Medeiros, R. A.; Rocha-Filho, R. C.; Fatibello-Filho, O. *Food Chem.* **2010**, *123*, 886. [[CrossRef](#)]
- [15] Trojanowicz, M. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 480. [[CrossRef](#)]
- [16] Svancara, I.; Vytras, K.; Kalcher, K.; Walcarius, A.; Wang, J. *Electroanalysis* **2009**, *21*, 7. [[CrossRef](#)]
- [17] Svancara, I.; Walcarius, A.; Kalcher, K.; Vytras, K. *Cent. Eur. J. Chem.* **2009**, *7*, 598. [[CrossRef](#)]
- [18] Svancara, I.; Kalcher, K.; Walcarius, A.; Vytras, K. *Electroanalysis with Carbon Paste Electrodes*, CRC Press: New York, 2012.
- [19] Khani, H.; Rofouei, M. K.; Arab, P.; Gupta, V. K.; Vafaei, Z. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *183*, 402. [[CrossRef](#)]
- [20] Oliveira, L. H.; Ribeiro, K. L.; Carvalho, C. T.; Trindade, M. A. G. *Orbital: Electron. J. Chem.* **2014**, *6*, 61. [[Link](#)]

- [21] Monteiro, S. P.; Ribeiro, L. A. R.; Fonseca, W. T.; Takeuchi, R. M.; Santos, A. S. *Orbital: Electron. J. Chem.* **2014**, *6*, 29. [[Link](#)]
- [22] Wei, D.; Ivaska, A. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *607*, 126. [[CrossRef](#)]
- [23] Shvedene, N. V.; Chernyshov, D. V.; Pletnev, I. V. *Russ. J. Gen. Chem.* **2009**, *78*, 2507. [[CrossRef](#)]
- [24] Franzoi, A. C.; Brondani, D.; Zapp, E.; Moccelini, S. K.; Fernandes, S. C.; Vieira, I. C.; Dupont, J. *Quim. Nova* **2011**, *34*, 1042. [[CrossRef](#)]
- [25] Zhang, S.; Sun, N.; He, X.; Lu, X.; Zhang, X. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **2006**, *35*, 1475. [[CrossRef](#)]
- [26] Opallo, M.; Lesniewski, A. *J. Electroanal. Chem.* **2011**, *656*, 2. [[CrossRef](#)]
- [27] Shiddiky, M. J. A.; Torriero, A. A. J. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 1775. [[CrossRef](#)]
- [28] Silvester, D. S. *Analyst* **2011**, *136*, 4871. [[CrossRef](#)]
- [29] Rehman, A.; Zeng, X. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1667. [[CrossRef](#)]
- [30] Fitchett, B. D.; Knepp, T. N.; Conboy, J. C. *J. Electrochem. Soc.* **2004**, *151*, 219. [[CrossRef](#)]
- [31] Schröder, U.; Wadhawan, J. D.; Compton, R. G.; Marken, F.; Suarez, P. A. Z.; Consorti, C. S.; Souza, R. F.; Dupont, J. *New J. Chem.* **2000**, *24*, 1009. [[CrossRef](#)]
- [32] Costa, R. B. *Influência da Estrutura dos íons de Líquidos Iônicos na Dupla Camada Elétrica das Interfaces Eléctrodo/Líquido Iónico*. [Master's thesis.] Porto, Portugal: Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, 2012.
- [33] Schrekker, H. S.; Silva, D. O.; Gelesky, M. A.; Stracke, M. P.; Schrekker, C. M. L.; Gonçalves, R. S.; Dupont, J. J. *Braz. Chem. Soc.* **2008**, *19*, 426. [[CrossRef](#)]
- [34] Nia, Y.; Wanga, L.; Kokot, S. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *412*, 185. [[CrossRef](#)]
- [35] Ziyatdinova, G. K.; Saveliev, A. A. Evtugyna, G. A.; Budnikov, H. C. *Electrochim. Acta* **2014**, *137*, 114. [[CrossRef](#)]

Cascas de Arroz: Uma Alternativa Promissora

Heloa Santos^{a*}, Danielle L. Junger^b and Ana B. Soares^b

^aPrograma de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, 24020-141 Niterói – RJ, Brasil.

^bDepartamento de Química, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, 29106-010 Vila Velha- ES, Brasil.

Article history: Received: 20 August 2014; revised: 04 November 2014; accepted: 20 November 2014. Available online: 30 December 2014.

Abstract: The reuse of rice husk ash (RHA) as catalyst support or as frying oil clarifier, which results in the reduction of the acidity, is a viable and cost effective alternative for obtaining biodiesel product. Under other circumstances, rice husk ash would be discarded. As a support, after acid leach and calcination, rice husk ash can be compared with the commercial silica (DEGUSSA), which is commonly used in catalysis. In residual frying oil clarification, there is a high adsorption and high clarification to produce biodiesel in transesterification. Studies also suggest that the use of the rice husk ash pretreated by acid leach to clarify the residual frying oil shows promising uses for the decreased amount of free fatty acids in these oils.

Keywords: rice husk ash; biomass; residual oil frying; clarification; catalytic support

1. INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, a busca por fontes de energia em substituição aos combustíveis fósseis tem se tornado de extrema importância, não só sob o aspecto econômico, mas também do ponto de vista ambiental.

Neste contexto, estão as fontes alternativas de energia, que apresentam como objetivo principal a redução de emissão de poluentes, além de serem renováveis. Entre elas, podemos citar: a energia hídrica, nuclear, eólica, fotovoltaica e a proveniente da biomassa (como lenha, biodiesel, biogás entre outros).

A biomassa vem sendo muito estudada como fonte de energia alternativa, visto que o Brasil apresenta vários aspectos favoráveis para a utilização deste tipo de energia, devido à sua localização, ao clima e extensão territorial. Dentre elas, o biodiesel, combustível que pode vir a solucionar muitos problemas ambientais e energéticos, é definido como uma mistura de mono-álquil ésteres de ácidos graxos derivado de óleos vegetais ou gordura animal, de acordo com a ASTM D 6751 [1].

É importante ressaltar que o biodiesel

apresenta baixos níveis de liberação de monóxido de carbono em relação aos combustíveis fósseis e de materiais particulados liberados durante a combustão. Além disso, não há liberação de compostos de enxofre na atmosfera e apresenta melhores propriedades combustíveis [2].

Diferentes processos podem ser realizados na produção do biodiesel, como pirólise, microemulsão, esterificação e transesterificação. Dentre eles a transesterificação é a melhor forma de se obter o biodiesel (ésteres de ácidos graxos), com características físicas semelhantes ao do diesel convencional [3].

Vários fatores influenciam essa reação, tal como o catalisador, o tipo do álcool, a proporção molar álcool/óleo, a temperatura, a pureza dos reagentes e quantidade de ácidos graxos livres [4].

Desse modo, a obtenção do biodiesel é realizada pela esterificação de ácidos graxos livres (AGL), através da troca do grupo alcoxila de forma reversível, por meio da utilização de catalisador ácido, básico ou enzimático, podendo ser homogêneo ou heterogêneo [2].

Um dos problemas da utilização de óleos

*Corresponding author. E-mail: helosantos@hotmail.com

usados para a produção de biodiesel reside na utilização de um catalisador alcalino, comumente utilizado, durante a reação de transesterificação; este catalisador vai reagir com os AGL, formando sabões. A água utilizada durante a reação pode, também, provocar a saponificação e, não sendo este o objetivo, torna-se um inconveniente [5]. Ressalta-se ainda que a água diminui o rendimento da reação e dificulta os processos de separação do glicerol e a purificação do biodiesel [6].

A forma como se encontra o catalisador também influencia. Catalisadores homogêneos são de difícil separação dos produtos, por conseguinte, difícil é a recuperação e reutilização do mesmo. Por isso, os catalisadores heterogêneos apresentam vantagens pela redução de etapas de lavagem do biodiesel, além da possibilidade na sua reutilização e consequente diminuição de rejeitos reacionais.

Embora a síntese de biodiesel por catálise heterogênea apresente vantagens técnicas e ambientais em relação à homogênea, a busca por materiais de baixo custo ou a reutilização de rejeitos, como as CA, é de suma importância para a minimização de custos.

