FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDOS FÚLVICOS EXTRAÍDOS DE RESÍDUOS RECICLADOS PARA ACTIVIDADES AGRÍCOLAS

DISSERTAÇÃO PARA DOUTORAMENTO EM QUÍMICA

CÉSAR JOÃO DOS SANTOS OLIVEIRA

Mestre em Química (U.P.)

PORTO

2000

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDOS FÚLVICOS EXTRAÍDOS DE RESÍDUOS RECICLADOS PARA ACTIVIDADES AGRÍCOLAS

DISSERTAÇÃO PARA DOUTORAMENTO EM QUÍMICA

CÉSAR JOÃO DOS SANTOS OLIVEIRA

MESTRE EM QUÍMICA (U.P.)

PORTO

2000

Em memória da avó Idalina

À minha família

RESUMO

Caracterizaram-se duas amostras de ácidos fúlvicos (AF) antropogénicos extraídos de dois "compostos" obtidos a partir da reciclagem de lamas de uma estação de tratamento de águas residuais urbanas (AFLC) e de resíduos animais (AFRAC), que são utilizados como correctivos orgânicos em actividades agrícolas. Estas amostras de AF foram comparadas com duas outras amostras extraídas de solos naturais (solo de pinhal, AFS, e de um solo Laurentian, AFLau) quanto às suas propriedades.

Efectuou-se uma caracterização geral das amostras de AF, tendo-se recorrido a análises elementares, estudos espectroscópicos (RMN de ^{13}C, FT-IR, UV-Vis e fluorescência molecular síncrona), titulações potenciométricas com medição de pH e condutimétricas com base forte, e caracterização da distribuição de massas moleculares por cromatografia de alta pressão com exclusão por tamanhos. Esta caracterização geral mostrou que as amostras de AF antropogénicas, quando comparadas com as amostras de solo natural, apresentam maior abundância em azoto e enxofre, menor quantidade de estruturas aromáticas condensadas e maior quantidade de estruturas alifáticas, um número inferior de grupos carboxílicos ácidos mais fortes ($pK_a \approx 3$) e massas macro-moleculares ligeiramente menores, sendo constituídas por moléculas diferentes. Cada amostra antropogénica exibiu algumas particularidades. Assim, verificou-se que a amostra AFLC contém uma quantidade relativamente elevada de estruturas ácidas com $pK_a \approx 6$ e uma maior dispersão na distribuição de massas moleculares, enquanto a amostra AFRAC possui uma quantidade relativamente pequena de sítios quelantes de catiões metálicos.

Caracterizaram-se detalhadamente as propriedades de complexação de catiões metálicos com as amostras de AF, utilizando quer a potenciometria com eléctrodos selectivos a iões [catiões Cu(II), Pb(II) e Cd(II), a uma concentração de AF de 25 mg/L e a pH 6,0], quer a fluorescência molecular síncrona [catião Cu(II), a concentrações de AF de 25, 50 e 100 mg/L, a pH 3, 4, 5 e 6]. Também se estudaram as propriedades cinéticas da complexação dos AF com os catiões Cu(II) e Ni(II). Globalmente, não foram detectadas grandes diferenças entre as amostras antropogénicas e as amostras naturais quanto às suas propriedades de complexação, à excepção da amostra de AFRAC que se caracteriza por uma capacidade de complexação (quantidade de sítios ligantes) muito inferior à das restantes amostras.

Estudaram-se as interacções entre as amostras de AF e o herbicida atrazina, tendo-se utilizado metodologias de extracção e cromatografia de alta pressão com exclusão por tamanhos. Quando se comparou a associação dos AF e a atrazina com associações envolvendo outras substâncias orgânicas, verificou-se que a primeira é muito débil, quer no valor da constante de associação, quer na respectiva labilidade. Uma análise global da informação disponível sobre a associação da amostra AFLC com substâncias orgânicas pouco solúveis mostrou que essa associação é mais forte que as associações detectadas para as amostras de AF naturais.

Obteve-se alguma informação sobre eventuais transformações que as amostras de AF antropogénicas podem sofrer quando adicionadas a um solo natural. As informações recolhidas numa experiência de laboratório que abarcou um período de seis meses, mostraram que essas transformações, a existirem, serão pequenas, e que os AF antropogénicos se misturam com os AF naturais sem sofrerem transformações significativas. Verificou-se que as características dos AF extraídos das misturas dos "compostos" com o solo natural correspondem, de forma grosseira, a uma média pesada das propriedades das duas amostras de AF que estão na origem da mistura.

Embora não seja possível retirar conclusões absolutas sobre eventuais impactos de uma prática agrícola que envolva a utilização continuada de produtos reciclados (vulgarmente denominados "compostos") na fracção húmica dos solos, os resultados obtidos neste trabalho apontam para uma provável existência de transformações que podem ocorrer nessa fracção dos solos agrícolas.

ABSTRACT

Two samples of anthropogenic fulvic acids (AF) extracted from two composts used as organic correctives in agricultural activities obtained from sewage sludge from a municipal waste water treatment station (AFLC) and from livestock (AFRAC), were characterized. The properties of these two samples were compared with those of two samples of fulvic acids extracted from natural soil (pinewood soil, AFS, and Laurentian soil, AFLau).

A general characterization has been done by elemental analysis, spectroscopic studies (^{13}C-NMR, FT-IR, UV-Vis and synchronous molecular fluorescence), potentiometric pH readings and conductimetric titrations with a strong base, and molecular weight distribution by high pressure size exclusion chromatography (HP-SEC). This characterization shows that the anthropogenic samples have, when compared with the natural samples, higher content of nitrogen and sulphur, less quantity of condensed aromatic structures and an higher content of aliphatic structures, lower concentration of more strong carboxylic acid structures ($pK_a \approx 3$), average macromolecular weights somewhat smaller and constituted by different molecules. Some particularities have been detected in each anthropogenic samples: AFLC has a greater concentration of acid structures with a pK_a about 6 and a larger dispersion in the distribution of molecular weights; AFRAC has a relatively small concentration of binding sites towards metal ions.

The complexation properties of the AF samples towards metal cations were studied in detailed by potentiomety with ion selective electrodes [Cu(II), Pb(II) and Cd(II), concentration of AF 25 mg/L, at pH 6] and by synchronous molecular fluorescence [Cu(II), concentration of 25, 50 and 100 mg/L, at pH 3, 4, 5 and 6]. Moreover, the kinetic properties of the complexation of Cu(II) and Ni(II) ions were analysed. Globally, there weren't detected different complexation properties between the anthropogenic and natural samples, with the exception of the AFRAC sample that has a relatively small complexation capacity (binding sites quantity).

The interaction of the AF samples with atrazin was studied using extraction and high pressure size exclusion chromatography techniques. The association of all samples of AF with atrazin revealed to be very week when compared with the association of the same set of samples with other organic substances. A global analysis of the available

information about the association of the AFLC sample with hydrophobic organic substances showed that it has a stronger association with the natural AF samples.

Further information about possible transformations that the anthropogenic AF samples could undergo when mixed with natural soil, were obtained. The information obtained from a pilot scale experiment, in a six months period, showed that if any transformations are observed they are quite small. The properties of AF samples extracted from mixtures of natural soil and "composts" roughly correspond to an weight average of the properties of the two AF samples.

Although absolute conclusions about the existence of possible impacts in the humic fraction of agricultural soils as consequence of the continuous application of recycled products (composts) cannot be obtained, the results of this work suggests a probable existence of some sort of transformations in the humic fraction of agricultural soils.

RÉSUMÉ

On à procédé a la caractérisation de deux échantillons de acides fulvique (AF) anthropogenèse extraite de deux composts utilisé comment correctives organique en activité agricole et obtenu de la recyclage de lames d'une station de traitement de l'eau résiduel municipal (AFLC) et des résiduel animaux (AFRAC). On à comparé ces propriétés avec deux autres échantillons de acides fulvique naturel extraite de sols naturels (sol de bois de pins, AFS, et sol Laurentian, AFLau).

Une caractérisation globale à été effectué avec les analyse élémentaire, spectroscopie (^{13}C-RMN, FT-IR, UV-Vis et fluorescence moléculaire synchrone), titrage potentiomètric avec mesure de pH et titrage conductivité avec une base fort, et distribution de mass moléculaire par chromatographie de haute pression avec l'exclusion de grandeurs. Cette caractérisation générale montre que les échantillons de AF anthropogenèse ont, quand comparé avec les échantillons naturels, un major quantité de nitrogène et sulfure élémentaire, plus petite quantité des structures aromatique condensés et plus grande quantité des structures aliphatique, mineur quantité de groups acides plus forts ($pK_a \approx 3$), mass macromoléculaire légèrement inférieur et constitué par différentes molécules. On a détecté quelques particuliers dans les échantillons anthropogenèse: ALFC a une relativement grande quantité de structures acides avec une $pK_a \approx 6$ et une plus grand dispersions de la distribution de masses moléculaires; AFRAC a une quantité relativement petite de place de complexation des ions métalliques.

Les propriétés de complexation de les enchantions des AF avec les ions métalliques on a été suffisant étudie par la potentiomètrie [ions Cu(II), Pb(II) e Cd(II), une concentration 25 mg/L, pH 6,0] et par fluorescence moléculaire synchrone [ions Cu(II), concentrations 25, 50 et 100 mg/L, pHs de 3, 4, 5 e 6]. Les propriétés cinétiques avec les ions Cu(II) et Ni(II) one été étudié. Globalement, on a pas détecté différences entre les propriétés de complexation des échantillons de AF naturels et anthropogenèse, avec l'exception de l'échantillon AFRAC, caractérisé par une capacité de complexation (quantité de place de complexation) très petite que les autres.

On á étudié l'interaction entre les échantillons de AF et l´herbicide atrazine avec une méthodologie d'extraction et par chromatographie de haute pression avec l'exclusion de grandeurs. L'association entre l'atrazine et AF est très faible. Une

analyse globale de l'information disponible sur l'interaction des AF anthropogenèse et les substances organiques montré que l'association et plus fort que l'observé par les échantillons naturels.

Quelque information a été obtenue sur l'éventuel transformations que les échantillons des AF anthropogenèse souffrent quand elles sont aditioné au sol naturel. Les informations obtenues dans une expérience de laboratoire, dans une période de six moins, montré q'il n'y a pas de grandes transformations dans les AF anthropogenèse.

Cette travaille ne permis pas de tiré de conclusions absolues sur l'existence des impacts dans la fraction humique des sols agricole en conséquence de l'utilisation intensive des produits recycle. Quelques évidences suggèrent q'il va avoir transformations dans la fraction humiques des sols agricoles.

AGRADECIMENTOS

Agradece-se a orientação do Prof. Doutor Joaquim C. G. Esteves da Silva.

Agradece-se à Fundação para a Ciência e Tecnologia uma bolsa de Doutoramento atribuída pelo Programa Praxis XXI (BD/9187/96).

Este trabalho de Doutoramento foi realizado no âmbito do projecto DGA 30/96, da Direcção Geral do Ambiente/Fundação para a Ciência e Tecnologia. Algumas partes do trabalho foram executados no âmbito dos Projectos PBIC/C/QUI/2177/95 e PRAXIS XXI 2/2.1/QUI/294/94, ambos da Fundação para a Ciência e Tecnologia.

ÍNDICE GERAL

1 – INTRODUÇÃO GERAL

1.1 – GÉNESE DO TRABALHO 1

1.1.1 – Substâncias húmicas 1

1.1.2 – SH antropogénicas 3

1.1.3 – Compostagem 5

1.1.4 – Interacções das SH com catiões metálicos 7

1.1.5 – Interacções das SH com herbicidas 8

1.2 – OBJECTIVOS DO TRABALHO 11

1.3 – ORGANIZAÇÃO DO RELATÓRIO 12

1.4 – BIBLIOGRAFIA 12

2 – TEORIA

2.1 – ESTUDOS CONDUTIMÉTRICOS 15

2.1.1 – Soluções de surfactantes 15

2.1.2 – Soluções de polielectrólitos 19

2.1.2.1 – Determinações de condutividade 19

2.1.2.2 – Determinação de fr e λ_{Pol} 21

2.2 – ESTUDOS DE CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHOS 20

2.3 – TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DOS DADOS DE FLUORESCÊNCIA 23

2.3.1 – Pré-processamento de dados espectrais 23

2.3.2 – Técnicas para a análise dos perfis de extinção de fluorescência 25

2.3.2.1 – Análise de Stern-Volmer 25

2.3.2.2 – Método de Ryan e Weber 29

2.4 – TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DOS DADOS POTENCIOMÉTRICOS 31

2.4.1 – Titulação de misturas de AF e catião Cu(II) com base forte 31

2.4.2 – Interacção de catiões metálicos com amostras de AF 32

2.4.2.1 – Modelos de cálculo utilizados no tratamento dos dados experimentais 32

2.5 – ESTUDOS CINÉTICOS 39
2.5.1 – Decomposição por PARAFAC de matrizes de três vias 39
2.5.2 – Lei integrada das velocidades 40
2.5.2.1 – Definição da lei integrada das velocidades 40
2.5.2.2 – Resolução da lei integrada das velocidades 42
2.6 – TÉCNICAS DE CALIBRAÇÃO MULTICOMPONENTE 43
2.6.1 – Introdução 43
2.6.2 – Regressão dos componentes principais 44
2.6.3 – Mínimos quadrados parciais 46
2.7 – ESTUDOS DE SOLUBILIDADE 48
2.7.1 – Modelação das interacções entre as SH e a atrazina 48
2.7.2 – Efeito dos sais inorgânicos na solubilidade da AT 49
2.8 – BIBLIOGRAFIA 51

3 – SECÇÃO EXPERIMENTAL

3.1 – ORIGEM DAS AMOSTRAS ESTUDADAS 55
3.2 – REAGENTES E SOLUÇÕES 55
3.3 – EQUIPAMENTOS UTILIZADOS 57
3.3.1 – Medições condutimétricas 57
3.3.2 – Medições de fluorescência 57
3.3.3 – Medições de UV-Vis 57
3.3.4 – Medições potenciométricas 58
3.3.5 – Separações cromatográficas 60
3.3.6 – Medições de RMN 60
3.3.7 – Centrifugação 60
3.3.8 – Banho termostático com agitação 60
3.4 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS 62
3.4.1 – Estudos condutimétricos 62
3.4.1.1 – Medições condutimétricas simples 62
3.4.1.2 – Titulações condutimétricas 62
3.4.2 – Medições de fluorescência 62
3.4.3 – Medições de UV-Vis 63
3.4.4 – Medições potenciométricas 63

3.4.4.1 – Titulação de misturas de AF e catião Cu(II) com base forte 63
3.4.4.2 – Interacção de catiões metálicos com amostras de AF 63
3.4.4.3 – Calibração dos eléctrodos selectivos a catiões metálicos 64
3.4.5 – Separações cromatográficas 65
3.4.6 – Extracções sólido-líquido e líquido-líquido 66
3.4.7 – Estudos cinético-espectrofotométricos 67
3.4.7.1 – Estudos cinético-espectrofotométricos da descomplexação de catiões metálicos do PAR 67
3.4.7.2 – Estudos cinético-espectrofotométricos da descomplexação de catiões metálicos dos AF 67
3.5 – BIBLIOGRAFIA 68

4 – CARACTERIZAÇÃO GERAL DAS AMOSTRAS DE AF

4.1 – INTRODUÇÃO 69
4.2 – SECÇÃO EXPERIMENTAL 69
4.2.1 – Reagentes e soluções 69
4.2.1.1 – Medições de UV-Vis 69
4.2.1.2 – Medições de fluorescência 69
4.2.1.3 – Determinação potenciométrica do número total de sítios ligantes 69
4.2.1.4 – Estudo do comportamento condutimétrico de surfactantes e de soluções de AF 70
4.2.1.5 – Experiências de cromatografia de exclusão por tamanhos 70
4.2.2 – Procedimentos experimentais 71
4.3 – RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO 71
4.3.1 – Análises elementares 71
4.3.2 – Propriedades espectroscópicas 73
4.3.2.1 – Espectros de RMN de ^{13}C 73
4.3.2.2 – Espectroscopia de UV-Vis 75
4.3.2.3 – Espectroscopia de IV 77
4.3.2.4 – Espectroscopia de fluorescência molecular síncrona 80
4.3.3 – Propriedades ácido-base 84
4.3.3.1 – Curvas de titulações potenciométricas e grupos ácido-base 84

4.3.4 – Estudos condutimétricos 86
4.3.4.1 – Soluções de surfactantes 86
4.3.4.2 – Soluções de AF 86
4.3.4.3 – Titulações condutimétricas das amostras de AF 89
4.3.5 – Titulações potenciométricas a pH constante na presença de Cu(II) 96
4.3.6 – Propriedades de complexação 100
4.3.7 – Caracterização da distribuição de massas moleculares por HP-SEC 100
4.3.7.1 – Amostras de AF 100
4.3.7.2 – Compostos modelo simples dos AF, aminoácidos e amostras de pré-fúlvicos 107
4.3.7.3 – Análise dos cromatogramas com o auxílio de técnicas quimiométricas de reconhecimento de formas 113
4.3.7.4 – Possibilidade de calibração da coluna de HP-SEC 119
4.4 – CONCLUSÕES 119
4.5 – BIBLIOGRAFIA 125

5 – ESTUDO DAS INTERACÇÕES ENTRE CATIÕES METÁLICOS E AF

5.1 – INTRODUÇÃO 127
5.2 – SECÇÃO EXPERIMENTAL 129
5.2.1 – Reagentes e soluções 129
5.2.1.1 – Estudos potenciométricos das interacções de catiões metálicos com amostras de AF 129
5.2.1.2 – Estudos por fluorescência síncrona do efeito do pH e da concentração dos AF nos parâmetros de equilíbrio de complexação 129
5.2.1.3 – Decomposição por PARAFAC de matrizes de três vias de dados cinético-espectrofotométricos correspondentes a misturas de catiões metálicos pesados 129
5.2.1.4 – Estudos cinéticos da interacção entre AF e os catiões Ni(II) e Cu(II) 130
5.2.2 – Procedimentos experimentais 130
5.3 – RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO 131

5.3.1 – Estudos potenciométricos da interacção de catiões metálicos com amostras de AF 131
5.3.1.1 – Amostras de AF com origem natural 131
5.3.1.2 – Amostras de AF com origem antropogénica 138
5.3.1.3 – Amostras de AF extraídas de misturas de solo natural e compostos 142
5.3.1.4 – Comparação global dos parâmetros de equilíbrio de complexação 147
5.3.2 – Estudo do efeito do pH e da concentração dos AF nos parâmetros de equilíbrio de complexação 151
5.3.2.1 – Estudo dos conjuntos de espectros 151
5.3.2.1.1 – Análise preliminar dos espectros 151
5.3.2.1.2 – Determinação do número de componentes por SIMPLISMA 155
5.3.2.1.3 – Espectros dos componentes 158
5.3.2.1.4 – Perfis de intensidade de fluorescência 158
5.3.2.2 – Determinação de parâmetros de equilíbrio 167
5.3.2.2.1 – Representações de Stern-Volmer da extinção da fluorescência 167
5.3.2.2.2 – Análise da extinção de fluorescência pelo método de Ryan e Weber 172
5.3.3 – Comparação dos resultados obtidos por potenciometria e fluorescência 174
5.3.4 – Decomposição por PARAFAC de matrizes de três vias de dados cinético-espectrofotométricos correspondentes a misturas de catiões metálicos pesados 176
5.3.4.1 – Análise preliminar dos espectros 176
5.3.4.2 – Matrizes de três vias correspondentes a um único ião 179
5.3.4.3 – Misturas de catiões 182
5.3.4.4 – Limitações do processo de decomposição 185
5.3.4.5 – Perspectivas para os estudos de soluções de AF 186
5.3.5 – Estudos cinéticos da interacção entre AF e os catiões Ni(II) e Cu(II) 186
5.3.5.1 – Análise preliminar dos conjuntos de espectros 187

5.3.5.2 – Suavização dos perfis de absorvância e estudo com transformadas de Laplace 191
5.4 – CONCLUSÕES 196
5.5 – BIBLIOGRAFIA 197

6 – ESTUDO DAS INTERACÇÕES DA ATRAZINA COM AF

6.1 – INTRODUÇÃO 199
6.2 – SECÇÃO EXPERIMENTAL 200
6.2.1 – Reagentes e soluções 200
6.2.1.1 – Determinação simultânea da AT, DeAT, DpAT e HidAT com base em medições de UV e técnicas de calibração multivariada 200
6.2.1.2 – Experiências de cromatografia de exclusão por tamanhos 200
6.2.1.3 – Experiências de extracção sólido-líquido e líquido-líquido 201
6.2.2 – Procedimentos experimentais 201
6.2.2.1 – Determinação simultânea da AT, DeAT, DpAT e HidAT com base em medições de UV e técnicas de calibração multivariada 201
6.2.2.2 – Estudo da influência da força iónica na solubilidade da AT, DeAT e DpAT 203
6.2.2.3 – Estudo das interacções da AT, DeAT e DpAT com AF 203
6.3 – RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO 204
6.3.1 – Determinação simultânea da AT e de três dos seus metabolitos com base em medições de UV e técnicas de calibração multivariada 204
6.3.2 – Estudo da solubilidade em água da AT 210
6.3.3 – Estudo da solubilidade em água dos metabolitos da AT 212
6.3.4 – Estudo da influência da força iónica na solubilidade em solução aquosa da AT 212
6.3.5 – Valores de K_{doc} e de solubilidade da AT na presença de AF 216
6.3.5.1 – Análise dos valores da solubilidade 216
6.3.5.2 – Determinação dos valores de K_{doc} 219
6.3.6 – Separação da AT, DeAT e DpAT de soluções aquosas de AF por HP-SEC 223

6.4 – CONCLUSÕES 229
6.5 – BIBLIOGRAFIA 229

7 – CONCLUSÕES GLOBAIS 231

APÊNDICE 1 – UTILIZAÇÃO DE SIMULAÇÕES NA AVALIAÇÃO DOS MODELOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DOS DADOS POTENCIOMÉTRICOS

A1.1 – CARACTERÍSTICAS DAS SIMULAÇÕES 233
A1.2 – RESULTADOS DAS SIMULAÇÕES 235
A1.3 – AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE CÁLCULO 235
A1.4 – CONCLUSÕES 243

APÊNDICE 2 – MÉTODO DAS TRANSFORMADAS DE LAPLACE

A2.1 – CÁLCULO DE C(t) 243
A2.2 – MÉTODO DAS TRANSFORMADAS DA LAPLACE 245
A2.2.1 – Cálculo das derivadas 245
A2.2.2 – Pré-processamento dos dados 246
A2.2.3 – Ajuste polinomial 247
A2.3 – BIBLIOGRAFIA 252

APÊNDICE 3 – PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS EFECTUADAS NO ÂMBITO DO TRABALHO DE DOUTORAMENTO

A3.1 – ARTIGOS 253
A3.2 – RESUMOS DE COMUNICAÇÕES 253

APÊNDICE 4 – ÍNDICE DE TABELAS E DE FIGURAS

A4.1 – ÍNDICE DE TABELAS 257
A4.2 – ÍNDICE DE FIGURAS 259

ABREVIATURAS

AF	ácidos fúlvicos
AFS	ácidos fúlvicos extraídos de um solo de pinhal
AFLau	ácidos fúlvicos extraídos de um solo laurentian
AFLC	ácidos fúlvicos extraídos de lamas compostadas
AFMSLC	ácidos fúlvicos extraídos de uma mistura de solo de pinhal com lamas compostadas
AFMSRAC	ácidos fúlvicos extraídos de uma mistura de solo de pinhal com resíduos animais compostados
AFRAC	ácidos fúlvicos extraídos de resíduos animais compostados
AH	ácidos húmicos
ANOVA	análise de variância
AT	atrazina
C	contraião
$C_i(0)$	concentração inicial do complexo $[L_i - M]$
C(t)	concentração do complexo [L – M] no instante de tempo t
C_0	massa de atrazina repartida numa unidade de massa de matéria orgânica
CMC	concentração micelar crítica
DOC	carbono orgânico dissolvido
DME	desvio médio das estimativas
DP	desvio padrão
E	potencial do eléctrodo
E_0	potencial padrão do eléctrodo
EPA	"Environmental Protection Agency"
F	intensidade de fluorescência experimental
F	parâmetro utilizado na análise de variância (ANOVA)
F_0	intensidade de fluorescência do ligando livre
F_{ML}	intensidade de fluorescência do complexo [ML]
f	fracção de fluoróforos acessível ao catião
fr	parâmetro relacionado com a fracção de contraiões livres (= 1-θ, em que θ representa a fracção de cargas de sinal contrário ligadas ao poliião).
HP-SEC	cromatografia de alta pressão por exclusão de tamanhos

I	força iónica
IHSS	"International Humic Substances Society"
IV	Infravermelho
K	constante de equilíbrio de complexação
K_{doc}	constante de partição determinada com base no conteúdo de carbono orgânico
K_{SH}	coeficiente de partição entre soluções aquosas de SH e a água pura
k_i	constante de velocidade específica de descomplexação dos catiões metálicos do sítio ligante i
L	ligando
L_i	sítio ligante i
M	catião metálico
m	espectro médio
MQP	Mínimos Quadrados Parciais
MM	massa molecular
ML	complexo [ligando-catião metálico]
p	espectro pureza
PAR	4-(2-piridilazo)resorcinato de sódio
PARAFAC	"Parallel factor analysis"
Pol	poliião
ppm	partes por milhão
PRESS	"Prediction Residual Error Sum of Squares"
RCP	Regressão dos Componentes Principais
R_r	razão da intensidade relativa total dos espectros desvio padrão de j e j+1
R_s	intensidade relativa total do espectro do desvio padrão
s	espectro desvio padrão
SEC	cromatografia de exclusão por tamanhos
SH	substâncias húmicas
SIMPLISMA	"SIMPLe-to-use Interactive Self-modelling Mixture Analysis"
SQR	soma dos quadrados do resíduo
S_W^*	solubilidade aparente numa solução contendo ligandos orgânicos
S_W	solubilidade em água pura
UV-Vis	ultravioleta-visível
[A]	concentração da espécie A (mol/L)

$\{L\}$	concentração total de L expressa em g/L
α	fracção de ligando complexado
γ	coeficiente de actividade
λ_C	condutividade do contraião (S cm^2 mol^{-1})
λ_C^0	condutividade molar do contraião em água (S cm^2 mol^{-1})
λ_{Pol}	condutividade do poliião (S cm^2 mol^{-1})
Λ	condutividade molar
κ	condutividade da solução (S cm^{-1})
ν	função de formação que representa o número médio de catiões metálicos associados a cada molécula de L (varia entre zero e um)
π	pressão osmótica
τ	turbidância

1 – INTRODUÇÃO GERAL

1.1 – GÉNESE DO TRABALHO

1.1.1 – Substâncias húmicas

A matéria orgânica presente nos solos e águas e que não se encontra incorporada nos tecidos vivos dos microorganismos é constituída por misturas complexas de compostos que podem ser agrupados em classes de acordo com a sua composição química e reactividade [1-3]. Assim, uma das classes inclui biomoléculas de composição química e funções biológicas conhecidas (como por exemplo aminoácidos, proteínas, açucares, gorduras e ácidos orgânicos de baixa massa molecular) que foram produzidas pela actividade de microorganismos sobre restos de plantas e animais. Estes compostos são facilmente assimilados pelos organismos, pelo que persistem nos solos durante períodos de tempo curtos. Uma outra classe, a dos chamados "resíduos orgânicos", compreende produtos intermédios e/ou parcialmente degradados com alguma estabilidade química e biológica (como sejam tecidos de plantas e animais e produtos da sua decomposição parcial) que foram gerados em processos de decomposição incompleta de restos de materiais orgânicos. Uma terceira classe, a das "substâncias húmicas" (SH), é formada por um conjunto de compostos orgânicos de cor amarela, castanha ou preta, com uma massa molecular relativamente elevada, propriedades físicas e químicas relativamente estáveis e elevados tempos de vida média nos sistemas ambientais.

As SH presentes nos solos e águas são constituídas por misturas heterogéneas de macromoléculas orgânicas com estruturas alifáticas e aromáticas, cuja composição final depende directamente dos materiais de origem e tempo de maturação, e indirectamente de factores externos como o clima (que afecta a existência de diferentes espécies de plantas, a quantidade de material vegetal produzido por estas e a intensidade da actividade dos microorganismos que intervêm na sua decomposição), a morfologia do solo e a incorporação de novos materiais residuais [2-4]. Estas substâncias, que derivam de um grande número de compostos provenientes da transformação química e microbiológica da matéria orgânica fresca existente nos solos, são produzidas no decorrer de um conjunto de processos químicos complexos a que se atribui a designação

genérica de processo de humificação [4]. No decurso deste processo onde se decompõe biomassa até à obtenção de materiais estabilizados, o carbono orgânico é oxidado por organismos heterotróficos que introduzem no seu próprio metabolismo a energia retirada dos processos de oxidação, realizando a decomposição da matéria orgânica até os conteúdos de oxigénio e água, temperatura e níveis de nutrientes básicos não se mostrarem adequados à sua actividade biológica [3].

As SH podem ser subdivididas em três grupos de acordo com a sua solubilidade em água. Assim, enquanto os ácidos fúlvicos (AF) são solúveis em solução aquosa a qualquer valor de pH e os ácidos húmicos (AH) apenas em meio alcalino, a humina é insolúvel em meio ácido ou básico [1,3-5].

Na Tabela 1.1 apresentam-se características elementares típicas [1] das fracções AF e AH. Da análise desta tabela verifica-se que o carbono e o oxigénio são os seus constituintes principais. Assim, enquanto o carbono varia entre 41 e 59 %, o oxigénio oscila entre 33 e 50 % e as percentagens dos outros elementos apresentam-se na gama dos 3 a 7 % para o hidrogénio, 1 a 4 % para o azoto e 0,1 a 4 % para o enxofre. Quando se confrontam as composições elementares dos AF e dos AH, verifica-se que os AF possuem quantidades inferiores de carbono e quantidades mais elevadas de oxigénio.

Na Tabela 1.1 apresentam-se também valores típicos para os grupos funcionais mais característicos das SH [1]. Verifica-se que os AF possuem uma acidez total superior e quantidades mais elevadas de grupos carboxílicos, fenólicos e carbonilo. Dado que as SH se encontram sempre presentes nos solos em quantidades apreciáveis, a elevada quantidade deste grupos induz uma participação intensa destas substâncias em alguns fenómenos químicos e físicos, como a permuta catiónica, mineralização do solo, capacidade tampão de pH e combinação com micronutrientes e/ou micropoluentes (metais pesados, moléculas orgânicas como os pesticidas, etc.) [2,6]. De uma forma mais genérica, as SH influenciam processos como a biodisponibilidade / fitotoxicidade, mobilização/transporte e imobilização/acumulação de poluentes ou elementos essenciais [2,5]. Por exemplo, as SH fornecem quase todo o azoto, 50 a 60 % do fosfato, cerca de 80 % do enxofre e grande parte do boro e molibdénio adsorvidos pelas plantas em regiões temperadas com solos não fertilizados [3]. A disponibilidade de muitos micronutrientes catiónicos é também grandemente afectada pela presença de SH, uma vez que a formação de complexos estáveis com os catiões diminui a probabilidade de ocorrerem reacções de hidrólise e de precipitação, o que lhes reduziria a solubilidade e disponibilidade [3].

Tabela 1.1 – Características elementares dos AF e AH e quantidades típicas de grupos funcionais [1].

	AF	AH
Gama de valores de análise elementar (%)		
C	40,7 – 50,6	53,8 –58,7
H	3,8 – 7,0	3,2 – 6,2
O	39,7 – 49,8	32,8 – 38,3
N	0,9 – 3,3	0,8 – 4,3
S	0,1 – 3,6	0,1 – 1,5
Quantidade de grupos funcionais (mmol/g) [a]		
Acidez total	8,6	7,2
Grupos carboxílicos	4,0	3,1
Fenóis	4,6	4,2
Grupos álcool	0,8	1,3
Grupos carbonilo	4,3	1,3

a – Valores típicos

1.1.2 – SH antropogénicas

Os restos de plantas e animais em decomposição que se adicionam naturalmente aos solos no decorrer dos ciclos de vida desses organismos podem considerar-se como sendo as fontes naturais de matéria orgânica dos solos. Na agricultura tradicional, acrescentavam-se aos solos estrumes e resíduos vegetais provenientes de culturas, com o objectivo de manter, ou mesmo de aumentar o conteúdo de matéria orgânica destes e aumentar a sua fertilidade global. No entanto, estes resíduos só são adicionados aos solos após um determinado período de tempo estabelecido empiricamente pelas práticas agrícolas.

A crescente limitação dos recursos naturais e a obrigatoriedade de implementar medidas que promovam a reciclagem de lixos, conduziram a uma utilização frequente

dos resíduos sólidos como adubos agrícolas ou correctivos orgânicos. No entanto, à semelhança do que se verifica nas práticas agrícolas tradicionais, estes materiais não são aplicados directamente aos solos sem serem submetidos a tratamentos prévios, de que resultam produtos com elevadas quantidades de matéria orgânica contendo SH [2]. Estes materiais orgânicos estabilizados são vulgarmente designados por "compostos".

O objectivo principal da utilização agrícola de resíduos orgânicos é contribuir para a restauração do conteúdo orgânico e a fertilidade de solos pobres, submetidos a culturas intensivas ou degradados por efeitos da erosão natural e, simultaneamente, promover a reciclagem de materiais orgânicos, o que do ponto de vista ambiental é considerado o procedimento mais correcto. A falta de aterros e os elevados custos de armazenamento de resíduos orgânicos, a existência de legislações mais rígidas quanto à poluição atmosférica e dos aquíferos, as crescentes exigências para a introdução de materiais reciclados na agricultura e os relativos baixos custos de produção destes compostos em comparação com os benefícios que advêm da sua utilização, também contribuem para o interesse crescente em novas formas de reciclagem destes materiais [2].

Antes da aplicação aos solos, estes resíduos são submetidos a tratamentos prévios com o objectivo de os separar dos materiais inertes, e minimizar, ou mesmo eliminar as suas propriedades mais nefastas, aumentando simultaneamente a sua eficiência, ou seja, a sua capacidade de fertilização dos solos. De outro modo, dada a rápida decomposição desses materiais não estabilizados, a sua adição directa provocaria uma diminuição acentuada do conteúdo de oxigénio e do potencial oxido-redutor dos solos, de que resultaria um aumento de mobilidade de formas reduzidas de alguns metais vestigiais poluentes [2]. Por outro lado, a presença nos solos de materiais orgânicos pouco maturados contendo razões elevadas carbono/azoto, poderia acarretar a imobilização do azoto e provocar a deficiência deste, enquanto baixas razões carbono/azoto poderiam conduzir à produção de amoníaco, que é tóxico para as plantas [2]. Aos efeitos enunciados da introdução nos solos de materiais orgânicos não maturados, acrescentam-se ainda outros como a diminuição da capacidade de penetração da água no solo, o aumento da condutividade eléctrica causado pelo incremento do conteúdo salino, a inibição da germinação de sementes, a diminuição do comprimento das raízes e a modificação da microflora do solo. Adicionalmente, se estes materiais contiverem ácidos orgânicos, a sua presença nos solos pode também causar fitotoxicidade [2].

1.1.3 – Compostagem

Os tratamentos mais vulgarmente aplicados aos resíduos orgânicos são as digestões aeróbia ou anaeróbia [2]. Os processos anaeróbios apresentam a possibilidade de recuperação de alguma energia, na forma de gás metano. Em contraste, os processos aeróbios são consumidores de energia, devido ao facto de lhes ser necessário fornecer oxigénio para facilitar a conversão dos resíduos orgânicos (ver Tabela 1.2) [7]. No contexto da reciclagem de resíduos orgânicos, designa-se por compostagem uma digestão aeróbia de uma mistura contendo o resíduo orgânico, um material para dar corpo à mistura ("bulking agent") e um agente inicializador do processo ("seeding agent"). Os materiais usados para dar corpo à mistura são, por exemplo, o serrim e a palha, que têm como função fornecer alguma consistência à mistura e impedir que esta forme um "tijolo" compacto. Os agentes inicializadores são tipicamente porções de composto na fase final de maturação, que introduzem na mistura os microorganismos necessários para que ocorra o processo bioquímico.

Resumidamente, pode considerar-se a compostagem como consistindo numa versão acelerada dos processos envolvidos na decomposição natural da matéria orgânica do solo, sendo conseguida através do fornecimento das condições mais favoráveis para a actividade dos microorganismos. Os objectivos dos processos de compostagem de resíduos orgânicos centram-se na transformação de materiais orgânicos biodegradáveis em produtos mais estáveis do tipo SH, na destruição de organismos patogénicos presentes nos resíduos, na fixação de nutrientes (azoto, fósforo e potássio) e na produção de um produto final estabilizado biológica e quimicamente que possa ser utilizado como aditivo orgânico na agricultura [2].

De uma forma geral, as características físicas e químicas do composto produzido variam com a natureza dos materiais de origem, as condições em que ocorreu a compostagem e a extensão da decomposição. A estrutura física do substrato, a composição química e a razão C/N, os tratamentos prévios (separação de resíduos por classes e o acrescentamento de aditivos), a temperatura, o pH, a composição da mistura e o tempo de duração desta, afectam a velocidade e eficiência dos processos de compostagem e as propriedades finais do composto [2].

Um aditivo orgânico só deve ser aplicado aos solos depois de assegurada uma elevada estabilidade e grau de maturação do composto. Actualmente, não existem

Tabela 1.2 – Comparação do desempenho dos processos aeróbios e anaeróbios no tratamento de resíduos orgânicos [7].

Característica	**Processos aeróbios**	**Processos anaeróbios**
Objectivo do processo	Redução do volume dos lixos e produção de composto	Redução do volume dos lixos, produção de energia e estabilização dos lixos
Utilização energética	Consomem energia	Produzem energia
Produtos originados	Húmus, CO_2, H_2O	Lamas, CO_2, CH_4
Redução de volume	Até 50 %	Até 50 %
Tempo de processamento	20 a 30 dias	20 a 40 dias

normas estabelecidas para a avaliação da qualidade dos aditivos orgânicos. Contudo, foram propostos diversos parâmetros para a avaliação do grau de maturação dos materiais orgânicos, que incluem a determinação de características físicas (o cheiro, a cor, a presença de materiais estranhos ou inertes e a temperatura), características químicas (a razão C/N, a capacidade de troca catiónica, os conteúdos de NO_3^- e NO_2^-, a razão NO_3^-/ NH_4^+, o pH e a presença de substâncias biodegradáveis), testes enzimáticos e microbiológicos (a actividade da fosfatase alcalina, o uso de microorganismos como indicadores e medições de biomassa) e análises químicas e físico-químicas das fracções tipo SH (incluindo análises elementares e de grupos funcionais, determinação do conteúdo de metais vestigiais, determinação da distribuição de massas moleculares por métodos cromatográficos e caracterização espectroscópica) [2].

Alguns dos métodos referidos são empíricos e carecem de suporte teórico. As dificuldades sentidas na caracterização dos aditivos orgânicos ainda são aumentadas pela extrema diversidade na origem e nos tratamentos aplicados aos substratos orgânicos, o que acarreta algumas dificuldades na aplicação geral destes métodos de

caracterização. Desta forma, dadas as limitações individuais de cada método e as diferentes características exibidas por cada composto, a avaliação do grau de maturidade dos aditivos orgânicos deve efectuar-se a partir de uma utilização combinada de vários métodos, em vez de um único [2]

1.1.4 – Interacções das SH com catiões metálicos

Uma das características mais importantes e conhecidas das SH é a sua elevada capacidade de formação de complexos estáveis com catiões metálicos, o que se deve à quantidade relativamente elevada de grupos carboxílicos e hidroxílicos que entram na sua composição química e que têm propriedades de coordenação com metais [8-10]. Estes complexos, para além de alterarem as características de solubilidade desses catiões metálicos, desempenham também um papel importante na especiação de metais no ambiente. A associação de um catião metálico com SH pode mascarar as propriedades químicas do catião e alterar as suas interacções com os organismos vivos. Essas interacções também influenciam o nível de toxicidade do catião, uma vez que este se encontra dependente da dose assimilada por cada organismo [10]. A formação de complexos orgânicos solúveis com catiões metálicos pode conduzir à disseminação e contaminação de águas subterrâneas, e à retenção de catiões metálicos em solução. Por outro lado, podem também formar-se complexos insolúveis, dos quais resultam reduções na biodisponibilidade e na ecotoxicidade desses metais [8-10].

Embora exista um elevado número de estudos publicados sobre AF naturais [11-17], só muito recentemente tem sido tentada a caracterização de AF provenientes de resíduos sólidos compostados [18-20], tendo sido detectadas algumas modificações na mobilidade de catiões metálicos existentes em solos submetidos a tratamentos com estes materiais. No entanto, no caso dos AF antropogénicos, são mal conhecidos os efeitos da aplicação destas substâncias aos solos, nomeadamente as eventuais alterações na capacidade de retenção de metais e a sua influência em fenómenos de retenção, transporte e biodisponibilidade, quer dos metais essenciais aos seres vivos, quer dos tóxicos.

A quantificação da complexação de catiões metálicos por SH tem sido objecto de estudos nos quais se usam diferentes técnicas experimentais, diferentes meios e diferentes modelos na análise dos dados. Muitos dos estudos efectuados sobre a complexação de metais por SH visam apenas aspectos termodinâmicos, ou seja,

constantes de estabilidade [AF – Catião metálico]. Quando os equilíbrios químicos envolvidos se estabelecem rapidamente em relação à escala de tempo em que decorre a complexação, este tipo de estudos permite efectuar uma caracterização satisfatória dos sistemas naturais. No entanto, como os processos vivos são dinâmicos e não estáticos, decorrendo quase sempre afastados do equilíbrio, os aspectos cinéticos das reacções químicas em análise não podem ser desprezados [21-23]. Todavia, quase todos os dados referidos na literatura sobre sistemas naturais se referem apenas a equilíbrios de especiação, desprezando muitas vezes os aspectos cinéticos das reacções uma vez que os métodos necessários para o seu estudo necessitam de uma resolução e sensibilidade superiores aos estudos de equilíbrio, sendo por isso mais difíceis de desenvolver.

1.1.6 – Interacções das SH com herbicidas

Durante largas dezenas de anos os solos e as águas foram contaminados por compostos orgânicos sintéticos provenientes de explorações agrícolas. Esses compostos uma vez lançados no ambiente interactuam com as substâncias orgânicas e inorgânicas existentes no solo e nas águas superficiais ou subterrâneas, originando uma série de problemas ambientais ainda não completamente caracterizados e para os quais não existe um nível de informação satisfatório que permita, por um lado efectuar uma prevenção mais efectiva a este tipo de poluição, e por outro combater eficazmente os seus efeitos [5].

Os herbicidas são utilizados quase indiscriminadamente em quantidades excessivas com o intuito de combater pragas e de aumentar as produções, sendo dos poluentes orgânicos com efeitos mais nefastos no ambiente. A atrazina (AT), por exemplo, é um herbicida que foi utilizado na Europa e nos Estados Unidos no controlo de colheitas, principalmente as de milho, e devido à sua aplicação maciça e contínua desde 1959 encontram-se resíduos deste herbicida em solos, águas superficiais e mesmo em águas subterrâneas [24-32]. Por exemplo, em algumas regiões da Alemanha nas quais se efectuava a produção de milho foram detectadas em águas subterrâneas concentrações médias de AT na ordem dos 0,6 μgL^{-1} [33]. Sabendo que a União Europeia estabeleceu como concentrações máximas permitidas 0,1 e 0,5 μgL^{-1}, respectivamente, para um pesticida e para a soma das concentrações de todos os pesticidas existentes nas águas para consumo humano [33,34], pode concluir-se da exorbitância do valor detectado nessas águas subterrâneas. A importância da ocorrência

destas elevadas concentrações é ampliada pelo facto de a AT ser considerada pela EPA como um possível carcinogénio, uma vez que aumenta a incidência de tumores mamários em fêmeas de ratos [29].

Uma vez no solo, a AT degrada-se naturalmente num período de semanas ou meses (Fig. 1.1) através de reacções de hidrólise ou devido à interacção com microorganismos [25,28,30,31,35-37], originando compostos como a 2-hidroxilatrazina (HidAT), a desetilatrazina (DeAT) e a desisopropilatrazina (DpAT). Embora a toxicologia destes metabolitos ainda não esteja bem estudada, espera-se que estes sejam pelo menos tão tóxicos como a AT, pelo que também devem ser considerados em estudos de impacto ambiental. No entanto, a degradação da AT não é muito rápida, pois o anel de triazina característico da AT mostra-se bastante resistente à degradação. Num estudo efectuado sobre a degradação da AT em solos, verificou-se que 80 % da AT adicionada se encontrava intacta ao fim de 70 dias, e apenas 1 % se degradava na totalidade, originando como produto final CO_2. Verificou-se também que esta se hidroliza mais rapidamente em condições ácidas ou básicas que em meio neutro. Assim, alguns estudos laboratoriais demonstraram que o seu tempo de meia vida é de perto de 40 dias em meio ácido, e cerca 20 vezes superior em condições neutras.

Existem alguns estudos efectuados sobre a interacção da AT com SH [28,35-43]. Segundo um destes estudos [35], apesar do número de sítios ligantes da AT representar apenas 1 % ou ainda menos da quantidade total de grupos carboxílicos presentes nas SH, a ocorrência de associações entre a AT e SH encontra-se dependente da quantidade de grupos carboxílicos existentes nas SH. Uma estimativa da capacidade máxima de complexação das SH detectou maiores quantidades de AT complexada a pHs fortemente ácidos, decrescendo até pH neutro. Concluiu-se assim que a complexação da AT será bastante mais intensa em solos ácidos que em solos neutros ou básicos.

Quanto ao efeito da concentração de SH na quantidade de AT complexada, foi detectada uma relação directa entre o aumento da concentração de AH e quantidade de AT complexada, até cerca de 0,8 g L^{-1}. Pelo contrário, no caso dos AF verificou-se uma redução da quantidade de AT complexada com o aumento da concentração de AF, o que se deveu à formação de agregados que terão bloqueado os sítios ligantes. Neste estudo também se avaliou o efeito da presença de catiões metálicos [nomeadamente o Cu(II)] na capacidade de complexação da AT, tendo-se apurado que a quantidade de AT complexada diminui na presença de Cu(II), em consequência da competição do catião metálico pelos sítios ligantes do tipo carboxilato existentes nas SH [35].

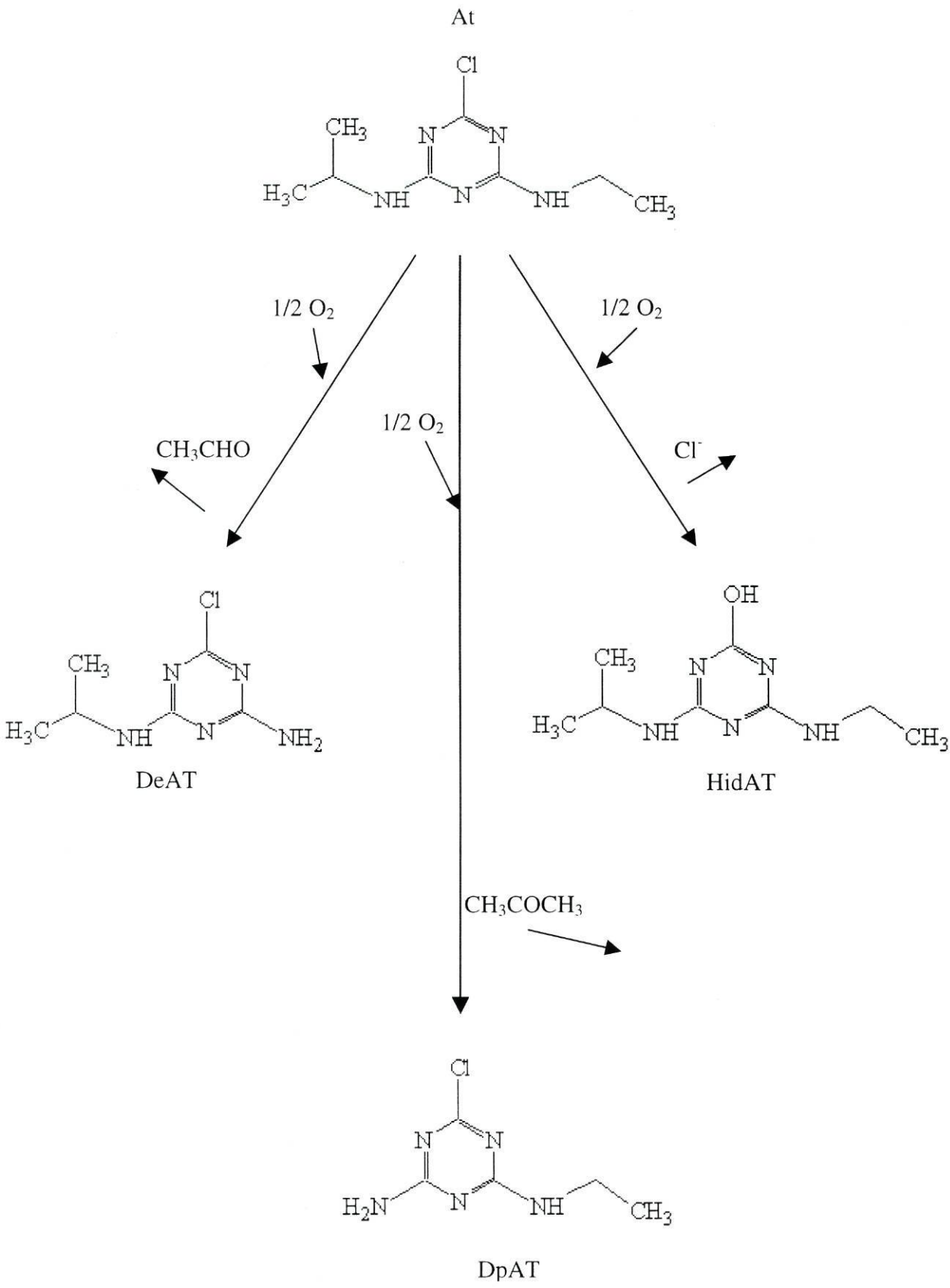


Figura 1.1 – Estrutura da AT e reacções de formação de três dos seus metabolitos.

Outros estudos confirmam que a associação da AT com SH, a pH neutro, é relativamente fraca em termos absolutos [37,42,43], decorrendo eventualmente segundo um mecanismo de pontes de hidrogénio [42]. No entanto, face à quantidade relativamente elevada de SH presentes nos solos, poder-se-á esperar destas substâncias um papel importante nas interacções com a AT.

1.2 – OBJECTIVOS DO TRABALHO

O objectivo principal desta Tese de Doutoramento foi o de obter e reunir informação sobre as propriedades físico-químicas de duas amostras de AF extraídos de dois materiais reciclados, nomeadamente o composto de lamas proveniente de uma estação de tratamento de águas residuais urbanas, comercializado com o nome de AGRONAT, e o composto de estrumes animais e de resíduos vegetais, comercializado com o nome de SANSÃO. Estes conhecimentos foram comparados sistematicamente com outros já existentes sobre amostras de AF com origem natural, com o propósito de identificar algumas das diferenças que possam existir entre eles.

Os esforços da actividade experimental concentraram-se na produção de informação sobre duas propriedades importantes na produção agrícola dos solos, nomeadamente a complexação de catiões metálicos pelos AF, cujas características se relacionam com a disponibilidade de nutrientes pelas plantas, e a interacção de AF com pesticidas, cujas propriedades se relacionam com o destino ambiental e os mecanismos de actuação desta família de substâncias.

Deste modo, os objectivos concretos deste trabalho foram três:

(i) Caracterização geral das amostras de AF no que respeita às seguintes propriedades: análises elementares; caracterização espectroscópica (RMN de ^{13}C, UV-Vis, IV e fluorescência molecular síncrona); propriedades ácido-base; comportamento em solução; e distribuição de massas moleculares.

(ii) Determinação de propriedades de complexação das amostras de AF com os catiões Cu(II), Pb(II) e Cd(II), mais propriamente constantes de estabilidade condicional e capacidades de complexação. No caso do Cu(II), pretendeu-se também estudar o efeito da variação do pH e da concentração de AF na estabilidade dos complexos [AF – Cu(II)].

(iii) Determinação da capacidade de associação das amostras de AF com um pesticida vulgar, nomeadamente a AT, e obter informação sobre a estabilidade cinética dessa associação.

Do ponto de vista experimental e de tratamento de dados, um outro objectivo desta Tese foi o de desenvolver e testar novos métodos de estudo de amostras de AF, mais propriamente: (i) o desenvolvimento de métodos para obtenção de informação química quantitativa sobre as interacções de catiões metálicos e AF naturais e antropogénicos, nomeadamente parâmetros termodinâmicos e cinéticos; (ii) a implementação de um sistema cromatográfico de alta pressão com exclusão por tamanhos para a caracterização da distribuição de massas moleculares dos AF e o estudo da interacção destes com pesticidas; (iii) o desenvolvimento de um método para a determinação da solubilidade de AT em soluções aquosas baseado em extracções sólido-líquido e líquido-líquido; e (iv) a implementação de metodologias quimiométricas de calibração multivariada e de decomposição trilinear.

1.3 - ORGANIZAÇÃO DO RELATÓRIO

Além deste capítulo introdutório, este relatório compreende um **segundo capítulo**, onde se apresentam os fundamentos teóricos dos métodos de cálculo utilizados, um **terceiro capítulo**, onde se descrevem as preparações químicas, equipamentos e procedimentos experimentais gerais utilizados, um **quarto capítulo**, onde se reúnem os resultados disponíveis sobre as amostras de AF utilizadas, um **quinto** e **sexto** capítulos, onde se descrevem respectivamente os resultados das interacções [AF – Catiões metálicos] e [AF – AT], e finalmente um **sétimo capítulo** de conclusões e discussão global dos resultados.

1.4 - BIBLIOGRAFIA

[1] G. G. Choudhry, Humic Substances: Structural, Photophysical, Photochemical and Free Radical Aspects and Interactions with Environmental Chemicals, Gordon and Breach Science Publishers, Nova York, 1984, Part I.

[2] N. Senesi, T. M. Miano e G. Brunetti, *Humic-like Substances in Organic Amendments and Effects on Native Soil Humic Substances*, A. Piccolo (Ed.), em Humic Substances in Terrestrial Ecosystems, Elsevier, Amsterdão, 1996, Cap. 14.

[3] F. J. Stevenson, Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions, Wiley, Nova York, 1982, Caps. 1 e 2.

[4] M. A. Rashid, Geochemistry of Marine Humic Compounds, Springer-Verlag, Nova York, 1985, Cap. 2.

[5] W. Kordel, M. Dassenakis, J. Lintelmann e S. Padberg, *Pure & Appl. Chem.*, 1997, **69**, 1571-1600.

[6] F. J. Stevenson, Geochemistry of Soil Humic Substances, G. R. Aiken, D. M. McKnigth, R. L. Wershaw e P. MacCarthy (Eds.), em Humic Substances in Soil, Sediment and Water, Wiley, Nova York, 1985, Cap. 2.

[7] G. Tchobanoglous, H. Theisen e S. Virgil, Integrated Solid Waste Management: Engineering Principles and Management Issues, McGraw-Hill, Inc., Nova York, 1993, Cap. 14.

[8] F. J. Stevenson, Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions, Wiley, Nova York, 1982, Cap. 14.

[9] M. A. Rashid, Geochemistry of Marine Humic Compounds, Springer-Verlag, Nova York, 1985, Cap. 4.

[10] E. M. Perdue, *Effects of Humic Substances on Metal Speciation*, I. H. Suffet e P. MacCarthy (Eds.), em Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants, American Chemical Society, 1989, Caps. 18 e 19.

[11] R. A. Saar e J. H. Weber, *Anal. Chem.*, 1980, **52**, 2095-2100.

[12] D. K. Ryan, C. P. Thompson e J. H. Weber, 1983, *Can. J. Chem.*, **61**, 1505-1509.

[13] D. K. Ryan e J. H. Weber, *Environ. Sci. Technol.*, 1982, **16**, 866-872.

[14] M. Ewald, C. Belin, P. Berger e J. H. Weber, *Environ. Sci. Technol.*, 1983, **17**, 501-504.

[15] S. E. Cabaniss e M. S. Shuman, *Anal. Chem.*, 1986, **58**, 398-401.

[16] P. Blaser e G. Sposito, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 1987, **51**, 612-619.

[17] T. M. Miano, G. Sposito e J. P. Martin, *Soil Sci. Soc. Am. J.*,1988, **52**, 1016-1019.

[18] S. Deiana, C. Cessa, B. Manunza, R. Rausa e R. Seeber, *Soil Sci.*, 1990, **150**, 419-425.

[19] P. L. Giusquiani, G. Gigliotte e D. Businelli, *J. Environ. Qual.*, 1992, **21**, 330-335.

[20] P. L. Giusquiani, G. Gigliotte, D. Businelli e A. Macchioni, *Spectroscopic Comparision Between Humic and Fulvic Acids from Urban Waste Compost and Soil*, N. Senesi e T. M. Miano (Eds.), em Humic Substances in Global Environment and Implications on Human Health, Elsevier, Amsterdão, 1994, pág. 1303-1310.

[21] C. H. Langford e D. W. Gutzman, *Anal. Chim. Acta*, 1992, **256**, 183-201.

[22] C. L. Chakrabarti, Y. Lu, J. Cheng, M. H. Back e W. Schroeder, *Anal. Chim. Acta*, 1993, **267**, 47-64.

[23] C. H. Langford e R. L. Cook, *Analyst*, 1995, **120**, 591-596.

[24] N. Aharonson, S. Z. Cohen, N. Drescher, T. J. Gish, S. Gorbach, P. C. Kearney, S. Otto, T. R. Roberts e J. W. Vonk, *Pure & Appl. Chem.*, 1987, **59**, 1419-1446.

[25] W. E. Pereira e C. E. Rostad, *Environ. Sci. Technol.*, 1990, **24**, 1400-1406.

[26] R. Frank, H. E. Braun, B. D. Ripley e B. S. Clegg, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1990, **44**, 401-409.

[27] E. M. Thurman, D. A. Goolsby, M. T. Meyer, M. S. Mills, M. L. Pomes e D. W. Kolpin, *Environ. Sci. Technol.*, 1992, **26**, 2440-2447.

[28] L. Martin-Neto, E. M. Vieira e G. Sposito, *Environ. Sci. Technol.*, 1994, **28**, 1867-1873.

[29] M. O. Ribaudo e A. Bouzaher, *Atrazine: Environmental Characteristics and Economics of Management*, Resouces and Technology Division, Economic Research Service, U. S. Department of Agriculture, Agriculture Report no. 699, 1994.

[30] K. R. Solomon et al, *Environ. Toxicol. Chem.*, 1996, **15**, 31-76.

[31] M. Berg, S. R. Müller e R. P. Schwarzenbach, *Anal. Chem.*, 1995, **67**, 1860-1865.

[32] C. F. Williams, S. D. Nelson e T. J. Gish, *Soil. Sci. Am. J.*, 1999, **63**, 425-432.

[33] A. Dankwardt, S. Pullen, S. Rauchalles, K. Kramer, F. Just, B. Hock, R. Hofmann, R. Schewes e F. Maidl, *Anal. Letters*, 1995, **28**, 621-634.

[34] E. Pelizzetti, V. Maurino, C. Minero, V. Carlin, E. Pramauro, O. Zerbinati e M. Tosato, *Environ. Sci. Technol.*, 1990, **24**, 1559-1565.

[35] Z. Wang, D. S. Gamble e C. H. Langford, *Environ. Sci. Technol.*, 1992, **26**, 560-565.

[36] H. Sabik, S. Cooper, P. Lafrance e J. Fournier, *Talanta*, 1995, **5**, 717-724.

[37] Z. Wang, D. S. Gamble e C. H. Langford, *Anal. Chim. Acta*, 1990, **232**, 181-188.

[38] D. Gamble e S. Khan, *Can. J. Chem.*, 1988, **66**, 2605-2617.

[39] Z. Wang, D. S. Gamble e C. H. Langford, *Anal. Chim. Acta*, 1991, **244**, 135-143.

[40] N. Hesketh, M. Jones e E. Tipping, *Anal. Chim. Acta*, 1996, **327**, 191-201.

[41] Y. Chien, E. Kim e W. F. Bleam, *Environ. Sci. Technol.*, 1997, **31**, 3204-3208.

[42] E. C. Devitt e M. R. Wiesner, *Environ. Sci. Technol.*, 1998, **32**, 232-237.

[43] N. A. Kulikova, I. V. Perminova e G. F. Lebedeva, Proceedings of the 10th International Meeting of the International Humic Substances Society, Vol. 1, Toulouse, France, 2000, pág. 357-360.

2 – TEORIA

Neste capítulo descrevem-se resumidamente alguns princípios teóricos das técnicas experimentais e de análise de dados utilizadas neste trabalho. Estas últimas foram agrupadas de acordo com a técnica experimental utilizada.

2.1 – ESTUDOS CONDUTIMÉTRICOS

2.1.1 – Soluções de surfactantes

Algumas substâncias orgânicas possuem uma estrutura e propriedades químicas que se podem ser alteradas com a modificação das características do meio. No caso das substâncias orgânicas surfactantes, como estas apresentam uma extremidade polar e outra apolar, a sua solubilidade em solução aquosa resulta de um equilíbrio entre a tendência hidrofílica dos grupos polares e a tendência hidrofóbica dos grupos apolares [1,2]. Desta forma, se uma molécula contendo uma parte hidrofílica possuir ao mesmo tempo uma região hidrofóbica extensa como por exemplo uma longa cadeia de carbonos, a sua solubilidade em solução será mais reduzida em consequência da presença desta cadeia. No entanto, a solubilidade destas moléculas em solução pode ser alterada em consequência da associação entre moléculas. Assim, a associação entre grupos polares de várias moléculas origina a formação de pequenas subunidades que têm o nome de micelas (Fig. 2.1), enquanto as moléculas que as formam se denominam de surfactantes. Uma estrutura deste tipo tem a vantagem de minimizar o contacto

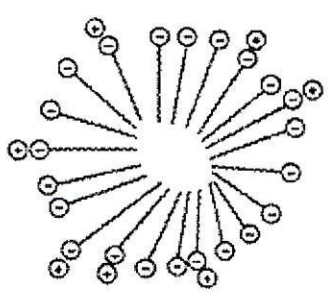


Figura 2.1 – Representação esquemática de uma micela.

entre os grupos hidrofóbicos dos surfactantes e a água, e ao mesmo tempo permite o contacto dos grupos hidrofílicos com esta [2]. Como se discutirá mais à frente, as moléculas de AF poderão apresentar algumas semelhanças com as moléculas de surfactantes no que respeita ao seu comportamento em solução aquosa.

Se se representar uma molécula de surfactante por S, o processo de formação de micelas pode ser descrito pela equação química seguinte:

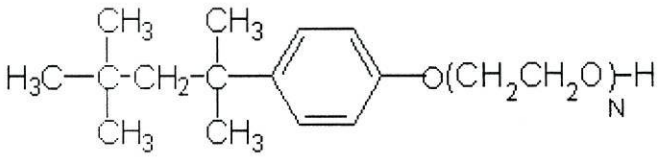
$$nS \Leftrightarrow S_n \tag{2.1}$$

na qual S_n representa uma micela constituída por moléculas de surfactante S, com um grau de agregação n.

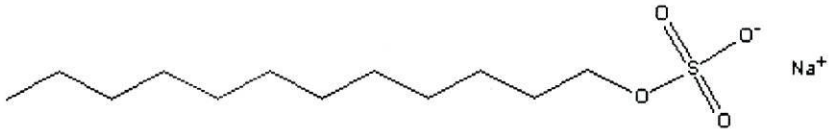
O grupo polar constituinte da molécula de surfactante pode ter características iónicas ou não-iónicas. Os grupos não iónicos mais frequentes apresentam estruturas do tipo polietileno $[-(C_2H_4O)_x-]$, com valores de x que oscilam entre 3 e 20, ou ainda mais. De entre os surfactantes deste tipo podem destacar-se os da família do Triton (Fig. 2.2.a). Os grupos iónicos, por seu lado, podem ser subdivididos em aniónicos e catiónicos. Os aniónicos apresentam grupos como o sulfato $[-SO_4^-]$, sulfonato $[-SO_3^-]$ e carboxilato $[-CO_2^-]$ (por exemplo o dodecilsulfato de sódio (SDS), Fig. 2.2.b), enquanto os catiónicos são constituídos normalmente por amónios quaternários $[-NR_3^+$, em que R representa uma outra estrutura] (por exemplo o cloreto de cetilpiridina, CPC, Fig. 2.2.c, ou o brometo de cetilpiridina, CPB, Fig. 2.2.d). Um outro caso é o dos surfactantes anfotéricos ou zwitteriónicos, que apresentam simultaneamente grupos carregados positivamente e negativamente.

Uma das particularidades dos surfactantes é que a associação destes monómeros em micelas só ocorre a partir de uma concentração bem determinada de surfactante, que é denominada de "concentração micelar crítica", CMC [2]. Como se pode verificar pela análise da Fig. 2.3, a formação das micelas é acompanhada por alterações bem visíveis em algumas das propriedades físicas da solução, como a condutividade, κ, turbidância, τ, pressão osmótica, π, ou a condutividade molar, Λ [2]. Da análise desta figura pode verificar-se no que respeita à condutividade κ da solução que esta aumenta de uma forma acentuada com o acréscimo da concentração de surfactante até ser atingido o valor do CMC, altura a partir da qual um incremento da quantidade de surfactante adicionado provoca um aumento menos acentuado na condutividade da solução.

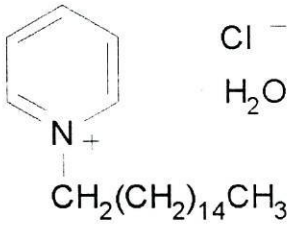
a)



b)



c)



d)

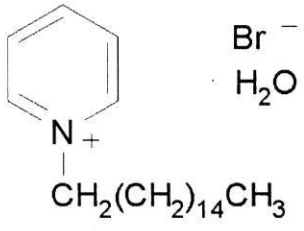


Figura 2.2 – Estruturas de alguns surfactantes: a) Triton; b) SDS; c) CPC; e d) CPB.

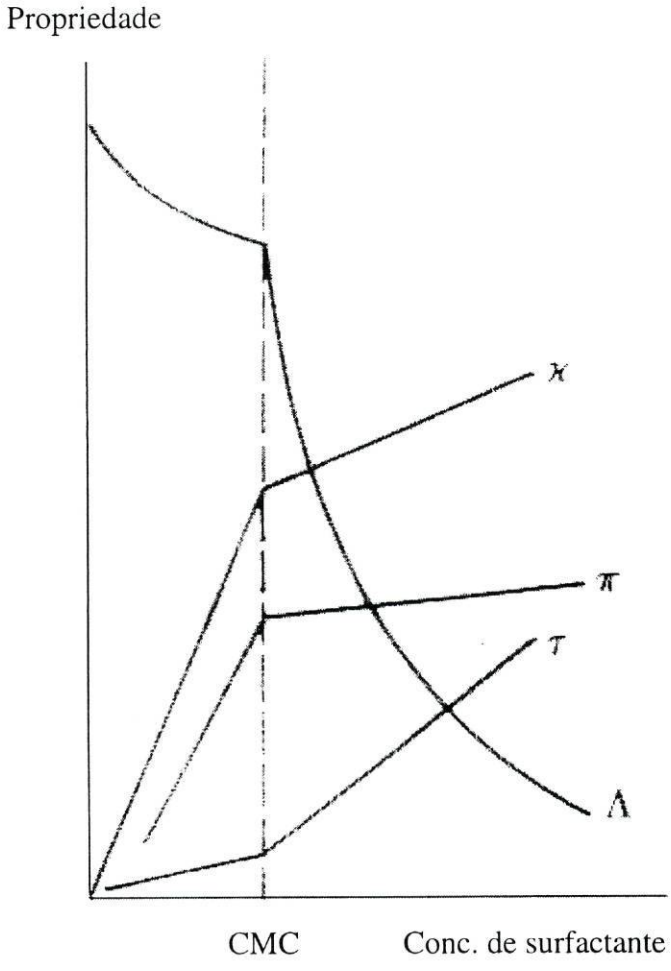


Figura 2.3 – Ilustração esquemática da variação de algumas propriedades (condutividade, κ; turbidância, τ; pressão osmótica, π; e condutividade molar, Λ) com a concentração de surfactante [2].

2.1.2 – Soluções de polielectrólitos

2.1.2.1 – Determinações de condutividade

No estudo de soluções de polielectrólitos, como são os AF [3-10], as medições condutimétricas podem fornecer informações importantes. Com o desenvolvimento da chamada teoria da condensação [1,4-7,11,12], segundo a qual todos os contraiões em solução interactuam de alguma forma com o poliião, e alguns deles "condensam" ou ficam presos ao poliião pela sua elevada carga de sinal contrário, obtiveram-se avanços na compreensão do comportamento de soluções. De acordo com esta teoria, a condutividade molar, Λ, de uma solução de um electrólito puro, ou seja, de uma solução contendo apenas poliiões, Pol, e contraiões, C, pode ser descrita pela expressão:

$$\Lambda = \frac{\kappa}{[\mathrm{Pol}]} = \mathrm{fr}(\lambda_C + \lambda_{\mathrm{Pol}}) \qquad (2.2)$$

onde κ representa a condutividade da solução (S cm^{-1}), [Pol] a concentração do poliião (mol cm^{-3}), λ_C a condutividade molar do contraião (S cm^2 mol^{-1}), λ_{Pol} a condutividade molar do poliião (S cm^2 mol^{-1}) e fr um parâmetro relacionado com a fracção de contraiões livres (= 1-θ, em que θ representa a fracção de cargas de sinal contrário ligadas ao poliião).

A equação anterior pode ser desenvolvida para uma expressão na qual λ_C seja substituída por λ_C^0, a condutividade molar do contraião em água:

$$\Lambda = \mathrm{fr}(\lambda_C^0 + \lambda_{\mathrm{Pol}}) \qquad (2.3)$$

2.1.2.2 – Determinação de fr e λ_{Pol}

Para determinar fr e λ_{Pol}, cada amostra de polielectrólito ácido deve ser titulada com soluções de hidróxido contendo contraiões diferentes, tipicamente Li^+, Na^+ e K^+, o que permitirá obter fr e λ_{Pol} através da representação de Λ em função de λ_C^0. Assim, um dos cuidados a ter no cálculo de Λ deve ser o de exprimir κ e C_{Pol} em unidades

homogéneas, uma vez que $\Lambda = \kappa / C_{Pol}$. Desta forma, pode representar-se κ em S cm^{-1} e C_{Pol} (=[OH^-], uma vez que a reacção é de 1:1) em mol cm^{-3}, o que originará valores de Λ expressos em S cm^2 mol^{-1}.

O cálculo de Λ deve efectuar-se utilizando exclusivamente valores de κ onde as concentrações de H^+ e de OH^- sejam relativamente baixas [4,6,7]. Representando κ em função de C_{Pol} pode calcular-se para cada amostra o valor de Λ a partir do declive da recta ($\kappa = \Lambda \times C_{Pol}$). Posteriormente, utilizando os valores de Λ calculados deve representar-se $\Lambda = f(\lambda_c^0)$ para os três catiões diferentes, o que origina uma recta de declive fr e permite determinar λ_{Pol} a partir da razão entre a ordenada na origem e o declive [4-7].

2.2 – ESTUDOS DE CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHOS

A cromatografia de exclusão por tamanhos ("Size Exclusion Chromatography", SEC, ou HP-SEC quando funciona a alta pressão) é o nome pelo qual se designa a separação de macromoléculas com base no seu tamanho utilizando para o efeito uma técnica de cromatografia líquida [13-16]. O fraccionamento de amostras nos seus constituintes é efectuado no interior de colunas cromatográficas (Fig. 2.4) cujo material de enchimento se compõe de partículas porosas com diâmetros de poro cuidadosamente calibrados. Assim, no fraccionamento de uma amostra formada por uma mistura ideal de dois constituintes com tamanhos moleculares distintos, verifica-se que estes se deslocam no interior da coluna cromatográfica percorrendo caminhos diferentes, sendo eluído em primeiro lugar o constituinte de maior volume em solução. Desta forma, devido à pressão exercida no interior da coluna pela passagem da fase móvel, as partículas de menor volume circulam quer pelo interior das partículas porosas que constituem a fase estacionária, ou seja, no interior do material de enchimento da coluna, quer nos espaços intersticiais, sendo por isso retardadas no seu percurso até à outra extremidade da coluna. Por outro lado, se as partículas possuírem um volume demasiado elevado que não lhes permita penetrar no interior dos poros do material de enchimento, circulam apenas nos interstícios da fase estacionária, percorrendo um percurso menor e sendo por isso eluídas mais rapidamente. Se no final da coluna se

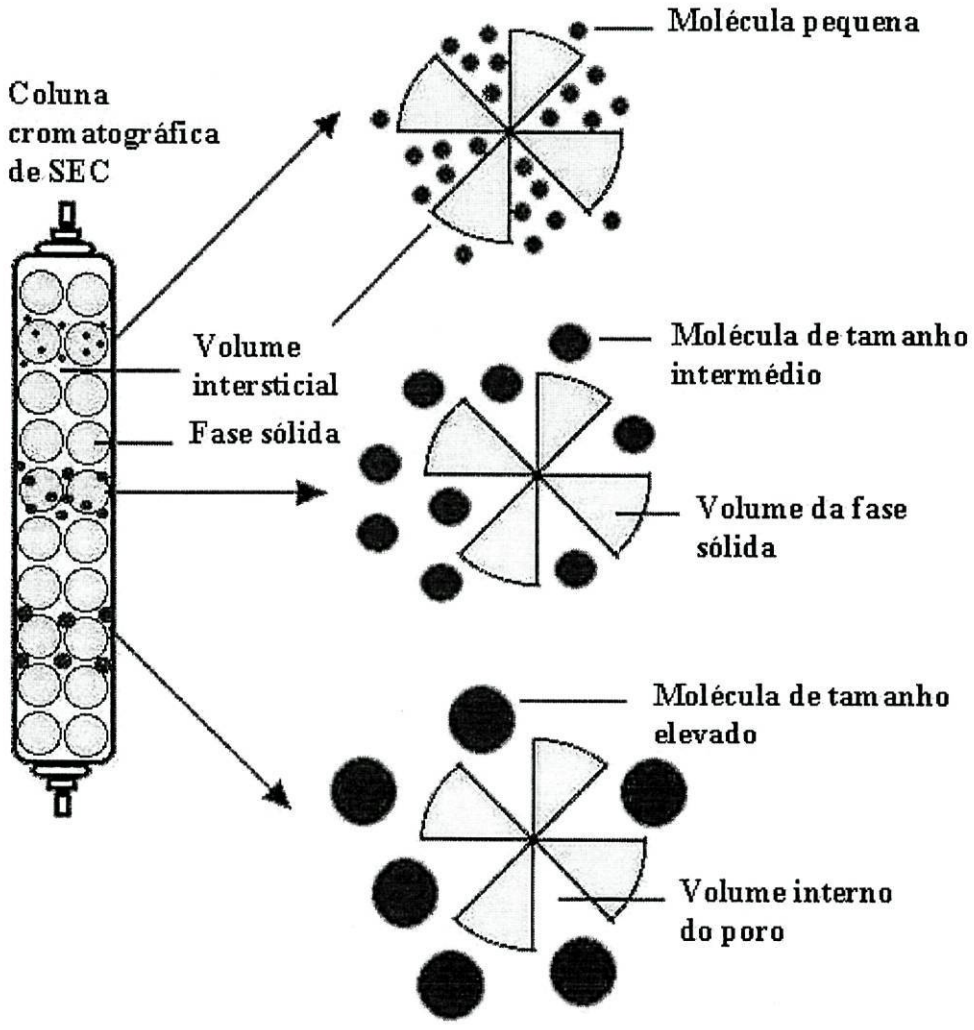


Figura 2.4 – Esquema de uma coluna de SEC.

colocar um detector (de massa, de UV-Vis, etc.) e o sistema estiver previamente calibrado, o tempo de passagem dos constituintes no detector em tempos distintos permitirá estimar o tamanho dos constituintes da mistura, sendo a altura do sinal ou a sua área proporcionais à concentração desse constituinte.

A calibração das colunas de SEC pode ser efectuada utilizando padrões contendo substâncias de massas moleculares conhecidas. Desta forma, ao injectar-se num sistema de SEC uma amostra de composição desconhecida pode comparar-se o tempo de eluição dos constituintes e a área contida sob as bandas com os valores previamente determinados na calibração, e assim calcular o tamanho molecular e a concentração de cada constituinte. Contudo, esta técnica apenas permite obter informação válida sobre as amostras se a matriz dos padrões for idêntica à das amostras, sem o qual as determinações efectuadas não serão completamente válidas. Este facto deve-se a que os sistemas de SEC separam as moléculas de acordo com o tamanho e não pela massa molecular dos constituintes, pelo que polímeros da mesma massa mas com fórmulas químicas diferentes, ou moléculas que difiram na sua conformação estereoquímica (por exemplo linear *vs* ramificada), uma vez que apresentam volumes em solução (volumes hidrodinâmicos) distintos, exibem tempos de eluição diferentes. A presença deste tipo de discrepância entre padrões e amostras pode conduzir a erros elevados em determinações de massas moleculares, pelo que as determinações efectuadas nestas condições apenas podem ser utilizadas a título comparativo.

Para que as separações sejam efectivas e as estimativas dos tamanhos moleculares não sejam incorrectas, os constituintes da amostra devem formar uma mistura ideal, o que implica que não devem existir interacções entre eles. Por outro lado, a fase estacionária das colunas não deve reagir quimicamente com o soluto, deve ser estável à temperatura de funcionamento, encontrar-se completamente hidratada pela fase móvel e possuir um volume de poro tal que permita resolver a amostra, ou seja, separar a amostra nos seus constituintes. No caso de ocorrerem interacções entre o material de enchimento da coluna e algum dos constituintes da amostra, este poderá ser retido ou eluído mais rapidamente, sendo-lhe assim estimado um volume molecular distinto do valor real. Uma das formas de alterar o volume hidrodinâmico de cada constituinte, de diminuir as interacções entre os constituintes e entre estes e o material de enchimento da coluna será aumentar a força iónica da solução, uma vez que assim diminuem as interacções entre os constituintes e entre estes e a fase estacionária.

2.3 – TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DOS DADOS DE FLUORESCÊNCIA

2.3.1 – Pré-processamento de dados espectrais

Os AF são constituídos por misturas complexas de diversas substâncias, pelo que as bandas observadas nos espectros poderão conter contribuições de espécies diferentes. Quando se efectuam experiências onde se provocam variações nos espectros por adição de um catião metálico ou por variação do pH, é indispensável aferir se as bandas observadas nos espectros têm variações semelhantes, o que indicará que existe apenas um componente, ou se envolvem diversas variações linearmente independentes, o que indicará a existência de espécies com propriedades diferentes, ou seja, que existem vários componentes. Neste trabalho, a análise das variações observadas nos espectros foi efectuada pelo método SIMPLISMA [17-21]

O SIMPLISMA é um método de pré-processamento de dados espectrais que tem como objectivo a detecção de comprimentos de onda puros, pelo que pretende encontrar comprimentos de onda em que só um componente origina sinal a partir de um conjunto ordenado de espectros experimentais obtidos em sequência (por exemplo uma titulação). Neste trabalho, esta técnica foi usada com espectros de fluorescência síncrona obtidos ao longo de uma titulação de AF com catião Cu(II).

Os espectros são representados pela matriz **D**, com elementos d_{ij}, do tipo $n_w \times n_s$, em que n_w é o número de pontos por espectro e n_s é o número de espectros. Os comprimentos de onda puros são determinados por análise de três espectros (vectores), calculados a partir dos dados experimentais: espectro médio, **m**; espectro desvio padrão (DP), **s**; espectro pureza, **p**. Estes vectores são definidos, respectivamente, por

$$m_i = \frac{1}{n_s}\sum_{j=1}^{n_s} d_{ij} \qquad (i = 1...n_w) \qquad (2.4)$$

$$s_i = \sqrt{\frac{1}{n_s}\sum_{j=1}^{n_s}\left(d_{ij} - m_i\right)^2} \qquad (i = 1...n_w) \qquad (2.5)$$

$$p_i = \frac{s_i}{m_i} \qquad (i = 1...n_w) \qquad (2.6)$$

A visualização dos vectores **s** e **p** na forma de espectros permite a detecção dos comprimentos de onda com nível de pureza mais elevado, os quais são sucessivamente removidos dos espectros. Este processo é repetido até que o espectro médio e o espectro do desvio padrão apresentem apenas ruído, isto é, até ser removida toda a informação útil incluída nos espectros e apenas restar erro aleatório.

Como complemento à análise gráfica usaram-se duas funções de erro, R_s (intensidade relativa total do espectro do desvio padrão) e R_r (razão das intensidades relativas totais dos espectros desvio padrão de j e j+1), que fornecem uma indicação aproximada do número de componentes

$$R_{sj} = 100 \frac{\sum_{i=1}^{n_w} s_{ij}}{\sum_{i=1}^{n_w} s_{il}} \qquad (2.7a)$$

$$R_{rj} = \frac{R_{sj}}{R_{s(j+1)}} \qquad (2.7b)$$

Quando for atingido o número correcto de componentes, a função R_{sj} deve apresentar um valor próximo de zero, enquanto que a função R_{rj} deve ser muito superior a $R_{r(j-1)}$.

O segundo passo do SIMPLISMA é o cálculo dos espectros (matriz **S**, tamanho $n_c \times n_w$, em que n_c é o número de componentes) e perfis de concentração (matriz **C**, tamanho $n_s \times n_c$). Assumindo que todos os componentes têm a mesma eficiência de fluorescência, os perfis de concentração, depois de normalizados, são iguais às intensidades de fluorescência das variáveis puras que lhes correspondem. Se a matriz de dados ($\mathbf{D^T}$) for expressa como

$$\mathbf{D^T = C\,S} \qquad (2.8)$$

os espectros e perfis de concentração podem ser calculados por um método de mínimos quadrados:

$$\mathbf{S = (C^T\,C)^{-1}\,C^T\,D^T} \qquad (2.9)$$

$$\mathbf{C = D^T\,S^T\,(S\,S^T)^{-1}} \qquad (2.10)$$

Na eq. 2.9, as intensidades das variáveis puras na matriz **D** são usados na matriz **C**.

2.3.2 – Técnicas para a análise dos perfis de extinção de fluorescência

Nos estudos de complexação por fluorescência, após a utilização da técnica SIMPLISMA na determinação do número de componentes, cálculo dos espectros pureza, e respectivos perfis de extinção de fluorescência em função da concentração de catião metálico, é necessário efectuar a estimativa dos parâmetros de equilíbrio através do ajuste a modelos plausíveis destes perfis. Esse procedimento pode ser executado por dois tratamentos independentes, a análise de Stern-Volmer [21-25] e o método de Ryan e Weber [21,26,27].

2.3.2.1 – Análise de Stern-Volmer

Equação linear de Stern-Volmer. A extinção de fluorescência é um processo no qual a intensidade de fluorescência de uma dada espécie diminui devido a processos de transferência de energia, formação de complexos e colisões entre moléculas [21-25]. Quando um ligando (L) apresenta fluorescência, acontecem os seguintes fenómenos:

$$L + h\nu \rightarrow L^* \qquad (2.11.a)$$

$$L^* \rightarrow L + h\nu \qquad (2.11.b)$$

$$L^* \rightarrow L \qquad (2.11.c)$$

onde a eq. 2.11.a representa a absorção de radiação, a eq. 2.11.b a emissão de radiação e a eq. 2.11.c um decaimento não radiativo.

A extinção de fluorescência pode ser estática quando ocorre a formação de um complexo não fluorescente entre o fluoróforo e uma determinada substância que provoca a diminuição da fluorescência (extintor), ou dinâmica quando apenas ocorre colisão ou uma passagem muito próxima de um grupo fluorescente no estado excitado pelo extintor, que lhe provoca uma diminuição na fluorescência. No caso da extinção de fluorescência ser dinâmica, a colisão tem de se verificar durante o tempo de vida do estado excitado do grupo fluorescente, que volta ao estado fundamental após a colisão sem a emissão de qualquer fotão.

A extinção estática de fluorescência é representada pela equação linear de Stern-Volmer, que pode ser deduzida da seguinte forma: quando ocorre a complexação entre um ligando (L) fluorescente e um catião metálico (M), com formação de um complexo (ML) não fluorescente, a equação que traduz a reacção é

$$M + L \Leftrightarrow ML \tag{2.12}$$

à qual corresponde a seguinte constante de equilíbrio de complexação, K

$$K = \frac{[ML]}{[M][L]} \tag{2.13}$$

onde [ML], [L] e [M] correspondem às respectivas concentrações molares das espécies. Sabendo que os balanços materiais de ligando e catião metálico são, respectivamente

$$[L]_{Total} = [L] + [ML] \tag{2.14a}$$

e

$$[M]_{Total} = [M] + [ML] \tag{2.14b}$$

e que a fluorescência é proporcional à concentração de L,

$$\frac{F_0}{F} = \frac{[L]_{Total}}{[L]} \tag{2.15}$$

em que F_0 e F correspondem respectivamente à intensidade de fluorescência na ausência e na presença de catião, substituindo na eq. 2.15 $[L]_{Total}$ pelo seu valor na eq. 2.14.a, e [ML] pelo seu valor da eq. 2.13, obtém-se

$$\frac{F_0}{F} = \frac{[L]+[ML]}{[L]} = \frac{[L]+K[L][M]}{[L]} = 1 + K[M] \tag{2.16}$$

Para valores de $[M]_{Total}$ suficientemente superiores a $[L]_{Total}$ e/ou para valores de K suficientemente baixos, [M] é aproximadamente igual a $[M]_{Total}$, pelo que a equação anterior toma a forma aproximada

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[M]_{Total} \qquad (2.17.a)$$

sendo conhecida pelo nome de equação linear de Stern-Volmer.

A extinção dinâmica de fluorescência é representada por uma equação linear de Stern-Volmer semelhante à deduzida para a extinção estática de fluorescência (eq. 2.17a), na qual K é substituído por $K_{dinâmico}$, que representa não uma complexação efectiva (formação de [ML]), mas uma constante colisional:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{dinâmico}[M]_{Total} \qquad (2.17.b)$$

É importante salientar que a linearidade do gráfico que representa a equação de Stern-Volmer (eq. 2.17a) não prova a existência de extinção estática de fluorescência, já que a extinção dinâmica de fluorescência também origina um gráfico de Stern-Volmer linear. No caso em estudo, como se formam complexos estáveis entre os AF e o catião Cu(II), existirá sempre uma componente estática na extinção da fluorescência.

Equação modificada de Stern-Volmer. Este método modificado de Stern-Volmer [22-23] permite analisar a extinção de fluorescência no caso de existirem dois tipos de sítios ligantes fluorescentes, um acessível ao catião metálico e outro inacessível. Nestes casos, o gráfico de Stern-Volmer apresenta um encurvamento no sentido do eixo das abcissas para concentrações elevadas do catião metálico, ou seja, quando os sítios ligantes acessíveis ficam saturados e, por consequência, deixam de fluorescer, a intensidade de fluorescência observada é devida apenas aos sítios inacessíveis.

Sendo (a) o sítio ligante fluorescente acessível ao catião e (b) o inacessível, a intensidade de fluorescência total na ausência de catião, F_0, é dada por:

$$F_0 = F_{0a} + F_{0b} \qquad (2.18)$$

em que o subscrito 0 se refere à intensidade de fluorescência na ausência de catião.