Como as CA possuem grande quantidade de sílica e poder adsorvente, são interessantes também como suportes de catalisadores. Além disso, são facilmente comparáveis com o suporte de sílica comercial muito utilizado em indústrias na catálise heterogênea.

O processo de esterificação para a produção de biodiesel apresenta como principais vantagens a possibilidade de produção desse combustível a partir de resíduos de baixo valor agregado.

Uma fonte promissora e sustentável de AGL é o óleo residual de fritura (ORF) que apresenta um grande potencial poluidor. Um litro de óleo de cozinha, descartado em recursos hídricos, contaminam cerca de um milhão de litros de água [7].

Por tanto, quando o descarte ocorre de maneira incorreta causa danos ao meio ambiente, como impermeabilização do solo, poluição de rios e dos demais recursos hídricos. Este óleo é obtido em grande quantidade, pois é utilizado rotineiramente na alimentação da população.

O ORF necessita ainda de tratamento para que se enquadre nas exigências da ANP [8], sendo límpido e isento de cor. Por isso faz-se necessário a clarificação do ORF por meio de adsorventes, como

com as cascas de arroz (CA) ou com as cinzas das cascas de arroz (CCA) que, devido as suas propriedades, apresentam alto poder adsorvente resultando na redução do índice de acidez do ORF.

A clarificação do ORF por adsorventes *in natura* torna-se uma alternativa sustentável e barata, visto que as CA são resíduos agrícolas abundantes em nosso país. A alta porcentagem adsorvente das CA se justifica pela presença de aproximadamente 20% de sua composição em SiO₂ no material *in natura* [9].

As CA são um subproduto de moagem da safra de arroz e são muito utilizadas como combustível em fornos de caldeiras e as cinzas produzidas geram um enorme problema na sua eliminação.

Neste contexto, o presente trabalho visa o desenvolvimento sustentável, havendo redução do nível de resíduos e elaboração de novas metodologias que possibilitem sua execução em escala industrial.

2. BIODIESEL

Experiências brasileiras procuram formas de agroenergia na substituição parcial dos combustíveis fósseis. Exemplos estão no desenvolvimento do álcool, com o Programa do Álcool – Próálcool – e pela utilização de óleos vegetais transesterificados – biodiesel [10].

Segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) [11], “biocombustíveis são derivados de biomassa renovável que podem substituir, parcial ou totalmente, combustíveis derivados de petróleo e gás natural em motores a combustão ou em outro tipo de geração de energia”.

A produção de biodiesel pode ser realizada com o craqueamento, a esterificação ou a transesterificação (a mais utilizada), dentre outros. Para isso, a reação química de óleos vegetais ou de gorduras animais com o álcool comum (etanol) ou o metanol é estimulada por um catalisador [12]. Alguns exemplos de biocombustíveis são verificados na Tabela 1.

A Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis (ANP) especifica e fiscaliza a qualidade dos biocombustíveis, garantindo o abastecimento do mercado desde de 2005 quando houve inserção do biodiesel na matriz energética brasileira [11].

De acordo com GOMES [14], as resoluções

que regulamentam as especificações para Biodiesel no Brasil são regidas pela ANP 7, de 19 de março de 2008, que são menos restritas que na Europa,

permitindo a produção de biodiesel a partir de diversas matérias primas. Algumas dessas matérias primas estão na Tabela 2.

Tabela 1. Principais exemplos de biocombustíveis [13].

Biocombustível	Matéria-prima	Processos de obtenção	Composição Química
Carvão Vegetal	Madeira	Pirólise	Carbono
Álcool	Açúcares (glicose, amido, celulose, etc)	Fermentação anaeróbica	Etanol
Biogás	Todo o tipo de biomassa	Fermentação anaeróbica	Hidrocarbonetos leves
Biogás de síntese	Biomassa em geral	Gaseificação	Mistura de vários gases, essencialmente CO e H ₂
Biodiesel	Óleos e Gorduras	Esterificação ou Transesterificação	Monoésteres de ácidos graxos
Bio-óleo	Óleos e Gorduras	Craqueamento ou hidrocrackeamento	Mistura de hidrocarbonetos e compostos oxigenados

Tabela 2. Composição em ácido graxo de alguns óleos e gorduras de origem vegetal [13].

Fonte do óleo ou gordura	Ácido Graxo (%)				
	Palmítico C16	Estearíco C18	Oléico C18:1 (n9)	Linoléico C18:2 (n12)	Linolênico C18:3 (n15)
Algodão	17-31	1-4	13-44	33-59	0,1-2,1
Amendoim	6-16	1,3-6,5	35-72	13-45	<1
Dendê	32-59	1,5-8	27-52	5-14	<1,5
Girassol	3-10	1-10	14-65	20-75	<0,7
Oliva	7,5-20	0,5-3,5	56-83	3,5-20	<1,5
Milho	8,19	0,5-4	19-50	34-62	4-11
Soja	7,14	1,4-5,5	19-30	44-62	4-11

Com o Biodiesel, o Brasil se torna referência mundial no uso de fontes renováveis, pois o país é considerado hoje a grande potência para a produção desse combustível. Essa posição foi conquistada com a utilização do álcool em veículos automotivos, iniciativa pioneira no sentido de criar um programa de combustível alternativo ao petróleo. O Proálcool foi o maior programa de substituição de combustíveis fósseis no mercado automotivo mundial. No Brasil, têm sido utilizadas misturas do biodiesel com o diesel convencional, conhecidas como misturas BX, onde X refere-se à quantidade de biodiesel (% v/v) adicionada no óleo diesel [15].

Dependendo da quantidade de B100 adicionado ao diesel de petróleo, a utilização do biodiesel pode gerar em média 48% menos monóxido de carbono, sendo 47% menos material particulado e 67% menos hidrocarbonetos [11].

Além disso, observa-se uma ausência na Há um destaque dentre os destinos dos embarques do agronegócio brasileiro nesse mês de junho de 2014, e esse foi a Ásia, com 42,6% de participação na receita total, seguida pela União Europeia, com

liberação de compostos de enxofre na atmosfera, propriedades combustíveis satisfatórias e diminuição na emissão de gases do efeito estufa, visto que no cultivo das oleaginosas também há um consumo de gás carbônico [16].

Segundo o MINISTÉRIO DA AGRICULTURA [17] em junho de 2014 as exportações do agronegócio brasileiro renderam US\$ 9,61 bilhões, que corresponde um crescimento de 4,7% em comparação ao mesmo período do ano passado. Comparado ao mês de junho de 2013, a balança comercial do setor registrou um superávit de US\$ 8,40 bilhões, visto que as importações alcançaram US\$ 1,21 bilhão (queda de 5,5%).

Já no grupo da soja (que inclui farelo, óleo e soja em grão) estiveram em destaque, sendo que a soja em grão foi o produto de maior receita dentro do grupo (US\$ 3,57 bilhões) [17]

aproximadamente de 23%. De junho de 2013 há junho de 2014, exportações do setor totalizam US\$ 99,51 bilhões, em que US\$ 33,85 bilhões vêm do grupo da soja, US\$ 16,82 bilhões do setor de carnes e US\$

11,98 bilhões do complexo sucroalcooleiro [17].

Ao contrário do país asiático e comparada a outras partes do mundo, a China só chegou ao mercado de biodiesel com vários anos de atraso. Isso é o que afirma o relatório “China Biodiesel Industry Report 2014-2017” publicado pela Researchmoz – empresa norte-americana de consultoria e inteligência de mercado [18].

Com o objetivo de substituir combustíveis fósseis há o surgimento de uma alternativa voltada a agroenergia. Pesquisas indicam que as reservas mundiais de petróleo se esgotarão por volta de 2046, sem considerar a tendência de crescimento do consumo. E com o aumento da procura e uma acessibilidade deficiente, é possível que seu preço atinja patamares muito elevados sendo inviáveis economicamente [19].

O Brasil já obteve uma patente para fabricação de biodiesel nos anos de 1970, que expirou antes de adotar o uso do mesmo, mas mesmo assim o país conta com indústria de biodiesel consolidada, com usinas destinadas a produção e comercialização do material [20].

A legislação brasileira tornou obrigatório o uso de no mínimo 5% de biodiesel no diesel e instituiu o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) [21].

Em 1893, Rudolf Diesel foi o primeiro a utilizar um combustível obtido pela transesterificação de óleo de amendoim. Antes da II Guerra Mundial esse combustível foi usado em veículos na África do Sul [21].

Segundo LUCENA [22], na década de 1940 os EUA tinham interesse no biocombustível por ser uma maneira mais rápida de produzir glicerina para alimentar bombas na guerra.

Os EUA incentiva o uso de Biodiesel com o “Programa EcoDiesel” e a mistura mais cogitada é de 20% de Biodiesel – B20. No mundo, a Alemanha é considerada a maior produtora e consumidora de Biodiesel [21].

Por causa de seus diversos ecossistemas, o Brasil possui uma vantagem em relação aos outros produtores de oleaginosas.

RATHMANN *et al.* [19] cita as seguintes vantagens na utilização do biodiesel:

1. *Vantagens ecológicas:* Não há emissão de enxofre durante a combustão dos motores,

principal causador da chuva ácida e de irritações das vias respiratórias. O gás carbônico liberado na combustão é absorvido na produção agrícola que origina a matéria-prima para o Biodiesel.

2. *Vantagens macroeconômicas:* geração de emprego para a população rural; aproveitamento interno dos óleos vegetais.

3. *Diversificação da matriz energética:* Introdução dos biocombustíveis.

4. *Vantagens financeiras:* a produção de Biodiesel pode colaborar com a participação do Brasil no mercado de bônus de carbono do Protocolo de Kyoto.

5. *Desenvolvimento regional:* reestruturação do sistema produtivo. O Programa do Biodiesel propõe que 50% do Biodiesel venha da mamona de pequenas propriedades familiares e os 50% da agricultura industrial, como a soja.

Segundo a Revista BiodieselBR [18] um relatório publicado em junho de 2014 pela consultoria alemã especializada em óleos vegetais *Oil World* afirma que a produção global de biodiesel deverá crescer em torno de 8% em 2014. Essa é uma expansão menor que do ano de 2013.

Como a cada litro de diesel substituído por biodiesel 2,66 quilos de carbono não são liberados, os países objetivam incluir em sua matriz energética tal combustível [19].

3. ÓLEO DE SOJA

Para melhor explicar os processos que ocorrem na degradação do óleo de fritura, primeiramente é importante apresentar a composição do óleo de soja, representada pela Tabela 3.

O preparo de alimentos, através da fritura por imersão em óleos, é uma prática difundida por todo o mundo, já que em altas temperaturas e em rápida transferência de calor, o alimento fica pronto rapidamente para o consumo, conferindo ao produto características agradáveis de cor, sabor, textura e palatabilidade. Geralmente, esta fritura por imersão ocorre de duas formas: a forma contínua – o óleo fica aquecido por um período prolongado, e a forma descontínua ou intermitente, ou seja, o óleo é aquecido para o preparo de uma refeição, esfriado e

reaquecido para uma próxima refeição, comum em redes de *fast-food*, restaurantes, pastelarias e em residências [24].

Tabela 3. Composição do óleo de soja.

Nº de carbonos	Ácidos Graxos	Concentração (%)
C12:0	Láurico	0,1 (máx.)
C14:0	Mirístico	0,2 (máx.)
C16:0	Palmítico	9,9 – 12,2
C16:1 (9)	Palmitoléico	Traços – 0,2
C18:0	Estearíco	3 – 5,4
C18:1 (9)	Oléico	17,7 – 26
C18:2 (9,12)	Linoléico	49,7 – 56,9
C18:3 (9,12,15)	Linolênico	5,5 – 9,5
C20:0	Araquídico	0,2 – 0,5
C20:1 (5)	Gadoléico	0,1 – 0,3
C22:0	Behênico	0,3 – 0,7
C22:1	Erucico	0,3 (máx.)
C24:0	Lignocérico	0,4 (máx.)

FONTES: Adaptado de COSTA NETO et al., 2000.[23]

O Brasil não tem nenhum regulamento que defina legalmente o monitoramento de descarte para óleos e gorduras no processo de fritura. Porém, em dezembro de 2003, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recebeu documentação da Associação de Defesa do Consumidor, fazendo requerimento à participação nas ações para criação de Norma Brasileira que dispusesse sobre a utilização e o descarte de óleos e gorduras utilizados para fritura [11]. Em decorrência disso, a ANVISA determinou as recomendações de boas práticas, que se encontram disponíveis para consulta pública. Recomenda-se que a quantidade de AGL não seja superior a 0,9%; o teor de compostos polares não seja maior que 25%; e, os valores de ácido linolênico do óleo de fritura não devam ultrapassar o limite de 2% [11].

Os óleos de fritura representam grande potencial de oferta. Um levantamento primário da oferta de óleos residuais de frituras, suscetíveis de serem coletados, revela um potencial de oferta no país superior a 30 mil toneladas por ano. Algumas possíveis fontes dos óleos e gorduras residuais são: lanchonetes e cozinhas industriais, indústrias onde ocorre a fritura de produtos alimentícios, os esgotos municipais onde a nata sobrenadante é rica em matéria graxa e águas residuais de processos de

indústrias alimentícias [25].

Com a intenção de reduzir os custos de matéria-prima na obtenção de biodiesel e eliminar um resíduo potencialmente poluidor dos cursos hídricos, substituiu-se o óleo de soja isento de impurezas pelo ORF, que é uma alternativa de baixo custo.

Em óleo ou em gorduras podem ser encontrados AGL que são basicamente ácidos carboxílicos de cadeia curta podendo ser saturados ou insaturados. A produção de ácidos graxos livre e consequentemente de diglicerídeos ocorre por meio de reações hidrolíticas que ocorrem em óleos, principalmente, quando submetidos a altas temperaturas e pela presença de água contida nos alimentos.

A alta temperatura utilizada no preparo de frituras, entretanto, seria um fator facilitador da degradação de óleos vegetais por oxidação, hidrólise e formação de dienos conjugados. Os óleos residuais de fritura possuem uma maior concentração de ácidos graxos livre, além de viscosidade cinemática, calor específico, e tensão superficial superior [13].

A degradação de lipídeos pode ser ocasionada por oxidação, hidrólise, pirólise e absorção de sabores e odores estranhos como demonstra a Figura 1. Dentre estes fatores, a oxidação é a principal causa de deterioração, alterando diversas propriedades, como a qualidade sensorial (sabor, aroma, textura e cor); valor nutricional (perda de vitaminas, carotenóides, proteínas e ácidos graxos essenciais); depreciação do produto e toxicidade (grande formação de radicais livres) [13]. Para utilizá-lo é necessário adsorver as impurezas contidas no ORF para maximizar o rendimento da reação na obtenção do biodiesel e atender as especificações exigidas pela ANP.

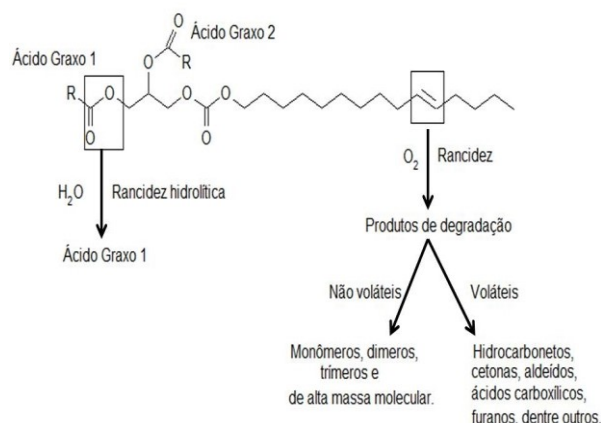


Figura 1. Tipos de rancidez durante o processo de fritura.

4. CASCAS DE ARROZ (CA)

A casca de arroz (CA) mostrada na figura 2, dentre os vários ramos promissores, se destaca na produção de energia e o aproveitamento de suas cinzas ricas em sílica, por isso, com o objetivo de se obter um melhor aproveitamento deste rejeito, vários estudos estão sendo realizados [26, 27, 28].



Figura 2. Cascas de arroz *in natura*.

O aproveitamento de biomassa entra no aspecto da sustentabilidade, visto que há uma considerável redução do balanço energético final de CO₂, pois há absorção desse gás pelas plantas na fotossíntese [29].

As CCA, pelo fato de ser um resíduo proveniente da queima em caldeiras, se torna acessível em grande quantidade e de difícil adequação à sua destinação final. As CA podem ser aproveitadas de várias maneiras, uma delas é a queima direta, que além de gerar energia na qual o CO₂ produzido volta ao ciclo do carbono na biosfera, gera o resíduo final

Tabela 4. Características gerais das CA [32].