A fracção de fluoróforos acessível ao catião (f) é dada por

$$f = \frac{F_{0a}}{F_0} = \frac{F_{0a}}{F_{0a} + F_{0b}} \tag{2.19}$$

De acordo com a equação de Stern-Volmer (eq. 2.17.a), na presença de catião metálico a intensidade de fluorescência da fracção acessível diminui, enquanto que a fracção inacessível não sofre extinção de fluorescência. Assim,

$$F = \frac{F_{0a}}{1 + K[M]} + F_{0b} \tag{2.20}$$

em que K é a constante de estabilidade de complexos com a fracção acessível. Subtraindo membro a membro a eq. 2.18 à eq. 2.20, vem [21,22]:

$$\Delta F = F_0 - F = F_{0a} \frac{K[M]}{1 + K[M]} \tag{2.21}$$

Invertendo a eq. 2.21 e multiplicando membro a membro pela eq. 2.18, vem

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \left(\frac{1 + K[M]}{K[M]} \right) \left(\frac{F_{0a} + F_{0b}}{F_{0a}} \right) \tag{2.22}$$

Atendendo à eq. 2.19 e rearranjando, vem

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \left(\frac{1}{f \times K} \right) \frac{1}{[M]} + \frac{1}{f} \tag{2.23}$$

Se se aplicarem as condições descritas para a validade da eq. 2.17.a, pode substituir-se nesta equação [M] por $[M]_{Total}$,

$$\frac{F_0}{\Delta F} = \left(\frac{1}{f \times K} \right) \frac{1}{[M]_{Total}} + \frac{1}{f} \tag{2.24}$$

Se a representação de $\frac{F_0}{\Delta F}$ em função de $\frac{1}{[M]_{Total}}$ for linear, K e f podem ser obtidos por resolução do sistema de equações:

$$\text{declive} = \frac{1}{f \times K} \qquad (2.25)$$

$$\text{ordenada na origem} = \frac{1}{f}$$

2.3.2.2 – Método de Ryan e Weber

Em solução diluída, um ligando fluorescente em equilíbrio com um catião metálico apresenta uma intensidade de fluorescência experimental (F) que varia ao longo de uma titulação com a extensão de formação de complexos [21,26,27]. A intensidade de fluorescência experimental (F) é igual à soma da intensidade de fluorescência do ligando livre (F_0) com a do ligando complexado (F_{ML})

$$F = F_0 + F_{ML} \qquad (2.26)$$

Numa titulação de um ligando com um catião metálico, a fracção de ligando complexado, α, é dada em função das intensidades de fluorescência no início, F_0, e no fim da titulação, F_{ML}, por

$$\alpha = \frac{[ML]}{[L]_{Total}} = \frac{F_0 - F}{F_0 - F_{ML}} \qquad (2.27)$$

Admitindo que se formam complexos na proporção 1:1 com constante de estabilidade condicional dada pela eq. 2.13, e usando os balanços materiais do ligando (eq. 2.14.a) e do catião metálico (eq. 2.14.b), a fracção de ligando complexada pode ser expressa em termos da constante de estabilidade e da concentração de catião metálico livre por

$$\alpha = \frac{[ML]}{[L]_{Total}} = \frac{K[M]}{1 + K[M]} = \frac{K([M]_{Total} - \alpha[L]_{Total})}{K([M]_{Total} - \alpha[L]_{Total}) + 1} \qquad (2.28)$$

Rearranjando a equação anterior, e através da resolução de uma equação de segundo grau, obtém-se:

$$\alpha = \left[\frac{1}{2K[L]_{Total}}\right] \times$$
$$\times \left\{(K[L]_{Total} + K[M]_{Total} + 1) - \sqrt{(K[L]_{Total} + K[M]_{Total} + 1)^2 - 4K^2[L]_{Total}[M]_{Total}}\right\} \quad (2.29)$$

Exprimindo os resultados experimentais de maneira a que $F_0 = 100$, obtém-se por substituição de α retirado da eq. 2.27

$$\alpha = 100 + \left[\frac{F_{ML} - 100}{2K[L]_{Total}}\right] \times$$
$$\times \left\{(K[L]_{Total} + K[M]_{Total} + 1) - \sqrt{(K[L]_{Total} + K[M]_{Total} + 1)^2 - 4K^2[L]_{Total}[M]_{Total}}\right\} \quad (2.30)$$

Nos casos em que exista evidencia experimental de que o complexo formado entre L e M é não fluorescente ($F_{ML} = 0$), esta equação pode ser simplificada para

$$F = 100 - \frac{100}{2K[L]_{Total}} \times$$
$$\times \left\{(K[L]_{Total} + K[M]_{Total} + 1) - \sqrt{(K[L]_{Total} + K[M]_{Total} + 1)^2 - 4K^2[L]_{Total}[M]_{Total}}\right\} \quad (2.31)$$

Para obter K, $[L]_{Total}$ e F_{ML}, esta equação pode ser resolvida por ajuste por regressão não linear dos perfis de extinção de fluorescência calculados pelo SIMPLISMA (secção 2.3.1) em função de $[M]_{Total}$ obtido experimentalmente.

A qualidade do ajuste é avaliada por duas funções de erro, a soma dos quadrados do resíduo (SQR) e o desvio médio das estimativas (DME),

$$SQR = \sum (F - F_{cal})^2 \quad (2.32)$$

$$DME = \frac{\sum |F - F_{cal}|}{n_p} \quad (2.33)$$

em que os somatórios são efectuados com o número de pontos usados nos cálculos (n_p), F é a intensidade de fluorescência experimental e F_{cal} é a intensidade de fluorescência calculada.

Um dos problemas inerentes a esta técnica é que não se obtêm estimativas razoáveis de $[L]_{Total}$ se a ordem de grandeza das constantes de formação e/ou a concentração de ligando forem baixas [20,21].

2.4 – TÉCNICAS QUIMIOMÉTRICAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DOS DADOS POTENCIOMÉTRICOS

2.4.1 – Titulação de misturas de AF e catião Cu(II) com base forte

A adição de catião Cu(II) a soluções de AF provoca a formação de complexos [Cu(II) – AF], o que origina um aumento da acidez da solução em consequência da libertação de catiões hidrogénio dos grupos carboxílicos que formaram quelatos com o Cu(II) [9,10,28]. No entanto, para além dos grupos carboxílicos, nos AF existem também grupos ácidos do tipo hidroxílico que são demasiado fracos para serem detectados pelas titulações habituais de ácido-base [9,10,28]. A titulação de soluções de AF contendo Cu(II) em proporções diferentes permite estimar de uma forma indirecta a concentração de sítios ligantes presentes nas moléculas de AF, uma vez que o aumento de acidez provocado pela reacção de complexação pode ser doseado com base forte. A concentração de sítios ligantes será então determinada por titulação, sendo calculada pela diferença entre a quantidade de base forte necessária para valorar as soluções imediatamente antes do excesso de Cu(II), e na sua ausência. Se as soluções de AF contiverem um grande excesso de Cu(II), a curva de titulação sofre um forte desvio provocado pela presença de Cu(II) não complexado que se encontra a ser doseado nesse momento. Um prolongamento desta linha imediatamente antes deste desvio permite estimar a quantidade de Cu(II) complexado com os AF.

A análise das curvas de titulação para um mesmo valor de pH permite verificar que ocorre um consumo de base mais elevado na presença de Cu(II) que na sua ausência. Neste caso, sendo elevada a estabilidade dos complexos formados, os grupos ácidos demasiado fracos para serem titulados directamente numa simples reacção de ácido-base podem ser valorados indirectamente na presença de Cu(II). Este resultado sugere que nas reacções de complexação entre os AF e o catião Cu(II) deverão estar

envolvidos grupos hidroxílicos fracamente ácidos (entre outros) que não eram titulados em meio aquoso.

2.4.2 – Interacção de catiões metálicos com amostras de AF

2.4.2.1 – Modelos de cálculo utilizados no tratamento dos dados experimentais

Na modelação das interacções entre catiões metálicos e as amostras de AF partiu-se de um modelo simples de complexação, a partir do qual se desenvolveram três outros modelos.

Modelo simples. A formação de complexos entre os AF e catiões metálicos pode ser descrita utilizando-se um modelo simples de complexação que contempla a formação de complexos com uma estequeometria 1:1. A reacção de complexação que se observa entre os sítios ligantes dos AF (L), que neste modelo simples são considerados semelhantes e independentes entre si, e um catião metálico (M) com a formação de um complexo (ML) é representada pela seguinte equação (cargas não apresentadas para simplificação):

$$M + L \Leftrightarrow ML \tag{2.34}$$

à qual corresponde a seguinte constante de equilíbrio condicional de complexação K,

$$K = \frac{[ML]}{[M][L]} \tag{2.35}$$

onde [ML], [L] e [M] correspondem às respectivas concentrações molares das espécies. Os balanços materiais do catião metálico e ligando são, respectivamente

$$[M]_{Total} = [M] + [ML] \tag{2.36}$$

e

$$[L]_{Total} = [L] + [ML] \tag{2.37}$$

Modelo de Scatchard. A formação do complexo ML pode ser caracterizada por um parâmetro denominado de função de formação, ν, que representa o número médio de catiões metálicos associados a cada molécula de L, o que de acordo com o modelo descrito atrás poderá variar entre zero e um:

$$\nu = \frac{[M]_{complexado}}{[L]_{Total}} = \frac{[ML]}{[L]_{Total}} \tag{2.38}$$

Substituindo [ML] pelo seu valor retirado da eq. 2.35 e $[L]_{Total}$ pelo valor no balanço material (eq. 2.37), vem:

$$\nu = \frac{K[M][L]}{[L]+K[M][L]} \tag{2.39}$$

Dividindo numerador e denominador por [L] e rearranjando vem

$$\nu = \frac{K[M]}{1+K[M]} \Leftrightarrow \nu + \nu K[M] = K[M] \tag{2.40}$$

Um novo rearranjo da expressão (dividindo por [M] e passando "νK" do membro da esquerda para o da direita) conduz à equação seguinte:

$$\frac{\nu}{[M]} = K - \nu K \tag{2.41}$$

Esta equação traduz o método de Scatchard para o modelo de complexação apresentado [29-37].

Como se pode verificar, a utilização da eq. 2.41 só é possível efectuando-se uma estimativa da concentração dos sítios ligantes envolvidos na complexação ($[L]_{Total}$). A estimativa deste parâmetro em amostras com estrutura mal determinada e para as quais se desconhece a massa molecular (como é o caso dos AF) poderia realizar-se através de titulações com base forte, o que permitiria efectuar estimativas dos valores de acidez total. No entanto, embora este tipo de metodologia tenha sido utilizado em estudos de complexação de catiões metálicos com AF [38,39], não parece ser o mais apropriado

uma vez que nem todos os grupos ácidos dos AF se encontram em sítios ligantes com capacidade de formação de complexos estáveis. Por este motivo, esta metodologia não parece ser a mais indicada para a aplicação do método de Scatchard a estudos com AF.

A eq. 2.41 pode ser ligeiramente modificada de forma a não ser necessário utilizar de forma explicita o valor de $[L]_{total}$. De facto, sabendo que

$$[L]_{Total} = \frac{\{L\}}{MM_L} \tag{2.42}$$

em que {L} representa a concentração total de L expressa em g L^{-1} e MM_L a massa molar de L, pode substituir-se o valor de $[L]_{Total}$ na eq. 2.38, originando a equação:

$$\nu = \frac{[ML](MM_L)}{\{L\}} \tag{2.43}$$

Se se definir uma função ν^* como sendo

$$\nu^* = \frac{[ML]}{\{L\}} \tag{2.44}$$

a eq. 2.43 pode vir apresentada da seguinte forma:

$$\nu = \nu^* \times (MM_L) \tag{2.45}$$

Substituindo este resultado na eq. 2.41 e rearranjando, vem

$$\frac{\nu^*}{[M]} = \frac{K}{MM_L} - K\nu^* \tag{2.46}$$

Uma representação de $\frac{\nu^*}{[M]}$ em função de ν^*, ou seja, $\frac{[M]_{Total} - [M]}{\{L\}[M]}$ em função de $\frac{[M]_{Total} - [M]}{\{L\}}$ origina uma recta de declive –K e ordenada na origem $\frac{K}{MM_L}$.

Um dos problemas que surge frequentemente com a utilização desta equação relaciona-se com o encurvamento da representação, que é muito comum quando estão envolvidos ligandos orgânicos e que normalmente se atribui quer à formação de estequeometrias de complexação diferentes da 1:1, nomeadamente 1:2, quer à presença de dois tipos de sítios ligantes com características diferentes [30-37]. Para obviar este facto, assume-se a presença de dois ou mais sítios ligantes independentes e com características distintas, e desta forma divide-se o gráfico em duas ou mais zonas aproximadamente lineares a partir das quais se determinam independentemente os valores de K [30-37]. No entanto, num estudo efectuado com dados simulados [40], concluiu-se que este encurvamento no sentido positivo do eixo das ordenadas não deve ser atribuído à presença de sítios ligantes com características diferentes (heterogeneidade do ligando), uma vez que esse facto dificilmente resultaria num encurvamento das representações. Por outro lado, nesse mesmo estudo refere-se que a acontecer qualquer encurvamento provocado pela heterogeneidade do ligando, este deveria ocorrer na direcção do eixo das abcissas e não na direcção do eixo das ordenadas. Este aspecto das representações de Scatchard encontra-se mais desenvolvido no Apêndice 1.

Modelo de van den Berg / Ruzic. Com base nos balanços materiais do catião metálico e do ligando que foram definidos respectivamente nas eqs. 2.36 e 2.37, a constante de equilíbrio condicional K (eq. 2.35) pode ser reescrita da seguinte forma:

$$K = \frac{[M]_{Total} - [M]}{[M][L]} = \frac{[L]_{Total} - [L]}{[M][L]} \tag{2.47}$$

Se se adicionar uma quantidade de catião metálico a um sistema em titulação provocando um aumento ΔM na sua concentração total, a equação de balanço material pode ser reescrita da seguinte forma:

$$\{[M]_{Total} + \Delta[M]\} - [M] = K[M][L] \tag{2.48}$$

onde $\{[M]_{Total} + \Delta[M]\}$ corresponde à nova concentração total do catião metálico após a adição. Rearranjando a expressão anterior, vem:

$$\Delta[M] = K[M][L] - [M]_{Total} + [M] \tag{2.49}$$

Um rearranjo da eq. 2.47 (divisão do numerador e denominador por [L]), conduz à expressão

$$K = \frac{\frac{[L]_{Total}}{[L]} - 1}{[M]} \Leftrightarrow \frac{[L]_{Total}}{[L]} = K[M] + 1 \Leftrightarrow [L] = \frac{[L]_{Total}}{K[M]+1} \tag{2.50}$$

Substituindo-se o valor de [L] definido na eq. 2.50 pelo seu valor na eq. 2.49, obtém-se a expressão seguinte:

$$\Delta[M] = \frac{[L]_{Total}}{1 + \frac{1}{K[M]}} - [M]_{Total} + [M] \tag{2.51}$$

Passando $[M]_{Total}$ e [M] para o primeiro termo, e dividindo tudo por [M], obtém-se:

$$\frac{\{[M]_{Total} + \Delta[M]\} - [M]}{[M]} = \frac{[L]_{Total}}{[M] + \frac{1}{K}} \tag{2.52}$$

Invertendo a eq. 2.52, obtém-se a chamada equação de van den Berg / Ruzic [40-43]:

$$\frac{[M]}{\{[M]_{Total} + \Delta[M]\} - [M]} = \frac{1}{K[L]_{Total}} + \frac{1}{[L]_{Total}}[M] \tag{2.53}$$

Da representação de parte esquerda da eq. 2.53 em função de [M] obtém-se uma recta a partir da qual se pode determinar a concentração do ligando total (ou capacidade de complexação), $[L]_{Total}$, a partir do declive da recta, $\frac{1}{[L]_{Total}}$, e a constante de complexação K a partir da ordenada na origem, $\frac{1}{K[L]_{Total}}$.

Modelo de Buffle. A observação experimental de uma titulação de AF com um qualquer catião metálico que forme complexos estáveis com os AF (por exemplo o Cu(II) ou o Pb(II)) mostra que ocorre a libertação de protões à medida que se adiciona o catião metálico. Este facto significa que estão a ocorrer dois equilíbrios químicos simultâneos, um de complexação (descrito pelas eqs. 2.34 e 2.35) e outro de ácido-base. Deste modo, a reacção química global que ocorre entre os sítios ligantes das moléculas de AF e o catião metálico é representada pela seguinte equação química (cargas não apresentadas para simplificação):

$$M + LH_x \Leftrightarrow ML + xH \tag{2.54}$$

a qual tem uma constante de equilíbrio K* descrita pela equação seguinte

$$K^* = \frac{[ML][H]^x}{[M][LH_x]} \tag{2.55}$$

Esta equação foi utilizada por Buffle [45,46] na derivação de um outro método gráfico para o estudo da complexação entre AF e catiões metálicos.

No entanto, a constante de equilíbrio representada na eq. 2.55 corresponde ao produto da constante de equilíbrio de complexação (eq. 2.35), pela constante de equilíbrio de ácido-base (K_a), que é representada pela equação química seguinte (cargas omitidas por simplicidade):

$$LH_x \Leftrightarrow L + xH \tag{2.56}$$

com

$$K_a = \frac{[L][H]^x}{[LH_x]} \tag{2.57}$$

pelo que vem

$$K^* = K \times K_a \tag{2.58}$$

A equação subjacente ao modelo de Buffle pode ser derivada considerando apenas o equilíbrio de complexação. Assim, a equação do balanço material do ligando, (eq. 2.37) pode ser reescrita como

$$[L]_{Total} = \frac{\{L\}}{MM_L} = [L] + [ML] \tag{2.59}$$

Dividindo esta equação por [ML] vem

$$\frac{\{L\}}{MM_L} \times \frac{1}{[ML]} = \frac{[L]}{[ML]} + 1 \tag{2.60}$$

Como $\frac{[ML]}{[L]} = K[M]$, vem

$$\frac{\{L\}}{MM_L} \times \frac{1}{[ML]} = \frac{1}{[M]K} + 1 \tag{2.61}$$

Multiplicando ambos os membros da equação por MM_L e sabendo que $[ML] = [M]_{Total} - [M]$, vem

$$\frac{\{L\}}{[M]_{Total} - [M]} = \frac{MM_L}{[M]K} + MM_L \tag{2.62}$$

Considerando a eq. 2.44, obtém-se a expressão que traduz o método de Buffle [45,46]:

$$\frac{1}{\nu^*} = \frac{MM_L}{K}\frac{1}{[M]} + MM_L \tag{2.63}$$

A representação de $\frac{1}{\nu^*}$ em função de $\frac{1}{[M]}$ origina uma recta de declive $\frac{MM_L}{K}$ e ordenada na origem MM_L.

No Apêndice 1 efectua-se uma avaliação mais exaustiva destes três métodos de cálculo (métodos de Scatchard, van den Berg/Ruzic e Buffle).

2.5 – ESTUDOS CINÉTICOS

2.5.1 – Decomposição por PARAFAC de matrizes de três vias

Uma matriz de dados de três vias correspondendo a uma experiência cinético-espectrofotométrica tem uma estrutura tridimensional que pode ser descrita pela equação seguinte:

$$a_{ijk} = \sum_{s=1}^{nf} t_{is} w_{js} c_{ks} + e_{ijk} , \qquad i = 1, ..., nt; j = 1, ..., nw; k = 1, ..., ns; \qquad (2.64)$$

onde a_{ijk} representa os elementos da matriz **A** contendo as absorvâncias experimentais, w_{js} os elementos da matriz **S** que contém os espectros (cada um deles com *nw* comprimentos de onda), t_{is} os elementos da matriz **T** que contém os perfiz de tempo (cada um deles com *nt* tempos), c_{ks} os elementos da matriz **C** que contém a concentração relativa de *n*s espécies, n_f o número de factores do modelo e e_{ijk} o número de elementos da matriz de erro.

A eq. 2.64 representa também o modelo PARAFAC [47]. Após a selecção do número de factores do modelo (n_f), as três matrizes básicas **T**, **S** e **C** são calculadas por um método iterativo alternante de mínimos quadrados sem quaisquer restrições, tomando como primeira aproximação para as três matrizes um conjunto gerado aleatoriamente. A existência de uma decomposição única é verificada pela realização de diversas experiências independentes. O número de factores do modelo é determinado pela dimensão intrínseca da matriz de dados, que corresponde às variações não correlacionadas observadas nos espectros.

Se as intensidades de absorvância observadas forem directamente proporcionais à concentração das *ns* espécies, isto é, se no decorrer das experiências a lei de Lambert-Beer for obedecida em toda a gama de concentrações, comprimentos de onda e tempos, são produzidas matrizes de dados de três vias com estrutura trilinear, onde *nf* é igual a *ns*. Nas experiências cinético-espectrofotométricas, o número de espécies espectroscopicamente activas é igual ao número de catiões metálicos somado de um, que corresponde à presença do indicador metalocrómico.

A qualidade da adequação dos dados experimentais ao modelo testado é fornecida pelo valor da função de perda após ser atingida a convergência, sendo definida como sendo

$$\sum_{i=1}^{nt}\sum_{j=1}^{nw}\sum_{k=1}^{ns} e^2_{ijk} = \sum_{i=1}^{nt}\sum_{j=1}^{nw}\sum_{k=1}^{ns} (a_{ijk} - a'_{ijk})^2 \qquad (2.65)$$

onde a'_{ijk} são os elementos previstos da matriz experimental.

Neste trabalho utilizou-se um valor bastante baixo para a função de perda ($1{,}0 \times 10^{-8}$), que funcionou como critério para a interrupção do processo de mínimos quadrados alternantes.

Um dos grandes objectivos deste trabalho foi a quantificação da concentração de catiões metálicos pesados, pelo que se efectuou uma análise da capacidade de previsão dos elementos da matriz de concentração. O teste efectuado consistiu na representação das concentrações previstas em função das concentrações reais, complementada com o cálculo dos parâmetros de regressão da representação linear, como o coeficiente de correlação, intercepção e correspondente intervalo de confiança a 95 %.

2.5.2 – Lei integrada das velocidades

2.5.2.1 – Definição da lei integrada das velocidades

A procedimento experimental utilizado no estudo da cinética das reacções de complexação entre os sítios ligantes dos AF (L_i) e catiões metálicos (M) baseou-se numa reacção de permuta entre um catião metálico ligado aos AF e um quelante forte (indicador metalocrómico) (eq. 2.66). Neste trabalho usou-se o indicador metalocrómico 4-(2-piridilazo)resorcinato de sódio (PAR).

$$[L-M] + PAR \rightarrow L + [M-PAR] \qquad (2.66)$$

Os AF contêm diversos sítios ligantes com capacidade para formar complexos estáveis com os catiões metálicos. Assim, cada um destes sítios poderá ser caracterizado

por velocidades específicas diferentes, pelo que a reacção global (eq. 2.66) pode ser subdividida nas seguintes equações químicas:

$$[L_1 - M] + PAR \xrightarrow{k_1'} L_1 + [M - PAR] \qquad (2.67)$$

$$\vdots \qquad\qquad \vdots$$

$$[L_i - M] + PAR \xrightarrow{k_i'} L_i + [M - PAR]$$

em que L_i representa os diferentes sítios ligantes presentes nos AF.

Como a velocidade de formação do complexo com PAR é muito superior à velocidade de descomplexação do catião metálico dos sítios ligantes dos AF, a velocidade global é limitada por esta última reacção. Nestas condições, a concentração de PAR é ajustada de forma a provocar uma reacção de complexação [Catião metálico – PAR] com cinética de pseudo-primeira ordem, sendo a velocidade global da reacção de permuta condicionada pela velocidade de descomplexação dos catiões metálicos dos AF [32,48-52].

Utilizando um grande excesso de PAR, as reacções (2.67) podem ser descritas pelas seguintes espécies químicas:

$$M(aq) + PAR \xrightarrow{k_0} [M - PAR] \qquad \text{(rápido)} \qquad (2.68)$$

$$[L_i - M] \xrightarrow{k_i} L_i + M \qquad \text{(lento)} \qquad (2.69)$$

em que k_0 representa a velocidade específica da reacção de formação do complexo entre o catião metálico e o PAR, e k_i a velocidade específica da reacção de descomplexação do catião metálico do sítio ligante (L_i) dos AF.

A velocidade global da reacção é então limitada pela velocidade de descomplexação do catião metálico dos AF, e tem uma lei diferencial de velocidade da forma:

$$\frac{d[[M - PAR]}{dt} = \sum_i \{C_i(0) \times [1 - \exp(-k_i t)]\} + X \qquad (2.70)$$

onde $C_i(0)$ representa a concentração inicial do complexo [L_i – M], t o tempo e X um termo independente do tempo, que contempla o branco e a contribuição de qualquer reacção que ocorra e que seja demasiado rápida para ser detectada no tempo de duração da experiência.

À eq. 2.70 corresponde uma lei integrada de velocidades da forma:

$$C(t) = \sum C_i(0)\exp(-k_i t) \tag{2.71}$$

em que C(t) = concentração do complexo [L – M] no instante de tempo t.

A resolução desta equação permite a determinação de velocidades específicas de descomplexação, k_i, e concentrações iniciais dos sítios ligantes, $C_i(0)$.

2.5.2.2 – Resolução da lei integrada das velocidades

Para resolver a eq. 2.71, Shuman sugeriu o uso de transformadas de Laplace onde o somatório da equação é substituído por um integral [32,49]:

$$C(t) = S\int_{-\infty}^{+\infty} H(t)e^{-kt}d(\ln t) \tag{2.72a}$$

com

$$H(t) = \frac{d^2C(t)}{d(\ln t)^2} - \frac{dC(t)}{d(\ln t)} \tag{2.72b}$$

e

$$S = \frac{4C(t)}{\sum C_i(0)} \tag{2.72c}$$

A representação de H(t) em função de ln(t) origina o denominado espectro cinético. O número de bandas existentes em cada espectro traduz o número de componentes a considerar na experiência. Por outro lado, a posição relativa no eixo das abcissas do máximo de cada banda permite efectuar uma estimativa das velocidades de descomplexação, uma vez que $k = 2/t$, sendo a concentração de cada componente determinada pela área de cada banda.

No Apêndice 2 apresenta-se com maior pormenor a implementação prática do método das transformadas de Laplace.

2.6 – TÉCNICAS DE CALIBRAÇÃO MULTICOMPONENTE

2.6.1 – Introdução

Quando se dispõe de diversas soluções (*ns* soluções) contendo várias espécies químicas (*nc* constituintes) que absorvem radiação (espectros constituídos por $n\lambda$ comprimentos de onda), a equação de Lambert-Beer toma a seguinte forma matricial:

$$\mathbf{A} = \mathbf{K}\,\mathbf{C} \tag{2.73}$$

onde **A** representa a matriz das absorvâncias ($n\lambda$ linhas × *ns* colunas), **C** a matriz das concentrações (*nc* linhas × *ns* colunas) e **K** a matriz ($n\lambda$ linhas × *nc* colunas) que contém as constantes de proporcionalidade entre os valores de absorvância e as concentrações dos *nc* constituintes.

A eq. 2.73 define um modelo de calibração para análises quantitativas. Após o cálculo de **K**, este modelo pode ser utilizado na previsão da concentração de constituintes de amostras. O cálculo da matriz **K** pode ser efectuado através da determinação da chamada "pseudo-inversa":

$$\mathbf{K} = \mathbf{A}\,\mathbf{C}^{\mathrm{T}}\,(\mathbf{C}\,\mathbf{C}^{\mathrm{T}})^{-1} \tag{2.74}$$

Este modelo de calibração denomina-se de mínimos quadrados clássicos ou de método da matriz K [53]. Um dos problemas associados a este modelo de calibração relaciona-se com o facto dos valores de absorvância a um comprimento de onda fixo serem calculados como sendo uma função de todas as concentrações dos constituintes. No caso das amostras possuírem constituintes desconhecidos, as capacidades de previsão do modelo de calibração falham e obtêm-se soluções afectadas de erro.

Esta limitação do método da matriz K pode ser colmatada através do rearranjando da equação de Lambert-Beer (eq. 2.73), que toma a forma seguinte:

$$\mathbf{C} = \mathbf{P}\,\mathbf{A} \tag{2.75}$$

onde **P** (*nc* linhas × $n\lambda$ colunas) é a matriz das constantes de proporcionalidade entre os valores de concentração e de absorvância.

Com a utilização deste novo modelo eliminam-se as limitações do modelo anterior, uma vez que as concentrações são agora determinadas em função dos valores de absorvância a uma série de comprimentos de onda variados. Assim, após selecção dos comprimentos de onda (regiões do espectro) para os quais apenas os constituintes conhecidos contribuem, podem efectuar-se as determinações quantitativas sem outros erros para além dos erros instrumentais. Desta forma, a matriz **P** pode ser calculada como,

$$\mathbf{P} = \mathbf{C}\,\mathbf{A}^{T}\,(\mathbf{A}\,\mathbf{A}^{T})^{-1} \tag{2.76}$$

Este novo modelo de calibração é conhecido como mínimos quadrados inversos, regressão linear múltipla (RLM) ou método da matriz P [54]. No entanto, este novo método também apresenta alguns problemas que induzem à instabilidade na solução matemática da eq. 2.76, nomeadamente a colinearidade dos valores de absorvância dos espectros.

2.6.2 – Regressão dos componentes principais

Para melhorar o modelo de RLM foi proposto o método da regressão dos componentes principais (RCP) [55]. Neste método, após a determinação do número de factores que provocam variações linearmente independentes (*nf*), a matriz das absorvâncias **A** é decomposta em duas matrizes mais simples. Assim, num sistema linear, o número de factores é considerado como sendo igual ao número de constituintes (*nf* = *nc*), ao contrário do que se verifica para um sistema não linear, no qual o número de factores será superior ao número de constituintes (*nf* > *nc*). Esta decomposição, denominada em química de análise dos componentes principais (ACP) [56], corresponde a um cálculo de valores e vectores próprios de uma matriz de covariância

de **A**, ou à sua decomposição nos valores singulares. Esta decomposição pode ser representada como,

$$\mathbf{A}^T = \mathbf{S}\,\mathbf{F} \tag{2.77}$$

onde **S** é a matriz dos "scores" (*ns* linhas × *nf* colunas) e **F** é a matriz dos vectores próprios (*nf* linhas × $n\lambda$ colunas).

Estas matrizes **S** e **F** correspondem a soluções abstractas das matrizes **K** e **C**. Rearranjando a eq. 2.77, obtém-se

$$\mathbf{S} = \mathbf{A}^T\,\mathbf{F}^T \tag{2.78}$$

em que $\mathbf{F}^T$ corresponde à matriz transposta da matriz **F**.

Neste caso não é necessário efectuar o cálculo da "pseudo-inversa" porque sendo a matriz **F** uma matriz ortonormal, a matriz inversa será igual à matriz transposta ($\mathbf{F}\,\mathbf{F}^T = \mathbf{F}^T\,\mathbf{F} = \mathbf{I}$, matriz identidade).

Na RCP, o modelo de calibração é semelhante ao modelo da RLM (eq. 2.75), no qual se substitui a matriz das absorvâncias (matriz **A**) pela matriz dos "scores" (matriz **S**)

$$\mathbf{C}^T = \mathbf{S}\,\mathbf{B} \tag{2.79}$$

sendo a matriz **B** (*nf* linhas × *nc* colunas) a matriz dos coeficientes de regressão.

Esta equação pode ser reescrita de outra forma, obtendo-se o modelo de calibração para a RCP,

$$\mathbf{C}^T = \mathbf{A}^T\,\mathbf{F}^T\,\mathbf{B} \tag{2.80}$$

A RCP permite resolver alguns dos problemas da RLM, nomeadamente aqueles que se relacionam com a colinearidade das absorvâncias dos espectros e a instabilidade assim causada no cálculo. De facto, como a matriz das absorvâncias é sujeita a uma ACP, não é necessário efectuar qualquer selecção de comprimentos de onda. Por outro lado, permite a utilização de um grande número de pontos por espectro, o que introduz

um efeito nivelador e torna a solução final menos influenciada pelo ruído experimental. De facto, a ACP permite eliminar parte do ruído experimental existente na matriz das absorvâncias. No entanto, no método da RCP podem permanecer ainda alguns problemas relacionados com a dificuldade na aplicação e compreensão da primeira parte do cálculo, a ACP, e com a possibilidade da existência de colinearidade entre as concentrações dos constituintes.

2.6.3 – Mínimos quadrados parciais

O método dos mínimos quadrados parciais (MQP) resultou da evolução do método de RCP [57,58]. Assim, no método de MQP, após a determinação do número de factores (*nf*) que provocam variações linearmente independentes nas duas matrizes **A** e **C**, estas são decompostas em duas mais simples. Esta solução pode ser representada como,

$$\mathbf{A}^{\mathrm{T}} = \mathbf{S}\,\mathbf{F}_{\mathrm{a}} \tag{2.81.a}$$

$$\mathbf{C}^{\mathrm{T}} = \mathbf{U}\,\mathbf{F}_{\mathrm{c}} \tag{2.81.b}$$

em que **S** e **U** (*ns* linhas × *nf* colunas) representam as matrizes dos "scores" e $\mathbf{F}_{\mathrm{a}}$ (*nf* linhas × $n\lambda$ colunas) e $\mathbf{F}_{\mathrm{c}}$ (*nf* linhas × *nc* colunas) as matrizes dos factores.

No entanto, neste modelo a decomposição das matrizes **A** e **C** não é independente, mas sim conjunta, decorrendo simultaneamente a construção do modelo de calibração e a decomposição das matrizes **S** e **U** (neste processo é usado um método iterativo derivado do algoritmo NIPALS [59]). A Fig. 2.5 apresenta de forma esquemática o processo de decomposição dos MQP.

A selecção do número de factores a utilizar é determinante para uma boa aplicação do modelo dos MQP. De facto, para além do sinal analítico provocado pelos constituintes com interesse, os dados experimentais contêm sempre ruído. As técnicas de decomposição das matrizes de dados experimentais baseadas em operações matemáticas têm a vantagem de poder eliminar algum desse ruído ignorando parte dos factores, ou seja, os factores secundários. Assim, no desenvolvimento de modelos de calibração, a determinação do número de factores principais a reter pode ser efectuada

usando diversas funções, como por exemplo a PRESS (**P**rediction **R**esidual **E**rror **S**um of **S**quares),

$$\mathrm{PRESS} = \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{m}\left(\mathbf{Cp}_{i,j} - \mathbf{C}_{i,j}\right)^2 \qquad (2.82)$$

onde n representa o número de amostras do conjunto de calibração, m o número de constituintes, **Cp** a matriz das concentrações previstas e **C** a matriz das concentrações conhecidas.

De uma maneira geral, os modelos de calibração baseados em MQP são mais robustos dos que os modelos obtidos com outras técnicas de calibração, o que resulta fundamentalmente do facto dos vectores calculados durante a decomposição se encontrarem relacionados directamente com os constituintes com interesse na análise química [57,58].

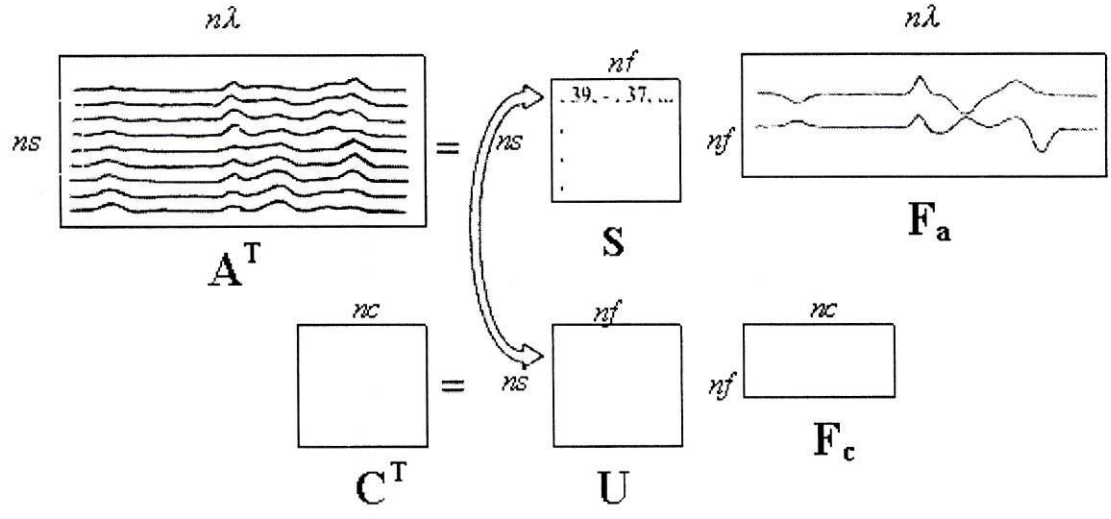


Figura 2.5 – Processo de decomposição dos MQP (ver no texto a definição das matrizes e coeficientes) [60].

Existem duas versões dos MQP, os MQP1 e os MQP2. Nos MQP2, o modelo de calibração é desenvolvido com todos os constituintes em simultâneo. Deste modo, os vectores assim calculados não são optimizados individualmente para cada constituinte, o que pode sacrificar alguma exactidão na previsão das concentrações. Por exemplo, se um conjunto de calibração contiver um constituinte numa gama de concentração relativamente elevada e outro constituinte numa gama de concentração relativamente pequena, poderão surgir problemas no calculo da concentração do constituinte minoritário. Pelo contrário, nos MQP1 o modelo de calibração é desenvolvido separadamente para cada constituinte, calculando-se e optimizando-se um conjunto diferente de vectores de "scores" e factores para cada um, pelo que se conseguem melhores resultados em situações mais complexas do ponto de vista de análise química. Assim, a desvantagem dos MQP1 relativamente aos MQP2 é o maior tempo gasto no cálculo.

2.7 – ESTUDOS DE SOLUBILIDADE

2.7.1 – Modelação das interacções entre as SH e a atrazina

As interacções entre as SH e a atrazina (AT) podem tomar a forma de um equilíbrio de partição entre a solução aquosa e as secções apolares das SH, de que resulta um aumento da solubilidade da AT em solução, uma vez que $[AT]_{Total} = [AT]_{Livre} + [AT]_{ligada\ a\ SH}$. Desta forma, este efeito pode ser descrito pela eq. 2.83 [61], onde S_W^* representa a solubilidade aparente numa solução contendo SH, [SH] a concentração de SH, S_W a solubilidade da atrazina em água pura e C_0 a massa de atrazina repartida numa unidade de massa de matéria orgânica:

$$S_W^* = S_W + [SH] \times C_0 \tag{2.83}$$

A quantidade C_0 pode ser relacionada com S_W através do coeficiente de partição da atrazina entre as SH e a água pura (K_{SH}):

$$K_{SH} = \frac{C_0}{S_W} \tag{2.84}$$

Por combinação das eqs. 2.83 e 2.84 temos,

$$S_W^* = S_W(1+[SH]\times K_{SH}) \tag{2.85}$$

O valor de K_{SH} é característico de cada amostra de SH. No entanto, se o coeficiente de partição for apresentado em função da concentração de carbono orgânico dissolvido (doc) e não em função da concentração de SH, será mais fácil efectuar comparações com valores existentes na literatura relativos a outras amostras. Desta forma, a eq. 2.85 pode ser reescrita como

$$S_W^* = S_W(1+[doc]\times K_{doc}) \Leftrightarrow \frac{S_W^*}{S_W} = 1+[doc]\times K_{doc} \tag{2.86}$$

onde K_{doc}, que representa a constante de partição determinada com base no conteúdo de carbono orgânico, pode ser calculado a partir do K_{SH} de acordo com a seguinte relação:

$$K_{SH} = \frac{\%C}{100}\times K_{doc} \tag{2.87}$$

A análise da eq. 2.86 mostra que a solubilidade aparente será tanto maior quanto mais elevado for o valor de ([doc] × K_{doc}), o que pode ser controlado experimentalmente através do valor da concentração de SH. Por outro lado, o coeficiente de partição (K_{doc}) depende da amostra de SH e também do soluto em estudo, e pode ser determinado por representação de $\frac{S_W^*}{S_W}$ em função de [doc], obtendo-se uma recta com declive (K_{doc}) e ordenada na origem 1.

2.7.2 – Efeito dos sais inorgânicos na solubilidade da AT

A solubilização da AT em água pode ser representada pela equação química seguinte:

$$AT\ (s) \Leftrightarrow AT\ (aq) \tag{2.88}$$

com uma constante de equilíbrio termodinâmica K_s definida pela seguinte equação:

$$K_S = a_{AT}(aq) = S_W \tag{2.89}$$

onde $a_{AT}(aq)$ representa a actividade da AT em água.

No entanto, a solubilidade da AT em solução aquosa pode ser alterada pela presença de sais inorgânicos em solução. Assim,

$$a_{AT}(aq) = [AT](aq) \times \gamma_{AT}(aq) \tag{2.90}$$

em que $\gamma_{AT}(aq)$ representa o coeficiente de actividade da AT.

Atendendo à eq. 2.90, a eq. 2.89 pode ser reescrita como

$$K_S = [AT](aq) \times \gamma_{AT}(aq) = S_W^* \times \gamma_{AT}(aq) \tag{2.91}$$

Comparando as eqs. 2.89 e 2.91 e atendendo aos coeficientes de actividade resultantes da presença de um sal iónico em solução, γ_+ e γ_- (a AT não contribui para a força iónica (I) da solução, portanto $\gamma_{AT} = 1$), vem

$$S_W = (\gamma_\pm) \times S_W^* \tag{2.92}$$

ou

$$\frac{S_W}{S_W^*} = \gamma_\pm \tag{2.93}$$

onde $\gamma_\pm$ é o coeficiente de actividade médio do sal iónico que contribui para a força iónica da solução.

Sabendo que a lei limite de Debye-Hückel [62] tem a forma,

$$\mathrm{Log}(\gamma_\pm) = -0{,}509|z_+ z_-|\sqrt{I} \tag{2.94}$$

onde z_+ e z_- são as cargas dos iões do sal iónico, pode aplicar-se logaritmos a ambos os membros da eq. 2.93 e substituir-se $\mathrm{Log}(\gamma_\pm)$ pelo seu valor na eq. 2.94, obtendo-se

$$\mathrm{Log}\left(\frac{S_W^*}{S_W}\right) = 0{,}509|z_+ z_-|\sqrt{I} \qquad (2.95)$$

A análise desta equação permite verificar que um acréscimo de força iónica induz um aumento na solubilidade aparente [63], pelo que se designa este efeito de "salting-in".

Se a força iónica atingir valores elevados, a lei limite de Debye-Hückel deixa de ser válida e a eq. 2.95 será substituída pela eq. 2.96 [63]:

$$\mathrm{Log}\left(\frac{S_W^*}{S_W}\right) = -K' \times I \qquad (2.96)$$

onde K' é uma constante positiva, apresentando um valor tanto mais elevado quanto maior for a molécula de soluto. Esta equação mostra que ocorre uma diminuição de solubilidade a forças iónicas elevadas, pelo que se denomina este efeito de "salting-out" [63].

Combinando as eqs. 2.95 e 2.96, obtém-se uma equação geral que relaciona a solubilidade de uma substância orgânica hidrofóbica com a força iónica [63]:

$$\mathrm{Log}\left(\frac{S_W^*}{S_W}\right) = 0{,}509|z_+ z_-|\sqrt{I} - K' \times I \qquad (2.97)$$

A análise desta equação mostra que para valores relativamente baixos de força iónica a solubilidade aumenta com o incremento da força iónica, invertendo-se esta tendência a valores de I elevados.

2.8 – BIBLIOGRAFIA

[1] J. T. G. Overbeek, *Pure & Appl. Chem.*, 1976, **46**, 91-101.

[2] P. C. Hiemenz, *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, Marcel Dekker, Nova York, 1986, Cap. 8.

[3] J. Buffle, *Natural Organic Matter and Metal-Organic Interactions in Aquatic Systems*, H. Siegel (Ed.), em Metal Ions in Biological Systems, Marcel Dekker, Nova York, 1984, Vol. 18.

[4] M. A. G. T. Van Der Hoop, H. P. Van Leeuwen e R. F. M. J. Cleven, *Anal. Chim. Acta*, 1990, **232**, 141-148.

[5] H. P. Van Leeuwen, R. F. M. J. Cleven e P. Valenta, *Pure & Appl. Chem.*, 1991, **63**, 1251-1268.

[6] F. Rey, M. Pérez-Asenjo, A. A. S. C. Machado, P. Facal, M. A. Ferreira e A. Toja, *Talanta*, 1995, **42**, 1919-1923.

[7] F. Rey, A. A. S. C. Machado, F. Arce, M. A. Ferreira e A. Troja, *Anal. Chim. Acta*, 1995, **304**, 375-379.

[8] J. A. Marinsky e J. Ephraim, *Environ. Sci. Technol.*, 1986, **20**, 349-354.

[9] J. Ephraim, S. Alegret, A. Mathuthu, M. Bicking, R. L. Malcolm e J. A. Marinsky, *Environ. Sci. Technol.*, 1986, **20**, 354-366.

[10] J. Ephraim e J. A. Marinsky, *Environ. Sci. Technol.*, 1986, **20**, 367-376.

[11] G. S. Manning, *J. Phys. Chem.*, 1975, **79**, 262-265.

[12] F. Rey, M. Pérez-Asenjo, A. A. S. C. Machado, P. Facal e M. A. Ferreira, *J. Electroanal. Chem.*, 1997, **431**, 77-79.

[13] F. J. Stevenson, Humus Chemistry – Genesis, Composition and Reactions, Wiley, Nova York, 1992, Cap. 12.

[14] Paul C. Hiemenz, Principles of Colloid and Surface Chemistry, Marcel Dekker, Nova York, 1986, pág. 42-45.

[15] Edward G. Malawer, *Introduction to Size Exclusion Chromatography*, C. Wu (Ed.), em Handbook of Size Exclusion Chromatography, Marcel Dekker, Nova York, 1995, Cap. 1.

[16] Sandy Lindsay, High Performance Liquid Chromatography: Analytical Chemistry by Open Learning, Wiley, Nova York, 1987, pág. 125-130.

[17] W. Windig, *A Simple-to-Use Method of Interactive Self-Modeling Mixture Analysis*, P. C. Jurs (Ed.), em Computer-Enhanced Analytical Spectroscopy, Vol. 3, Plenum, 1982, Cap. 4

[18] W. Windig e J. Guilment, *Anal. Chem.*, 1991, **63**, 1425-1432.

[19] W. Windig, C. E. Heckler, F. A. Agblevor e R. J. Evans, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 1992, **14**, 195-207.

[20] J. C. G. Esteves da Silva, *Acid-base and metal ion complexation properties of humic substances studied by chemometric analysis of spectroscopic-potenciometric hyphenated data*, Tese de Doutoramento, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto, 1994.

[21] C. J. Santos Oliveira, *Estudo da complexação de ácidos fúlvicos com UO_2^{2+} e Fe(III) por fluorescência molecular e das propriedades de ácido-base de compostos modelo de ácidos fúlvicos por FTIR*, Tese de Mestrado, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto, 1997.

[22] J. R. Lackowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum, 1983, Cap. 9.

[23] S. S. Leher, *Biochemistry*, 1971, **10**, 3254-3263.

[24] E. R. Carraway, J. N. Demas e B. A. DeGraft, *Anal. Chem.*, 1991, **63**, 332-336.

[25] L. K. Fraiji, D. M. Hayes e T. C. Werner, *J. Chem. Educ.*, 1992, **69**, 424-428.

[26] D. K. Ryan e J. H. Weber, *Anal. Chem.*, 1982, **54**, 986-990.

[27] D. K. Ryan e J. H. Weber, *Environ. Sci. Technol.*, 1982, **16**, 866-872.

[28] J. C. G. Esteves da Silva, *Utilidade de misturas sintéticas e de modelos computacionais no estudo de equilíbrios de ácido-base e de complexação de ácidos fúlvicos por potenciometria*, Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto, 1988.

[29] G. Scatchard, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1949, **51**, 660-672.

[30] F. J. Stevenson, Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions, Wiley, Nova York, 1982, Cap. 15.

[31] J. Buffle, Complexation Reactions in Aquatic Systems: An Analytical Aproach, Wiley, 1988, Cap. 5.

[32] M. S. Shuman, B. J. Collins, P. J. Fitzgerald e D. L. Olson, *Distribution of Stability Constants and Dissociation Rate Constants among Binding Sites on Estuarine Copper-Organic Complexes: Rotated Disk Electrode Studies and an Affinity Spectrum Analysis of Ion-Selective Electrode and Photometric Data*, R. F. Chtistman e E. T. Gjessing (Eds.), em Aquatic and Terrestrial Humic Materials, Ann Harbour Science, Michigan, 1983, Cap. 17.

[33] R. F. Mantoura e J. P. Riley, *Anal. Chim. Acta*, 1975, **78**, 193-200.

[34] W. T. Bresnahan, C. L. Grant e J. H. Weber, *Anal. Chem.*, 1978, **50**, 1675-1679.

[35] R. D. Guy e C. L. Chakrabarti, *Can. J. Chem.*, 1976, **54**, 2600-2611.

[36] J. R. Tuschall Jr. e P. L. Brezonik, *Anal. Chim. Acta*, 1983, **149**, 47-58.

[37] E. M. Logan, I. D. Pulford, G. T. Cook e A. B. Mackenzie, *European J. Soil Sci.*, 1997, **48**, 685-696.

[38] J. C. G. Esteves da Silva e A. A. S. C. Machado, *Anal. Letters*, 1995, **28**, 2401-2411.

[39] J. C. G. Esteves da Silva, A. A. S. C. Machado e M. A. B. A. Silva, *Wat. Res.*, 1998, **32**, 441-449.

[40] C. M. Mendel, V. Licko e J. P. Kane, *J. Biol. Chem.*, 1985, **260**, 3451-3455.

[41] C. M. G. van den Berg e J. R. Kramer, *Anal. Chim. Acta*, 1979, **106**, 113-120.

[42] I. Ruzic, *Anal. Chim. Acta*, 1982, **140**, 99-113.

[43] M. Lucia A. M. Campos e C. M. G. van den Berg, *Anal. Chim. Acta*, 1994, **284**, 481-496.

[44] N. J. Turoczy e J. E. Sherwood, *Anal. Chim. Acta*, 1997, **354**, 15-21.

[45] J. Buffle, F. Greter e W. Haerdi, *Anal. Chem.*, 1977, **49**, 216-222.

[46] J. Buffle, *Anal. Chim. Acta*, 1980, **118**, 29-44.

[47] R. A. Harshman e M. E. Lundy, *The PARAFAC Model for Three-Way Factor Analysis and Multidimensional Scaling*, H.C. Law, C.W. Snider, Jr., J.A. Hattie e R.P. McDonald (Eds.), em Research Methods for Multimode Data Analysis, Praeger Publishers, Nova York, 1984, pág. 122-215.

[48] C. H. Langford, *Humic and Hydrous Oxide Ligands in Soil and Natural Water – Metal-Ion Complexation*, G. B. Kauffman (Ed.), em Coordination Chemistry – A Century of Progress, ACS Symposium Series 565, Washington DC, 1994, Cap. 33.

[49] D. L. Olson e M. S. Shuman, *Anal. Chem.*, 1983, **55**, 1103-1107.

[50] C. H. Langford e D. W. Gutzman, *Anal. Chim. Acta*, 1992, **256**, 183-201.

[51] D. W. Gutzman e C. H. Langford, *Environ. Sci. Technol.*, 1993, **27**, 1388-1393.

[52] C. H. Langford e R. L. Cook, *Analyst*, 1995, **120**, 591-596.

[53] J. Zupan e J. Gasteigner, Neural Networks for Chemistry, VCH, Weinheim, 1993.

[54] D. M. Haaland e R. G. Easterlin, *Appl. Spectrosc.*, 1980, **34**, 539-548.

[55] P. M. Fredericks, J. B. Lee, P. R. Osborn e D. A. J. Swinkels, *Appl. Spectrosc.*, 1985, **39**, 303-310.

[56] E. H. Malinowski e D. G. Howery, Factor Analysis in Chemistry, Wiley, Nova York, 1980.

[57] F. N. Villoslada, L. V. P. Arribas, M. E. L. González e L. M. P. Díez, *Anal. Chim. Acta*, 1995, **313**, 93-101.

[58] P. F. Seelig e H. N. Blount, *Anal. Chem.*, 1979, **51**, 327-337.

[59] Y. Miyashita, T. Itozawa, H. Katsumi e S. Sasaki, *J. Chemometrics*, 1990, **4**, 97-100.

[60] PLS plus/IQ for GRAMS/32, Galactic Industries Coorporation, USA, 1996.

[61] C. T. Chiou, R. L. Malcolm, T. I. Brinton e D. E. Kile, *Environ. Sci. Technol.*, 1986, **20**, 502-508.

[62] P. W. Atkins, Physical Chemistry, Oxford University Press, Oxford, 1990, Cap. 10.

[63] R. Chang, Physical Chemistry with Applications to Biological Systems, MacMillan Publishing Co, Inc., Nova York, 1981, Cap. 9.

3 – SECÇÃO EXPERIMENTAL

3.1 – ORIGEM DAS AMOSTRAS ESTUDADAS

Os estudos foram efectuados sobre quatro amostras de AF, duas de origem natural, AFS e AFLau, e duas de origem antropogénica, AFLC e AFRAC, cuja origem e materiais de base se encontram indicados na Tabela 3.1. Também se realizaram estudos com AF extraídos de misturas de solo natural com materiais compostados. À excepção da amostra AFLau que tem origem comercial, as amostras de AF foram extraídas usando o método de extracção recomendado pela IHSS (International Humic Substances Society) [1].

3.2 – REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados neste trabalho são de qualidade p.a., à excepção do ácido cafeico (no qual predomina o isómero trans) que apresenta um grau de pureza superior a 99 %. Salvo quando indicado o contrário, todas as soluções foram preparadas com água desionizada utilizando material de vidro de classe A. As particularidades de cada solução encontram-se descritas com maior pormenor em cada capítulo.

Prepararam-se as seguintes soluções para uso geral:

- Soluções de AF: prepararam-se soluções de AF por pesagem, dissolução e diluição rigorosas em água desionizada, ajustando-se o seu pH, quando necessário, por adição de KOH ou HNO_3.
- Ácido nítrico 0,1000 M: preparou-se uma solução padrão de ácido nítrico 0,1000 M em água desionizada por diluição rigorosa a um litro de uma ampola Titrisol (Merck).
- Hidróxido de potássio 0,05 M: as soluções de hidróxido de potássio de concentração aproximada 0,05 M foram preparadas e descarbonatadas segundo o processo descrito em [2]. As soluções previamente descarbonatadas foram mantidas sob atmosfera inerte de azoto.
- Soluções tampão de fosfato (pH 6,784) e ftalato (pH 3,883), com I = 0,1 M: as soluções tampão de fosfato e ftalato para calibração dos eléctrodos de medição do pH foram preparadas segundo o procedimento descrito em [4].

Tabela 3.1 – Origem e materiais de base das amostras de AF estudadas.

Designação da amostra	Material de origem
AF naturais	
AFS	Horizonte 10-25 cm de um solo de pinhal
AFLau	Origem comercial – "Laurentian fulvic acids", comercializado sob o nome de Fredriks.
AF antropogénicos	
AFLC	Composto proveniente de lamas de ETAR da fábrica de compostagem da ETAR de Parada (Maia), comercializado sob o nome de Agronat.
AFRAC	Composto de resíduos vegetais e de animais domésticos, proveniente da Húmica (Setúbal), comercializado sob o nome de Sansão.
AF extraídos de misturas de solo de pinhal com lamas compostadas	
AFMSLC(0)	Mistura [a] de solo natural com lamas de ETAR compostadas, no instante da mistura destes.
AFMSLC(6)	Mistura [a] de solo natural com lamas de ETAR compostadas, 6 meses após a mistura.
AF extraídos de misturas de solo de pinhal com resíduos animais compostados	
AFMSRAC(0)	Mistura [a] de solo natural com resíduos animais compostados, no instante da mistura destes.
AFMSRAC(6)	Mistura [a] de solo natural com resíduos animais compostados, 6 meses após a mistura.

a – Mistura de solo/materiais compostados na proporção volumétrica de 3/2.

3.3 – EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

3.3.1 – Medições condutimétricas

A análise da condutividade das soluções de AF e de surfactantes foi efectuada com um condutímetro da marca Crison, modelo GLP 31, provido de um sensor de temperatura. O condutímetro foi calibrado com o auxílio de duas soluções de KCl de concentrações 0,0100 M (κ = 1413 μS/cm a 25 °C) e 0,100M (κ = 12,88 mS/cm a 25 °C). As análises foram efectuadas numa célula de titulação termostatizada a 25 °C e com agitação, na qual se introduziram as soluções a medir e se colocaram sob atmosfera inerte de azoto. Após cada adição de titulante, efectuou-se a leitura dos valores da condutividade das soluções depois de algum tempo de estabilização.

3.3.2 – Medições de fluorescência

As medições de fluorescência síncrona foram executadas com um espectrofotómetro de luminescência da marca Perkin-Elmer, modelo LS-50, provido de uma célula de fluxo. Os espectros foram obtidos com os parâmetros experimentais indicados na Tabela 3.2. Depois da subtracção do espectro da solução de referência (solução de nitrato de potássio 0,1 M), os espectros a usar nos cálculos foram convertidos para ASCII com o programa Lab Calc (Galactic Industries Co., U.S.A.) e reduzidos para uma versão de 57 pontos, com 5 nm de resolução.

3.3.3 – Medições de UV-Vis

À excepção do detector de UV-Vis colocado no sistema de cromatografia por exclusão por tamanhos, todas as medições simples de UV-Vis foram efectuadas com um espectrofotómetro de feixe simples com detector de fila de díodos da marca Hewlett-Packard, modelo HP8452A, equipado com uma célula de quartzo de percurso óptico 1 cm. Os espectros foram obtidos de 2 em 2 nm, com um tempo de integração de 0,5 s.

Nos estudos de solubilidade dos herbicidas, os espectros foram adquiridos entre os 190 e os 800 nm, efectuando-se um corte a 242 nm. Nos estudos sobre a determinação simultânea da atrazina e dos seus metabolitos, os espectros foram obtidos

Tabela 3.2 – Parâmetros experimentais utilizados nos espectros síncronos de fluorescência.

comprimento de onda de excitação (nm)	260 a 550
abertura do monocromador de emissão (nm)	7,5
abertura do monocromador de excitação (nm)	7,5
velocidade de varrimento (nm/min)	200
intervalo de digitalização (nm)	0,5
$\Delta\lambda$ (nm)	25

entre os 190 e os 400 nm, utilizando-se nos cálculos toda a gama dos espectros. Os espectros relativos aos estudos cinético-espectrofotométricos foram efectuados com o sistema já descrito, com as características instrumentais de aquisição indicadas na Tabela 3.3.

As medições de UV-Vis à saída da coluna cromatográfica do sistema de cromatografia de exclusão por tamanhos foram efectuadas com um detector de UV-Vis com fila de díodos da marca Ati Unicam, modelo Crystal 250. As características de aquisição destes espectros encontram-se indicadas na Tabela 3.3.

3.3.4 – Medições potenciométricas

Neste trabalho utilizaram-se dois sistemas potenciométricos de titulação. Na titulação de misturas de AF e catião Cu(II) com base forte utilizou-se um sistema de titulação automático controlado por PC, constituído por um pHmetro Crison MicropH 2002 e uma microbureta Crison MicroBu 2031, um eléctrodo de vidro da marca Metler Toledo, modelo U262-S7/120 e um eléctrodo de referência saturado, de junção dupla, da marca Ingold, modelo 373-90-WTE-ISE-S7/105-120. As titulações potenciométricas

Tabela 3.3 – Características dos espectros de UV-Vis adquiridos ao longo do tempo.

Experiências cinético-espectrofotométricas de misturas de catiões		
Gama de comprimentos de onda (nm)	332 - 580	
Resolução (nm)	2	
Tempo de integração (s)	0,2	
Período de tempo entre dois espectros (s)	0,5	
Duração da experiência (s)	60	
Experiências cinético-espectrofotométricas de descomplexação de catiões metálicos de amostras de AF [a]		
Gama de comprimentos de onda (nm)	500 - 520	
Resolução (nm)	2	
Tempo de integração (s)	0,3	
Período de tempo entre dois espectros (s)	Ni(II)	1° conjunto – 1,5 2° conjunto – 50
	Cu(II)	1° conjunto – 1,0 2° conjunto – 15
Duração da experiência (s)	1° conjunto – 300; 2° conjunto – 1800	
Detector colocado no sistema de HP-SEC		
Comprimento de onda (nm)	200 a 704	
Tempo de aquisição (min)	cerca de 45	
Frequência de aquisição (s) [b]	cerca de 3	

a – Para reduzir a dimensão das matrizes de dados e as dificuldades de manuseamento, a aquisição dos dados relativos às experiências cinético-espectrofotométricas de descomplexação de catiões metálicos de amostras de AF foi efectuada em dois conjuntos diferentes, com características instrumentais de aquisição distintas. A aquisição dos dados relativos ao 2° conjunto iniciou-se após o armazenamento dos dados referentes ao 1° conjunto, e depois da alteração das condições instrumentais de aquisição de dados.

b – Parâmetro ajustado automaticamente pelo detector tendo em conta o tempo de aquisição dos espectros e a gama de comprimentos de onda seleccionada.

de catiões metálicos a pH constante foram efectuadas com o sistema de titulação descrito anteriormente, tendo-se utilizado adicionalmente eléctrodos selectivos aos iões Cu(II), Pb(II) e Cd(II) da marca Orion, modelos 9429, 9482 e 9448, respectivamente, e um segundo pHmetro Crison MicropH 2002.

3.3.5 – Separações cromatográficas

As separações cromatográficas foram efectuadas num sistema de HPLC constituído por uma bomba isocrática da marca Hewlett Packard, modelo HP1100, uma válvula de injecção manual da marca Rheodyne, modelo 7752i, uma pré-coluna TSK Gel da marca Tosohaas, uma coluna TSK Gel também da marca Tosohaas, referência G2000 SWXL, e um detector de UV-Vis com fila de díodos da marca Ati Unicam, modelo Crystal 250. Na Fig. 3.1 apresenta-se um esboço da montagem utilizada.

3.3.6 – Medições de RMN

Os espectros de RMN de ^{13}C das amostras de AF foram efectuados no Departamento de Química da Faculdade de Valladolid (Espanha) utilizando um espectrofotómetro da marca Bruker, modelo AC 300, com uma frequência de 75 MHz para o carbono. Como referência interna foi usado TSP (3-trimetilsililpropionato-2,2,3,3-d^4 de sódio), com posição a -2,6 ppm. Foram utilizados como solventes água deuterada e solução de NaOD em D_2O.

3.3.7 – Centrifugação

Nas experiências de extracção sólido-líquido onde não foi possível pipetar o volume necessário de líquido por os sólidos não se encontrarem completamente depositados, efectuaram-se centrifugações com uma centrifugadora da marca Alresa, modelo Didacen II.

3.3.8 – Banho termostático com agitação

Quando necessário, as soluções foram agitadas a 125 rpm e a 25 °C num banho termostático com agitação da marca Gfl, modelo 1086.

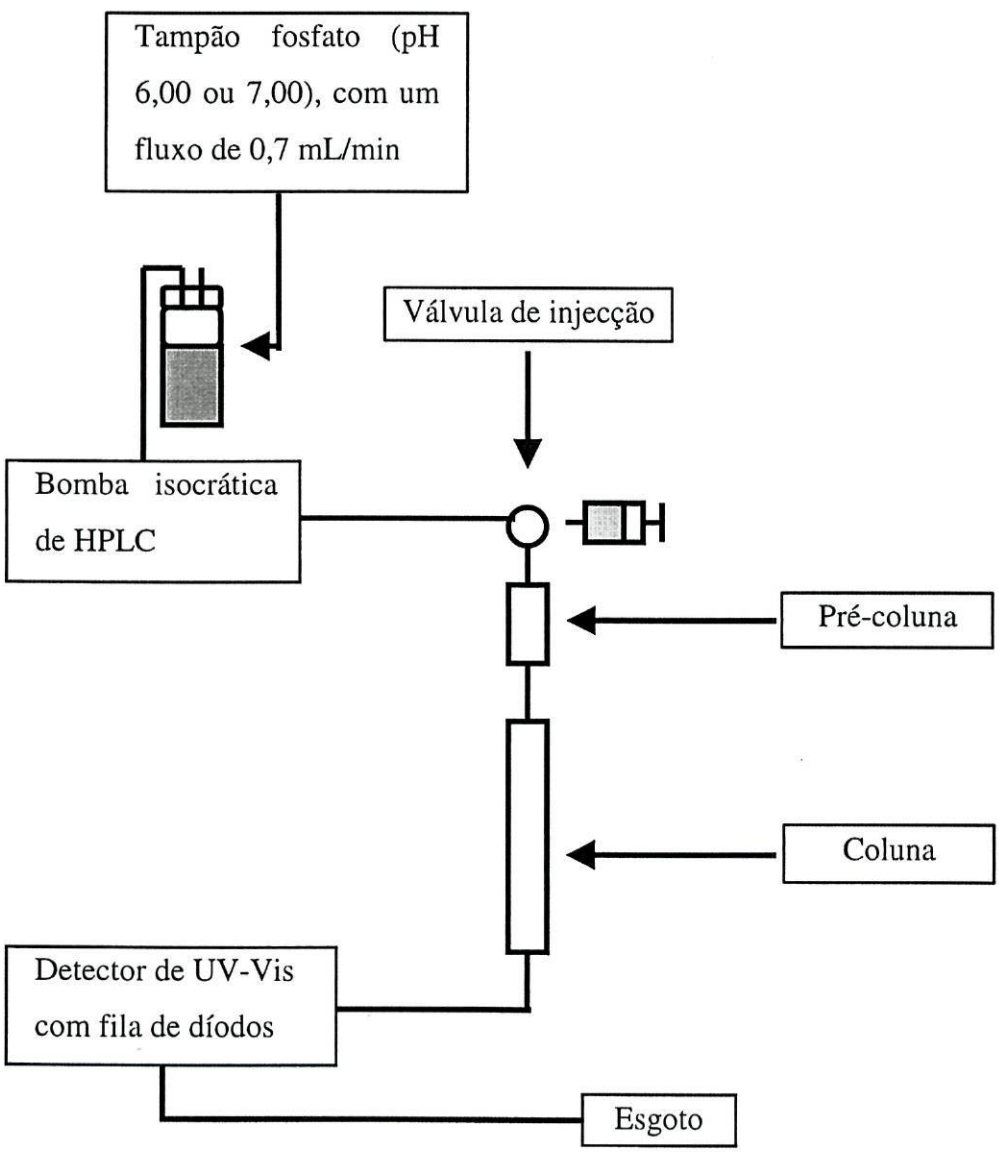


Figura 3.1 – Esquema do sistema de HP-SEC utilizado.

3.4 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.4.1 – Estudos condutimétricos

3.4.1.1 – Medições condutimétricas simples

Os estudos condutimétricos das soluções de surfactantes e de AF foram efectuados numa célula de titulação termostatizada a 25 °C e com agitação, na qual se introduziu o volume necessário de água desionizada e se colocou sob atmosfera inerte de azoto. Após cada adição de solução de surfactante ou de AF, efectuou-se a leitura dos valores da condutividade da solução resultante depois de algum tempo de estabilização, que seguiu valores típicos na ordem dos 10 a 20 segundos. O condutímetro foi previamente calibrado com o auxílio de duas soluções de KCl de concentrações 0,0100 M (κ = 1413 μS cm^{-1} a 25 °C) e 0,100 M (κ = 12,88 mS cm^{-1} a 25 °C).

3.4.1.2 – Titulações condutimétricas

Prepararam-se soluções aquosas de AF de concentração 100 mg/L em água desionizada. As titulações foram realizadas colocando-se 10,00 mL de solução de AF numa célula de titulação, termostatizada a 25 °C e com agitação. Efectuou-se a determinação dos valores de condutividade de cada solução de AF após pequenas adições (3 a 5 μL) de titulante (KOH, NaOH ou LiOH), a que se seguiram novas medições de condutividade, repetindo-se o processo até ao termo da titulação. As soluções de titulante foram previamente doseadas com HNO_3 para determinação da sua concentração.

3.4.2 – Medições de fluorescência

Os conjuntos de espectros de fluorescência foram obtidos por titulação de soluções de AF com soluções do catião Cu(II), a valores de pH fixos (3,0, 4,0, 5,0 e 6,0). As titulações seguiram a seguinte sequência experimental: (i) adição de 20,00 mL de solução de AF para a cuba de titulação e ajuste do pH ao valor pretendido com ácido ou base forte; (ii) adição de um pequeno volume de solução de catião metálico (0,002 a

0,050 mL); (iii) ajuste do pH ao valor pretendido; e (iv) obtenção do espectro de fluorescência síncrona, depois de cerca de 4 minutos de estabilização. Durante a leitura do pH e do registo dos espectros, a bomba de fluxo foi desligada. Todas as experiências foram executadas sob atmosfera inerte de azoto.

3.4.3 – Medições de UV-Vis

As medições de UV-Vis foram efectuadas utilizando o solvente como solução de referencia (branco).

3.4.4 – Medições potenciométricas

3.4.4.1 – Titulação de misturas de AF e catião Cu(II) com base forte

Na determinação do número total de sítios ligantes efectuaram-se titulações com base forte de misturas de AF e catião Cu(II) em diferentes proporções, nas quais a concentração de AF se manteve sempre constante (100 mg/L em água desionizada) e a concentração de catião Cu(II) foi sendo aumentada progressivamente desde zero até cerca de 0,7 mM. Para efectuar as titulações colocaram-se 10,00 mL de solução de AF numa célula de titulação, termostatizada a 25 °C, com agitação e sob atmosfera inerte de azoto, efectuando-se a adição de base forte de forma a variar o pH da solução resultante desde valores ácidos no início da titulação até valores fortemente alcalinos no final desta. As titulações foram interrompidas na altura em que a adição de base forte deixou de provocar variações significativas no pH da solução resultante.

3.4.4.2 – Interacção de catiões metálicos com amostras de AF

Para efectuar as titulações colocaram-se 20,00 mL de solução de AF numa célula de titulação, termostatizada a 25 °C, com agitação e sob atmosfera inerte de azoto. Após o ajuste inicial do pH da solução a 6,0, a sequência de operações foi a seguinte: (i) adição de solução de catião metálico; (ii) verificação do pH e reajuste se necessário com uma solução de hidróxido de potássio descarbonatado; (iii) leitura da diferença de potencial registada pelos eléctrodos de pH e de catião metálico. A calibração dos eléctrodos sensíveis aos catiões metálicos foi realizada no final das

titulações, onde a concentração de catião metálico se encontrava em grande excesso relativamente à concentração de ligando.

3.4.4.3 – Calibração dos eléctrodos selectivos a catiões metálicos

De acordo com a equação de Nernst, $E = E_0 + S \times p[M^{n+}]$, a variação da concentração de catião metálico traduz-se num aumento proporcional no potencial do eléctrodo. No entanto, esta equação apenas pode ser aplicada sem cuidados adicionais em sistemas simples e completamente caracterizados, como são as soluções aquosas contendo apenas o catião metálico a ser estudado. Nestas situações (ver o exemplo da Fig. 3.2), a representação dos valores de E em função de $[M^{n+}]$ origina rectas com excelentes coeficientes de correlação, da ordem dos 0,9999. Por outro lado, quando se efectuam estudos sobre sistemas não completamente conhecidos como é o caso das soluções de AF, podem surgir outros fenómenos, como a complexação dos AF com catiões presentes à superfície da membrana sólida do eléctrodo, o que pode originar

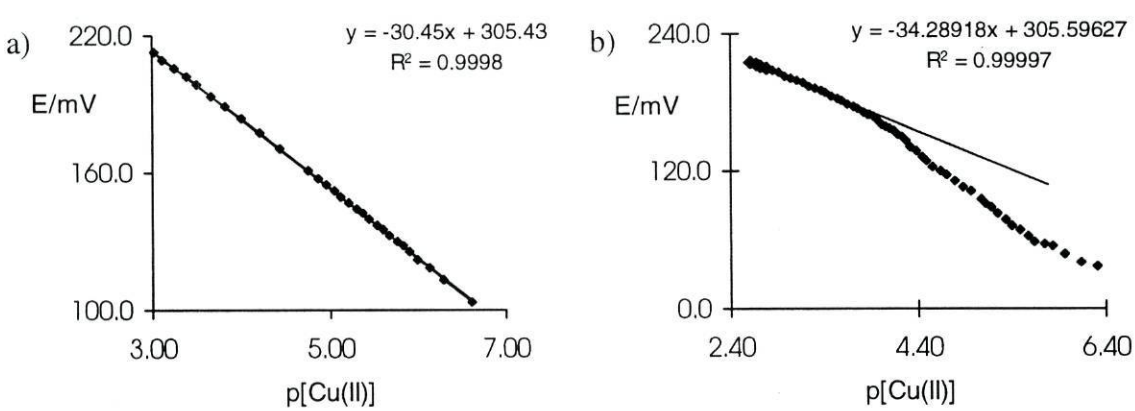


Figura 3.2 – Exemplos típicos de calibrações do eléctrodo sensível a Cu(II) em duas matrizes distintas: a) solução em electrólito inerte de KNO_3 0,1 M; b) solução de AFLau 25 mg/L. Na Fig. 3.2.b representa-se a recta através da qual se efectuou a calibração do eléctrodo, que foi ajustada aos últimos pontos da experiência.

potenciais de eléctrodo inferiores ao próprio branco e assim inviabilizar uma calibração efectuada em água ou numa outra matriz diferente da própria amostra. Para se contornar este problema, e dada a inexistência de matrizes de soluções de AF sobre as quais se possam efectuar as calibrações dos eléctrodos, torna-se necessária a realização dessas calibrações sobre a própria amostra em estudo.

No decorrer das titulações potenciométricas de catiões metálicos em soluções de AF, numa primeira parte da experiência detectaram-se encurvamentos mais ou menos nítidos na representação do potencial do eléctrodo em função da concentração total de catião metálico adicionado. Este desvio à linearidade deve-se ao facto dos eléctrodos serem sensíveis à presença de catião metálico livre e não detectarem o catião metálico que possa estar complexado com os AF, originando desta forma o encurvamento observado. No entanto, numa segunda parte da experiência o catião metálico adicionado encontra-se em grande excesso relativamente à capacidade de complexação dos ligandos, pelo que a sua concentração total em solução será aproximadamente igual à concentração livre, ou seja, à concentração medida pelo eléctrodo selectivo. Nestas condições, a representação do potencial do eléctrodo em função da concentração total de catião metálico adicionado adquire a forma de uma linha recta, com coeficientes de correlação da ordem dos 0,999. Esta última parte da titulação deve ser utilizada como calibração do eléctrodo.

3.4.5 – Separações cromatográficas

A execução experimental do trabalho seguiu os procedimentos esquematizados na Fig. 3.1. A fase inicial das experiências de HP-SEC consistiu no ajuste do fluxo da fase móvel para o valor de 0,7 mL min^{-1}, tendo o cuidado de eliminar quaisquer bolhas de ar contidas no sistema. Posteriormente, com o auxílio da válvula de injecção manual, efectuou-se a introdução no sistema da amostra preparada em tampão fosfato (pH 6,00 ou 7,00 [5]) e previamente filtrada, utilizando para o efeito um loop de 200 μL. No instante da injecção, iniciou-se também a aquisição dos espectros com as características indicadas na Tabela 3.4. Antes da sua utilização quer na preparação das soluções de AF quer como fase móvel, as soluções tampão foram previamente filtradas por vácuo com filtros de acetato de celulose. Todas as outras soluções foram filtradas antes da injecção no sistema de HP-SEC com o auxílio de filtros para seringa da marca Millipore, referência HV4, com tamanho de poro 0,45 μm.

Para efectuar os cortes nos espectros seleccionou-se o comprimento de onda 255 nm por este ser um comprimento de onda não selectivo, onde praticamente todas as moléculas absorvem. No entanto, no caso das amostras contendo atrazina ou os seus metabolitos, este corte foi efectuado a 220 nm, por ser esta a zona em que estes compostos apresentam o seu máximo de absorção.

As análises de reconhecimento de formas dos espectros correspondentes aos máximos dos picos cromatográficos foram efectuadas com o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, versão 6.1 para Windows), usando o método do centróide.

3.4.6 – Extracções sólido-líquido e líquido-líquido

Nos estudos de solubilidade da AT em água pura e em soluções aquosas de AF, introduziram-se 0,5 mL de solução 2000 ppm de herbicida preparado em etanol em conjuntos de três frascos de 25 mL, que foram deixados abertos para facilitar a evaporação do solvente. Após a evaporação total do etanol (ocorreu em cerca de 24 horas), adicionaram-se 7,00 mL de água desionizada, de solução de sal inorgânico ou de AF, deixando-se o conjunto em agitação constante durante 24 horas a uma temperatura controlada de 25 °C. Posteriormente, já em repouso e depois dos sólidos não solubilizados terem assentado no fundo dos frascos, transferiram-se 4,00 mL dessas soluções para outros frascos de igual capacidade, obtendo-se assim soluções aquosas saturadas em herbicida. Nos casos em que a deposição dos sólidos no fundo dos frascos não foi completa, efectuaram-se centrifugações após as quais se transferiram as quantidades pretendidas. Depois da obtenção das soluções aquosas saturadas em herbicida, adicionou-se a cada frasco 5,00 mL de clorofórmio com o objectivo de extrair os herbicidas para a fase orgânica. Após mais 24 horas de agitação a uma temperatura controlada de 25 °C, retirou-se parte da fase orgânica sobre a qual se efectuaram medições de absorvância a 242 nm.

Para determinar a concentração de atrazina dissolvida na fase aquosa, a absorvância das soluções foi comparada com a absorvância a 242 nm de um conjunto de padrões de atrazina preparados em clorofórmio. Para que a matriz dos padrões fosse semelhante à das amostras, estes foram preparados em 5,00 mL de clorofórmio aos quais se adicionaram 4,00 mL de água, colocando-se as soluções em agitação a 25 °C juntamente com as amostras.

3.4.7 – Estudos cinético-espectrofotométricos

3.4.7.1 – Estudos cinético-espectrofotométricos da descomplexação de catiões metálicos do PAR

Os estudos cinético-espectrofotométricos da descomplexação de catiões metálicos do PAR foram efectuados seguindo-se o seguinte procedimento: (i) introdução na célula de quartzo do espectrofotómetro de 3,00 mL da mistura constituída pelos catiões metálicos, PAR e tampão bórax (pH 9,50) [5], juntamente com uma barra magnética (Hewlett Packard, modelo 9301-1161) para facilitar a mistura de reagentes; (ii) injecção de 30 μL de solução diluída de EDTA, seguida do inicio da aquisição dos espectros de UV-Vis, de acordo com as condições indicadas na Tabela 3.3.

Os espectros obtidos, cada um deles constituído por 125 pontos, foram convertidos para o formato ASCII com um programa desenvolvido em Turbo Pascal (Borland, USA). Na construção das matrizes de dados atendeu-se apenas aos primeiros 49 espectros, não sendo considerados os 11 últimos de cada experiência para se reduzir a dimensão das matrizes de dados, uma vez que não existiam variações importantes na sua forma e intensidade. A decomposição por PARAFAC das matrizes foi efectuada com o programa TRILIN obtido de P. M. Kroonenberg (Departamento de Educação da Universidade de Leiden).

3.4.7.2 – Estudos cinético-espectrofotométricos da descomplexação de catiões metálicos dos AF

Prepararam-se conjuntos de soluções aquosas de misturas de AF 100 mg/L com diferentes concentrações dos catiões Ni(II) ou Cu(II). Estas misturas, após o ajuste do pH a 7,0 com ácido ou base forte e a tamponação da solução resultante com HCO_3^- 0,0500 M de forma a obter uma concentração final de HCO_3^- da ordem de 6×10^{-4} M, foram colocadas em agitação durante 24 horas e a 25 °C. O procedimento laboratorial adoptado foi o seguinte: (i) introdução na célula de quartzo do espectrofotómetro de 1,50 mL da solução contendo AF e catião metálico (com pH previamente ajustado a 7,0 e tamponado), juntamente com uma barra magnética; (ii) injecção de 1,00 mL de solução de PAR $5,3 \times 10^{-5}$ M (com pH igualmente ajustado a 7,0), seguida do imediato início da aquisição dos espectros de UV-Vis (com as condições indicadas na Tabela

3.3). Para cada amostra de AF efectuaram-se experiências com seis razões molares de [Catião metálico]/AF diferentes (1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7 e 1:10), ajustadas a uma concentração estimada de sítios ligantes dos AF de 0,25 mmol/g.

Os espectros obtidos foram convertidos para o formato ASCII, tendo-se utilizado no tratamento de dados um método baseado em transformadas de Laplace (ver Apêndice 2).

3.5 – BIBLIOGRAFIA

[1] E. M. Thurman, *Isolation of Soil and Aquatic Humic Substances (Group Report)*, F. H. Frimmel e R. F. Christman (Eds.), em Humic Substances and their Role in the Environment, Wiley, Nova York, 1988, pág. 31-43.

[2] J. C. G. Esteves da Silva, *Acid-base and metal ion complexation properties of humic substances studied by chemometric analysis of spectroscopic-potenciometric hyphenated data*, Tese de Doutoramento, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto, 1994.

[3] Z. Wang, D. S. Gamble e C. H. Langford, *Environ. Sci. Technol.*, 1992, **26**, 560-565.

[4] J. C. G. Esteves da Silva, *Utilidade de misturas sintéticas e de modelos computacionais no estudo de equilíbrios de ácido-base e de complexação de ácidos fúlvicos por potenciometria*, Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto, 1988.

[5] Handbook of Chemistry and Physics, David R. Lide (Ed.), CRC Pres, Inc., Florida, 70th Edition, 1989-90.

4 – CARACTERIZAÇÃO GERAL DAS AMOSTRAS DE AF

4.1 – INTRODUÇÃO

Neste capítulo pretendeu-se efectuar uma caracterização geral das amostras de AF utilizadas neste trabalho. Para esse efeito, reúnem-se neste capítulo os resultados da caracterização das amostras de AF estudadas, obtidos por diversas técnicas analíticas, aos quais se adicionam alguns resultados existentes na literatura sobre estas amostras.

4.2 – SECÇÃO EXPERIMENTAL

4.2.1 – Reagentes e soluções

4.2.1.1 – Medições de UV-Vis

- Soluções de AF: utilizaram-se soluções de concentração 20 mg/L preparadas por pesagem, dissolução e diluição rigorosas em hidrogenocarbonato de sódio 0,1 M [1].

4.2.1.2 – Medições de fluorescência

- Soluções de AF: utilizaram-se soluções de concentração 100 mg/L preparadas por pesagem, dissolução e diluição rigorosas em solução de electrólito inerte de KNO_3 0,1 M, com pH ajustado a 6,0 por adição de hidróxido de sódio 0,05 M.

4.2.1.3 – Determinação potenciométrica do número total de sítios ligantes

- Soluções de Cu(II): utilizou-se uma solução padrão de Cu(II) de concentração 0,1000 M preparada por pesagem e diluição com água desionizada do sal $Cu(NO_3)_2$. A partir desta solução mais concentrada prepararam-se outras soluções de trabalho menos concentradas por diluição com água desionizada.
- Soluções de KCl: prepararam-se soluções de KCl de concentrações 0,0100 e 0,100 M por pesagem e diluição rigorosa do sal em água desionizada. Antes da pesagem, o sal foi previamente condicionado durante 24 horas a 110 °C.

- Soluções de LiOH, NaOH e KOH: as soluções de LiOH, NaOH e KOH de concentração 0,05 M foram preparadas por pesagem e diluição em água desionizada dos sais respectivos. Posteriormente, as soluções foram tituladas com ácido forte.

4.2.1.4 – Estudo do comportamento condutimétrico de surfactantes e de soluções de AF

- Soluções aquosas de brometo de cetilpiridina (CPB), cloreto de cetilpiridina (CPC) e dodecilsulfato de sódio (SDS): prepararam-se soluções aquosas de CPB, CPC e SDS de concentração 0,06 M por pesagem e diluição em água desionizada.
- Soluções de AF: prepararam-se soluções aquosas de AF de concentração 500 mg/L por pesagem e diluição rigorosa em água desionizada, tendo-se ajustado o pH a 5,6 por adição de hidróxido de sódio 0,05 M.

4.2.1.5 – Experiências de cromatografia de exclusão por tamanhos

- Soluções tampão de fosfato
  - pH 6,00: preparou-se uma solução aquosa de tampão fosfato com pH 6,00 por mistura de 50 mL de solução de KH_2PO_4 0,1 M e 5,6 mL de NaOH 0,1 M, com ajuste do volume final da solução a 100,0 mL com água desionizada [2].
  - pH 7,00: preparou-se uma solução aquosa de tampão fosfato com pH 7,00 por mistura de 50 mL de solução de KH_2PO_4 0,1 M e 29,1 mL de NaOH 0,1 M, com ajuste do volume final da solução a 100,0 mL com água desionizada [2].

  Antes da sua utilização, quer na preparação das soluções de AF quer como fase móvel, as soluções tampão foram previamente filtradas por vácuo com filtros de acetato de celulose.
- Soluções de AF e de pré-fúlvicos: prepararam-se soluções de AF e de pré-fúlvicos de concentrações 330 mg/L por pesagem, dissolução e diluição rigorosas em tampão fosfato com pH 6,00 ou 7,00. Antes da injecção no sistema de HP-SEC todas as soluções foram filtradas com o auxílio de filtros para seringa da marca Millipore, referência HV4, com tamanho de poro 0,45 μm.

- Soluções de compostos modelo simples dos AF e de aminoácidos: prepararam-se soluções de compostos modelo simples dos AF e de aminoácidos de concentrações $1{,}1 \times 10^{-4}$ M por pesagem, dissolução e diluição rigorosas em tampão fosfato com pH 6,00 ou 7,00. À semelhança das soluções de AF e de pré-fúlvicos, antes da injecção no sistema de HP-SEC estas soluções foram filtradas utilizando os filtros referidos anteriormente.

4.2.2 – Procedimentos experimentais

Os estudos do comportamento condutimétrico de surfactantes e de soluções de AF foram efectuados conforme o procedimento descrito em 3.3.1. As titulações potenciométricas a pH constante na presença de Cu(II) efectuaram-se com um sistema de titulação automático, seguindo o procedimento descrito em 3.3.4. As separações cromatográficas foram efectuadas com o equipamento e os procedimentos descritos em 3.3.5.

4.3 – RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO

4.3.1 – Análises elementares

Na Tabela 4.1 apresentam-se os resultados das análises elementares das amostras estudadas (análises efectuadas na Universidade de Manchester, U.K., com a excepção da amostra AFLau cujos valores foram obtidos do fornecedor da amostra). Foram estabelecidas as razões entre o número de moles dos elementos hidrogénio, azoto e enxofre e o número de moles de carbono (Tabela 4.1), não se tendo determinado as percentagens de humidade e de cinzas por limitações na quantidade de amostra.

Da análise da Tabela 4.1 não se detectam variações significativas na percentagem de carbono das várias amostras. Por outro lado, pode observar-se que as amostras de AF antropogénicas possuem percentagens de hidrogénio, azoto e enxofre superiores às amostras de AF naturais. No caso dos AF extraídos de misturas de solo natural com materiais antropogénicos, as percentagens de abundância destes três elementos situam-se entre as percentagens referentes às amostras naturais (valores inferiores) e os resultados das amostras de AF antropogénicas que lhes correspondem (valores superiores).

Tabela 4.1 – Análises elementares, razões atómicas e fórmulas empíricas das amostras de AF estudadas.

ANÁLISES ELEMENTARES				
Amostra	% C	% H	% N	% S
AF naturais				
AFS	47,06	3,82	1,06	0,00
AFLau	45,14	4,11	1,07	---
AF antropogénicos				
AFLC	50,70	5,04	4,98	0,88
AFRAC	49,18	5,38	2,21	0,58
AF extraídos de misturas de solo de pinhal com lamas compostadas				
AFMSLC(0)	45,86	4,20	1,25	0,66
AFMSLC(6)	43,49	4,42	1,26	0,86
AF extraídos de misturas de solo de pinhal com resíduos animais compostados				
AFMSRAC(0)	44,40	4,71	4,10	0,35
AFMSRAC(6)	43,28	4,62	3,61	0,41

RAZÕES ATÓMICAS							
Amostra	nC	nH	nN	nS	nH/nC	nN/nC	nS/nC
AF naturais							
AFS	3,918	3,790	0,0757	0	0,967	0,0193	0
AFLau	3,758	4,078	0,0764	--	1,085	0,0203	--
AF antropogénicos							
AFLC	4,221	5,000	0,356	0,02745	1,185	0,0842	0,0065
AFRAC	4,095	5,338	0,158	0,01809	1,304	0,0385	0,0044
AF extraídos de misturas de solo de pinhal com lamas compostadas							
AFMSLC(0)	3,818	4,167	0,0892	0,0206	1,091	0,0234	0,0054
AFMSLC(6)	3,621	4,385	0,0900	0,0268	1,211	0,0248	0,0074
AF extraídos de misturas de solo de pinhal com resíduos animais compostados							
AFMSRAC(0)	3,697	4,673	0,293	0,0109	1,264	0,0792	0,0030
AFMSRAC(6)	3,603	4,584	0,258	0,0128	1,272	0,0715	0,0035

FÓRMULAS EMPÍRICAS [a]			
AFS	$C_{52}O_{40}H_{50}N$	AFMSLC(0)	$C_{43}O_{34}H_{47}NS_{0,2}$
AFLau	$C_{49}O_{41}H_{53}N$	AFMSLC(6)	$C_{40}O_{35}H_{49}NS_{0,3}$
AFLC	$C_{12}O_7H_{14}NS_{0,08}$	AFMSRAC(0)	$C_{13}O_{10}H_{16}NS_{0,04}$
AFRAC	$C_{26}O_{14}H_{34}NS_{0,1}$	AFMSRAC(6)	$C_{14}O_{12}H_{18}NS_{0,05}$

a – Cálculos efectuados tendo como base um átomo de azoto. Na realização destes cálculos, determinou-se a percentagem de oxigénio como sendo a diferença entre a soma das percentagens relativas aos elementos carbono, hidrogénio, azoto e enxofre e o valor 100, o que pode não ser totalmente correcto devido à presença nas amostras de humidade e cinzas.

Relativamente às razões atómicas, verifica-se que as amostras de AF antropogénicos possuem razões azoto/carbono cerca de quatro vezes superiores às amostras de AF naturais e percentagens igualmente superiores das razões hidrogénio/carbono e enxofre/carbono. No caso dos AF extraídos de misturas de solo natural com materiais antropogénicos, obtiveram-se razões atómicas que se localizaram entre os valores dos AF naturais e os valores dos AF antropogénicos, não se tendo detectado alterações significativas nas percentagens e razões molares com o aumento do tempo de mistura. Em resumo, verifica-se que todas as razões atómicas referidas relativas aos AF antropogénicos são superiores às razões atómicas correspondentes às amostras naturais, particularmente no caso da razão azoto/carbono, o que sugere a presença de resíduos de proteínas [3] nos AF antropogénicos.

Na Tabela 4.1 apresentam-se também as fórmulas empíricas das amostras de AF. Da análise destas fórmulas empíricas pode observar-se que as amostras de AF naturais não contêm enxofre, ao contrário de todas as outras amostras. Por outro lado, as amostras antropogénicas apresentam menor quantidade de carbono, oxigénio e hidrogénio que as amostras naturais, enquanto as amostras de AF extraídas de misturas exibem quantidades de carbono, oxigénio e hidrogénio que são intermédias dos valores referentes à amostra AFS e dos materiais antropogénicos que estão na sua origem.

Estes resultados retirados das análises elementares não permitem chegar a conclusões definitivas quanto a eventuais alterações às características dos solos provocadas pela adição de materiais compostados. Todavia, verificou-se que a adição ao solo destes materiais conduziu a razões atómicas hidrogénio/carbono e azoto/carbono nos AF extraídos nessas misturas que são superiores aos valores que lhes correspondem no caso da amostra AFS.