Propriedades (%)	Composição elementar (%)	Componentes presentes (%)
Voláteis: 59,5	Carbono: 44,5	Celulose: 34,4
Umidade: 7,9	Hidrogênio: 5,6	Hemicelulose: 29,3
Cinzas: 15,3 – 24,4	Oxigênio: 49,3	Lignina: 19,2

Se não ocorre o aproveitamento dessas CCA advindas da combustão e forem descartadas indevidamente no meio ambiente, a poluição será grave ao solo por causa do alto teor de carbono residual presente [29].

O potencial adsorvente e suas propriedades tornam as CCA um material valioso em pesquisas no preparo de catalisadores. Além disso, Alguns estudos realizados comprovam a capacidade absorptiva das CA

que é a cinza impura, rica em sílica. Se a CCA for utilizada para algum fim comercial, se fechará o ciclo de industrialização do arroz, sendo possível o total aproveitamento da matéria-prima proveniente da lavoura, já que o farelo, gérmen e outras 60 partes já tem destino no mercado. Afinal, uma produção industrial ideal é aquela que gera resíduo zero [29].

Esta casca apresenta alta dureza, fibrosidade e natureza abrasiva, levando à obtenção de um produto com baixas propriedades nutritivas, boa resistência ao desgaste e muita cinza [30].

A casca de arroz (CA) apresenta em sua epiderme externa maior concentração de sílica, na região interna da casca que apresenta um aspecto mais liso da epiderme interna, encontram-se em maior concentração a celulose e a lignina, principais compostos orgânicos da casca. A sílica presente na casca, e por consequência na cinza, está concentrada principalmente dentro da epiderme externa em direção ao meio da estrutura da casca. No entanto, uma pequena, mas significativa quantidade de sílica reside na epiderme interna, adjacente ao grão de arroz [31].

Fernandes [32] indica que as CA possuem um elevado teor de sílica, composta por 50% de celulose, 30% de lignina e 20% de resíduos orgânicos, em que o resíduo inorgânico contém, em média, 95% a 98%, em massa, de sílica, na forma amorfa hidratada, havendo ao todo 13 a 29% de sílica nas CA. Essa composição geral, relacionada na tabela 4, ainda é relacionada a safra, dependendo da variáveis biológicas e climáticas da região [32].

in natura. Estudos utilizaram as CA *in natura* para remoção de metais pesados em efluentes sintéticos e os resultados dos teores de metais determinados nos efluentes ficaram abaixo daqueles requeridos pela EPA (Environmental Protection Agency) para descarte de efluentes [29].

Verifica-se, ainda, de acordo com estudos, que as CA *in natura* apresentam 91,1% de SiO₂ e pequenas quantidades de K₂O, CaO, e outros [9]. Por

isso a lixiviação ácida e a pirólise são processos muito usados na extração da CCA amorfa, podendo apresentar um teor de 90-99% em sílica, constituindo uma fonte barata de sílica com uma área superficial alta, ponto de fusão elevado e porosidade alta [33].

Por esses motivos apresentados que a CCA é comparada facilmente a SiD, suporte comumente utilizado. As cinzas podem ser visualizadas na figura 4.

Colocando-se em foco as razões ambientais, sociais e econômicas apresentadas, há uma motivação ao desenvolvimento de uma futura conscientização e de maior responsabilidade ecológica da população em geral.



Figura 4. Cinzas das cascas de arroz (CCA) que passaram por uma lixiviação ácida.

5. USO NA CLARIFICAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA

No beneficiamento do arroz temos, como subproduto mais volumoso, as cascas, as quais podem ser aproveitadas de diversas maneiras. Devido ao seu alto poder calorífico (≈ 3000 kcal/kg) a geração de energia através da queima da casca de arroz é uma alternativa praticável do ponto de vista tecnológico, viável do ponto de vista econômico e ética do ponto de vista ecológico, pois, a matéria-prima é abundante e todo CO_2 produzido na queima volta para o ciclo de carbono da biosfera terrestre. No caso da geração de energia pela combustão direta, o resíduo final é a cinza impura. Se ela for utilizada, direta ou indiretamente, para algum fim comercial, se fechará o ciclo da industrialização do arroz [29].

Como a cinza contém alto teor de sílica ($> 92\%$), isto a torna um resíduo valorizado [38]. No entanto essa cinza só terá alto valor econômico se tiver alta qualidade, que é mensurada pela alta superfície específica, tamanho e pureza de partícula.

Consequentemente, seria um grande desperdício de matéria-prima nobre jogá-la fora, já que pode ser usada em vários ramos industriais, tais como eletrônica, construção civil, cerâmica, indústria química, fabricação de células fotovoltaicas, entre outros.

As cascas de arroz (CA) têm se apresentado como uma fonte promissora em vários ramos. Dentre eles podemos citar a produção de energia através da queima das cascas de arroz e o aproveitamento de suas cinzas ricas em sílica; como material adsorvivo; para produção de carbeto de silício (SiC); produção de sílica pura; utilização das cinzas como carga em polímeros; produção de cimento e uso em concreto; uso de cinza como suporte de catalisadores metálicos; síntese de zeólitas; e produção de diferentes tipos de silicatos, são algumas alternativas. Dessa forma muitos estudos estão sendo realizados no intuito do melhor aproveitamento deste rejeito [31].

Um outro emprego da casca de arroz tem sido feito por OLIVEIRA e colaboradores (2008) na clarificação do ORF, pois de acordo com a resolução no 7 de 2008 da ANP, o biodiesel deve ser límpido e isento de impurezas, desta forma, verificou-se que o material obtido pela casca de arroz clarificou o ORF em 70% além de diminuir o teor de AGL. Além de Adam & Chua (2004) que modificaram a CCA com alumínio (III) (CCA-Al) para a adsorção de ácido palmítico na qual se verificou como um processo espontâneo e endotérmico [34].

TOSE (2013) atingiu um grau de clarificação superior a 40% a partir do ORF tratado, o biodiesel por transesterificação apresentou índice de refração igual ou menor do que os valores exigidos pela ANVISA (1,466 e 1,470), além de reduzir 81,5% dos ácidos graxos livres [35]. Esse produto também atingiu índice de refração dentro das exigências e uma redução superior a 50% de ácidos graxos livres. Já JUNGER (2012) utilizou 20 % (m/m) de CCA e verificou a clarificação de 23 % do ORF, reduzindo o índice de acidez em 52 % na duração de 48h [36].

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que a CCA como material adsorvivo de compostos indesejados do ORF se mostrou muito eficiente na remoção de ácidos graxos analisados pelo índice de acidez. Quando analisado o grau de clarificação o melhor resultado foi de 48h e 20% em massa, a medida que aumentamos a porcentagem de CCA a clarificação torna-se mais eficiente. Com o teste de Kreis também pode-se visualizar uma menor quantidade de aldeídos e cetonas. Por meio desses

fatos podemos confirmar a eficiência da CCA como adsorvente na recuperação do ORF [36]. Pode-se observar também que CCA possui uma boa área específica e os resultados obtidos são promissores para a utilização desse rejeito [36]

6. USO NA CATÁLISE PARA OBTENÇÃO DE BIODIESEL

A catálise é um ramo da química que estuda o desempenho de catalisadores em várias reações orgânicas e inorgânicas, além do desenvolvimento de novos materiais e sua caracterização.

Catalisadores são substâncias que aumentam a velocidade da reação sem serem consumidas; depois que a reação cessa, o catalisador pode ser recuperado da mistura reacional quimicamente inalterado. O catalisador participa da reação, proporcionando um caminho alternativo, de mais baixa energia, para a formação dos produtos. Visto que o catalisador permanece quimicamente inalterado na reação, ele não aparece como reagente nem como produto, no balanço global da reação [37].

Um catalisador comercial deve ser ativo, seletivo, estável em relação às condições térmicas do processo e à natureza do substrato suficientemente resistente ao atrito, pouco friável, possuir uma vida útil longa e se, por qualquer motivo, perdê-la, ser possível restaurá-la ao nível inicial por meio de uma reação química facilmente exequível (regeneração fácil) [34].