4.3.2 – Propriedades espectroscópicas

4.3.2.1 – Espectros de RMN de ^{13}C

Na Fig. 4.1 apresentam-se os espectros de RMN de ^{13}C das amostras de AF naturais e antropogénicas (realizados na Universidade de Valladolid) e na Tabela 4.2 as percentagens de carbono determinadas com base na análise destes espectros. Quando se comparam os espectros de RMN de ^{13}C das amostras de AF antropogénicos com os

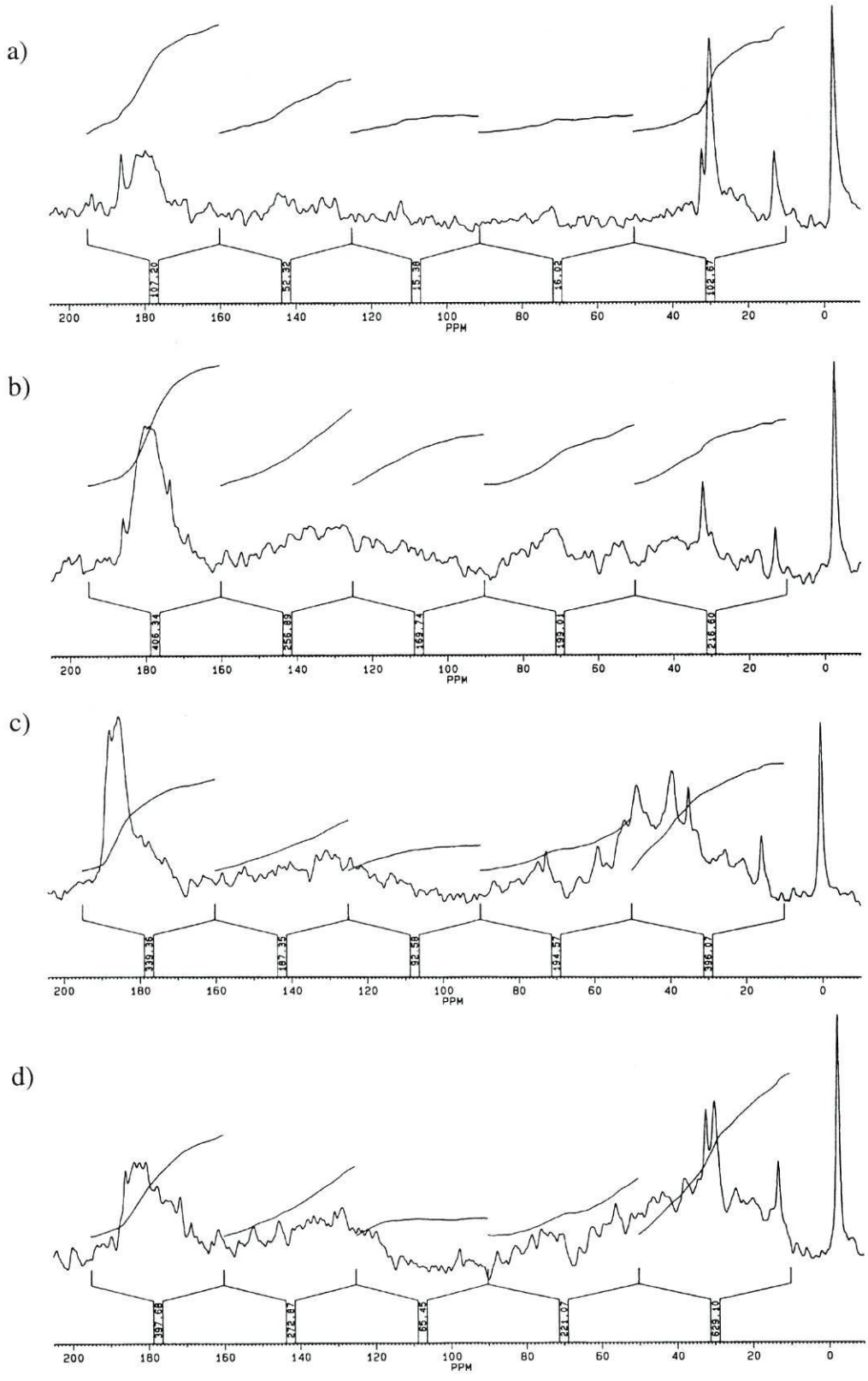


Figura 4.1 – Espectros de RMN de ^{13}C das amostras de AF naturais e antropogénicos: a) AFS, b) AFLau, c) AFLC e d) AFRAC.

Tabela 4.2 – Percentagem de carbono das amostras em estudo determinado a partir de espectros de RMN de ^{13}C.

Amostra [a]	Intervalo de 10-50 ppm (alifáticos)	Intervalo de 50-90 ppm (carboidratos e álcoois)	Intervalo de 90-125 ppm (aromáticos)	Intervalo de 125-160 ppm (aromáticos CO)	Intervalo de 160-190 ppm (carboxílicos)
AF naturais					
AFS	35,0	5,5	5,2	17,8	36,5
AFLau	17,3	15,9	13,6	20,6	32,5
AF antropogénicos					
AFLC	32,7	16,1	7,7	15,5	28,0
AFRAC	39,7	13,9	4,1	17,2	25,1

a – Não se efectuaram análises das amostras de AF extraídas de misturas de solo natural com compostos.

espectros das amostras de AF naturais, verifica-se que as amostras antropogénicas apresentam percentagens mais reduzidas de carbonos aromáticos e, principalmente, de carbonos em grupos carboxílicos. Este facto permite concluir que as amostras de AF antropogénicos possuem uma menor quantidade de carbonos num estado de oxidação mais elevado, o que sugere que se trata de materiais orgânicos que eventualmente ainda não se encontram completamente maturados ou oxidados.

4.3.2.2 – Espectroscopia de UV-Vis

Na Fig. 4.2 exibe-se um espectro de UV-Vis típico das amostras de AF (os espectros são todos semelhantes entre si) e na Tabela 4.3 as razões E_4/E_6 para as amostras de AF estudadas. Na Tabela 4.3 apresentam-se também as estimativas do peso molecular e grau de aromaticidade das amostras de AF, efectuadas através da leitura dos valores da absorvância a 280 nm e da aplicação das eqs. 4.1 e 4.2 [5].

Tabela 4.3 – Razão E_4/E_6, peso molecular e grau de aromaticidade das amostras de AF.

Amostra	E_4/E_6	Abs (280 nm)	$\varepsilon / \frac{L}{(molC)cm}$	MM / Da	% Aromaticidade
AF naturais					
AFS	16,9	2,454	639,0	3040	38,7
AFLau	9,3	1,843	521,6	2571	32,8
AF antropogénicos					
AFLC	11,0	0,8888	210,6	1330	17,2
AFRAC	28,9	1,738	424,3	2183	27,9
AF extraídos de misturas de solo de pinhal com lamas compostadas [a]					
AFMSLC(0)	4,8	0,3820	490,0	2445	31,2
AFMSLC(6)	10,2	0,3720	377,4	1996	25,6
AF extraídos de misturas de solo de pinhal com resíduos animais compostados [a]					
AFMSRAC(0)	5,1	0,2825	460,5	2327	29,8
AFMSRAC(6)	8,3	0,2560	426,7	2193	28,1

a – Resultados retirados de [6].

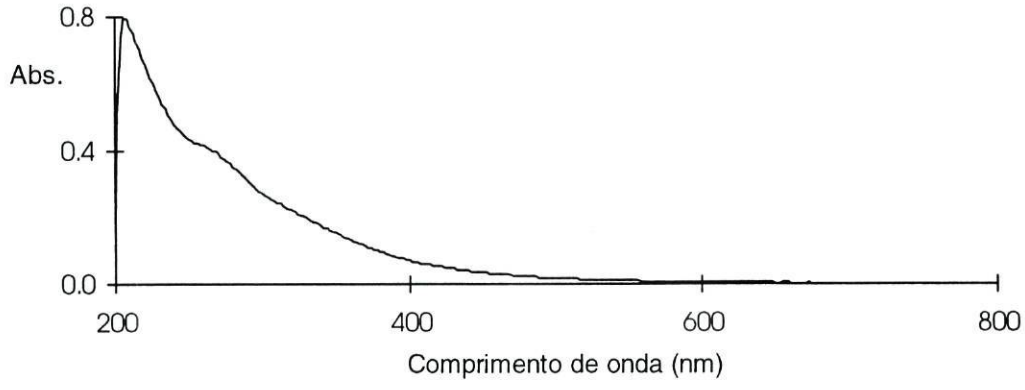


Figura 4.2 – Espectro de UV-Vis típico de soluções aquosas de AF.

$$\% \text{ aromaticidade} = 0{,}05\ \varepsilon + 6{,}7 \quad (4.1)$$

$$MM = 3{,}99\ \varepsilon + 490 \quad (4.2)$$

Deve notar-se que estas equações foram obtidas para um conjunto particular de amostras de SH [5], não existindo quaisquer garantias que os resultados obtidos pela aplicação destas equações às amostras aqui estudadas tenham qualquer significado. No entanto, estas equações permitem converter um espectro de UV-Vis num conjunto reduzido de parâmetros, pelo que facilitam uma análise comparativa de amostras distintas. A denominada razão E_4/E_6, que se considera ser inversamente proporcional à percentagem de humificação e de aromaticidade das amostras [5], pode definir-se como sendo a razão entre os valores de absorvância a 466 e a 666 nm. Desta forma, pode atribuir-se uma reduzida razão E_4/E_6 a um grau de aromaticidade elevado, enquanto que uma elevada razão reflectirá a presença de uma maior quantidade de estruturas alifáticas.

Uma análise do espectro de UV-Vis típico presente na Fig. 4.2 permite verificar que este tipo de espectros de amostras de AF é constituído por uma banda larga e mal definida, com máximo a cerca de 210 nm e que contém um "shoulder" a cerca de 280 nm. Da análise da Tabela 4.3 pode concluir-se que as amostras de AF naturais apresentam massas moleculares superiores, quer às amostras de AF antropogénicos, quer às amostras de AF extraídos de misturas. Para estas últimas, detecta-se um aumento da razão E_4/E_6 e uma diminuição dos valores de MM e da percentagem de aromaticidade com o aumento do tempo de mistura (Tabela 4.3). Relativamente aos valores das percentagens de aromaticidade, verifica-se que as amostras de AF antropogénicas apresentam percentagens de aromaticidade inferiores às amostras naturais.

É de salientar que os resultados obtidos nas estimativas do peso molecular e grau de aromaticidade são meramente indicativos, não se lhes podendo atribuir grande significado.

4.3.2.3 – Espectroscopia de IV

Na Fig. 4.3 apresentam-se os espectros de IV das amostras de AF, na gama de números de onda 3800 a 800 cm^{-1}, e na Tabela 4.4 a localização das bandas principais

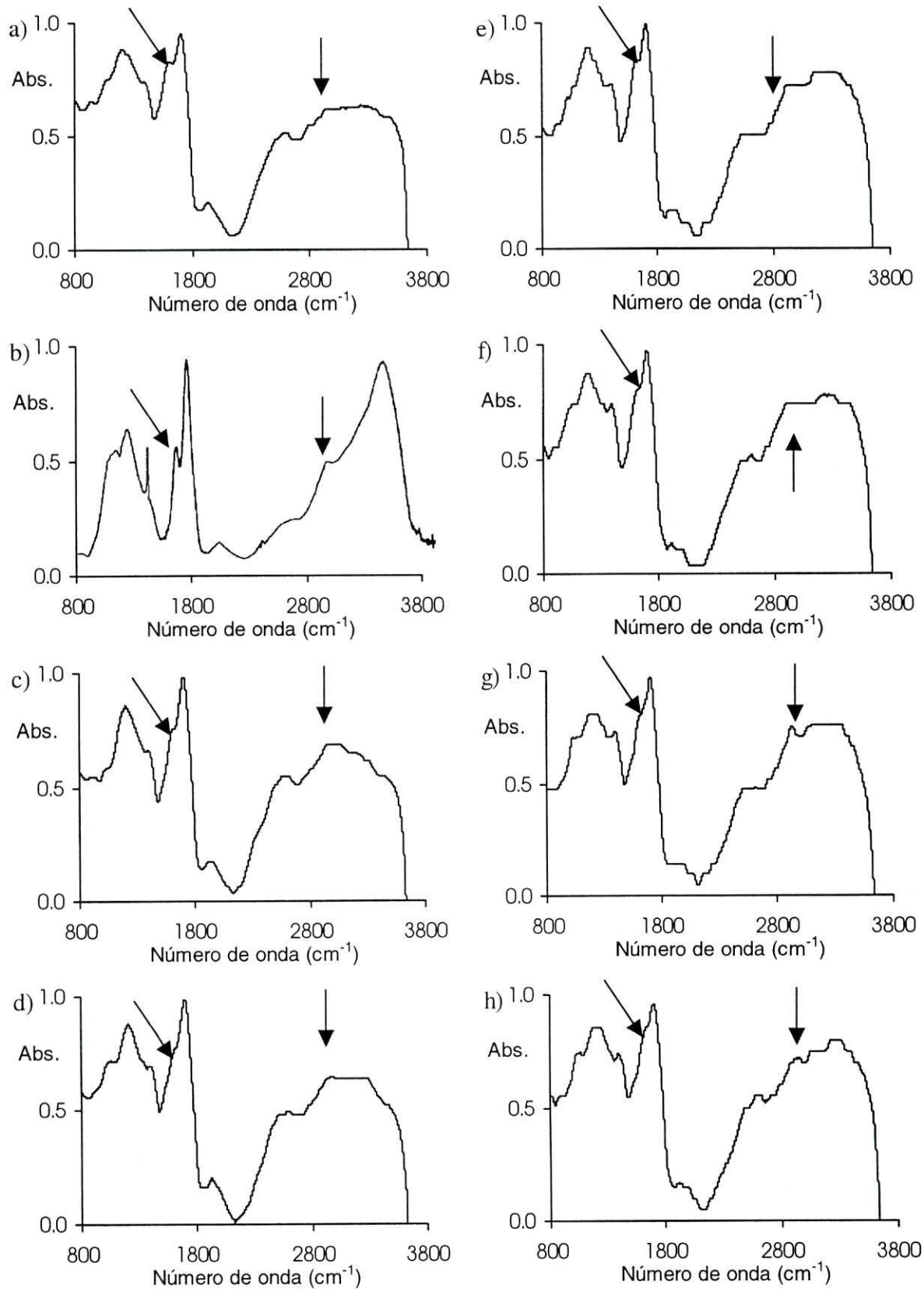


Figura 4.3 – Espectros de IV das amostras: a) AFS; b) AFLau; c) AFLC; d) AFRAC; e) AFMSLC(0); f) AFMSLC(6); g) AFMSRAC(0) e h) AFMSRAC(6) a pH 6,0. As setas indicam as bandas que sofrem variações mais significativas. Espectro b) retirado de [7].

Tabela 4.4 – Principais bandas dos espectros de IV das amostras de AF. Interpretação dos espectros de IV de acordo com a literatura [1,5,8,9].

	Banda [a] de IV (cm^{-1}) [b]						
	alongamento C-H (grupos alifáticos)	alongamento C=O (grupos carboxílicos)	alongamento C=C	encurvamento CH_2 e CH_3	encurvamento O-H (grupos carboxílicos) alongamento C-O (OH fenólico)	alongamento C-O (COOH)	alongamento C-O (éteres e carbohidratos)
Amostra	~2940	~1720	1680-1620	~1420	~1410	~1230-1210	~1040
AF naturais							
AFS	+	+++	+++	+	+	++	+
AFLau	+	+++	+++	+	+	++	+
AF antropogénicos							
AFLC	+++	+++	+	+	+	++	+
AFRAC	+++	+++	+	+	+	++	+
AF extraídos de misturas [c]							
AFMSLC	++	+++	++	+	+	++	+
AFMSRAC	++	+++	++	+	+	++	+

a – +++, sinal muito forte; ++, sinal forte; +, sinal fraco.

b – Comprimento de onda do máximo das bandas mais importantes

c – No caso dos AF extraídos de misturas, as medições foram efectuadas sobre misturas dos AF recolhidos aos dois tempos de amostragem.

dos espectros, assim como a correspondência entre essas bandas e os grupos químicos que as originam. Uma análise dos espectros de IV (Fig. 4.3 e Tabela 4.4) permite verificar que estes são globalmente semelhantes entre si, com a excepção das bandas localizadas a cerca de 1620 e a 2940 cm^{-1}, uma vez que exibem intensidades relativas diferentes conforme a amostra. Assim, os espectros de IV das amostras de AF naturais apresentam uma banda localizada a cerca de 1620 cm^{-1} com uma intensidade relativa mais elevada que a banda localizada ao mesmo número de onda nos espectros das amostras de AF antropogénicas. Se se atribuir esta banda à presença de ligações C=C inseridas em estruturas aromáticas, a menor intensidade desta banda nas amostras de AF antropogénicas sugere a presença nestas amostras de uma menor quantidade de estruturas aromáticas, o que está de acordo com a evolução da percentagem de aromaticidade das amostras apresentada na Tabela 4.3. Por outro lado, verifica-se que a banda localizada a 2940 cm^{-1} apresenta uma intensidade mais elevada nas amostras antropogénicas, indicando uma maior percentagem de estruturas C-H alifáticas [1].

Estes resultados mostram que os AF antropogénicos, de uma forma geral possuem uma menor quantidade de estruturas aromáticas e uma maior abundância em estruturas alifáticas relativamente aos AF naturais.

Os resultados encontrados através desta análise de IV evidenciaram alguma concordância com os valores das razões atómicas hidrogénio/carbono discutidas anteriormente na secção 4.3.1, uma vez que já se haviam detectado quantidades relativas de hidrogénio (relativamente ao carbono) superiores nas amostras antropogénicas comparando com as amostras naturais. Por outro lado, as análises de RMN de ^{13}C e de UV-Vis também mostraram que as amostras antropogénicas contêm uma menor quantidade de estruturas aromáticas que as amostras naturais. Uma outra conclusão a retirar da análise da Fig. 4.3 é que não se foram detectadas alterações significativas nos espectros de IV dos AF extraídos de misturas com o decorrer do tempo da mistura.

4.3.2.4 – Espectroscopia de fluorescência molecular síncrona

Na Fig. 4.4 apresentam-se espectros de fluorescência síncrona das amostras de AF a pH 6,0, em solução de KNO_3 0,1 M, e na Tabela 4.5 a localização das bandas principais destes espectros. Uma análise comparativa dos espectros das amostras

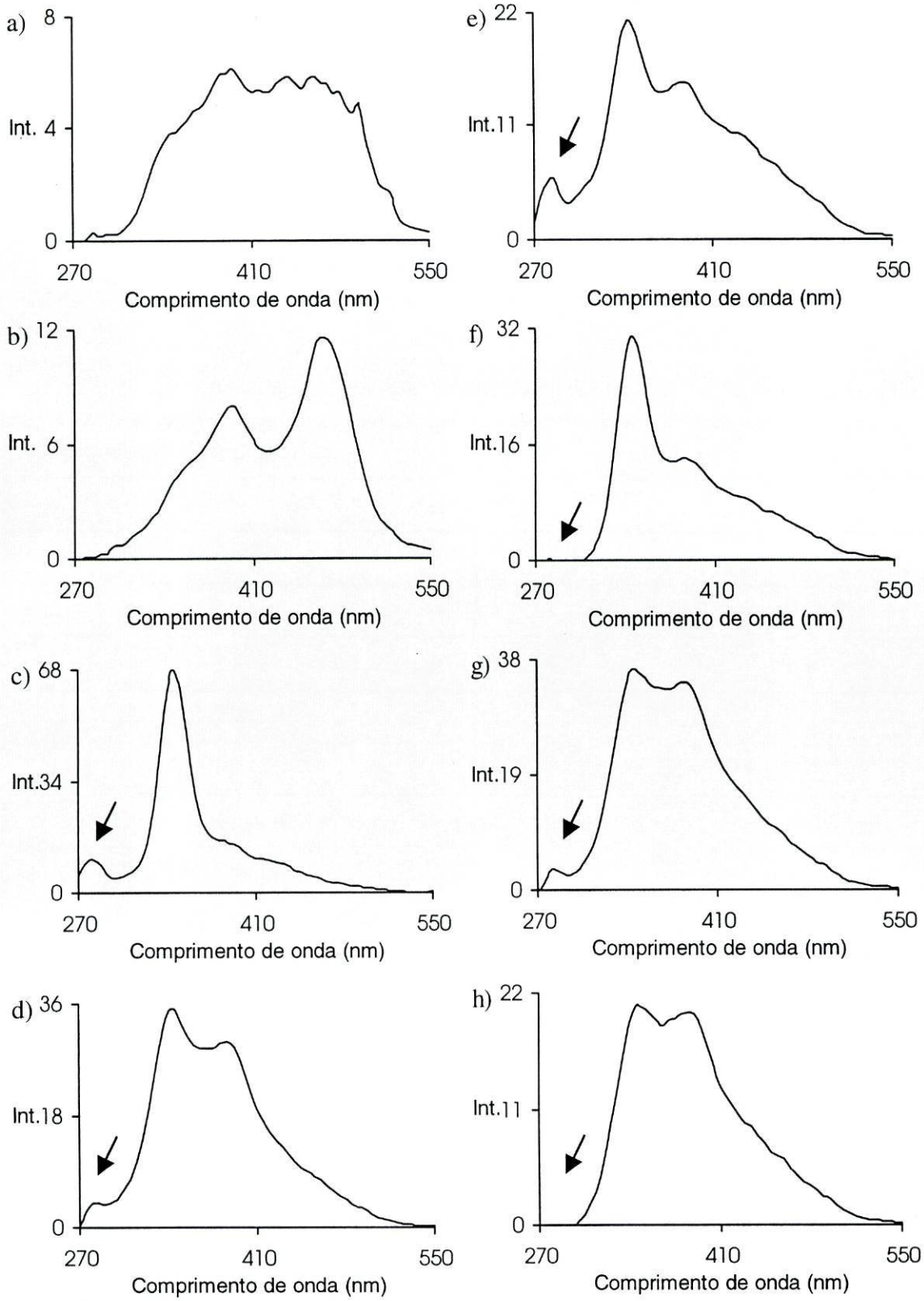


Figura 4.4 – Espectros de fluorescência síncrona típicos das amostras de AF em KNO_3 0,1 M: a) AFS; b) AFLau; c) AFLC; d) AFRAC; e) AFMSLC(0); f) AFMSLC(6); g) AFMSRAC(0) e h) AFMSRAC(6) a pH 6,0. Espectros e) a h) retirados de [6]. As setas indicam a posição da banda localizada a 280 nm, característica dos materiais antropogénicos.

Tabela 4.5 – Localização das bandas principais dos espectros de fluorescência síncrona.

Amostra	Posição das bandas (nm)[a]
AF naturais	
AFS	390, 440, 460
AFLau	485, 370
AF antropogénicos	
AFLC	345, 280, 390
AFRAC	345, 385, 280
AF extraídos de misturas de solo de pinhal com lamas compostadas	
AFMSLC(0)	340, 390, 280
AFMSLC(6)	340, 390
AF extraídos de misturas de solo de pinhal com resíduos animais compostados	
AFMSRAC(0)	340, 390, 280
AFMSRAC(6)	340, 390

a – Bandas ordenadas no sentido decrescente das intensidades.

naturais com os espectros das amostras de AF antropogénicos e dos AF extraídos de misturas permite detectar grandes diferenças entre eles. De facto, enquanto que as amostras naturais apresentam as bandas mais intensas a comprimentos de onda superiores a 370 nm, nas amostras de AF antropogénicos e de AF extraídos de misturas as bandas mais intensas encontram-se presentes a comprimentos de onda inferiores.

Apesar dos AF apresentarem uma composição final desconhecida e serem compostos por misturas complexas de diversos constituintes, para uma mesma família de compostos será válida a hipótese das suas propriedades de fluorescência dependerem da condensação aromática das amostras. Assim, como as amostras naturais apresentam as principais bandas de fluorescência numa gama de comprimentos de onda relativamente mais elevada (baixas energias) que as amostras antropogénicas, as primeiras terão um teor de estruturas aromáticas condensadas mais elevado. Por outro lado, as amostras antropogénicas contêm estruturas aromáticas relativamente simples (apenas um anel aromático) [10]. Esta menor quantidade de estruturas fluorescentes condensadas, que se poderá reflectir numa menor quantidade global de carbono aromático nos materiais antropogénicos, está de acordo com os resultados obtidos na análise espectroscópica de RMN de ^{13}C, de UV-Vis e de IV.

Uma análise mais pormenorizada dos espectros da Fig. 4.4 permite detectar nas amostras antropogénicas (Fig. 4.4.c e 4.4.d) uma banda relativamente pequena a 280 nm. Esta banda também é detectada nos espectros correspondentes às misturas no tempo zero (Figs. 4.4.e e 4.4.g), mas já não se observa nos espectros das amostras extraídas seis meses após a mistura (Fig. 4.4.f e 4.4.h). Este resultado indicia que as estruturas fluorescentes responsáveis por aquela banda são transformadas ao fim de algum tempo após mistura com o solo natural, pelo que serão estruturas relativamente reactivas que por isso podem ser facilmente degradadas. A existência desta banda nas amostras de AF antropogénicos poderá indicar uma maturação incompleta do respectivo composto, uma vez que as estruturas responsáveis pela banda a 280 nm só serão transformadas após a sua adição ao solo natural.

Uma análise mais atenta dos espectros das misturas de AF antropogénicos e solo natural (Figs. 4.4.e a 4.4.h) permite verificar que os espectros das misturas são como que uma soma dos espectros da amostra AFS com os espectros das amostras de AF extraídas de materiais compostados, sem entrar nesta análise com a banda dos 280 nm. Este resultado sugere que, para além das transformações envolvendo as estruturas fluorescentes responsáveis pela banda a 280 nm, não ocorrerão quaisquer outras

alterações nos materiais orgânicos antropogénicos após a sua adição aos solos, pelo menos nos materiais fluorescentes.

4.3.3 – Propriedades ácido-base

4.3.3.1 – Curvas de titulações potenciométricas e grupos ácido-base

Na Fig. 4.5 apresenta-se um exemplo típico de uma curva de titulação potenciométrica de uma amostra de AF com base forte. Da análise desta figura pode verificar-se que estas curvas são semelhantes às descritas na literatura para outras amostras [11,12], caracterizando-se por possuírem uma plataforma na região ácida, o que sugere uma forte capacidade tampão, e um ponto final localizado a pH neutro. Na Tabela 4.6 apresentam-se os valores do número de equivalentes ácidos calculados para as amostras de AF. Uma análise desta tabela permite verificar que as amostras antropogénicas apresentam uma quantidade de grupos ácidos titulados directamente até ao ponto final (a acidez total titulada directamente em água, usando um método de derivadas para detectar o ponto final) que é semelhante ao valor correspondente à amostra natural AFS. De facto, a acidez total da amostra AFS é cerca de 5,6 mmol g^{-1} enquanto que as amostras antropogénicas apresentam valores entre os 5,2 e os 6,7 mmol g^{-1}. A análise da Tabela 4.6 permite ainda concluir que a amostra AFLC apresenta uma maior quantidade de grupos ácidos que as outras amostras. No caso dos AF extraídos de misturas, existe alguma evidência para um acréscimo da quantidade de grupos ácidos com o aumento do tempo de mistura.

Quando se comparam as concentrações de quatro classes de grupos ácidos existentes nos AF (parâmetros C_i obtidos por ajuste não linear de dados de titulações com base forte das amostras de AF [13-15]) verifica-se que apesar das amostras AFS, AFLC e AFRAC exibirem concentrações semelhantes de grupos ácidos titulados directamente em água, apresentam diferentes concentrações dos vários sistemas ácido-base. Assim, enquanto a amostra AFS possui uma concentração elevada de C_1, ou seja, dos grupos mais ácidos, as amostras AFLC e AFRAC exibem quantidades praticamente nulas destes grupos. Por outro lado, as amostras antropogénicas são caracterizadas por uma maior concentração de grupos ácidos mais fracos. A amostra AFLC apresenta também uma concentração relativamente elevada da classe de ácidos com um pK_a cerca de 6, que eventualmente poderão corresponder a grupos fenóis mais ácidos.

Tabela 4.6 – Concentração dos grupos ácidos titulados directamente (Neq) e concentrações dos grupos correspondentes aos sistemas ácido-base presentes em cada amostra de AF (C_i) [&].

Amostra	Neq	Ajuste não linear [a]				Ref.
		C_1	C_2	C_3	C_4	
AFS	5,56(4)	3,54(6)	1,07(2)	1,08(5)	0,68(4)	[13]
AFLau	7,78	--	--	--	--	este trabalho
AFLC	6,73(3)	≈ 0	4,96(6)	2,76(8)	0,55(7)	[14]
AFRAC	5,21(8)	≈ 0	5,03(1)	0	0,06(1)	[14]
AFMSLC(0)	5,80(4)	--	--	--	--	[15]
AFMSLC(6)	6,2(2)	--	--	--	--	[15]
AFMSRAC(0)	4,50(7)	--	--	--	--	[15]
AFMSRAC(6)	4,90(6)	--	--	--	--	[15]

& – Concentrações em mmolH^+/(g de AF). Os valores apresentados referem-se à média de três determinações. Não se determinaram as concentrações dos grupos correspondentes aos sistemas ácido-base presentes nas amostras de AF extraídas de misturas.

a – A estas quatro classes de ácidos correspondem as seguintes constantes de acidez: pK_a (C_1) ≈ 3; pK_a (C_2) $\approx 4,5$; pK_a (C_3) ≈ 6 e pK_a (C_4) ≈ 9.

b – Não se encontrou na literatura o valor da acidez total. Em contrapartida, usou-se um valor calculado por soma das concentrações dos grupos carboxílicos mais fortes (5,11 mmol/g) e dos grupos carboxílicos mais fracos (3,49 mmol/g).

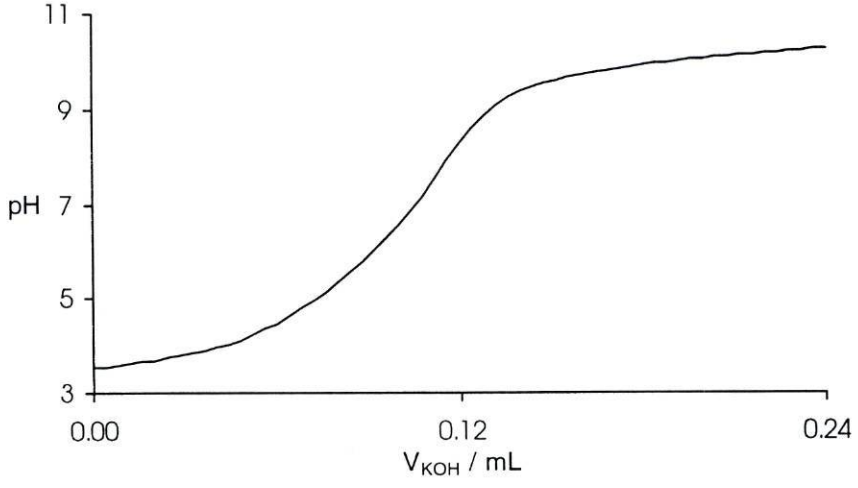


Figura 4.5 – Exemplo típico de uma titulação potenciométrica de uma solução de AFS com base forte.

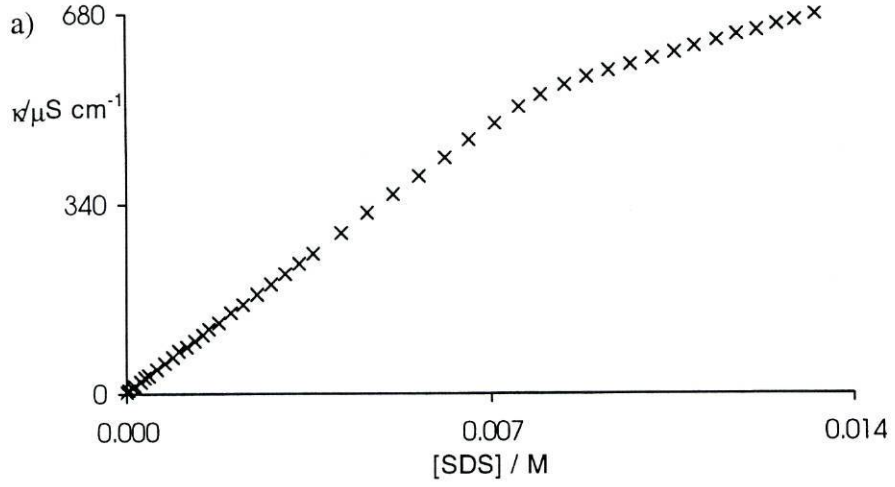
4.3.4 – Estudos condutimétricos

4.3.4.1 – Soluções de surfactantes

Na Fig. 4.6 apresentam-se resultados típicos dos estudos da condutividade de soluções aquosas em função da concentração de surfactante. Da análise desta figura pode detectar-se em cada gráfico duas zonas lineares com declives distintos, o que é típico de soluções com comportamento surfactante [16]. A zona de intersecção dessas rectas permite determinar o valor de CMC característico de cada surfactante (Tabela 4.7) ou seja, para uma determinada temperatura, a concentração de surfactante a partir da qual se verifica a formação de micelas. Quando se compara o valor de CMC obtido para o SDS com os valores existentes na literatura (Tabela 4.7) também determinados por condutividade [17], verifica-se que estes se encontram muito próximos entre si (erro de cerca de 2 %) o que valida o método experimental utilizado. No caso dos surfactantes CPB e CPC, não é tão boa a concordância existente entre os valores determinados experimentalmente e os valores existentes na literatura, tendo-se cometido erros de determinação de cerca de 90 e 62 %, respectivamente. No entanto, tendo em consideração que os valores de CMC podem oscilar conforme a técnica experimental utilizada [16], e que os resultados retirados da literatura foram encontrados por técnicas diferentes das condutimétricas, a comparação efectuada poderá não ser completamente válida, o que inviabiliza uma avaliação da qualidade das determinações efectuadas por uma análise directa destes dois valores.

4.3.4.2 – Soluções de AF

Alguns estudos efectuados sobre o comportamento de SH em solução aquosa sugerem que as macromoléculas de SH ora apresentam tendência para se agregarem formando estruturas do tipo micelas, ora permanecem com uma estrutura distendida [18]. Estas mudanças de configuração são afectadas por parâmetros experimentais como a concentração e o pH da solução [18]. Assim, sugere-se que ocorrerá a agregação para concentrações relativamente elevadas de SH. Por outro lado, estas associações estarão relacionadas com a afinidade entre algumas fracções moleculares apolares existentes nas diferentes macromoleculas dos AF. Pode-se considerar-se a hipótese de que a



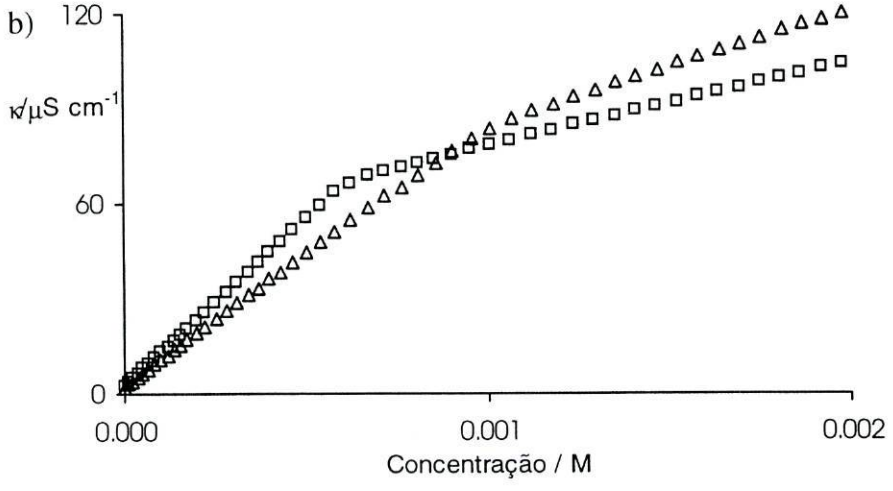


Figura 4.6 – Determinação do valor de CMC de alguns surfactantes: a) SDS; b) CPB, (□); e CPC, (Δ).

Tabela 4.7 – Comparação de valores de CMC a 25 °C determinados por condutimetria para alguns surfactantes com outros valores retirados da literatura [17] [&].

Surfactante	CPB	CPC	SDS
Valor retirado da literatura	0,0067 [a]	0,00063 [b]	entre 0,00807 e 0,00827 [c]
Valor experimental	0,00070(7)	0,00102(2)	0,00791(9)
% erro	89,6	62,0	2,04 [d]

& – Valores de CMC expressos em M; entre parêntesis valores de desvio médio.

a – Determinado por estudos de tensão superficial;

b – Determinado por potenciometria;

c – Determinado por condutimetria;

d – Calculado em relação ao valor tabelado 0,00807 M.

existirem essas agregações, estas apresentarão algumas semelhanças com as agregações que ocorrem com moléculas de surfactantes no decorrer da formação de micelas. Deste modo, após a neutralização dos grupos mais ácidos das moléculas de AF (até pH 6), uma eventual alteração à linearidade nas representações da condutividade em função da concentração de AF evidenciará a existência de agregações.

Na Fig. 4.7 mostra-se a variação da condutividade com a alteração da concentração das soluções aquosas de AF, a pH 5,6. Uma primeira análise desta figura permite observar um aumento da condutividade com o incremento da concentração de AF. Como a condutividade cresce linearmente com o aumento da concentração de AF, este estudo não evidenciou a existência de qualquer tipo de associação entre as moléculas de AF, pelo menos dentro da gama de concentrações de AF estudada (0-250 mg/L). No entanto, se as amostras de AF estiverem contaminadas com espécies químicas de elevada condutividade molar, este tipo de técnica dificilmente permitiria detectar a existência de agregações, mesmo que estas existissem. Deste modo, a análise da Fig. 4.7, assim como as conclusões daí retiradas, terão que ter em consideração esta possibilidade.

Salienta-se o facto deste estudo ter englobado uma gama de concentração de AF que é bastante superior às concentrações que existem naturalmente no ambiente, cujos valores típicos se aproximam dos 100 mg/L [13], pelo que se pode concluir que os AF não apresentam um comportamento do tipo surfactante. Uma outra conclusão que se pode retirar da análise desta figura é que os AF com origem antropogénica, AFLC e AFRAC apresentam condutividades em solução aquosa inferiores às amostras naturais, AFS e AFLau. Estas diferenças podem-se ficar a dever a dois factores: (i) grupos iónicos diferentes nas amostras; e/ou, (ii) menor quantidade de estruturas iónicas nas amostras de AF antropogénicas.

4.3.4.3 – Titulações condutimétricas das amostras de AF

Na Fig. 4.8 apresentam-se exemplos típicos de titulações das amostras de AF naturais e antropogénicas com NaOH (os resultados para as titulações com KOH e LiOH são semelhantes) e na Fig. 4.9 os resultados típicos das titulações da amostra AFRAC com LiOH, NaOH e KOH. A análise das Figs. 4.8 e 4.9 permite verificar que

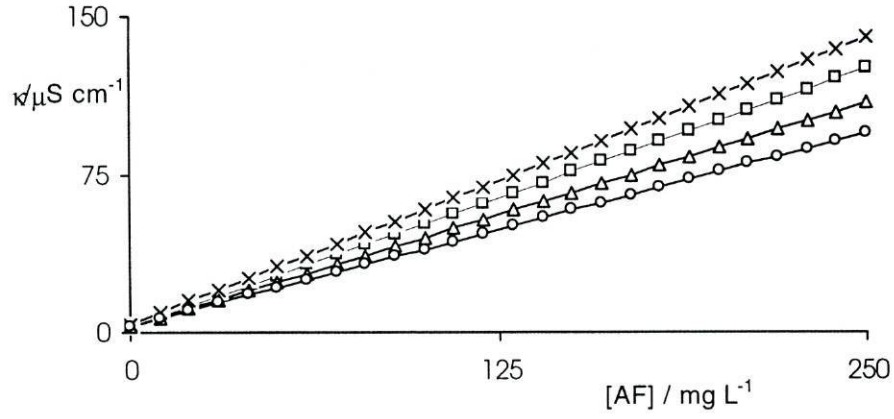


Figura 4.7 – Condutividade relativa das amostras de AF: (×) AFS; (□) AFLau; (Δ) AFLC e (○) AFRAC.

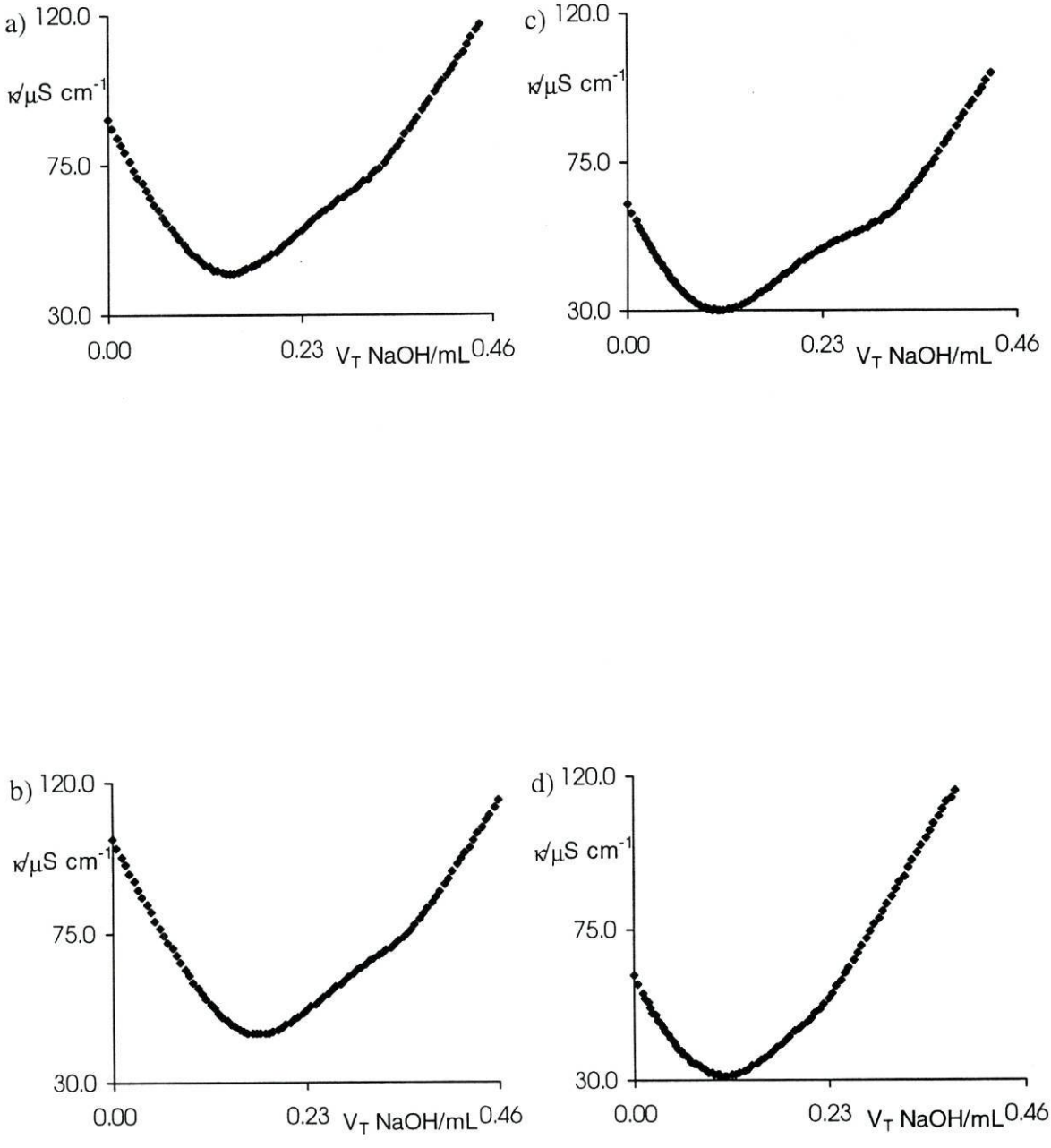


Figura 4.8 – Titulações condutimétricas típicas das amostras de AF com NaOH 0,05571 M: a) AFS; b) AFLau; c) AFLC e d) AFRAC.

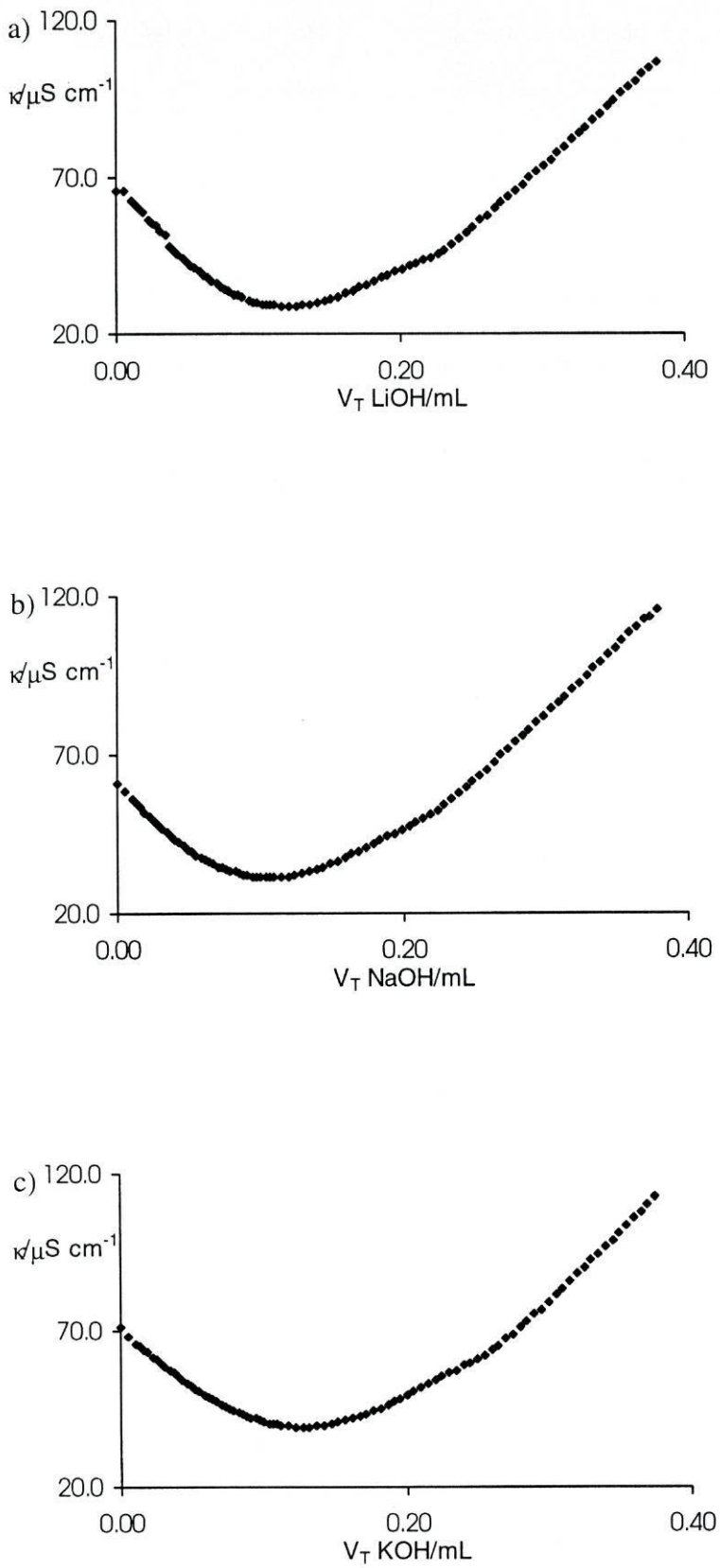


Figura 4.9 – Titulações condutimétricas típicas da amostra AFRAC 100 mg L^{-1} com as bases fortes: a) LiOH; b) NaOH e c) KOH.

se encontram presentes três zonas distintas (representadas na Fig. 4.10) em cada um dos gráficos, às quais se podem efectuar ajustes lineares, sendo a transição entre as zonas A e B menos clara que entre as zonas B e C, que se apresenta muito mais nítida. Assim,

(i) na zona A, observa-se uma diminuição da condutividade com a adição de solução de NaOH. Esta parte inicial da curva, até ao mínimo, corresponde à neutralização do catião hidrogénio que se encontra livre devido à presença nas moléculas de AF de grupos ácidos fracos [19]. A reacção pode ser descrita pela equação:

$$H^+(aq) + M^+(aq) + OH^-(aq) \rightarrow H_2O + M^+(aq) \qquad (4.3)$$

(ii) na zona B, verifica-se que a condutividade da solução aumenta ligeiramente devido a um acréscimo nos AF do número de grupos ácidos carregados negativamente, e também devido ao aumento da concentração de catiões metálicos livres [19]:

$$LH(aq) + M^+(aq) + OH^-(aq) \rightarrow L^-(aq) + M^+(aq) + H_2O \qquad (4.4)$$

(iii) na zona C, detecta-se um aumento mais acentuado da condutividade provocado pelo facto do ligando L já se encontrar na totalidade na forma de $L^-(aq)$. Desta forma, o forte aumento da condutividade deve-se ao aumento da concentração de catião metálico livre e de anião hidróxido adicionados [19].

Cada uma destas secções poderá corresponder à titulação de uma diferente classe de grupos ácidos. Na Fig. 4.10 apresentam-se os resultados típicos de ajustes lineares aos conjuntos de pontos incluídos em cada uma das três secções. Como se pode concluir da análise desta figura, eliminando alguns dos pontos situados na transição entre zonas podem ajustar-se três rectas diferentes, cada recta a uma zona distinta do gráfico. No caso concreto da mostra AFLC, na zona B detecta-se a presença não de uma, mas sim de duas porções lineares às quais se podem ajustar rectas com declives diferentes (Fig. 4.10.b). Na Fig. 4.10 apresentam-se para cada zona os resultados do ajuste linear correspondente, assim como a representação da melhor recta.

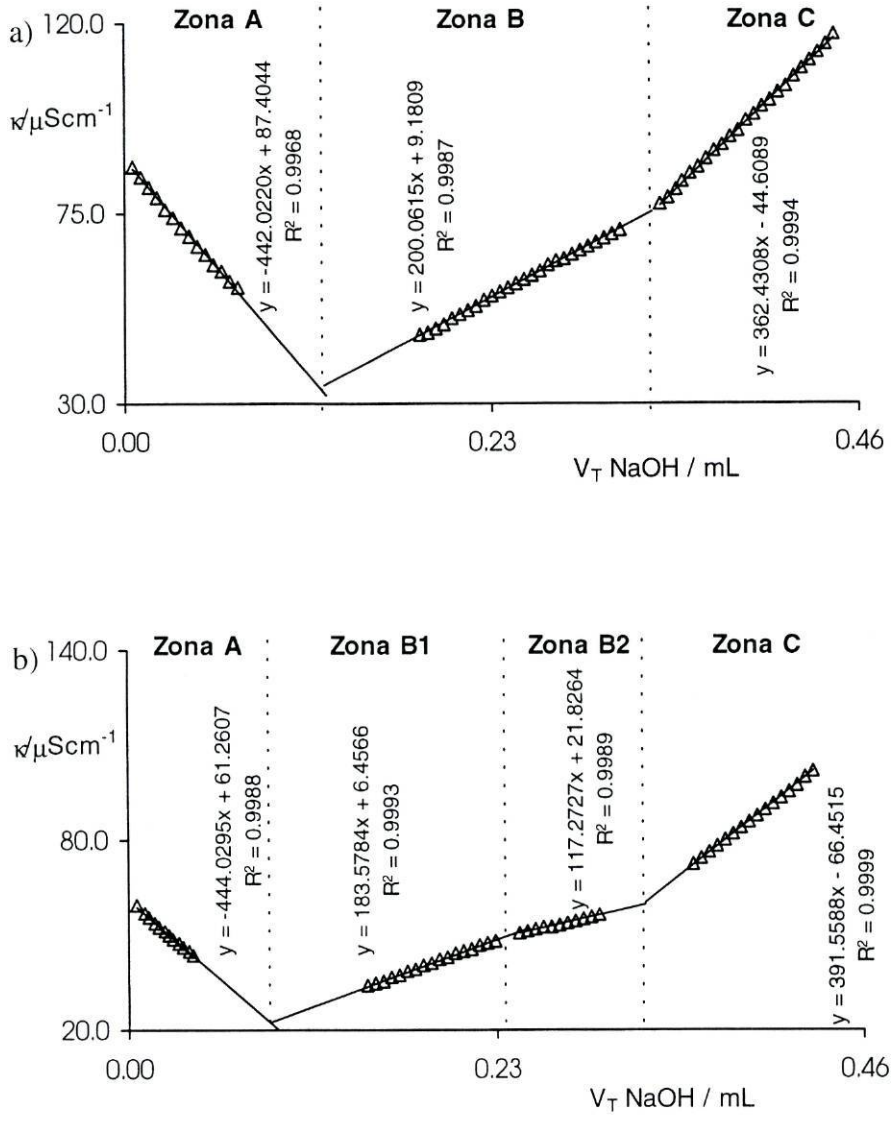


Figura 4.10 – Resultados típicos de ajustes lineares aos conjuntos de pontos resultantes de titulações com NaOH 0,05571 M de soluções de AF 100 mg L^{-1}: a) AFS; e b) AFLC.

A existência de uma segunda porção linear na zona B do gráfico no caso da amostra AFLC (Fig. 4.10.b) pode dever-se à presença em quantidade significativa de um outro tipo de grupo ácido fraco com características ácido-base diferentes do anterior (primeira porção linear na zona B), o que justificaria um ajuste linear com um declive diferente. Estes resultados são corroborados por outros obtidos por titulações potenciométricas (Tabela 4.6), segundo os quais esta amostra possui uma quantidade elevada de um terceiro grupo ácido fraco. Nos gráficos correspondentes à amostra AFS detecta-se a presença de uma pequena curvatura que também poderia ser atribuída a um terceiro grupo com características de ácido fraco. No entanto, o pequeno número de pontos experimentais desta zona (que pode dever-se a uma concentração deste grupo muito inferior à da amostra AFLC) não permitiu a realização de qualquer ajuste linear, pelo que esses pontos experimentais foram excluídos dos cálculos. A obtenção de dois pontos finais em titulações condutimétricas de amostras de AF extraídos de solo natural foi também relatada por Gamble [11]. Segundo este autor, o primeiro ponto final será motivado pela presença de grupos COOH do tipo salicílico, enquanto que o segundo ponto final será provocado pela totalidade dos grupos carboxílicos.

Na Tabela 4.8 apresenta-se um resumo dos resultados obtidos com a titulação condutimétrica das soluções de AF com LiOH, NaOH e KOH. Uma análise desta tabela permite verificar que os AF com origem natural, AFS e AFLau, contêm uma quantidade de grupos ácidos mais fortes superior às amostras de AF de origem antropogénica, AFLC e AFRAC. Assim, enquanto as primeiras apresentam valores na ordem dos 3 mmol/g, as segundas exibem valores inferiores, tipicamente na casa dos 2 mmol/g. Este facto ainda é mais evidente quando se analisam os resultados relativos à segunda classe de grupos ácidos. De facto, da análise da Tabela 4.8 verifica-se que as amostras naturais apresentam concentrações deste grupo na ordem dos 4,5 a 5 mmol/g, enquanto as amostras com origem antropogénica apresentam valores típicos na ordem dos 3 mmol/g. Este facto confirma outros resultados obtidos por técnicas diferentes [14], segundo os quais os AF com origem antropogénica possuem uma quantidade de grupos ácidos inferior aos AF naturais.

Uma comparação da média dos valores da concentração total de grupos carboxílicos determinados para a amostra AFLau, 7,78 mmol/g, com os valores existentes na literatura e que oscilam entre 7,72 mmol/g [20] e 8,67 mmol/g [7], permite verificar que o valor obtido neste trabalho está correcto.

Tabela 4.8 – Concentração dos grupos ácidos (mmol/g) das amostras AFS, AFLau, AFLC e AFRAC. Valores obtidos por titulação das amostras de AF com soluções de LiOH, NaOH e KOH [&].

AMOSTRA	$[L_1]$	$[L_2]$	$[L_3]$	$[L_{Total}]$ médio	Contraião
AFS [a]	2,65(6)	4,5 **7,1(3)**	--	7,1(3)	Na^+
AFLau	3,08(6)	4,60 **7,68(7)**	--	7,8(2)	Li^+
	3,1(1)	5,0 **8,07(7)**	--		Na^+
	2,97(1)	4,61 **7,58(7)**	--		K^+
AFLC	2,2(2)	3,0 **5,2(1)**	2,0 **7,22(7)**	7,0(2)	Li^+
	1,9466(7)	3,14 **5,09(8)**	2,01 **7,1(1)**		Na^+
	1,73(1)	3,05 **4,78(2)**	1,92 **6,7(1)**		K^+
AFRAC	2,13(6)	3,08 **5,21(4)**	--	5,2(1)	Li^+
	2,08(7)	3,2 **5,3(1)**	--		Na^+
	2,18(2)	2,95 **5,13(4)**	--		K^+

& – A negrito apresentam-se os valores cumulativos; entre parêntesis valores de desvio médio (duas experiências independentes); L_1, L_2, L_3 – classe de grupo ácido 1, 2 e 3, respectivamente.

a – Só se efectuou a titulação com NaOH por limitações na quantidade de amostra.

Por outro lado, não se detectam diferenças significativas nos resultados das titulações utilizando soluções de catiões diferentes, o que se encontra de acordo com o previsto pela teoria da condensação [19], podendo-se atribuir as pequenas diferenças encontradas à existência de erro experimental.

Um dos problemas inerentes à utilização das titulações condutimétricas em estudos de AF é que estas apenas permitem estabelecer a acidez total das amostras, sendo muito difícil determinar separadamente a acidez de grupos ácidos mais fortes e a acidez de grupos ácidos mais fracos, ou seja, não é possível efectuar uma análise quantitativa dos diferentes grupos mas apenas detectar a sua existência.

4.3.5 – Titulações potenciométricas a pH constante na presença de Cu(II)

Na Fig. 4.11 apresentam-se os resultados da titulação com base forte das amostras de AF na presença e na ausência de Cu(II). Da análise desta figura pode concluir-se que a pH inferior a 6 ocorre um consumo de base mais elevado na titulação de soluções de AF onde se encontra presente Cu(II), relativamente às soluções de AF onde este catião se encontra ausente. Este facto significa que na presença de Cu(II) estão a ser doseados grupos ácidos demasiado fracos para serem titulados directamente numa simples reacção de ácido-base, ou seja, a complexação do Cu(II) com os sítios ligantes dos AF promove a libertação de protões ácidos mais fracos, que dessa forma podem ser valorados [21].

Uma comparação da quantidade de protões extra libertados na presença de Cu(II) imediatamente antes de se iniciarem as hidrólises deste (e antes de existir Cu(II) não totalmente complexado) com a quantidade de protões titulados na ausência de Cu(II) permite efectuar a estimativa do número de sítios ligantes ($[L]_{Total}$) das moléculas de AF. No entanto, convém salientar que ao se efectuarem estas considerações se assume que terão sido titulados todos os hidrogénios carboxílicos na primeira parte da experiência, pelo que apenas restarão quantificar os hidrogénios hidroxílicos, um por sítio ligante. Para que este facto seja correcto, a complexação do Cu(II) terá de envolver dois grupos ácidos, um carboxílico e outro hidroxílico, que libertarão em conjunto dois protões. No entanto, se ao invés destes dois grupos diferentes a complexação ocorrer com dois grupos hidroxílicos, nenhum deles terá sido titulado na primeira parte da experiência, pelo que a complexação com o Cu(II) originará a libertação não de um,

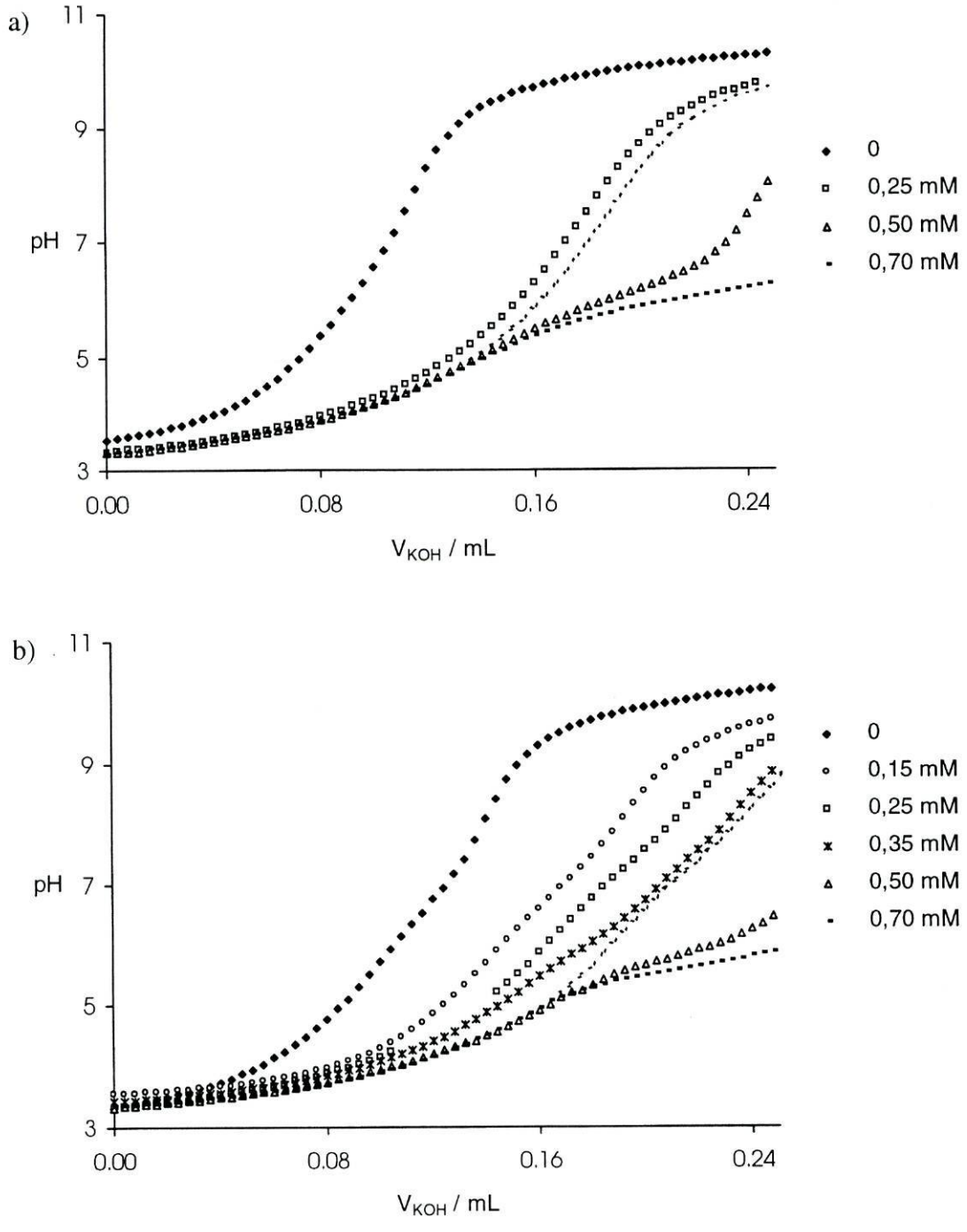


Figura 4.11 – Titulação de soluções de AF na ausência e na presença de diferentes concentrações de Cu(II): a) AFS; b) AFLau); c) AFLC e d) AFRAC. A tracejado fino apresenta-se a curva corrigida para a titulação do excesso de Cu(II).

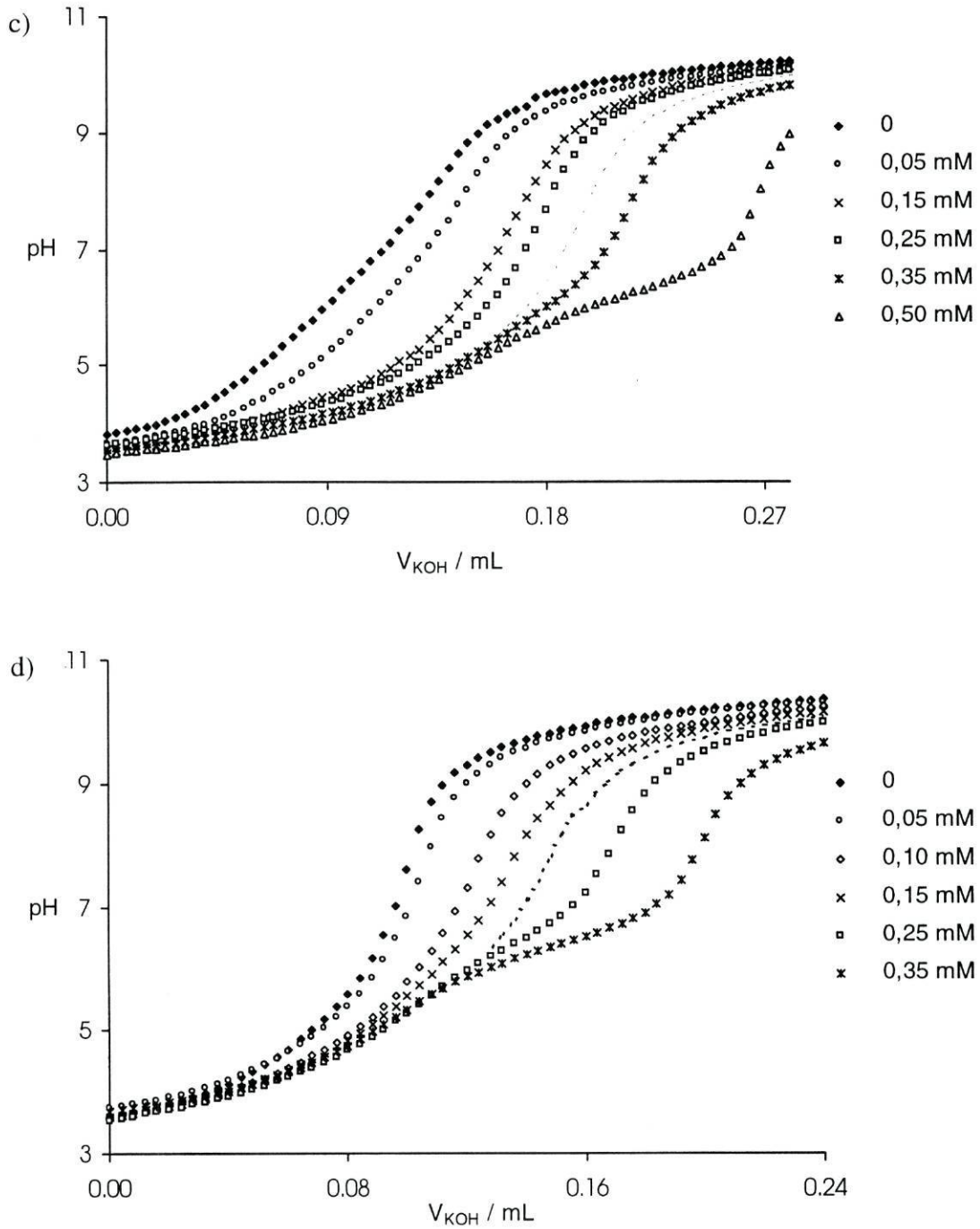


Figura 4.11 (continuação)

Tabela 4.9 – Concentração de sítios ligantes (mmol/g) determinados por potenciometria para as amostras AFS, AFLau, AFLC e AFRAC.

AMOSTRA	AFS	AFLau	AFLC	AFRAC
Concentração de sítios ligantes (mmol g^{-1})	3,74	4,48 [b]	4,02	1,96
% relativamente aos valores obtidos por potenciometria em água	67,3	57,6 [c]	59,7	37,6
% relativamente aos valores obtidos por condutividade em água [a]	52,7	57,4	57,4	37,7

a – Percentagem (%) relativamente aos valores obtidos por titulação com NaOH.

b – Para esta amostra apresenta-se na literatura [4] um valor de 5,7 mmol g^{-1}.

c – Relativamente ao valor da acidez carboxílica total (8,60 mmol g^{-1}) [4].

ocorrer com dois grupos hidroxílicos, nenhum deles terá sido titulado na primeira parte da experiência, pelo que a complexação com o Cu(II) originará a libertação não de um, mas sim de dois hidrogénios. Desta forma, estes resultados poderão vir afectados de um erro por excesso.

Como se pode observar pela análise da Fig. 4.11, detecta-se um forte desvio nas representações do pH em função do volume de base adicionado nas titulações onde existe um grande excesso de Cu(II) relativamente ao número de sítios ligantes, uma vez que além dos protões libertados pelos sítios ligantes dos AF se estão também a dosear os protões libertados pelas reacções de hidrólise do Cu(II), que se iniciaram a partir de pH 6. Para obviar este facto que impede a realização de uma estimativa correcta do número de sítios ligantes, efectuou-se um prolongamento da linha de titulação a partir do local onde se detectou o desvio causado pela presença de Cu(II) (linha a tracejado fino na Fig. 4.11).

Os resultados obtidos encontram-se sumariados na Tabela 4.9. Da análise desta tabela pode verificar-se que as amostras AFS, AFLau e AFLC apresentam concentrações semelhantes de sítios ligantes (valores entre 3,7 e 4,5 mmol g^{-1}) enquanto a amostra AFRAC exibe um valor significativamente inferior (1,96 mmol g^{-1}).

Quando se comparam os valores assim determinados com resultados semelhantes obtidos por titulações potenciométricas e condutimétricas em água e na ausência de catião metálico (Tabela 4.9), verifica-se que os sítios ligantes são cerca de 53 a 67 % do total de grupos ácidos obtidos por potenciometria e condutividade para as amostras AFS, AFLau e AFLC, e cerca de 37 % do total de grupos ácidos determinados para a amostra AFRAC.

4.3.6 – Propriedades de complexação

Na Tabela 4.10 apresentam-se parâmetros da complexação (retirados da literatura) das amostras de AF em estudo com catiões metálicos. A comparação dos valores de Log K mostra que a estabilidade dos complexos formados é idêntica para as amostras de AF naturais e antropogénicas. De facto, para o Cu(II) a pH 6,0 verifica-se que as constantes de estabilidade apresentam um valor médio de Log K de cerca de 4,3(2), o que poderá sugerir a semelhança entre os sítios ligantes das várias amostras.

No caso dos valores de $[L]_{Total}$, devido à incerteza nas determinações e à grande dispersão dos valores não é possível detectar quaisquer diferenças de comportamento entre amostras naturais e antropogénicas.

4.3.7 – Caracterização da distribuição de massas moleculares por HP-SEC

4.3.7.1 – Amostras de AF

Na Fig. 4.12 apresentam-se os conjuntos de espectros de UV-Vis das amostras AFS, AFLC e AFRAC em função do tempo, e na Fig. 4.13 os cromatogramas ao máximo dos espectros (corte a 255 nm).

Uma análise global das Figs. 4.12 e 4.13 mostra que os cromatogramas se compõem por uma única banda (ou pico largo) bem definida, sugerindo para as três amostras uma distribuição aproximadamente contínua de massas moleculares. A pH 7,00 (Fig. 4.13.b) observa-se ainda a presença de pequenos "shoulders" nas bandas, o que indicia uma maior heterogeneidade na estrutura (ou volumes) das moléculas.

Uma análise comparativa dos cromatogramas das três amostras mostra que os seus máximos ocorrem a tempos ligeiramente diferentes. Assim, o máximo do

Tabela 4.10 – Parâmetros de equilíbrio obtidos por fluorescência molecular para a complexação de catiões com amostras de AF [&].

Amostra	Catião	pH	Log K	I_{ML} ou (100-f)	$[L]_{Total}$ / mM	Δ[M] / mM	Ref.
AFS	Cu(II)	4,0	4,17(7) **3,89(5)**	0,0 **1(2)**	--	0,01-0,4	[13]
		6,0	4,69(5)	0,0	0,048(6)	0,001-0,07	[13]
	UO_2^{2+}	3,5	4,4(3) **3,93(2)**	15(3)	0,011(2)	0,06-0,3	[22]
		7,0	4,18(5) **4,06(1)**	0,0	0,021(2)	0,01-0,2	[22]
	Fe(III)	3,0	5,48(1) **4,07(6)**	20(1)	0,081(4)	0,002-0,09	[22]
		4,0	4,96(7) **4,3(2)**	15(4)	0,06(1)	0,005-0,12	[22]
		5,0	4,89(1) **4,2(1)**	28(1)	0,042(3)	0,002-0,11	[22]
		6,0	5,1(2) **4,4(2)**	38(10)	0,033(8)	0,002-0,11	[22]
	Al(III)	2,5	4,5(3)	124(9)	0,28(6)	0,1-0,3	[23]
		3,0	4,6(3)	109(6)	0,07(2)	0,01-0,3	[23]
		3,5	4,8(2)	110(4)	0,11(2)	0,03-0,2	[23]
		4,0	5,2(1)	96(1)	0,106(2)	0,02-0,2	[23]
		4,5	6,1(2)	100(1)	0,102(6)	0,05-0,1	[23]
		5,0	6,2(3)	96(6)	0,083(6)	0,03-0,1	[23]
AFLC	Cu(II)	6,0	4,22(5) **4,32(1)**	20(1) **24(2)**	--	0,05-0,3	[24]
	UO_2^{2+}	3,5	5,2(2) **5,1(2)**	53(7) **50(10)**	--	0,003-0,04	[24]
	Fe(III)	4,0	5,0(1) **4,87(7)**	16(8) **10(2)**	--	0,001-0,05	[24]
		5,0	4,9(2) **4,7(1)**	--	0,013(2)	0,002-0,06	[24]
AFRAC	Cu(II)	6,0	4,51(8) **4,21(2)**	33(5) **33(8)**	0,042(6)	0,003-0,3	[23]
	UO_2^{2+}	3,5	3,6(2) **4,4(1)**	37(11) 79(1)	--	0,02-0,2	[22]
	Fe(III)	4,0	5,5(2) **4,66(3)**	87(3) **78(3)**	0,021(2)	0,001-0,05	[22]
AFMSLC(0)	Cu(II)	6,0	4,05(7) **3,9(1)**	0(0) **0(4)**	0,03(1)	0,05-0,3	[6]
AFMSLC(6)	Cu(II)	6,0	3,99(1) **3,93(5)**	0(0) **0(7)**	0,04(2)	0,03-0,2	[6]
AFMSRAC(0)	Cu(II)	6,0	4,2(2) **4,02(2)**	17(2) **11(5)**	0,04(2)	0,03-0,2	[6]
AFMSRAC(6)	Cu(II)	6,0	4,29(8) **4,02(7)**	20(6) **8(4)**	0,027(6)	0,01-0,2	[6]

& – Quando disponíveis apresentam-se a negrito os resultados obtidos pelos métodos de Stern-Volmer ou Stern-Volmer modificado.

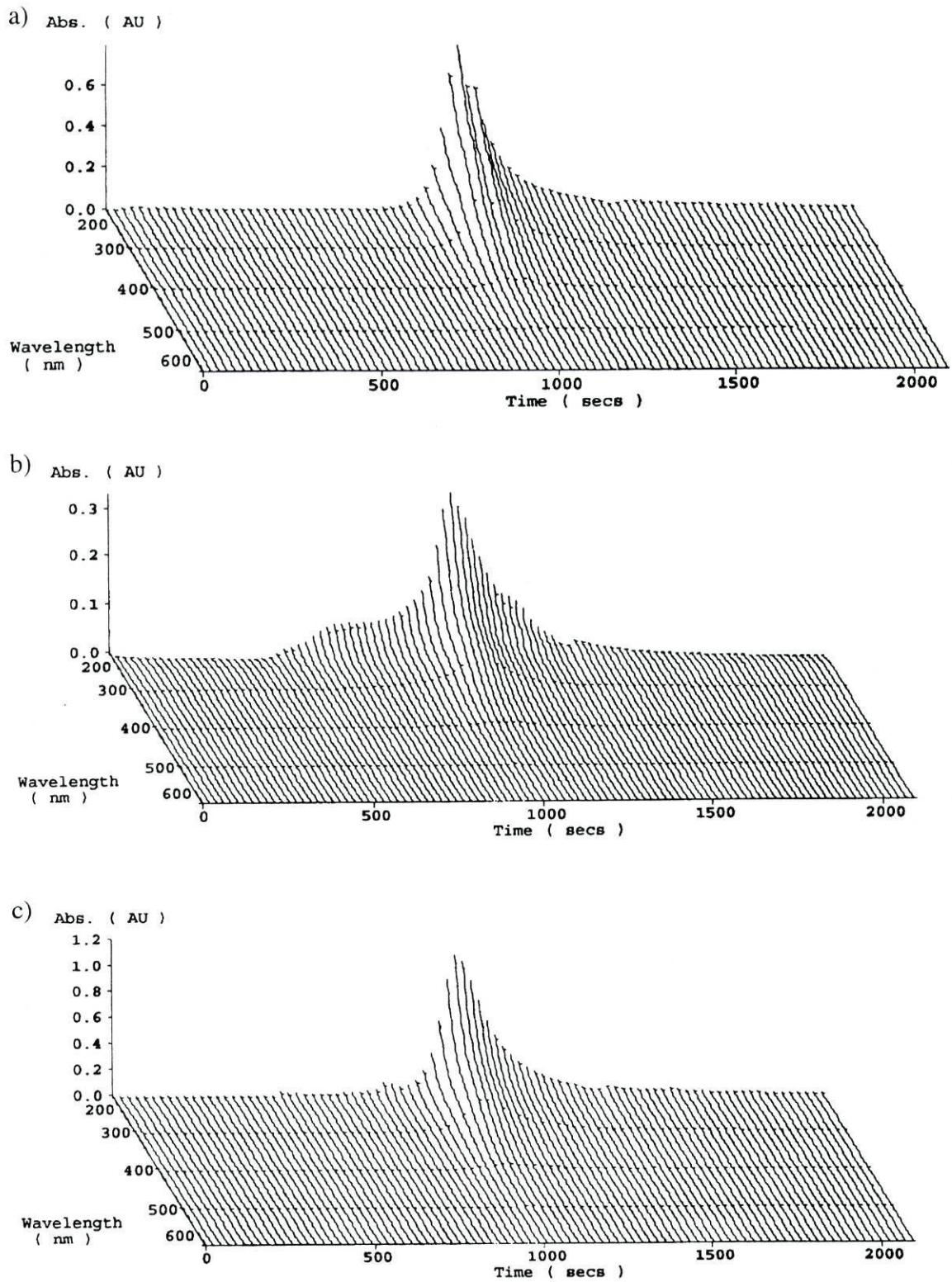


Figura 4.12 – Conjuntos de espectros de UV-Vis das amostras AFS, [a), d)]; AFLC, [b), e)]; e AFRAC, [c), f)] em função do tempo, a pH 6,00, [a) - c)]; e a pH 7,00, [d) - f)].

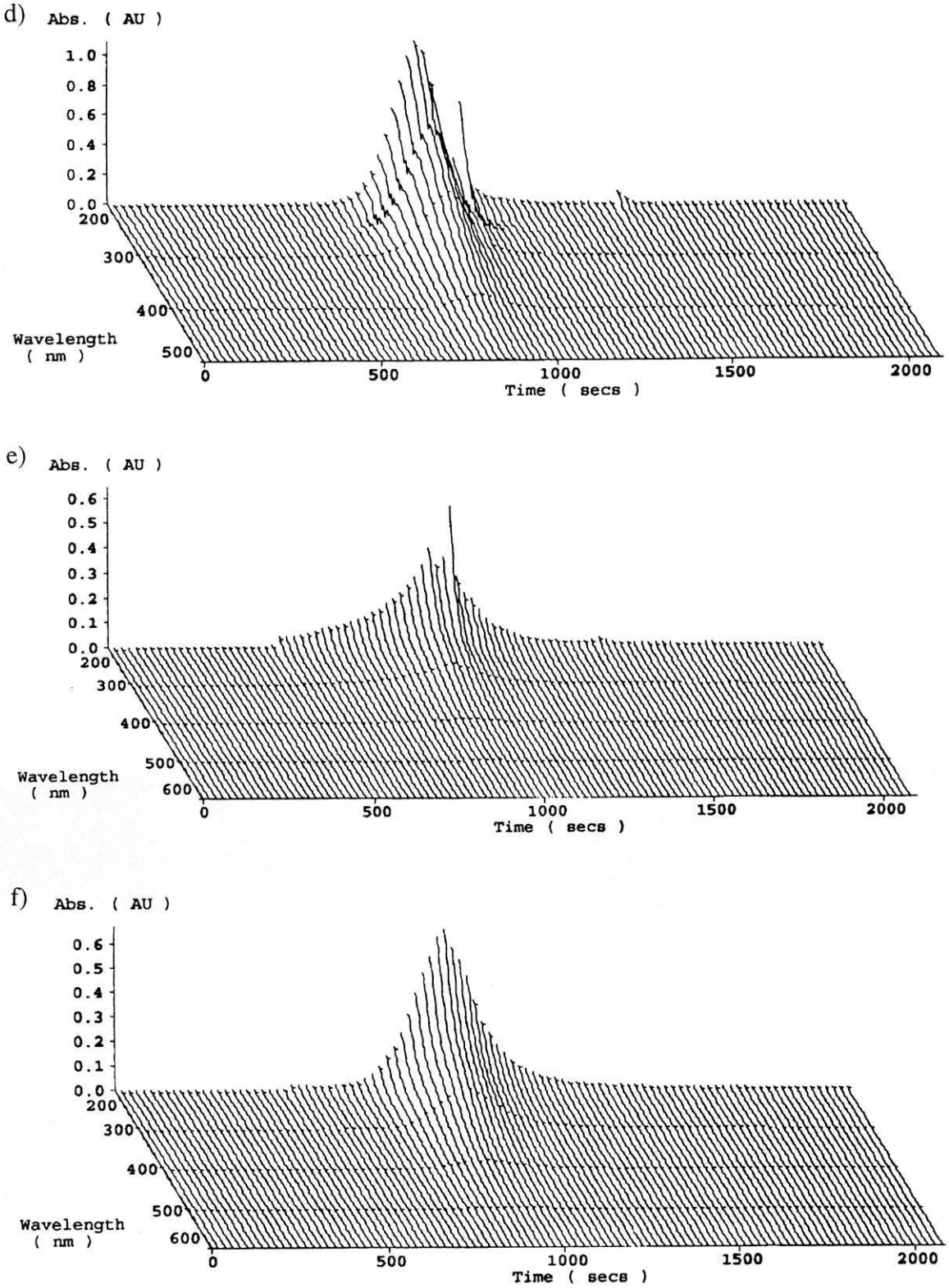


Figura 4.12 (continuação)

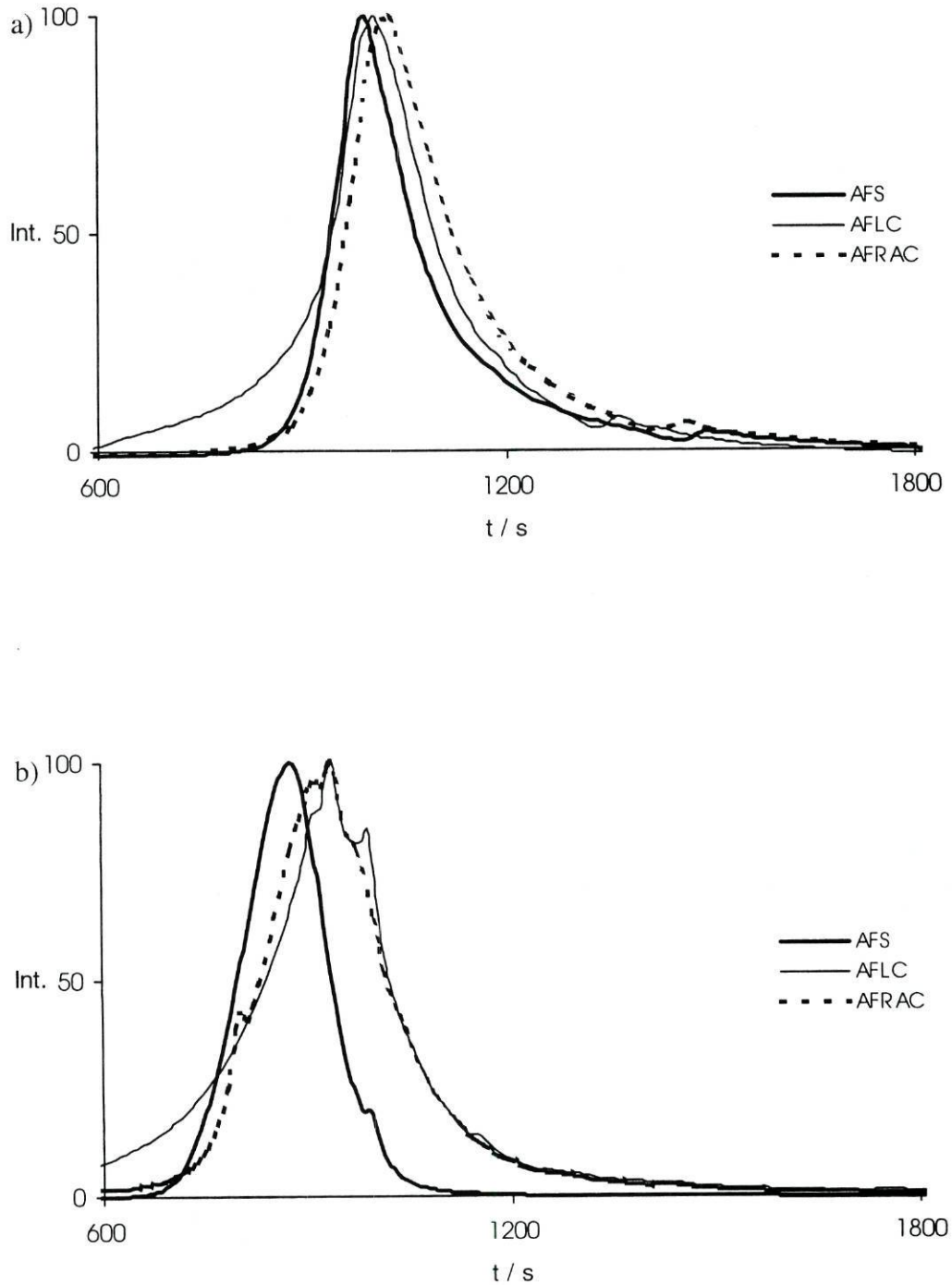


Figura 4.13 – Sobreposição de cromatogramas típicos das amostras AFS, AFLC e AFRAC a pH 6,00, [a)]; e pH 7,00, [b)]. Cortes a 255 nm.

cromatograma da amostra AFS surge sempre em primeiro lugar (esta diferença é mais clara a pH 7,00), o que poderá significar que esta amostra possui uma massa molecular média ligeiramente maior que a massa molecular média das amostras antropogénicas. Esta observação é de certo modo concordante com alguns resultados apresentados anteriormente, obtidos a partir das medições de UV-Vis (secção 4.3.2.2). A forma do cromatograma da amostra AFLC, em particular a sua fase ascendente, é diferente da forma dos cromatogramas das outras amostras, uma vez que o inicio da subida ocorre mais cedo e é mais suave. Este resultado sugere uma maior dispersão na distribuição de massas moleculares, em particular para valores de massas moleculares mais elevados.

Uma análise do comportamento das amostras aos dois valores de pH estudados (Figs. 4.12 e 4.13) permite verificar que os constituintes são eluídos mais cedo a pH 7,00, o que sugere que as moléculas de AF apresentam uma estrutura mais volumosa a pH mais alcalino. De facto, esta técnica baseia as separações efectuadas no volume hidrodinâmico das partículas e não apenas na massa molecular destas, pelo que a separação dos constituintes pode ser afectada por propriedades como a carga, a disposição estereoquímica ou mesmo o nível de hidratação [25]. Assim, o comportamento observado pode ser justificado pelo facto das moléculas de AF se encontrarem mais desprotonadas a valores de pH mais elevados, adquirindo por isso uma carga negativa mais intensa. Esse aumento de densidade de carga originará uma maior distensão das moléculas de forma às suas estruturas carregadas se afastarem o máximo entre si, pelo que as moléculas adquirirão volumes hidrodinâmicos mais elevados [18]. Ao inverso, a pH mais ácido ocorrerá uma contracção das moléculas provocada por uma menor densidade de cargas, sendo estas eluídas mais tardiamente. Esta hipótese poderia ser testada efectuando estudos a valores de pH mais ácidos. No entanto, a coluna de HP-SEC utilizada apresenta limites operacionais de pH, não permitindo trabalhar a valores relativamente ácidos.

Na Fig. 4.14 apresenta-se uma sobreposição dos espectros das amostras de AF obtidos para diversos tempos de retenção. Da análise desta figura pode verificar-se que a maior parte dos espectros com tempos de eluição distintos são diferentes entre si, em particular para as amostras antropogénicas, o que sugere que estes espectros correspondem a estruturas químicas distintas. No caso da amostra AFS, não se identificaram quaisquer diferenças nos espectros obtidos a pH 6,00 aos tempos de retenção 989 e 1036 s, embora a pH 7,00 já se observem diferenças nítidas entre eles.

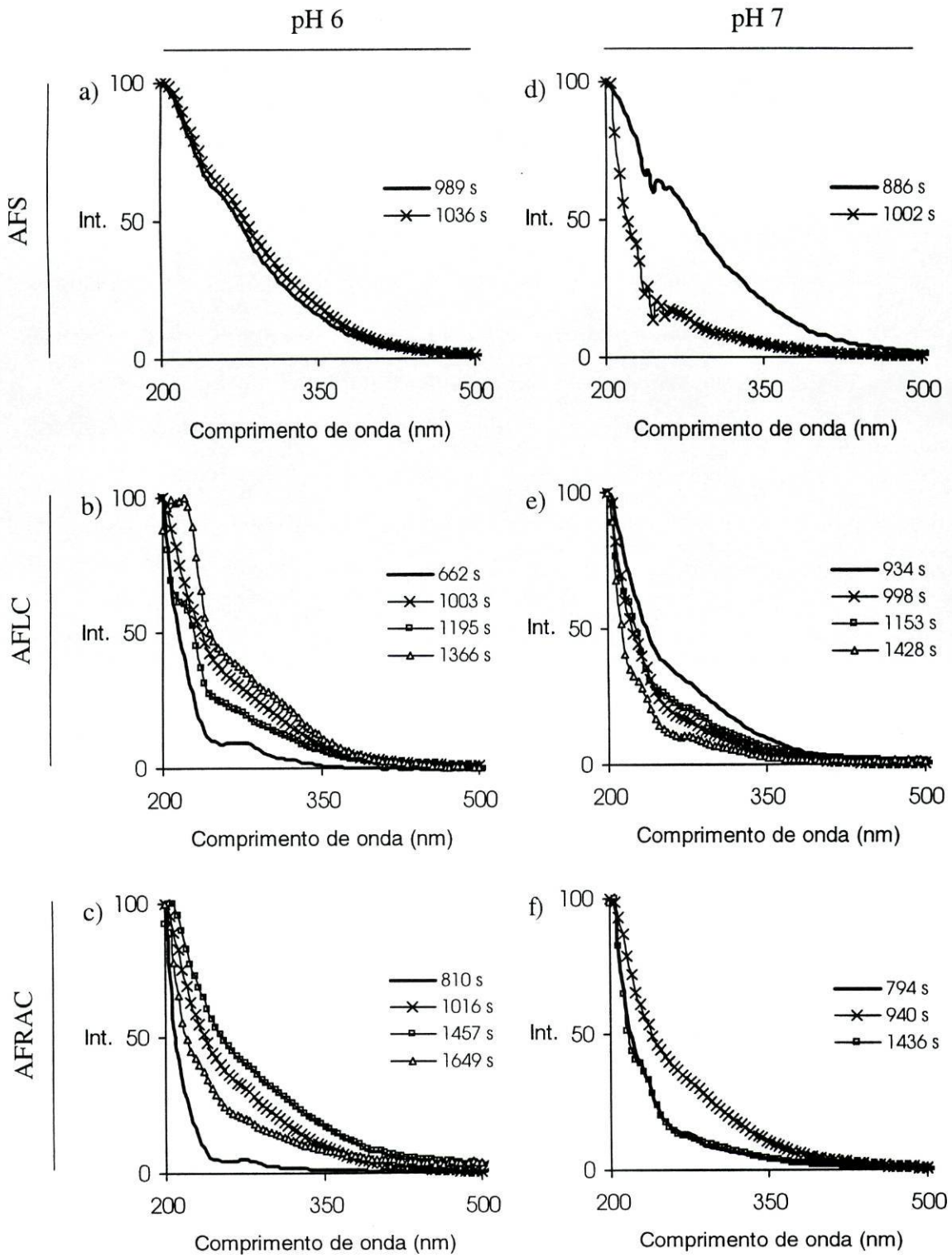


Figura 4.14 – Sobreposição dos espectros dos máximos detectados nas experiências de HP-SEC. Espectros agrupados de acordo com as amostras (AFS, [a), d)]; AFLC, [b), e)]; e AFRAC, [c), f)]) e o pH (6,00, [a) – c)]; e 7,00, [d) – f)]).

Estas observações mostram que as amostras de AF antropogénicos possuem uma heterogeneidade molecular superior à amostra de AF natural.

A Fig. 4.15 apresenta uma sobreposição de espectros das três amostras de AF, obtidos a tempos de eluição semelhantes. A análise desta figura permite verificar que os espectros das amostras de AF antropogénicos, AFLC e AFRAC, apresentam fortes semelhanças entre si, principalmente a pH 6,00, evidenciando a existência de estruturas químicas semelhantes. Pelo contrário, os espectros da amostra AFS são diferentes dos espectros das amostras de AF antropogénicos, suportando as observações anteriores quanto às dissemelhanças entre a amostra natural e as amostras antropogénicas.

4.3.7.2 – Compostos modelo simples dos AF, aminoácidos e amostras de pré-fúlvicos

De forma a efectuar um estudo preliminar do sistema de separação por tamanhos e assim avaliar a possibilidade de estimar tamanhos moleculares dos constituintes das amostras de AF, efectuaram-se alguns estudos com compostos modelo simples dos AF (ácido cafeico, catecol e salicilato de sódio), aminoácidos (tirosina, triptofano e fenilalanina) e amostras de pré-fúlvicos (cedidos por F. Rey, da Universidade de Vigo e E. Barrado, da Universidade de Valladolid) de diferentes origens (extraídos de folhas de carvalho, castanheiro, eucalipto e videira) a pH 6,00 e 7,00. Na Fig. 4.16 apresentam-se exemplos típicos dos conjuntos de espectros de UV-Vis destas amostras em função do tempo para pH 6,00 e na Fig. 4.17 os cromatogramas realizados aos máximos dos espectros (corte a 255 nm) aos dois valores de pH.

À semelhança do que se tinha observado para as amostras de AF, da análise da Fig. 4.17 pode constatar-se que a eluição dos máximos dos cromatogramas de uma forma geral ocorre mais cedo a pH 7,00. Uma análise comparativa desta figura com a Fig. 4.12 onde se apresentam os conjuntos de espectros das amostras de AF adquiridos em função do tempo, permite concluir que os registos obtidos para os compostos modelo simples e aminoácidos são semelhantes aos conjuntos de espectros adquiridos para as amostras de AF. No entanto, as amostras de AF apresentam uma largura do pico cromatográfico a meia altura de cerca de 100 s (Fig. 4.13), enquanto que os compostos modelo simples e aminoácidos apresentam larguras próximas de 30 a 40 s. Esta diferença já era esperada, uma vez que os AF deverão apresentar uma dispersão de massas moleculares à volta de um valor médio, ao contrário dos compostos modelo simples que têm uma massa molecular única e bem definida.

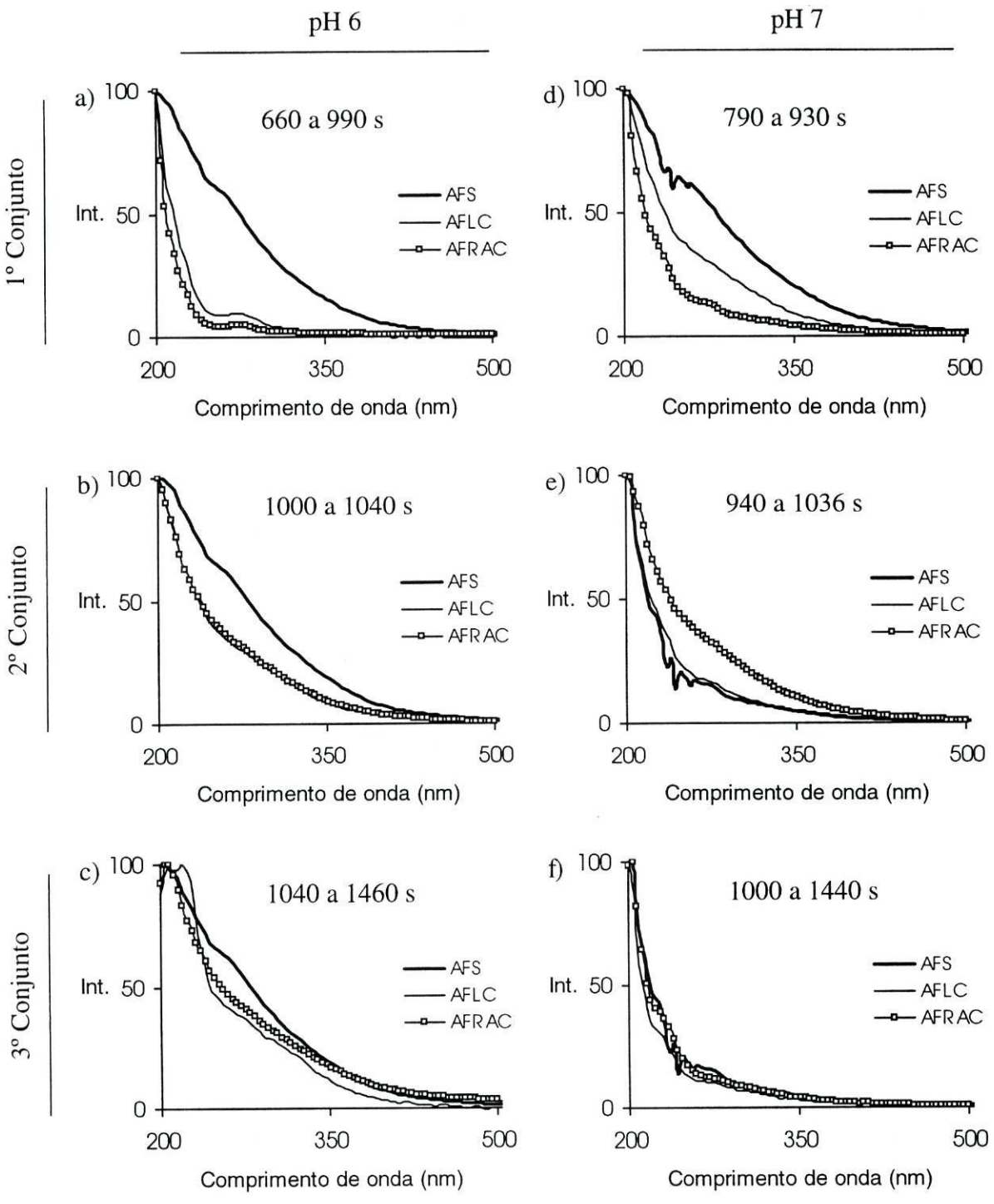


Figura 4.15 – Sobreposição dos espectros dos máximos agrupados conforme o tempo de eluição: 1° conjunto, [a), d)]; 2° conjunto, [b), e)]; e 3° conjunto [c), f)]. Experiências a pH 6,00 [a) - c)] e 7,00 [d) - f)].

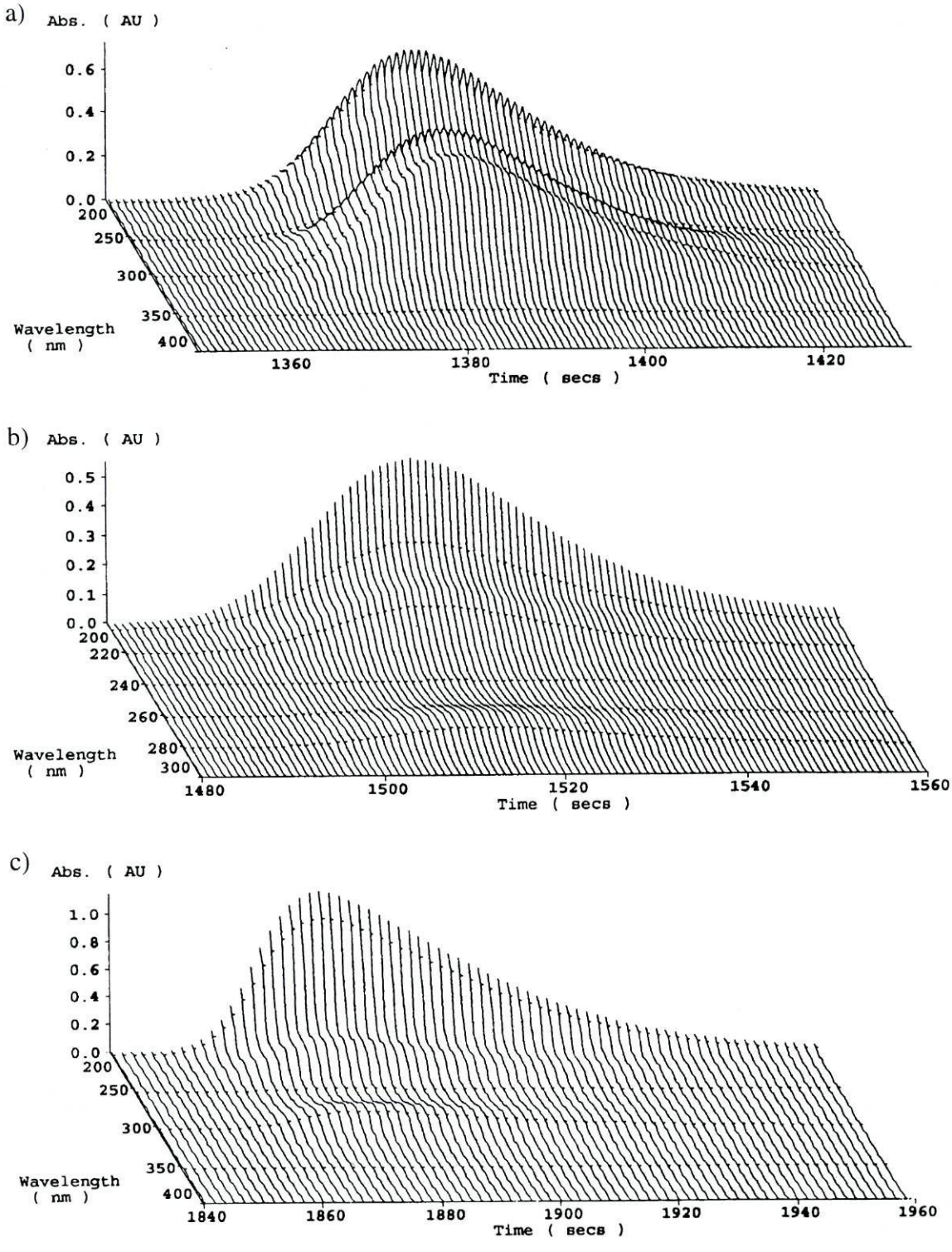


Figura 4.16 – Exemplos típicos de conjuntos de espectros de UV-Vis em função do tempo de compostos modelo simples dos AF a pH 6,00: a) ácido cafeico; b) catecol; e c) salicilato de sódio.

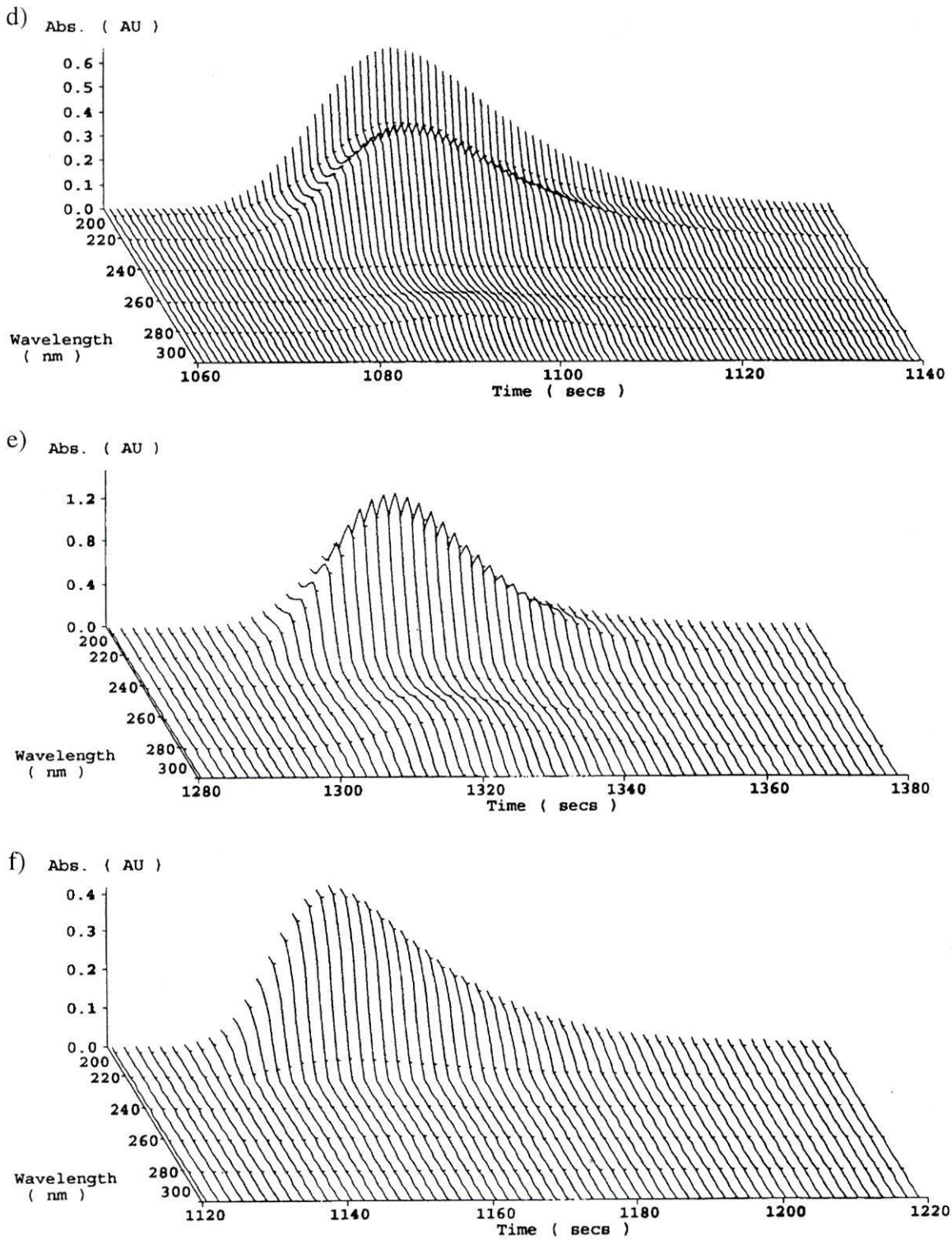


Figura 4.16 (continuação) – Exemplos típicos de conjuntos de espectros de UV-Vis em função do tempo de aminoácidos a pH 6,00: d) tirosina; e) triptofano; e f) fenilalanina.

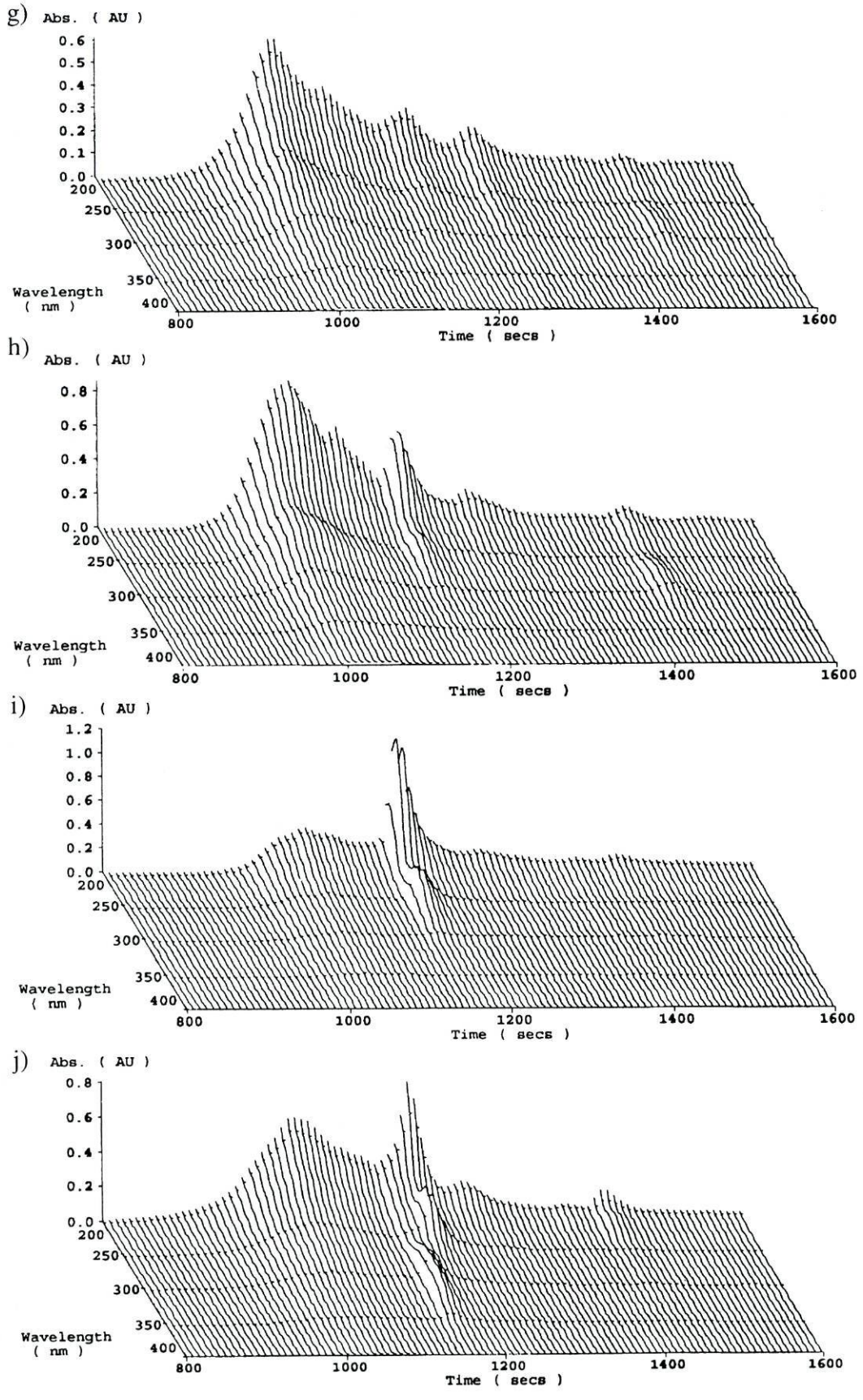


Figura 4.16 (continuação) – Exemplos típicos de conjuntos de espectros de UV-Vis em função do tempo de amostras de pré-fúlvicos extraídos de folhas de g) carvalho; h) castanheiro; i) eucalipto; e j) videira. Espectros a pH 6,00.

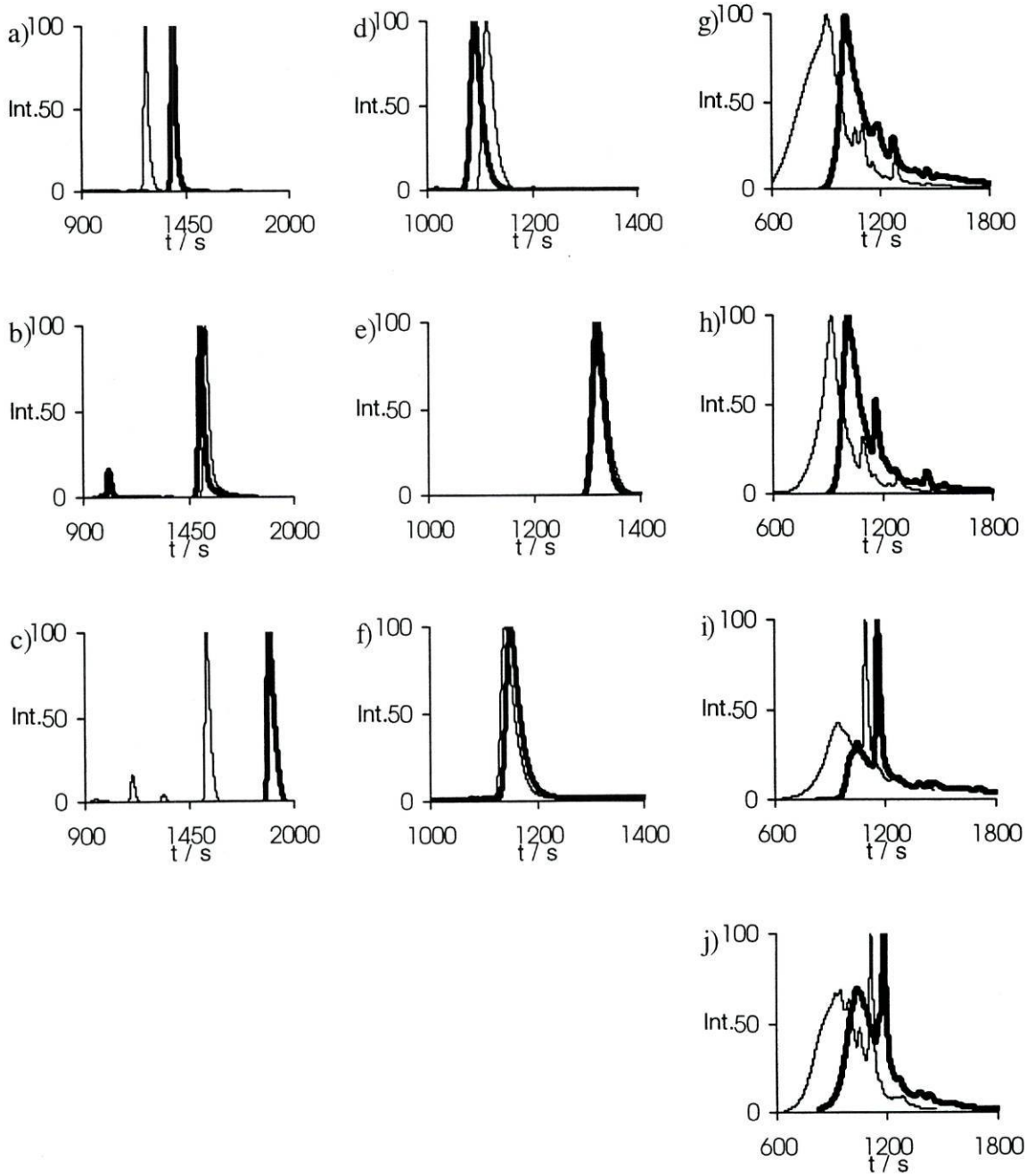


Figura 4.17 – Sobreposição de cromatogramas típicos a pH 6,00 (——) e 7,00 (——): (i) compostos modelo simples dos AF, a) ácido cafeico, b) catecol e c) salicilato de sódio; (ii) aminoácidos, d) tirosina, e) triptofano e f) fenilalanina; e (iii) amostras de pré-fúlvicos extraídos de folhas de g) carvalho, h) castanheiro, i) eucalipto e j) videira. Cortes a 255 nm.

Quando se comparam os tempos de eluição referentes a estas amostras com os tempos de eluição obtidos para as amostras de AF (Fig. 4.13), da ordem dos 1000 s a pH 6,00 e cerca de 50 a 100 s inferiores a pH 7,00, verifica-se que apenas as amostras de pré-fúlvicos apresentam bandas cromatográficas com tempos de eluição semelhantes a estes, sendo eluídos posteriormente todos os constituintes das outras amostras. Como seria de esperar, este facto demonstra que as amostras de AF apresentam estruturas bastante mais volumosas que as moléculas dos compostos simples. No caso das amostras de pré-fúlvicos, para além das bandas com tempos de eluição semelhantes às bandas dos AF foram detectadas outras bandas localizadas a tempos de retenção mais elevados. Este facto demonstra que as amostras de pré-fúlvicos apresentam um elevado grau de heterogeneidade molecular (eventualmente mais elevado que as amostras de AF), possuindo compostos mais simples e menos volumosos que os AF.

No caso particular dos aminoácidos, é de salientar que podendo estes apresentar uma carga global positiva ou negativa, esta pode provocar alterações ao seu normal tempo de eluição na ausência de qualquer carga, uma vez que o material de enchimento das colunas que é constituído à base de sílica, por vezes apresenta uma ligeira carga negativa devido à presença de grupos ácidos fracos [25]. Desta forma, os aminoácidos que apresentem cargas globais positivas tendem a ser mais retidos pela matriz, originando tempos de retenção superiores e sugerindo a presença de moléculas com tamanhos moleculares inferiores ao seu tamanho real. Por outro lado, os aminoácidos que apresentem cargas globais negativas tendem a ser repelidos da superfície do material de enchimento, resultando num menor acesso ao interior dos poros e numa eluição mais rápida [25].

4.3.7.3 – Análise dos cromatogramas com o auxílio de técnicas quimiométricas de reconhecimento de formas

Dada a natureza heterogénea das amostras e ao elevado número de picos detectados, é difícil efectuar uma análise comparativa dos espectros de UV-Vis obtidos aos máximos das bandas através de uma simples apreciação visual destes. Por este motivo, utilizaram-se técnicas de reconhecimento de formas, tendo-se efectuado-se uma análise da aglomeração dos espectros de UV-Vis correspondentes a todos os máximos detectados nos cromatogramas. Na Tabela 4.11 indicam-se os códigos das amostras utilizados na análise da aglomeração.

Tabela 4.11 – Legenda dos códigos utilizados na construção dos dendogramas da Fig. 4.18 [&].

Amostra	Código da amostra	Tempo de retenção /s	Código do tempo de retenção
Ácido cafeico	CAF	1005	1
Catecol	CAT		
Salicilato de sódio	SAL		
Tirosina	TYR	1040	2
Triptofano	TRY		
Fenilalanina	PHE	1080	3
AF extraídos de folhas de carvalho	OA		
AF extraídos de folhas de castanheiro	CH	1170	4
AF extraídos de folhas de eucalipto	EU		
AF extraídos de folhas de videira	VI	1250	5
AFS	PW		
AFLC	CS	1460	6
AFRAC	AR		

& – No caso das amostras cujos cromatogramas são constituídos por bandas múltiplas, o código utilizado no dendograma é formado pela associação do código da amostra com o código do tempo de retenção.

Na Fig. 4.18 apresentam-se os resultados (dendogramas) da análise da aglomeração dos espectros e na Tabela 4.12 a composição de cada um dos aglomerados detectados. A análise da Fig. 4.18 mostra que existe aglomeração de espectros, sendo detectadas diversas classes de similaridade (foram colocadas linhas a tracejado sobre os dendogramas para indicar o nível de similaridade de cada aglomerado de espectros). Para que a similaridade dos aglomerados assinalados fosse semelhante, o nível de similaridade a utilizar nessa análise deveria ser único. No entanto, a adoptar-se um critério único, que seria cerca de 10 (ver Fig. 4.18), obter-se-ia um aglomerado que conteria a maior parte das amostras, perdendo-se alguma informação mais detalhada. Por este motivo, optou-se em alguns casos por dividir o maior aglomerado em fracções mais pequenas, o que foi conseguido por redução do critério de similaridade para valores inferiores a 5 (ver Fig. 4.18).

Uma análise global da composição dos aglomerados detectados (Tabela 4.12) permite constatar que os espectros das substâncias simples não se agrupam com os espectros das amostras de AF ou pré-fúlvicos, pelo que se infere que os primeiros possuem estruturas químicas bastante diferentes dos AF. Este facto reforça uma das conclusões retiradas da análise comparativa das Figs. 4.13 e 4.17, segundo a qual apenas as amostras de pré-fúlvicos apresentam tempos de eluição semelhantes aos das amostras de AF. Assim, sendo as amostras de aminoácidos e de ligandos modelo dos AF eluídas mais tardiamente, pode concluir-se que possuem volumes hidrodinâmicos inferiores aos das moléculas de AF.

Os espectros das amostras de AF e de pré-fúlvicos registados ao máximo do pico localizado a 1005 s tendem a agruparem-se (grupos A e B a pH 6 e grupos A e C a pH 7, Tabela 4.12). Este facto mostra que a este tempo de eluição as fracções moleculares serão semelhantes.

Uma das limitações da análise de similaridade dos espectros de UV-Vis das diversas fracções está relacionada com a limitada capacidade de classificação da técnica de detecção, ou seja, é uma técnica que não gera grande quantidade de informação sobre as amostras em análise. Apesar desta falta de resolução, os resultados obtidos na análise da aglomeração evidenciam que as amostras de AF e pré-fúlvicos não possuem estruturas semelhantes às substâncias simples. Por outro lado, as semelhanças detectadas nos espectros poderão não corresponder a estruturas do mesmo tipo.

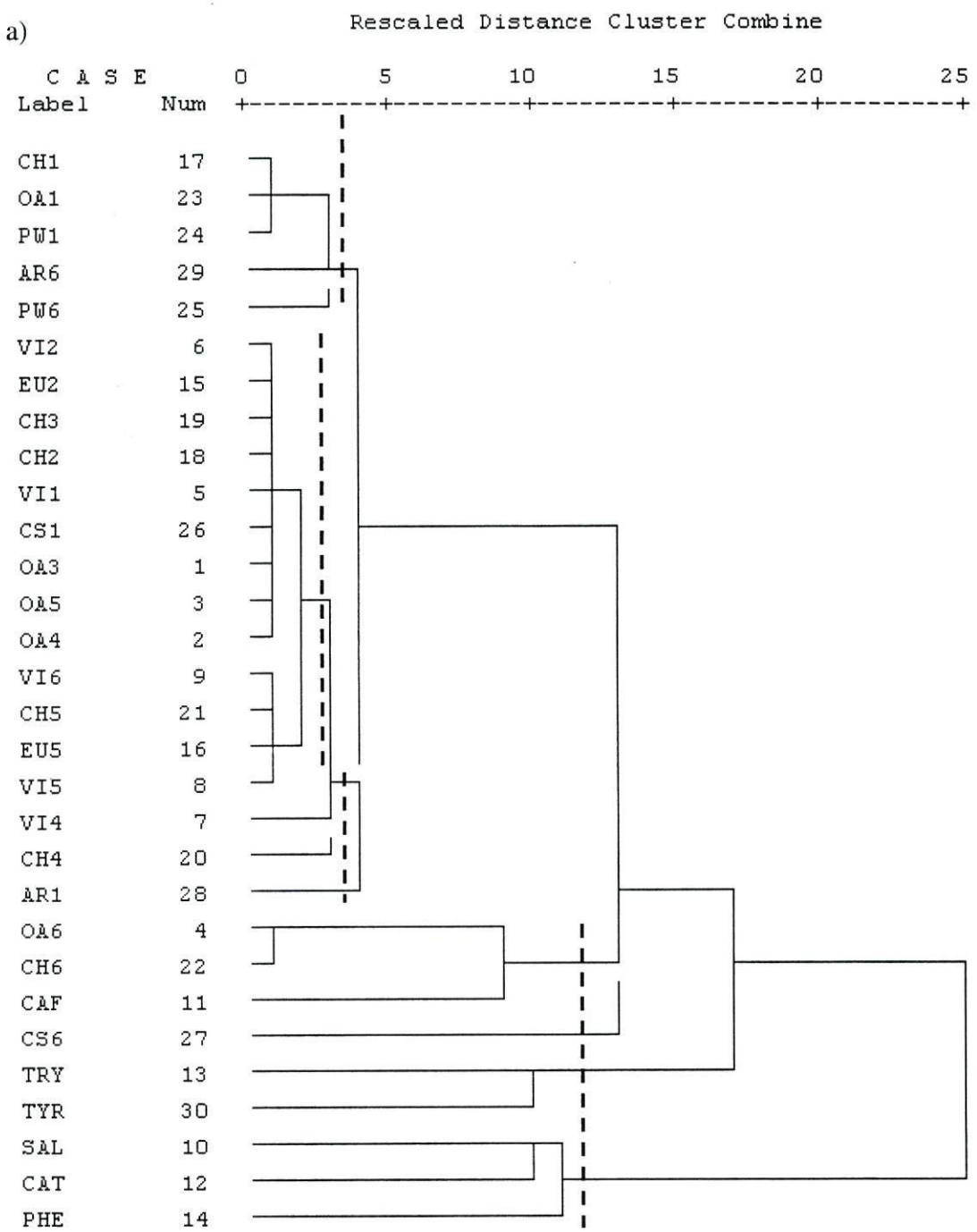


Figura 4.18 – Dendogramas obtidos por análise de aglomeração dos espectros de UV-Vis dos máximos obtidos a pH 6,00 [a)] e 7,00 [b)]. A legenda dos códigos utilizados na figura encontra-se na Tabela 4.11. As linhas a tracejado indicam os critérios de selecção utilizados na análise de aglomeração.

b)

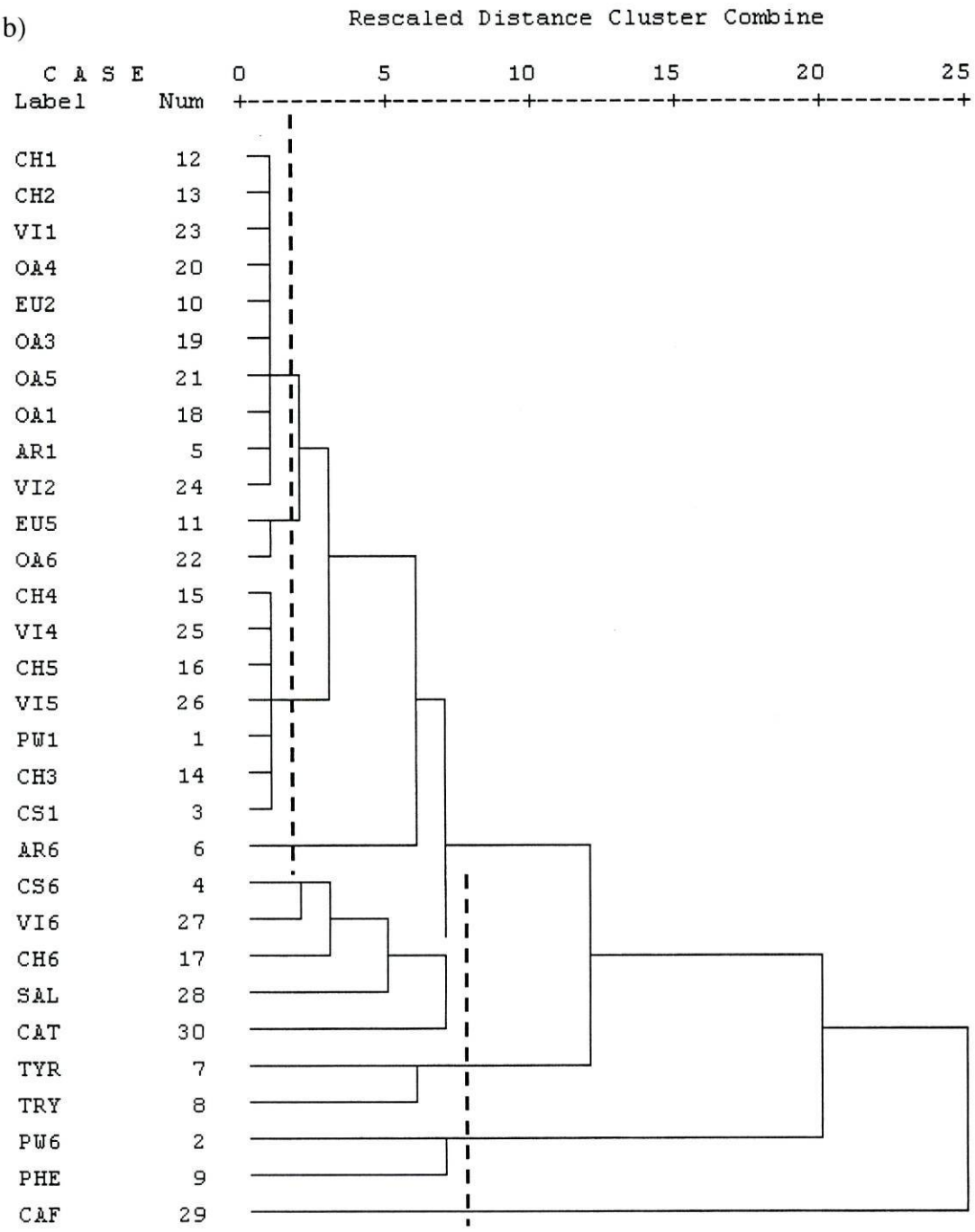


Figura 4.18 (continuação)

Tabela 4.12 – Resultados da análise da aglomeração dos espectros de UV-Vis das amostras de AF, ligandos modelo dos AF, aminoácidos e amostras de pré-fúlvicos [&].

pH 6				pH 7			
Grupo	Amostra	Tempo de eluição / s	MM	Grupo	Amostra	Tempo de eluição / s	MM
A	AF Castanheiro	1005	--	A	AFRAC	1005	--
	AF Carvalho		--		AF Videira		--
	AFS		--		AF Castanheiro		--
	AFRAC	1460	--		AF Carvalho		--
	AFS		--		AF Eucalipto	1040	--
B	AFLC	1005	--		AF Videira		--
	AF Videira		--		AF Castanheiro		--
	AF Eucalipto	1040	--		AF Carvalho	1080	--
	AF Videira		--		AF Carvalho	1170	--
	AF Castanheiro		--		AF Carvalho	1250	--
	AF Carvalho	1080	--	B	AF Eucalipto	1250	--
	AF Castanheiro		--		AF Carvalho	1460	--
	AF Carvalho	1170	--	C	AFS	1005	--
	AF Eucalipto	1250	--		AFLC		--
	AF Videira		--		AF Castanheiro	1080	--
	AF Castanheiro		--		AF Videira	1170	--
	AF Carvalho		--		AF Castanheiro		--
	AF Videira	1460	--		AF Videira	1460	--
C	AF Videira	1170	--		AF Castanheiro		--
	AF Castanheiro		--	D	AFRAC	1460	--
D	AFRAC	1005	--	E	AFLC	1460	--
E	Ácido cafeico		180,2		AF Videira		--
	AF Carvalho	1460	--		AF Castanheiro		--
	AF Castanheiro		--		Salicilato de sódio		160,1
F	AFLC	1460	--		Catecol		110,1
G	Tirosina	1091	181,2	F	Tirosina		181,2
	Triptofano	1320	204,2		Triptofano		204,2
H	Salicilato de sódio	1875	160,1	G	AFS	1460	--
	Catecol	1520	110,1		Fenilalanina		165,2
	Fenilalanina	1135	165,2	H	Ácido cafeico		--

& – MM, massa molecular (g/mol).

Nas Figs. 4.19a e 4.19b apresentam-se os espectros médios e de desvio padrão dos grupos detectados nas análises de aglomeração a pH 6,00 e 7,00. Da análise desta figuras pode verificar-se que os espectros médios calculados para cada grupo são diferentes entre si, o que justifica a inclusão destas fracções moleculares em grupos distintos. Por outro lado, verifica-se também que a intensidade dos espectros de desvio padrão não é muito elevada, sugerindo uma grande semelhança entre os espectros contidos em cada grupo.

4.3.7.4 – Possibilidade de calibração da coluna de HP-SEC

Após esta análise prévia do comportamento de amostras de AF quando inseridas num sistema de HP-SEC, o procedimento seguinte poderia ser a estimativa da sua massa molecular média, para a qual seria necessário efectuar a calibração da coluna cromatográfica. Existem alguns estudos publicados onde se utilizaram padrões de polissacarídeos [26], sulfonato de poliestireno [27-29] e polietileno glicol [28,30] para efectuar essa calibração. Em face dos resultados obtidos neste trabalho para os compostos simples e às variações do tempo de retenção provocadas pela alteração do pH, parece muito difícil a execução de uma calibração que permita obter valores rigorosos da distribuição de massas moleculares das amostras de AF. Por outro lado, para além dos custos excessivamente elevados das amostras padrão utilizadas em estudos de AF, não existem quaisquer garantias que essas calibrações permitam obter resultados satisfatórios. Rigorosamente, a calibração de um sistema HP-SEC para AF deveria ser efectuada com amostras de AF previamente caracterizadas por outras técnicas. Como esta tarefa envolve meios logísticos e tempo que não estão previstos neste trabalho, não se efectuou a determinação de massas moleculares das amostras de AF.

4.4 – CONCLUSÕES

A estratégia utilizada neste trabalho para a caracterização das amostras de AF sob estudo mostrou ser válida. De facto, obteve-se um conjunto de informação sobre as propriedades químicas das amostras que permitiu efectuar uma análise destas, tanto em termos comparativos, como em termos absolutos. Note-se que a natureza dos AF,

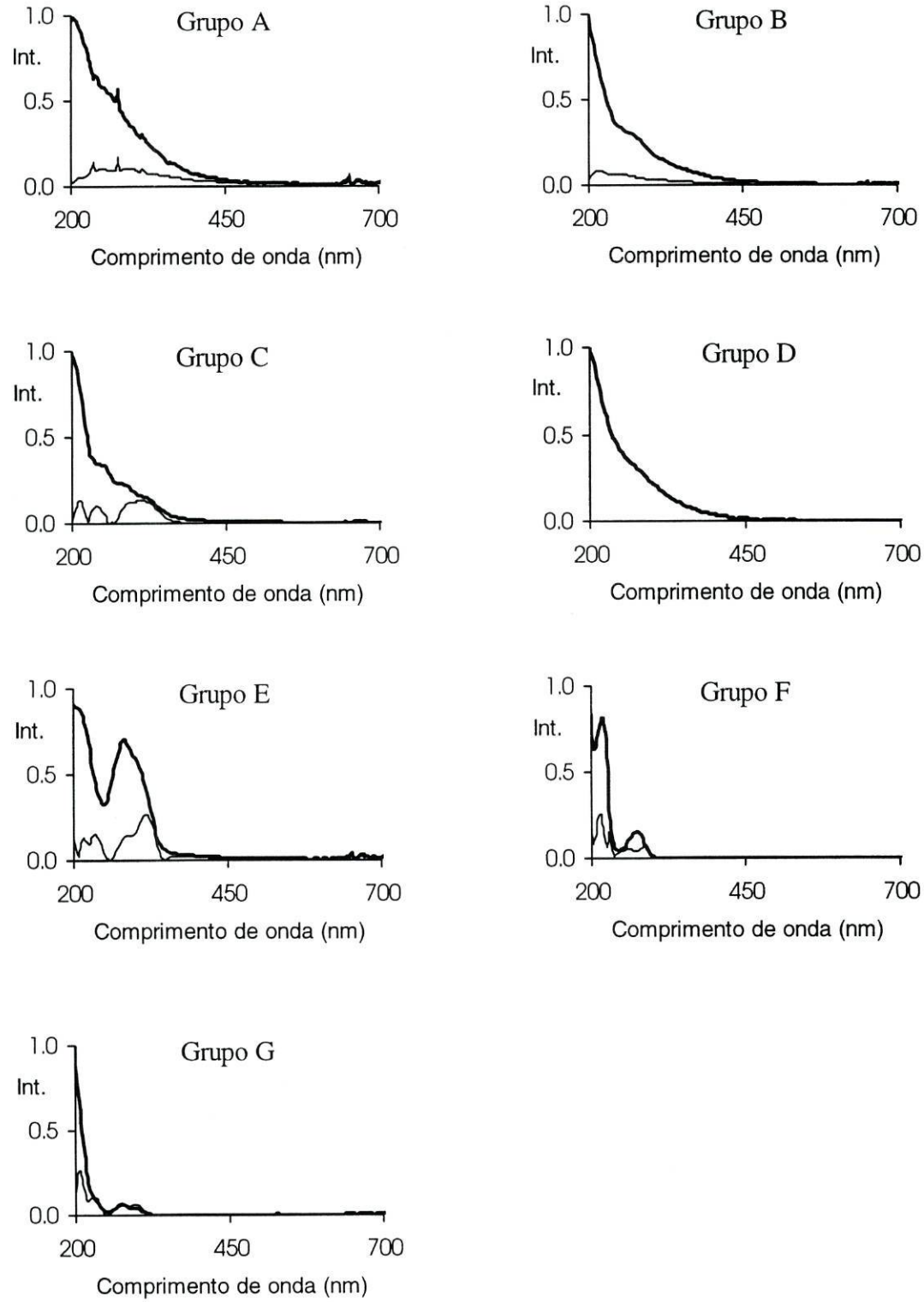


Figura 4.19a – Espectros médios (——) e de desvio padrão (——) dos grupos detectados na análise de aglomeração (Tabela 4.12) das experiências de HP-SEC a pH 6,00.

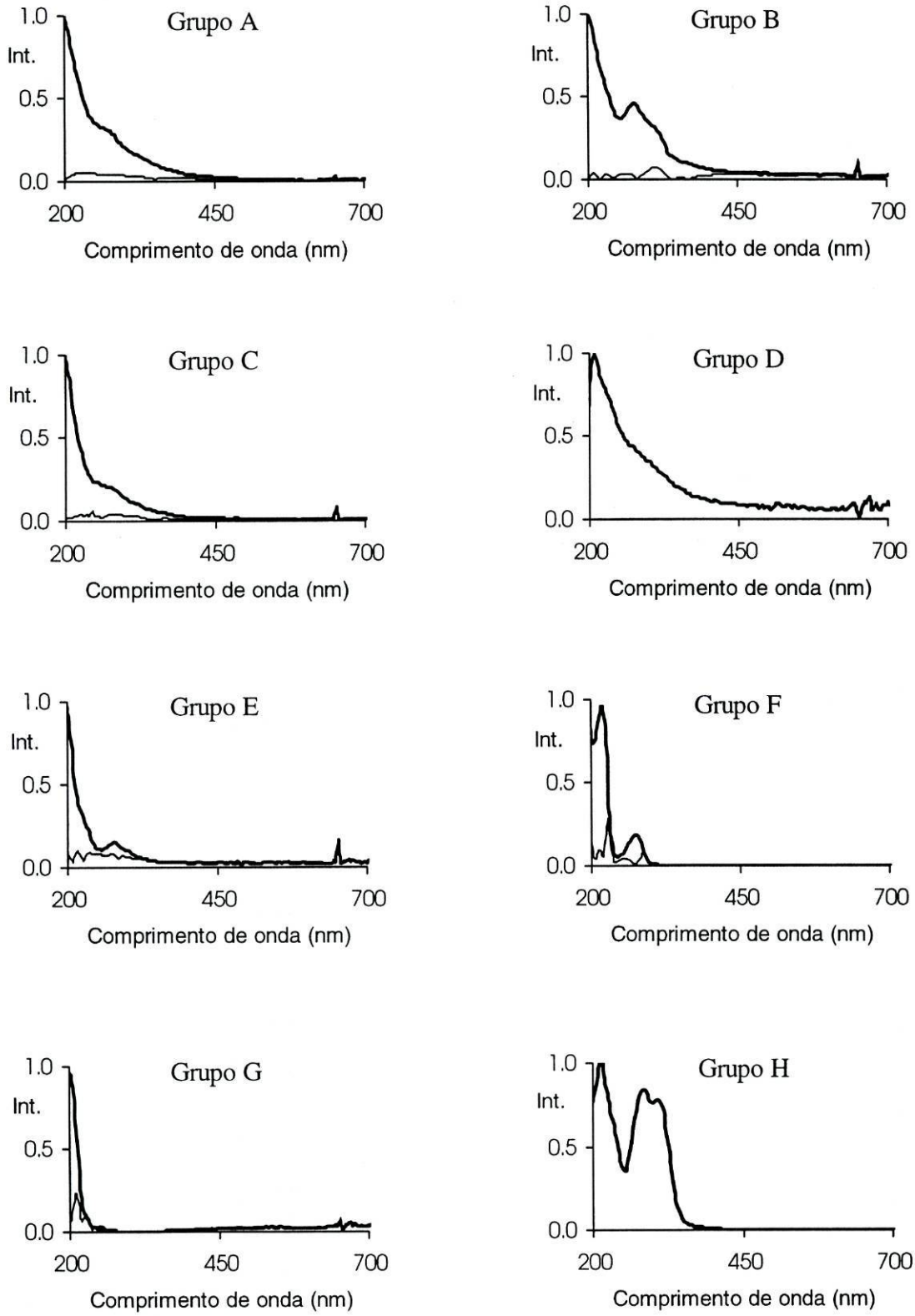


Figura 4.19b – Espectros médios (——) e de desvio padrão (——) dos grupos detectados na análise de aglomeração (Tabela 4.12) das experiências de HP-SEC a pH 7,00.

acrescida da pouca resolução relativa das metodologias de análise química na caracterização de amostras de extractos muito complexos quimicamente e que foram obtidos segundo um processo de extracção igual, limita a identificação de pormenores finos nas suas propriedades físico-químicas.

Uma análise global dos resultados relativos às amostras de AF permite verificar que as amostras naturais exibem características diferentes das amostras antropogénicas. Nas Tabelas 4.13.a a 4.13.d apresentam-se de uma forma resumida os tópicos que mais contribuíram para salientar as diferenças existentes entre as amostras estudadas.

Uma análise relativa à composição elementar e aos grupos funcionais (Tabela 4.13.a) mostra que as amostras de AF antropogénicas se caracterizam por uma quantidade dos elementos enxofre e azoto superior às amostras naturais, uma maior quantidade de estruturas alifáticas e um menor número de estruturas aromáticas.

No que respeita aos grupos envolvidos em reacções de ácido-base (Tabela 4.13.b), nomeadamente grupos carboxílicos e fenólicos mais ácidos, verifica-se que os AF antropogénicos apresentam uma menor quantidade de grupos ácidos mais fortes (eventualmente estruturas do tipo salicílico com um $pK_a \approx 3$). No entanto, a quantidade global de grupos ácidos é semelhante nos dois tipos de amostras, provavelmente graças a uma maior abundância de estruturas ácidas mais fracas nos AF antropogénicos, como por exemplo grupos fenólicos, grupos amino de aminoácidos e grupos hidroxílicos. Uma análise superficial das estruturas envolvidas na complexação de catiões metálicos (Tabela 4.13.c) mostrou que algumas amostras de AF antropogénicos exibem uma concentração de sítios ligantes inferior à das amostras restantes.

A análise da distribuição de massas moleculares (Tabela 4.13.d) permitiu detectar para as amostras de AF antropogénicas massas ligeiramente inferiores que as amostras naturais, sendo a respectiva distribuição de massas caracterizada por uma maior heterogeneidade e maior dispersão.

Tabela 4.13.a – Particularidades das amostras de AF antropogénicos: características elementares e informações espectroscópicas.

Propriedade	**AF antropogénicos**
Análises elementares	• Contêm enxofre. • Contêm maior quantidade de azoto.
Razões atómicas	• Razões azoto/carbono e hidrogénio/carbono superiores.
Espectros de RMN de ^{13}C	• Menor percentagem de carbonos aromáticos e carboxílicos.
Espectros de UV-Vis	• Massas moleculares inferiores. • Menor percentagem de aromaticidade.
Espectros de IV	• Menor quantidade de estruturas aromáticas. • Maior quantidade de estruturas alifáticas (C-H).
Espectros de fluorescência molecular síncrona	• Bandas mais intensas a comprimentos de onda inferiores a 370 nm (menor condensação de estruturas fluorescentes, provavelmente aromáticas). • Contêm uma banda característica a 280 nm (material facilmente degradado em ambientes naturais).

Tabela 4.13.b – Particularidades das amostras de AF antropogénicos: propriedades dos grupos envolvidos em reacções de ácido-base.

Propriedade	AF antropogénicos
Grupos ácido-base	• Acidez total semelhante às amostras naturais. • Quantidades quase nulas de grupos ácidos mais fortes (pK_a cerca de 3). • Maior quantidade de grupos ácidos mais fracos. • Na amostra AFLC detectou-se claramente por condutimetria uma terceira classe de grupos ácidos.

Tabela 4.13.c – Particularidades das amostras de AF antropogénicos: propriedades dos grupos envolvidos em reacções de complexação.

Propriedade	AF antropogénicos
Sítios ligantes	• Estabilidade dos complexos metálicos idêntica. • Valores mais elevados de fluorescência residual. • Na amostra AFRAC a concentração de sítios ligantes é cerca de metade da amostra AFS.

Tabela 4.13.d – Particularidades das amostras de AF antropogénicos: distribuição de massas moleculares.

Propriedade	AF antropogénicos
Distribuição de MM	• Massas moleculares ligeiramente inferiores. • Maior dispersão da distribuição de massas moleculares. • Maior heterogeneidade molecular. • Espectros diferentes da amostra natural, indicando a presença de estruturas químicas distintas.

4.5 – BIBLIOGRAFIA

[1] F. J. Stevenson, Humus Chemistry, Wiley, Nova York, 1982, Cap. 11.

[2] Handbook of Chemistry and Physics, David R. Lide (Ed.), CRC Pres, Inc., Florida, 70th Edition, 1989-90.

[3] N. Senesi, T. M. Miano e G. Brunetti, *Humic-like Substances in Organic Amendments and Effects on Native Soil Humic Substances*, em Humic Substances in Terrestrial Ecosystems, Alessandro Picolo (Ed.), Elsevier, Amsterdão, 1966, Cap. 14.

[4] Z. Wang, D. S. Gamble e C. H. Langford, *Environ. Sci. Technol.*, 1992, **26**, 560-565.

[5] Y. P. Chin, G. Aiken e E. O'Longhlin, *Environ. Sci. Technol.*, 1994, **28**, 1853-1858.

[6] A. B. S. Falcão, *Estudo das transformações de ácidos fúlvicos provenientes de materiais reciclados usados como adubos agrícolas*, Relatório de Seminário Científico, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto, 1997.

[7] Espectro que acompanha a amostra de AF da marca Fredriks Research Products, Burg. de Vlugtlaan 259, 1063 BM Amsterdão, Holanda.

[8] P. MacCarthy e J. A. Rice, *Spectroscopy Methods (other than NMR) for Determining Functionality in Humic Substances*, G. R. Aiken, D. M. McKnight, R. L. Wershaw e P. MacCarthy (Eds.), em Humic Substances in Soil, Sediment and Water, Wiley, Nova York, 1985, Cap. 21.

[9] W. V. Gerasimowicz, D. M. Byler e H. Susi, *Appl. Spectrosc.*, 1986, **40**, 504.

[10] J. C. Esteves da Silva e A. A. Machado, *Analyst*, 1995, **120**, 2553-2560.

[11] D. S. Gamble, *Can. J. Chem.*, 1970, **48**, 2662-2669.

[12] F. J. Stevenson, Humus Chemistry, Wiley, Nova York, 1982, Cap. 13.

[13] J. C. G. Esteves da Silva, *Acid-base and metal ion complexation properties of humic substances studied by chemometric analysis of spectroscopic-potenciometric hyphenated data*, Tese de Doutoramento, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto, 1994.

[14] M. A. B. A. Silva, *Estudo das propriedades de ácido-base de ácidos fúlvicos extraídos de lamas residuais e de compostos*, Relatório de Seminário Científico, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto, 1996.

[15] J. R. M. Dias, *Estudo das propriedades ácido-base de ácidos fúlvicos extraídos de misturas de um solo natural com lixos reciclados*, Relatório de Seminário Científico, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto, 1998.

[16] P. C. Hiemenz, Principles of Colloid and Surface Chemistry, Marcel Dekker, Nova York, 1986, Cap. 8.

[17] N. M. van Os, J. R. Haak e L. A. M. Rupert, Physico-Chemical Properties of Selected Anionic, Cationic and Nonionic Surfactants, Elsevier, Londres, 1993.

[18] F. J. Stevenson, Humus Chemistry, Wiley, Nova York, 1982, Cap. 12.

[19] M. A. G. T. van Der Hoop, H. P. van Leeuwen e R. F. M. J. Cleven, *Anal. Chim. Acta*, 1990, **232**, 141-148.

[20] A. S. Mathuthu, J. A. Marinsky e J. H. Ephraim, *Talanta*, 1995, **42**, 441-447.

[21] J. Ephraim, S. Alegret, A. Mathuthu, M. Bicking, R. L. Malcolm e J. A. Marinsky, *Environ. Sci. Technol.*, 1986, **20**, 354-366.

[22] C. J. Santos Oliveira, *Estudo da complexação de ácidos fúlvicos com UO_2^{2+} e Fe(III) por fluorescência molecular e das propriedades de ácido-base de compostos modelo de ácidos fúlvicos por FTIR*, Tese de Mestrado, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto, 1997.

[23] J. C. Esteves da Silva, A. A. Machado e C. J. S. Oliveira, *Anal. Chim. Acta*, 1997, **349**, 23-31.

[24] M. S. S. D. S. Pinto, *Estudo da interacção entre o Cu(II) e ácidos fúlvicos extraídos de materiais antropogénicos por fluorescência molecular*, Relatório de Seminário Científico, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto, 1996.

[25] E. G. Malawer, *Introduction to Size Exclusion Chromatography*, C. Wu (Ed.), em Handbook of Size Exclusion Chromatography, Marcel Dekker, Nova York, 1995, Cap. 16.

[26] R. Rausa, E. Mazzolari e V. Calemma, *J. Chromatogr.*, 1991, **541**, 419-429.

[27] J. Kilduff, T. Karanfil, Y. Chin e W. Weber Jr., *Environ. Sci. Technol.*, 1996, **30**, 1336-1343.

[28] J. Peuravuori e K. Pihlaja, *Anal. Chim. Acta*, 1997, **337**, 133-149.

[29] C. Pelekani, G. Newcombe, V. Snoeyink, C. Hepplewhite, S. Assemi e R. Beckett, *Environ. Sci. Technol.*, 1999, **33**, 2807-2813.

[30] Q. Zhou, S. E. Cabaniss e P. A. Maurice, *Wat. Res.*, 2000, **34**, 3505-3514.

5 – ESTUDO DAS INTERACÇÕES ENTRE CATIÕES METÁLICOS E AF

5.1 – INTRODUÇÃO

Neste capítulo apresentam-se os resultados do estudo das interacções entre AF extraídos de solos naturais e de materiais antropogénicos e os catiões metálicos Cu(II), Pb(II) e Cd(II). Para este efeito, desenvolveram-se diferentes procedimentos experimentais e de tratamento de dados com o objectivo de avaliar as propriedades de equilíbrio químico e a cinética dessas interacções. Os estudos foram dirigidos sobre quatro amostras de AF, duas de origem natural, AFS e AFLau, e duas de origem antropogénica, AFLC e AFRAC, cuja origem e materiais de base se encontram indicados na Tabela 3.1 do Capítulo 3. Para se avaliar a existência de uma eventual alteração na capacidade de retenção de metais em solos aos quais se adicionaram materiais orgânicos reciclados, pretendeu-se também analisar as propriedades de complexação de AF extraídos de misturas de solo natural com materiais compostados (Tabela 3.1 do Capítulo 3).

Numa primeira fase do trabalho, estudaram-se as propriedades de complexação dos catiões Cu(II), Pb(II) e Cd(II) com amostras de AF de concentração 25 mg/L a pH 6. Nestes estudos, utilizou-se como técnica experimental a potenciometria com eléctrodos selectivos a catiões, que teoricamente permite obter os resultados mais exactos. No entanto, dadas as suas limitações operacionais, nomeadamente as eventuais interferências sentidas no funcionamento dos eléctrodos selectivos a pHs mais ácidos, optou-se por aplicar esta técnica somente em experiências realizadas a pH 6. Por outro lado, como a calibração dos eléctrodos deve ser efectuada na solução que está a ser titulada (secção 3.4.4.3 do Capítulo 3), essa curva de titulação deverá conter uma zona onde a concentração total de catião metálico seja aproximadamente igual à sua concentração livre, o que só é alcançável se a concentração de ligando for relativamente baixa. Por este facto, esta técnica foi utilizada apenas em soluções relativamente diluídas de AF (25 mg/L).

Numa segunda fase do trabalho, utilizou-se a técnica de fluorescência molecular síncrona no estudo das propriedades de complexação de catiões metálicos com AF a concentrações destes últimos superiores a 25 mg/L e/ou a valores de pH inferiores a 6.

O sinal desta técnica resulta do estado molecular dos AF, não sendo directamente influenciado pela presença de catiões metálicos, pelo que a sua utilização se apresenta bastante versátil. No entanto, a fluorescência molecular apenas detecta a complexação que envolve as estruturas fluorescentes (as estruturas não fluorescentes não contribuem para o sinal analítico). No caso de existirem fracções de catião metálico ligado a moléculas não fluorescentes dos AF, estas induzirão erros não quantificados no cálculo dos parâmetros de equilíbrio, o que poderá representar uma das limitações do método. Nesta fase do trabalho, estudou-se o efeito do pH (3, 4, 5 e 6) e da concentração de AF (25, 50 e 100 mg/L) nos parâmetros de complexação das amostras AFS, AFLC e AFRAC com o catião Cu(II).

Numa terceira fase do trabalho pretendeu-se obter dados sobre a cinética das reacções químicas entre os AF e os catiões metálicos. Num primeiro estudo, desenvolveu-se uma metodologia para a quantificação de catiões metálicos a níveis vestigiais, tendo-se utilizado um método de análise de dados livre de modelos rígidos. Neste trabalho optou-se pelo método PARAFAC por este efectuar a decomposição de matrizes lineares de três vias de uma forma única e sem impor modelos rígidos. Experimentalmente, utilizaram-se matrizes de dados cinético-espectrofotométricos correspondentes a misturas binárias e ternárias de catiões metálicos pesados [Zn(II), Ni(II), Pb(II), Co(II) e Cd(II)]. Estas matrizes de dados de três vias foram construídas através da aquisição de espectros de soluções padrão com diferentes concentrações relativas dos catiões, durante reacções de substituição de ligando provocadas pela adição de EDTA a misturas de catiões metálicos e do indicador metalocrómico não selectivo 4-(2-pyridylazo)resorcinol (PAR). Os resultados deste trabalho servem como ponto de partida no desenvolvimento de metodologias analíticas para a detecção de catiões metálicos pesados na gama de concentrações dos micromolar, que numa fase subsequente possam incorporar novas metodologias de estudo das propriedades cinéticas das reacções de complexação entre os AF e os catiões metálicos.

O estudo cinético prosseguiu com a aplicação de uma metodologia clássica de tratamento de dados cinéticos das reacções de complexação entre AF e os catiões Cu(II) e Ni(II), designadamente o método das transformadas de Laplace. Este método foi seleccionado por permitir obter informação numa base livre de modelos rígidos, o que é uma vantagem quando se estudam substâncias tão complexas como são os AF.

5.2 – SECÇÃO EXPERIMENTAL

5.2.1 – Reagentes e soluções

Todos os restantes reagentes utilizados foram de qualidade p.a. ou semelhante. Para além das soluções de uso geral, utilizaram-se as preparações indicadas nas subsecções seguintes.

5.2.1.1 – Estudos potenciométricos das interacções de catiões metálicos com amostras de AF

- Soluções de AF: utilizaram-se soluções de AF de concentração 25 mg/L, preparadas em solução de electrólito inerte de KNO_3 0,1 M.

5.2.1.2 – Estudos por fluorescência síncrona do efeito do pH e da concentração dos AF nos parâmetros de equilíbrio de complexação

- Soluções de AF: utilizaram-se soluções de AF de concentração 25, 50 e 100 mg/L, preparadas em solução de electrólito inerte de KNO_3 0,1 M, tendo-se ajustado o seu pH aos valores 3, 4, 5 ou 6 por adição de ácido (HNO_3) ou base forte descarbonatada (NaOH).

5.2.1.3 – Decomposição por PARAFAC de matrizes de três vias de dados cinético-espectrofotométricos correspondentes a misturas de catiões metálicos pesados

- Soluções dos catiões metálicos pesados: prepararam-se soluções aquosas dos catiões metálicos Co(II), Zn(II), Cd(II), Pb(II) e Ni(II) de concentração aproximada $1,0 \times 10^{-3}$ M por pesagem e diluição dos seguintes sais: $CoCl_2.6H_2O$, $Zn(NO_3)_2.4H_2O$, $Cd(NO_3)_2.4H_2O$, $Pb(NO_3)_2$ e $NiCl_2.6H_2O$. As soluções a analisar foram preparadas pela mistura das soluções padrão de catiões metálicos na zona de concentrações dos micromolar, de PAR (20 – 40 μM) e de tampão bórax (pH 9,50). A preparação das soluções seguiu um desenho experimental completo com quatro níveis para as misturas binárias, e com três níveis para as misturas ternárias.

- Solução tampão de bórax com pH 9,50: preparou-se uma solução tampão de bórax com pH 9,50 pela mistura de 4,77 g de bórax e de 75 mL de solução aquosa de NaOH 0,10 M, ajustando-se o volume final a 500 mL com solução de KNO_3 0,1 M [1].
- Solução de PAR: preparou-se uma solução de PAR de concentração $1,0 \times 10^{-3}$ M em solução de tampão bórax com pH 9,50.
- Solução de EDTA: preparou-se uma solução de EDTA de concentração 0,100 M em água desionizada a partir de uma ampola Titrisol (Merck-ref.9992). As soluções de EDTA mais diluídas (1,00 a 6,00 mM) foram preparadas por diluição com tampão bórax da solução mais concentrada.

5.2.1.4 – Estudos cinéticos da interacção entre AF e os catiões Ni(II) e Cu(II)

- Soluções de AF: preparam-se soluções de AF de concentração 100 mg/L em água desionizada.
- Solução de PAR: preparou-se uma solução de PAR de concentração $5,3 \times 10^{-4}$ M em água desionizada. O pH da solução foi ajustado a 7,0 por adição de ácido ou base forte.
- Soluções dos catiões Ni(II) e Cu(II): prepararam-se soluções aquosas dos catiões metálicos Ni(II) e Cu(II) por pesagem e diluição dos sais $NiCl_2.6H_2O$ e $Cu(NO_3)_2$.
- Solução de $NaHCO_3$: preparou-se uma solução de $NaHCO_3$ de concentração 0,05 M por pesagem e diluição rigorosa do sal em água desionizada.
- Misturas de AF com catiões: prepararam-se em balões de 10,00 mL, soluções de misturas de AF com diferentes concentrações (2,5 a 25 μM) dos catiões Ni(II) ou Cu(II). Após o ajuste do pH a 7,0, tamponaram-se as soluções por adição de 0,120 mL de solução de $NaHCO_3$, a que se seguiu um reajuste do pH, quando necessário.

5.2.2 – Procedimentos experimentais

As experiências potenciométricas com medição de pH realizadas no decurso dos estudos das interacções entre catiões metálicos e amostras de AF foram efectuadas com o sistema de titulação descrito em 3.3.4. Nos estudos sobre o efeito do pH e da

concentração dos AF na constante de estabilidade condicional e na capacidade de complexação das amostras AFS, AFLC e AFRAC com catião Cu(II) utilizaram-se soluções de AF preparadas em KNO_3 0,1 M, para três níveis de concentração de AF (25, 50 e 100 mg/L), e cada um destes níveis de concentração para quatro valores de pH (3, 4, 5 e 6). Os conjuntos de espectros de fluorescência foram obtidos com o equipamento e os procedimentos indicados no Capítulo 3. Os estudos cinético-espectrofotométricos da descomplexação de catiões metálicos do PAR e dos AF foram efectuados com o equipamento e os procedimentos gerais descritos no Capítulo 3.

5.3 – RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO

5.3.1 – Estudos potenciométricos da interacção de catiões metálicos com amostras de AF

5.3.1.1 – Amostras de AF com origem natural

Na Fig. 5.1 podem observar-se exemplos típicos de curvas de titulação para as amostras AFS e AFLau. Da análise desta figura pode verificar-se que ocorreu um incremento do potencial do eléctrodo com o aumento da concentração de catião metálico. Uma análise mais detalhada destes gráficos permite detectar em cada um deles duas secções com comportamentos distintos. Na primeira secção, onde as concentrações de catião metálico são baixas, observa-se um ligeiro encurvamento na representação provocado pela complexação de parte do catião metálico pelos AF. Na segunda secção, onde as concentrações de catião metálico são superiores, a representação adquire a forma de uma recta, sendo o potencial do eléctrodo directamente proporcional à concentração de catião metálico. Desta forma, o encurvamento observado na representação do potencial do eléctrodo em função da concentração de catião metálico pode ser atribuído à existência de complexação entre catiões metálicos e os AF, sendo este encurvamento tanto mais pronunciado quanto maior for a constante de complexação e a concentração de sítios ligantes das amostras de AF. Quando se analisam as diferenças detectadas no comportamento dos vários catiões metálicos, verifica-se que o encurvamento observado para o Cd(II) é inferior ao encurvamento provocado pelos outros dois catiões, o que leva a concluir que os complexos de Cd(II)

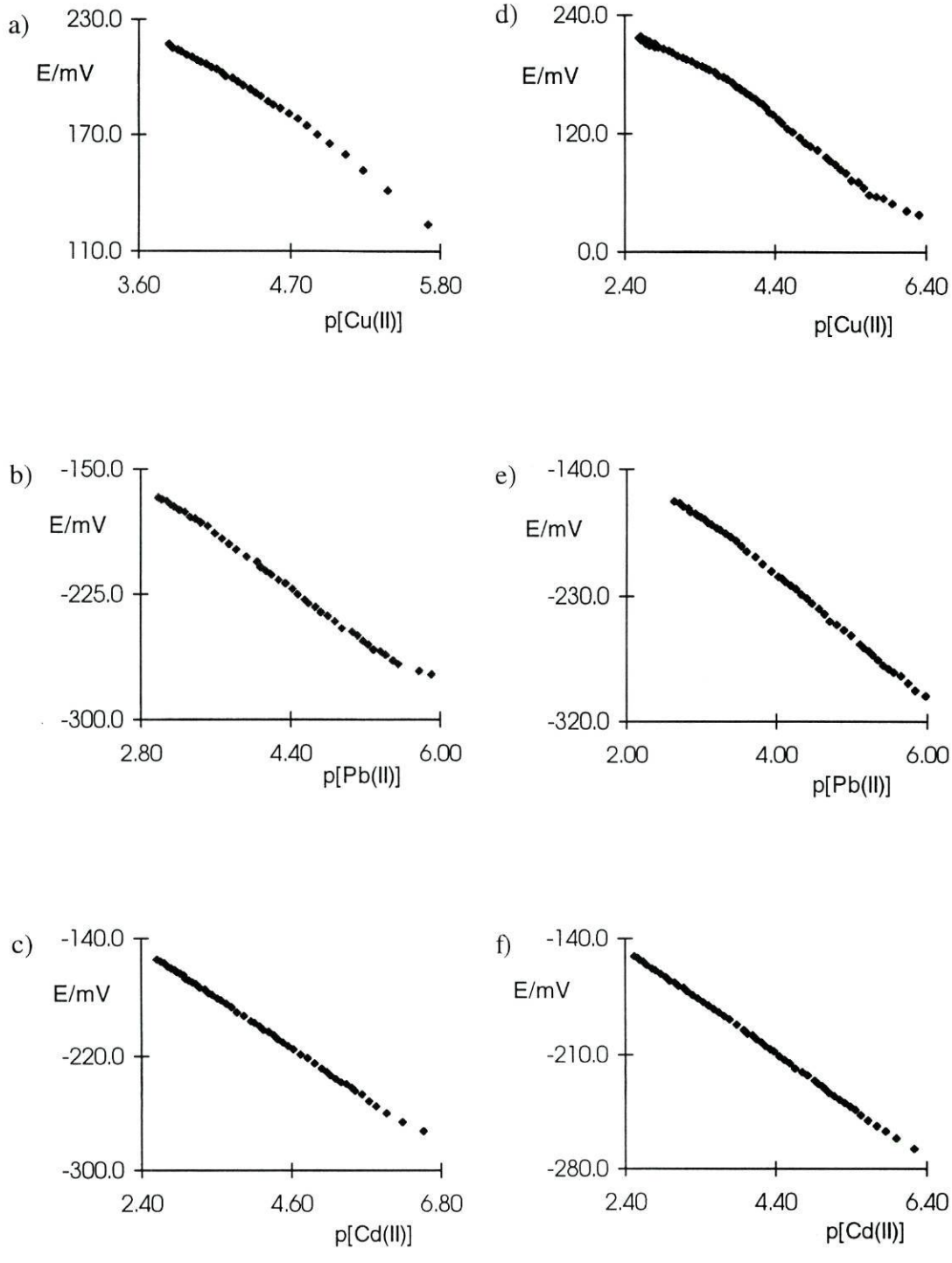


Figura 5.1 – Curvas de titulação para as amostras AFS, [a) - c)]; e AFLau, [d) - f)]. Titulações com Cu(II), [a) e d)]; Pb(II), [b) e e)]; e Cd(II), [c) e f)].

com as amostras AFS e AFLau devem possuir uma estabilidade inferior aos complexos dos outros dois catiões estudados.

Na Fig. 5.2 apresentam-se as representações da evolução do grau de complexação do catião metálico adicionado com o aumento da concentração deste. A análise desta figura evidencia um comportamento distinto dos três catiões estudados. Assim, no início das titulações com Cu(II) todo o catião metálico adicionado é complexado com os AF, atingindo-se desta forma graus de complexação de um. Pelo contrário, os outros dois catiões apresentam graus de complexação inferiores, sendo este efeito mais nítido no caso do cádmio, uma vez que as duas amostras apresentam graus de complexação deste catião na ordem dos 0,25 a 0,4. Assim, partindo da análise desta figura para cada uma das amostras estudadas, poder-se-ia ordenar a estabilidade dos complexos formados entre os catiões metálicos e as amostras AFS e AFLau segundo a ordem Cu(II) > Pb(II) > Cd(II).

Na Fig. 5.3 apresentam-se exemplos típicos das representações de Scatchard e de Buffle para a complexação do catião Cu(II) (as representações para o Pb(II) e o Cd(II) são semelhantes) com AFS e AFLau. Esta figura mostra que este tipo de representações não permitiu obter ajustes lineares de qualidade razoável, o que se pode dever à existência de heterogeneidade nos sítios ligantes dos AF (ver Apêndice 1). Por esta razão, optou-se pela utilização do método de van den Berg / Ruzic para a análise destes resultados potenciométricos, uma vez que este método permite obter representações lineares mesmo na presença de heterogeneidade dos sítios ligantes (ver Apêndice 1).

Na Fig. 5.4 apresentam-se os gráficos de van den Berg / Ruzic para as amostras AFS e AFLau. Como se pode observar, as representações de $\frac{[M]}{[M]_{Total} + \Delta[M] - [M]}$ em função de [M] surgem com uma forma aproximadamente linear, sendo o ajuste relativo ao Cu(II) aquele que apresenta uma qualidade mais elevada (ver também a Tabela 5.1).

Na Tabela 5.1 apresentam-se parâmetros de complexação obtidos pela aplicação do modelo de van den Berg / Ruzic aos dados experimentais. A análise desta tabela evidencia a existência de valores semelhantes para as constantes de complexação dos três catiões com as duas amostras em estudo, tendo os valores das constantes seguido a ordem estabelecida na análise da evolução do grau de complexação, ou seja, Cu(II) > Pb(II) > Cd(II). Relativamente às concentrações de ligando, obtiveram-se valores da mesma ordem de grandeza para os três catiões. No caso da avaliação da adequação do

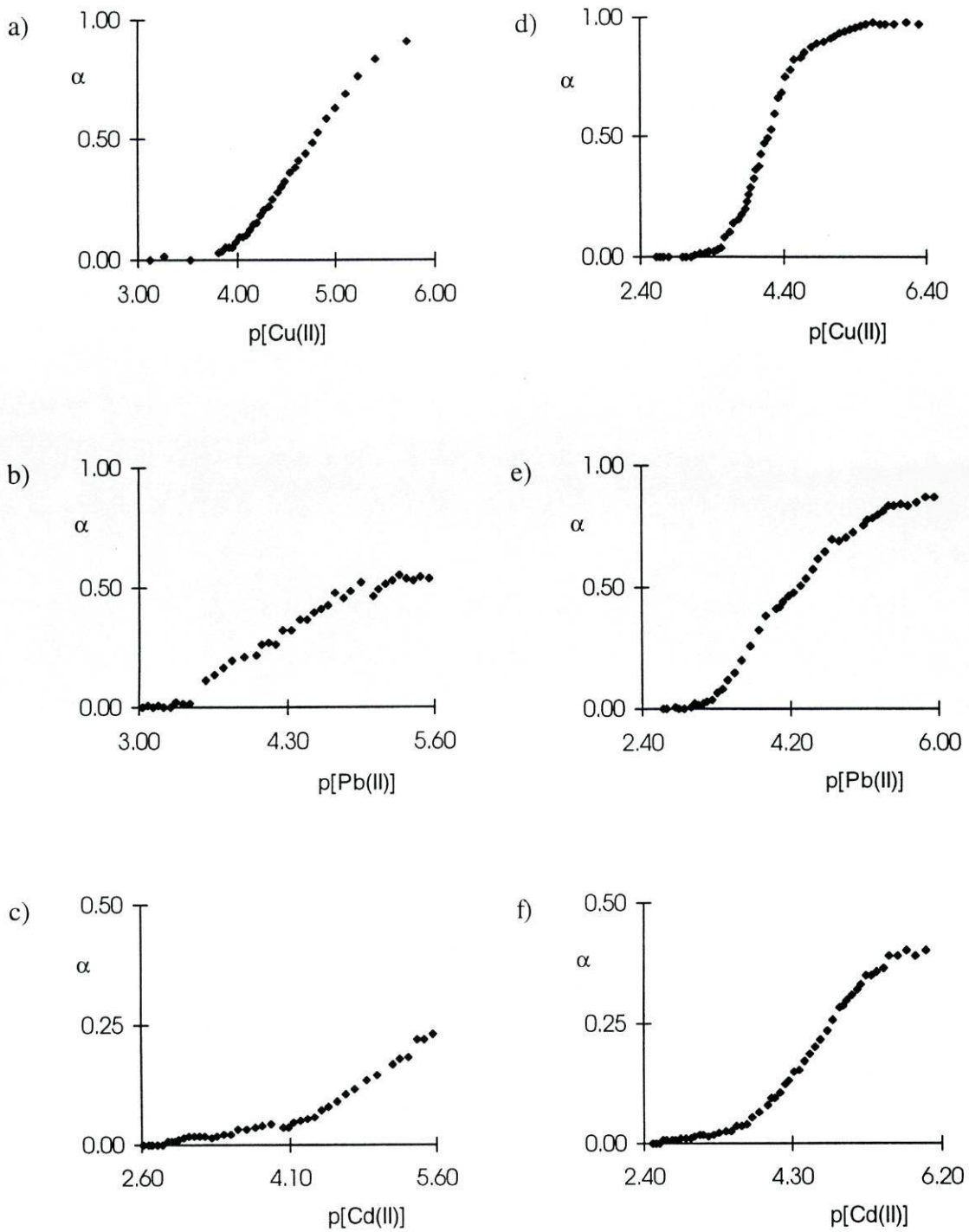


Figura 5.2 – Variação do grau de complexação com a concentração total de catião metálico para as amostras AFS, [a) - c)]; e AFLau, [d) - f)]. Titulações com Cu(II), [a) e d)]; Pb(II), [b) e e)]; e Cd(II), [c) e f)].

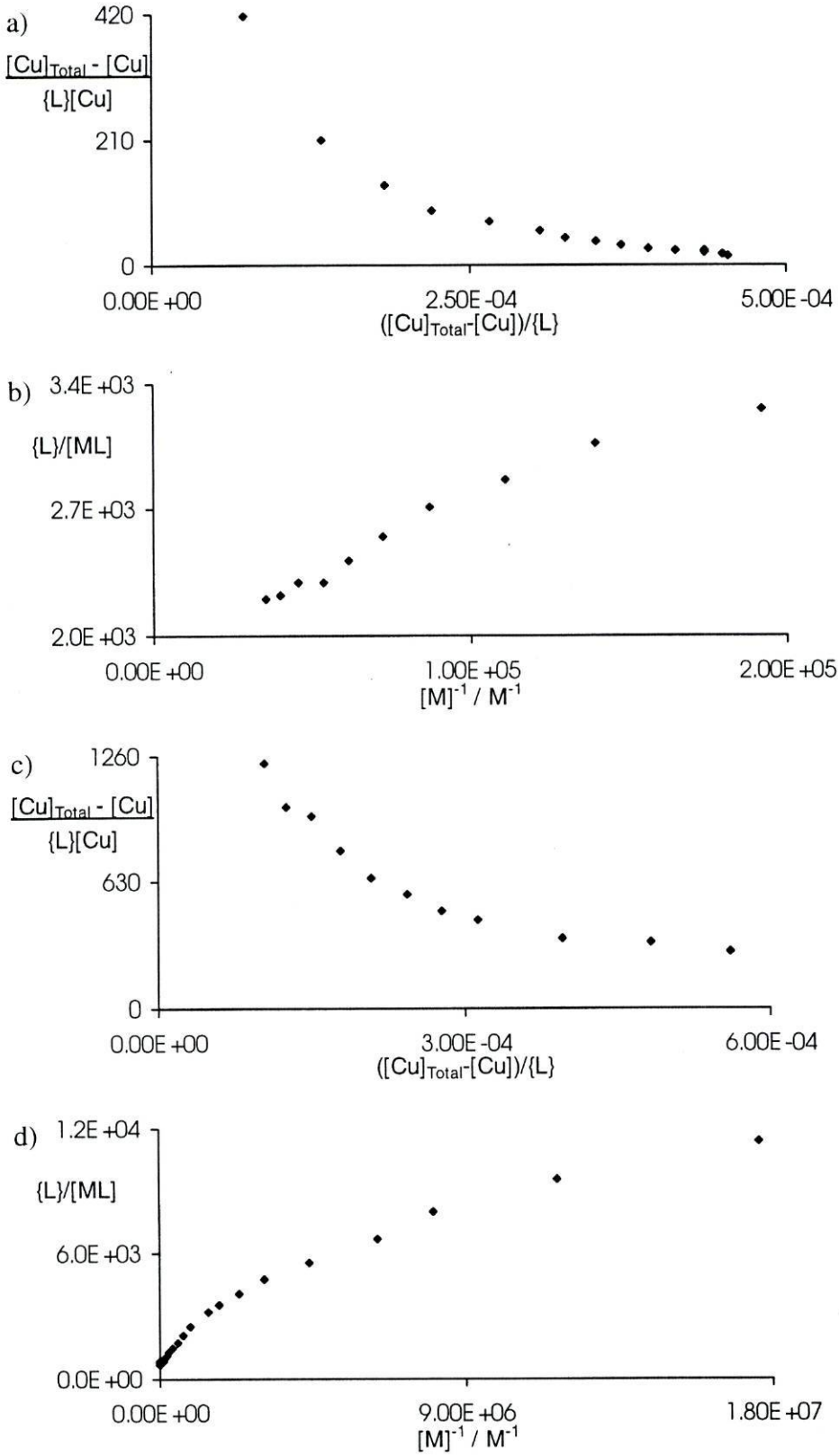


Figura 5.3 – Representações de Scatchard [a) e c)] e de Buffle [b) e d)] da complexação do catião Cu(II) com as amostras AFS, [a) e b)]; e AFLau, [c) e d)].

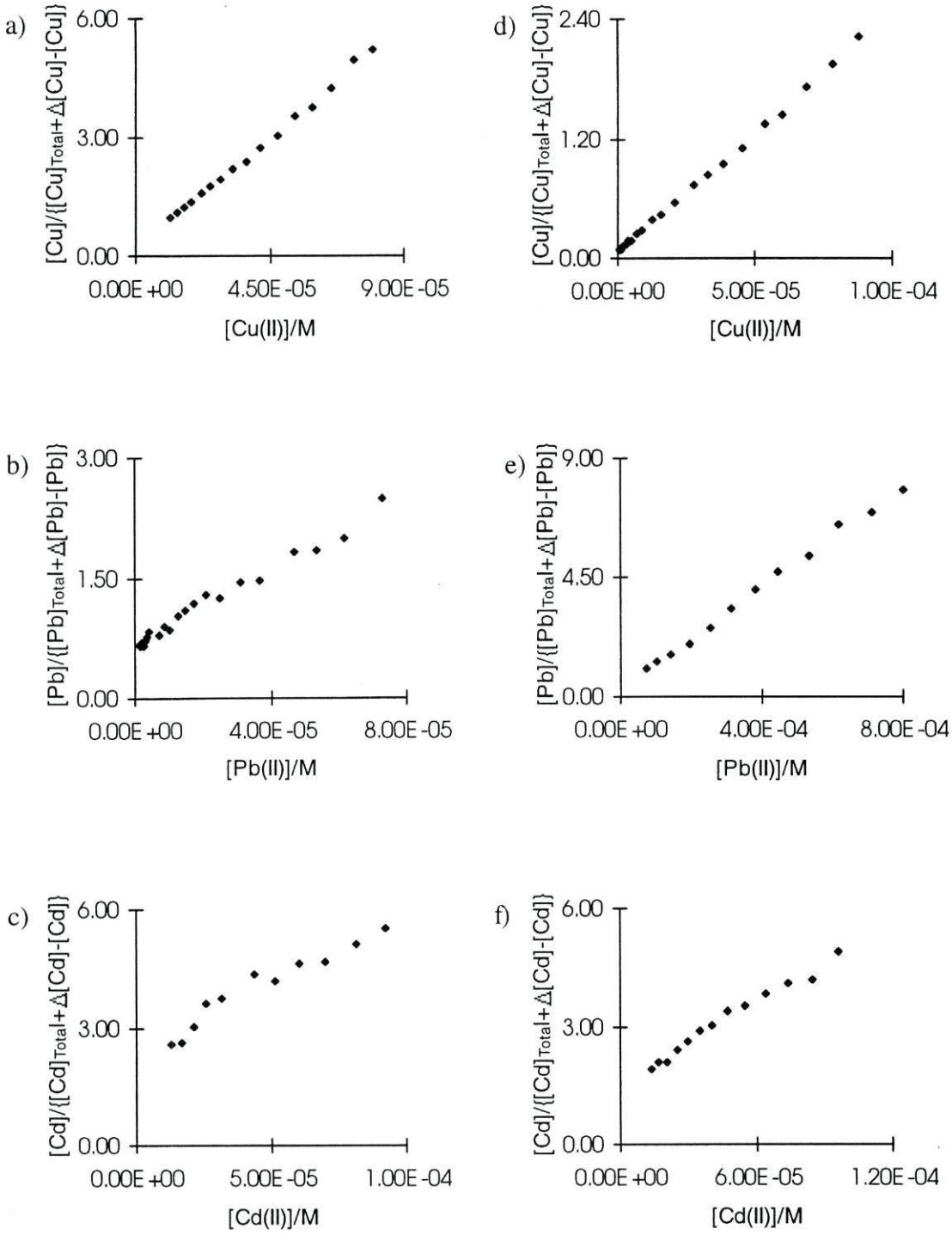


Figura 5.4 – Gráficos de van den Berg / Ruzic para as amostras AFS, [a) - c)]; e AFLau, [d) - f)]. Titulações com Cu(II), [a) e d)]; Pb(II), [b) e e)]; e Cd(II), [c) e f)] a pH 6,0.