A síntese industrial do biodiesel a partir de matérias-primas com alto teor de ácidos graxos, ainda é em grande parte realizada por meio de catálise básica homogênea. Contudo esta síntese é problemática devido à formação de emulsão, o que diminui o rendimento da reação, dificulta os processos de separação do glicerol e a purificação do biodiesel [2].

Embora a reação com NaOH ou KOH proporcione altos rendimentos, sob condições ideais, a purificação é bastante difícil por causa da glicerina, que é obtida como coproduto no processo, apresentar contaminação com sais, acilgliceróis, sabões, entre outros [2]. Essas inúmeras etapas de purificação encarecem o processo reacional, por isso a reação de esterificação é mais comumente catalisada por ácido sulfúrico [2].

Ademais os catalisadores ácidos tenham a vantagem de evitar a saponificação na reação, o uso

de tais catalisadores agregam problemas ambientais, tanto por dificuldades na reutilização, quanto na produção de efluentes corrosivos. Por isso, há um aumento da utilização de catalisadores ácidos heterogêneos, pois quando utilizados na produção de biodiesel apresentam diversas vantagens quando comparados aos seus análogos homogêneos, como: facilidade na separação dos produtos reduzindo desta forma etapas de lavagem e, portanto os custos do processo; possibilidade de reuso do catalisador e diminuição de rejeitos possibilitando a aplicação de protocolos de produção ambientalmente mais corretos [38].

Além disso, o mecanismo de catálise heterogênea possibilita a comparação do catalisador frente ao uso de dois suportes, a SiD e as CCA, para o possível aproveitamento das CA, produto que, em outras situações, se tornaria um rejeito, e, nesse caso, pode ser aproveitado para a produção de biodiesel.

Diante disso, verifica-se uma incessante procura por um catalisador com alta seletividade e grande estabilidade térmica, verificando essas propriedades com o auxílio de reações de esterificação do ácido oléico.

SANTOS e SOARES (2013) apresentam um estudo interessante da utilização das CA tratada com HCl 20% (v/v) como suporte na esterificação via rota etílica. A reação obteve uma conversão média de 51,19% para impregnação de Nb₂O₅ 10% (m/m). Essa reação foi por 6 h, a 60 °C, com 5% (m/m) desse catalisador, sendo ainda a proporção molar de 1:10 (Ácido Oléico: Etanol). Além disso foi obtido com as CCA um suporte com área específica muito superior a Sílica DEGUSSA, sendo 303 (m²/g) e 140 (m²/g), respectivamente [39].

7. CONCLUSÕES

Países tentam diminuir suas emissões de gases estufa e sua petrodependência, por isso objetivam o desenvolvimento de estudos voltados a produção de alternativas energéticas. Dentre elas a produção de biodiesel, com o intuito de reaproveitar resíduos. Continuadamente nesse propósito as CA, também descartadas discriminadamente no meio ambiente, se tornam promissoras como suporte de catalisadores e adsorventes de óleos residuais de fritura.

Esses óleos residuais, contaminantes aquíferos, podem se tornar reagentes para a produção de um biocombustível sustentável, em que há

aproveitamento de um grande número de resíduos.

Além dos motivos ambientais, as CA também possuem características físico-químicas excelentes para estudos de comparação com o suporte comercialmente utilizado, a sílica DEGUSSA.

Nos últimos anos, tem-se investido cada vez mais em pesquisas para transformação das cinzas de casca de arroz, até então consideradas resíduos industriais, em subproduto de interesse comercial.

8. REFERÊNCIAS E NOTAS

- [1] Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels, ASTM D6751-08.
- [2] Cordeiro, C. S.; Silva, F.R.; Wypych, F.; Ramos, L. P. *Quím Nova*. **2011**, *34*, 477. [[Crossref](#)]
- [4] Geris, R.; Santos, N. A. C.; Amaral, B. A.; Maia, I. S., Castro, V. D.; Carvalho, J. R.M.; *Quím Nova*. **2007**, *30*, 1369. [[CrossRef](#)]
- [5] Schuchardt, U.; Sercheli, R.; Vargas, R. M. *J Braz Chem Soc*. **1998**, *9*, 199. [[CrossRef](#)]
- [6] Campaio, M. J. F.. Produção de biodiesel por catálise heterogênea. [Dissertação de Mestrado] Bragança, Portugal: Escola Superior de Tecnologia e de Gestão de Bragança, Instituto Politécnico de Bragança, 2008. [[Link](#)]
- [7] Disponível em: <http://sec.s bq.org.br/>. Acesso Dezembro 2014.
- [8] Melo Júnior, C. A. R. Esterificação catalítica e não catalítica para síntese de biodiesel em reator micro-ondas. [Dissertação de Mestrado] Aracaju, Brasil: Programa de pós-graduação em Engenharia de Processos, Universidade Tiradentes, 2008. [[Link](#)]
- [9] Disponível em: <http://www.ellocombustiveis.com.br/>. Acesso Maio 2013.
- [10] Kumagai, S.; Sasaki, J. *Bioresour Technol*. **2009**, *100*, 3308. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
- [11] Pacheco, F. *Conjuntura e Planejamento* **2004**, *22*, 26. [[Link](#)]
- [12] Disponível em: <http://anp.gov.br/>. Acesso Maio 2014.
- [13] Disponível em: <http://www.pensamentoverde.com.br/>. Acesso Julho 2014.
- [14] Oliveira, F. C. C.; Suarez, P. A. Z.; dos Santos, W. L. P. *Quím Nova*. **2008**, *28*, 3. [[Link](#)]
- [15] Gomes, M.M.R. Produção de biodiesel a partir da esterificação dos ácidos graxos obtidos por hidrólise de óleo de peixe. [Dissertação de Mestrado] Rio de Janeiro, Brasil: Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009. [[Link](#)]
- [16] Suarez, P. A. Z.; Meneguetti, S. M. P.; Meneguetti, M. R.; Wolf, C. R. *Quím Nova*. **2007**, *30*, 667. [[CrossRef](#)]
- [17] Peterson, C. L.; Hustrulid, T. *Biomass and Bioenergy* **1998**, *14*, 91. [[CrossRef](#)]
- [18] Disponível em: <http://www.apla.org.br/>. Acesso Julho 2014.
- [19] Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/>. Acesso Julho 2014.
- [20] Disponível em: <http://www.biodiesel.gov.br/>. Acesso Janeiro 2014.
- [21] Disponível em: <http://www.pensamentoverde.com.br/>. Acesso Julho 2014.
- [22] Lima Filho, D. O.; Sogabe, V. P.; Calarge, T. C. C. C. *Espacios* **2008**, *29*, 5. [[Link](#)]
- [23] Lucena, T. K. Impactos do Uso de Biodiesel na Economia Brasileira: Uma Análise pelo Modelo Insumo-Produto. [Dissertação de Mestrado] Rio de Janeiro, Brasil: Faculdade de Economia, Universidade Federal Fluminense, 2008. [[Link](#)]
- [24] Costa Neto, P. R. C.; Rossi, L. F. S. *Quím Nova* **2000**, *23*, 531. [[CrossRef](#)]
- [25] Mendonça, D. R.; Da Silva, J. P. V.; Almeida, R. M.; Wolf, C. R.; Meneguetti, M. R.; Meneguetti, S.M.P. *Appl Catal. A* **2009**, *345*, 105. [[CrossRef](#)]
- [26] Parente, E. J. S. Biodiesel: Uma aventura tecnológica num país engraçado, Unigráfica: Fortaleza, 2003.
- [27] Della, V. P.; Hotza, D.; Junkes, J. A.; Oliveira, A. P. N. *Quím nova*. **2006**, *29*, 1175. [[Link](#)].
- [28] Adam, F.; Chua, J. H. *J. Coll. Interf. Scien*. **2004**, *280*, 55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [29] Chang, F. W.; Kuo, M. S.; Tsay, M. T.; Hsieh, M. C. *Appl. Cat. A*. **2003**, *247*, 309. [[CrossRef](#)]
- [30] Foletto, E. L.; Hoffmann, R.; Hoffmann, R. S.; Portugal Jr., U. L.; Jahn, S. L. *Quím Nova* **2005**, *28*, 1055. [[Link](#)]
- [31] Fonseca, M. R. G. Isolantes térmicos a partir de cinza de casca de arroz: obtenção, caracterização de propriedades e sua relação com a microestrutura. [Tese de Doutorado] Porto Alegre, Brasil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999. [[Link](#)]
- [32] James, J.; Rao, M.S. *Thermochem. Acta* **1985**, *97*, 329. [[CrossRef](#)]
- [33] Fernandes, A. Síntese de Zeólita e Wollastonita a partir da cinza da casca de arroz. [Tese de Doutorado] São Paulo, Brasil: Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade de São Paulo, 2006. [[Link](#)]
- [34] Braga, V.S. Preparação e caracterização de catalisadores baseados em pentóxido de nióbio e óxido de cobre (II) aplicados em reações de esterificação e transesterificação. [Tese de Doutorado] Brasília, Brasil: Instituto de Química, Universidade de Brasília, 2007. [[Link](#)]
- [35] Soares, A. B. Estudo de catalisadores heterogêneos na transesterificação do óleo de soja. 2009. 142 f. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais – Universidade Estadual do Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes, RJ, 2009. [[Link](#)]
- [36] Tose, L. V.; Soares, A. B. Abstract da VII Jornada de Iniciação Científica, Desenvolvimento Tecnológico e Inovação do IFES, Vitória, Brasil, 2012. [[Link](#)]
- [37] Junger, D. L.; SOARES, A. B. Abstract da VI Jornada de Iniciação Científica, Desenvolvimento Tecnológico e Inovação do IFES, Vitória, Brasil, 2011. [[Link](#)]
- [38] Brady, J. E.; Humiston, G. E. Química Geral 2. 2nd ed. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos, 2000.
- [39] Ciola, R. Fundamentos da catálise. 1st ed. São Paulo: Moderna, 1981.
- [40] Santos, H.; Soares, A. B. Abstract da VII Jornada de Iniciação Científica, Desenvolvimento Tecnológico e Inovação do IFES, Vitória, Brasil, 2012. [[Link](#)]