Tabela 5.1 – Resultados obtidos nas titulações dos catiões metálicos Cu(II), Pb(II) e Cd(II) na presença das amostras AFS e AFLau a pH 6,0 [&].

Amostra	**Catião**	**Log K**	**$[L]_{Total}$** [a]	**Correl**	**N.P.**	**$\Delta[M] \times 10^5$/ M**
AFS	Cu(II)	5,46(9)	*1,64(2)* **0,656(8)**	0,9991	17	1,08 a 8,8
	Pb(II)	4,59(6)	*4,6(4)* **1,8(2)**	0,9910	22	0,23 a 9,2
	Cd(II)	4,17(4)	*2,7(3)* **1,1(1)**	0,9695	12	0,89 a 9,8
AFLau	Cu(II)	5,56(1)	*4,4(2)* **1,76(8)**	0,9978	21	0,84 a 11,9
	Pb(II)	4,51(6)	*9(1)* **3,6(4)**	0,9958	17	4,51 a 56,0
	Cd(II)	4,3(1)	*2,7(9)* **1,1(4)**	0,9900	12	2,52 a 11,4

& – Log K, logaritmo neperiano da constante de equilíbrio condicional; $[L]_{Total}$, concentração total de ligando; Correl, coeficiente de correlação linear; N.P., número de pontos experimentais utilizados no cálculo; Δ[M], gama de concentrações de catião metálico M utilizada nos cálculos.

a – Em itálico apresentam-se os valores de $[L]_{Total}$ em mol/L ($\times 10^5$) e a negrito os valores que lhes correspondem expressos em mmol/g.

modelo de van den Berg / Ruzic aos dados experimentais, os ajustes obtidos foram de boa qualidade, uma vez que os valores do coeficiente de correlação linear foram sempre superiores a 0,99, excepto no caso particular da complexação de Cd(II) com AFS para o qual o coeficiente de correlação linear apresenta o valor de 0,97.

A comparação dos valores médios de $[L]_{Total}$ (média dos valores obtidos com os três catiões) de cada amostra (1,2 mmol/g para AFS e 2,2 mmol/g para AFLau - Tabela 5.1) com a concentração de sítios ligantes determinados por potenciometria de pH utilizando um grande excesso de catião Cu(II) (3,74 e 4,48 mmol/g, para as amostras AFS e AFLau, respectivamente - Tabela 4.9) permitiu concluir que o estudo agora efectuado detectou cerca de um terço dos sítios ligantes determinados para a amostra AFS por titulações potenciométricas de pH, e cerca de metade dos mesmos quando se refere à amostra AFLau.

5.3.1.2 – Amostras de AF com origem antropogénica

Na Fig. 5.5 apresentam-se as curvas de titulação obtidas para as amostras AFLC e AFRAC. Detecta-se um incremento do potencial dos eléctrodos selectivos com o aumento da concentração de catião metálico, à semelhança do que aconteceu no caso dos AF naturais. Quando se analisa o encurvamento causado nesta representação pela complexação entre os catiões metálicos e os AF, verifica-se que esse encurvamento é mais nítido no caso dos catiões Cu(II) e Pb(II) em contraste com o Cd(II), o que poderá indicar uma complexação menos extensa com este catião.

Na Fig. 5.6 apresentam-se as representações da evolução do grau de complexação do catião metálico adicionado com o aumento da concentração deste em solução. A análise desta figura evidencia que a amostra AFRAC deverá ter uma concentração de sítios ligantes inferior à da amostra AFLC e às amostras de AF naturais, uma vez que se detecta para esta amostra uma percentagem de Cd(II) complexado muito menor que a percentagem de Cd(II) complexado pelas amostras restantes. Assim, esta amostra complexou apenas cerca de 10 % do catião cádmio inicialmente adicionado, em contraste com os cerca de 60 % da amostra AFLC e os cerca de 25 a 45 % das amostras naturais (Fig. 5.2).

Na Fig. 5.7 apresentam-se exemplos típicos das representações de Scatchard e de Buffle para a complexação do catião Cu(II) com AFLC e AFRAC. A análise desta

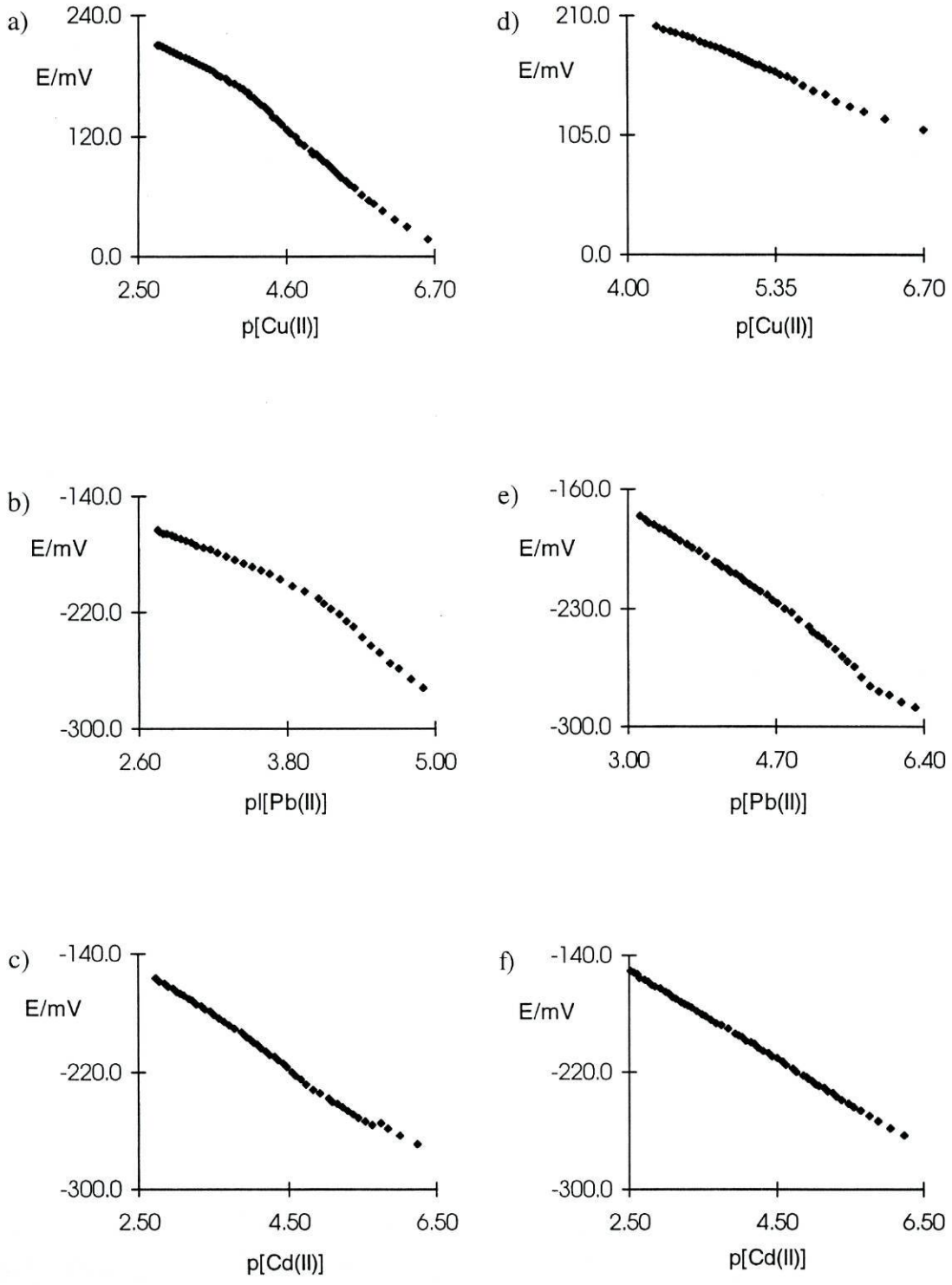


Figura 5.5 – Curvas de titulação para as amostras AFLC, [a) - c)]; e AFRAC, [d) - f)]. Titulações com Cu(II), [a) e d)]; Pb(II), [b) e e)]; e Cd(II), [c) e f)].

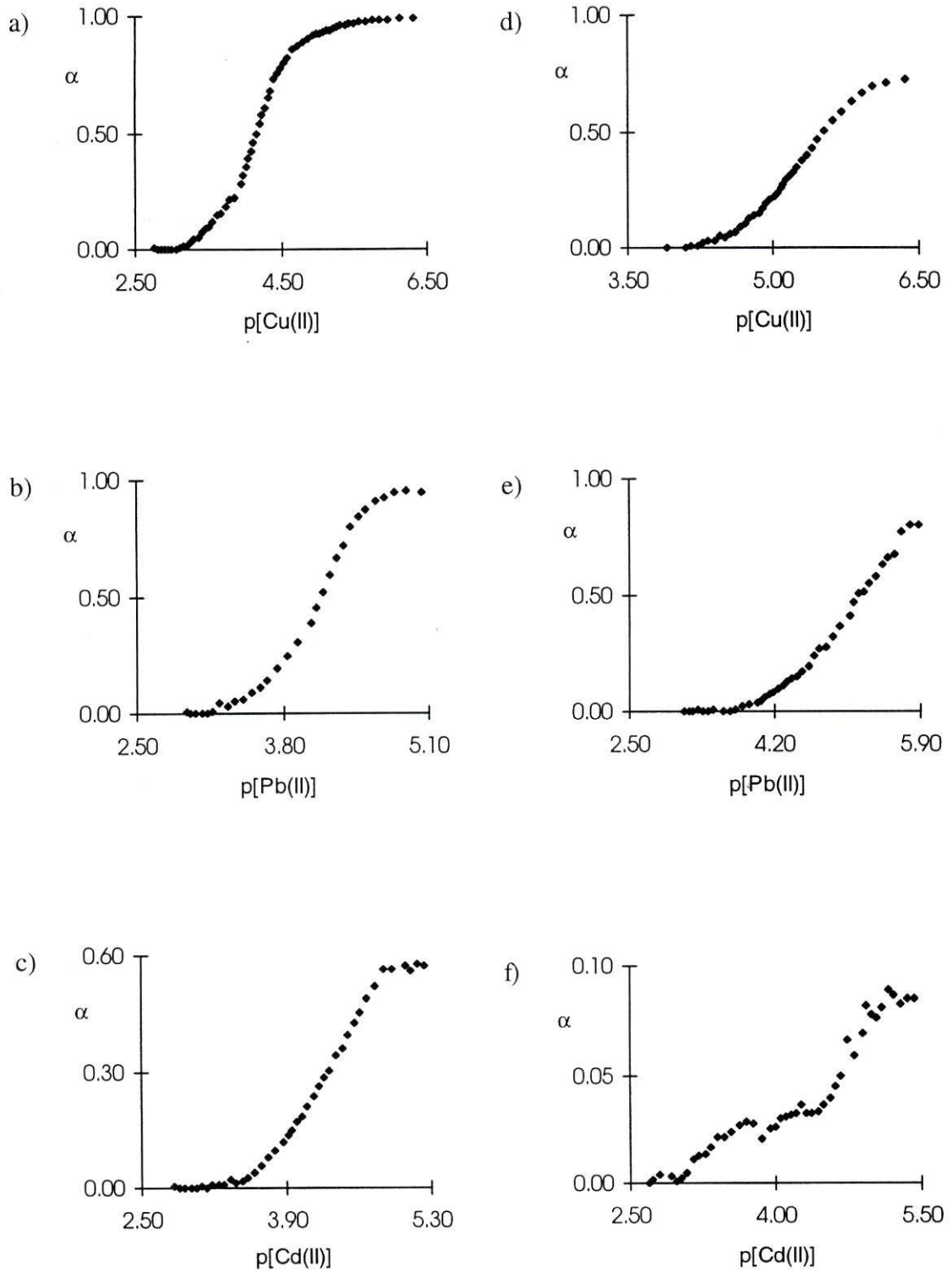


Figura 5.6 – Variação do grau de complexação com a concentração total de catião metálico para as amostras AFLC, [a) - c)]; e AFRAC, [d) - f)]. Titulações com Cu(II), [a) e d)]; Pb(II), [b) e e)]; e Cd(II), [c) e f)].

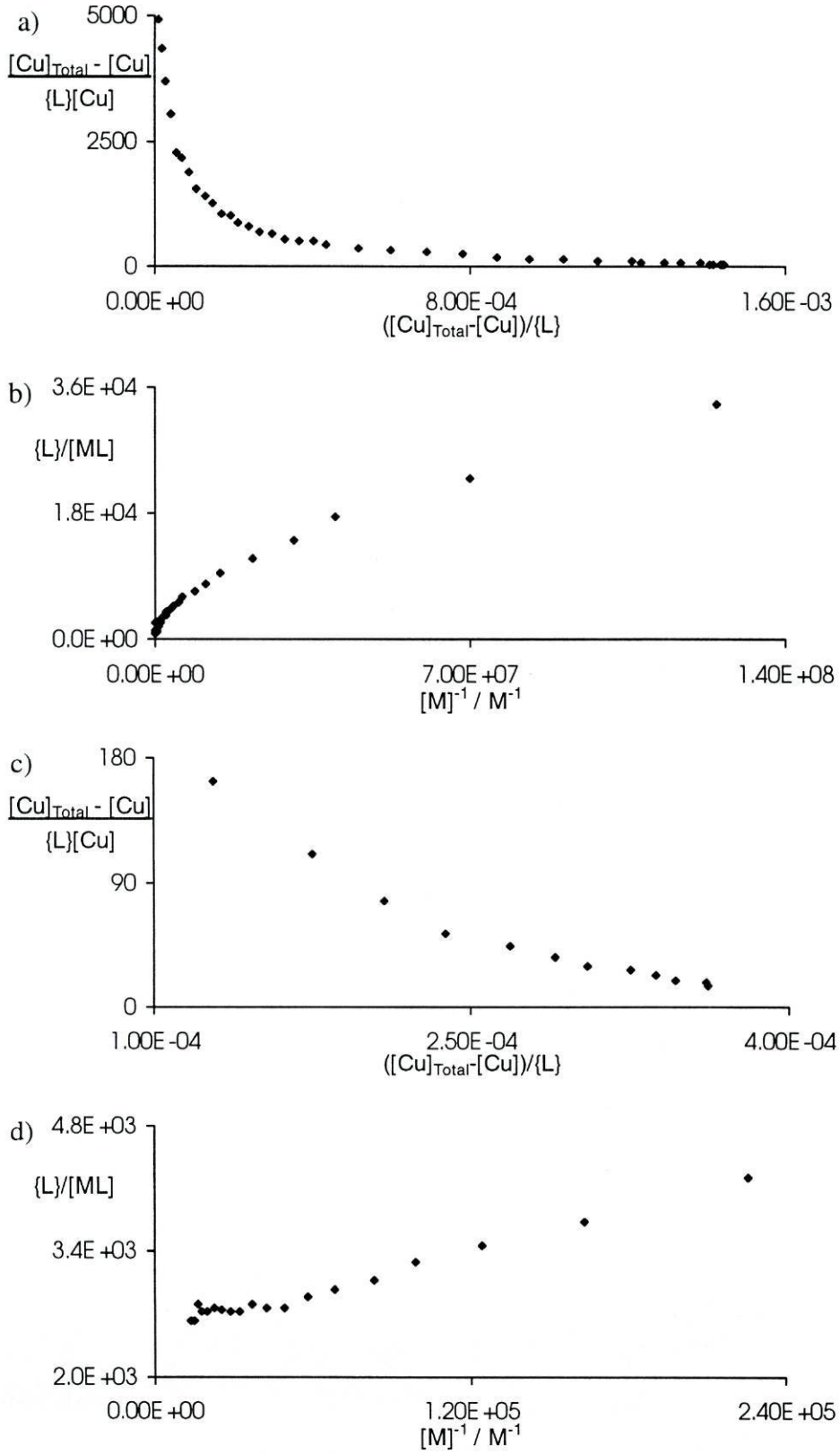


Figura 5.7 – Representações de Scatchard [a) e c)] e de Buffle [b) e d)] da complexação do catião Cu(II) com as amostras AFLC, [a) e b)]; e AFRAC, [c) e d)].

figura é semelhante à efectuada para a Fig. 5.3, nomeadamente quanto à heterogeneidade dos sítios ligantes, pelo que se optou pelo método de van den Berg / Ruzic para a análise destes resultados potenciométricos.

Os gráficos de van den Berg / Ruzic relativos a estas amostras (Fig. 5.8) originaram representações lineares (ver coeficientes de correlação na Tabela 5.2), o que permitiu efectuar a estimava dos parâmetros de equilíbrio de complexação.

Os valores de Log K (Tabela 5.2) obtidos para as duas amostras não foram muito diferentes entre si (valores de cerca de 4,8 a 5,6), à excepção do valor 6,3 relativo à complexação do Cu(II) com a amostra AFRAC. Este elevado valor de Log K desvia-se da tendência geral observada, e pode ser justificado pela baixa concentração de sítios ligantes desta amostra, o que pode provocar maiores erros na determinação dos valores dos parâmetros de complexação.

Os valores médios de $[L]_{Total}$ (média dos valores obtidos com os três catiões) determinados para cada uma das amostras de AF antropogénicos (Tabela 5.2) foram 1,6 mmol/g para AFLC e 0,3 mmol/g para AFRAC. Uma comparação destes valores com a concentração de sítios ligantes determinados por potenciometria de pH utilizando um grande excesso de catião Cu(II) (4,02 e 1,96 mmol/g respectivamente para AFLC e AFRAC - Tabela 4.9) AFLC permite concluir que no caso da amostra AFLC apenas se detectaram cerca de 40 % dos sítios ligantes determinados por titulações potenciométricas de pH, baixando esta percentagem para perto de 15 % quando se analisam os resultados referentes à amostra AFRAC.

Comparando os resultados obtidos para as amostras antropogénicas (Tabela 5.2) com os resultados referentes às amostras naturais (Tabela 5.1), verifica-se que estes são globalmente semelhantes, à excepção da concentração de sítios ligantes da amostra AFRAC, que é bastante inferior à das restantes amostras.

5.3.1.3 – Amostras de AF extraídas de misturas de solo natural e compostos

Na Fig. 5.9 apresentam-se as curvas de titulação obtidas para as amostras de AF extraídas de misturas de solo natural e compostos e na Fig. 5.10 as representações da evolução do grau de complexação com o aumento da concentração de catião metálico. A análise destas figuras é semelhante à efectuada no caso das amostras de AF naturais e antropogénicas (Figs. 5.1, 5.2, 5.5 e 5.6).

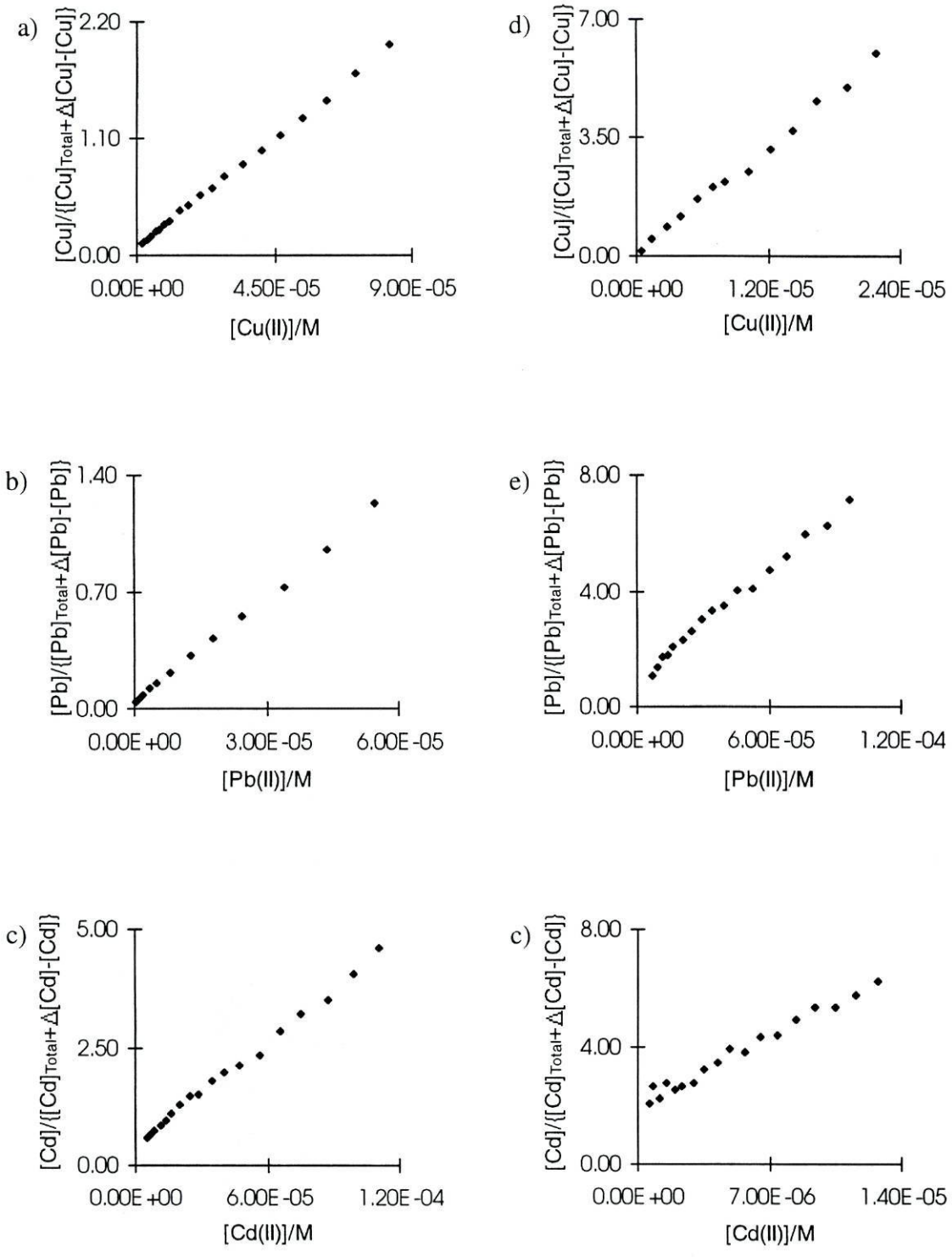


Figura 5.8 – Gráficos de van den Berg / Ruzic para as amostras AFLC, [a) - c)]; e AFRAC, [d) - f)]. Titulações com Cu(II), [a) e d)]; Pb(II), [b) e e)]; e Cd(II), [c) e f)].

Tabela 5.2 – Resultados obtidos nas titulações dos catiões metálicos Cu(II), Pb(II) e Cd(II) na presença das amostras AFLC e AFRAC [&].

Amostra	Catião	Log K	$[L]_{Total}$ [a]	Correl	N.P.	$\Delta[M] \times 10^5$/ M
AFLC	Cu(II)	5,4(1)	*4,6(2)* **1,84(8)**	0,9995	20	1,64 a 11,5
	Pb(II)	5,6(2)	*4,71(5)* **1,88(2)**	0,9994	13	1,24 a 9,0
	Cd(II)	4,8(1)	*3,1(4)* **1,2(2)**	0,9910	16	1,76 a 12,3
AFRAC	Cu(II)	6,3(2)	*0,34(7)* **0,14(3)**	0,9991	19	0,20 a 2,3
	Pb(II)	5,0(2)	*1,3(4)* **0,5(2)**	0,9969	17	1,15 a 3,7
	Cd(II)	5,1(2)	*0,35(6)* **0,14(2)**	0,9910	18	0,25 a 1,3

& – Log K, logaritmo neperiano da constante de equilíbrio condicional; $[L]_{Total}$, concentração total de ligando; Correl, coeficiente de correlação linear; N.P., número de pontos experimentais utilizados no cálculo; Δ[M], gama de concentrações de catião metálico M utilizada nos cálculos.

a – Em itálico apresentam-se os valores de $[L]_{Total}$ em mol/L ($\times 10^5$) e a negrito os valores que lhes correspondem expressos em mmol/g.

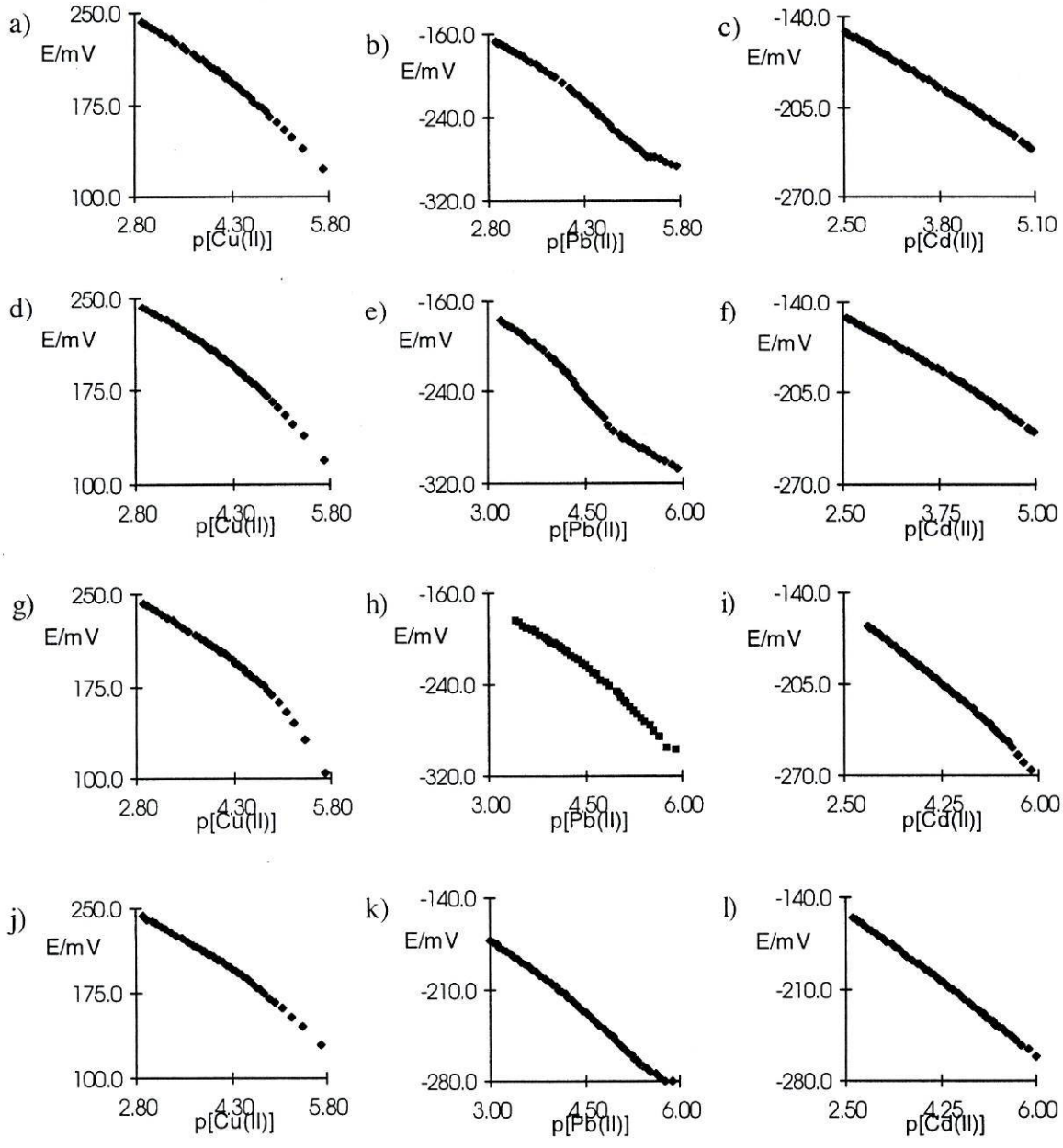


Figura 5.9 – Curvas de titulação para as amostras AFMSLC(0), [a) - c)]; AFMSLC(6), [d) - f)]; AFMSRAC(0), [g) - i)]; e AFMSRAC(6), [j) - l)]. Titulações com Cu(II), [a), g) e j)]; Pb(II), [b), h) e k)]; e Cd(II), [c), i) e l)].

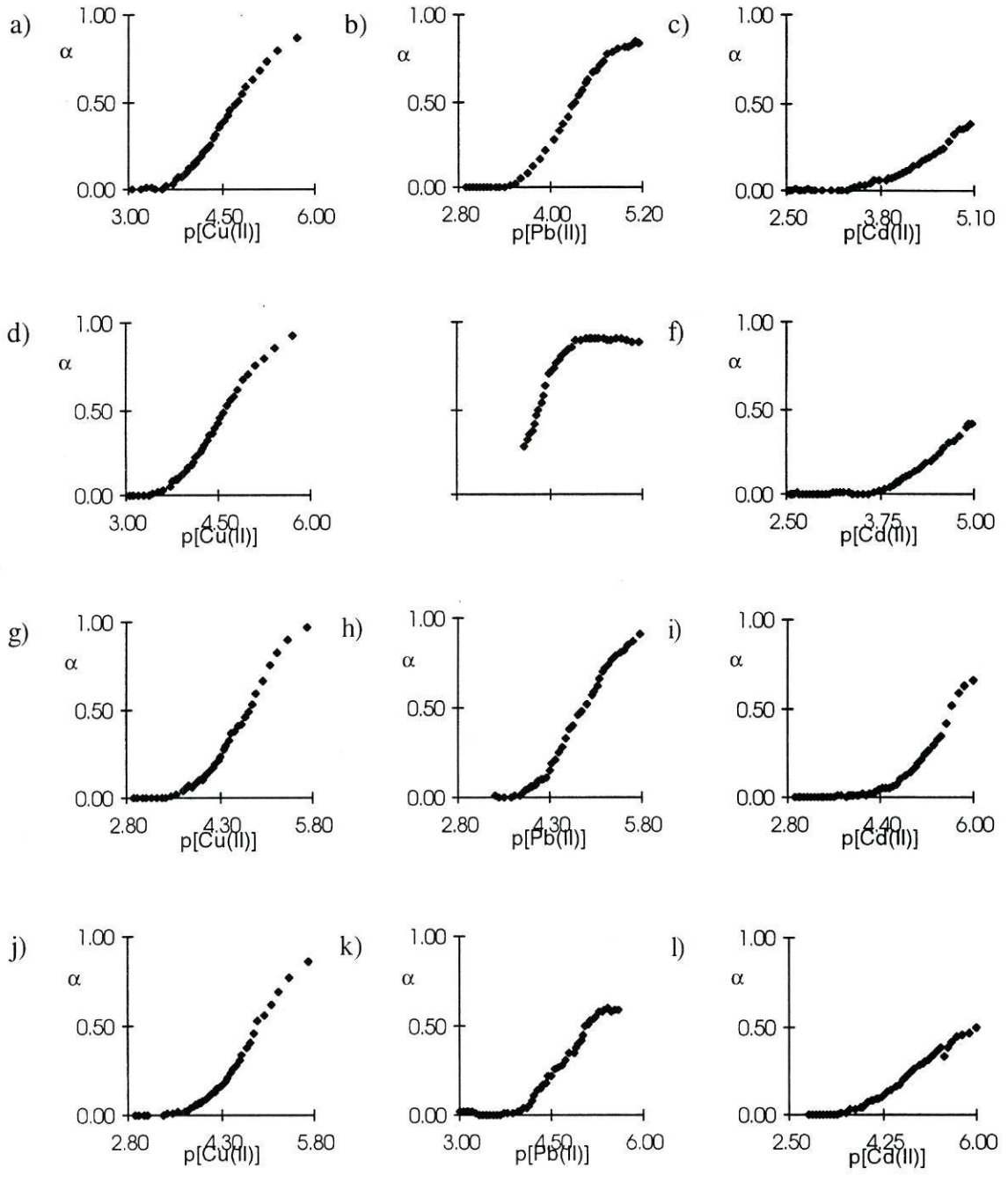


Figura 5.10 – Variação do grau de complexação com a concentração total de catião metálico para as amostras AFMSLC(0), [a) - c)]; AFMSLC(6), [d) - f)]; AFMSRAC(0), [g) - i)]; e AFMSRAC(6), [j) - l)]. Titulações com Cu(II), [a), g) e j)]; Pb(II), [b), h) e k)]; e Cd(II), [c), i) e l)].

Dado que os métodos de Scatchard e de Buffle revelaram não serem particularmente eficazes no tratamento dos dados potenciométricos correspondentes às amostras naturais e antropogénicas, neste caso adoptou-se também pelo método de van den Berg / Ruzic para a análise dos dados referentes às amostras de AF extraídas de misturas de solo natural e compostos.

Os gráficos de van den Berg / Ruzic referentes a estas amostras (Fig. 5.11) originaram representações lineares (ver coeficientes de correlação na Tabela 5.3). Uma análise dos resultados globais contidos na Tabela 5.3 indicia a ausência de variações significativas nos parâmetros de equilíbrio com a alteração do tempo de amostragem dos AF, tendo-se obtido valores de Log K semelhantes aos das amostras naturais e antropogénicas. Relativamente a $[L]_{Total}$, os valores correspondentes a estas amostras localizaram-se entre os valores de $[L]_{Total}$ da amostra AFS, mais elevados, e os valores de $[L]_{Total}$ relativos às amostras de AF antropogénicos, mais reduzidos.

5.3.1.4 – Comparação global dos parâmetros de equilíbrio de complexação

A comparação global das constantes de equilíbrio de complexação calculadas (Fig. 5.12) revelou, no caso das amostras naturais, uma tendência inequívoca para o aumento dos valores de Log K segundo a ordem: Cd(II) < Pb(II) < Cu(II). Pelo contrário, não foi detectada nenhuma evolução clara dos valores de Log K para as amostras de AF antropogénicos e de misturas, oscilando os valores entre 5,0 e 6,3 para o Cu(II), 5,0 e 5,6 para o Pb(II) e 4,5 e 5,1 para o Cd(II). Por outro lado, os resultados obtidos mostraram que não existem grandes diferenças na estabilidade dos complexos formados entre AF naturais e os AF resultantes de materiais compostados.

No que respeita à concentração de grupos ligantes nas moléculas de AF estudadas, $[L]_{Total}$, não foram detectadas diferenças significativas na concentração destes grupos nas amostras AFS e AFLC, ao contrário da amostra AFRAC para a qual se observaram diferenças importantes nos valores de $[L]_{Total}$ quando comparados com os valores referentes às outras duas amostras. De facto, a concentração de ligandos nesta última amostra é bastante inferior à das outras duas, o que se reflecte nas amostras de AF extraídas de misturas de solo com resíduos animais compostados [AFMSRAC(0) e AFMSRAC(6)] uma vez que estas também apresentam uma concentração de ligandos mais baixa quando comparada com a concentração de ligandos das amostras AFMSLC(0) e AFMSLC(6).

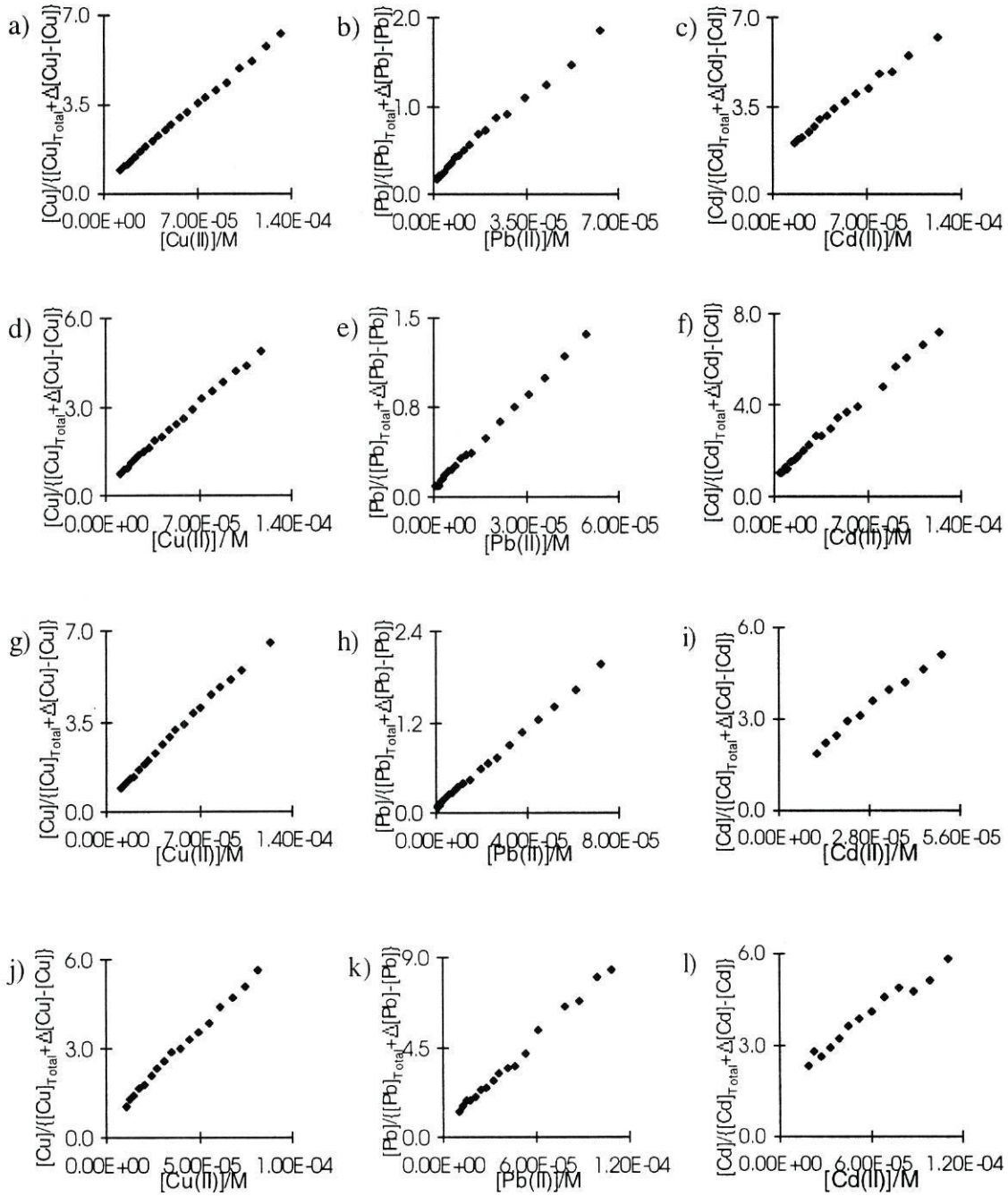


Figura 5.11 – Gráficos de van den Berg / Ruzic para as amostras AFMSLC(0), [a) - c)]; AFMSLC(6), [d) - f)]; AFMSRAC(0), [g) - i)]; e AFMSRAC(6), [j) - l)]. Titulações com Cu(II), [a), g) e j)]; Pb(II), [b), h) e k)]; e Cd(II), [c), i) e l)].

Tabela 5.3 – Resultados obtidos nas titulações dos catiões metálicos Cu(II), Pb(II) e Cd(II) na presença das amostras AFMSLC(0), AFMSLC(6), AFMSRAC(0) e AFMSRAC(0) [&].

Amostra	Catião	Log K	$[L]_{Total}$ [a]	Correl	N.P.	$\Delta[M] \times 10^5$/ M
AFMSLC(0)	Cu(II)	4,95(4)	*2,4(2)* **0,96(8)**	0,9993	21	2,3 a 14,2
	Pb(II)	5,22(3)	*4,0(3)* **1,6(1)**	0,9974	13	2,6 a 52,6
	Cd(II)	4,45(3)	*2,3(4)* **0,9(2)**	0,9976	14	2,1 a 11,9
AFMSLC(6)	Cu(II)	4,99(4)	*2,7(1)* **1,08(4)**	0,9993	20	2,3 a 13,1
	Pb(II)	5,53(2)	*3,876(2)* **1,5504(8)**	0,9997	24	0,5 a 7,9
	Cd(II)	4,7(1)	*2,1(9)* **0,8(4)**	0,9953	15	0,9 a 6,2
AFMSRAC(0)	Cu(II)	5,3(2)	*1,7(3)* **0,7(1)**	0,9993	16	2,0 a 8,9
	Pb(II)	5,6(1)	*1,2(4)* **0,5(2)**	0,9986	28	0,1 a 8,0
	Cd(II)	4,8(1)	*1,1(2)* **0,44(8)**	0,9984	10	1,8 a 5,4
AFMSRAC(6)	Cu(II)	5,05(2)	*1,66(7)* **0,66(3)**	0,9985	17	1,8 a 8,9
	Pb(II)	5,12(7)	*1,22(1)* **0,488(4)**	0,9968	17	1,1 a 10,9
	Cd(II)	4,366(4)	*2,1(7)* **0,8(3)**	0,9865	14	1,6 a 11,4

& – Log K, logaritmo neperiano da constante de equilíbrio condicional; $[L]_{Total}$, concentração total de ligando; Correl, coeficiente de correlação linear; N.P., número de pontos experimentais utilizados no cálculo; Δ[M], gama de concentrações de catião metálico M utilizada nos cálculos.

a – Em itálico apresentam-se os valores de $[L]_{Total}$ em mol/L ($\times 10^5$) e a negrito os valores que lhes correspondem expressos em mmol/g.

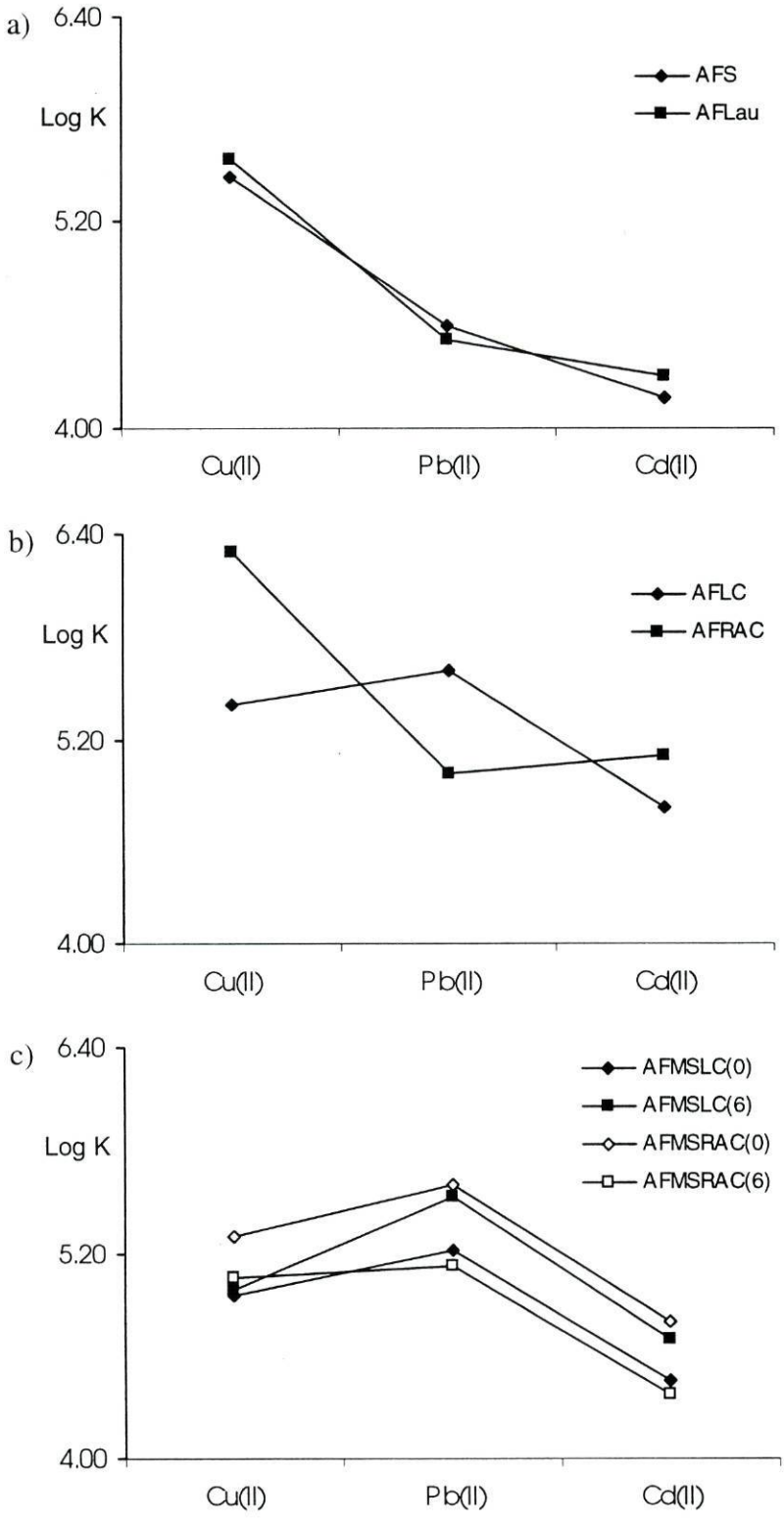


Figura 5.12 – Gráficos resumo da evolução das constantes de complexação (Log K) dos três catiões estudados com amostras de AF: a) AF naturais; b) AF antropogénicos; c) AF extraídos de misturas de solo natural e compostos.

5.3.2 – Estudo do efeito do pH e da concentração dos AF nos parâmetros de equilíbrio de complexação

De forma a aumentar a informação existente sobre as interacções de catiões metálicos com AF naturais e antropogénicos, estudou-se o efeito do pH e da concentração da amostra de AF nos parâmetros de equilíbrio dessas interacções. Este estudo foi efectuado utilizando como técnica experimental a fluorescência molecular síncrona, porque esta permite gerar uma grande quantidade de informação sobre as amostras de AF [2-5].

5.3.2.1 – Estudo dos conjuntos de espectros

5.3.2.1.1 – Análise preliminar dos espectros

As Figs. 5.13 a 5.15 exemplificam os efeitos da presença de catião Cu(II), da variação da concentração de AF e do pH nos espectros de fluorescência síncrona das amostras AFS (Fig. 5.13), AFLC (Fig. 5.14) e AFRAC (Fig. 5.15). Da análise global destas figuras pode observar-se o seguinte: (i) as amostras de AF de concentração mais elevada apresentam uma fluorescência relativa superior às amostras mais diluídas; (ii) o aumento da concentração de catião Cu(II) provoca a extinção de fluorescência em algumas bandas, ou mesmo em todas, conforme as amostras; (iii) a alteração do pH afecta a forma geral dos espectros apenas no caso da amostra AFS.

Quando se comparam entre si os espectros das três amostras verifica-se que estes são bastante diferentes, tal como já se tinha discutido na secção 4.3.2.4 do Capítulo 4. Uma análise do efeito da concentração de Cu(II) nos espectros de fluorescência mostra que a gama de comprimentos de onda que sofre extinção da fluorescência varia de acordo com a amostra. Assim, a extinção de fluorescência da amostra AFS ocorre praticamente em toda a gama de comprimentos de onda do espectro, a da amostra AFRAC entre os 320 e os 420 nm, enquanto a amostra AFLC apresenta extinção de fluorescência apenas na banda localizada a 345 nm.

Quanto ao efeito do pH na forma dos espectros das três amostras de AF, este parâmetro apenas afectou os espectros da amostra AFS, uma vez que os espectros das amostras antropogénicas não sofreram grandes alterações com a variação do pH.

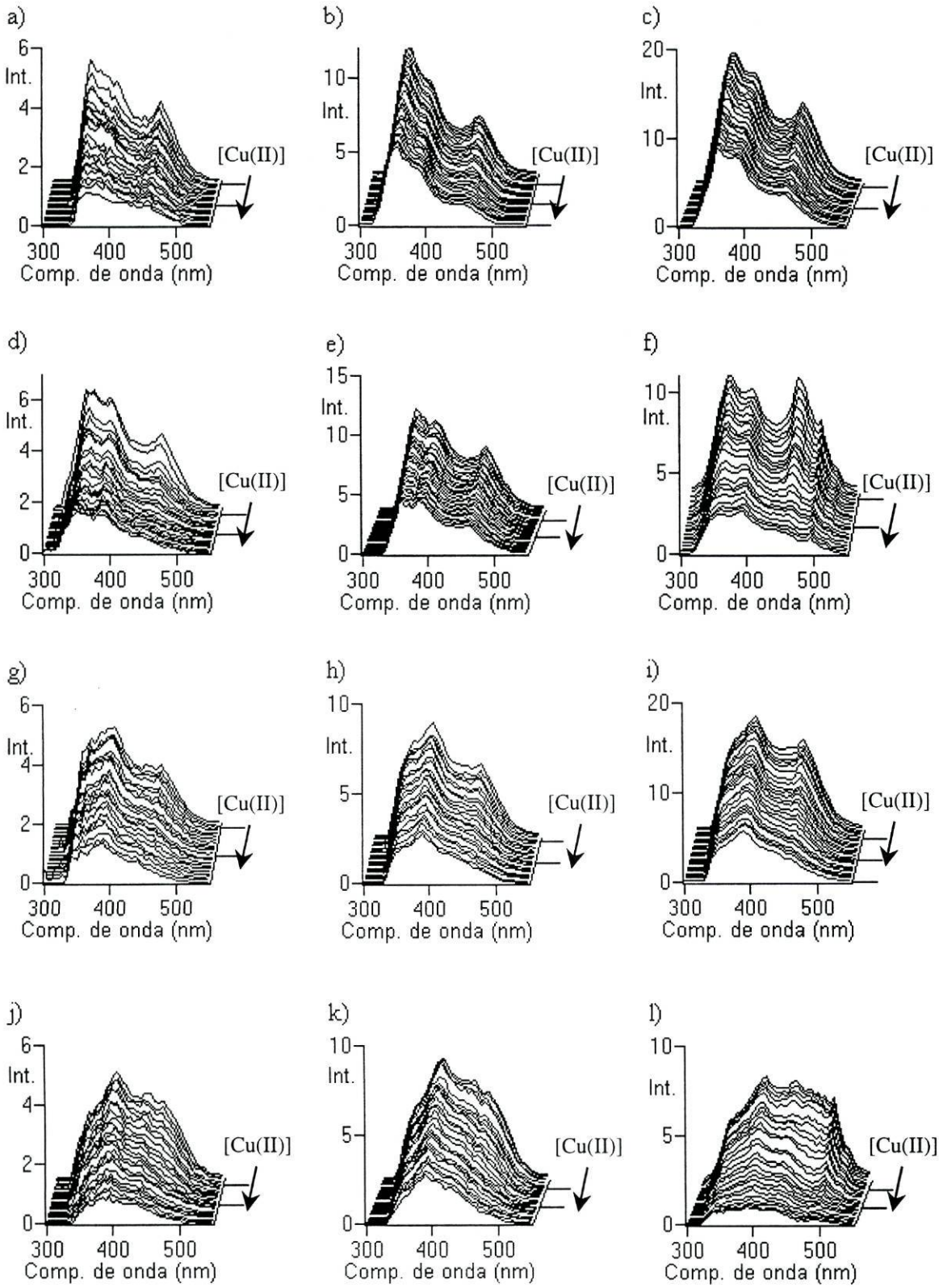


Figura 5.13 – Espectros típicos de fluorescência síncrona para as experiências com AFS a pH 3, [a) - c)]; 4, [d) - f)]; 5, [g) - i)]; e 6 [j) - l)]. Concentrações de AFS de 25 mg L^{-1}, [a), d), g) e j)]; 50 mg L^{-1}, [b), e), h) e k)]; e 100 mg L^{-1}, [c), f), i) e l)].

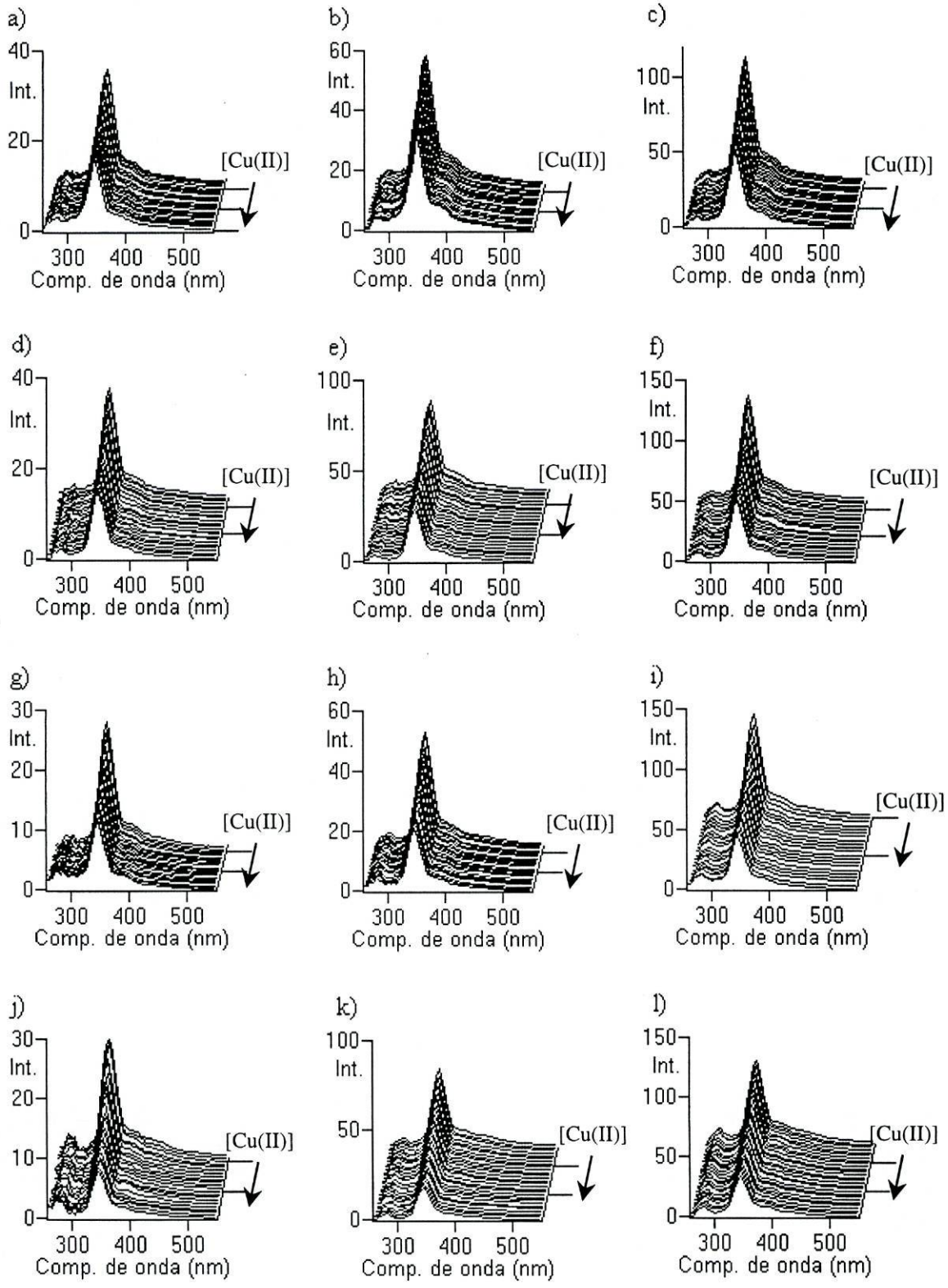


Figura 5.14 – Espectros típicos de fluorescência síncrona para as experiências com AFLC a pH 3, [a) - c)]; 4, [d) - f)]; 5, [g) - i)]; e 6, [j) - l)]. Concentrações de AFLC de 25 mg L^{-1}, [a), d), g) e j)]; 50 mg L^{-1}, [b), e), h) e k)]; e 100 mg L^{-1}, [c), f), i) e l)].

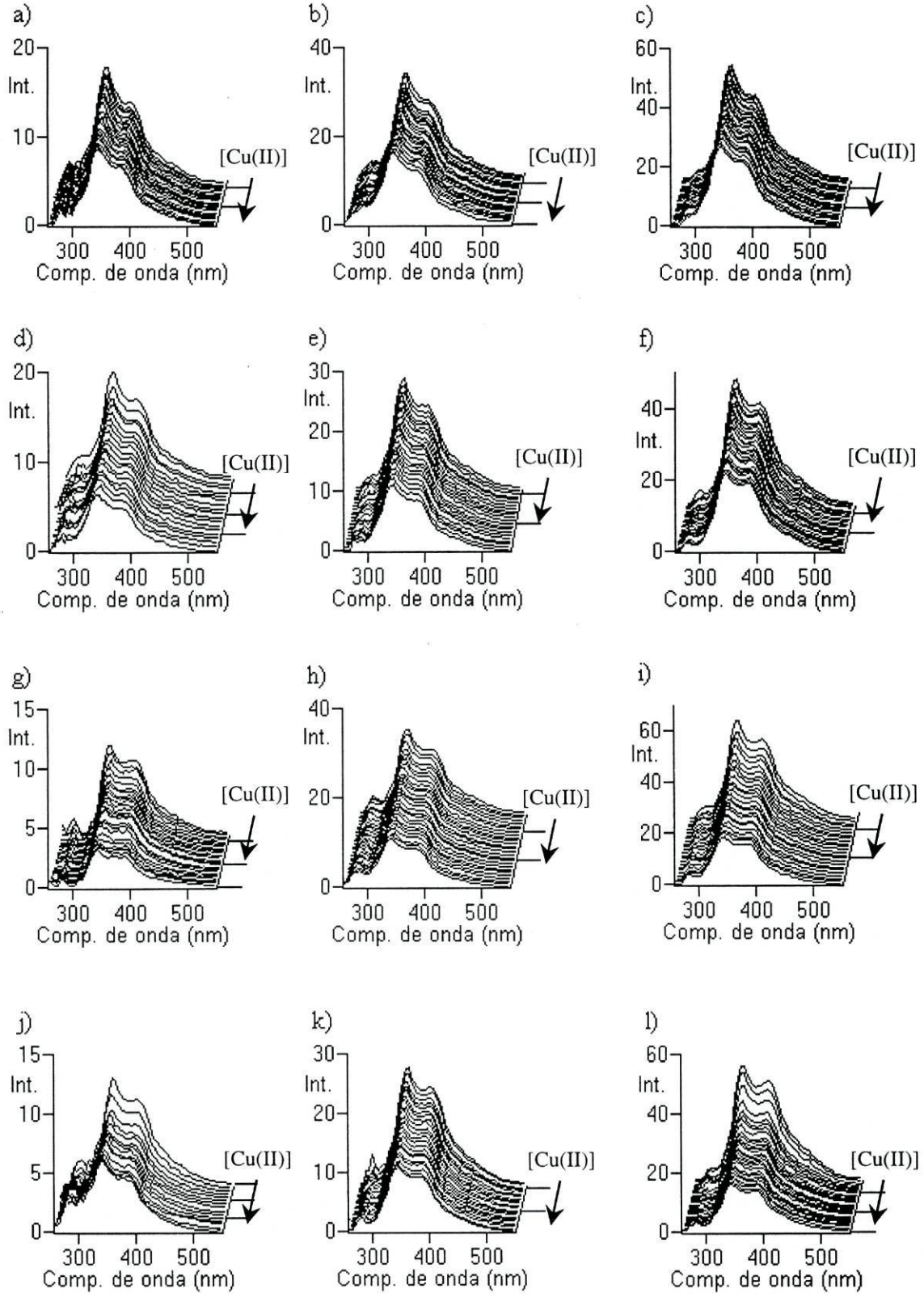


Figura 5.15 – Espectros típicos de fluorescência síncrona para as experiências com AFRAC a pH 3, [a) - c)]; 4, [d) - f)]; 5, [g) - i)]; e 6, [j) - l)]. Concentrações de AFRAC de 25 mg L^{-1}, [a), d), g) e j)]; 50 mg L^{-1}, [b), e), h) e k)]; e 100 mg L^{-1}, [c), f), i) e l)].

5.3.2.1.2 – Determinação do número de componentes por SIMPLISMA

A utilização do modo de fluorescência molecular síncrona permite gerar uma quantidade de informação relativamente elevada sobre as amostras de AF em estudo. Nas experiências de extinção de fluorescência, uma análise dos espectros obtidos pode permitir a detecção de mais de um tipo de sítios ligantes fluorescentes, desde que as respectivas bandas de fluorescência síncrona não se encontrem na mesma região espectral. Como estes espectros podem conter a contribuição de mais de um tipo de sítios ligantes que se encontrem a formar complexos com o Cu(II), tornou-se necessário adoptar um método quimiométrico de auto-resolução de curvas que permita determinar quer o número de componentes ou de tipos de sítios ligantes que intervêm na complexação, quer os comprimentos de onda onde a extinção da fluorescência se deve apenas a cada um dos sítios ligantes. O método que tem vindo a ser utilizado com algum sucesso neste tipo de estudo é o SIMPLISMA [6-8] (ver secção 2.3.1 do Capítulo 2).

Na Fig. 5.16 apresentam-se exemplos de espectros desvio padrão típicos obtidos da análise por SIMPLISMA das amostras AFS, AFLC e AFRAC, a pH 5, para uma concentração de 25 mg/L, e na Tabela 5.4 valores típicos das funções de erro do SIMPLISMA para as experiências efectuadas.

A partir da análise dos valores das funções de erro (Tabela 5.4) poder-se-ia concluir que as três amostras possuem dois componentes (ou sítios ligantes diferentes) que provocam variações linearmente independentes nos espectros. De facto, o parâmetro R_s do terceiro componente é baixo enquanto o parâmetro R_s do segundo componente é relativamente elevado, dando a entender que existem dois sítios ligantes diferentes. No entanto, quando se observam simultaneamente os espectros desvio padrão (Fig. 5.16) a situação torna-se mais duvidosa. Uma análise dos espectros correspondentes ao segundo componente das amostras AFLC (Fig. 5.16.e) e AFRAC (Fig. 5.16.h) indicia que estes contêm apenas ruído, uma vez que a banda de maior intensidade se situa numa zona particularmente ruidosa e isenta de informação útil nos espectros originais (cerca dos 260-320 nm). Assim, pode concluir-se que as variações observadas se devem apenas à presença de ruído experimental, não sendo por isso consideradas na escolha do número de variações linearmente independentes. Em contraste, no caso da amostra AFS, à excepção das experiências efectuadas a pH 6 e a 25 mg/L onde se detectou apenas um componente (Figs. 5.16.j a 5.16.l), o espectro

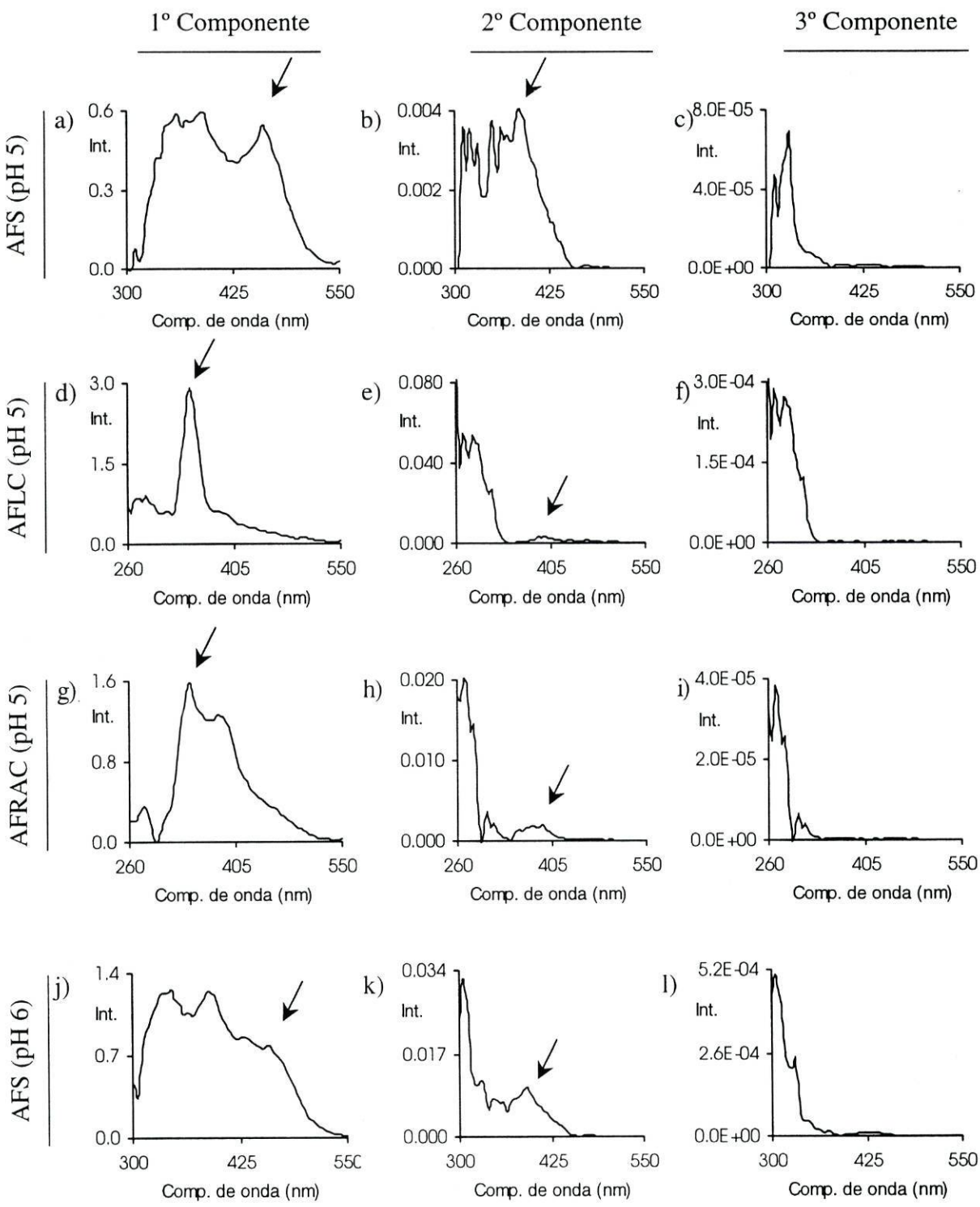


Figura 5.16 – Espectros típicos desvio padrão para as amostras AFS, [a) - c)]; AFLC, [d) - f)]; e AFRAC, [g) - i)], a pH 5 e a uma concentração de 25 mg L^{-1}. As figuras 5.16 [j) - l)] referem-se à amostra AFS a pH 6 e a 25 mg L^{-1}. As setas indicam os locais onde foram seleccionados os componentes.

Tabela 5.4 – Valores típicos das funções de erro do SIMPLISMA para as experiências com AF e catião Cu(II) [&].

Amostra	[AF]/mg L^{-1}	N	pH = 3		pH = 4		pH = 5		pH = 6	
			R_s	R_r	R_s	R_r	R_s	R_r	R_s	R_r
AFS	25	1	100	127	100,0	104	100,0	127	100	58
		2	0,7890	197	0,9573	645	0,7884	274	1,7153	217
		3	0,0040	1087	0,0015	7×10^{14}	0,0029	2310	0,0079	--
	50	1	100	130	100	180	100	104	100	107
		2	0,7711	910	0,5555	789	0,9574	831	0,9360	469
		3	0,0009	3806	0,0007	5600	0,0012	2080	0,0012	2676
	100	1	100	155	100	59	100	114	100	59
		2	0,6470	2276	1,682	1743	0,8760	1658	1,6892	1350
		3	0,0003	4855	0,0009	2920	0,0005	2978	0,0013	4391
AFLC	25	1	100	131	100	131	100	37	100	137
		2	0,7642	1872	0,7624	736	2,7002	1496	0,7319	574
		3	0,0004	---	0,0010	---	0,0018	---	0,0013	---
	50	1	100	231	100	175	100	272	100	203
		2	0,4337	847	0,5729	1367	0,3682	1795	0,4937	996
		3	0,0005	---	0,0004	---	0,0002	---	0,0005	---
	100	1	100	187	100	344	100	654	100	477
		2	0,5344	1630	0,2908	1537	0,1530	1506	0,2097	1154
		3	0,0003	---	0,0002	---	0,0001	---	0,0002	---
AFRAC	25	1	100	94	100	69	100	114	100	70
		2	1,0655	1324	1,4595	4822	0,8793	650	1,4375	2247
		3	0,0008	---	0,0003	---	0,0014	---	0,0006	---
	50	1	100	77	100	373	100	87	100	334
		2	1,3064	511	0,2679	1086	1,1482	1090	0,2995	111
		3	0,0026	---	0,0006	---	0,0011	---	0,0027	---
	100	1	100	192	100	288	100	438	100	314
		2	0,5212	3153	0,3467	2105	0,2284	1150	0,3181	3568
		3	0,0002	---	0,0002	---	0,0002	---	9×10^{-5}	---

& – N, número da variável pura.

desvio padrão correspondente ao segundo componente (Fig. 5.16.b) ainda contém sinal. De facto, para além da zona compreendida entre os 260 e os 320 nm que foi atribuída à presença de ruído experimental, existe também um conjunto de bandas de intensidade elevada situadas na zona dos 350 a 420 nm que contêm informação relevante, uma vez que nessa zona existem bandas nos espectros originais (Fig. 5.13).

Para complementar esta análise testou-se uma escolha hipotética de dois componentes para as três amostras estudadas (Fig. 5.17), tendo-se concluído que o segundo componente não teria qualquer significado físico no caso das amostras AFLC e AFRAC, uma vez que os seus espectros representam apenas ruído (Figs. 5.17.e e 5.17.h). Uma simples análise dos respectivos perfis de concentração das amostras AFLC e AFRAC (Figs. 5.17.f e 5.17.i) revela que praticamente não existem diferenças entre os dois componentes considerados, uma vez que os respectivos perfis de concentração são praticamente coincidentes. Em contraste, no caso da amostra AFS detectaram-se diferenças significativas nos perfis de concentração do primeiro e segundo componentes, existindo cerca de 60 % de extinção de fluorescência para o primeiro componente e cerca de 40 % para o segundo componente. Desta forma, decidiu-se adoptar a escolha de um componente para as amostras AFLC e AFRAC e dois componentes para a amostra AFS, com a excepção das experiências a 25 mg/L e a pH 6, para as quais se detectou apenas um componente.

5.3.2.1.3 – Espectros dos componentes

Nas Figs. 5.18 a 5.20 apresentam-se os espectros calculados dos componentes detectados para as amostras AFS, AFLC e AFRAC, e na Tabela 5.5 a posição das bandas principais dos espectros. A análise dos espectros revela que não ocorreram alterações significativas na forma dos espectros dos componentes com a variação do pH ou da concentração de AF, o que sugere que entre pH 3 e 6 estão envolvidos na complexação dos AF com o Cu(II) o mesmo tipo de sítios ligantes.

5.3.2.1.4 – Perfis de intensidade de fluorescência

Nas Figs. 5.21 a 5.23 apresentam-se os perfis de intensidade de fluorescência calculados para os componentes detectados nas amostras AFS (Fig. 5.21), AFLC (Fig. 5.22) e AFRAC (Fig. 5.23). Da análise destas figuras verifica-se que os perfis de

Tabela 5.5 – Posição (nm) das principais bandas de fluorescência síncrona dos componentes detectados nas experiências com AFS, AFLC e AFRAC.

Amostra	AFS	AFLC	AFRAC
1° Componente	460	345, 390	340, 390
2° Componente	390	--	--

intensidade de fluorescência calculados têm a forma de uma curva ligeiramente decrescente, com o primeiro componente da amostra AFS a apresentar uma extinção de fluorescência mais intensa que o segundo. Observa-se também uma extinção de fluorescência menos intensa a valores de pH mais ácidos, aumentando a sua extensão até atingir o seu valor máximo a pH 6. Este facto é particularmente evidente no caso da amostra AFS, para a qual se observou para o primeiro componente uma extinção de fluorescência a uma concentração de 100 mg L^{-1} de cerca de 60 % a pH 3, e de 100 % a pH 6.

Por outro lado, detectaram-se algumas diferenças entre as amostras quanto à sua fluorescência residual. Assim, a amostra AFS apresentou valores de extinção de fluorescência bastante superiores aos das outras duas, sugerindo que as amostras AFLC e AFRAC possuem uma percentagem de material fluorescente sem propriedades de complexação superior à amostra AFS.

Relativamente à influencia da variação do pH nos perfis de intensidade de fluorescência, observou-se um aumento geral da percentagem de complexação com o incremento do pH.

Quanto à influência da concentração de AF na percentagem de complexação, esta não afectou significativamente a forma dos perfis de intensidade de fluorescência calculados.

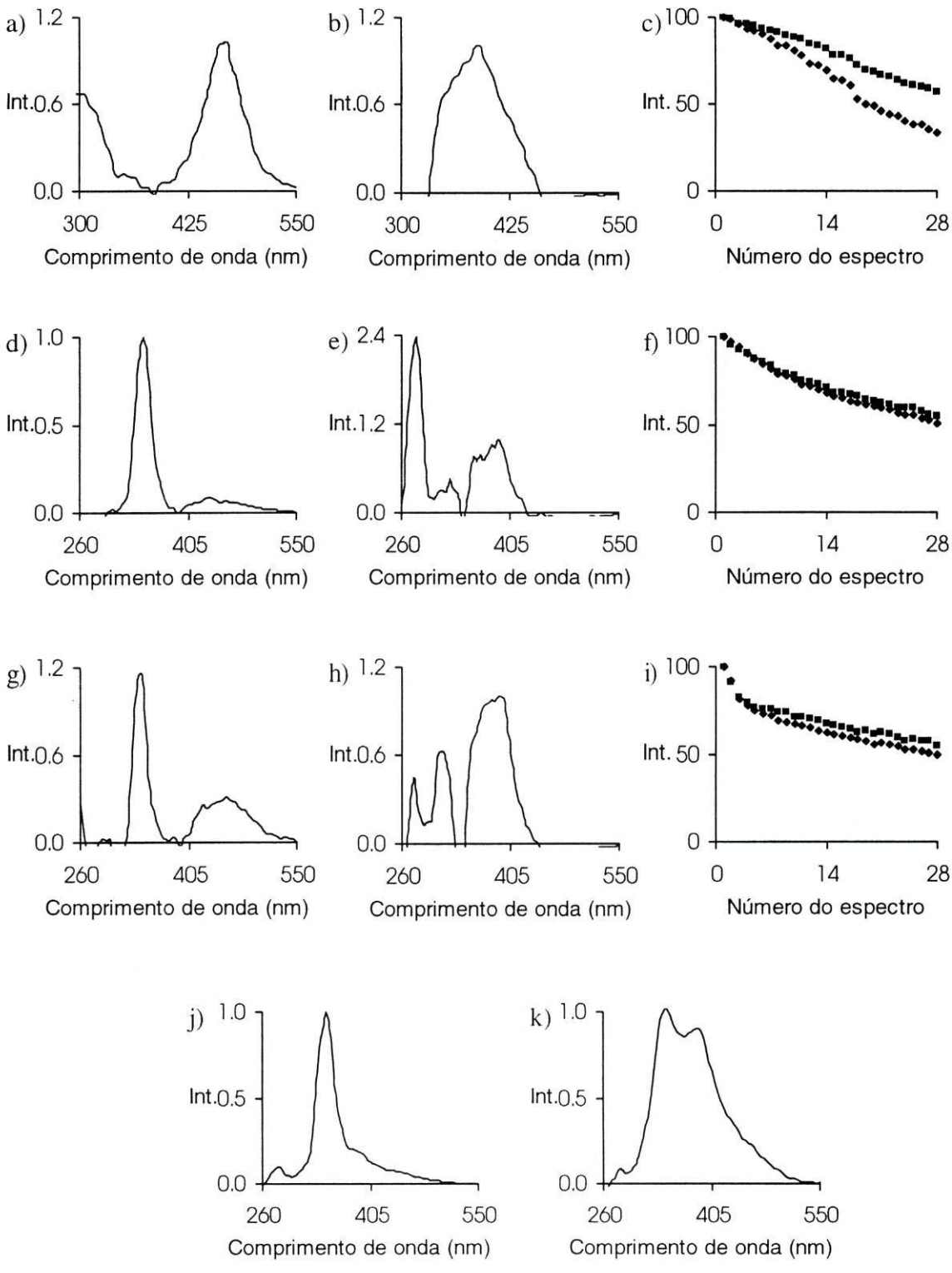


Figura 5.17 – Espectros típicos dos componentes e perfis de concentração para uma escolha hipotética de dois componentes para as amostras AFS, [a) - c)]; AFLC, [d) - f)]; e AFRAC, [g) - i)], a pH 5, em contraste com uma escolha de um componente para AFLC, [j)]; e AFRAC, [k)], a uma concentração de 100 mg L^{-1}.

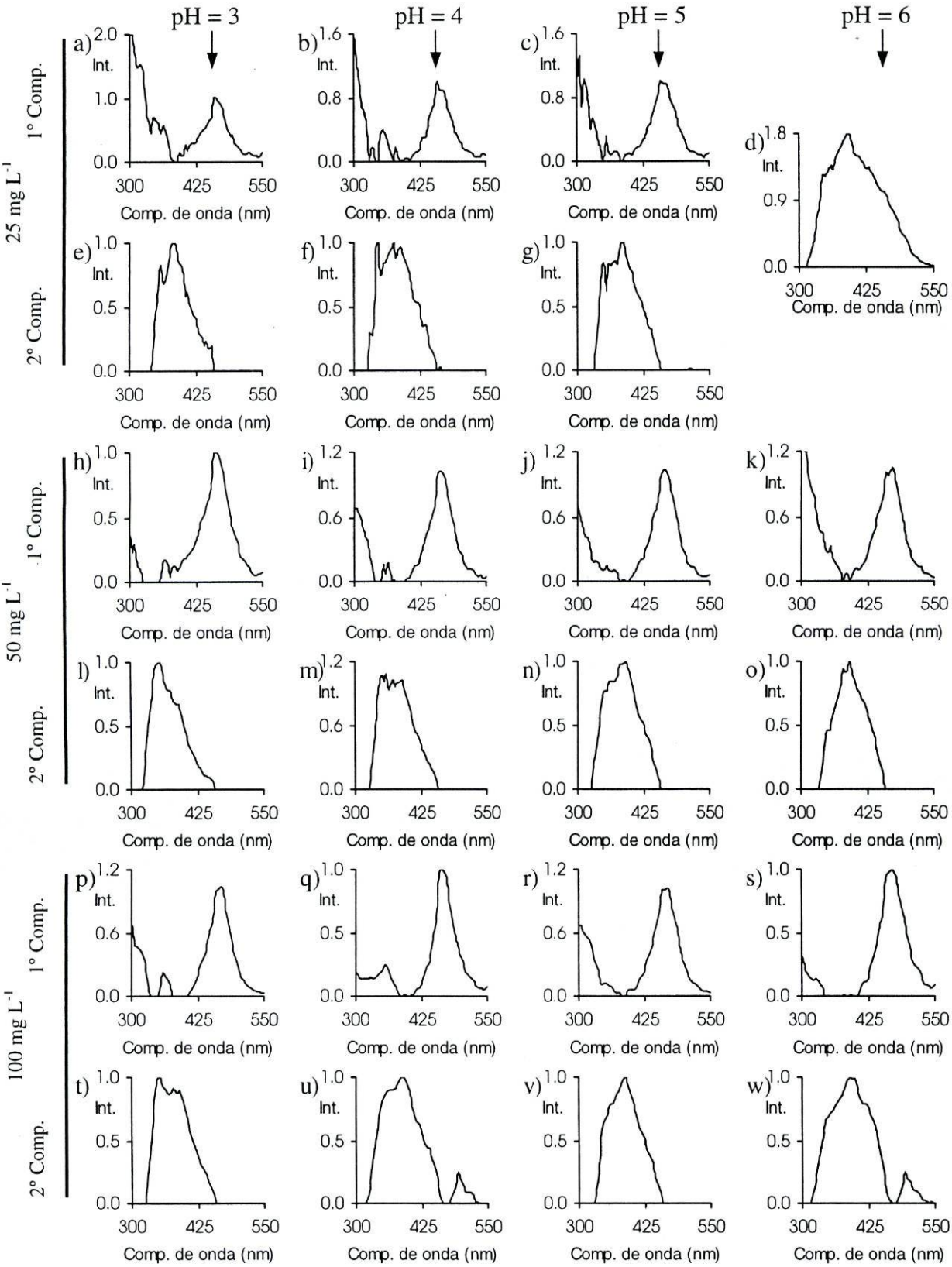


Figura 5.18 – Espectros calculados típicos dos componentes detectados nas experiências com AFS a pH 3, 4, 5 e 6, para concentrações de AFS de 25 mg L^{-1}, [a) - g)]; 50 mg L^{-1}, [h) - o)]; e 100 mg L^{-1}, [p) - w)]. Detectou-se apenas um componente nas experiências a 25 mg L^{-1} a pH 6.

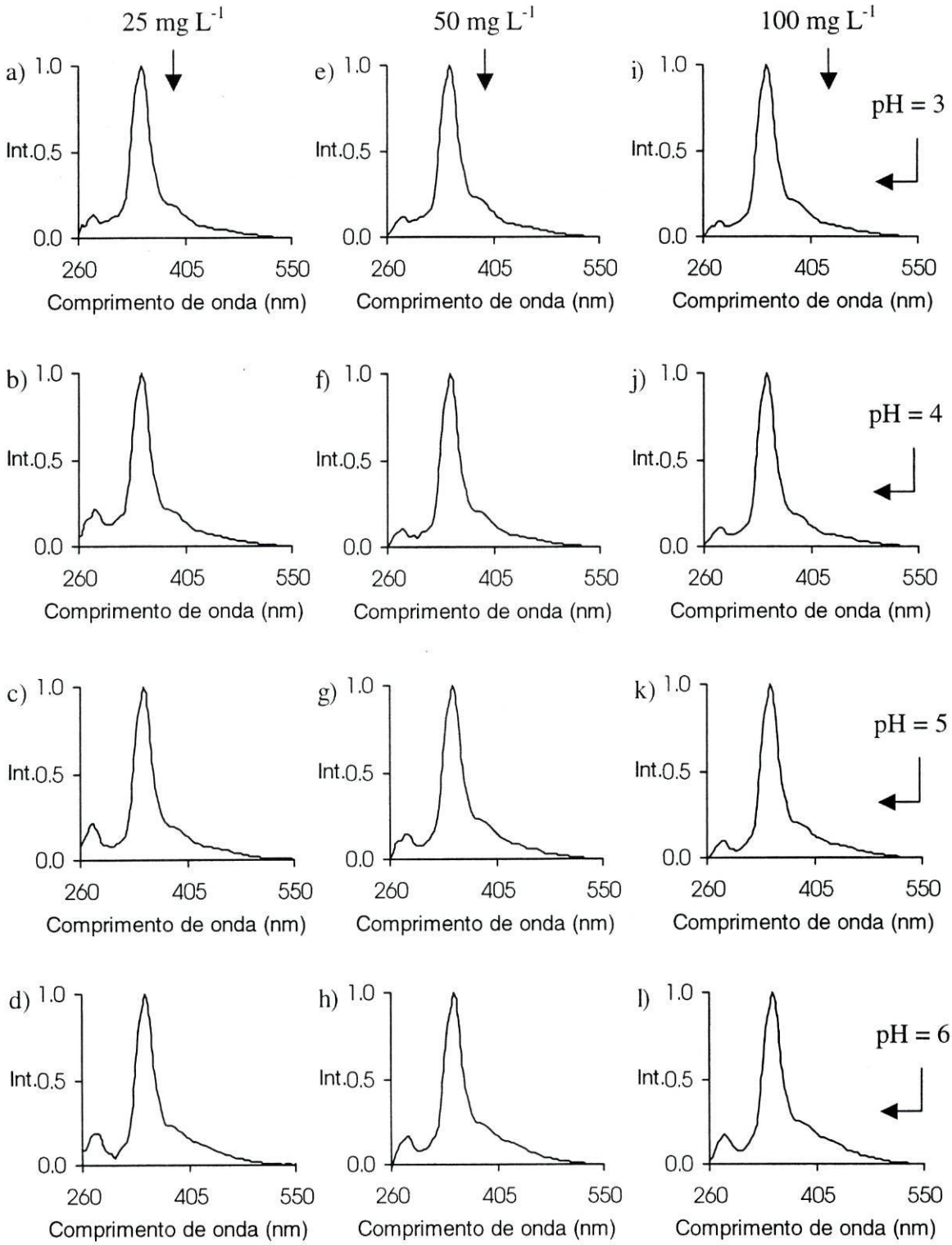


Figura 5.19 – Espectros calculados típicos do componente detectado nas experiências com AFLC e Cu(II) a pH 3, 4, 5 e 6, para concentrações de AFLC de 25 mg L^{-1}, [a) - d)]; 50 mg L^{-1}, [e) - h)]; e 100 mg L^{-1}, [i) - l)]. Experiências a pH 3, [a), e) e i)]; 4, [b), f) e j)]; 5, [c), g) e k)]; e 6, [d), h) e l)].

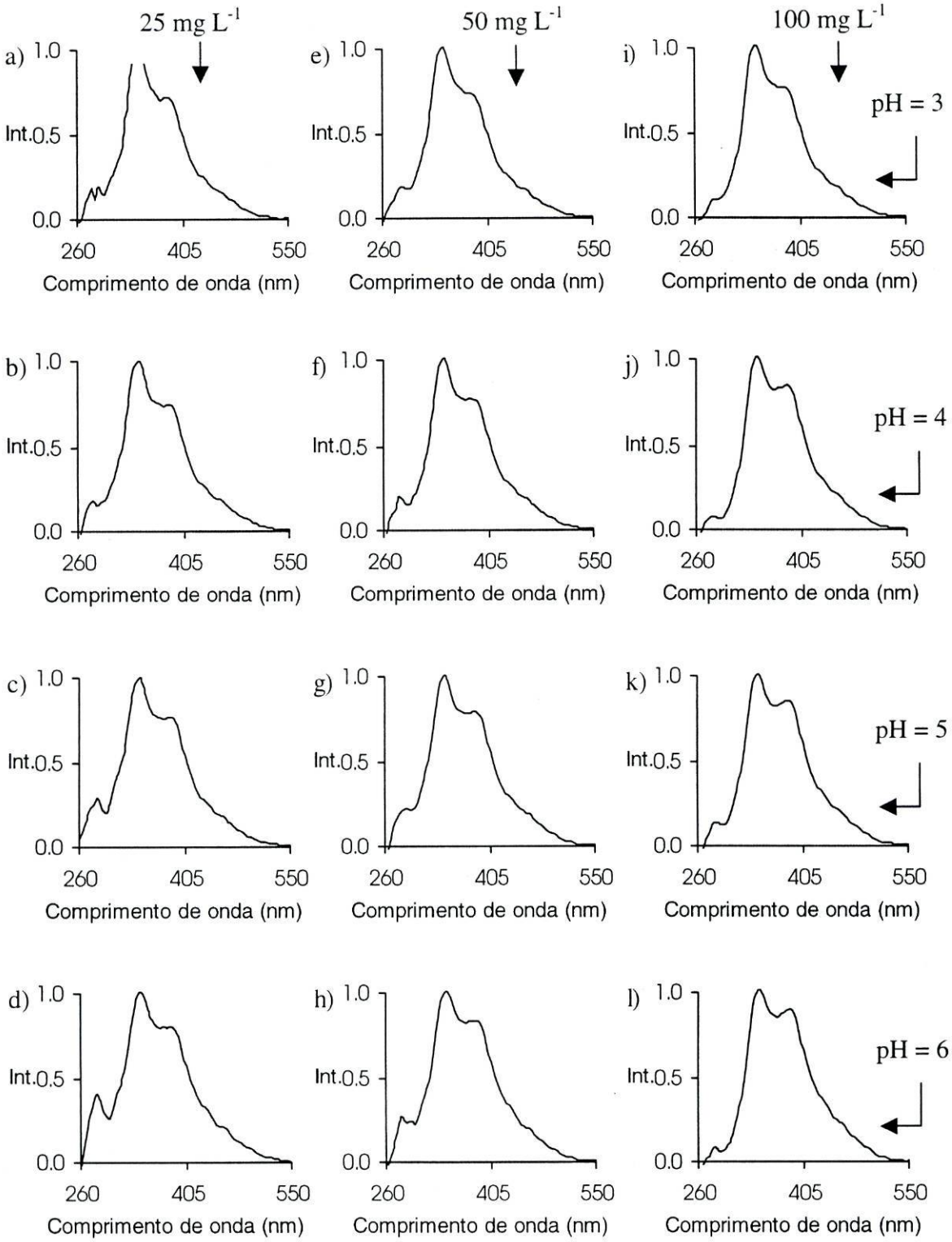


Figura 5.20 – Espectros calculados típicos do componente detectado nas experiências com AFRAC e Cu(II) a pH 3, 4, 5 e 6, para concentrações de AFRAC de 25 mg L^{-1}, [a) - d)]; 50 mg L^{-1}, [e) - h)]; e 100 mg L^{-1}, [i) - l)]. Experiências a pH 3, [a), e) e i)]; 4, [b), f) e j)]; 5, [c), g) e k)]; e 6, [d), h) e l)].

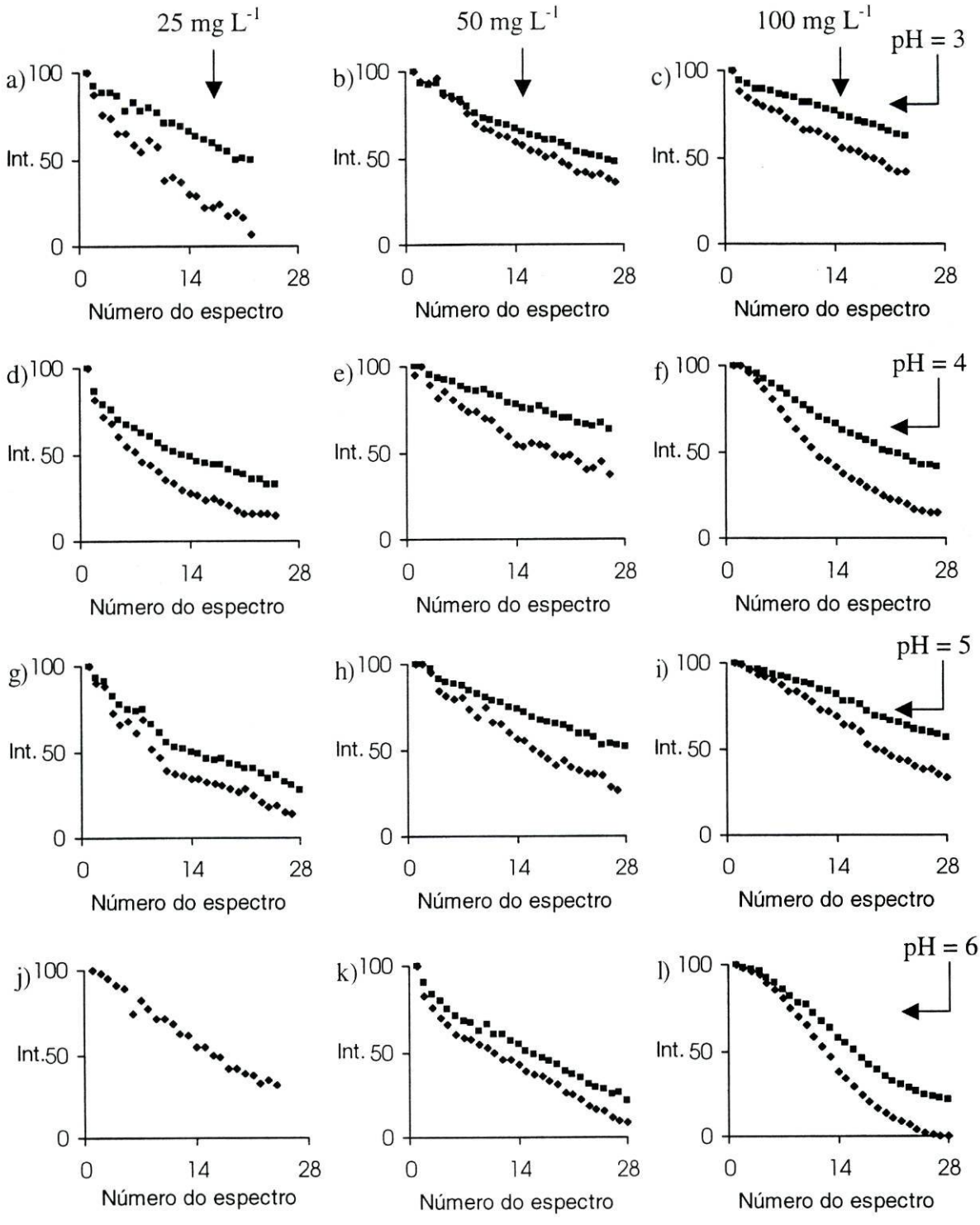


Figura 5.21 – Perfis de intensidade de fluorescência típicos dos componentes detectados nas experiências com AFS e Cu(II) a pH 3, 4, 5 e 6 e para concentrações de AFS de 25 mg L^{-1}, [a) - d)]; 50 mg L^{-1}, [e) - h)]; e 100 mg L^{-1}, [i) - l)]. Experiências a pH 3, [a), e) e i)]; 4, [b), f) e j)]; 5, [c), g) e k)]; e 6, [d), h) e l)].

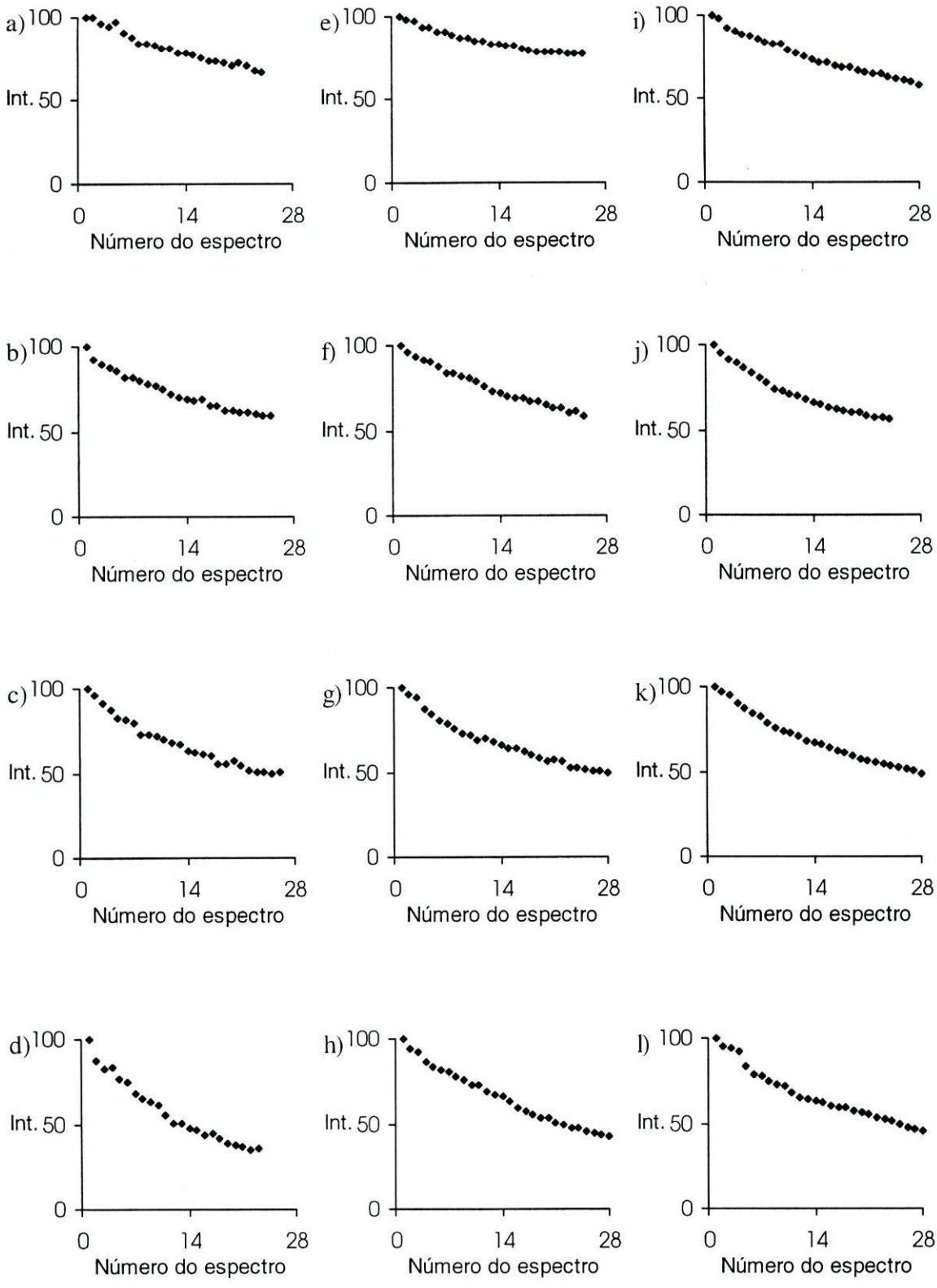


Figura 5.22 – Perfis de intensidade de fluorescência típicos do componente detectado nas experiências com AFLC e Cu(II) a pH 3, 4, 5 e 6 e para concentrações de AFLC de 25 mg L^{-1}, [a) - d)]; 50 mg L^{-1}, [e) - h)]; e 100 mg L^{-1}, [i) - l)]. Experiências a pH 3, [a), e) e i)]; 4, [b), f) e j)]; 5, [c), g) e k)]; e 6 [d), h) e l)].

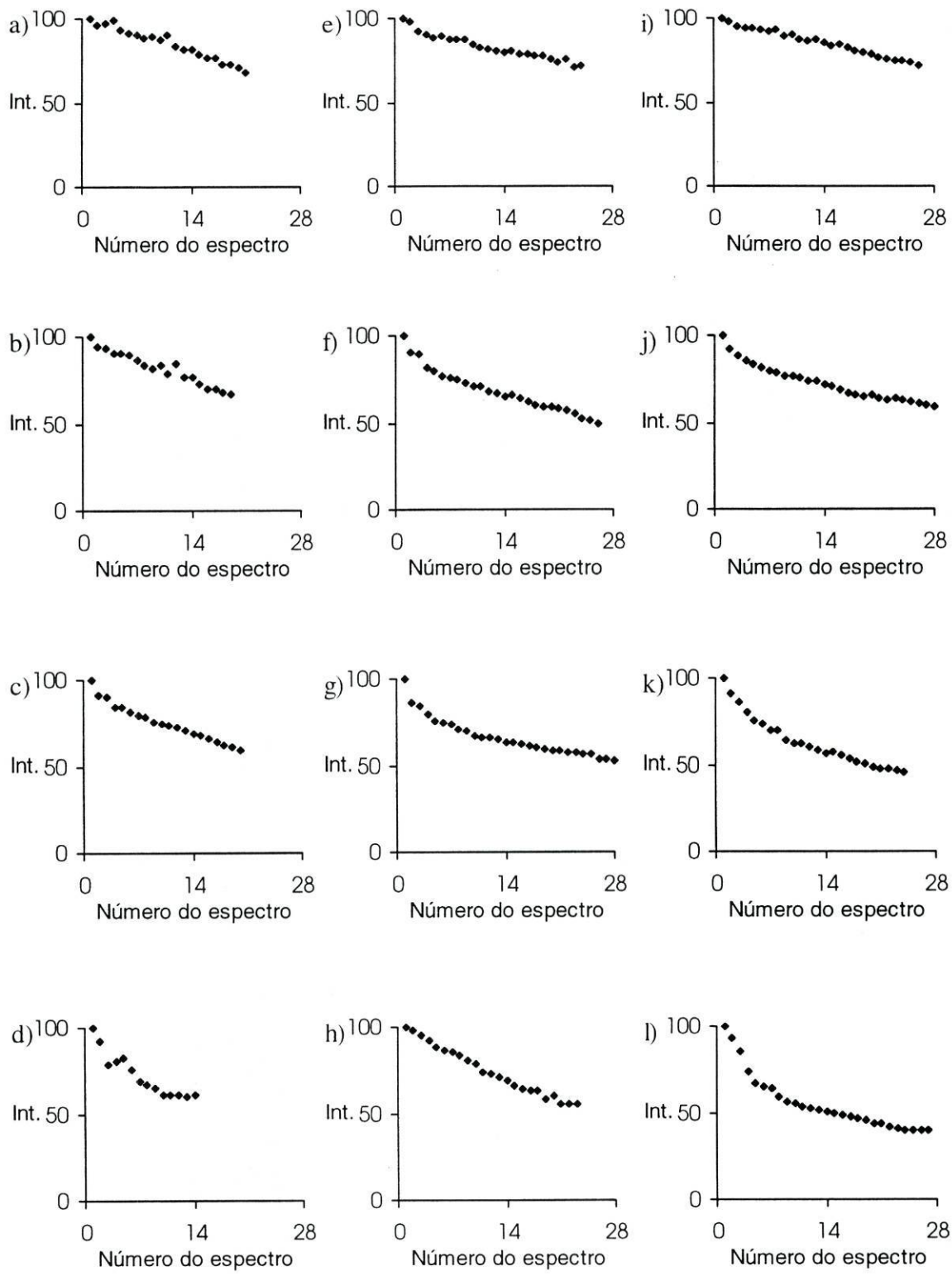


Figura 5.23 – Perfis de intensidade de fluorescência típicos do componente detectado nas experiências com AFRAC e Cu(II) a pH 3, 4, 5 e 6 e para concentrações de AFRAC de 25 mg L^{-1}, [a) - d)]; 50 mg L^{-1}, [e) - h)]; e 100 mg L^{-1}, [i) - l)]. Experiências a pH 3, [a), e) e i)]; 4, [b), f) e j)]; 5, [c), g) e k)]; e 6 [d); h) e l)].

5.3.2.2 – Determinação de parâmetros de equilíbrio

5.3.2.2.1 – Representações de Stern-Volmer da extinção da fluorescência

Na Fig. 5.24 apresentam-se representações de Stern-Volmer (eq. 2.17.a) típicas dos perfis de intensidade de fluorescência das três amostras. Da análise desta figura verifica-se que se obtiveram representações de Stern-Volmer aproximadamente lineares numa gama baixa de concentrações de ião metálico, mas à medida que a concentração deste aumenta, tendem a desviar-se no sentido do eixo das abcissas, o que indicia a existência de uma contribuição para a extinção da fluorescência de grupos fluorescentes que não participam na reacção de complexação, quer porque estes não se encontram acessíveis, quer porque não têm propriedades de complexação.

Quando os dados foram analisados pela equação modificada de Stern-Volmer que tem em conta este tipo de desvio (eq. 2.24) obtiveram-se representações mais lineares (Fig. 5.24). Nas Tabelas 5.6.a a 5.6.c apresentam-se alguns resultados obtidos no tratamento destas representações. Da análise dos valores de f pode concluir-se que o modelo se ajustou aos dados experimentais, uma vez que se obtiveram valores de [(1-f) × 100] com significado físico (entre 0 e 100). No entanto, no caso particular da amostra AFS a 100 mg L^{-1}, a pH 5 e 6, o modelo não se ajustou aos resultados experimentais, tendo originado valores de f superiores a um. Este resultado terá sido provocado por um fenómeno de extinção de fluorescência mais complexo que não se encontre contemplado na formulação do modelo, como por exemplo a presença de contribuições significativas de extinção dinâmica, que terão contribuído para a extinção global.

Uma comparação dos valores de (100-f) determinados para as várias amostras permite concluir que a percentagem de grupos fluorescentes não acessíveis à complexação é semelhante nas amostras AFLC e AFRAC, e muito inferior no caso da amostra AFS.

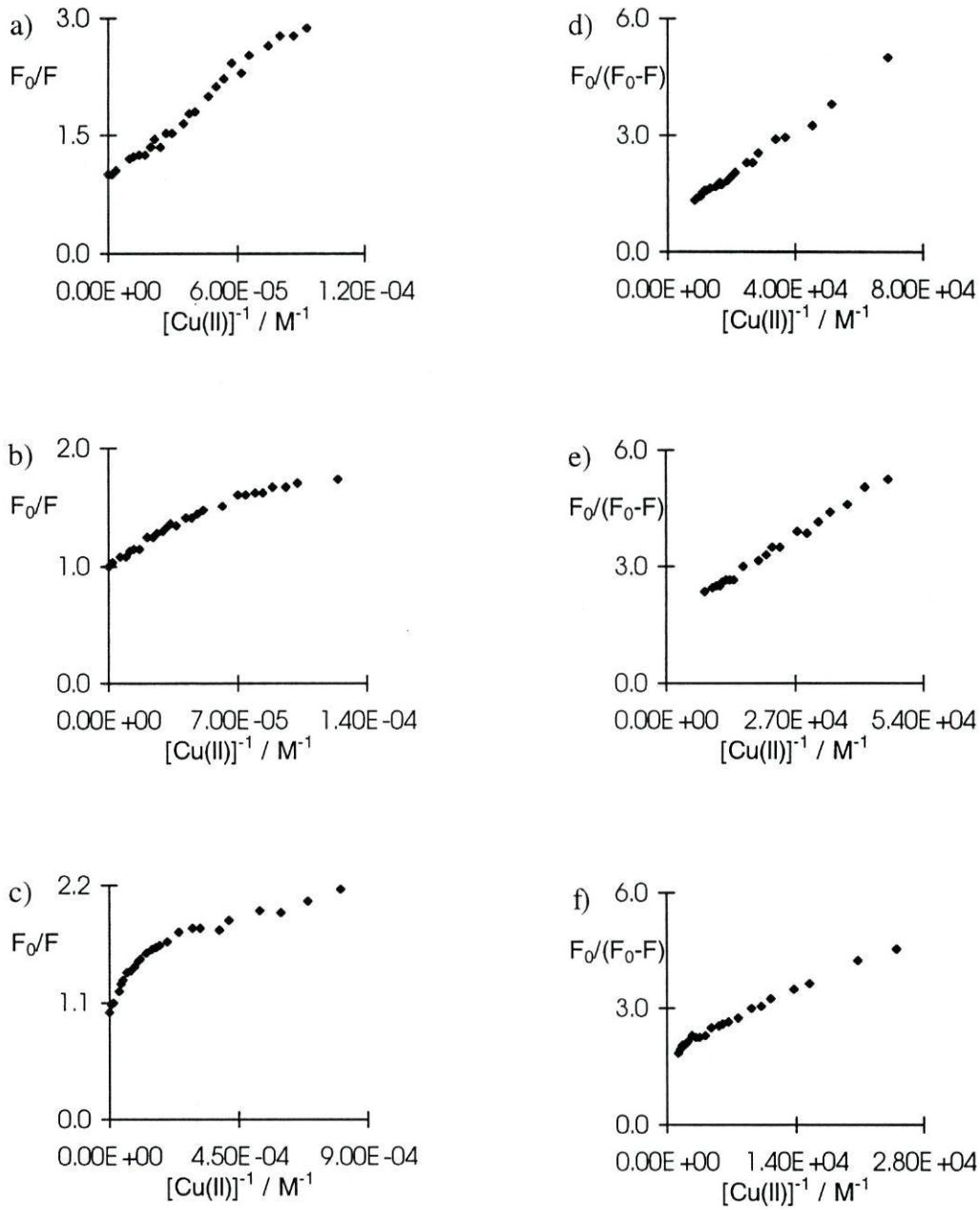


Figura 5.24 – Representações típicas das equações de Stern-Volmer linear, [a) - c)], e modificada, [d) - f)], para as experiências com AFS, [a) e d)]; AFLC, [b) e e)]; e AFRAC, [c) e f)], a pH 5 e uma concentração de 50 mg L^{-1}.

Tabela 5.6.a – Resumo dos resultados obtidos para a amostra AFS [&].

	Método de Ryan-Weber							Método de Stern-Volmer modificado			
pH	Log K	F_{ML}	$[L]_{Total}$ [a]	N.P.	SQR	DM	Δ[Cu(II)]	Log K	(1-f) × 100	N.P.	Correl
25 mg/L											
3	3,75(6)	9(6)	[b]	11	7,89	0,70	0,06-2,3	3,7(2)	8(9)	9	0,9936
4	4,1(1)	7(3)	*0,038(7)* **1,5(3)**	11	8,70	0,64	0,06-1,0	3,98(7)	5(3)	13	0,9973
5	4,64(4)	4(5)	[b]	11	4,07	0,55	0,01-0,2	4,6(1)	5(12)	12	0,9917
6	4,83(3)	21(3)	*0,04(2)* **1,6(8)**	16	4,92	0,44	0,002-0,15	4,32(4)	0(0)	16	0,9954
50 mg/L											
3	3,5(1)	14(9)	[b]	13	7,05	0,53	0,04-1,4	3,37(5)	24(15)	12	0,9947
4	4,2(1)	14(11)	[b]	15	6,12	0,57	0,006-0,15	4,1(2)	14(12)	17	0,9934
5	4,54(6)	0(0)	*0,024(8)* **0,5(2)**	16	7,24	0,62	0,006-0,14	4,354(1)	0(0)	21	0,9984
6	4,9(3)	2(3)	[b]	14	7,30	0,59	0,01-0,09	4,51 [c]	0 [c]	19 [c]	0,9986 [c]
100 mg/L											
3	3,5(1)	24(6)	[b]	12	5,07	0,43	0,02-1,1	3,6(1)	29(5)	17	0,9974
4	4,17(7)	0	[b]	--	2,40	0,40	0,01-0,4	3,89(5)	1(2)	20	0,9992
5	4,45(1)	0	*0,060(4)* **0,60(4)**	16	5,79	0,41	0,004-0,11	[d]	[d]	[d]	[d]
6	4,69(5)	0	*0,048(6)* **0,48(6)**	--	0,54	0,20	0,001-0,07	--	--	--	--

& – Log K, logaritmo da constante de estabilidade condicional; $[L]_{Total}$, concentração de ligando; F_{ML}, intensidade de fluorescência devida ao ligando complexado; N.P., número de pontos usados nos cálculos; SQR, soma dos quadrados dos resíduos; DM, desvio médio das estimativas; Δ[Cu(II)], gama de concentrações de Cu(II) usada nos cálculos ($mmolL^{-1}$); Correl, coeficiente de correlação linear. Valores médios para Log K; desvios padrões entre parêntesis; valores típicos para os restantes parâmetros.

a – Valores a itálico expressos em mmol/L, e a negrito em mmol/g.

b – Não foram obtidas estimativas razoáveis.

c – Obtido a partir de uma única experiência.

d – O modelo não se ajustou aos dados experimentais.

Tabela 5.6.b – Resumo dos resultados obtidos para a amostra AFLC [&].

	Método de Ryan-Weber							Método de Stern-Volmer modificado			
pH	Log K	F_{ML}	$[L]_{Total}$	N.P.	SQR	DM	Δ[Cu(II)]	Log K	(1-f) × 100	N.P.	Correl
25 mg/L											
3	3,4(2)	54(9)	*0,2(2)* **8(8)**	17	6,36	0,49	0,08-1,8	3,3(2)	54(8)	16	0,9962
4	4,4(2)	53(4)	[b]	11	3,12	0,43	0,008-0,12	4,5(3)	52(2)	15	0,9981
5	4,73(9)	51(1)	*0,011(5)* **0,4(2)**	16	5,07	0,46	0,004-0,11	4,6(1)	44(9)	15	0,9953
6	4,87(9)	38(7)	*0,023(9)* **0,9(4)**	14	4,22	0,47	0,02-0,1	4,4(2)	18(7)	20	0,9982
50 mg/L											
3	4,4(2)	70(1)	[b]	21	4,00	0,404	0,009-0,15	4,5(2)	71(2)	16	0,9974
4	4,4(1)	52(6)	*0,01(2)* **0,2(4)**	19	5,25	0,426	0,004-0,11	4,38(7)	49(5)	17	0,9967
5	4,7(2)	43(4)	*0,023(3)* **0,46(6)**	23	5,47	0,423	0,002-0,12	4,36(3)	33(7)	20	0,9976
6	4,5(2)	28(1)	*0,02(2)* **0,4(4)**	20	4,58	0,394	0,006-0,11	4,3(1)	18(13)	22	0,9986
100 mg/L											
3	3,6(1)	53(5)	[b]	23	5,84	0,44	0,02-1,54	3,50(9)	50(7)	21	0,9984
4	4,1(1)	46(6)	*0,04(1)* **0,4(1)**	22	4,10	0,36	0,02-0,35	3,91(9)	42(7)	21	0,9989
5	4,40(9)	39(6)	*0,03(3)* **0,3(3)**	25	4,84	0,37	0,03-0,14	4,3(1)	36(3)	17	0,9989
6	4,3(1)	33(2)	[b]	20	5,98	0,44	0,008-0,16	4,3(1)	34(2)	22	0,9987

& – Ver o rodapé da Tabela 5.6.a.

Tabela 5.6.c – Resumo dos resultados obtidos para a amostra AFRAC [&].

	Método de Ryan-Weber							Método de Stern-Volmer modificado			
pH	Log K	F_{ML}	$[L]_{Total}$	N.P.	SQR	DM	Δ[Cu(II)]	Log K	(1-f) × 100	N.P.	Correl
25 mg/L											
3	3,4(2)	58(6)	[b]	14	10,09	0,79	0,04-1,6	3,4(2)	58(8)	12	0,9955
4	4,1(4)	65(4)	[b]	11	12,08	0,80	0,04-0,13	4,2(3)	67(6)	13	0,9919
5	4,1(3)	52(9)	[b]	11	4,27	0,51	0,06-1,12	3,9(2)	47(13)	15	0,9952
6	4,6(2)	53(13)	[b]	11	6,26	0,76	0,008-0,40	4,6(2)	53(12)	11	0,9980
50 mg/L											
3	3,5(1)	72(3)	[b]	15	5,22	0,49	0,04-1,2	3,5(2)	72(1)	15	0,9951
4	3,76(8)	54(2)	[b]	13	4,76	0,46	0,16-1,1	3,8(1)	55(3)	16	0,9913
5	4,22(9)	50(3)	[b]	18	4,29	0,80	0,03-0,6	4,30(7)	50(3)	21	0,9942
6	4,54(9)	50(4)	*0,004(6)* **0,1(1)**	14	3,44	0,36	0,02-0,2	4,50(1)	50(5)	17	0,9930
100 mg/L											
3	3,5(1)	68(4)	[b]	16	4,81	0,38	0,12-0,77	3,5(2)	68(5)	18	0,9929
4	3,83(1)	54(3)	[b]	17	4,31	0,39	0,14-0,93	3,90(2)	56(2)	16	0,9947
5	4,25(5)	46(4)	*0,003(6)* **0,03(6)**	18	5,74	0,50	0,03-0,52	4,24(2)	46(3)	21	0,9972
6	4,35(7)	38(5)	*0,02(1)* **0,2(1)**	23	5,70	0,41	0,008-0,4	4,18(3)	33(4)	23	0,9986

& – Ver o rodapé da Tabela 5.6.a.

5.3.2.2.2 – Análise da extinção de fluorescência pelo método de Ryan e Weber

As Tabelas 5.6.a a 5.6.c e Fig. 5.25 mostram os resultados obtidos no ajuste dos perfis de extinção de fluorescência pelo método de Ryan e Weber (eq. 2.31). Os valores dos parâmetros de erro SQR e DM mostram que a qualidade dos ajustes obtidos é boa, uma vez que o parâmetro DM é sempre inferior a um e os valores de SQR são relativamente baixos.

Uma análise dos valores de Log K permite concluir que se obtiveram valores semelhantes para as três amostras, tal como pela análise de Stern-Volmer. O aumento de Log K (note-se que K é a constante de complexação condicional) com o pH resulta de uma maior desprotonação dos sítios ligantes envolvidos na complexação.

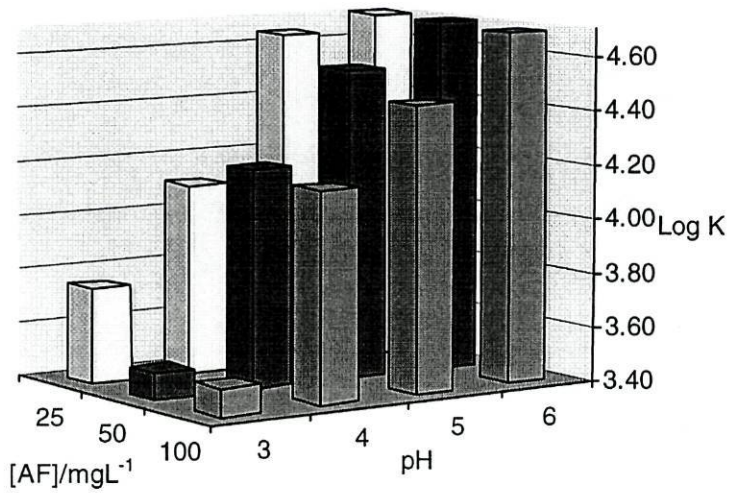
Para alguns dos casos, o ajuste dos perfis de intensidade de fluorescência não permitiu obter estimativas razoáveis dos valores de $[L]_{Total}$, mas este facto não afectou os valores de Log K e F_{ML}, nem a qualidade global do ajuste. Um dos factores que limitou a obtenção de estimativas razoáveis dos valores de $[L]_{Total}$ foi a relativamente baixa concentração de $[L]_{Total}$ nas moléculas de AF.

A comparação dos valores de $[(1\text{-}f)\times100]$ com os valores de F_{ML} detectados mostra que eles são semelhantes entre si, assim como os valores de Log K calculados pelos dois métodos. Quando se analisam os valores de F_{ML} ou de $[(1\text{-}f)\times100]$, verifica-se que estes diminuem com o aumento do pH, como se pode concluir também pela apreciação dos perfis de intensidade de fluorescência. Esta diminuição da fluorescência residual resulta de uma maior capacidade de complexação, uma vez os grupos carboxílicos encontram-se menos protonados a valores de pH mais elevados. Relativamente ao efeito da variação da concentração de AF na intensidade de fluorescência residual, não foi detectada qualquer alteração significativa dos valores de F_{ML} com o incremento da concentração de AF.

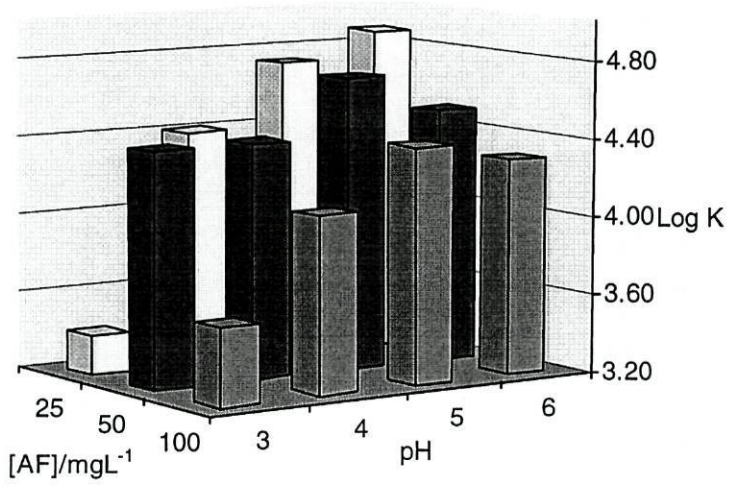
As duas amostras de AF antropogénicos, AFLC e AFRAC apresentam uma grande percentagem de grupos fluorescentes que não participam nas reacções de complexação, uma vez que os valores de $[(1\text{-}f)\times100]$ ou F_{ML} que lhes correspondem são bastante elevados quando comparados com os valores de F_{ML} relativos à amostra AFS.

A concordância observada entre os resultados obtidos pelo método de Ryan e Weber e pelas representações de Stern-Volmer suporta a evidência de que a extinção de fluorescência provocada pelo catião Cu(II) nestes AF é predominantemente estática.

a)



b)



c)

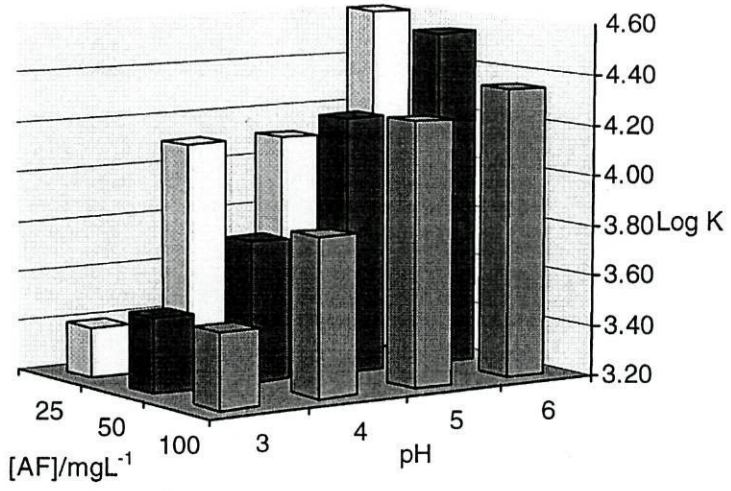


Figura 5.25 – Valores de Log K obtidos para as experiências de complexação do catião Cu(II) com as seguintes amostras de AF: a) AFS; b) AFLC e c) AFRAC.

5.3.3 – Comparação dos resultados obtidos por potenciometria e fluorescência

Quando se comparam os resultados dos parâmetros de complexação do catião Cu(II) e das amostras AFS, AFLC e AFRAC a pH 6,0 e a 25 mg/L obtidos por fluorescência com os resultados que lhes correspondem obtidos por potenciometria (Tabela 5.7 e Fig. 5.26) verifica-se que existe uma concordância razoável entre os valores de $[L]_{Total}$ e algumas diferenças significativas nos valores de Log K. De facto, enquanto os valores de $[L]_{Total}$ determinados pelas duas técnicas são da mesma ordem de grandeza, os valores de Log K calculados pelos métodos de Stern-Volmer ou Stern-Volmer modificado são cerca de uma década inferiores aos valores de Log K determinados por potenciometria, e cerca de meia década quando se utiliza o método de Ryan e Weber. Este fenómeno já se encontra descrito na literatura [9] e pode ser justificado de duas formas: (i) a fluorescência molecular apenas é sensível à formação de complexos 1:1, pelo que os valores de Log K obtidos na presença de complexos de outras estequeometrias (nomeadamente 1:2) virão afectados de um erro por defeito; (ii) a fluorescência síncrona não detecta a complexação de catiões pelos sítios ligantes não fluorescentes mais fracos, o que pode conduzir a resultados por defeito uma vez que podem estar a intervir na complexação sítios ligantes não fluorescentes, não sendo por isso detectados pela fluorescência molecular síncrona.

A fluorescência molecular e a potenciometria forneceram informações sobre os AF de formas distintas. Assim, como os AF são fluorescentes, a fluorescência molecular permitiu obter informação directa sobre eles. Por outro lado, a técnica potenciométrica utilizada apenas mediu a concentração de catião metálico livre, pelo que os AF foram estudados de uma forma indirecta. Esta particularidade da técnica potenciométrica pode apresentar em simultâneo vantagens e desvantagens. Assim, na ausência de adsorção de catião metálico nas paredes da cuba, de formação de hidrólises, ou quaisquer outros fenómenos paralelos, pode calcular-se com precisão a quantidade de catião metálico complexado como sendo a diferença entre a quantidade adicionada e a livre (medida pelo eléctrodo). Este procedimento, na ausência de fenómenos não esperados poderá conduzir a resultados de melhor qualidade que a fluorescência molecular, uma vez que podem existir sítios ligantes não fluorescentes que por isso não sejam detectados nesta última técnica. Por outro lado, dadas as limitações de utilização dos eléctrodos selectivos, nomeadamente quanto ao pH e à concentração de ligando a utilizar, a fluorescência molecular síncrona apresenta uma maior versatilidade de utilização.

Tabela 5.7 – Comparação entre os parâmetros de complexação determinados por potenciometria e fluorescência do catião Cu(II) com amostras de AF de concentração 25 mg L^{-1} a pH 6,0.

	Parâmetro de complexação			
	Log K		$[L]_{Total}$ (mmol/L)	
Amostra	Potenciometria	Fluorescência [a]	Potenciometria	Fluorescência
AFS	5,46(9)	*4,83(3)* **4,32(4)**	0,0164(2)	0,04(2)
AFLC	5,4(1)	*4,87(9)* **4,4(2)**	0,046(2)	0,023(9)
AFRAC	6,3(2)	*4,6(2)* **4,6(2)**	0,0034(7)	--

a – A itálico apresentam-se os valores obtidos pelo método de Ryan e Weber e a negrito os resultados obtidos pelo método de Stern-Volmer modificado.

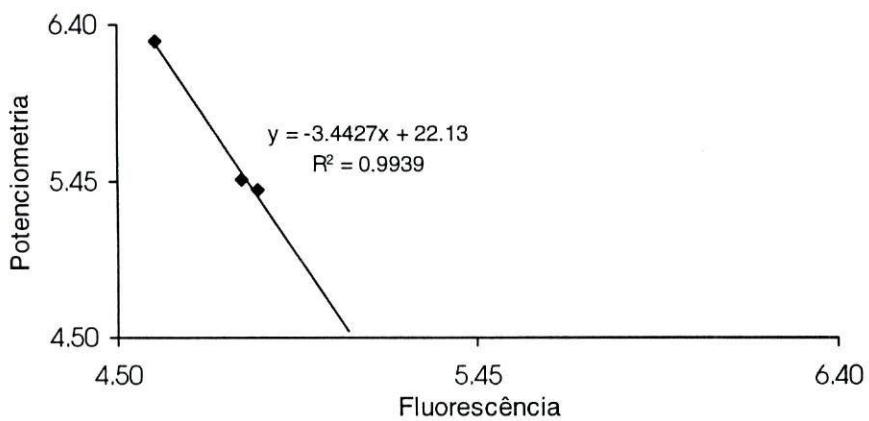


Figura 5.26 – Correlação entre os valores de Log K obtidos por fluorescência (método de Ryan e Weber) e potenciometria para as amostras AFS, AFLC e AFRAC a uma concentração de AF de 25 mg L^{-1} e a pH 6,0.

5.3.4 – Decomposição por PARAFAC de matrizes de três vias de dados cinético-espectrofotométricos correspondentes a misturas de catiões metálicos pesados

Antes de se iniciar o estudo das propriedades cinéticas das interacções entre amostras de AF e dois catiões metálicos, Cu(II) e Ni(II), desenvolveu-se uma metodologia para a quantificação de misturas de catiões metálicos a níveis vestigiais usando um método cinético de substituição de ligando (substituição de PAR por EDTA) e uma técnica quimiométrica de decomposição trilinear.

5.3.4.1 – Análise preliminar dos espectros

Na Fig. 5.27 apresentam-se exemplos típicos de matrizes de duas vias correspondendo a soluções simples e a misturas de catiões metálicos. Uma análise geral destas figuras mostra a existência de características comuns entre elas, nomeadamente a diminuição da intensidade da banda localizada a cerca de 500 nm e o aumento da intensidade da banda situada a 414 nm. A primeira banda corresponde ao complexo entre o PAR e os catiões metálicos, e a sua intensidade diminui em resultado da reacção de substituição do PAR pelo EDTA, o que provoca a formação de uma espécie espectroscopicamente inactiva na gama de comprimentos de onda do visível. A segunda banda deve-se à presença de PAR não complexado, verificando-se que a sua concentração aumenta no decorrer da experiência em resultado da substituição do PAR pelo EDTA. No caso das misturas de catiões (Figs. 5.27.d a 5.27.f), não se detectam diferenças significativas entre estes espectros e os espectros correspondentes aos catiões simples (Figs. 5.27.a a 5.27.c), uma vez que o máximo das bandas que correspondem à formação de complexos entre o PAR e os catiões metálicos se localizam para todos eles num intervalo de comprimentos de onda reduzido, da ordem dos 16 nm. Na Tabela 5.8 apresentam-se os máximos das bandas das misturas de PAR com catiões metálicos.

Uma análise da banda localizada a cerca de 520 nm nos conjuntos de espectros correspondentes a catiões simples (Fig. 5.28) permite ordenar a velocidade das reacções de substituição de ligando da seguinte forma: Pb(II) > Cd(II) > Zn(II) > Ni(II) ≈ Co(II).

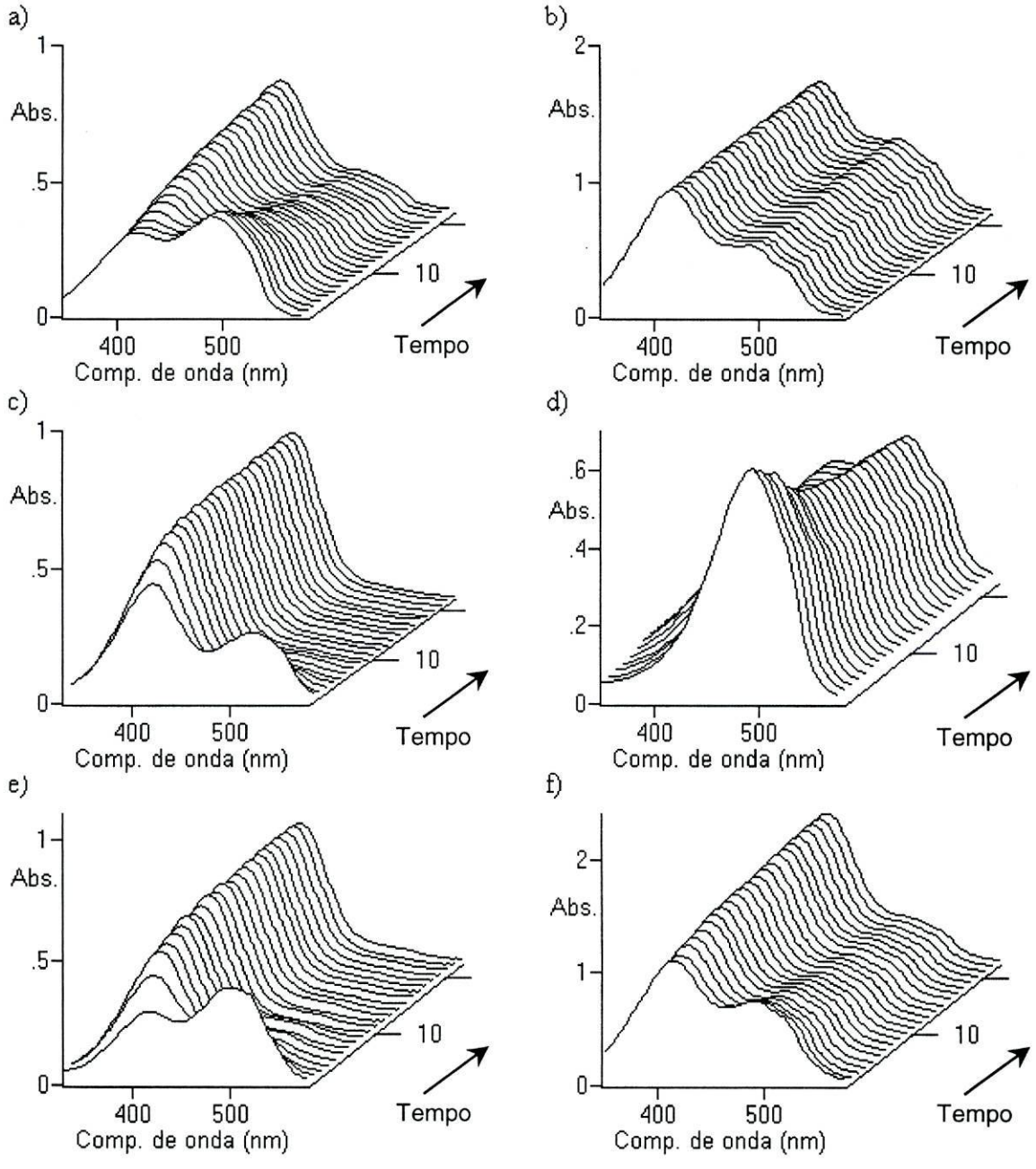


Figura 5.27 – Espectros sobrepostos típicos correspondentes a misturas de PAR com catiões ou misturas de catiões: a) Zn(II) (4,0 μM); b) Ni(II) (6,0 μM); c) Pb(II) (6,0 μM); d) Zn(II) + Ni(II) (4,0 μM de ambos os catiões); e) Pb(II) + Cd(II) (6,0 e 3,0 μM, respectivamente); f) Zn(II) + Pb(II) + Co(II) (6,0, 3,0 e 1,0 μM, respectivamente).

Tabela 5.8 – Máximos das bandas das misturas de PAR com catiões metálicos [&].

Catião	Zn(II)	Ni(II)	Pb(II)	Co(II)	Cd(II)
Máximos das bandas (nm)	490 + "shoulder" a 520	495 + "shoulder" a 526	516	500	490 + "shoulder" a 522

& – A largura das bandas a 50% da altura é de cerca de 80 nm.

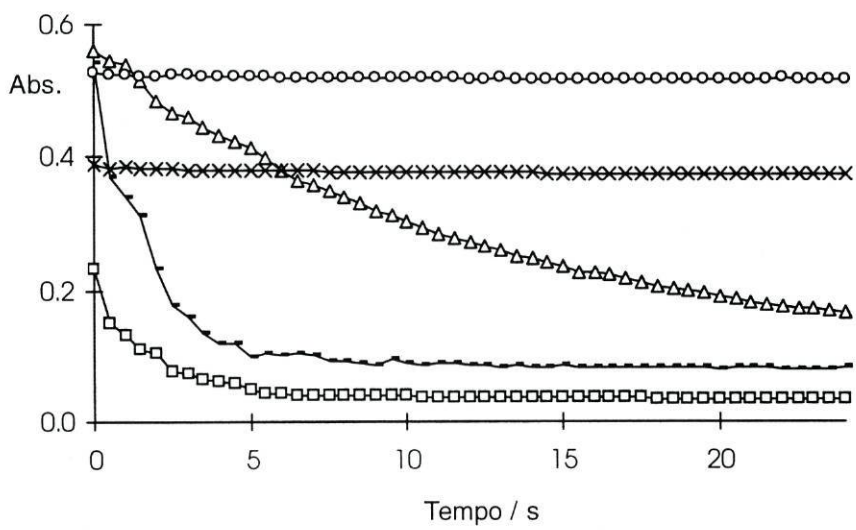


Figura 5.28 – Perfis de absorvância a 520 nm das bandas correspondentes à formação de complexos entre o PAR e os catiões Zn(II), Ni(II), Pb(II), Co(II) e Cd(II) em função do tempo. Os símbolos correspondem aos seguintes catiões: (Δ) Zn(II); (○) Ni(II); (□) Pb (II); (×) Co(II); (-) Cd(II).

5.3.4.2 – Matrizes de três vias correspondentes a um único ião

Efectuou-se a decomposição por PARAFAC das matrizes de três vias correspondentes a um único catião utilizando um modelo de dois factores, com o objectivo de verificar a trilinearidade da estrutura das matrizes de dados. Os dois factores correspondem, um às variações espectrais induzidas pela substituição do ligando, e o outro às secções dos espectros que não sofrem transformações durante a experiência. A Fig. 5.29 mostra os resultados típicos de um processo de decomposição [neste caso concreto para o Ni(II)] e a Tabela 5.9 alguns parâmetros de regressão da representação das concentrações experimentais em função das concentrações previstas.

A análise dos espectros calculados para os dois factores (Fig. 5.29.a) mostra que um deles (o primeiro) apresenta apenas valores positivos, enquanto que o outro (o segundo) apresenta duas secções distintas, uma positiva e outra negativa. Assim, o primeiro dos factores pode ser atribuído a um espectro constante, ou seja, um espectro onde não foram detectadas quaisquer variações no decorrer do tempo, e deve-se quer à banda do PAR a cerca de 414 nm, quer porventura à fracção de complexo [Catião metálico – PAR] não deslocado pelo EDTA no final do tempo de monitorização (cerca de 30 s). No caso do espectro do segundo factor, a secção positiva deve-se ao aumento da intensidade da banda correspondente ao PAR livre, enquanto a secção negativa pode ser atribuída à banda do complexo [Catião metálico – PAR], cuja concentração diminui no decorrer do tempo As duas bandas que correspondem a este factor possuem sinais opostos, o que se deve ao facto da diminuição da banda do complexo [Catião metálico – PAR] estar negativamente correlacionada com o aumento da banda referente ao PAR livre. Este resultado está de acordo com o previsto no modelo inicial.

Na Fig. 5.29.b apresenta-se um exemplo típico de perfis de tempo calculados. Da análise desta figura verifica-se que o perfil de tempo correspondente ao espectro constante tem a forma de uma linha horizontal, não mostrando qualquer variação no decorrer do tempo. Por outro lado, o outro perfil apresenta a forma de uma curva, com uma tendência crescente ou decrescente, correspondendo às variações observadas nos espectros à medida que decorrem as reacções de substituição. Relativamente ao complexo [Catião metálico – PAR], uma vez que a concentração deste diminui no decorrer do tempo, é de esperar um perfil de tempo com uma tendência decrescente, sendo essa variação oposta à tendência observada para o PAR livre. Uma vez que as

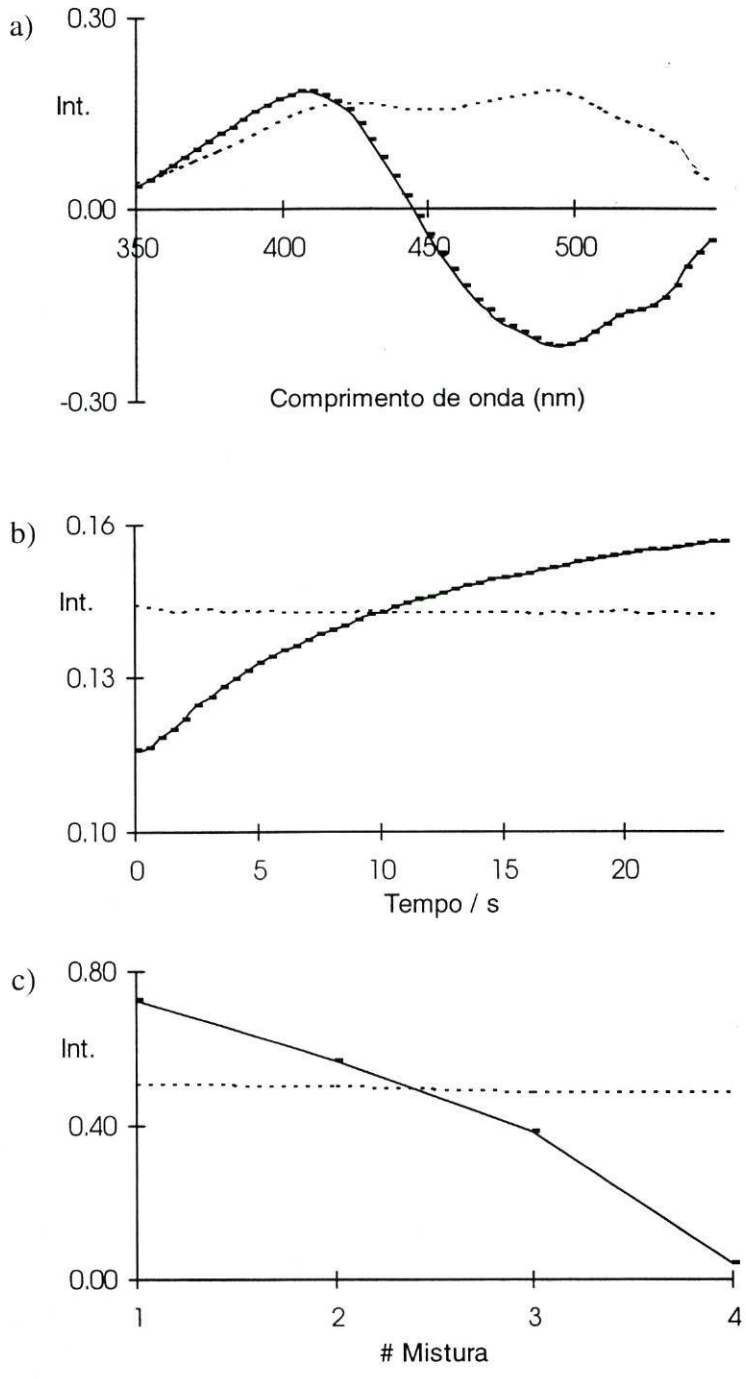


Figura 5.29 – Resultados típicos da decomposição de uma matriz de dados correspondente ao espectros da mistura de PAR com um único catião [neste caso o Ni(II)]: a) espectros; b) perfis de tempo; c) concentrações estimadas (unidades arbitrárias) dos componentes nas misturas.

Tabela 5.9 – Resultados de regressão linear típicos obtidos entre os valores previstos pelo método (unidades arbitrárias) e as concentrações reais (μM) dos catiões metálicos &.

Mistura	Catião	R	O.O.	I.C. (95%)
Iões simples [a]				
Zn(II)	Zn(II)	0,9932	$-1,0 \times 10^{-7}$	$[-4,2 \times 10^{-6}; 4,0 \times 10^{-6}]$
Ni(II)	Ni(II)	0,9747	$-2,6 \times 10^{-7}$	$[-1,7 \times 10^{-5}; 1,2 \times 10^{-5}]$
Pb(II)	Pb(II)	0,9955	$-8,2 \times 10^{-7}$	$[-6,4 \times 10^{-6}; 4,8 \times 10^{-6}]$
Co(II)	Co(II)	0,9927	$3,6 \times 10^{-6}$	$[8,4 \times 10^{-7}; 6,3 \times 10^{-6}]$
Cd(II)	Cd(II)	0,9989	$-2,2 \times 10^{-7}$	$[-1,6 \times 10^{-6}; 1,2 \times 10^{-6}]$
Misturas binárias				
Zn(II) + Ni(II)	Zn(II)	0,9794	$-2,7 \times 10^{-7}$	$[-5,8 \times 10^{-7}; 4,2 \times 10^{-8}]$
	Ni(II)	0,9981	$3,7 \times 10^{-6}$	$[3,6 \times 10^{-6}; 3,8 \times 10^{-6}]$
Pb(II) + Cd(II)	Pb(II)	0,9527	$8,3 \times 10^{-7}$	$[7,3 \times 10^{-8}; 1,6 \times 10^{-6}]$
	Cd(II)	0,7252	$-1,0 \times 10^{-6}$	$[-2,6 \times 10^{-6}; 5,7 \times 10^{-7}]$
Zn(II) + Pb(II)	Zn(II)	0,9820	$-3,3 \times 10^{-8}$	$[-2,6 \times 10^{-7}; 1,9 \times 10^{-7}]$
	Pb(II)	0,9545	$1,2 \times 10^{-7}$	$[-5,1 \times 10^{-5}; 7,1 \times 10^{-7}]$
Misturas ternárias				
Zn(II) + Pb(II) + Co(II)	Zn(II)	0,9970	$1,2 \times 10^{-7}$	$[-3,4 \times 10^{-7}; 9,7 \times 10^{-8}]$
	Pb(II)	0,9603	$4,6 \times 10^{-7}$	$[-3,2 \times 10^{-7}; 1,2 \times 10^{-6}]$
	Co(II)	0,9959	$8,0 \times 10^{-6}$	$[7,6 \times 10^{-6}; 8,5 \times 10^{-6}]$

& – R, coeficiente de correlação; O.O., ordenada na origem; I.C., intervalo de confiança.

a – Os conjuntos obtidos para os iões simples foram constituídos por três matrizes de duas vias correspondendo a subconjuntos de misturas binárias, onde o segundo ião apresenta uma concentração nula.

variações com o tempo das concentrações de complexo [Catião metálico – PAR] e de PAR livre se encontram inversamente correlacionadas, um perfil de tempo pode ser obtido a partir do outro.

Para se efectuarem análises quantitativas, o parâmetro mais importante a considerar é a concentração dos catiões metálicos que integram as misturas. Assim, efectuaram-se representações das concentrações estimadas (unidades arbitrárias) em função das concentrações experimentais, de forma a se avaliar a qualidade das estimativas. Os resultados obtidos (Tabela 5.9 e Fig. 5.29.c) mostram que essa representação toma a forma de uma recta, com coeficientes de correlação elevados e ordenadas na origem cujos intervalos de confiança incluem o zero, pelo que se conclui da boa qualidade das estimativas dos valores da concentração. Contudo, é de salientar que estes resultados foram obtidos excluindo do cálculo a concentração nula, com a qual se obtiveram alguns desvios à linearidade desta representação.

5.3.4.3 – Misturas de catiões

Efectuou-se a decomposição por PARAFAC das matrizes de três vias correspondentes a misturas de catiões, utilizando um número de factores igual ao número de catiões presentes na mistura, mais um, que corresponde à existência do espectro do PAR e de outras contribuições constantes.

O PARAFAC conseguiu encontrar uma decomposição única apenas em algumas das misturas binárias e ternárias dos cinco catiões (Tabela 5.9). A decomposição é tanto mais fácil de obter, quanto maior for a diferença entre as propriedades cinéticas das reacções de substituição de ligando dos constituintes das misturas. Assim, o perfil de tempo surge como o factor mais importante a ter em consideração no desenho experimental de misturas candidatas a uma decomposição única.

Nas Figs. 5.30 e 5.31 apresentam-se resultados típicos da decomposição de matrizes de dados correspondentes a uma mistura binária de [Zn(II) + Pb(II)] (Fig. 5.30) e a uma mistura ternária de [Zn(II) + Pb(II) + Co(II)] (Fig. 5.31), e na Tabela 5.9 alguns parâmetros da regressão linear obtidos da representação das concentrações calculadas (unidades arbitrárias) em função das concentrações experimentais. Da análise das Figs. 5.30 e 5.31 e da Tabela 5.9 verifica-se que os espectros calculados dos complexos de PAR (Figs. 5.30.a e 5.31.a) apresentam uma forma semelhante aos espectros obtidos

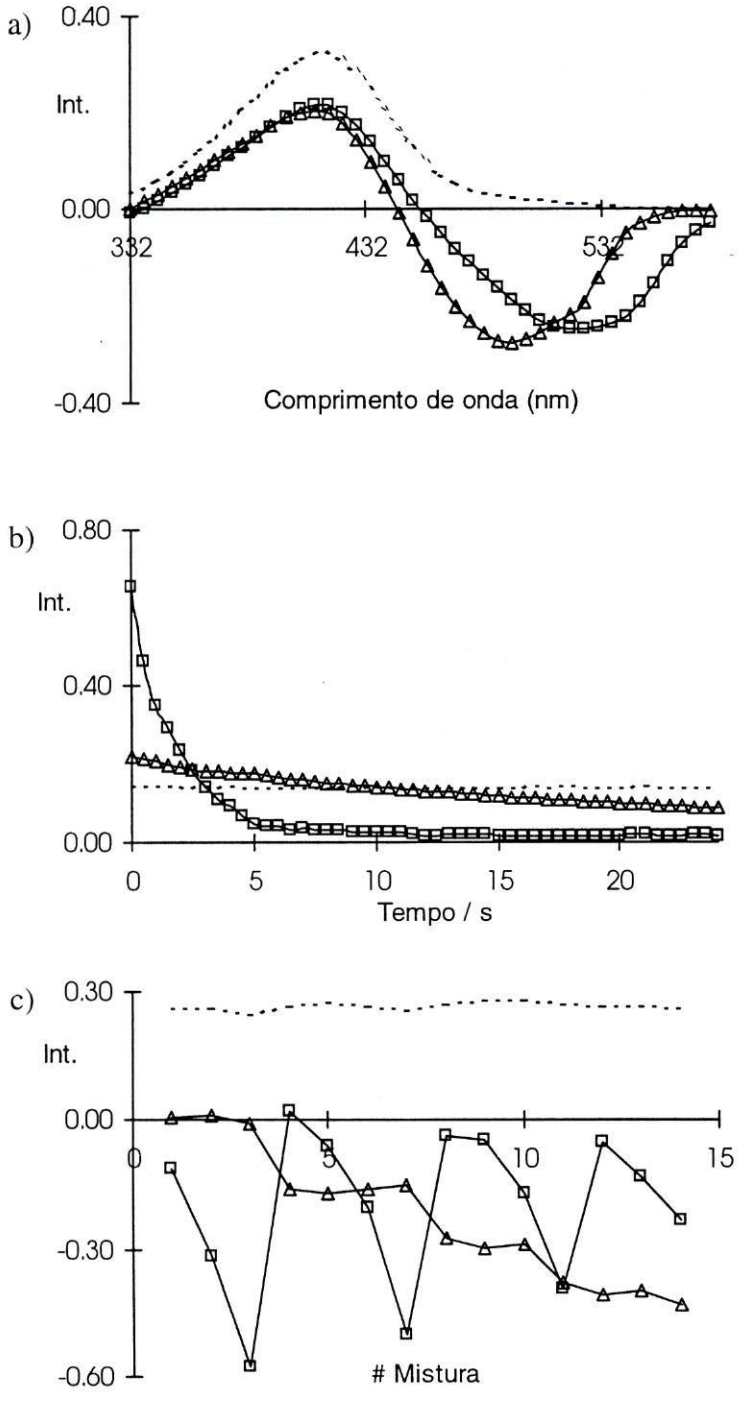


Figura 5.30 – Resultados típicos da decomposição de uma matriz de dados correspondente ao espectros da mistura de PAR com dois catiões [neste caso, Zn(II) + Pb(II)]: a) espectros; b) perfis de tempo; c) concentrações estimadas (unidades arbitrárias) dos componentes nas misturas. Os símbolos correspondem aos seguintes catiões: (△) Zn(II); (□) Pb (II).

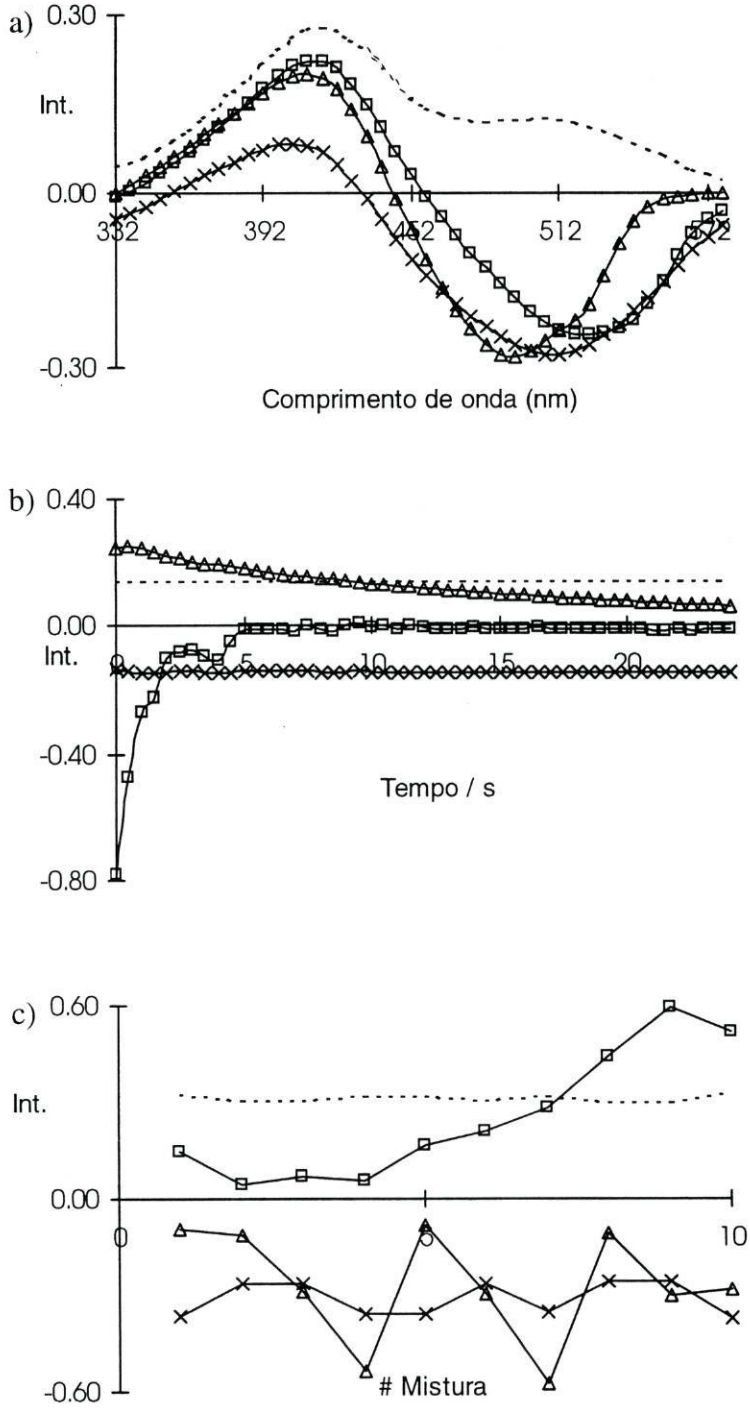


Figura 5.31 – Resultados típicos da decomposição de uma matriz de dados correspondente aos espectros da mistura de PAR com três catiões [neste caso, Zn(II) + Pb(II) + Co(II)]: a) espectros; b) perfis de tempo; c) concentrações estimadas (unidades arbitrárias) dos componentes nas misturas. Os símbolos correspondem aos seguintes catiões: (△) Zn(II); (□) Pb (II); (×) Co(II).

para os catiões simples (Fig. 5.29.a), coincidindo com a forma dos espectros experimentais. A análise das Figs. 5.30.a e 5.31.a revela ainda que para além da elevada sobreposição das bandas de que resulta uma menor capacidade de resolução destas, a decomposição por PARAFAC conseguiu reconstruir os espectros individuais sem quaisquer limitações.

Relativamente aos perfis de tempo (Figs. 5.30.b e 5.31.b) calculados para os constituintes das misturas, estes seguiram a tendência observada anteriormente.

A estimativa das concentrações (Figs. 5.30.c e 5.31.c) mostrou ser de boa qualidade, uma vez que existe uma proporcionalidade directa entre os valores experimentais e os previstos, sendo a qualidade das previsões semelhante à obtida para os catiões simples (Tabela 5.9). Todavia, obteve-se uma correlação de menor qualidade no caso do Cd(II) inserido na mistura binária de [Pb(II) + Cd(II)], o que se deveu à existência de perfis de tempo semelhantes para os dois catiões.

5.3.4.4 – Limitações do processo de decomposição

Para se obter uma decomposição única das matrizes de dados cinético-espectrofotométricos correspondentes a misturas binárias ou ternárias dos cinco catiões analisados, os catiões devem possuir espectros e perfis de tempo diferentes. Por exemplo, os complexos [PAR + Zn(II)] e [PAR + Cd(II)] possuem espectros semelhantes, ou seja, um máximo das bandas a 490 nm e um "shoulder" a cerca de 520 nm, pelo que estes dois catiões não originam matrizes de dados cinético-espectrofotométricos que permitam obter uma decomposição única. No caso das misturas de Co(II) e de Ni(II), a situação observada é idêntica, uma vez que estes dois catiões possuem perfis de tempo semelhantes (Fig. 5.28). Contudo, nestes casos onde as misturas contiverem catiões com espectros ou propriedades cinéticas semelhantes, a alteração das condições experimentais (como o pH ou o indicador metalocrómico utilizado) pode facilitar um processo de decomposição única. Nas situações em que não seja possível alterar as condições experimentais, deve utilizar-se um outro processo de decomposição no qual se possam impor restrições ao cálculo [10,11].

5.3.4.5 – Perspectivas para os estudos de soluções de AF

Este estudo demonstrou que as medições cinético-espectrofotométricas de misturas de catiões metálicos pesados são capazes de produzir conjuntos de dados com estrutura trilinear capazes de atingirem uma decomposição única. Desta forma, este método apresenta um elevado potencial para a utilização no desenvolvimento de técnicas analíticas que permitam a determinação simultânea, robusta e quantitativa de misturas de catiões metálicos pesados na gama de concentrações dos micromolar.

O modelo PARAFAC representou satisfatoriamente os dados experimentais apresentados neste trabalho, o que demonstrou a utilidade de técnicas quimiométricas baseadas no PARAFAC na resolução de alguns problemas analíticos mais complexos. Quanto maior a complexidade das amostras, mais confusos serão os sinais de fundo, pelo que aumentarão as dificuldades na sua eliminação. Assim, a aplicação deste tipo de metodologia de análise química a estudos intrinsecamente complexos, como são os que envolvem AF, poderá ser vantajoso porque permitirá extrair, ou isolar, os perfis de tempo de outros sinais de fundo ("background") complexos. No entanto, antes da sua utilização em estudos envolvendo AF, será ainda necessário obter uma maior quantidade de informação, quer sobre as reais potencialidades destas metodologias, quer sobre as interacções entre AF e misturas de catiões metálicos.

Para além de uma metodologia para a extracção de perfis de tempo o mais puros possível, é necessário um método que permita efectuar a transformação desses perfis de tempo em parâmetros cinéticos (velocidades específicas e concentração de sítios ligantes). O método das transformadas de Laplace, que se aplicará a seguir, parece ter características que se integram na filosofia de desenvolvimento de metodologias do tipo do PARAFAC, uma vez que recorre a uma modelação branda.

5.3.5 – Estudos cinéticos da interacção entre AF e os catiões Ni(II) e Cu(II)

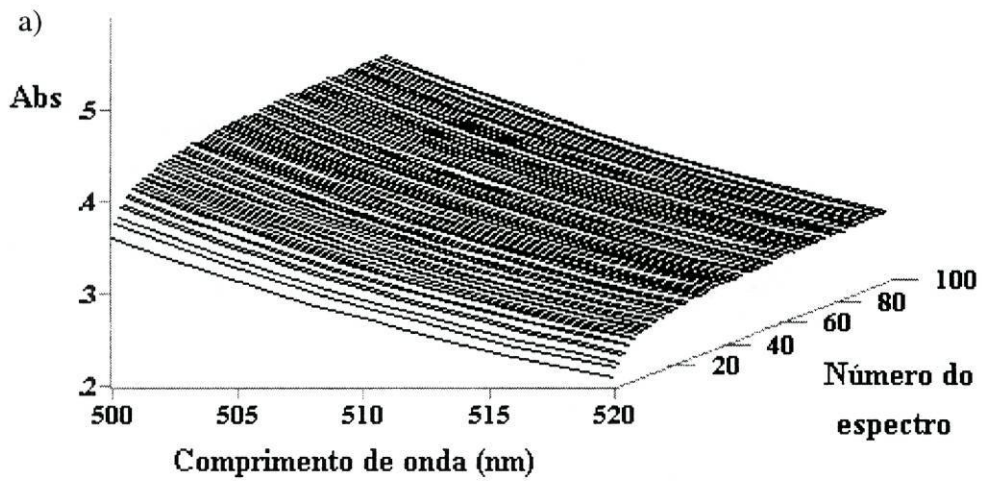
Efectuaram-se estudos cinéticos da interacção entre AF e os catiões Ni(II) e Cu(II) utilizando como técnica experimental a espectroscopia de UV-Vis. Esta técnica permitiu a monitorização de uma reacção de permuta de ligando entre os AF e o indicador metalocrómico PAR, tendo-se aplicado o método das transformadas de Laplace no tratamento dos dados obtidos.

5.3.5.1 – Análise preliminar dos conjuntos de espectros

Na Fig. 5.32 apresentam-se exemplos típicos de um conjunto de dados experimentais recolhidos no decorrer de experiências de cinética de descomplexação dos catiões Ni(II) e Cu(II) de uma amostra de AFS (as figuras são semelhantes para as outras amostras de AF). Da análise desta figura pode verificar-se que ocorre um incremento da absorvância com o aumento do tempo da reacção em resultado da formação do complexo [Catião metálico – PAR], sendo esse aumento bastante acentuado nos primeiros segundos e muito mais moderado no período de tempo restante. Note-se que no início da experiência, para além do catião metálico deslocado pelo PAR também se forma o complexo entre o PAR e o catião metálico livre (não complexado com os AF). Como a estabilidade dos complexos de AF com Ni(II) é muito menor do que a estabilidade dos complexos com o Cu(II) [12], a quantidade de catião metálico livre no início da experiência será maior no caso do Ni(II) que no caso do catião Cu(II), nas mesmas condições experimentais. Uma análise da Fig. 5.32 permite confirmar esta observação, uma vez que variação inicial de absorvância é muito mais pronunciada no conjunto de espectros correspondente ao catião Ni(II) (Fig. 5.32.a) que no conjunto de espectros relativo ao Cu(II) (Fig. 5.32.b).

Um corte nos espectros da Fig. 5.32 a 508 nm (ao máximo de absorvância do complexo [Catião metálico – PAR]) permitiu obter conjuntos de valores de absorvância em função do tempo [Abs(t)]. Na Fig. 5.33 apresentam-se sobreposições de cinco perfis de absorvância (por comodidade de representação não se apresentam os perfis de absorvância para a razão molar catião metálico/AF 1:7) que correspondem à formação dos complexos entre os catiões Ni(II) e Cu(II) e o PAR. Da análise desta figura pode verificar-se que a absorvância máxima atingida no decorrer de cada experiência aumenta à medida que se alarga a razão molar catião metálico/AF, devido à formação de uma maior quantidade de complexo [Catião metálico – PAR].

Por outro lado, quando se comparam os perfis de absorvância do Ni(II) e do Cu(II) para uma mesma amostra de AF e uma razão molar idêntica (Fig. 5.34), verifica-se que a formação do complexo [Catião metálico – PAR] atinge mais rapidamente valores próximos do máximo no caso do Ni(II) que no caso do Cu(II), o que estará relacionado com a maior concentração de catião metálico livre existente no início das experiências em que intervém o Ni(II). Uma outra particularidade destas representações



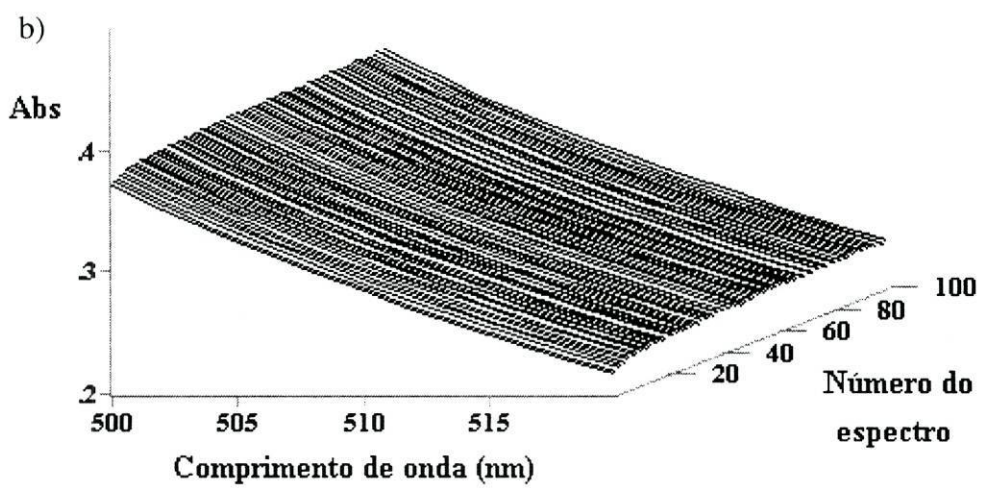


Figura 5.32 – Representação de conjuntos de espectros de absorvância em função do tempo para experiências de descomplexação dos catiões (a) Ni(II) e (b) Cu(II) de uma amostra de AFS.

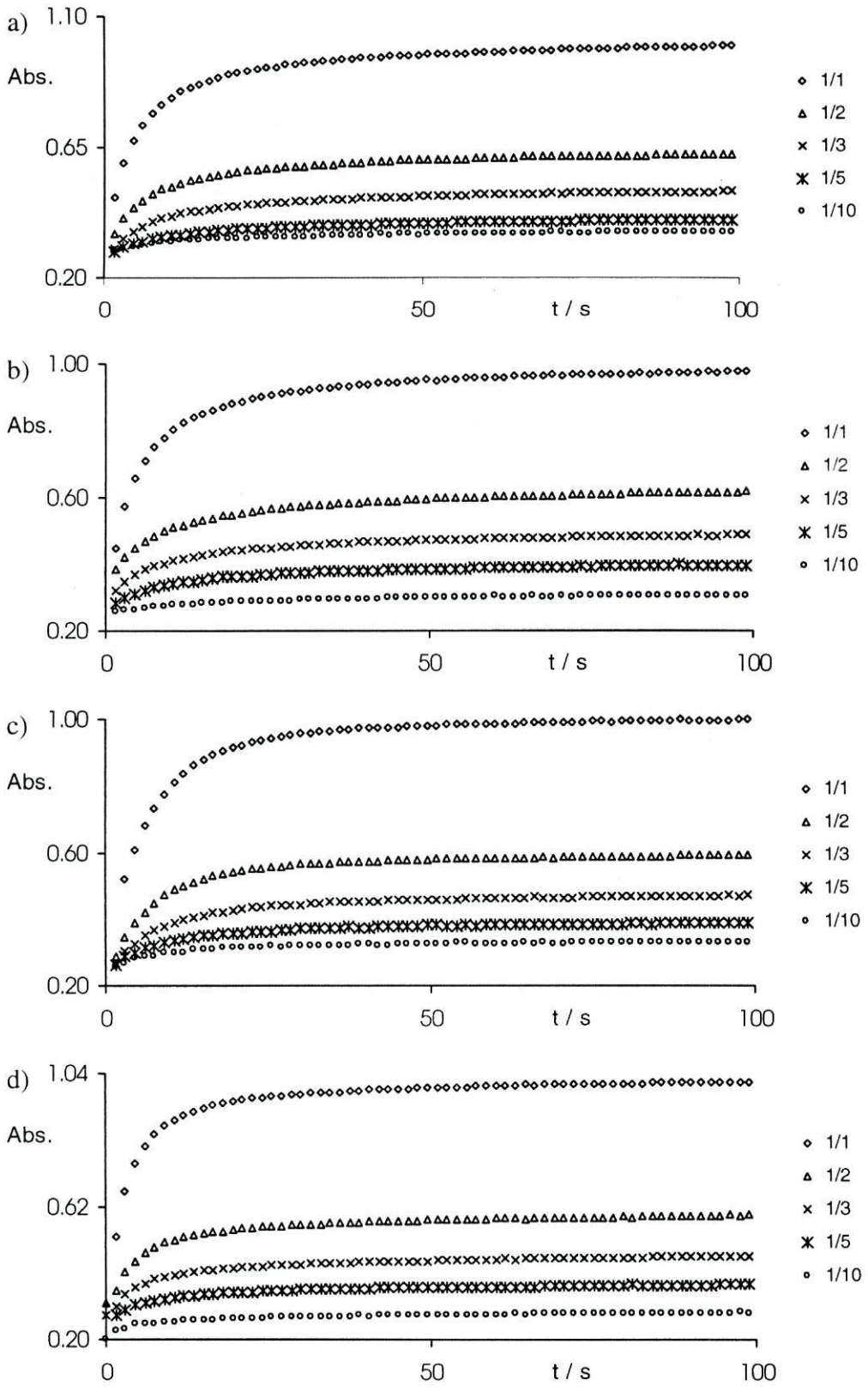


Figura 5.33 – Representação da absorvância a 508 nm em função do tempo para experiências de descomplexação dos catiões Ni(II), [a) - d)]; e Cu(II), [e) - h)] de amostras de AF: AFS, [a), e)]; AFLau, [b), f)]; AFLC, [c), g)]; e AFRAC, [d), h)]. Sobreposições de perfis de absorvância para diferentes proporções $[Ni]_{Total}/[L]_{Total}$.

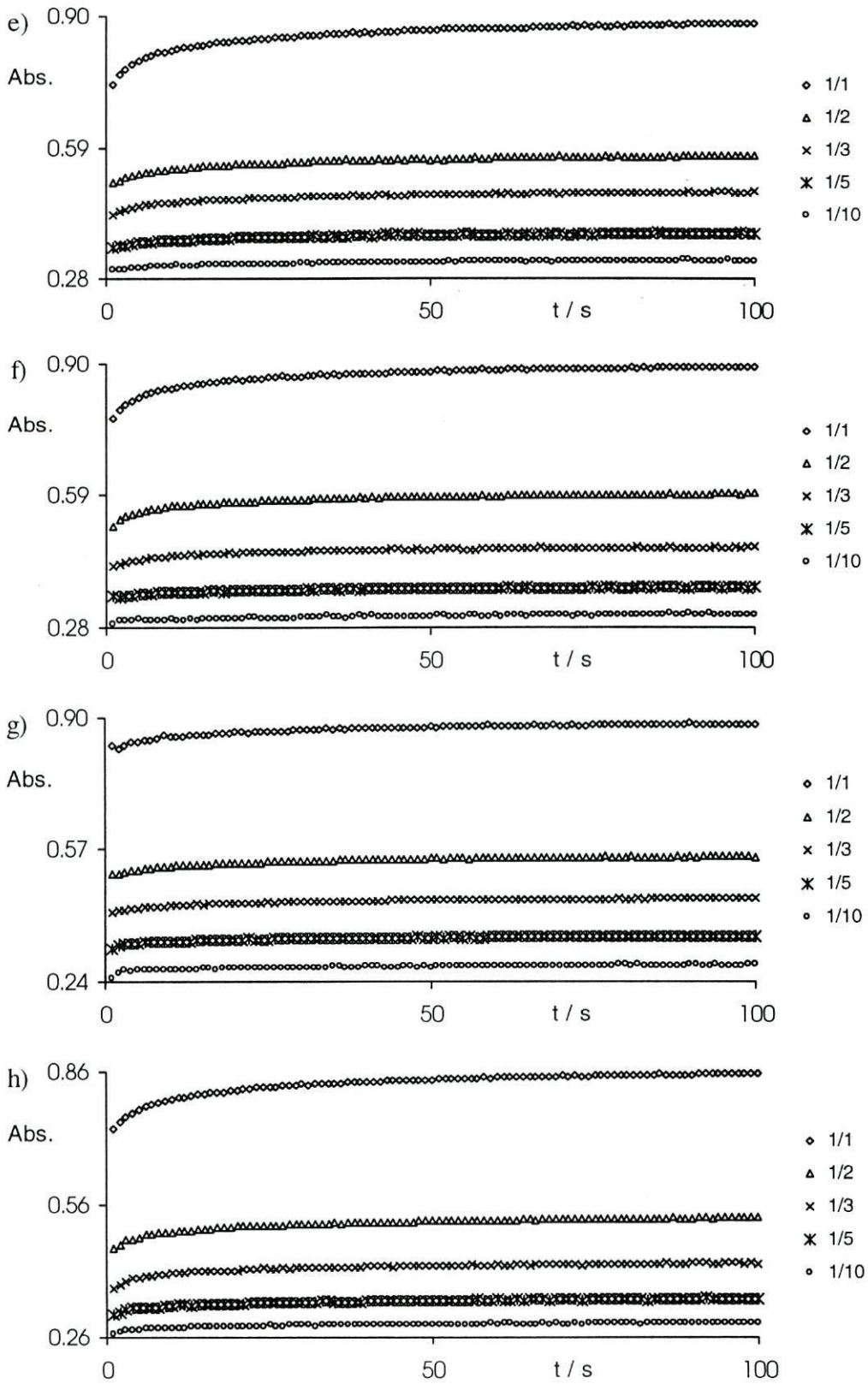


Figura 5.33 (continuação)

é a presença de ruído experimental detectado nas pequenas oscilações nos valores da absorvância.

5.3.5.2 – Suavização dos perfis de absorvância e estudo com transformadas de Laplace

Para suavizar as curvas de Abs(t) utilizou-se o procedimento descrito no Apêndice 2, que consiste resumidamente na seguinte sequência de operações: (i) logaritmização dos pares de valores [t, Abs], com a representação da função Ln(Abs) em função de Ln(t) (ver exemplos típicos para os catiões Ni(II) e Cu(II) nas Figs. 5.35.a e 5.35.e, respectivamente); (ii) ajuste de funções polinomiais a estas novas curvas (ver novamente as Figs. 5.35.a e 5.35.e, onde se representam as curvas originais ajustadas a dois polinómios de grau seis, com coeficientes de correlação bastante bons); (iii) reprodução da curva de Ln(Abs) em função de Ln(t), para intervalos constantes de Ln(t), utilizando o polinómio, ou polinómios que melhor se ajustem à função (ver Figs. 5.35.b e 5.35.f, para o Ni(II) e Cu(II), respectivamente).

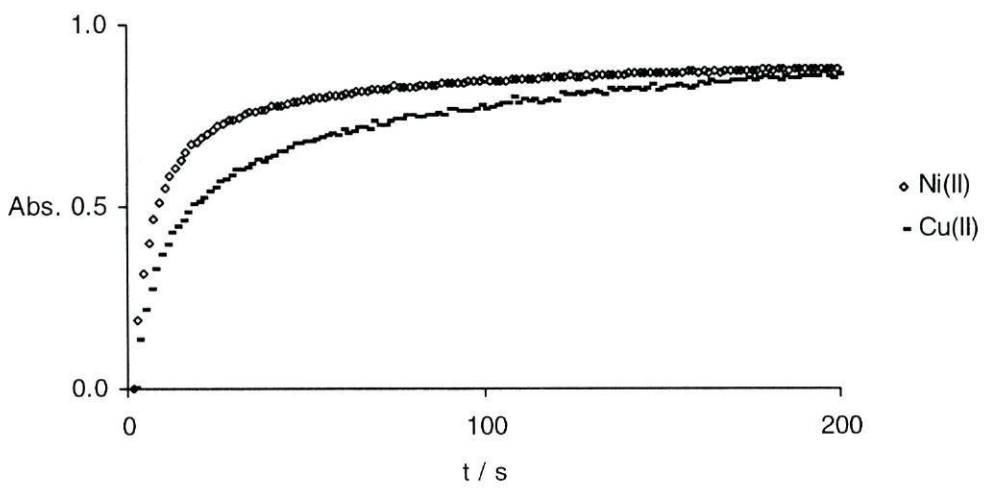


Figura 5.34 – Sobreposição de perfis de absorvância normalizados para experiências de descomplexação dos catiões Ni(II) e Cu(II) com a amostra AFS, para uma razão molar [Catião metálico/AF] de 1:1.

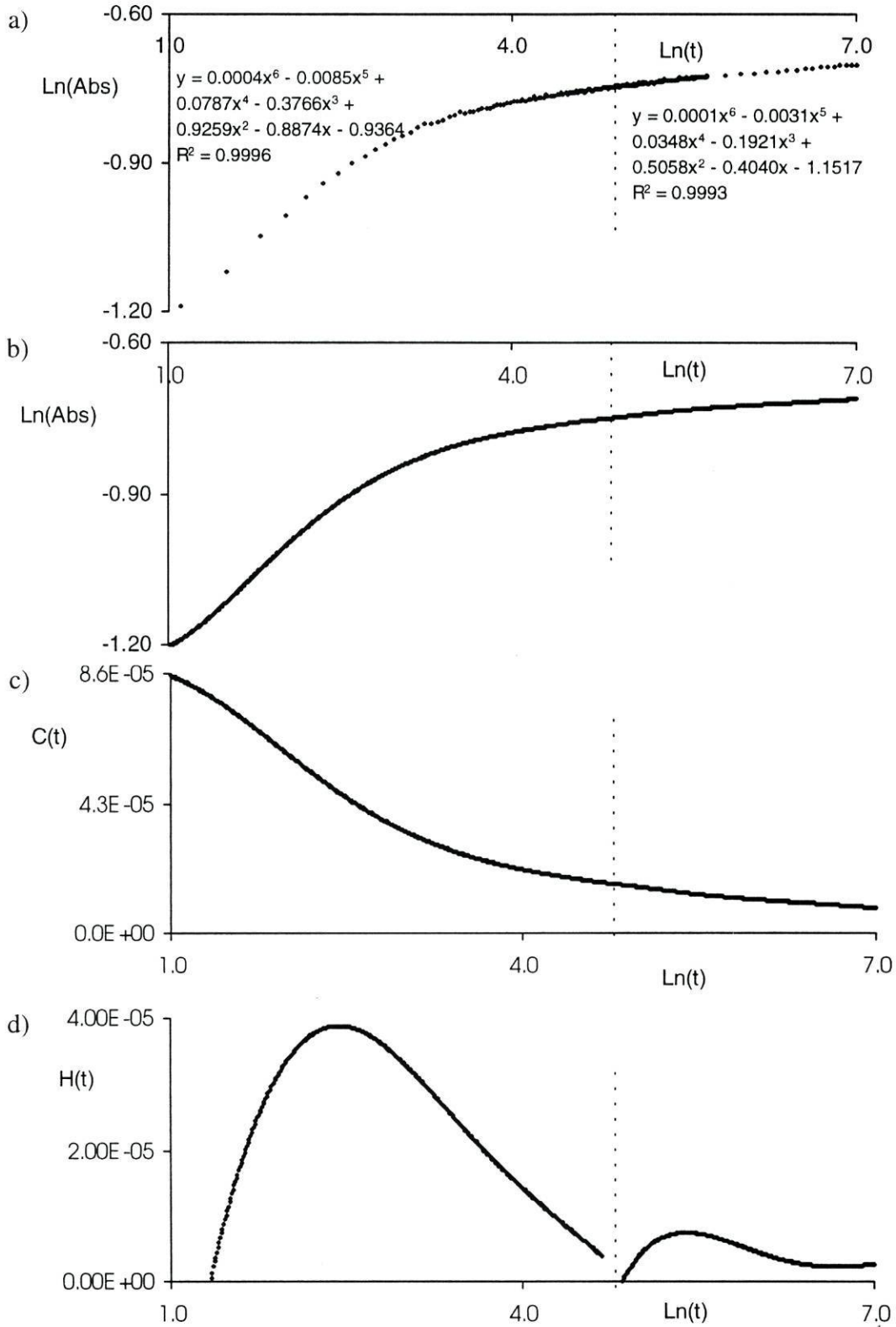


Figura 5.35 – Resultados típicos de experiências de descomplexação dos catiões Ni(II), [a) - d)]; e Cu(II), [e) - h)] da amostra AFLC, numa razão molar 1:3. Ajuste de duas funções polinomiais aos valores de Ln(Abs) = f [Ln(t)], [a), d)]; construção de uma função corrigida Ln(abs) = f [Ln(t)], [b), f)]; representação dos pares de valores C(t) = f [Ln(t)], [c), g)]; e representação de H(t) = f [Ln(t)], [d), h)]. As linhas a tracejado delimitam a zona de contacto entre duas secções.