Condutividade da Polianilina e Poliacrilonitrila Dopadas com Fe(II) e Fe(III)

Yonis Fornazier Filho*, Eloi Alves da Silva Filho, Vadilson Malaquias dos Santos, Evaristo Nunes Filho, Carlos Gilmar Zucolotto Junior, Alfredo Gonçalves Cunha

Departamento de Química e Departamento de Física da Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, 514, Vitória-ES, Cep. 29075-910, Brasil.

Article history: Received: 13 September 2014; revised: 29 October 2014; accepted: 11 November 2014. Available online: 02 January 2015.

Abstract: In this work we report the studies on Polyaniline Emeraldine (PANI-ES) and Polyacrylonitrile (PAN) doped with salt of Fe (II) and Fe(III). We used the techniques of conductivity measurements with application of pressure. The results showed that conductivity of PANI-ES increase with pressure of range of 1.73 MPa until 20.0 MPa and PAN also increase with maximum of 6.0 mPa except to samples PAN-2-TT-FeIII and PAN-2-TTAA-FeIII.

Keywords: polyaniline; polyacrylonitrile; conductivity; semiconductor

1. INTRODUÇÃO

A condutividade em materiais poliméricos é um fenômeno estudado há alguns anos, apesar de que uma das principais características desses materiais serem a sua capacidade isolante de altas frequências e de voltagens (alta resistividade). Uma das características dos polímeros condutores, também chamados de “metais sintéticos” é a existência em suas estruturas de longos sistemas π conjugados (alternância de ligações simples e duplas ao longo da cadeia) que devidamente tratados possibilitam o aumento da condutividade [1, 2]. Entretanto, a baixa condutividade dos materiais poliméricos é alterada mediante a dopagem pela adição ou remoção de elétrons da cadeia polimérica [3]. A condutividade dos polímeros pode variar com fatores como a temperatura; microestrutura e morfologia e assim os polímeros mais ordenados contêm poucos defeitos que interrompem a conjugação da cadeia polimérica, pois tem maior ordenamento molecular e maior grau de cristalização [4-6]; dissolução em um solvente, como por exemplo, nos eletrólitos poliméricos gelificados de Li/PAN/Solvente [7]. Os métodos mais utilizados para a medida da resistividade em sólidos são os métodos de duas pontas, também conhecido como de dois terminais que é um padrão

recomendado pela ASTM (D257-99) para materiais com resistência elétrica acima de $10^6 \Omega$ e o método da sonda de quatro pontas pela ASTM (F43-99) para medida de resistividade em materiais semicondutores cuja utilização está relacionada à geometria da amostra e os fatores de correção necessários à obtenção do valor correto da resistividade [8]. A medição da condutividade elétrica do polímero macerado (em grãos) até a formação dos filmes devido à pressão é uma adaptação do método descrito por Gilmar *et. al.*, [9]. O objetivo deste trabalho foi aplicar o método de quatro pontas para medidas da condutividade sob efeito da pressão para os polímeros Polianilina na forma esmeraldina (PANI-ES) e Poliacrilonitrila (PAN), dopadas com íons do metal ferro, PANI-ES-Fe(II), PANI-ES-Fe(III), PAN-Fe(II), PAN-Fe(III).

2. MATERIAL E MÉTODOS

A reação de síntese da Polianilina na forma esmeraldina (PANI-ES) foi realizada utilizando o procedimento descrito por Devendrappa *et. al.* [10] através da reação da anilina bidestilada em solução aquosa de ácido clorídrico em concentrações de 1,0 mol/L e usando o agente oxidante persulfato de

*Corresponding author. E-mail: eloi.silva@ufes.br

amônia, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$. As amostras da Poliacrilonitrila (PAN) utilizadas neste trabalho foram sintetizadas pelo método de emulsão de Sánchez-Soto *et al.* [11] realizada pela adição de 50 mL de água deionizada, 0,5g de peróxido de benzoíla e 25 mL de acrilonitrila em um erlenmeyer, com agitação, à temperatura de 60 °C por um período de 2 h que resultou na formação do polímero PAN, que foi lavado cinco vezes em água destilada e separado da solução por filtração a vácuo e caracterizado por espectroscopia no infravermelho (FT-IR), calorimetria exploratória de varredura (DSC), termogravimetria (TGA), viscosimetria e raios-X [12, 13].

Para as medidas de resistividade elétrica DC

foi utilizado um cilindro de acrílico, representado na Figura 1 para a amostra de PANI-ES, sendo constituído por 7,5 cm de altura, perfurado internamente num diâmetro de 6,5 mm tendo dois pistões de cobre inseridos com a função de contato para o material a ter sua resistência medida. Cada pino tem cabeça circular com diâmetro de 5,0cm que se encaixa no cilindro de acrílico. A base de cada pistão possui encaixes para as duas sondas, onde é efetuada a condução de corrente (Figura 1). O pistão maior tem 6,0cm de altura com base de 1,0 cm. O pistão menor tem 1,5 cm de altura com base de 1,0 cm. O peso total do conjunto vazio foi de 601,60 g. Todo o conjunto foi isolado de contato com a prensa por duas placas de teflon.

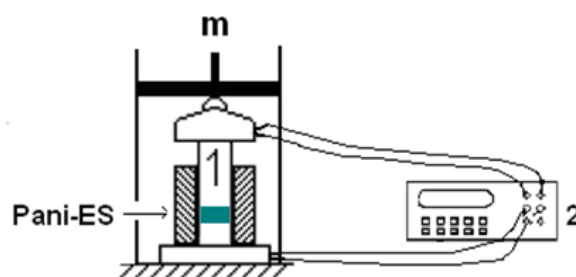


Figura 1. Cilindro de acrílico utilizado para medidas das resistências DC das amostras sintetizadas. Detalhe da armação do cilindro com a amostra, pistões (1) e cabos ligados e o isolamento do cilindro com placas de teflon (2).

Como fonte de tensão DC e medida de resistência foi utilizado um Multímetro Digital 3440 A1 *Digital Multimeter* da Agilent. Para realização de pressão sobre o sistema foi utilizada uma prensa Modelo C da Carvel Laboratory Press. Para a medida de resistência da PANI-ES foi utilizado massa de 1,608g. O material foi colocado dentro do tubo de acrílico, fechado com os pinos ligados ao multímetro por quatro cabos e após foi passada uma corrente DC e procedeu-se a medida da resistência em ohm (Ω). A medida inicial foi feita a pressão atmosférica. Após a

primeira medida foi efetuado um aumento gradual de pressão a 1,73 MPa a um máximo de 20,0 MPa respectivamente. Para cada intervalo de aumento de pressão foram efetuadas três medidas de resistência (três leituras) no intervalo de cinco minutos. Todos os filmes dos polímeros PANI-ES e PAN foram dopados com soluções de FeCl_2 0,01 mol·L⁻¹ e FeCl_3 0,01 mol·L⁻¹, como é apresentado na Tabela 1. O procedimento foi aplicado para as medidas de condutividade dos demais filmes poliméricos.

Tabela 4. Dopagem das amostras sintetizadas.

Amostra	Condições
PANI-ES	Filme obtido a partir da anilina em meio ácido HCl 1,0 mol/L
PANI-ES-Fe(II)	Filme obtido pela dissolução da PANI-ES em soluções de FeCl_2 0,01 mol·L ⁻¹
PANI-ES-Fe(III)	Filme obtido pela dissolução da PANI-ES em soluções de FeCl_3 0,01 mol·L ⁻¹
PAN-1-FeII*	Filme obtido pela adsorção direta de FeCl_2 0,01 mol·L ⁻¹ a PAN-1
PAN-1-FeII	Filme obtido por evaporação do solvente da PAN dissolvida em DMF, após a adsorção de FeCl_2 0,01 mol·L ⁻¹
PAN-1-FeIII	Filme obtido pela adsorção 1,0 mL de FeCl_3 0,01 mol·L ⁻¹ em PAN dissolvida em DMF e evaporação do solvente
PAN-2-TT-FeII	Filme obtido pela adsorção 1,0 mL de FeCl_2 0,01 mol·L ⁻¹ em PAN-2 -TT
PAN-2-TT-FeIII	Filme preparado pela Adsorção de 1,0 mL de FeCl_3 0,01 mol·L ⁻¹ em solução alcoólica
PAN-2-TTAA-FeIII	Filme obtido pela adsorção 1,0 mL de FeCl_2 0,01 mol/L em PAN-2 -TTAA

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Medidas de resistência e condutividade elétrica em sólidos poliméricos na forma de pó são difíceis de serem realizadas. Algumas tentativas foram feitas neste trabalho, utilizando-se amostras prensadas e medidas diretamente no multímetro, mas a variação observada foi muito grande. À medida que os terminais eram levemente pressionados na amostra, observava-se uma brusca mudança na resistência, e logicamente na condutividade dos materiais. Portanto as condutividades dos materiais variavam com a pressão. Daí seria necessário buscar uma técnica em

que se pudesse medir a resistência e a condutividade em função da pressão. Os cálculos da condutividade (ρ) foram feitos usando a equação $R = \rho \cdot (L/A)$ [14], onde A é a área da pastilha prensada e fixada em 3.3×10^{-3} cm, R a resistência (Ω), e L (cm) a espessura da amostra pressionada, que varia de acordo com a pressão aplicada. Portanto a condutividade foi medida em $(\Omega \cdot \text{cm})^{-1}$ ou $(\text{S} \cdot \text{cm}^{-1})$, medida diretamente no ohmímetro. Os resultados foram plotados em um gráfico, que é mostrado na Figura 2. A partir deste gráfico foi possível observar a variação da condutividade em função da pressão.

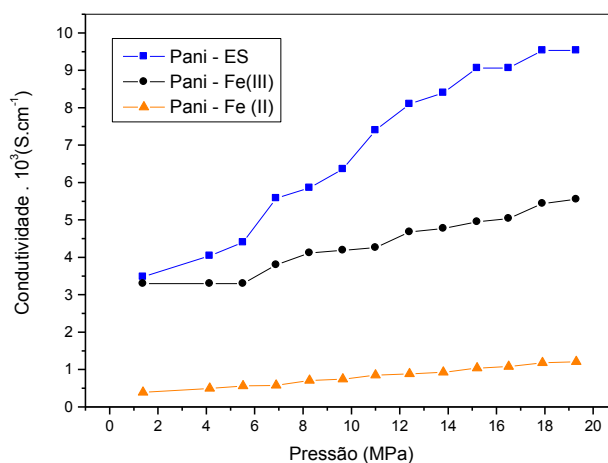


Figura 2. Condutividade das amostras de PANI-ES, PANI-Fe(II) e PANI-Fe(III).

Nas medidas da PANI-ES foram observadas resistências na ordem de Ω , entre valores de 0,057 e 0,032 Ω . Observou-se, portanto a diminuição da resistência com o aumento da pressão. Isto significa que tendo baixa resistência, a PANI-ES tem alta resistividade e alta condutividade, o que era esperado segundo a literatura [15, 16]. Também não houve muita variação nos valores da resistividade, sendo observada uma rápida estabilização em 0,032 Ω e com facilidade de medidas. Isto comprova a alta condutividade do material. A PANI-ES atingiu valores de condutividade da ordem de $10^3 \text{ S} \cdot \text{cm}^{-1}$, o que está de acordo com a literatura [15, 16]. Isto comprova a alta condutividade desta forma da PANI.

Para a PANI-Fe(III) foram observadas resistências na ordem de Ω , e com estabilidade mais constante em relação a PANI-ES. Não houve muita variação nas medidas, sendo fácil de medir, pois a estabilidade foi maior. A condutividade variou entre $3,3 \times 10^3$ e $5,6 \times 10^3 \text{ S} \cdot \text{cm}^{-1}$, valores próximos e um pouco abaixo dos medidos para a PANI-ES (Figura

2).

Para amostra PANI-Fe(II), foram observadas resistências na ordem de Ω , mas com valores maiores em relação a PANI-ES e a PANI-Fe(III). Também manteve uma estabilidade, mas com variação menor em relação às outras duas amostras, não ocorrendo muita variação. As condutividades variaram na faixa de $0,39 \times 10^3$ a $1,2 \times 10^3 \text{ S} \cdot \text{cm}^{-1}$, atingido, portanto, valores menores que as outras duas amostras.

Segundo Mattoso [17], estudos demonstraram que o máximo na condutividade ocorre na forma 50% oxidada. E a reação de protonação ocorre preferencialmente nos nitrogênios imínicos (quinoides). Portanto, a forma mais condutora seria quando a protonação ocorre na forma quinóide (imina). A PANI-ES tem cerca de 50% de sua cadeia protonada nos nitrogênios imínicos. O restante da cadeia polimérica apresenta, portanto, preferencialmente nitrogênios na forma benzenóide (amina), que seria a forma onde ocorre a menor condutividade da PANI. Sendo assim, quando os íons

ferro foram adicionados, preferencialmente interagem com os nitrogênios amínicos (benzenóides) [18].

As condutividades das amostras sólidas de PANI-Fe(III) e PANI-Fe(II), foram inferiores as da amostra PANI-ES. Estes resultados demonstram que os íons ferro, ocuparam em sua maior parte os nitrogênios amínicos. Também podem existir íons ferro em nitrogênios imínicos, tal como foi demonstrado nos espectros FT-IR e Mössbauer [19]. Mas os testes de condutividade demonstraram que estes íons ocuparam em sua maior parte os nitrogênios benzenóides. Portanto, para interação dos íons Fe(III) com a cadeia polimérica, pode-se sugerir uma estrutura análoga a indicada por Genoud *et al.* [20] e Bienkowsk *et al.* [21].

A condutividade elétrica de materiais

poliméricos tem variação apreciável com a variação de temperatura, a concentração do dopante e a morfologia [21-23]. A condutividade elétrica sob corrente contínua (σ) dos filmes de PAN sintetizadas foram obtidas na faixa de 10^{-5} a $10^{-10} \Omega^{-1}\text{m}^{-1}$. Onde, a com menor condutividade foi encontrada para PAN-1-FeIII, e a adsorção do Fe(III) ocorreu em concentração muito pequena, o que pode ter influenciado na condutividade.

A Figura 3, apresenta a resistividade e a condutividade versus a pressão para uma amostra PAN-1 com formato cilíndrico de base com área de $3,3 \times 10^{-5} \text{ m}^2$ e lado de 5,6 mm dopada com solução de Fe(II) $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e seca a 60°C . Neste caso, o aumento de pressão fez com que a condutividade do material aumentasse significativamente.