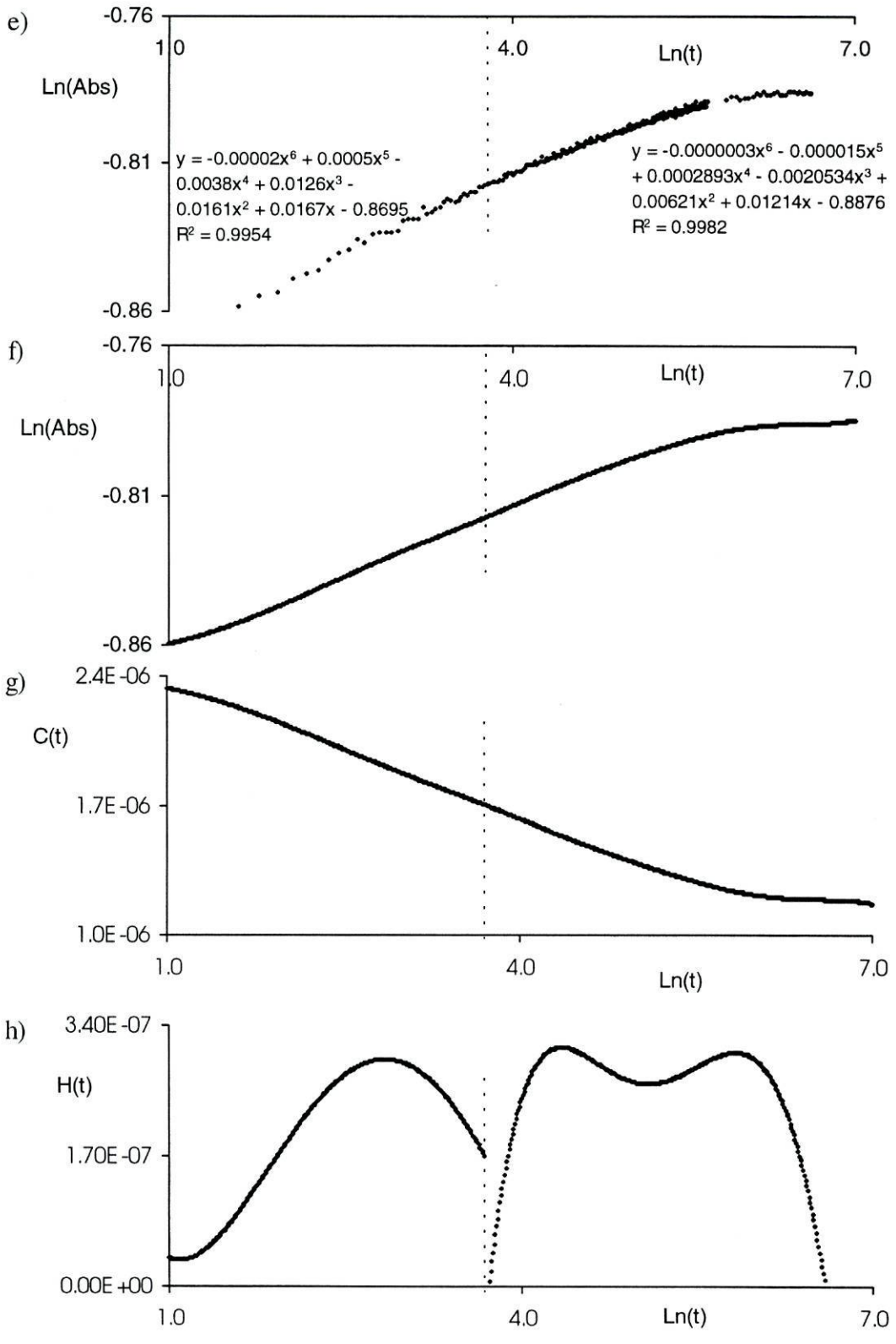


Figura 5.35 (continuação)

Após a reprodução dos valores de absorvância, determinaram-se as respectivas funções C(t) (concentração de catião metálico complexado com AF) (Figs. 5.35.c e 5.35.g). Este cálculo foi efectuado utilizando uma curva de calibração previamente obtida (Lei de Lambert-Beer), a partir da qual se estabeleceram os valores da absortividade molar, ε, para cada catião. Efectuando leituras de absorvância a tempo infinito [Abs(t_∞)]), as funções C(t) foram determinadas como sendo $\frac{Abs(t_\infty) - Abs(t)}{\varepsilon}$.

O cálculo das funções H(t) = f [Ln(t)] (Figs. 5.35.d e 5.35.h) (realizado da forma indicada na secção 2.5.2 e no Apêndice 2) permite, numa primeira fase, efectuar uma estimativa do número de sítios ligantes que complexam os catiões metálicos e que apresentam propriedades cinéticas diferentes. A análise deste tipo de representações (Figs. 5.35.d e 5.35.h), nomeadamente o número de bandas contidas em cada representação, permitiu constatar que esse número é no mínimo de dois. Nos estudos com o catião Cu(II) (Fig. 5.35.h), surge por vezes a dúvida da presença de um terceiro sítio ligante, de muito difícil caracterização.

Nas representações das funções H(t) = f [Ln(t)], os valores de tempo aos quais são detectados os máximos das bandas permitem efectuar uma estimativa dos valores de velocidade específica das reacções de descomplexação, uma vez que $k = 2/t$. Na Tabela 5.10 apresentam-se as velocidades específicas de descomplexação dos dois catiões das amostras AFS, AFLC e AFRAC. Da análise desta tabela verifica-se que as velocidades específicas correspondentes à descomplexação mais rápida (k_1) se situam num intervalo compreendido entre os 0,18 e os 0,39 s^{-1} para o Ni(II), e entre os 0,17 e os 0,31 s^{-1} para o Cu(II). No que respeita aos valores de k_2, a reacção de descomplexação mais lenta, estes são cerca de 10 a 20 vezes inferiores aos valores de k_1. Estes resultados mostram que não existem diferenças significativas entre a amostra de AF natural e as duas amostras antropogénicas (AFLC e AFRAC) quanto à cinética das reacções de descomplexação dos dois catiões metálicos estudados.

Uma análise de alguns estudos existentes na literatura [13,14] para a interacção de AF com catiões metálicos, permite encontrar valores de velocidades específicas de descomplexação de um primeiro sítio ligante (k_1) da ordem dos 0,14 s^{-1} para o Ni(II) [13], e cerca de 0,45 s^{-1} para o Cu(II) [14]. Os valores obtidos neste trabalho para os dois catiões estudados situaram-se entre os 0,2 e os 0,4 s^{-1}, sendo da mesma ordem de grandeza dos valores apresentados na literatura.

Tabela 5.10 – Concentrações de grupos ligantes e velocidades específicas de descomplexação dos catiões Ni(II) e Cu(II) de amostras de AF [&].

	Ni(II)		**Cu(II)** [a]
Amostra	k_1 / s^{-1}	$C_1(0)$ / mmol g^{-1}	k_1 / s^{-1}
AFS	0,18(6)	0,6(2)	0,31(9)
AFLC	0,18(1)	0,4(2)	0,17(4)
AFRAC	0,39(3)	0,8(3)	0,19(5)
	Ni(II)		**Cu(II)** [a]
	k_2 / s^{-1}	$C_2(0)$ / mmol g^{-1}	k_2 / s^{-1}
AFS	-	0,08(6)	0,013(7)
AFLC	0,042(4)	0,03(1)	0,027(5)
AFRAC	0,0050(2)	0,03(1)	0,018(4)

& – 1 e 2, sítios ligantes dos AF; k_1 e k_2, velocidades específicas de descomplexação de cada sítio ligante; $C_1(0)$ e $C_2(0)$, concentrações de sítios ligantes.

a – Não foi possível estimar a concentração de sítios ligantes.

O cálculo da área de cada uma das bandas detectadas (Fig. 5.35.d e 5.35.h) deveria permitir a estimativa da concentração inicial de cada sítio ligante. No entanto, quando a área das bandas se apresentou bastante reduzida, essa estimativa nem sempre se conseguiu efectuar. Na Tabela 5.10 apresentam-se valores da concentração de sítios ligantes determinados para a descomplexação do Ni(II) das três amostras de AF, tendo-se obtido concentrações do primeiro sítio ligante da ordem dos 0,6 mmol/g, e cerca de dez vezes inferiores para o segundo sítio ligante. A comparação dos resultados obtidos para as diferentes amostras de AF não permite detectar diferenças entre elas.

Este estudo sobre as propriedades cinéticas da interacção entre os AF e os catiões metálicos Ni(II) e Cu(II) não permitiu identificar diferenças entre as amostras naturais e antropogénicas. No entanto, o método das transformadas de Laplace produziu resultados afectados de uma dispersão relativamente elevada, o que limitou a realização de uma caracterização fina das amostras.

5.4 – CONCLUSÕES

O trabalho apresentado neste capítulo permitiu efectuar uma caracterização pormenorizada das propriedades de complexação das amostras de AF. As diferentes metodologias utilizadas, quer experimentais quer de tratamento de dados, mostraram ser coerentes na obtenção de informação sobre a interacção de AF com catiões metálicos.

A utilização de eléctrodos selectivos de iões apresentou-se uma técnica com capacidade para gerar informação útil sobre a complexação dos catiões Cu(II), Pb(II) e Cd(II) por AF, em soluções aquosas relativamente diluídas. Os resultados obtidos com esta técnica permitiram detectar a existência de heterogeneidade nos sítios ligantes existentes nas moléculas de AF, quer naturais quer antropogénicos. Face a esta propriedade, e ao facto de ser impossível uma caracterização muito rigorosa da dispersão dessa heterogeneidade, o modelo de van den Berg / Ruzic mostrou ser o mais apropriado para esse estudo, uma vez que permitiu a obtenção de um conjunto de parâmetros de complexação de uma forma mais robusta que os outros dois métodos analisados. De facto, o método de van den Berg / Ruzic conduziu a representações gráficas lineares em misturas heterogéneas de ligandos onde os outros dois métodos originaram representações curvilíneas. Nessas representações, a selecção de segmentos aproximadamente lineares é quase sempre arbitrária e ocasiona interpretações teóricas sempre difíceis.

Uma análise global da estabilidade dos complexos formados (constantes de estabilidade condicionais) entre os catiões Cu(II), Pb(II) e Cd(II) (Log K) e as diferentes amostras de AF, mostrou que se obtiveram valores semelhantes. Este facto evidencia que as estruturas ligantes das amostras de AF estudadas serão eventualmente semelhantes. Por outro lado, identificaram-se diferenças entre a concentração de sítios ligantes (capacidade de complexação de catiões metálicos) de uma das amostras de AF antropogénicos estudada (AFRAC) e a concentração de sítios ligantes das restantes amostras. Obteve-se a mesma tendência no caso das amostras de AF com origem em misturas de solo natural e do material compostado de onde foi extraída a amostra AFRAC.

Os resultados obtidos por potenciometria com eléctrodos selectivos a catiões metálicos foram confirmados por fluorescência molecular síncrona. Esta última técnica permitiu detectar semelhanças nas propriedades de complexação das amostras estudadas, que se fizeram notar aquando da avaliação das variações da concentração de

AF em solução aquosa e do efeito da alteração do pH nas constantes de estabilidade condicional. Estes resultados confirmam o facto das estruturas complexantes (sítios ligantes) existentes nas amostras de AF naturais e antropogénicas serem semelhantes. Os resultados obtidos por fluorescência molecular também permitiram confirmar a menor capacidade de complexação de uma das amostras de AF antropogénicas (AFRAC).

Os estudos de fluorescência molecular síncrona das amostras de AF permitiram detectar nas amostras de AF antropogénicos uma quantidade relativamente elevada de estruturas fluorescentes que não participam em reacções de complexação de catiões metálicos. Este resultado contrasta com as observações efectuadas para as amostras de AF naturais, onde praticamente todas as estruturas fluorescentes participam na complexação, pelo menos a pH 6. Neste facto reside uma das diferenças estruturais mais importantes destas amostras de AF, que, no entanto, não afectaram as suas propriedades de complexação.

O estudo sobre as propriedades cinéticas da interacção de catiões metálicos com as amostras de AF permitiu verificar, mais uma vez, a existência de sítios ligantes semelhantes, uma vez que não foram detectadas variações significativas nas propriedades das amostras de AF. No entanto, a metodologia das transformadas de Laplace não é de aplicação fácil, sendo os resultados afectados de uma dispersão relativamente elevada, pelo que a análise dos dados obtidos é algo difícil. De qualquer forma, estabeleceram-se as bases para uma metodologia baseada numa filosofia de tratamento de dados totalmente livre de modelos rígidos (decomposição trilinear – PARAFAC), que no entanto, ainda se mostrou algo prematura no actual estado de conhecimento destas técnicas.

5.5 – BIBLIOGRAFIA

[1] Handbook of Chemistry and Physics, David R. Lide (Ed.), CRC Pres, Inc., Florida, 70th Edition, 1989-90.

[2] J. C. G. Esteves da Silva, A. A. S. C. Machado e C. J. S. Oliveira, *Analyst*, 1996, **121**, 1373-1379.

[3] J. C. G. Esteves da Silva, A. A. S. C. Machado e C. J. S. Oliveira, *Anal. Chim. Acta*, 1997, **349**, 23-31.

[4] J. C. G. Esteves da Silva, A. A. S. C. Machado, C. J. S. Oliveira e M. S. S. D. S. Pinto, *Talanta*, 1998, **45**, 1155-1165.

[5] J. C. G. Esteves da Silva, A. A. S. C. Machado, C. J. S. Oliveira e M. S. S. D. S. Pinto, *Environ. Toxicol. Chem.*, 1998, **17**, 1268-1273.

[6] W. Windig, *A Simple-to-Use Method of Interactive Self-Modeling Mixture Analysis*, P. C. Jurs (Ed.), em Computer-Enhanced Analytical Spectroscopy, Vol. 3, Plenum, 1982, Cap. 4

[7] W. Windig e J. Guilment, *Anal. Chem.*, 1991, **63**, 1425-1432.

[8] W. Windig, C. E. Heckler, F. A. Agblevor e R. J. Evans, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 1992, **14**, 195-207.

[9] T. R. Holm, *Chem. Spec. Bioavail.*, 1990, **2**, 63-76.

[10] R. Tauler, A. Smilde e B. Kowalski, *J. Chemometr.*, 1995, **9**, 31-58.

[11] R. Bro, *Chemometr. Intell. Lab. Sys.*, 1997, **38**, 149-171.

[12] J. C. G. Esteves da Silva, A. I. Herrero, A. A. S. C. Machado e E. Barrado, *Mikrochim. Acta*, 1998, **130**, 63-69.

[13] C. H. Langford e D. W. Gutzman, *Anal. Chim. Acta*, 1992, **256**, 183-201.

[14] M. S. Shuman, B. J. Collins, P. J. Fitzgerald e D. L. Olson, *Distribution of Stability Constants and Dissociation Rate Constants among Binding Sites on Estuarine Copper-Organic Complexes: Rotated Disk Electrode Studies and an Affinity Spectrum Analysis of Ion-Selective Electrode and Photometric Data*, R. F. Chtistman e E. T. Gjessing (Eds.), em Aquatic and Terrestrial Humic Materials, Ann Harbour Science, Michigan, 1983, Cap. 17.

6 – ESTUDO DAS INTERACÇÕES DA ATRAZINA COM AF

6.1 – INTRODUÇÃO

Neste capítulo apresentam-se os resultados obtidos no estudo das interacções entre a atrazina (AT) e AF extraídos de solos naturais e de materiais antropogénicos. Para este efeito, foram desenvolvidas diferentes metodologias experimentais para estudar as interacções da AT com amostras de AF e assim obter informação sobre eventuais impactos da utilização na agricultura de correctivos orgânicos contendo estas substâncias.

Numa primeira fase do trabalho estudou-se a possibilidade de determinação simultânea da AT, desetilatrazina (DeAT), desisopropilatrazina (DpAT) e 2-hidroxilatrazina (HidAT) utilizando medições de UV complementadas com técnicas quimiométricas de tratamento de dados. Com este estudo, pretendeu-se desenvolver uma metodologia para a determinação simultânea da AT e dos seus metabolitos e assim dispor de uma técnica que possibilite a caracterização desta mistura tal como ela existe em condições naturais. De facto, a AT utilizada como herbicida agrícola sofre decomposição nos seus metabolitos [1-5], pelo que também se encontrarão nos solos e águas outros compostos provenientes da sua decomposição.

Numa segunda parte do trabalho estudou-se a influência da força iónica e da presença de AF na solubilidade da AT, DeAT e DpAT em solução aquosa. Nestes estudos, adoptaram-se técnicas de extracção sólido-líquido e líquido-líquido, tendo-se utilizado o clorofórmio como solvente extractor.

Numa terceira fase do trabalho, avaliou-se o desempenho de uma metodologia analítica baseada em cromatografia líquida de alta pressão por exclusão por tamanhos no estudo das interacções entre amostras de AF e AT, DeAT e DpAT. Para além do desenvolvimento de uma outra metodologia de análise química, pretendeu-se também complementar a informação obtida inicialmente com as técnicas de extracção. Se os complexos formados entre os herbicidas e os AF fossem lábeis, seria muito difícil detectar a existência de associações, uma vez que ocorreria a separação das duas espécies durante o tempo de permanência dos complexos no interior da coluna cromatográfica. Este aspecto, complementado com as informações recolhidas pela utilização das técnicas de extracção, forneceu algumas informações quanto à cinética destas interacções.

6.2 – SECÇÃO EXPERIMENTAL

6.2.1 – Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de qualidade p.a. ou semelhante. Para além das soluções de uso geral, utilizaram-se as preparações indicadas nas subsecções seguintes.

6.2.1.1 – Determinação simultânea da AT, DeAT, DpAT e HidAT com base em medições de UV e técnicas de calibração multivariada

- Tampão fosfato com pH 6,865: preparou-se uma solução aquosa de tampão fosfato com pH 6,865 por pesagem e diluição a um litro de 3,4023 g de KH_2PO_4 e 8,9535 g de $Na_2HPO_4.12H_2O$ [6].
- Soluções de AT, DeAT, DpAT e HidAT em tampão fosfato com pH 6,865: as soluções padrão de AT, DeAT, DpAT e HidAT em tampão fosfato com pH 6,865 foram preparadas por pesagem e diluição rigorosas dos sólidos respectivos, de forma a apresentarem uma concentração final de 28 ppm.

6.2.1.2 – Experiências de cromatografia de exclusão por tamanhos

- Tampão fosfato com pH 6,00: prepararam-se soluções aquosas de tampão fosfato com pH igual a 6,00, de acordo com o procedimento descrito em 4.2.1.5.
- Soluções de AF: as soluções de AF de concentrações situadas entre os 20 e os 300 mg/L foram preparadas em tampão fosfato com pH 6,00. Antes da injecção no sistema de HP-SEC, todas as soluções foram filtradas com o auxílio de filtros para seringa da marca Millipore, referência HV4, com tamanho de poro 0,45 μm.
- Soluções de AT, DeAT e DpAT: prepararam-se soluções destes herbicidas com uma concentração aproximada 8×10^{-4} M por dissolução inicial num volume reduzido de etanol, perfazendo posteriormente o volume final com tampão fosfato de forma a obter uma solução 1 % em etanol. Antes da injecção no sistema de HP-SEC, as soluções foram filtradas utilizando os filtros já referidos.

6.2.1.3 – Experiências de extracção sólido-líquido e líquido-líquido

- Soluções de AF: as soluções de AF de concentrações 50, 100 e 200 mg/L foram preparadas em água desionizada, ajustando-se o seu pH a 6 por adição de KOH ou HNO_3.
- Soluções padrão de AT, DeAT e DpAT em clorofórmio: as soluções padrão dos herbicidas em clorofórmio foram preparadas por pesagem e diluição rigorosas dos sólidos respectivos, de forma a apresentarem uma concentração final de cerca de 130 ppm.
- Soluções de AT, DeAT e DpAT em etanol: as soluções padrão dos herbicidas em etanol foram preparadas por pesagem e diluição rigorosas dos sólidos, de forma a apresentarem uma concentração de 2000 ppm.
- Soluções aquosas de sais inorgânicos: as soluções de NaCl, $CaCl_2$ e KNO_3 de concentração 1,00 M foram preparadas por pesagem e diluição rigorosas dos sólidos respectivos, enquanto a solução de $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$, da mesma concentração que as anteriores, foi preparada a partir de uma mistura de volumes idênticos de soluções 0,50 M de diidrogenofosfato de potássio e hidrogenofosfato de sódio. As soluções destes sais com concentrações 0,10 e 0,01 M foram preparadas por diluição das soluções mais concentradas.

6.2.2 – Procedimentos experimentais

6.2.2.1 – Determinação simultânea da AT, DeAT, DpAT e HidAT com base em medições de UV e técnicas de calibração multivariada

Nos estudos sobre a determinação simultânea da AT, DeAT, DpAT e HidAT utilizaram-se 16 soluções de misturas destes compostos, com quatro níveis de concentração de cada um deles (0 a 1,51 mg/L). A preparação das soluções seguiu uma soma de dois desenhos factoriais fraccionados, cada um com dois níveis (Tabela 6.1), o que correspondeu a dois níveis de concentração de cada espécie em cada desenho factorial. O conjunto de espectros de UV obtido foi analisado com técnicas quimiométricas de calibração multivariada, nomeadamente Mínimos Quadrados Parciais (MQP) e Regressão dos Componentes Principais (RCP), sendo os cálculos efectuados com a aplicação PLS-IQ existente no programa GRAMS 32, Galactic Industries Co., USA.

Tabela 6.1 – Conjunto de soluções em tampão fosfato com pH 6,865 utilizadas na determinação simultânea da AT, DeAT, DpAT e HidAT [&].

Amostra	[AT] (mg/L)	[DeAT] (mg/L)	[DpAT] (mg/L)	[HidAT] (mg/L)
A1	1,51	1,51	1,51	1,51
A2	**1,51**	**1,51**	**0,50**	**0,50**
A3	1,51	0,50	1,51	0,50
A4	1,51	0,50	0,50	1,51
A5	**0,50**	**1,51**	**1,51**	**0,50**
A6	0,50	1,51	0,50	1,51
A7	0,50	0,50	1,51	1,51
A8	**0,50**	**0,50**	**0,50**	**0,50**
A9	1,01	1,01	1,01	1,01
A10	1,01	1,01	0,00	0,00
A11	**1,01**	**0,00**	**1,01**	**0,00**
A12	1,01	0,00	0,00	1,01
A13	**0,00**	**1,01**	**1,01**	**0,00**
A14	0,00	1,01	0,00	1,01
A15	**0,00**	**0,00**	**1,01**	**1,01**
A16	0,00	0,00	0,00	0,00

& – As amostras assinaladas a negrito não foram incluídas no conjunto de calibração, sendo utilizadas na validação do modelo.

A análise do conjunto de espectros de UV foi efectuada utilizando dois modelos:

(i) modelo de quatro componentes, considerando individualmente cada constituinte;

(ii) modelo de três componentes, em que um dos componentes corresponde à soma das concentrações dos constituintes DeAT e DpAT, e os outros dois componentes aos constituintes restantes.

6.2.2.2 – Estudo da influência da força iónica na solubilidade da AT, DeAT e DpAT

O estudo sobre a influência da força iónica da solução na solubilidade em água da AT, DeAT e DpAT foi realizado utilizando técnicas de extracção sólido-líquido e líquido-líquido. Para esse efeito, estudou-se a solubilidade destes herbicidas na presença de sais inorgânicos em solução (KNO_3, NaCl, $CaCl_2$ e $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$), a três níveis de concentração destes (0,01, 0,10 e 1,00 M). Cada experiência foi realizada em triplicado, tendo-se seguido os procedimentos experimentais gerais indicados na secção 3.4.6 do Capítulo 3.

Como se refere nesses procedimentos gerais, a determinação da concentração de herbicida dissolvido na fase aquosa é efectuada por comparação da absorvância (a 242 nm) de um conjunto de padrões preparados em clorofórmio com a absorvância das soluções obtidas após a extracção do herbicida para a fase orgânica. Na Tabela 6.2 apresenta-se um exemplo típico da construção de uma recta de calibração para a determinação de AT.

6.2.2.3 – Estudo das interacções da AT, DeAT e DpAT com AF

Foram efectuados estudos sobre as interacções da AT, DeAT e DpAT com AF utilizando técnicas de extracção sólido-líquido e líquido-líquido, e separações cromatográficas. As primeiras encontram-se descritas em 6.2.2.2, substituindo-se no entanto as soluções dos sais inorgânicos por água desionizada ou soluções aquosas de AF, enquanto as separações cromatográficas seguiram o procedimento experimental descrito na secção 3.4.5 do Capítulo 3.

Tabela 6.2 – Exemplo típico da construção de uma recta de calibração para a determinação de AT em clorofórmio.

Número do padrão	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
[AT] (mg/L)	0	10	20	30	35	45	55

6.3 – RESULTADOS OBTIDOS E DISCUSSÃO

6.3.1 – Determinação simultânea da AT e de três dos seus metabolitos com base em medições de UV e técnicas de calibração multivariada

Na Fig. 6.1 apresenta-se uma sobreposição dos espectros da AT, DeAT, DpAT e HidAT em solução aquosa de tampão fosfato com pH 6,865. Da análise desta figura pode observar-se que os espectros correspondentes à DeAT e DpAT apresentam formas semelhantes, ostentando máximos (Tabela 6.3) a um comprimento de onda idêntico (214 nm), ao contrário dos espectros dos outros dois compostos que apresentam máximos (222 e 216 nm, respectivamente para a AT e HidAT) e formas distintas.

A análise dos conjuntos de espectros de UV foi realizada com o auxílio de duas técnicas de calibração distintas, o MQP1 e a RCP (secção 2.6 do Capítulo 2), para as quais se definiram dois modelos de calibração. Num primeiro modelo, o de quatro constituintes, cada composto foi tratado como sendo um constituinte individual da matriz das amostras. No entanto, uma análise rápida dos espectros da DeAT e DpAT (Fig. 6.1) permite constatar que estes são praticamente coincidentes, com máximos idênticos. Esta particularidade introduz grandes dificuldades na capacidade de resolução de espectros de soluções contendo simultaneamente DeAT e DpAT, ou seja, nestas condições os métodos MQP1 e RCP poderiam não ser capazes de separar a informação referente a cada um destes compostos. Para ultrapassar esta dificuldade, elaborou-se um segundo modelo, o de três constituintes, no qual se considerou a soma das concentrações de DeAT e DpAT (os compostos que apresentam espectros mais semelhantes entre si) como sendo um único componente. Com este pequeno artifício

Tabela 6.3 – Máximos (nm) das soluções aquosas de AT e metabolitos preparadas em tampão fosfato com pH 6,865.

AT	DeAT	DpAT	HidAT
222	214	214	216

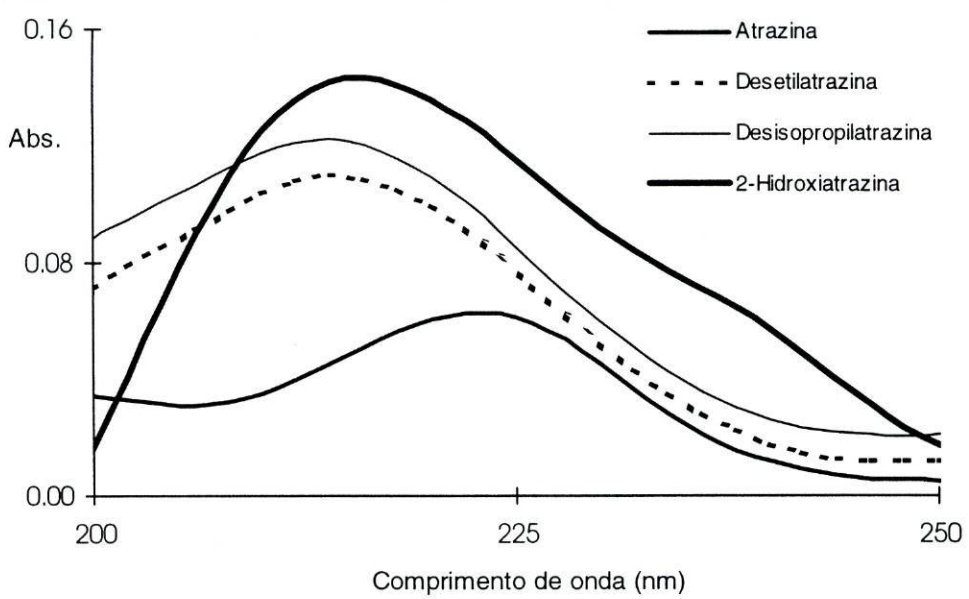


Figura 6.1 – Sobreposição dos espectros de UV da AT, DeAT, DpAT e HidAT em solução aquosa de tampão fosfato com pH 6,865.

pretendeu-se determinar não a concentração individual de cada um destes dois constituintes (o objectivo do modelo de quatro componentes) mas sim a soma das suas concentrações.

Para se avaliar a qualidade dos ajustes dos dois modelos aos dados experimentais tomaram-se parte das amostras (dez amostras) descritas na Tabela 6.1 como um conjunto de calibração, sendo as amostras restantes o conjunto de validação (amostras apresentadas a cheio na Tabela 6.1).

Na Tabela 6.4 apresentam-se algumas características da qualidade dos modelos de calibração. Da análise desta tabela pode verificar-se que o modelo de quatro constituintes não permite efectuar a quantificação simultânea da DeAT e DpAT, uma vez que os coeficientes de correlação relativos a estes dois compostos são muito baixos. Assim, utilizando MQP1 obtiveram-se coeficientes de correlação de 0,4484 e 0,6808 para a DeAT e DpAT, respectivamente, e com a RCP coeficientes de correlação ainda mais baixos, de 0,2015 e 0,6676 para a DeAT e DpAT, respectivamente. Pelo contrário, o modelo de três constituintes mostrou ser capaz de prever com exactidão a concentração dos constituintes das amostras. De facto, os valores dos coeficientes de correlação linear obtidos para este modelo de calibração são sempre superiores a 0,99, evidenciando o bom ajuste do modelo aos dados experimentais.

Nas Tabelas 6.5 e 6.6 apresentam-se alguns parâmetros que permitem avaliar a qualidade das previsões dos modelos. Da análise da Tabela 6.5, que corresponde ao modelo de quatro constituintes, verifica-se que os erros médios quadráticos (EMQ) cometidos pelo método MQP1 no cálculo das concentrações de DeAT e DpAT são aproximadamente três vezes mais elevados que os EMQ produzidos no cálculo da concentração dos outros dois constituintes. No caso da RCP, este erro é de cerca de sete a vinte vezes superior. No entanto, utilizando um modelo de apenas três constituintes (Tabela 6.6) verifica-se que a capacidade de previsão da soma da concentração de DeAT e DpAT é equivalente à dos outros dois constituintes.

Quando se comparam os dois métodos (MQP1 e RCP) quanto à qualidade das suas previsões (Tabela 6.7), verifica-se que os resultados obtidos são muito semelhantes. No entanto, no que respeita ao modelo de quatro constituintes, embora sendo igualmente fracas as previsões da concentração de DeAT e DpAT efectuadas pelos dois métodos, os valores de erro médio quadrático foram superiores quando se utilizou a RCP.

Tabela 6.4 – Avaliação da qualidade dos modelos de calibração: (i) modelo com quatro constituintes; (ii) modelo com três constituintes.

Modelo com quatro constituintes	**MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (MQP1)**		
	Constituinte	**Coeficiente de correlação linear**	**Número de factores**
	AT	0,9795	4
	DeAT	0,4484	2
	DpAT	0,6808	2
	HidAT	0,9989	4
	REGRESSÃO DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (RCP)		
	Constituinte	**Coeficiente de correlação linear**	**Número de factores**
	AT	0,9916	6
	DeAT	0,2015	
	DpAT	0,6676	
	HidAT	0,9996	
Modelo com três constituintes	**MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (MQP1)**		
	Constituinte	**Coeficiente de correlação linear**	**Número de factores**
	AT	0,9960	6
	DeAT + DpAT	0,9992	6
	HidAT	0,9996	5
	REGRESSÃO DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (RCP)		
	Constituinte	**Coeficiente de correlação linear**	**Número de factores**
	AT	0,9957	8
	DeAT + DpAT	0,9993	
	HidAT	0,9994	

Tabela 6.5 – Previsões efectuadas com o modelo de quatro constituintes [&].

	AT			DeAT			DpAT			HidAT		
MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (MQP1)												
Amostra	Valor previsto	Valor real	Erro absoluto	Valor previsto	Valor real	Erro absoluto	Valor previsto	Valor real	Erro absoluto	Valor previsto	Valor real	Erro absoluto
A2	1,50	1,51	**0,01**	0,97	1,51	**0,54**	1,13	0,50	**0,63**	0,55	0,50	**0,05**
A5	0,26	0,50	**0,24**	0,99	1,51	**0,52**	1,53	1,51	**0,02**	0,45	0,50	**0,05**
A8	0,54	0,50	**0,04**	0,50	0,50	**0,00**	0,37	0,50	**0,13**	0,50	0,50	**0**
A11	0,99	1,01	**0,02**	0,45	0,00	**0,45**	0,48	1,01	**0,53**	0,00	0,00	**0**
A13	0,28	0,00	**0,28**	0,59	1,01	**0,42**	0,91	1,01	**0,10**	0,04	0,00	**0,04**
A15	0,11	0,00	**0,11**	0,55	0,00	**0,55**	0,26	1,01	**0,75**	1,00	1,01	**0,01**
EMQ	**0,06**			**0,19**			**0,19**			**0,01**		
REGRESSÃO DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (RCP)												
Amostra	Valor previsto	Valor real	Erro absoluto	Valor previsto	Valor real	Erro absoluto	Valor previsto	Valor real	Erro absoluto	Valor previsto	Valor real	Erro absoluto
A2	1,22	1,51	**0,29**	3,68	1,51	**2,17**	-1,59	0,50	**2,09**	0,51	0,50	**0,01**
A5	0,33	0,50	**0,17**	2,26	1,51	**0,75**	0,92	1,51	**0,59**	0,42	0,50	**0,08**
A8	0,44	0,50	**0,06**	1,18	0,50	**0,68**	-0,15	0,50	**0,65**	0,49	0,50	**0,01**
A11	0,88	1,01	**0,13**	1,18	0,00	**1,18**	-0,16	1,01	**1,17**	-0,01	0,00	**0,01**
A13	-0,18	0,00	**0,18**	1,94	1,01	**0,93**	0,23	1,01	**0,78**	-0,07	0,00	**0,07**
A15	-0,01	0,00	**0,01**	0,43	0,00	**0,43**	0,55	1,01	**0,46**	1,00	1,01	**0,01**
EMQ	**0,07**			**0,48**			**0,45**			**0,02**		

& – EMQ, erro médio quadrático.

Tabela 6.6 – Previsões efectuadas com o modelo de três constituintes [&].

	AT			DeAT + DpAT			HidAT		
MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (MQP1)									
Amostra	Valor previsto	Valor real	Erro absoluto	Valor previsto	Valor real	Erro absoluto	Valor previsto	Valor real	Erro absoluto
A2	1,22	1,51	**0,29**	2,10	2,01	**0,09**	0,54	0,50	**0,04**
A5	0,37	0,50	**0,13**	3,16	3,02	**0,14**	0,43	0,50	**0,07**
A8	0,46	0,50	**0,04**	1,02	1,00	**0,02**	0,49	0,50	**0,01**
A11	0,88	1,01	**0,13**	1,03	1,01	**0,02**	0,00	0,00	**0**
A13	-0,16	0,00	**-0,16**	2,17	2,02	**0,15**	-0,07	0,00	**0,07**
A15	-0,02	0,00	**0,02**	1,00	1,01	**0,01**	1,00	1,01	**0,01**
EMQ	**0,063**			**0,038**			**0,019**		
REGRESSÃO DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (RCP)									
Amostra	Valor previsto	Valor real	Erro absoluto	Valor previsto	Valor real	Erro absoluto	Valor previsto	Valor real	Erro absoluto
A2	1,22	1,51	**0,29**	2,09	2,01	**0,08**	0,51	0,50	**0,01**
A5	0,33	0,50	**0,17**	3,17	3,02	**0,15**	0,42	0,50	**0,08**
A8	0,44	0,50	**0,06**	1,03	1,00	**0,03**	0,49	0,50	**0,01**
A11	0,88	1,01	**0,12**	1,02	1,01	**0,01**	-0,01	0,00	**0,01**
A13	-0,18	0,00	**0,18**	2,17	2,02	**0,15**	-0,07	0,00	**0,07**
A15	-0,01	0,00	**0,01**	0,99	1,01	**0,02**	1,00	1,01	**0,01**
EMQ	**0,068**			**0,039**			**0,018**		

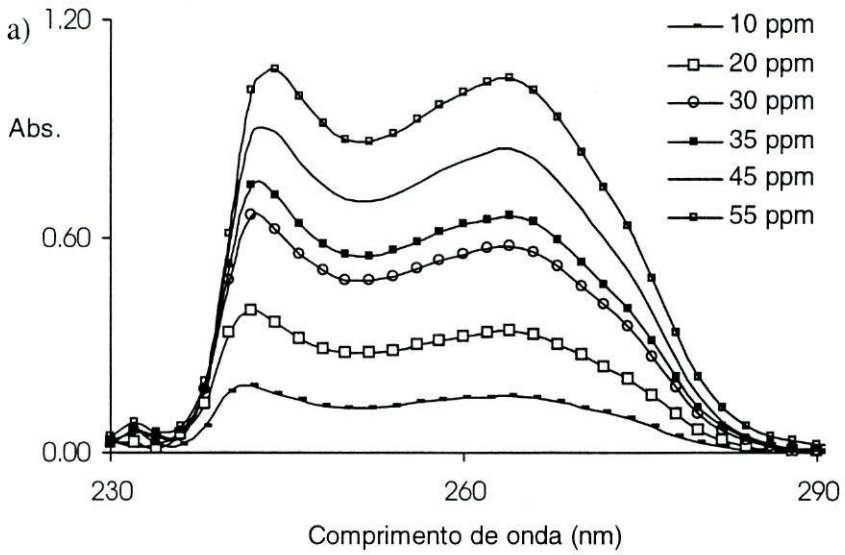
& – EMQ, erro médio quadrático.

Tabela 6.7 – Comparação das previsões efectuadas pelos modelos (valores de erro médio quadrático, EMQ).

Modelo de 4 constituintes				
	AT	DeAT	DpAT	HidAT
MQP1	0,06	0,19	0,19	0,01
RCP	0,07	0,48	0,45	0,02
Modelo de 3 constituintes				
	AT	DeAT + DpAT		HidAT
MQP1	0,063	0,038		0,019
RCP	0,068	0,039		0,018

6.3.2 – Estudo da solubilidade em água da AT

Neste trabalho determinou-se experimentalmente a solubilidade em água da AT, utilizando-se extracções sólido/água e água/clorofórmio para esse efeito. Na realização dessas determinações, foi necessária a construção uma recta de calibração de AT em clorofórmio hidratado. Na Fig. 6.2 apresenta-se um exemplo típico de uma dessas rectas de calibração (ver também a Tabela 6.2) construída com base nas leituras de absorvância a 242 nm sobre espectros de UV. Partindo de uma recta de calibração semelhante à recta representada na Fig. 6.2, determinou-se a solubilidade em água da AT a partir da média de cinco ensaios independentes, tendo-se obtido o valor de 31,8(2) mg/L. Este valor é da mesma ordem de grandeza de outro apresentado na literatura (33 mg/L) [4,7,8], pelo que se pode concluir da validade do método experimental utilizado.



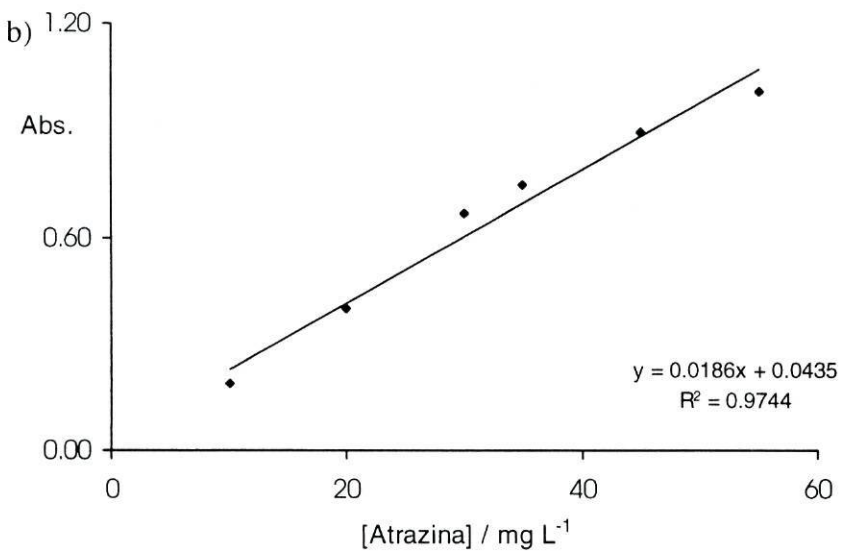


Figura 6.2 – Padrões de AT em clorofórmio: a) sobreposição dos espectros de UV; b) representação dos cortes a 242 nm efectuados nos espectros de UV dos padrões de AT em clorofórmio.

6.3.3 – Estudo da solubilidade em água dos metabolitos da AT

Efectuaram-se estudos para a determinação da solubilidade em água de dois dos metabolitos da AT, a DpAT e DeAT, utilizando a técnica experimental descrita anteriormente nos estudos da determinação da solubilidade em água da AT. A elevada solubilidade em água destas duas substâncias, que se verificou experimentalmente ser superior a 200 mg/L, condicionou a obtenção de estimativas seguras uma vez que esta técnica apenas permite estimar a solubilidade de substâncias pouco solúveis. Por outro lado, dada a sua grande solubilidade em água, as associações destes metabolitos com moléculas de AF, a existirem, não influenciarão grandemente a solubilidade em solução aquosa da DeAT e DpAT. Desta forma, não se efectuaram os estudos sobre a influencia da força iónica na solubilidade destes metabolitos, nem se aplicaram as técnicas de extracção na avaliação da eventual existência de interacções entre estes e os AF.

6.3.4 – Estudo da influência da força iónica na solubilidade em solução aquosa da AT

Na Tabela 6.8 apresentam-se os resultados experimentais da determinação da solubilidade da AT em soluções aquosas de diferentes sais inorgânicos, a 25 °C.

Da análise da Tabela 6.8 e Figs. 6.3 e 6.4.a pode verificar-se que ocorre uma diminuição na solubilidade da AT com o aumento da concentração de sais inorgânicos em solução. Assim, enquanto essa diminuição de solubilidade é pequena entre 0,01 e 0,10 M, quando a concentração dos sais aumenta para 1,00 M esse decréscimo de solubilidade é bastante mais intenso. Uma análise da Fig. 6.4.a permite verificar para concentrações idênticas de sal que as soluções contendo sais iónicos de maior valência provocam alterações mais significativas à solubilidade da AT que as soluções de sais de valências inferiores. A partir da análise das Figs. 6.4.b e 6.4.c pode concluir-se que a diminuição da solubilidade da AT com o aumento da concentração de sais em solução se deve fundamentalmente a um efeito de força iónica e não às características específicas dos sais inorgânicos. Assim, essa variação de solubilidade pode ser atribuída a um efeito de "salting out" (Capítulo 2, secção 2.7).

Para avaliar se o efeito da presença de sais inorgânicos na solubilidade da AT é ou não significativo, efectuou-se uma análise da variância (ANOVA) dos valores de solubilidade (Tabela 6.9). A análise desta tabela revela que a alteração da concentração

Tabela 6.8 – Solubilidade da AT [&] (mg/L) em soluções aquosas de sais inorgânicos, a 25 °C.

Sais inorgânicos	Concentração dos sais (M)		
	0,01	**0,10**	**1,00**
KNO_3	40,6(2)	39,60(1)	31,5(8)
NaCl	38,9(3)	37,3(8)	29,97(4)
$CaCl_2$	37,2(3)	34,5(2)	18,4(2)
$H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$	40,307(1)	35,2(6)	15,95(4)

& – Valores médios resultantes de dois ensaios independentes; entre parêntesis apresentam-se valores de desvio padrão; S_w = 31,8(2) mg/L (média de cinco ensaios independentes).

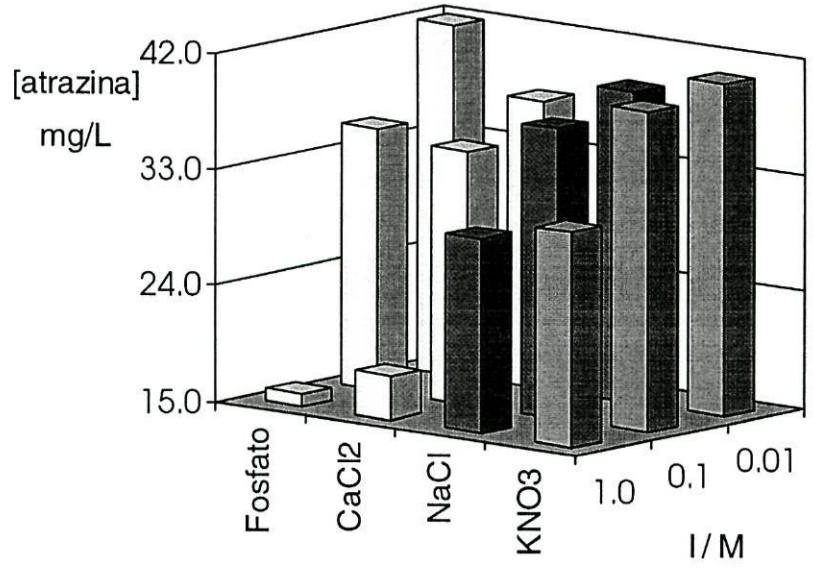


Figura 6.3 – Representação dos valores da solubilidade (mg/L) da AT na presença de sais inorgânicos em solução aquosa.

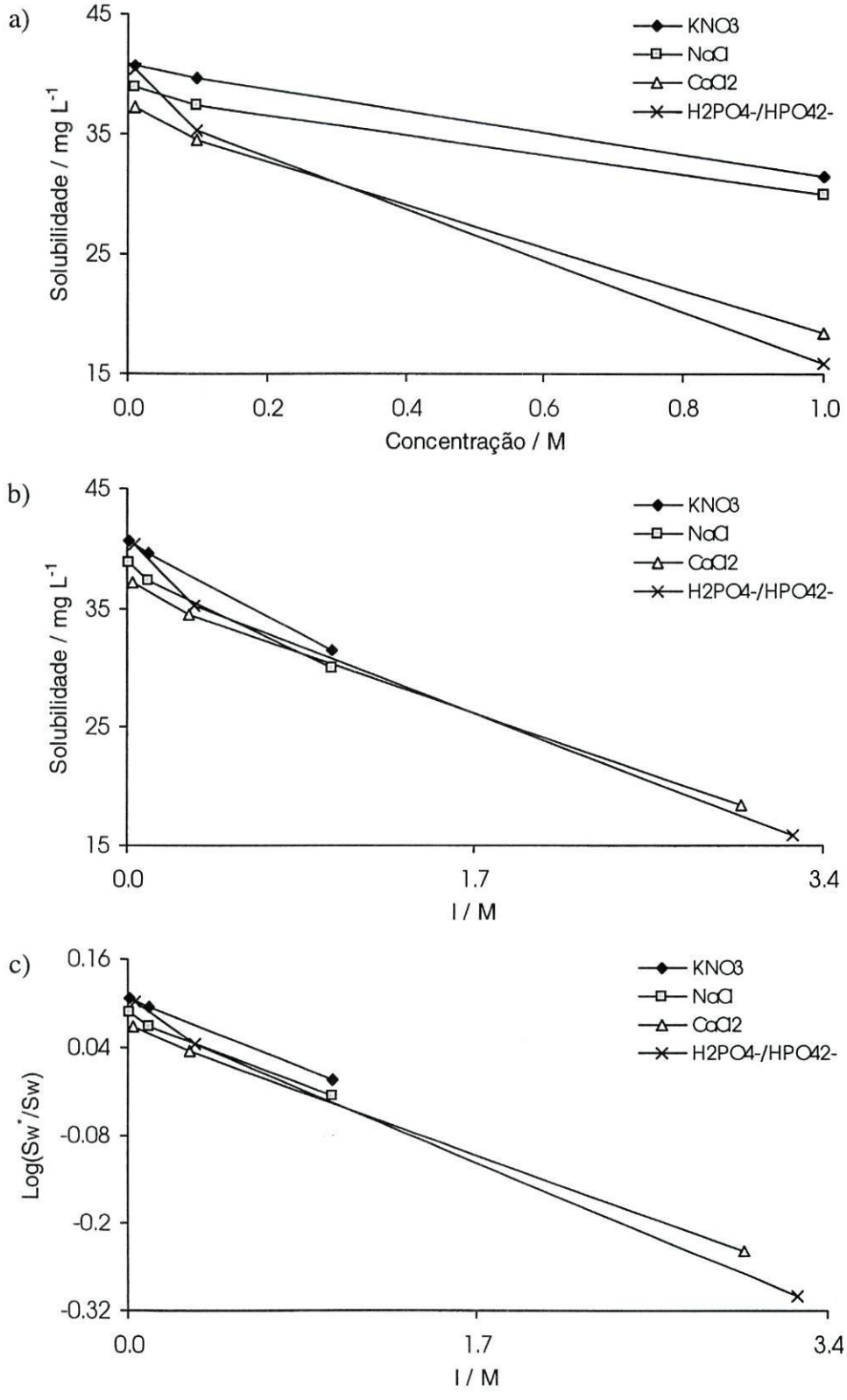


Figura 6.4 – Representação dos valores da solubilidade (mg/L) da AT em função a) da concentração de sais inorgânicos e b) da força iónica (I) da solução. Representação de c) $\mathrm{Log}\left(S_w^* / S_w\right)$ em função de I.

Tabela 6.9 – Resultados de ANOVA para o estudo do efeito da concentração dos sais inorgânicos na solubilidade da AT em solução aquosa, a 25 °C [&].

Origem da variação	Número de graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de *F*
KNO_3				
Entre os grupos	3	105,7	35,2	61,2
Dentro dos grupos	4	2,30	0,58	
NaCl				
Entre os grupos	3	315,6	105,9	175,2
Dentro dos grupos	4	2,40	0,60	
$CaCl_2$				
Entre os grupos	3	536,3	178,6	366,5
Dentro dos grupos	4	1,95	0,49	
$H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$				
Entre os grupos	3	770,7	256,9	527.3
Dentro dos grupos	4	1,95	0,49	

& – Número de ensaios igual a dois; $F_{crítico}$ igual a 6,591.

(ou mais propriamente da força iónica) dos sais em solução produziu alterações significativas na solubilidade da AT. Assim, o aumento da concentração de um mesmo sal em solução provocou uma diminuição na solubilidade da AT que pode ser atribuída indubitavelmente ao acréscimo da força iónica da solução (os valores de $F_{calculado}$ são sempre bastante superiores ao valor de $F_{crítico}$) e não a outros factores como o erro experimental. Quando se analisa o impacto da alteração do sal inorgânico em solução na solubilidade da AT (Tabela 6.10), verifica-se que também são significativas as alterações ocorridas na solubilidade desta, para concentrações idênticas de sal inorgânico. Este facto deve-se a que embora as soluções dos diferentes sais inorgânicos apresentem as mesmas concentrações molares em solução, exibem valores de força iónica distintos. De facto, o aumento da força iónica conduziu a uma diminuição aproximadamente linear da solubilidade (Fig. 6.4.b), o que se encontra de acordo com a eq. 2.97 obtida a partir da teoria de Debye-Hückel.

6.3.5 – Valores de K_{doc} e de solubilidade da AT na presença de AF

6.3.5.1 – Análise dos valores da solubilidade

Na Tabela 6.11 apresentam-se os valores da solubilidade da AT determinados em soluções aquosas de AF. Uma análise desta tabela permite detectar um ligeiro aumento na solubilidade da AT provocado pela presença de AF. Aparentemente, as amostras antropogénicas provocaram um acréscimo na solubilidade da AT superior à amostra de origem natural, AFS, especialmente para as concentrações mais elevadas de AF (200 mg/L). Este facto sugere que os AF antropogénicos possuem uma maior capacidade de solubilização da AT que a amostra AFS.

No caso particular das amostras AFLC e AFLau (Tabela 6.11), detecta-se um pequeno decréscimo na solubilidade da AT quando a concentração de AF aumenta de 50 para 100 mg/L, o que não terá grande significado uma vez que esta variação pode ser incluída no erro experimental. Relativamente à amostra AFLau, o aumento da sua concentração em solução não produziu alterações tão nítidas na solubilidade da AT como as restantes amostras, uma vez que as variações detectadas na solubilidade desta foram inferiores às variações sentidas na presença das outras três amostras de AF.

Uma análise mais pormenorizada da Tabela 6.11 quanto aos valores médios da

Tabela 6.10 – Resultados de ANOVA para o estudo do efeito do tipo de sal na solubilidade da AT em solução aquosa, a 25 °C [&].

Origem da variação	Nº de graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de *F*
0,01 M				
Entre os grupos	3	14,61	4,87	24,9
Dentro dos grupos	4	0,78	0,20	
0,10 M				
Entre os grupos	3	31,66	10,55	27,36
Dentro dos grupos	4	1,54	0,39	
1,00 M				
Entre os grupos	3	283,99	94,66	345,35
Dentro dos grupos	4	1,11	0,27	

& – Número de ensaios igual a 2; $F_{crítico}$ igual a 6,591

Tabela 6.11 – Solubilidade (mg/L) e valores de K_{doc} (L kg^{-1}) da AT em soluções aquosas de AF [&].

Solubilidade (mg/L)			
Amostra	Concentração de AF (mg/L)		
	50	100	200
AFS	30,6(1)	31,84(3)	36,7(6)
AFLau	35,57(5)	35,4(1)	37,6(4)
AFLC	38(3)	37(2)	40(2)
AFRAC	33,4(7)	35,3(2)	39,8(7)
Determinação dos valores de K_{doc} [a]			
Amostra	Declive	O.O.	K_{doc} (L kg^{-1})
AFS	1528,3	0,8484	3248
AFLau	691,8	1,0440	1533
AFLC	943,4	1,0691	1861
AFRAC	1415,1	0,9686	2877

& – Entre parêntesis apresentam-se valores de desvio padrão; S_w = 31,8(2) mg/L, resultante da média de cinco ensaios independentes.

a – Valores calculados com base nos resultados obtidos a 100 e a 200 mg/L de AF.

solubilidade da AT e dos respectivos desvios padrão não permite retirar conclusões inequívocas sobre as tendências de variação da solubilidade referidas, uma vez que os diferentes valores médios de solubilidade não são muito diferentes entre si, atendendo aos desvios padrão que lhes correspondem. Assim, não é muito claro o efeito da presença de AF a uma concentração de 50 mg/L na solubilidade da AT, uma vez que os valores assim obtidos não são muito diferentes da solubilidade da AT em água, sendo também semelhantes à solubilidade da AT determinada na presença de AF a uma concentração de 100 mg/L. Desta forma, efectuou-se uma análise da variância para eliminar quaisquer dúvidas existentes em relação ao significado das variações detectadas.

Os resultados da análise da variância dos efeitos da concentração e do tipo de AF na solubilidade da AT (Tabelas 6.12 e 6.13, respectivamente) revelam que as variações provocadas na solubilidade desta com o incremento da concentração de AF e com a alteração da amostra são estatisticamente significativas, uma vez que os valores de $F_{calculado}$ são superiores aos valores de $F_{crítico}$. No entanto, os valores de $F_{calculado}$ para as amostras AFLau e AFLC encontram-se relativamente próximos dos valores de $F_{crítico}$, o que leva a concluir que a variação de concentração destas duas amostras de AF não provocou um aumento significativo na solubilidade da AT.

6.3.5.2 – Determinação dos valores de K_{doc}

Embora não se tenham detectado alterações significativas na solubilidade da AT com a variação de concentração de algumas das amostras de AF (AFLau e AFLC), ajustaram-se à equação do modelo de partição (eq. 2.86) os valores da solubilidade obtidos (Tabela 6.11 e Fig. 6.5) para concentrações de AF 100 e 200 mg/L (os valores obtidos a 50 mg/L de AF não foram usados no cálculo).

Apesar de apenas serem utilizados dois pontos experimentais em cada representação (Fig. 6.5), os resultados do ajuste efectuado (Tabela 6.11) estão de acordo com o modelo de partição utilizado, uma vez que os valores obtidos para as respectivas ordenadas na origem encontram-se bastante próximos de 1. A análise comparativa dos valores de K_{doc} não permite detectar diferenças significativas entre as amostras de AF naturais e antropogénicas, situando-se os valores obtidos no intervalo compreendido entre os 1533 e os 3248 L kg^{-1}.

Tabela 6.12 – Valores de F obtidos por análise da variância (ANOVA) do efeito da concentração de AF na solubilidade em solução aquosa da AT [&].

Concentração de AF (mg L^{-1})	**50**	**100**	**200**
F	330,0	313,2	136,9

& – Número de ensaios igual a dois; $F_{crítico}$ igual a 5,192.

Tabela 6.13 – Valores de F obtidos por análise da variância (ANOVA) do efeito do tipo de AF na solubilidade em solução aquosa da AT [&].

Amostra	**AFS**	**AFLau**	**AFLC**	**AFRA**
F	184,4	15,2	34,4	175,7

& – Dois ensaios para a amostra AFLau, com $F_{crítico}$ igual a 9,552; cinco ensaios para as restantes amostras, com $F_{crítico}$ igual a 3,239.

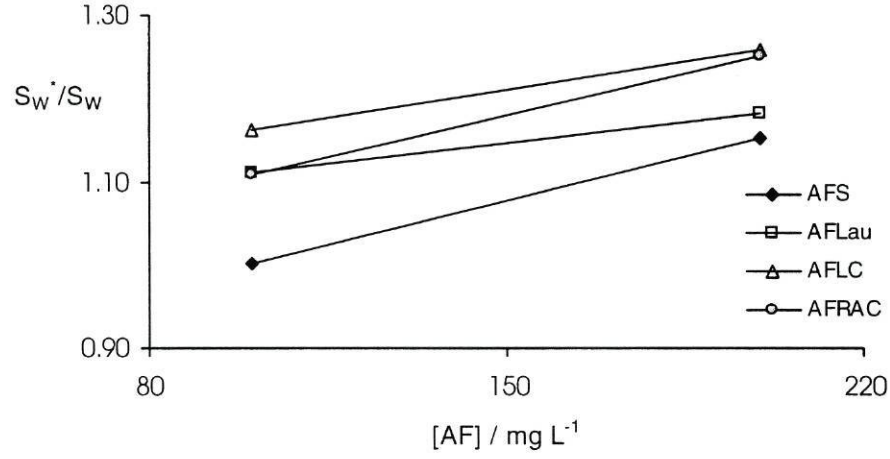


Figura 6.5 – Representação de $\left(S_W^*/S_W\right)$ para a AT em função da concentração de AF.

Eliminaram-se da representação os valores obtidos a 50 mg L^{-1} de AF.

Na Tabela 6.14, para além dos valores de K_{doc} relativos à associação da AT com AF, apresentam-se também os valores de K_{doc} obtidos para a associação dos AF com o pireno e o pentaclorofenol, determinados por uma técnica semelhante [9]. Da análise desta tabela pode verificar-se que os valores relativos ao pireno e pentaclorofenol são cerca de cinco a dez vezes superiores aos valores referentes à AT. Esta diferença deve-se ao facto da AT ser uma molécula mais polar que o pireno e o pentaclorofenol, o que a torna mais solúvel em solução aquosa (solubilidade cerca de $1{,}5 \times 10^{-4}$ M para a AT [4,7,8], $6{,}46 \times 10^{-7}$ M para o pireno [7] e $5{,}2 \times 10^{-5}$ M para o pentaclorofenol [10]). Esta maior polaridade da AT em relação às outras duas substâncias orgânicas provoca uma alteração no mecanismo de associação com os AF. De facto, enquanto as substâncias apolares (como o pireno) exibem uma maior afinidade pelos fragmentos apolares dos AF, a AT não terá afinidade para essas estruturas. Assim, a associação de moléculas orgânicas polares com AF decorre segundo um outro mecanismo diferente, por exemplo, por pontes de hidrogénio [3]. Deste modo, pode explicar-se a tendência relativamente fraca para a associação entre substâncias orgânicas polares com uma elevada solubilidade em água e as amostras de AF estudadas.

Numa análise comparativa dos valores de K_{doc} (Tabela 6.14) não são detectadas diferenças entre as amostras naturais e antropogénicas na intensidade das associações com o herbicida AT. No caso das interacções dos AF com substâncias apolares ou pouco polares como o pireno e o pentaclorofenol, observa-se um aumento global na solubilidade de substância orgânicas hidrofóbicas provocado pela amostra antropogénica AFLC que é superior ao aumento provocado pelas restantes amostras. Este facto pode atribuir-se à maior percentagem de estruturas aromáticas desta amostra [9] (ver na Tabela 4.2 a maior percentagem de carbonos detectados para esta amostra nos espectros de RMN de ^{13}C entre os 90 e os 125 ppm). No caso da AT, sendo o mecanismo da associação diferente e envolvendo interacções entre dipolos, a existência de uma maior percentagem de carbonos aromáticos poderá contribuir para a diminuição dessas interacções. De facto, a análise da Tabela 4.2 mostra que as amostras AFLau têm uma maior concentração deste tipo de carbonos (13,6 % e 7,7 % para AFLau e AFLC, respectivamente, e 5,2 % e 4,1 % para AFS e AFRAC, respectivamente), sendo também estas as amostras que apresentam uma menor tendência para a associação com a AT (ver Tabela 6.11).

Tabela 6.14 – Valores de K_{doc} da AT, pireno e pentaclorofenol em soluções de AF [&].

	AT	Pireno [a]	Pentaclorofenol [a]
AFS	3248	11901	21054
AFLC	1861	23874	25329
AFRAC	2877	9249	23460

& – K_{doc} em L kg^{-1}; S_w (AT) = $1{,}53 \times 10^{-4}$ M [4,7,8]; S_w (Pireno) = $6{,}46 \times 10^{-7}$ M [7] e S_w (Pentaclorofenol) = $5{,}2 \times 10^{-5}$ M [11].

a – Valores retirados da referência [12]

Tabela 6.15 – Constantes de partição entre a AT e SH de solos "podzolic" determinadas por técnicas de ultrafiltração [11].

Ácidos Fúlvicos		Ácidos Húmicos	
Amostra	K_{doc} / L kg^{-1}	Amostra	K_{doc} / L kg^{-1}
AF_{solo1}	192(12)	AH_{solo1}	281(17)
AF_{solo2}	110(10)	AH_{solo2}	181(30)
AF_{solo3}	275(17)	AH_{solo3}	380(23)

Quando se comparam os valores de K_{doc} apresentados neste trabalho para a AT com outros valores existentes na literatura, nomeadamente os resultados apresentados na Tabela 6.15 para SH extraídas de um solo "podzolic" [11], verifica-se que os primeiros (Tabela 6.11) são cerca de dez vezes superiores aos segundos (Tabela 6.15). No entanto, é de salientar que os valores de K_{doc} apresentados na Tabela 6.15 foram determinados por técnicas de ultrafiltração e não por estudos de equilíbrio sólido-líquido e líquido-líquido. Segundo alguns estudos [12,13], a utilização de filtros sólidos pode conduzir a valores de solubilidade determinados por defeito, uma vez que parte

dos compostos orgânicos pode ser adsorvida nestes, introduzindo erros na determinação dos valores de solubilidade.

6.3.6 – Separação de AT, DeAT e DpAT de soluções aquosas de AF por HP-SEC

Na Fig. 6.6 apresentam-se conjuntos típicos de espectros de UV-Vis de misturas de AFS com AT, DeAT, DpAT a pH 6,00 em função do tempo, e na Fig. 6.7 perfis de eluição típicos dos herbicidas e de misturas destes com diferentes concentrações de AFS.

Uma análise das Figs. 6.6 e 6.7 mostra que o aumento da concentração de AFS não provocou alterações significativas na intensidade das bandas correspondentes aos herbicidas, o que sugere ou ausência de complexação (que existe tal como foi verificado em 6.3.5 pela utilização das técnicas de extracção), ou uma complexação cinéticamente fraca (lábil) entre os herbicidas e os AFS. De facto, a existir uma complexação forte (não lábil) entre os AFS e estes compostos, esta deveria provocar uma remoção das bandas correspondentes aos herbicidas, ou em alternativa, uma diminuição significativa da intensidade destas bandas em consequência da formação de complexos. Este facto não é detectado mesmo para as concentrações mais elevadas de AFS utilizadas (cerca de 300 mg/L), que são muito superiores aquelas que existem no ambiente e que normalmente apresentam valores da ordem dos 80 a 100 mg/L [14].

Estas conclusões são reforçadas pela análise das representações dos máximos de intensidade normalizados e da área das bandas (Fig. 6.8). Assim, na Fig. 6.8 observa-se que o aumento da concentração de AFS provocou um incremento aproximadamente linear, tanto dos máximos de intensidade normalizados, como da área das bandas correspondentes aos AFS. Esta tendência, que é mais nítida no caso da AT (Figs. 6.8.a e 6.8.b), leva a concluir da formação de complexos entre estes herbicidas e a amostra AFS de características lábeis.

Os resultados obtidos encontram-se de acordo com outros trabalhos [3], onde se refere a existência de pontes de hidrogénio envolvidas na associação da AT com AF. Este tipo de ligações são de facto bastante débeis, tal como se refere na literatura, pelo que poderão ter-se rompido no interior da coluna cromatográfica, não sendo assim detectadas por esta técnica experimental.

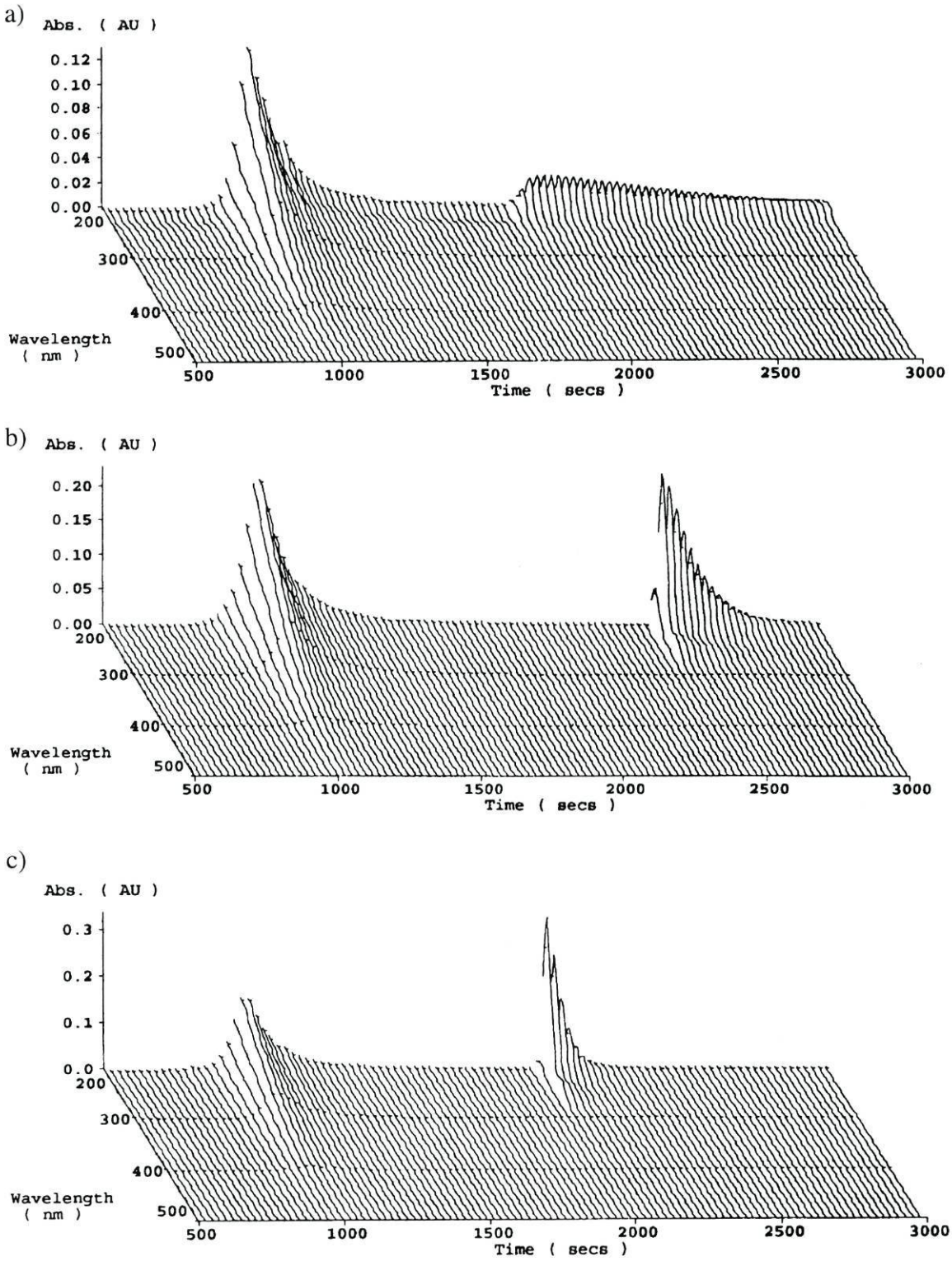


Figura 6.6 – Conjuntos típicos de espectros de UV-Vis de misturas de AFS 80 mg/L com a) AT, b) DeAT e c) DpAT 9×10^{-5} M a pH 6,00.

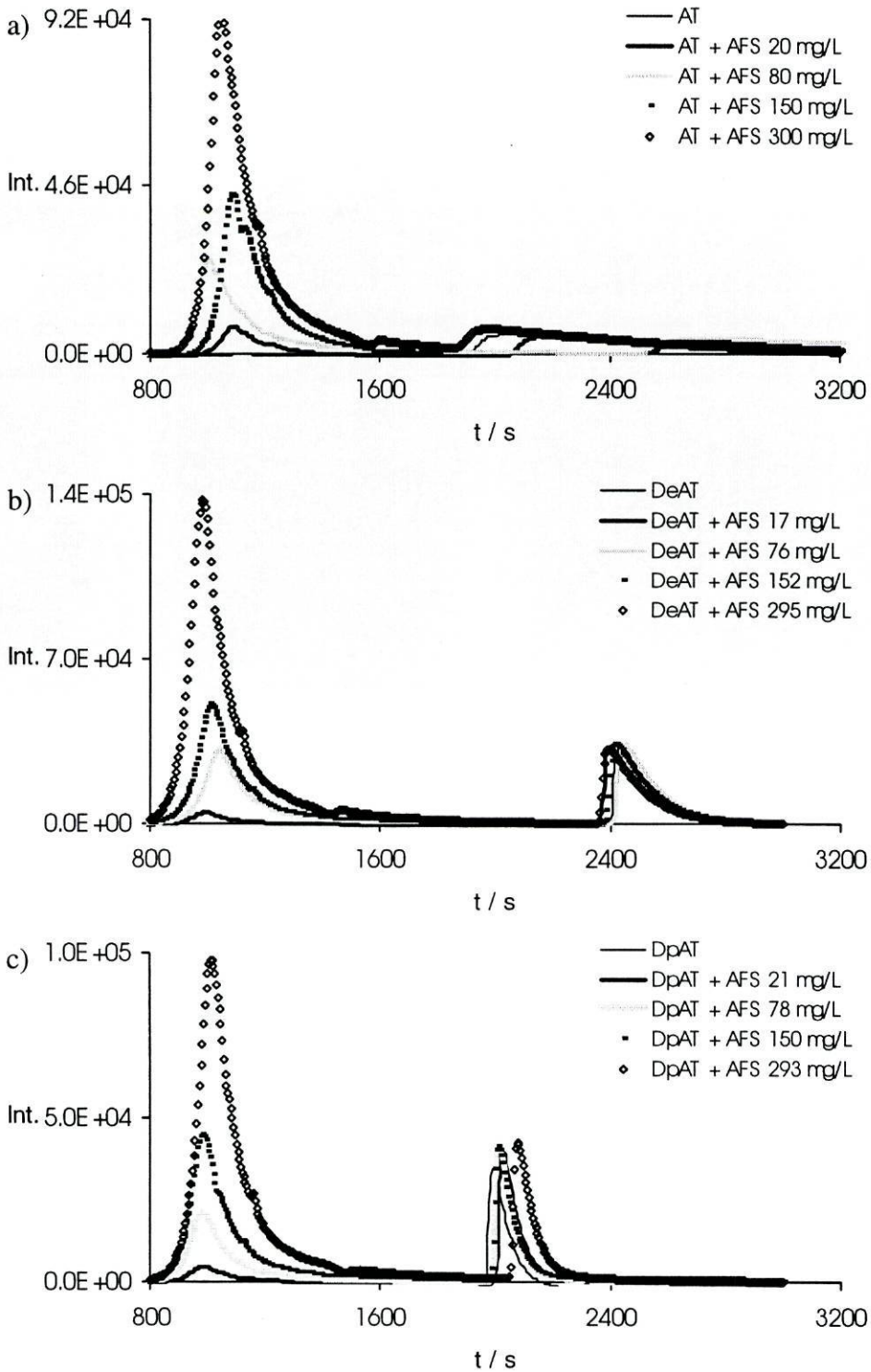


Figura 6.7 – Sobreposição dos perfis de eluição de misturas de a) AT, b) DeAT e c) DpAT 9×10^{-5} M para quatro níveis de concentração de AFS a pH 6,00. Ampliação das bandas dos herbicidas: d) AT, e) DeAT e f) DpAT.

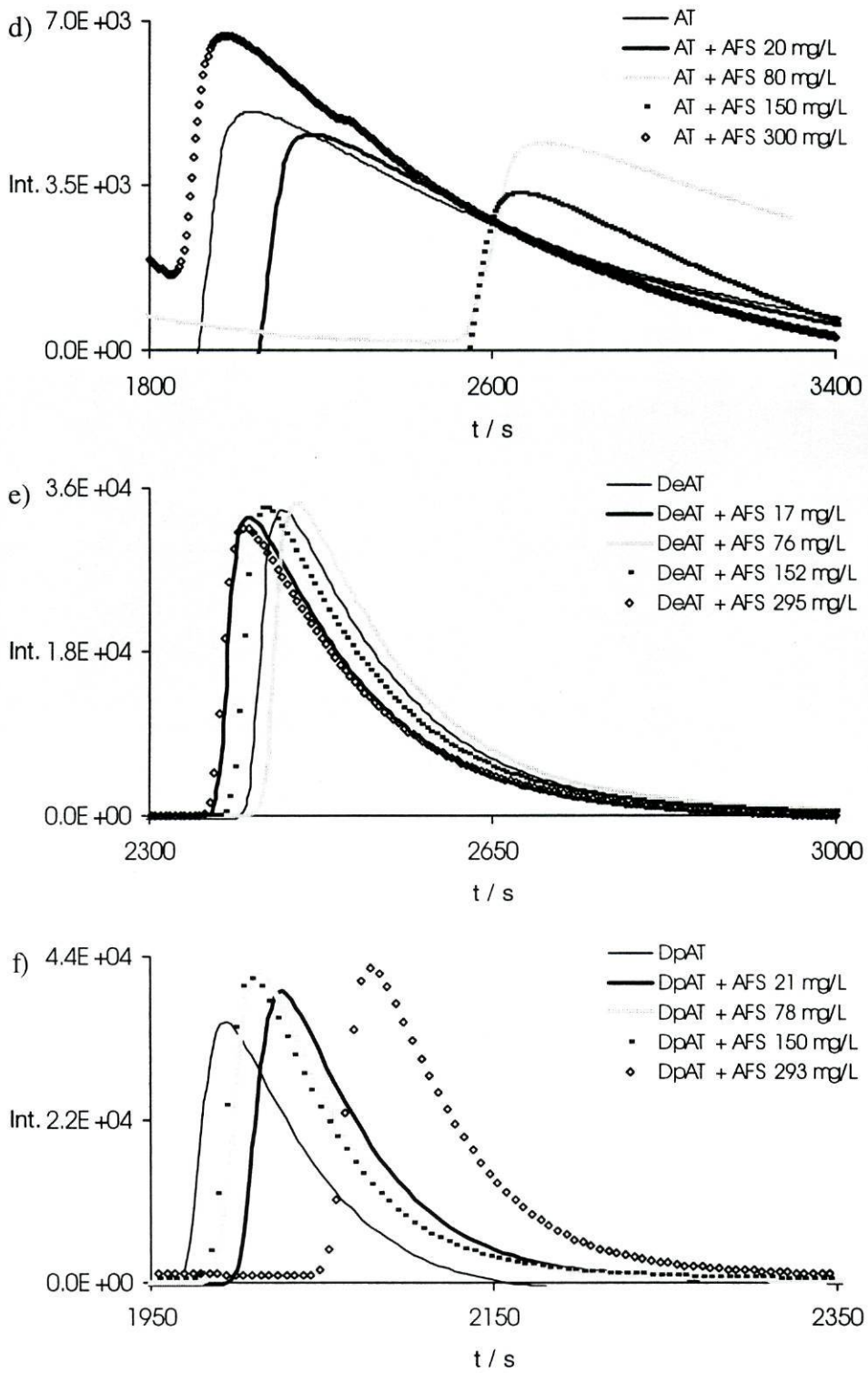


Figura 6.7 (continuação)

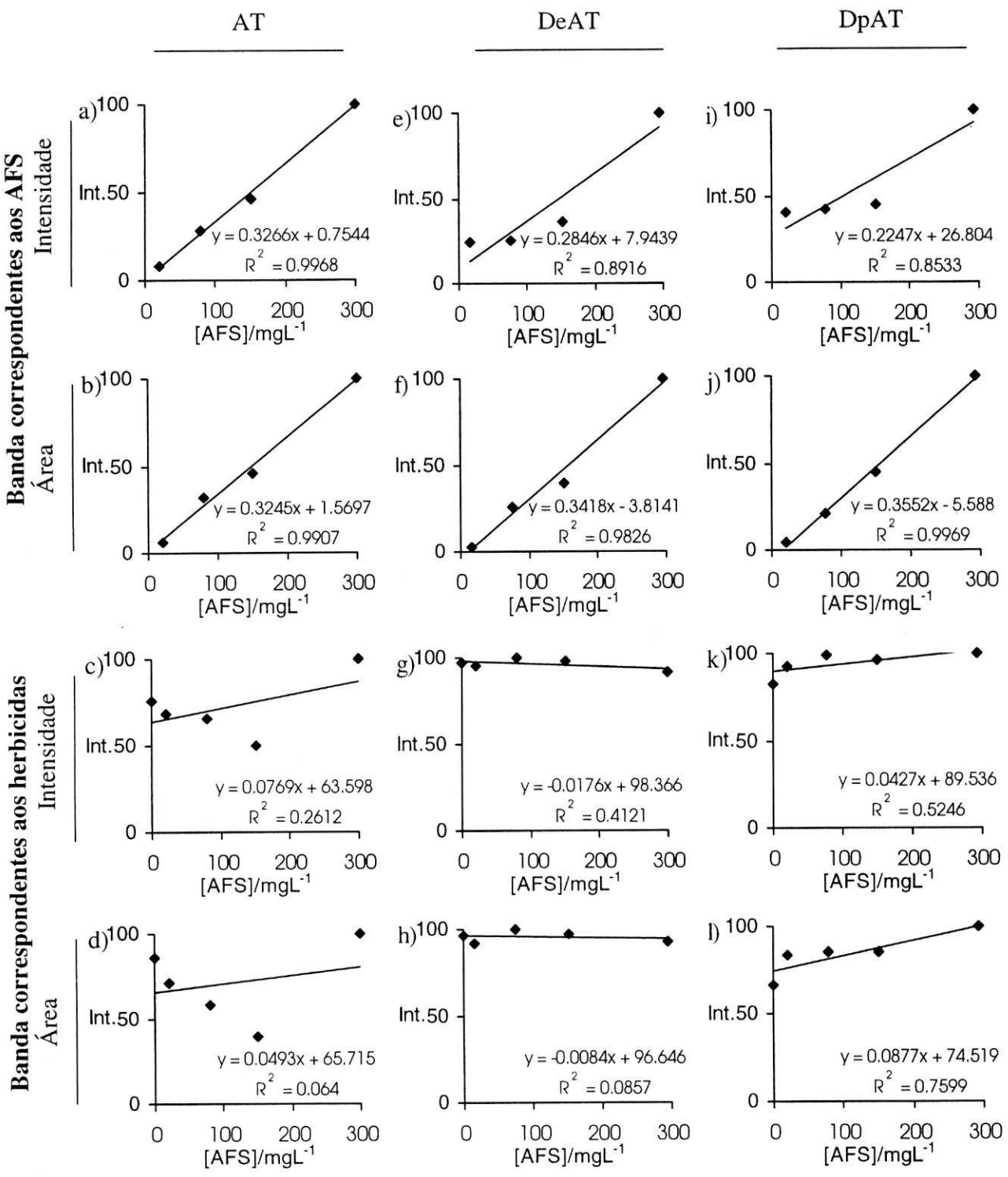


Figura 6.8 – Representação normalizada dos máximos de intensidade e das áreas das bandas correspondentes à presença de AFS e herbicidas para as experiências de complexação da AT, [a) - d)]; DeAT, [e) - h)]; e DpAT, [i) - l)], com AFS a pH 6,00.

Na Fig. 6.9 apresentam-se os perfis de eluição normalizados (cortes a 220 nm) da AT, DeAT e DpAT a pH 6,00. Uma análise rápida desta figura permite verificar que tanto a DeAT como a DpAT são eluidas num curto espaço de tempo e originam bandas de eluição bem definidas, ao contrário da AT que atravessa a coluna cromatográfica muito lentamente após o seu máximo de eluição. Este facto sugere a presença de interacções entre a AT e o material de enchimento da coluna, que fazem com que esta seja retida no interior da coluna cromatográfica. Por outro lado, quando se analisam os tempos de eluição dos três herbicidas, verifica-se que a AT e a DpAT apresentam tempos de eluição muito semelhantes (cerca de 2000 s), ao contrário da DeAT que é eluida muito mais tarde (cerca dos 2440 s). Se apenas se atendesse ao facto da massa molecular destes três herbicidas ser muito semelhante (cerca de 200 g/mol), o tempo de permanência destes no interior da coluna cromatográfica deveria ser idêntico na ausência de interacções com esta. Como este facto não se verifica, pode concluir-se que devem existir sofrer interacções entre estes herbicidas (pelo menos dois deles) e o material de enchimento da coluna, levando a que a AT seja retida e que por isso a sua banda seja mais prolongada, e a DeAT eluida posteriormente à DpAT.

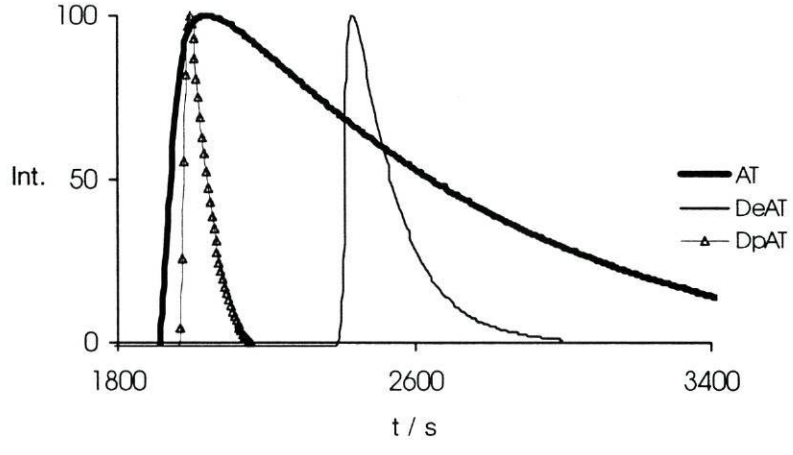


Figura 6.9 – Sobreposição de perfis de eluição normalizados típicos para a AT, DeAT e DpAT a pH 6,00. Cortes a 220 nm.

6.4 – CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste capítulo mostraram que ocorrem associações entre os AF e o herbicida AT. Essas associações são relativamente fracas, quer quanto à estabilidade, quer quanto à labilidade. Em relação aos metabolitos naturais da AT, as suas associações com os AF, a existirem, serão igualmente lábeis. Embora não tenha sido possível avaliar a estabilidade das associações entre estes metabolitos e os AF, sendo a sua solubilidade em água superior à da AT, não é previsível que as suas associações com os AF sejam mais fortes que a associação entre os AF e a AT.

Não foram detectadas quaisquer relações entre a origem das amostras de AF (natural *vs.* antropogénica) e a extensão das associações com a AT. Por outro lado, os resultados obtidos sugerem a existência de uma relação entre uma maior extensão das associações e uma menor percentagem de carbonos aromáticos. Este facto encontra-se em concordância com um mecanismo envolvendo dipolos moleculares, como por exemplo, pontes de hidrogénio, pelo que a interacção da AT com AF não corresponderá a um modelo de partição entre duas fases, como aquele que é detectado para moléculas apolares pequenas (como por exemplo o pireno).

As metodologias experimentais desenvolvidas no estudo das interacções entre AF e AT, nomeadamente a sequência de extracções sólido / solução aquosa e solução aquosa / clorofórmio e a técnica de cromatografia de exclusão por tamanhos, revelaram-se ferramentas importantes porque permitem obter informações complementares sobre os fenómenos em estudo. Por outro lado, verificou-se que estas duas metodologias experimentais acopladas a técnicas de calibração multivariada, também avaliadas neste capítulo, poderão constituir um instrumento particularmente útil neste tipo de estudos.

6.5 – BIBLIOGRAFIA

[1] G. G. Choudhry, Humic Substances: Structural, Photophysical, Photochemical and Free Radical Aspects and Interactions with Environmental Chemicals, Gordon and Breach Science Publishers, Inc., Nova York, 1984, Part IV.

[2] D. L. Macalady, P. G. Tratnyek e N. Lee Wolfe, *Influences of Natural Organic Matter on the Abiotic Hydrolysis of Organic Contaminants in Aqueous Systems*, I. H. Suffet e P. MacCarthy (Eds.), em Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants, American Chemical Society, 1989, Cap. 21.

[3] E. C. Devitt e M. R. Wiesner, *Environ. Sci. Technol.*, 1998, **32**, 232-237.

[4] K. R. Solomon et al, *Environ. Toxicol. Chem.*, 1996, **15**, 31-76.

[5] W. E. Pereira e C. E. Rostad, *Environ. Sci. Technol.*, 1990, **24**, 1400-1406.

[6] Handbook of Chemistry and Physics, David R. Lide (Ed.), CRC Pres, Inc., Florida, 70th Edition, 1989-90.

[7] R. Kühne, R. U. Ebert, F. Kleint, G. Schmidt e G. Schüürmann, *Chemosphere*, 1995, **30**, 2061-2077.

[8] F. A. Gunther, W. E. Westlake e P. S. Jaglan, *Residue Reviews*, 1968, **20**, 1-148.

[9] M. C. P. O. Marques, *Interacção de Ácidos Fúlvicos com Pentaclorofenol e Pireno: Metodologias para a Análise Rápida de Clorofenóis e Hidrocarbonetos Poliaromáticos*, Tese de Mestrado, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto, 2000.

[10] M. A. Schlautman e J. J. Morgan, *Environ. Sci. Technol.*, 1993, **27**, 961-969.

[11] N. A. Kulikova, I. V. Perminova e G. F. Lebedeva, Proceedings of the 10th International Meeting of the International Humic Substances Society, Julho de 2000, Toulouse, França, Vol. 1, pág. 357-360.

[12] G. R. Aiken e R. L. Malcolm, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1987, **51**, 2177-2184.

[13] F. D. Kopinke, A. Georgi e K. Mackenzie, *Anal. Chim. Acta*, 1997, **355**, 101-103.

[14] J. C. G. Esteves da Silva, *Acid-base and metal ion complexation properties of humic substances studied by chemometric analysis of spectroscopic-potenciometric hyphenated data*, Tese de Doutoramento, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto, 1994.

7 – CONCLUSÕES GLOBAIS

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram efectuar uma caracterização de duas amostras de AF antropogénicos (AFLC e AFRAC) provenientes de compostos comercializados para usos agrícolas (AGRONAT e SANSÃO). Uma das maiores dificuldades dos estudos de caracterização de AF é a falta de resolução das técnicas de análise química na determinação de características finas das amostras em estudo. Esta limitação está relacionada com a grande complexidade química dos AF, que são por definição extractos obtidos segundo um processo extracção determinado, e que por isso constituem uma mistura heterogénea de macromoléculas com propriedades mais ou menos semelhantes. Esta característica destes extractos origina, por vezes, uma resposta invariante e inconclusiva das técnicas analíticas em estudos envolvendo diversas amostras de AF.

No caso particular deste trabalho, conseguiram detectar-se características diferentes entre as amostras de AF antropogénicos e as amostras naturais, o que é suficiente para se concluir que as amostras de AF de origem antropogénica são quimicamente diferentes das amostras naturais. As maiores diferenças entre as amostras antropogénicas e as amostras naturais são observadas nos sinais estruturais macroscópicos registados nas análises elementares e espectroscópicas. No que respeita às propriedades de complexação de catiões metálicos e de associação com a atrazina, não se registaram diferenças globais significativas, a não ser uma menor capacidade de complexação de uma das amostras antropogénicas.

As metodologias de análise das amostras e das respectivas associações com catiões metálicos e atrazina revelaram ser adequadas aos estudos efectuados. Das técnicas implementadas neste trabalho, pode destacar-se a cromatografia de exclusão por tamanhos pela sua grande capacidade de caracterização dos AF e pela contribuição nos estudos das associações de AF com a atrazina. Espera-se que o desenvolvimento tecnológico na qualidade das fases sólidas utilizadas nas colunas de HP-SEC permita obter mais informação sobre as amostras de substâncias húmicas.

Neste trabalho testou-se o acoplamento de técnicas quimiométricas de calibração multivariada e de decomposição trilinear de desenvolvimento recente a algumas metodologias experimentais. Embora não se tenham aplicado estas novas metodologias de cálculo aos estudos de AF, abriram-se novas áreas de pesquisa que possibilitam o

desenvolvimento de novas técnicas de estudo das interacções de AF com outras espécies químicas existentes nos solos e nas águas. Dos estudos efectuados, pode destacar-se o potencial do acoplamento do PARAFAC a determinações cinéticas. Desta associação poderá surgir uma estratégia que permita a caracterização das propriedades cinéticas da complexação de AF com catiões metálicos utilizando uma metodologia baseada num princípio de modelação branda.

Os resultados obtidos neste estudo focaram apenas uma das fracções das substâncias húmicas dos solos, os AF, não sendo consideradas outras fracções quimicamente menos reactivas mas que desempenharão um determinado papel nos solos, nomeadamente os ácidos húmicos e a humina. Estudos preliminares sobre as propriedades de complexação do catião Cu(II) com ácidos húmicos extraídos dos mesmos materiais reciclados utilizados neste trabalho confirmaram a sua fraca reactividade química. Por outro lado, as amostras estudadas foram extraídas de materiais reciclados antes da sua adição aos solos, ou de misturas efectuadas em laboratório utilizando proporções de mistura solo / composto pouco realistas. Deste modo, os resultados obtidos não poderão ser directamente extrapolados para situações naturais. Para se obter este tipo de informação que permitiria a realização de previsões sobre eventuais impactos da utilização continuada de materiais reciclados a solos agrícolas, seria necessário efectuarem-se experiências de campo. No entanto, devido à elevada escala de tempo em que decorrem as culturas e os fenómenos químicos dos solos, estas experiências são muito demoradas (vários meses ou anos) pelo que saem fora do âmbito deste trabalho. Nota-se que está a decorrer a fase inicial de uma experiência em vasos que envolve uma cultura de Sorgo, na qual se utiliza uma proporção normal em actividades agrícolas de um solo natural misturado com o material reciclado donde foi extraída uma das amostras de AF antropogénicos (AFLC). Apenas a análise dos resultados obtidos neste tipo de experiências, onde se estuda a evolução das propriedades das substâncias húmicas extraídas de solos agrícolas ao longo do tempo, poderão confirmar as suspeitas levantadas neste trabalho sobre uma eventual modificação das suas características físico-químicas.