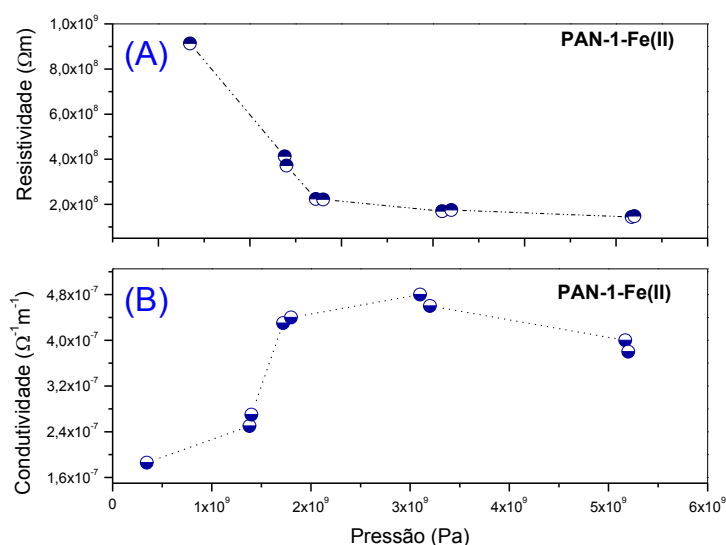


Figura 3. Comportamento da condutividade sob pressão dos filmes PAN-1-FeII. (A) Resistividade versus pressão; (B) Condutividade versus pressão.

Tal fato pode estar associado a um processo de otimização morfológica propositada pelo aumento de pressão sobre o material, mais os processos de condutividades em materiais poliméricos são complexos. A PAN-1 é um polímero semicristalino, sendo, portanto a contribuição da parte cristalina do polímero na condutividade relativamente pequena. Em tese, a parte amorfa do material teria maior papel no processo de condutividade do material em questão [22].

A condução nos filmes de PAN que foram modificados por adsorção é realizada na fase amorfa e irrelevante para os domínios microcristalinos

detectados na análise DSC e observados nas microscopias. O aumento da condutividade devido à presença de uma dispersão Fe(II) pode ser relacionado ao movimento do íon no material.

No caso das amostras de PAN-2-TT-FeIII e PAN-2-TTAA-FeIII analisadas, têm a condutividade diminuída com o aumento de pressão, Figura 4.

Os mecanismos de transporte de cargas em materiais poliméricos diferem em muito dos que ocorrem em condutores comuns, como os metais. Em materiais isolantes, em geral, a condutividade ocorre em decorrência de íons livres.

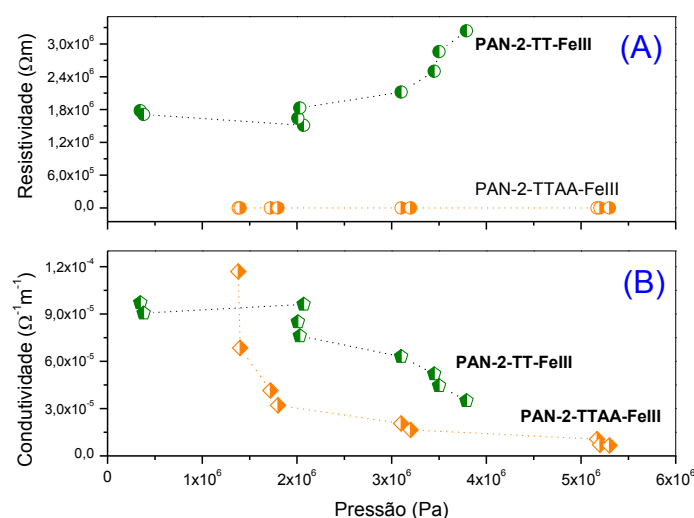


Figura 4. Comportamento da condutividade sob pressão dos filmes PAN-2-TT-FeIII. (A) Resistividades versus pressão; (B) Condutividades versus a pressão.

4. CONCLUSÃO

A condutividade no polímero está associada ao transporte por portadores de carga e associada à porção amorfa da PAN. O aumento de pressão sobre o polímero produz alterações morfológicas e modifica a forma de condução do material. A condutividade dos filmes está próxima à dos semicondutores inorgânicos.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPES/FUNCITEC pela bolsa de estudo e ao LabPetro-DQUI/UFES pelo apoio e suporte experimental e a equipe do LEMAG, LMC e LPT do DFIS/UFES pelas medidas de condutividade.

6. REFERÊNCIAS E NOTAS

- [1] Maia, D. J.; De Paoli, M. A.; Alves, O. L.; Zarbin, A. J. G.; das Neves, S. *Quim. Nova* **2006**, *23*, 204. [[CrossRef](#)]
- [2] Pant, H. C.; Patra, M. K.; Negi, S.C.; Bhatia, A.; Vadera, S. R.; Kumar, N. *Bull. Mater.* **2006**, *29*, 379. [[CrossRef](#)]
- [3] MacDiarmid, A. G.; Heeger, A. J. *Synth. Met.* **1979**, *1*, 101. [[CrossRef](#)]
- [4] Geniès, E. M.; Lapkowsk, M. J. *Electroanal. Chem.* **1987**, *220*, 67. [[CrossRef](#)]
- [5] Bredas, J. L.; Street, G. B. *Acc. Chem. Res.* **1985**, *18*, 309. [[CrossRef](#)]
- [6] Lei, J.; Cai, Z.; Martin, C. R. *Synth. Met.* **1992**, *46*, 53. [[CrossRef](#)]
- [7] Su, W. P.; Schrieffer, J. R.; Heeger, A. J. *Phys. Rev. Lett.* **1979**, *42*, 1698. [[CrossRef](#)]
- [8] Giroto, E. M.; Santos, I. A. *Quim. Nova* **2002**, *25*, 639. [[CrossRef](#)]
- [9] Zucolotto Jr., C. G. Geração de Hidrogênio e Negro de Fumo Pela Pirólise do Gás Natural Utilizando Uma Tocha de Plasma [Master's thesis.] Vitória, Brazil: Centro de Ciências Exatas, Departamento de Física da Universidade Federal do Espírito Santo, 2006.
- [10] Devendrappa, H.; Rao, U. V. S.; Prasad, M. V. N. A. *J. Power Sources* **2006**, *155*, 368. [[CrossRef](#)]
- [11] Sánchez-Soto, P. J.; Avilés, M. A.; del Rio, J. C.; Ginés, J. M.; Pascual, J.; Pérez-Rodríguez, J. L. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **2001**, *58*, 155. [[CrossRef](#)]
- [12] Fornazier Filho, Y. Síntese, dopagem e caracterização da polianilina com sais de Fe(II) e Fe(III). [Master's thesis.] Vitória, Brazil: Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo, 2009.
- [13] Santos, V. M. Estudo dos filmes de poliácrolonitrila modificados pela adição de clorofilas, citocromo c, Fe(II) e Fe(III). [Master's thesis.] Vitória, Brazil: Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo, 2009.
- [14] Konermann, L.; Silva, E. A.; Sogbein, O. F. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4836. [[CrossRef](#)]
- [15] Minto, C. D. G.; Vaughan, A. S. *Polymer* **1997**, *38*, 2683. [[CrossRef](#)]
- [16] Trchova, M.; Stejskal, J. *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 1803. [[CrossRef](#)]
- [17] Mattoso, L. H. C. *Quim. Nova* **1996**, *19*, 388. [[Link](#)]
- [18] Oshida, K.; Einaga, Y. *Thin Solid Films* **2007**, *515*, 5484. [[CrossRef](#)]

- [19] Fornazier Filho, Y.; Silva, E. A. *Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros – Foz do Iguaçu, PR – Outubro/2009*.
- [20] Genoud, F., C.; Bedel, A.; Oddou, J. L.; Jeandey, C.; Pron, A. *Mater. Chem. Phys.* **2000**, *12*, 744. [[CrossRef](#)]
- [21] Bienkowski, K.; Kulszewicz-Bajer, I.; Genoud, F.; Oddou, J.L.; Pron, A. *Mater. Chem. Phys.* **2005**, *92*, 27. [[CrossRef](#)]
- [22] Canevarolo, S. V. *In: Ciência dos Polímeros*, eds. São Paulo: Artliber, 2002.
- [23] Wang, B.; Xiao, S.; Cao, W.; Shi, X.; Xu, L. *J. Appl. Polymer Sci.* **2012**, *12*, 3413. [[CrossRef](#)]