APÊNDICE 1 – UTILIZAÇÃO DE SIMULAÇÕES NA AVALIAÇÃO DOS MODELOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DOS DADOS POTENCIOMÉTRICOS

A1.1 – CARACTERÍSTICAS DAS SIMULAÇÕES

Para se avaliar comparativamente os diferentes métodos de tratamento dos dados potenciométricos experimentais (descritos no Capítulo 2) e se determinar qual deles apresenta maior robustez a desvios do modelo de complexação simples 1:1, efectuaram-se quatro simulações de experiências potenciométricas de complexação com as características descritas na Tabela A1.1.

O cálculo do valor de [M] necessário para efectuar a simulação da titulação potenciométrica de uma solução contendo apenas um tipo de sítio ligante, Sim1 (Tabela A1.1), foi efectuado com o auxílio da eq. A1.1, que foi deduzida a partir da definição da constante de equilíbrio e dos balanços materiais de catião metálico e de ligando:

$$K[M]^2 + [M](-K[M]_{Total} + 1 + K[L]_{Total}) - [M]_{Total} = 0 \qquad (A1.1)$$

A concentração de M foi obtida após a resolução desta equação de segundo grau para os valores de K, $[M]_{Total}$ e $[L]_{Total}$ apresentados na Tabela A1.1.

Nas simulações de titulações potenciométricas de soluções contendo dois ou mais sítios ligantes diferentes (Sim2, Sim3 e Sim4), o valor de [M] (Tabela A1.1) foi determinado através de uma equação geral (eq. A1.2), também deduzida a partir da definição da constante de equilíbrio e dos balanços materiais de catião metálico e de ligando,

$$[M] - [M]_{Total} + \sum_{n=1}^{nL} \frac{K_n \times [L_n]_{Total}}{\frac{1}{[M]} + K_n} = 0 \qquad (A1.2)$$

em que nL representa o número de sítios ligantes diferentes.

As eqs. A1.1 e A1.2 foram introduzidas numa folha de cálculo (Microsoft Excel) e resolvidas em ordem a [M]. A eq. A1.2 foi solucionada com o auxílio da aplicação "Solver" (Microsoft Excel).

Tabela A1.1 – Parâmetros utilizados na simulação de quatro experiências potenciométricas de complexação metal-ligando [&].

Simulação	Reacções químicas	$K_{teórico}$
Sim1	$M + L \Leftrightarrow ML$	$4{,}00 \times 10^{5}$
Sim2	$M + L_1 \Leftrightarrow ML_1$ $M + L_2 \Leftrightarrow ML_2$	$K_1 = 4{,}00 \times 10^{5}$ $K_2 = 4{,}00 \times 10^{4}$
Sim3	$M + L_1 \Leftrightarrow ML_1$ $M + L_2 \Leftrightarrow ML_2$	$K_1 = 4{,}00 \times 10^{5}$ $K_2 = 4{,}00 \times 10^{3}$
Sim4	$M + L_1 \Leftrightarrow ML_1$ ... $M + L_n \Leftrightarrow ML_n$	$K_1 = 4{,}00 \times 10^{5}$ $K_2 = 3{,}56 \times 10^{5}$ $K_3 = 3{,}12 \times 10^{5}$ $K_4 = 2{,}68 \times 10^{5}$ $K_5 = 2{,}24 \times 10^{5}$ $K_6 = 1{,}80 \times 10^{5}$ $K_7 = 1{,}36 \times 10^{5}$ $K_8 = 9{,}20 \times 10^{4}$ $K_9 = 4{,}80 \times 10^{4}$ $K_{10} = 4{,}00 \times 10^{3}$

& – $[M]_{Total}$ variou entre 1×10^{-7} e 1×10^{-1} M; MM de cada ligando = 1000 g/mol para Sim1, 500 g/mol para Sim2 e Sim3 e 100 g/mol para Sim4; $[L]_{Total} = 5{,}00 \times 10^{-5}$ M para Sim1, Sim2 e Sim3, e $1{,}00 \times 10^{-4}$ M para Sim4.

A1.2 – RESULTADOS DAS SIMULAÇÕES

Os resultados das simulações encontram-se resumidos na Fig. A1.1. Da análise desta figura pode verificar-se que ocorre uma diminuição do grau de complexação com o aumento da concentração de catião metálico. Assim, para as concentrações mais baixas de catião metálico adicionado, este encontra-se quase totalmente complexado com L, na forma ML (grau de complexação, α, próximo de 1), diminuindo o seu grau de complexação à medida que a sua concentração cresce (vai ficando progressivamente em maior excesso relativamente ao ligando).

O decréscimo do grau de complexação de M com o aumento da sua concentração não ocorre de forma idêntica nas quatro simulações. De facto, da análise da Fig. A1.1.b pode verificar-se que as simulações Sim1 e Sim3 sofrem uma diminuição do grau de complexação mais rápida que as restantes. Assim, em Sim1 apenas um sítio ligante de concentração 5×10^{-5} M se encontra a complexar o Cu(II). Em Sim3, para além do primeiro sítio ligante que tem uma constante de complexação semelhante à de Sim1, existe um outro sítio ligante de concentração 5×10^{-5} M mas que apresenta uma constante de estabilidade relativamente baixa que o impede de participar quantitativamente na complexação. Nas simulações Sim2 e Sim4, os resultados presentes na Fig. A1.1 são semelhantes entre si porque a diferença existente entre os dois modelos reside no número de sítios ligantes (e de constantes de estabilidade) diferentes. Apesar de Sim4 apresentar uma distribuição de dez constantes diferentes, enquanto Sim2 apenas exibe duas, os valores médios de Log K são iguais (5,1) para as duas simulações.

A1.3 – AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE CÁLCULO

Nas Figs. A1.2 a A1.4 apresentam-se os resultados do ajuste dos dados simulados aos modelos de Scatchard, van den Berg / Ruzic e Buffle descritos no Capítulo 2, secção 2.4.2.

Uma análise global destas figuras permite verificar que as representações de Scatchard (Fig. A1.2) apresentam um encurvamento na presença de dois ou mais sítios ligantes, enquanto as representações de van den Berg / Ruzic e de Buffle (Figs. A1.3 e A1.4.a a A1.4.d, respectivamente), nas mesmas condições, originam gráficos aparentemente lineares com bons coeficientes de correlação. Por outro lado, as

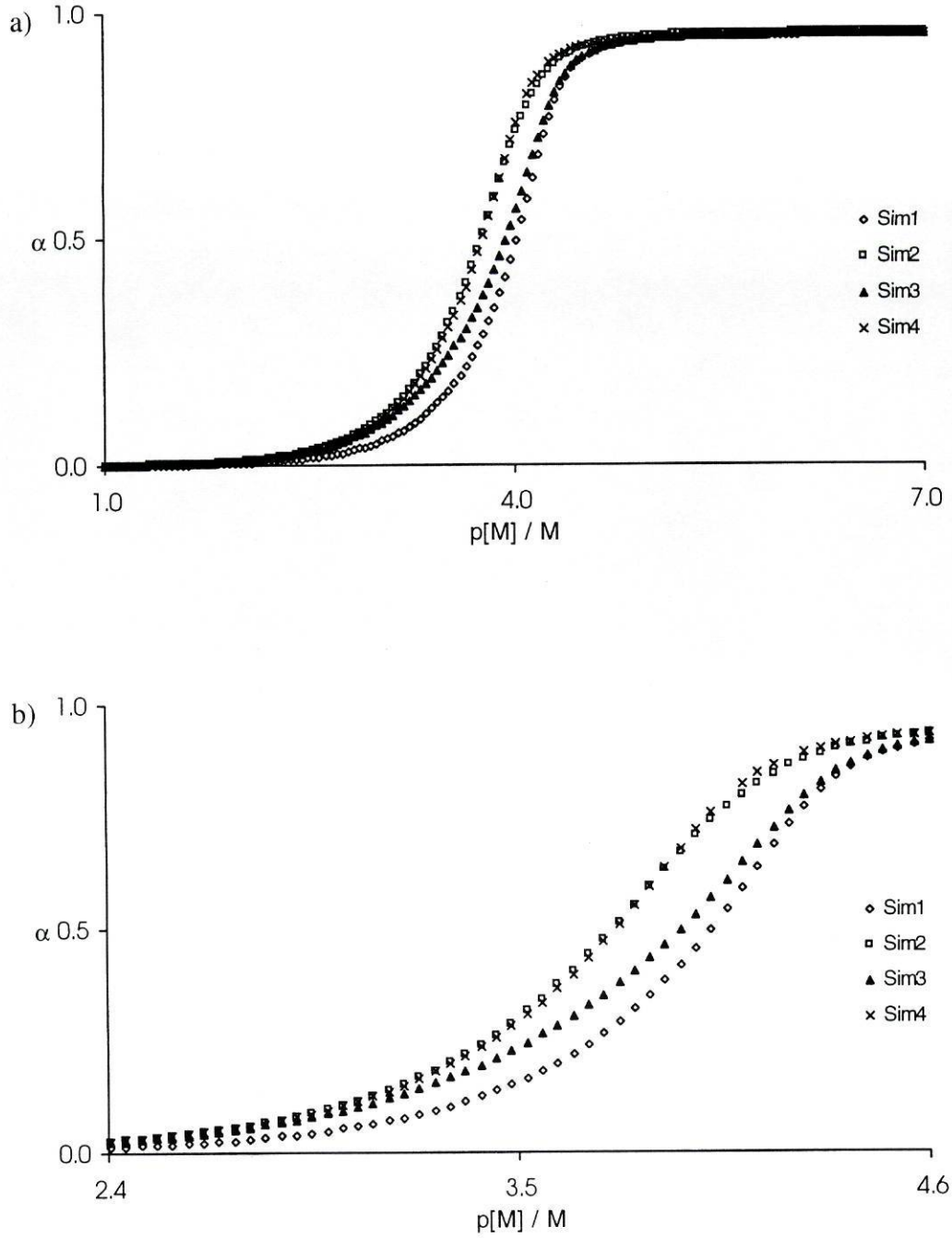


Figura A1.1 – Variação do grau de complexação ($\alpha = \frac{[ML]}{[M]_{Total}}$) de M e L com a concentração de catião metálico M: a) experiências potenciométricas simuladas, Sim1, Sim2, Sim3 e Sim4; b) ampliação da Fig. A1.1.a no intervalo de p[M] entre 2,4 e 4,6 M.

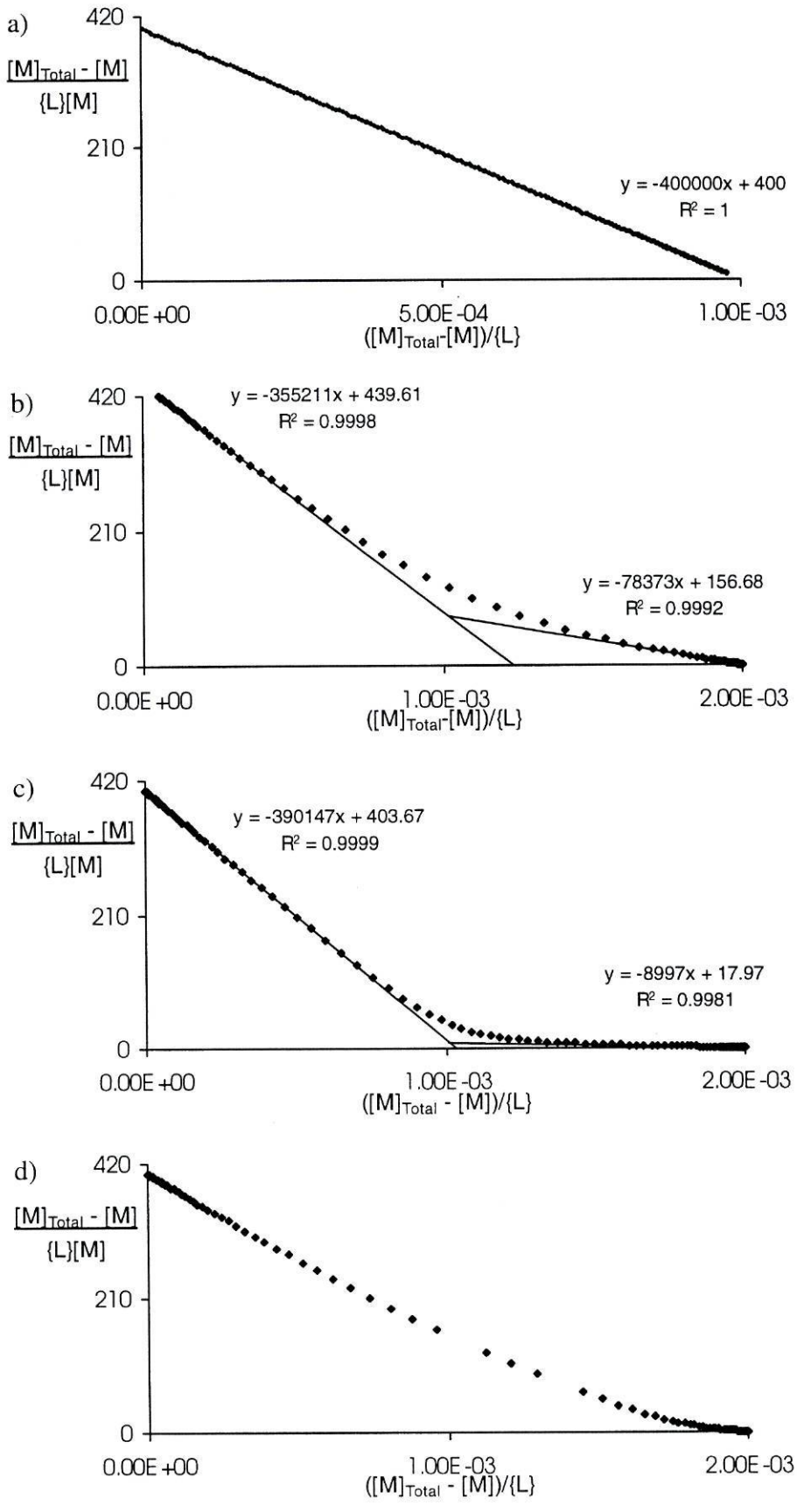


Figura A1.2 – Resultados do método de Scatchard para as titulações potenciométricas simuladas: a) Sim1; b) Sim2; c) Sim3 e d) Sim4. No caso da Fig.A1.2.d não foi possível ajustar qualquer recta aos valores simulados.

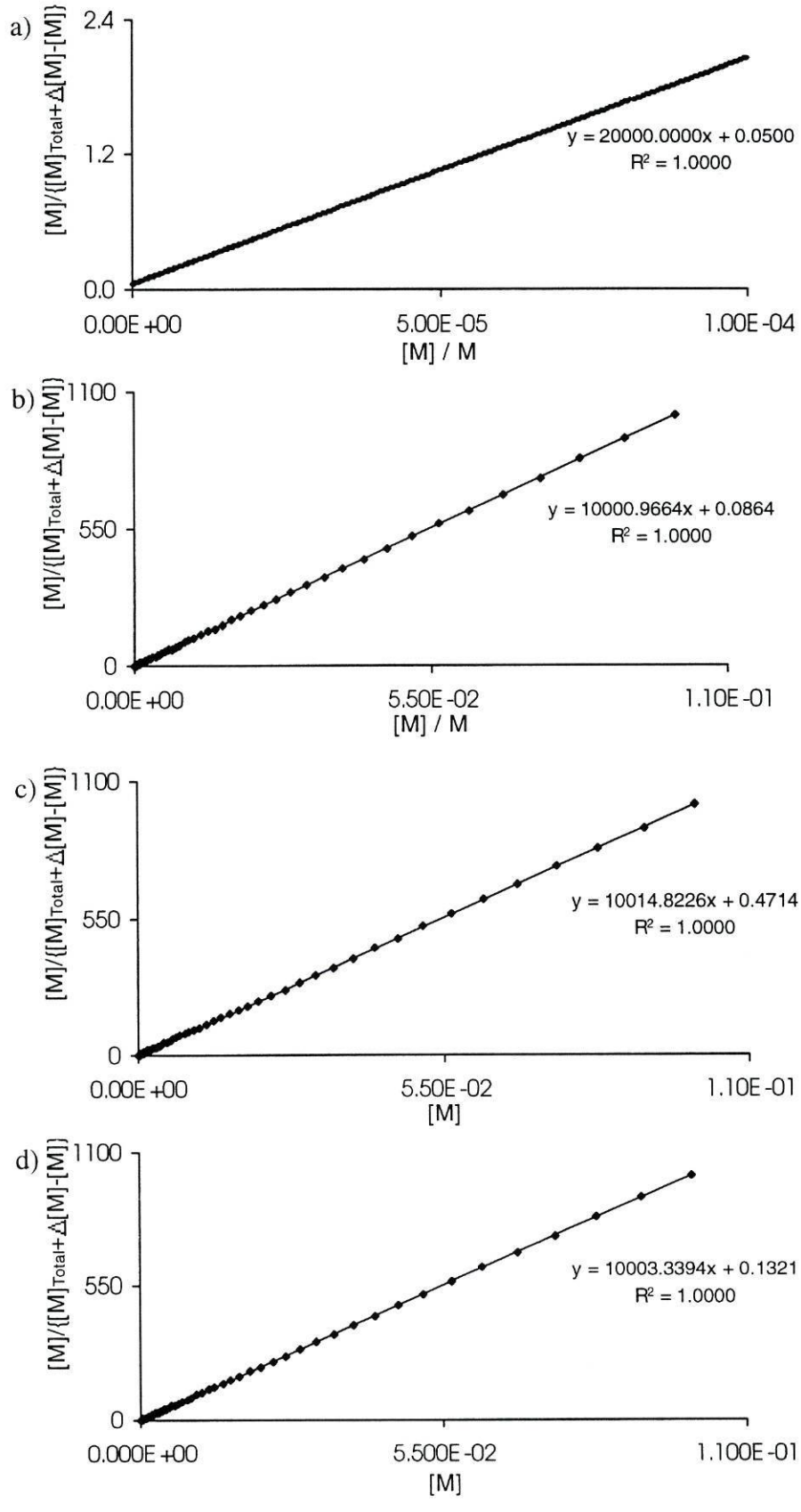


Figura A1.3 – Resultados do método de van den Berg / Ruzic para as titulações potenciométricas simuladas: a) Sim1; b) Sim2; c) Sim3 e d) Sim4.

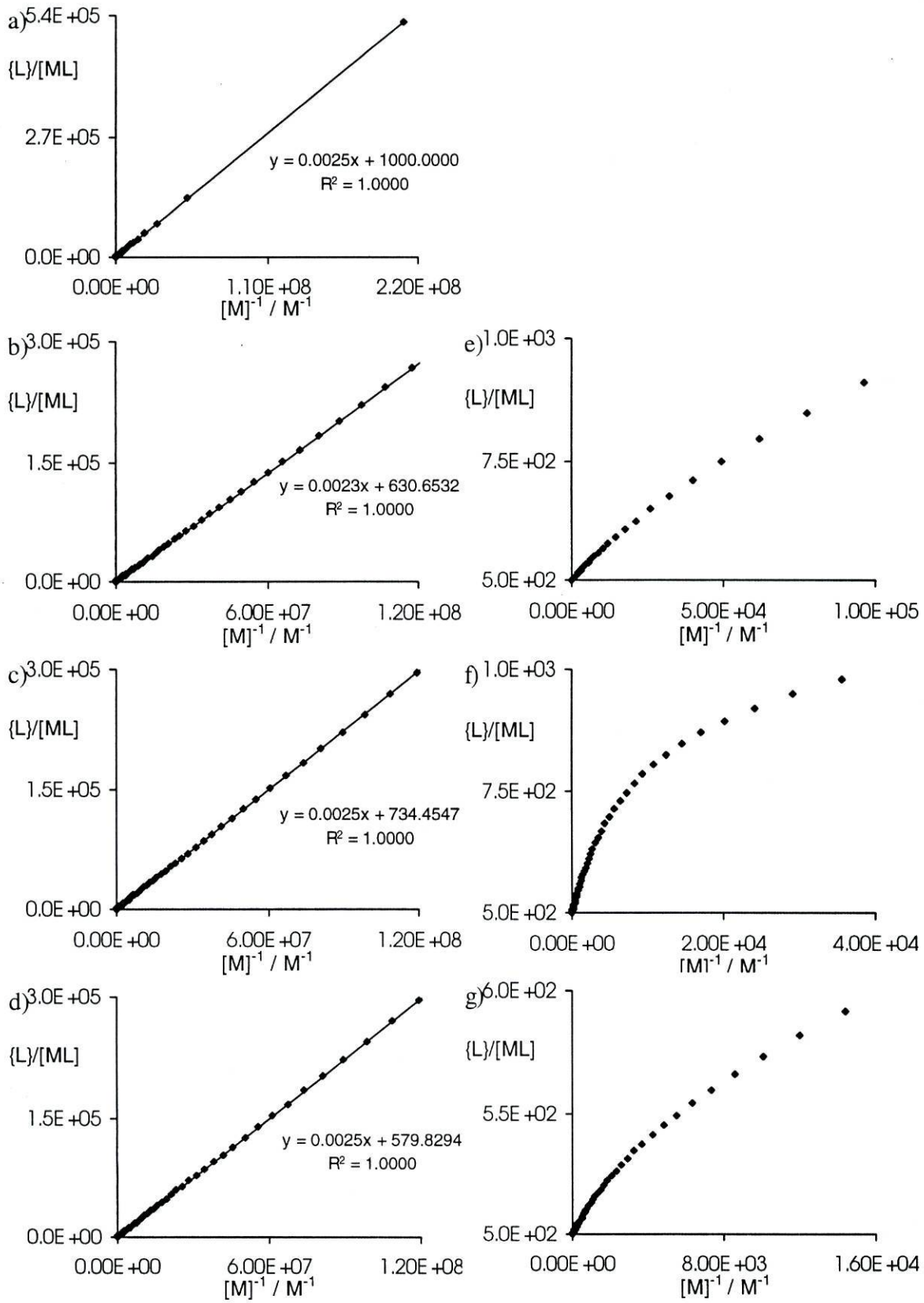


Figura A1.4 – Representações de Buffle para as titulações potenciométricas simuladas: a) Sim1; b) Sim2; c) Sim3 e d) Sim4. Ampliação das representações de Buffle onde se verificaram encurvamentos nos pontos iniciais: e) Sim2; f) Sim3 e g) Sim4.

representações de Scatchard e de van den Berg / Ruzic (Figs. A1.2 e A1.3) produziram uma distribuição regular de pontos no gráfico, enquanto a representação de Buffle (Fig. A1.4) gerou uma distribuição muito irregular dos pontos, em que a maior parte destes se concentra junto ao eixo das ordenadas.

No caso da representação de Buffle, da análise da Fig. A1.4 pode concluir-se que um ajuste por mínimos quadrados dos pontos experimentais a uma recta pode originar erros de cálculo elevados, uma vez que os pontos dos extremos apresentam um peso mais elevado que os valores intermédios. Esta situação é particularmente importante uma vez que os pontos experimentais mais isolados (aqueles que se encontram localizados na parte superior do gráfico) encontram-se afectados por um erro experimental mais elevado que os restantes, quer porque correspondem a concentrações muito baixas de catião metálico livre que por isso estão sujeitas a um maior erro na sua preparação, quer porque sofrem uma resposta mais lenta e imprecisa do eléctrodo selectivo. Por outro lado, detecta-se também um forte encurvamento nas representações de Buffle das simulações Sim2, Sim3 e Sim4 (não correspondem ao modelo correcto utilizado no tratamento dos dados uma vez que possuem mais de um tipo de sítio ligante) para as concentrações mais elevadas de M (Fig. A1.4.e a A1.4.g). Se se atender ao facto desta gama de concentrações ser a mais explorada experimentalmente devido à maior facilidade de detecção de catião metálico a concentrações mais elevadas (maior facilidade de preparação e menor erro na determinação experimental), podem prever-se algumas dificuldades para obter resultados de boa qualidade com a aplicação deste método.

Para Sim1 obtiveram-se representações de Scatchard e de van den Berg/Ruzic (Figs. A1.2.a e A1.3.a) aproximadamente lineares, com uma distribuição homogénea de pontos ao longo das representações. No entanto, na presença de dois ou mais sítios ligantes de características distintas (Sim2, Sim3 e Sim4), as representações de Scatchard sofrem um forte encurvamento (Figs. A1.2.b a A1.2.d) que é mais pronunciado nas simulações onde a diferença entre as constantes de complexação dos sítios ligantes é mais elevada. De facto, a representação de Scatchard correspondente a Sim3 ($K_1 = 4{,}0 \times 10^5$ e $K_2 = 4{,}0 \times 10^3$) apresenta um encurvamento mais nítido que a representação de Scatchard de Sim2 ($K_1 = 4{,}0 \times 10^5$ e $K_2 = 4{,}0 \times 10^4$).

Apesar das representações de Scatchard de Sim2 e Sim3 possuírem encurvamentos, foi possível isolar dois conjuntos de pontos aos quais se ajustaram rectas que permitiram estimar parâmetros de equilíbrio para cada sítio ligante (Tabela

A1.2). No caso de Sim4, onde a simulação foi construída com base em dez constantes de complexação bastante próximas entre si, embora esta representação possua um encurvamento muito mais ténue que as representações de Scatchard de Sim2 e Sim3, não foi possível isolar nenhum grupo de pontos que permitisse efectuar estas estimativas.

Uma analise rápida da Tabela A1.2 permite verificar os três métodos efectuaram estimativas perfeitas dos parâmetros de equilíbrio utilizados em Sim1 (que contém apenas um sítio ligante), tendo-se obtido percentagens de erro nulas. Pelo contrário, na presença de dois ou mais sítios ligantes distintos (Sim2, Sim3 e Sim4) os erros envolvidos na determinação dos parâmetros de equilíbrio foram bastante superiores aos erros obtidos em Sim1. Assim, da análise da Tabela A1.2 conclui-se que o método de Scatchard aplicado a Sim2 e Sim3 permitiu efectuar um cálculo razoável dos valores de Log K, tendo conduzido a constantes de equilíbrio com uma percentagem reduzida de erro. Por outro lado, as estimativas de $[L_n]$ foram fracas, uma vez que os erros envolvidos na sua determinação foram elevados em alguns dos casos. Em Sim4, o encurvamento global da representação provocado pela presença de dez sítios ligantes diferentes não permitiu ajustar qualquer recta e estimar parâmetros de equilíbrio.

Os métodos de van den berg / Ruzic e de Buffle permitiram estimar valores médios de Log K e o valor da soma de $[L_n]$, uma vez que as suas representações se ajustaram a uma recta mesmo na presença de vários sítios ligantes diferentes (no método de Buffle apenas para as concentrações menos elevadas de M).

Comparando entre si o desempenho destes dois métodos, verifica-se que o método de van den Berg / Ruzic permitiu efectuar estimativas destes parâmetros com percentagens de erro bastante inferiores aos erros cometidos com o método de Buffle. Mesmo em Sim4, aparentemente o caso mais complicado dos quatro em estudo, o método de van den Berg / Ruzic permitiu estimar sem qualquer erro a soma das concentrações dos sítios ligantes, e o valor médio de Log K com um erro diminuto.

É de salientar que estes três modelos foram desenvolvidos para um modelo de complexação 1:1. Qualquer desvio a este modelo poderá introduzir erros não previstos na estimativa de parâmetros de equilíbrio de complexação, pelo que as determinações efectuadas nessas condições não terão qualquer significado químico.

Tabela A1.2 – Análise de quatro simulações de experiências potenciométricas de complexação metal-ligando: parâmetros de equilíbrio calculados por três métodos distintos e os respectivos erros cometidos na sua determinação.

Método	Log K		$[L_n]$ / M [c]	
	Valor calculado	% erro [a]	Valor calculado	% erro [b]
Sim1				
Scatchard	5,60	0	$5{,}00 \times 10^{-5}$	0
van den Berg / Ruzic	5,60	0	$5{,}00 \times 10^{-5}$	0
Buffle	5,60	0	$5{,}00 \times 10^{-5}$	0
Sim2				
Scatchard	$\log K_1 = 5{,}55$	0,93	$[L_1] = 6{,}19 \times 10^{-5}$	23,80
	$\log K_2 = 4{,}89$	6,26	$[L_2] = 1{,}00 \times 10^{-4}$	100,0
van den Berg / Ruzic	5,06	0,82	$1{,}00 \times 10^{-4}$	0,0
Buffle	5,41	6,04	$7{,}93 \times 10^{-5}$	20,7
Sim3				
Scatchard	$\log K_1 = 5{,}59$	0,22	$[L_1] = 1{,}24 \times 10^{-4}$	148,0
	$\log K_2 = 3{,}95$	9,66	$[L_2] = 2{,}78 \times 10^{-3}$	5460
van den Berg / Ruzic	4,33	5,91	$9{,}99 \times 10^{-5}$	0,1
Buffle	5,47	18,86	$6{,}81 \times 10^{-5}$	31,9
Sim4				
Scatchard	--	--	--	--
van den Berg / Ruzic	4,88	4,43	$1{,}00 \times 10^{-4}$	0,0
Buffle	5,37	5,17	$8{,}62 \times 10^{-5}$	13,8

a – No caso dos métodos de van den Berg / Ruzic e de Buffle, este foi calculado relativamente a um valor médio de Log K_n utilizado na construção das simulações;

b – No caso dos métodos de van den Berg / Ruzic e de Buffle, este foi calculado relativamente à soma dos valores de $[L_n]$ utilizados na construção das simulações.

c – No caso dos métodos de Scatchard e de Buffle, uma vez determinados os valores de MM_L calculou-se $[L]_{Total}$ com base na eq. 2.42.

APÊNDICE 2 – MÉTODO DAS TRANSFORMADAS DE LAPLACE

O método das transformadas de Laplace foi utilizado no estudo da cinética de descomplexação de catiões metálicos dos AF. Com este Apêndice pretendeu-se demonstrar a metodologia utilizada na sua aplicação, recorrendo a uma simulação simples.

A2.1 – CÁLCULO DE C(t)

Simulou-se uma experiência de descomplexação de um catião metálico de um sistema de dois componentes (um deles correspondendo a uma reacção relativamente rápida e o outro a uma reacção mais lenta), com as características a seguir indicadas:

$k_1 = 0{,}1\ s^{-1}$; $k_2 = 0{,}01\ s^{-1}$; $C_1(0) = 8$; $C_2(0) = 2$,

em que k_1 e k_2 correspondem às velocidades específicas do sítio ligante 1 e 2, respectivamente, e $C_1(0)$ e $C_2(0)$ às concentrações arbitrárias de cada sítio ligante.

De acordo com a eq. 2.71, a função C(t) para este sistema vem:

$$C(t) = 8e^{-0,1t} + 2e^{-0,01t} \qquad (A2.1)$$

onde C(t) representa a concentração dos complexos [Catião metálico – sítio ligante].

Esta equação permitiu simular valores da diminuição da concentração total dos complexos após uma hipotética adição de quelante muito forte (indicador metalocrómico), tal como se encontra representado na Fig. A2.1.a.

Experimentalmente, o valor de C(t) não é obtido directamente através de quaisquer medições, mas sim de uma forma indirecta a partir de leituras do aumento da absorvância do complexo que se vai formando entre o indicador metalocrómico (PAR) e o catião metálico. Neste caso, o primeiro procedimento a realizar será a representação dos pares de valores tempo e absorvância (t, Abs) ao máximo da banda de absorção do complexo. Usando uma curva de calibração determinada por medições de absorvância

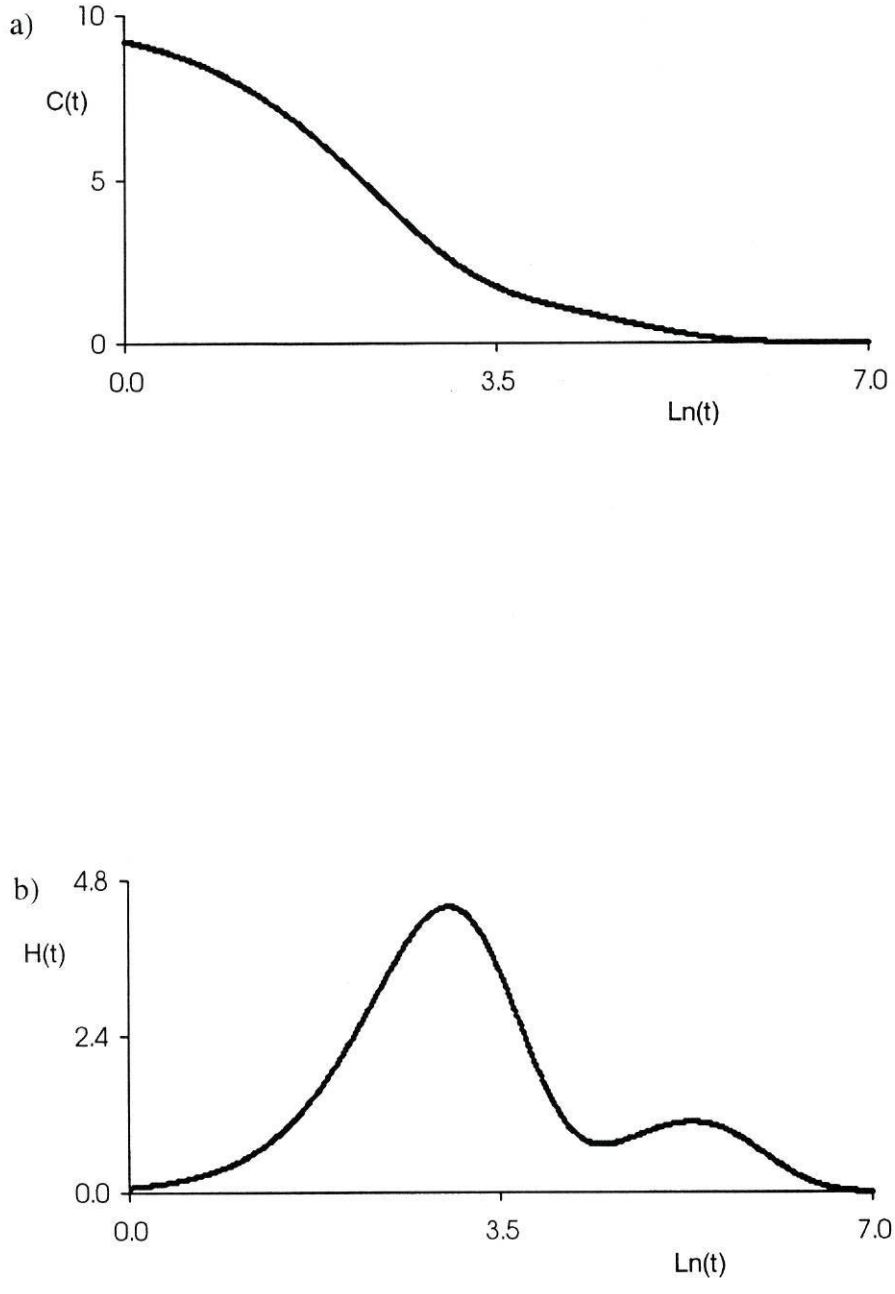


Figura A2.1 – Representação de a) C(t) = f [Ln(t)] para intervalos constantes de Ln(t), e b) H(t) = f [Ln(t)].

de soluções contendo misturas de catião metálico com concentração conhecida e excesso de indicador metalocrómico, pode determinar-se a absortividade molar, ε, do complexo [Catião metálico – Par] e calcular-se a concentração dos complexos [Catião metálico – AF_i] que decresce no decorrer da experiência, através da seguinte expressão:

$$C(t) = \frac{Abs(t_\infty) - Abs(t)}{\varepsilon} \qquad (A2.2)$$

onde AF_i representa as diferentes classes de sítios ligantes dos AF, $Abs(t_\infty)$ a absorvância a tempo infinito e Abs(t) a absorvância no instante de tempo t.

Depois de obtidas as representações de C(t), pode prosseguir-se para a fase de extracção de informação sobre a cinética de descomplexação. Neste caso, utilizou-se o método das transformadas de Laplace por ser um método de modelação banda e não impor nenhum modelo rígido aos dados experimentais. Dadas as características dos AF, este tipo de aproximação é particularmente atraente.

A2.2 – MÉTODO DAS TRANSFORMADAS DE LAPLACE

A2.2.1 – Cálculo das derivadas

Após o cálculo de C(t), a função H(t) [1-3] é determinada através do cálculo da primeira e segunda derivadas de C(t), uma vez que

$$H(t) = \frac{\Delta^2 C(t)}{\Delta(\ln t)^2} - \frac{\Delta C(t)}{\Delta(\ln t)} \qquad (A2.3)$$

Na Fig. A2.1.b apresenta-se a função H(t) obtida para esta simulação. A análise deste tipo de representações permite detectar a presença de diversas bandas, correspondendo cada uma delas a uma classe de sítios ligantes com velocidades de descomplexação diferentes. Os valores de tempo correspondentes ao máximo dessas bandas permitem efectuar o cálculo das velocidades de descomplexação de cada sítio ligante ($k = 2/t$), enquanto a área de cada banda permite obter uma estimativa da sua concentração [1-3].

A representação de H(t) em função de Ln(t) (Fig. A2.1.b) originou um gráfico contendo duas bandas com máximos a 3,02 e 5,31. Estes valores, depois de convertidos, originaram velocidades específicas de 0,098 s^{-1} para k_1 e 0,0099 s^{-1} para k_2. Comparando estes valores com aqueles que serviram de base à simulação, 0,1 para k_1 e 0,01 para k_2, pode verificar-se que existe uma boa concordância entre eles. Por outro lado, a área de cada uma das bandas permitiu estimar a concentração dos sítios ligantes como sendo 6,57 para $C_1(0)$ e 0,69 para $C_2(0)$. Estes valores encontram-se relativamente próximos dos parâmetros utilizados na construção da simulação, 8 e 2, respectivamente, verificando-se no entanto que a estimativa de $C_2(0)$ é de qualidade inferior à de $C_1(0)$, o que se pode dever à menor contribuição do sítio ligante 2 para a complexação global. Estes resultados mostram que o método utilizado permite obter estimativas razoáveis de velocidades específicas, mas apenas aproximações grosseiras das concentrações dos sítios ligantes.

A Fig. A2.1.b só apresenta a forma esperada (com a presença de duas bandas bem definidas, que permitiram a estimativa de velocidades específicas e concentrações de sítios ligantes) porque a função C(t) utilizada no seu cálculo foi simulada para valores constantes de Ln(t) [4] e na ausência de qualquer ruído. Se estas condições não forem satisfeitas, e experimentalmente nunca o são uma vez que existe sempre ruído experimental, é necessário efectuar um pré-processamento dos dados.

A2.2.2 – Pré-processamento dos dados

A primeira fase da implementação do método das transformadas de Laplace consiste num procedimento de suavização ("smooth") dos dados experimentais. Este tipo de pré-processamento é necessário pelo facto deste método envolver o cálculo de derivadas (primeira e segunda derivadas, e a sua subtracção) que são muito sensíveis à presença de ruído experimental. Desta forma, utilizou-se neste trabalho o seguinte procedimento geral:

(i) Representação de Ln(Abs) = f [Ln(t)];

(ii) Ajuste das representações anteriores a funções polinomiais;

(iii) Reprodução da função corrigida Ln(Abs) = f [Ln(t)] através do polinómio calculado para intervalos constantes de Ln(t);

(iv) Representação dos pares de valores C(t) = f [Ln(t)].

Após a realização dos procedimentos referidos anteriormente, obtêm-se curvas suavizadas de C(t) = f [Ln(t)] que estão prontas para a aplicação de derivadas.

A2.2.3 – Ajuste polinomial

A realização de ajustes polinomiais sobre os dados experimentais é uma das fases críticas do pré-processamento dos dados que precede a aplicação do método das transformadas de Laplace. De facto, se as funções polinomiais forem construídas de uma forma arbitraria, os resultados obtidos no cálculo da função H(t) serão aleatórios. Na situação em análise não é necessário efectuar qualquer correcção dos valores de absorvância, uma vez que não se introduziu ruído experimental na simulação. Assim, a representação de C(t) = f [Ln(t)] para intervalos constantes de Ln(t) [4] (uma condição essencial para todo o processo de cálculo) origina um gráfico semelhante ao representado na Fig. A2.1.a, onde se pode detectar um decréscimo da concentração de catião metálico complexado com o aumento do tempo de reacção.

O ajuste polinomial a efectuar sobre os espectros experimentais deve reproduzir ao máximo a informação válida contida nestes, e ao mesmo tempo eliminar a maior quantidade possível de ruído. Alguns testes efectuados sobre os dados experimentais mostraram que esse ajuste apresenta uma melhor qualidade (avaliada pelo coeficiente de correlação) com a utilização de polinómios de 6ª ordem. No entanto, se existirem sítios ligantes que apresentem contribuições menos significativas para a complexação global, a utilização de apenas uma função polinomial poderá mascarar essas contribuições, perdendo-se parte da informação contida nos dados experimentais. Desta forma, a aplicação de diferentes funções polinomiais a secções de dados distintas poderá conduzir a uma melhor reprodução dos dados originais, uma vez que permitirá isolar parte das variações associadas a cada sítio ligante.

Utilização de uma função. Para se avaliar da existência de eventuais alterações das estimativas efectuadas após a aplicação de um ajuste polinomial, refez-se todo o processo de cálculo com base na função C(t) determinada (representada na Fig. A2.1.a), incluindo a determinação daqueles que seriam os valores experimentais de absorvância. Na Fig. A2.2.a exemplifica-se a forma como se efectuou o ajuste polinomial da função Ln(Abs) = f [Ln(t)]. Os valores de absorvância determinados com base na eq. A2.2 foram utilizados posteriormente na construção de uma outra função Ln(Abs) = f [Ln(t)].

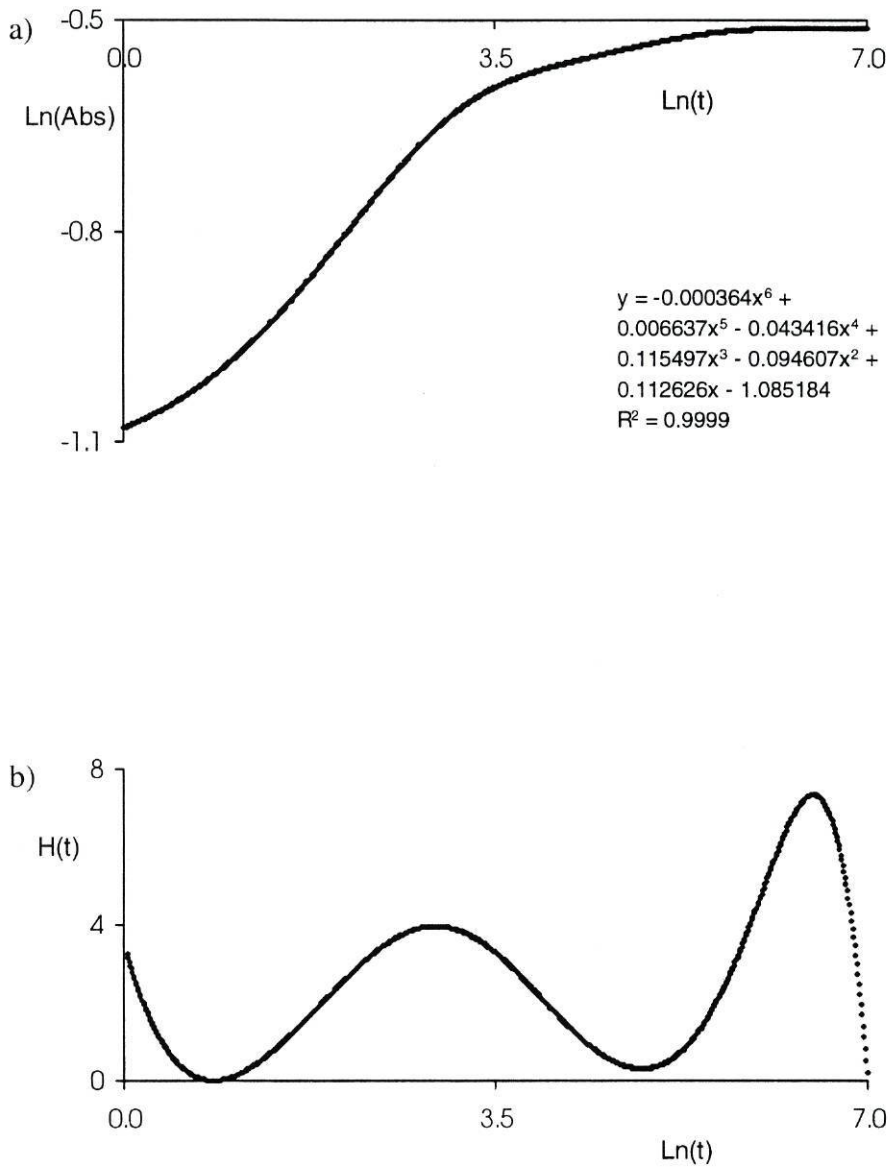


Figura A2.2 – Avaliação da utilização de apenas uma função polinomial na determinação de valores de absorvância corrigida: a) determinação da função Ln(Abs) = f [Ln(t)]; b) representação da função H(t) = f [Ln(t)]. Na Fig. A2.2.a apresenta-se a equação da função polinomial utilizada.

A função H(t) (Fig. A2.2.b) permitiu a determinação de velocidades específicas de descomplexação (Tabela A2.1), tendo-se obtido 0,11 s^{-1} para k_1 e 0,0030 s^{-1} para k_2. Uma comparação destes valores com os parâmetros utilizados na construção da simulação (Tabela A2.1) permite verificar que o valor de k_1 calculado é superior ao valor verdadeiro (0,1 s^{-1}), enquanto o valor de k_2 é inferior ao valor utilizado na construção da simulação (0,01 s^{-1}). Quando se analisam os valores das concentrações dos sítios ligantes, 7,88 para $C_1(0)$ e 7,13 para $C_2(0)$, verifica-se que se obteve um valor de $C_1(0)$ muito próximo do valor verdadeiro (erro de 1,5 %), e uma estimativa de $C_2(0)$ afectada de um elevado erro (cerca de 256 %). Assim, pode concluir-se que a utilização de apenas uma função polinomial não permitiu estimar convenientemente a concentração do sítio ligante $C_2(0)$. Este facto deve-se a uma menor contribuição deste sítio ligante para a reacção global de descomplexação (baixo valor de k_2 quando comparado com k_1).

Utilização de duas funções. A função C(t) simulada foi construída atendendo à presença de dois componentes, o que foi confirmado pela presença de duas bandas na função H(t) representada na Fig. A2.2.b. Desta forma, detectando-se em H(t) a presença de duas ou mais bandas, podem efectuar-se ajustes polinomiais parcelares da função Ln(Abs). Assim, seleccionando-se os intervalos de Ln(t) onde se localizam essas bandas, podem efectuar-se ajustes polinomiais separados em cada um desses intervalos (Fig. A2.3.a). Neste caso particular, efectuou-se um novo ajuste com duas funções polinomiais, o que permitiu a construção da função H(t) representada na Fig. A2.3.b. A determinação dos máximos de H(t) e a área de cada uma das bandas permitiu estimar os valores de k_i e de $C_i(0)$ apresentados na Tabela A2.1.

O ajuste efectuado conduziu a valores de k_1 e k_2 afectados de erros de determinação menores que os resultados obtidos com a utilização de uma única função (Tabela A2.1). Este facto foi particularmente evidente na determinação do valor de k_2, que foi calculado sem qualquer erro. Relativamente ao valor da concentração dos sítios ligantes, enquanto o valor de $C_1(0)$ obtido é da mesma ordem de grandeza da estimativa efectuada com uma única função polinomial, $C_2(0)$ foi estimado com um erro cerca de quatro vezes inferior.

Na Fig. A2.4 apresenta-se uma sobreposição das funções H(t) originadas por ajustes polinomiais de uma e duas funções. Da análise desta figura verifica-se que as bandas correspondentes a menores tempos de descomplexação (velocidades específicas

Tabela A2.1 – Velocidades específicas de descomplexação e concentrações de sítios ligantes determinados sobre dados corrigidos.

	Valor verdadeiro [a]	**Utilização de um polinómio na construção da função corrigida**		**Utilização de dois polinómios na construção da função corrigida**	
		Valor obtido [a]	% erro	Valor obtido [a]	% erro
$\mathbf{k_1}$	0,100	0,106	6,0	0,092	8,0
$\mathbf{C_1(0)}$	8	7,88	1,5	7,56	5,50
$\mathbf{k_2}$	0,010	0,003	70,0	0,010	0,0
$\mathbf{C_2(0)}$	2	7,13	256,5	0,79	60,5

a – Valores expressos em s^{-1}.

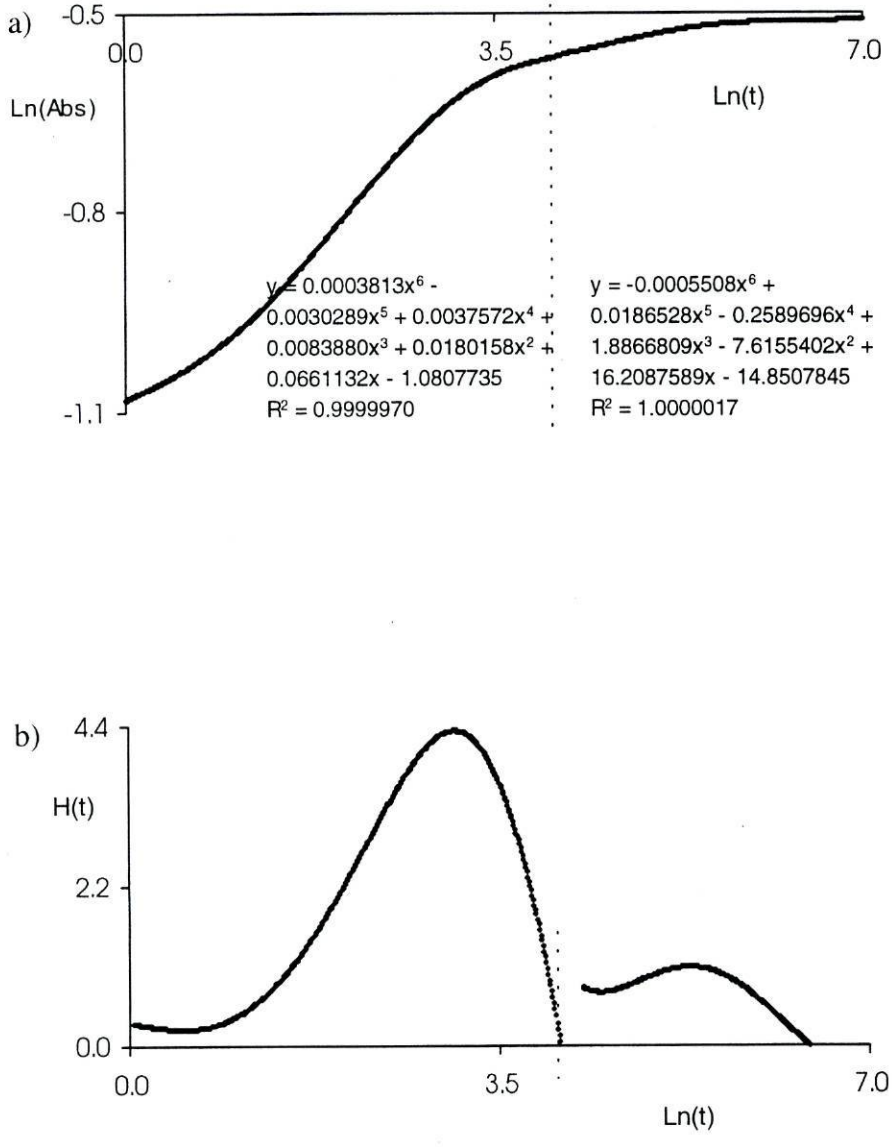


Figura A2.3 – Avaliação da utilização de duas funções polinomiais na determinação de valores de absorvância corrigida: a) determinação da função Ln(Abs) = f [Ln(t)]; b) representação da função H(t) = f [Ln(t)]. A linha a tracejado delimita a separação entre duas funções polinomiais distintas. Na Fig. A2.3.a apresentam-se as equações das duas funções polinomiais utilizadas.

superiores) apresentam uma área das bandas semelhante e os seus máximos quase sobrepostos, enquanto as bandas localizadas a tempos de descomplexação superiores exibem áreas de banda bastante diferentes e uma grande diferença entre os seus máximos. Este facto sugere que as determinações de parâmetros cinéticos dos sítios ligantes que menos contribuem para a reacção global de descomplexação são mais difíceis de efectuar.

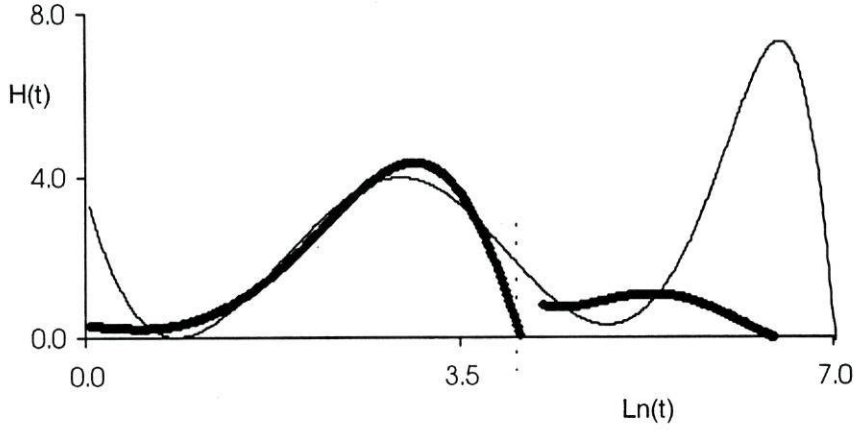


Figura A2.4 – Sobreposição das funções H(t) apresentadas nas Figs. A2.2.b (—) e A2.3.b (—).

A2.3 – BIBLIOGRAFIA

[1] M. S. Shuman, B. J. Collins, P. J. Fitzgerald e D. L. Olson, *Distribution of Stability Constants and Dissociation Rate Constants among Binding Sites on Estuarine Copper-Organic Complexes: Rotated Disk Electrode Studies and an Affinity Spectrum Analysis of Ion-Selective Electrode and Photometric Data*, R. F. Chtistman e E. T. Gjessing (Eds.), em Aquatic and Terrestrial Humic Materials, Ann Harbour Science, Michigan, 1983, Cap. 17.

[2] D. L. Olson e M. S. Shuman, *Anal. Chem.*, 1983, **55**, 1103-1107.

[3] C. H. Langford e D. W. Gutzman, *Anal. Chim. Acta*, 1992, **256**, 183-201.

[4] S. E. Cabaniss, *Environ. Sci. Technol.*, 1990, **24**, 583-588.

APÊNDICE 3 – PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS EFECTUADAS NO ÂMBITO DO TRABALHO DE DOUTORAMENTO

A3.1 – ARTIGOS

1 - PARAFAC DECOMPOSITION OF THREE-WAY KINETIC-SPECTROPHOTOMETRIC SPECTRAL MATRICES CORRESPONDING TO MIXTURES OF HEAVY METAL IONS

J. C. Esteves da Silva e **César J. S. Oliveira**, *Talanta*, 1999, **49**, 889-897.

2 - CARACTERIZAÇÃO COMPARATIVA DE ÁCIDOS FÚLVICOS EXTRAÍDOS DE UM SOLO E DE MATERIAIS COMPOSTADOS

J. C. Esteves da Silva e **César J. S. Oliveira**

Actas da 6ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente, Centro de Congressos da AIP, Lisboa, 1999, 3º Vol., 433-437.

3 - INTERACTION OF FULVIC ACIDS EXTRACTED FROM COMPOSTED WASTES WITH ORGANIC SUBSTANCES

J. C. Esteves da Silva, Miguel C. P. O. Marques e **César J. S. Oliveira**

Proceedings of the 10th International Meeting of the International Humic Substances Society, Toulouse (França), 2000, Vol. 1, 345-347.

A3.2 – RESUMOS DE COMUNICAÇÕES

1 - MODELOS PARA O TRATAMENTO DE PERFIS DE EXTINÇÃO PROVOCADOS PELA COMPLEXAÇÃO DE Cu(II) POR AMINOÁCIDOS E PROTEÍNAS FLUORESCENTES

J. C. Esteves da Silva, A. A. Machado e **César J. S. Oliveira**

Livro de Resumos do XI Encontro Galego-Português de Química, Ferrol (Espanha), 1997, pág. 4.08.

2 - MONITORING THE EFFECT OF THE pH AND CONCENTRATION ON THE EXTENT OF COMPLEX FORMATION BETWEEN Cu(II) AND FULVIC ACIDS BY FLUORESCENCE STATIC QUENCHING

J. C. Esteves da Silva, A. A. Machado e **César J. S. Oliveira**

Livro de Resumos do 3° Encontro Nacional de Química-Física da Sociedade Portuguesa de Química, Monte da Caparica, 1997, pág. P5.

3 - SPECIATION OF Cu(II) IN THE PRESENCE OF NATURAL AND ANTHROPOGENIC FULVIC ACIDS MEASURED BY Cu(II) ISE

J. C. Esteves da Silva e **César J. S. Oliveira**

Book of Abstracts, 7th European Conference on ElectroAnalysis, ESEAC'98, Coimbra, 1998, pág. P120.

4 - PARAFAC DECOMPOSITION OF THREE-WAY KINETIC-SPECTROPHOTOMETRIC SPECTRAL MATRICES CORRESPONDING TO MIXTURES OF METAL IONS

J. C. Esteves da Silva e **César J. S. Oliveira**

Book of Abstracts, IV COLLOQUIUM CHIMIOMETRICUM MEDITERRANEUM, Burgos (Espanha), 1998, pág. COM6-3.

5 - CARACTERIZAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DE MASSAS MOLECULARES DE AMOSTRAS DE ÁCIDOS FÚLVICOS

J. C. Esteves da Silva e **César J. S. Oliveira**

Livro de Resumos do XVI Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química, Guimarães, 1998, pág. P60.

6 - MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE ATRAZINA E DOS SEUS METABOLITOS BASEADO EM ESPECTROS DE UV E TÉCNICAS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

J. C. Esteves da Silva e **César J. S. Oliveira**

Livro de Resumos do XII Encontro Luso Galego de Química, Sociedade Portuguesa de Química, Porto, 1998, pág. 6.04.

7 - CARACTERIZAÇÃO COMPARATIVA DE ÁCIDOS FÚLVICOS EXTRAÍDOS DE UM SOLO E DE MATERIAIS COMPOSTADOS

J. C. Esteves da Silva e **César J. S. Oliveira**

6ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente, Centro de Congressos da AIP, Lisboa, 1999.

8 - ESTUDO DA INTERACÇÃO DA ATRAZINA COM ÁCIDOS FÚLVICOS

J. C. Esteves da Silva e **César J. S. Oliveira**

Livro de Resumos do Encontro SPQ-ANALÍTICA'99, Sociedade Portuguesa de Química, Coimbra, 1999, pág. P-10.

9 - PARÂMETROS CINÉTICOS DA INTERACÇÃO ENTRE ÁCIDOS FÚLVICOS NATURAIS E ANTROPOGÉNICOS E OS CATIÕES Cu(II) E Ni(II)

J. C. Esteves da Silva e **César J. S. Oliveira**

Livro de Resumos do XVII Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química, Lisboa, 2000, pág. 66.

10 - INTERACTION OF FULVIC ACIDS EXTRACTED FROM COMPOSTED WASTES WITH ORGANIC SUBSTANCES

J. C. Esteves da Silva, Miguel C. P. O. Marques e **César J. S. Oliveira**

10th International Meeting of the International Humic Substances Society, Toulouse (França), 2000.

11- CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDOS FÚLVICOS EXTRAÍDOS DE LAMAS DE ETAR E DE RESÍDUOS ANIMAIS COMPOSTADOS

J. C. Esteves da Silva e **César J. S. Oliveira**

Submetido ao XIV Encontro Luso Galego de Química, Sociedade Portuguesa de Química, Braga, 22 a 24 de Novembro.

APÊNDICE 4 – ÍNDICE DE TABELAS E DE FIGURAS

A4.1 – ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 – Características elementares dos AF e AH e quantidades típicas de grupos funcionais. 3

Tabela 1.2 – Comparação do desempenho dos processos aeróbios e anaeróbios no tratamento de resíduos orgânicos. 6

Tabela 3.1 – Origem e materiais de base das amostras de AF estudadas. 56

Tabela 3.2 – Parâmetros experimentais utilizados nos espectros síncronos de fluorescência. 58

Tabela 3.3 – Características dos espectros de UV-Vis adquiridos ao longo do tempo. 59

Tabela 4.1 – Análises elementares, razões atómicas e fórmulas empíricas das amostras de AF estudadas. 72

Tabela 4.2 – Percentagem de carbono das amostras em estudo determinado a partir de espectros de RMN de ^{13}C. 75

Tabela 4.3 – Razão E_4/E_6, peso molecular e grau de aromaticidade das amostras de AF. 76

Tabela 4.4 – Principais bandas dos espectros de IV das amostras de AF. Interpretação dos espectros de IV de acordo com a literatura. 79

Tabela 4.5 – Localização das bandas principais dos espectros de fluorescência síncrona. 82

Tabela 4.6 – Concentração dos grupos ácidos titulados directamente (Neq) e concentrações dos grupos correspondentes aos sistemas ácido-base presentes em cada amostra de AF (C_i). 85

Tabela 4.7 – Comparação de valores de CMC a 25 °C determinados por condutimetria para alguns surfactantes com outros valores retirados da literatura. 88

Tabela 4.8 – Concentração dos grupos ácidos (mmol/g) das amostras AFS, AFLau, AFLC e AFRAC. Valores obtidos por titulação das amostras de AF com soluções de LiOH, NaOH e KOH. 95

Tabela 4.9 – Concentração de sítios ligantes (mmol/g) determinados por potenciometria para as amostras AFS, AFLau, AFLC e AFRAC. 99

Tabela 4.10 – Parâmetros de equilíbrio obtidos por fluorescência molecular para a complexação de catiões com amostras de AF. 101

Tabela 4.11 – Legenda dos códigos utilizados na construção dos dendogramas da Fig. 4.18. 114

Tabela 4.12 – Resultados da análise da aglomeração dos espectros de UV-Vis das amostras de AF, ligandos modelo dos AF, aminoácidos e amostras de pré-fúlvicos. 118

Tabela 4.13a – Particularidades das amostras de AF antropogénicos: características elementares e informações espectroscópicas. 123

Tabela 4.13b – Particularidades das amostras de AF antropogénicos: propriedades dos grupos envolvidos em reacções de ácido-base. 124

Tabela 4.13c – Particularidades das amostras de AF antropogénicos: propriedades dos grupos envolvidos em reacções de complexação. 124

Tabela 4.13d – Particularidades das amostras de AF antropogénicos: distribuição de massas moleculares. 124

Tabela 5.1 – Resultados obtidos nas titulações dos catiões metálicos Cu(II), Pb(II) e Cd(II) na presença das amostras AFS e AFLau a pH 6,0. 137

Tabela 5.2 – Resultados obtidos nas titulações dos catiões metálicos Cu(II), Pb(II) e Cd(II) na presença das amostras AFLC e AFRAC. 144

Tabela 5.3 – Resultados obtidos nas titulações dos catiões metálicos Cu(II), Pb(II) e Cd(II) na presença das amostras AFMSLC(0), AFMSLC(6), AFMSRAC(0) e AFMSRAC(0). 149

Tabela 5.4 – Valores típicos das funções de erro do SIMPLISMA para as experiências com AF e catião Cu(II). 157

Tabela 5.5 – Posição (nm) das principais bandas de fluorescência síncrona dos componentes detectados nas experiências com AFS, AFLC e AFRAC. 159

Tabela 5.6.a – Resumo dos resultados obtidos para a amostra AFS. 169

Tabela 5.6.b – Resumo dos resultados obtidos para a amostra AFLC. 170

Tabela 5.6.c – Resumo dos resultados obtidos para a amostra AFRAC. 171

Tabela 5.7 – Comparação entre os parâmetros de complexação determinados por potenciometria e fluorescência do catião Cu(II) com amostras de AF de concentração 25 mg L^{-1} a pH 6,0. 175

Tabela 5.8 – Máximos das bandas das misturas de PAR com catiões metálicos. 180

Tabela 5.9 – Resultados de regressão linear típicos obtidos entre os valores previstos pelo método (unidades arbitrárias) e as concentrações reais (μM) dos catiões metálicos. 181

Tabela 5.10 – Concentrações de grupos ligantes e velocidades específicas de descomplexação dos catiões Ni(II) e Cu(II) de amostras de AF. 195

Tabela 6.1 – Conjunto de soluções em tampão fosfato com pH 6,865 utilizadas na determinação simultânea da AT, DeAT, DpAT e HidAT. 202

Tabela 6.2 – Exemplo típico da construção de uma recta de calibração para a determinação de AT em clorofórmio. 204

Tabela 6.3 – Máximos (nm) das soluções aquosas de AT e metabolitos preparadas em tampão fosfato com pH 6,865. 205

Tabela 6.4 – Avaliação da qualidade dos modelos de calibração: (i) modelo com quatro constituintes; (ii) modelo com três constituintes. 207

Tabela 6.5 – Previsões efectuadas com o modelo de quatro constituintes. 208

Tabela 6.6 – Previsões efectuadas com o modelo de três constituintes. 209

Tabela 6.7 – Comparação das previsões efectuadas pelos modelos (valores de erro médio quadrático, EMQ). 210

Tabela 6.8 – Solubilidade da AT (mg/L) em soluções aquosas de sais inorgânicos, a 25 °C. 213

Tabela 6.9 – Resultados de ANOVA para o estudo do efeito da concentração dos sais inorgânicos na solubilidade da AT em solução aquosa, a 25 °C. 215

Tabela 6.10 – Resultados de ANOVA para o estudo do efeito do tipo de sal na solubilidade da AT em solução aquosa, a 25 °C. 217

Tabela 6.11 – Solubilidade (mg/L) e valores de K_{doc} (L kg^{-1}) da AT em soluções aquosas de AF. 218

Tabela 6.12 – Valores de *F* obtidos por análise da variância (ANOVA) do efeito da concentração de AF na solubilidade em solução aquosa da AT. 220

Tabela 6.13 – Valores de *F* obtidos por análise da variância (ANOVA) do efeito do tipo de AF na solubilidade em solução aquosa da AT. 220

Tabela 6.14 – Valores de K_{doc} da AT, pireno e pentaclorofenol em soluções de AF. 222

Tabela 6.15 – Constantes de partição entre a AT e SH de solos "podzolic" determinadas por técnicas de ultrafiltração. 222

Tabela A1.1 – Parâmetros utilizados na simulação de quatro experiências potenciométricas de complexação metal-ligando. 234

Tabela A1.2 – Análise de quatro simulações de experiências potenciométricas de complexação metal-ligando: parâmetros de equilíbrio calculados por três métodos distintos e os respectivos erros cometidos na sua determinação. 242

Tabela A2.1 – Velocidades específicas de descomplexação e concentrações de sítios ligantes determinados sobre dados corrigidos 250

A4.2 – ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Estrutura da AT e reacções de formação de três dos seus metabolitos. 10

Figura 2.1 – Representação esquemática de uma micela. 15

Figura 2.2 – Estruturas de alguns surfactantes: a) Triton; b) SDS; c) CPC; e d) CPB. 17

Figura 2.3 – Ilustração esquemática da variação de algumas propriedades (condutividade, κ; turbidância, τ; pressão osmótica, π; e condutividade molar, Λ) com a concentração de surfactante. 18

Figura 2.4 – Esquema de uma coluna de SEC. 21

Figura 2.5 – Processo de decomposição dos MQP (ver no texto a definição das matrizes e coeficientes). 47

Figura 3.1 – Esquema do sistema de HP-SEC utilizado. 61

Figura 3.2 – Exemplos típicos de calibrações do eléctrodo sensível a Cu(II) em duas matrizes distintas: a) solução em electrólito inerte de KNO_3 0,1 M; b) solução de AFLau 25 mg/L. Na Fig. 3.2.b representa-se a recta através da qual se efectuou a calibração do eléctrodo, que foi ajustada aos últimos pontos da experiência. 64

Figura 4.1 – Espectros de RMN de ^{13}C das amostras de AF naturais e antropogénicos: a) AFS, b) AFLau, c) AFLC e d) AFRAC. 74

Figura 4.2 – Espectro de UV-Vis típico de soluções aquosas de AF. 76

Figura 4.3 – Espectros de IV das amostras: a) AFS; b) AFLau; c) AFLC; d) AFRAC; e) AFMSLC(0); f) AFMSLC(6); g) AFMSRAC(0) e h) AFMSRAC(6) a pH 6,0. As setas indicam as bandas que sofrem variações mais significativas. 78

Figura 4.4 – Espectros de fluorescência síncrona típicos das amostras de AF em KNO_3 0,1 M: a) AFS; b) AFLau; c) AFLC; d) AFRAC; e) AFMSLC(0); f) AFMSLC(6); g) AFMSRAC(0) e h) AFMSRAC(6) a pH 6,0. As setas indicam a posição da banda localizada a 280 nm, característica dos materiais antropogénicos. 81

Figura 4.5 – Exemplo típico de uma titulação potenciométrica de uma solução de AFS com base forte. 85

Figura 4.6 – Determinação do valor de CMC de alguns surfactantes: a) SDS; b) CPB, (□); e CPC, (Δ). 87

Figura 4.7 – Condutividade relativa das amostras de AF: (×) AFS; (□) AFLau; (Δ) AFLC e (○) AFRAC. 89

Figura 4.8 – Titulações condutimétricas típicas das amostras de AF com NaOH 0,05571 M: a) AFS; b) AFLau; c) AFLC e d) AFRAC. 90

Figura 4.9 – Titulações condutimétricas típicas da amostra AFRAC 100 mg L^{-1} com as bases fortes: a) LiOH; b) NaOH e c) KOH. 91

Figura 4.10 – Resultados típicos de ajustes lineares aos conjuntos de pontos resultantes de titulações com NaOH 0,05571 M de soluções de AF 100 mg L^{-1}: a) AFS; e b) AFLC. 93

Figura 4.11 – Titulação de soluções de AF na ausência e na presença de diferentes concentrações de Cu(II): a) AFS; b) AFLau); c) AFLC e d) AFRAC. A tracejado fino apresenta-se a curva corrigida para a titulação do excesso de Cu(II). 97

Figura 4.12 – Conjuntos de espectros de UV-Vis das amostras AFS, [a), d)]; AFLC, [b), e)]; e AFRAC, [c), f)] em função do tempo, a pH 6,00, [a) - c)]; e a pH 7,00, [d) - f)]. 102

Figura 4.13 – Sobreposição de cromatogramas típicos das amostras AFS, AFLC e AFRAC a pH 6,00, [a)]; e pH 7,00, [b)]. Cortes a 255 nm. 104

Figura 4.14 – Sobreposição dos espectros dos máximos detectados nas experiências de HP-SEC. Espectros agrupados de acordo com as amostras (AFS, [a), d)]; AFLC, [b), e)]; e AFRAC, [c), f)]) e o pH (6,00, [a) - c)]; e 7,00, [d) - f)]). 106

Figura 4.15 – Sobreposição dos espectros dos máximos agrupados conforme o tempo de eluição: 1° conjunto, [a), d)]; 2° conjunto, [b), e)]; e 3° conjunto [c), f)]. Experiências a pH 6,00 [a) – c)] e 7,00 [d) – f)]. 108

Figura 4.16 – Exemplos típicos de conjuntos de espectros de UV-Vis em função do tempo de (i) compostos modelo simples dos AF, a) ácido cafeico, b) catecol e c) salicilato de sódio; (ii) aminoácidos, d) tirosina, e) triptofano e f) fenilalanina e (iii) amostras de pré-fúlvicos extraídos de folhas de g) carvalho, h) castanheiro, i) eucalipto e j) videira. Espectros a pH 6,00. 109

Figura 4.17 – Sobreposição de cromatogramas típicos a pH 6,00 (——) e 7,00 (——): (i) compostos modelo simples dos AF, a) ácido cafeico, b) catecol e c) salicilato de sódio; (ii) aminoácidos, d) tirosina, e) triptofano e f) fenilalanina; e (iii) amostras de pré-fúlvicos extraídos de folhas de g) carvalho, h) de castanheiro, i) de eucalipto e j) de videira. Cortes a 255 nm. 112

Figura 4.18 – Dendogramas obtidos por análise de aglomeração dos espectros de UV-Vis dos máximos obtidos a pH 6,00 [a)] e 7,00 [b)]. A legenda dos códigos utilizados na figura encontra-se na Tabela 4.11. As linhas a tracejado indicam os critérios de selecção utilizados na análise de aglomeração. 116

Figura 4.19a – Espectros médios (——) e de desvio padrão (——) dos grupos detectados na análise de aglomeração (Tabela 4.12) das experiências de HP-SEC a pH 6,00. 120

Figura 4.19b – Espectros médios (——) e de desvio padrão (——) dos grupos detectados na análise de aglomeração (Tabela 4.12) das experiências de HP-SEC a pH 7,00. 121

Figura 5.1 – Curvas de titulação para as amostras AFS, [a) - c)]; e AFLau, [d) - f)]. Titulações com Cu(II), [a) e d)]; Pb(II), [b) e e)]; e Cd(II), [c) e f)]. 132

Figura 5.2 – Variação do grau de complexação com a concentração total de catião metálico para as amostras AFS, [a) - c)]; e AFLau, [d) - f)]. Titulações com Cu(II), [a) e d)]; Pb(II), [b) e e)]; e Cd(II), [c) e f)]. 134

Figura 5.3 – Representações de Scatchard [a) e c)] e de Buffle [b) e d)] da complexação do catião Cu(II) com as amostras AFS, [a) e b)]; e AFLau, [c) e d)]. 135

Figura 5.4 – Gráficos de van den Berg / Ruzic para as amostras AFS, [a) - c)]; e AFLau, [d) - f)]. Titulações com Cu(II), [a) e d)]; Pb(II), [b) e e)]; e Cd(II), [c) e f)] a pH 6,0. 136

Figura 5.5 – Curvas de titulação para as amostras AFLC, [a) - c)]; e AFRAC, [d) - f)]. Titulações com Cu(II), [a) e d)]; Pb(II), [b) e e)]; e Cd(II), [c) e f)]. 139

Figura 5.6 – Variação do grau de complexação com a concentração total de catião metálico para as amostras AFLC, [a) - c)]; e AFRAC, [d) - f)]. Titulações com Cu(II), [a) e d)]; Pb(II), [b) e e)]; e Cd(II), [c) e f)]. 140

Figura 5.7 – Representações de Scatchard [a) e c)] e de Buffle [b) e d)] da complexação do catião Cu(II) com as amostras AFLC, [a) e b)]; e AFRAC, [c) e d)]. 141

Figura 5.8 – Gráficos de van den Berg / Ruzic para as amostras AFLC, [a) - c)]; e AFRAC, [d) - f)]. Titulações com Cu(II), [a) e d)]; Pb(II), [b) e e)]; e Cd(II), [c) e f)]. 143

Figura 5.9 – Curvas de titulação para as amostras AFMSLC(0), [a) - c)]; AFMSLC(6), [d) - f)]; AFMSRAC(0), [g) - i)]; e AFMSRAC(6), [j) - l)]. Titulações com Cu(II), [a), g) e j)]; Pb(II), [b), h) e k)]; e Cd(II), [c), i) e l)]. 145

Figura 5.10 – Variação do grau de complexação com a concentração total de catião metálico para as amostras AFMSLC(0), [a) - c)]; AFMSLC(6), [d) - f)]; AFMSRAC(0), [g) - i)]; e AFMSRAC(6), [j) - l)]. Titulações com Cu(II), [a), g) e j)]; Pb(II), [b), h) e k)]; e Cd(II), [c), i) e l)]. 146

Figura 5.11 – Gráficos de van den Berg / Ruzic para as amostras AFMSLC(0), [a) - c)]; AFMSLC(6), [d) - f)]; AFMSRAC(0), [g) - i)]; e AFMSRAC(6), [j) - l)]. Titulações com Cu(II), [a), g) e j)]; Pb(II), [b), h) e k)]; e Cd(II), [c), i) e l)]. 148

Figura 5.12 – Gráficos resumo da evolução das constantes de complexação (Log K) dos três catiões estudados com amostras de AF: a) AF naturais; b) AF antropogénicos; c) AF extraídos de misturas de solo natural e compostos. 150

Figura 5.13 – Espectros típicos de fluorescência síncrona para as experiências com AFS a pH 3, [a) - c)]; 4, [d) - f)]; 5, [g) - i)]; e 6, [j) - l)]. Concentrações de AFS de 25 mg L^{-1}, [a); d); g) e j)]; 50 mg L^{-1}, [b); e); h) e k)]; e 100 mg L^{-1}, [c), f), i) e l)]. 152

Figura 5.14 – Espectros típicos de fluorescência síncrona para as experiências com AFLC a pH 3, [a) - c)]; 4, [d) - f)]; 5, [g) - i)]; e 6, [j) - l)]. Concentrações de AFLC de 25 mg L^{-1}, [a); d); g) e j)]; 50 mg L^{-1}, [b); e); h) e k)]; e 100 mg L^{-1}, [c), f), i) e l)]. 153

Figura 5.15 – Espectros típicos de fluorescência síncrona para as experiências com AFRAC a pH 3, [a) - c)]; 4, [d) - f)]; 5, [g) - i)]; e 6, [j) - l)]. Concentrações de AFRAC de 25 mg L^{-1}, [a); d); g) e j)]; 50 mg L^{-1}, [b); e); h) e k)]; e 100 mg L^{-1}, [c), f), i) e l)]. 154

Figura 5.16 – Espectros típicos desvio padrão para as amostras AFS, [a) - c)]; AFLC, [d) - f)]; e AFRAC, [g) - i)], a pH 5 e a uma concentração de 25 mg L^{-1}. As figuras 5.16 [j) - l)] referem-se à amostra AFS a pH 6 e a 25 mg L^{-1}. As setas indicam os locais onde foram seleccionados os componentes. 156

Figura 5.17 – Espectros típicos dos componentes e perfis de concentração para uma escolha hipotética de dois componentes para as amostras AFS, [a) - c)]; AFLC, [d) - f)]; e AFRAC, [g) - i)], a pH 5, em contraste com uma escolha de um componente para AFLC, [j)]; e AFRAC, [k)], a uma concentração de 100 mg L^{-1}. 160

Figura 5.18 – Espectros calculados típicos dos componentes detectados nas experiências com AFS a pH 3, 4, 5 e 6, para concentrações de AFS de 25 mg L^{-1}, [a) - g)]; 50 mg L^{-1}, [h) - o)]; e 100 mg L^{-1}, [p) - w)]. Detectou-se apenas um componente nas experiências a 25 mg L^{-1} a pH 6. 161

Figura 5.19 – Espectros calculados típicos do componente detectado nas experiências com AFLC e Cu(II) a pH 3, 4, 5 e 6, para concentrações de AFLC de 25 mg L^{-1}, [a) - d)]; 50 mg/L, [e) - h)]; e 100 mg/L, [i) - l)]. Experiências a pH 3, [a); e) e i)]; 4, [b); f) e j)]; 5, [c); g) e k)]; e 6, [d); h) e l)]. 162

Figura 5.20 – Espectros calculados típicos do componente detectado nas experiências com AFRAC e Cu(II) a pH 3, 4, 5 e 6, para concentrações de AFRAC de 25 mg L^{-1}, [a) - d)]; 50 mg L^{-1}, [e) - h)]; e 100 mg L^{-1}, [i) - l)]. Experiências a pH 3, [a); e) e i)]; 4, [b); f) e j)]; 5, [c); g) e k)]; e 6, [d); h) e l)]. 163

Figura 5.21 – Perfis de intensidade de fluorescência típicos dos componentes detectados nas experiências com AFS e Cu(II) a pH 3, 4, 5 e 6 e para concentrações de AFS de 25 mg L^{-1}, [a) - d)]; 50 mg L^{-1}, [e) - h)]; e 100 mg L^{-1}, [i) - l)]. Experiências a pH 3, [a); e) e i)]; 4, [b); f) e j)]; 5, [c); g) e k)]; e 6, [d); h) e l)]. 164

Figura 5.22 – Perfis de intensidade de fluorescência típicos do componente detectado nas experiências com AFLC e Cu(II) a pH 3, 4, 5 e 6 e para concentrações de AFLC de 25 mg L^{-1}, [a) - d)]; 50 mg L^{-1}, [e) - h)]; e 100 mg L^{-1}, [i) - l)]. Experiências a pH 3, [a); e) e i)]; 4, [b); f) e j)]; 5, [c); g) e k)]; e 6, [d); h) e l)]. 165

Figura 5.23 – Perfis de intensidade de fluorescência típicos do componente detectado nas experiências com AFRAC e Cu(II) a pH 3, 4, 5 e 6 e para concentrações de AFRAC de 25 mg L^{-1}, [a) - d)]; 50 mg L^{-1}, [e) - h)]; e 100 mg L^{-1}, [i) - l)]. Experiências a pH 3, [a); e) e i)]; 4, [b); f) e j)]; 5, [c); g) e k)]; e 6 [d); h) e l)]. 166

Figura 5.24 – Representações típicas das equações de Stern-Volmer linear, [a) - c)], e modificada, [d) - f)], para as experiências com AFS, [a) e d)]; AFLC, [b) e e)]; e AFRAC, [c) e f)], a pH 5 e uma concentração de 50 mg L^{-1}. 168

Figura 5.25 – Valores de Log K obtidos para as experiências de complexação do catião Cu(II) com as seguintes amostras de AF: a) AFS; b) AFLC e c) AFRAC. 173

Figura 5.26 – Correlação entre os valores de Log K obtidos por fluorescência (método de Ryan e Weber) e potenciometria para as amostras AFS, AFLC e AFRAC a uma concentração de AF de 25 mg L^{-1} e a pH 6,0. 175

Figura 5.27 – Espectros sobrepostos típicos correspondentes a misturas de PAR com catiões ou misturas de catiões: a) Zn(II) (4,0 μM); b) Ni(II) (6,0 μM); c) Pb(II) (6,0 μM); d) Zn(II) + Ni(II) (4,0 μM de ambos os catiões); e) Pb(II) + Cd(II) (6,0 e 3,0 μM, respectivamente); f) Zn(II) + Pb(II) + Co(II) (6,0, 3,0 e 1,0 mM, respectivamente). 177

Figura 5.28 – Perfis de absorvância a 520 nm das bandas correspondentes à formação de complexos entre o PAR e os catiões Zn(II), Ni(II), Pb(II), Co(II) e Cd(II) em função do tempo. Os símbolos correspondem aos seguintes catiões: (Δ) Zn(II); (○) Ni(II); (□) Pb (II); (×) Co(II); (-) Cd(II). 178

Figura 5.29 – Resultados típicos da decomposição de uma matriz de dados correspondente ao espectros da mistura de PAR com um único catião [neste caso o Ni(II)]: a) espectros; b) perfis de tempo; c) concentrações estimadas (unidades arbitrárias) dos componentes nas misturas. 180

Figura 5.30 – Resultados típicos da decomposição de uma matriz de dados correspondente ao espectros da mistura de PAR com dois catiões [neste caso, Zn(II) + Pb(II)]: a) espectros; b) perfis de tempo; c) concentrações estimadas (unidades arbitrárias) dos componentes nas misturas. Os símbolos correspondem aos seguintes catiões: (Δ) Zn(II); (□) Pb (II). 183

Figura 5.31 – Resultados típicos da decomposição de uma matriz de dados correspondente aos espectros da mistura de PAR com três catiões [neste caso, Zn(II) + Pb(II) + Co(II)]: a) espectros; b) perfis de tempo; c) concentrações estimadas (unidades arbitrárias) dos componentes nas misturas. Os símbolos correspondem aos seguintes catiões: (Δ) Zn(II); (□) Pb (II); (×) Co(II). 184

Figura 5.32 – Representação de conjuntos de espectros de absorvância em função do tempo para experiências de descomplexação dos catiões (a) Ni(II) e (b) Cu(II) de uma amostra de AFS. 188

Figura 5.33 – Representação da absorvância a 508 nm em função do tempo para experiências de descomplexação dos catiões Ni(II), [a) - d)]; e Cu(II), [e) - h)] de amostras de AF: AFS, [a), e)]; AFLau, [b), f)]; AFLC, [c), g)]; e AFRAC, [d), h)]. Sobreposições de perfis de absorvância para diferentes proporções $[Ni]_{Total}/[L]_{Total}$. 191

Figura 5.34 – Sobreposição de perfis de absorvância normalizados para experiências de descomplexação dos catiões Ni(II) e Cu(II) com a amostra AFS, para uma razão molar [Catião metálico/AF] de 1:1. 191

Figura 5.35 – Resultados típicos de experiências de descomplexação dos catiões Ni(II), [a) - d)]; e Cu(II), [e) - h)] da amostra AFLC, numa razão molar 1:3. Ajuste de duas funções polinomiais aos valores de Ln(Abs) = f [Ln(t)], [a), d)]; construção de uma função corrigida Ln(abs) = f [Ln(t)], [b), f)]; representação dos pares de valores C(t) = f [Ln(t)], [c), g)]; e representação de H(t) = f [Ln(t)], [d), h)]. As linhas a tracejado delimitam a zona de contacto entre duas secções. 192

Figura 6.1 – Sobreposição dos espectros de UV da AT, DeAT, DpAT e HidAT em solução aquosa de tampão fosfato com pH 6,865. 205

Figura 6.2 – Padrões de AT em clorofórmio: a) sobreposição dos espectros de UV; b) representação dos cortes a 242 nm efectuados nos espectros de UV dos padrões de AT em clorofórmio. 211

Figura 6.3 – Representação dos valores da solubilidade (mg/L) da AT na presença de sais inorgânicos em solução aquosa. 213

Figura 6.4 – Representação dos valores da solubilidade (mg/L) da AT em função a) da concentração de sais inorgânicos e b) da força iónica (I) da solução. Representação de c) Log (S_W^*/S_W) em função de I. 214

Figura 6.5 – Representação de (S_W^*/S_W) para a AT em função da concentração de AF. Eliminaram-se da representação os valores obtidos a 50 mg L^{-1} de AF. 220

Figura 6.6 – Conjuntos típicos de espectros de UV-Vis de misturas de AFS 80 mg/L com a) AT, b) DeAT e c) DpAT 9×10^{-5} M a pH 6,00. 224

Figura 6.7 – Sobreposição dos perfis de eluição de misturas de a) AT, b) DeAT e c) DpAT 9×10^{-5} M para quatro níveis de concentração de AFS a pH 6,00. Ampliação das bandas dos herbicidas: d) AT, e) DeAT e f) DpAT. 225

Figura 6.8 – Representação normalizada dos máximos de intensidade e das áreas das bandas correspondentes à presença de AFS e herbicidas para as experiências de complexação da AT, [a) - d)]; DeAT, [e) - h)]; e DpAT, [i) - l)], com AFS a pH 6,00. 227

Figura 6.9 – Sobreposição de perfis de eluição normalizados típicos para a AT, DeAT e DpAT a pH 6,00. Cortes a 220 nm. 228

Figura A1.1 – Variação do grau de complexação (α=[ML]/[M]$_{Total}$) de M e L com a concentração de catião metálico M: a) experiências potenciométricas simuladas, Sim1, Sim2, Sim3 e Sim4; b) ampliação da Fig. A1.1.a no intervalo de p[M] entre 2,4 e 4,6 M. 236

Figura A1.2 – Resultados do método de Scatchard para as titulações potenciométricas simuladas: a) Sim1; b) Sim2; c) Sim3 e d) Sim4. No caso da Fig. A1.2.d não foi possível ajustar qualquer recta aos valores simulados. 237

Figura A1.3 – Resultados do método de van den Berg / Ruzic para as titulações potenciométricas simuladas: a) Sim1; b) Sim2; c) Sim3 e d) Sim4. 238

Figura A1.4 – Representações de Buffle para as titulações potenciométricas simuladas: a) Sim1; b) Sim2; c) Sim3 e d) Sim4. Ampliação das representações de Buffle onde se verificaram encurvamentos nos pontos iniciais: e) Sim2; f) Sim3 e g) Sim4. 239

Figura A2.1 – Representação de a) C(t) = f [Ln(t)] para intervalos constantes de Ln(t); e b) H(t) = f [Ln(t)]. 244

Figura A2.2 – Avaliação da utilização de apenas uma função polinomial na determinação de valores de absorvância corrigida: a) determinação da função Ln(Abs) = f [Ln(t)]; b) representação da função H(t) = f [Ln(t)]. Na Fig. A2.2.a apresenta-se a equação da função polinomial utilizada. 248

Figura A2.3 – Avaliação da utilização de duas funções polinomiais na determinação de valores de absorvância corrigida: a) determinação da função Ln(Abs) = f [Ln(t)]; b) representação da função H(t) = f [Ln(t)]. A linha a tracejado delimita a separação entre duas funções polinomiais distintas. Na Fig. A2.3.a apresentam-se as equações das duas funções polinomiais utilizadas. 251

Figura A2.4 – Sobreposição das funções H(t) apresentadas nas Figs. A2.2.b (—) e A2.3.b (▬). 252