

José Pedro Montanha Meireles Martins

Identificação e Quantificação de Exsudados Libertados pelas Raízes da Planta *Cyperus eragrostis* Lamarck



Departamento de Química
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Porto
Novembro 2002

José Pedro Montanha Meireles Martins

Identificação e Quantificação de Exsudados Libertados pelas Raízes da Planta *Cyperus eragrostis* Lamarck



Departamento de Química
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Porto
Novembro 2002

Identificação e Quantificação de Exsudados Libertados pelas Raízes da Planta *Cyperus eragrostis* Lamarck

Dissertação para Mestrado em Química na
Faculdade Ciências da Universidade do Porto

Aos meus pais

À Nini

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria Teresa Sá Dias de Vasconcelos, minha orientadora, exprimo sincera gratidão pelo enorme apoio, boa orientação, presença e preocupação demonstrada na realização deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Fernanda Carvalho Leal, pela enorme ajuda, apoio e interesse demonstrado ao longo da realização deste trabalho.

À Mestre Marisa Almeida pelo auxílio dedicado na realização de algumas tarefas.

Ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, particularmente ao LAQUIPAI, todo o apoio dispensado.

A António Júlio Sousa pela assistência no laboratório.

A todos os meus amigos, pela amizade e ajuda na realização deste trabalho, assim como ao longo de todo o curso.

A toda a minha família por todo o apoio e compreensão dedicados.

RESUMO

O objectivo deste trabalho foi dar uma contribuição para o conhecimento da influência da planta *Cyperus eragrostis* Lamarck (existente em lagos e zonas pantanosas) na composição química do meio ao nível da rizosfera.

O objectivo final deste estudo será compreender a biogeoquímica dos fenómenos que ocorrem na rizosfera, conhecer os factores que a condicionam, com vista à eventual utilização de plantas em processos de remediação de solos.

Foram identificados e quantificados nas soluções onde foram mergulhadas as raízes das plantas os carboxilatos formato, malato, succinato e oxalato (por cromatografia líquida de alta eficiência), e metais pesados (por espectrofotometria de absorção atómica, EAA). Foram também determinadas as concentrações totais de ligandos libertados pelas raízes (por voltametria de redissolução catódica) e o teor total de metais pesados nas raízes (por EAA).

Foram feitos estudos das cinéticas de libertação dos exsudados, em períodos de tempo que variaram entre 2 min. e 24 h.

Na maioria das experiências as raízes foram mergulhadas em água desionizada. Porém, também se estudou a influência na exsudação da composição da solução em que estavam mergulhadas as raízes. Para tal, quantificaram-se diversos metais na água do lago onde viviam as plantas (no Parque da Cidade do Porto) e realizaram-se experiências em soluções com concentrações de metais idênticas a essas, obtidas a partir de sais de nitrato e cloreto.

Verificou-se que os carboxilatos eram libertados muito rapidamente, para as soluções em contacto com as raízes das plantas. Após apenas dois minutos foram detectados níveis que já correspondiam a um terço ou mesmo cerca de metade dos valores máximos encontrados no decorrer de 24 h de experiência.

Como produtos de exsudação foram identificados e quantificados os aniões succinato, malato, oxalato e formato. As respectivas concentrações variaram com a estação do ano em que foram realizadas as experiências e com a composição do meio, mas foram da ordem dos μ molar.

Foi também quantificada, sem identificação, a concentração total de ligandos complexantes fortes de Cu (II), que foi também da ordem dos μ molar.

Quantificou-se também a concentração de Cu, Fe, Mn, Pb, Zn e Cd libertados pelas raízes. Estas foram normalmente da ordem dos nmol/g raiz, variando de metal para metal e com a composição do meio.

Na sua globalidade, os resultados deste estudo evidenciaram a importância das raízes na composição dos solos e pântanos ao nível da rizosfera. Dada a importância ambiental destes fenómenos e a quase total ausência de conhecimentos sobre a influência da exsudação das plantas na especiação de metais pesados, este tema merece investigação futura.

ÍNDICE

Agradecimentos	IV
Resumo	V
Índice	VII
PARTE 1 – Generalidades	1
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO TEÓRICA	2
1.1. Introdução	3
1.2. Contexto do trabalho	5
1.3. Objectivos	7
CAPÍTULO 2 - TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS	9
2.1. Cromatografia	10
2.1.1. Definição	10
2.1.2. Tipos de Cromatografia Líquida	10
2.1.3. Relações e Parâmetros Importantes em Cromatografia	11
2.1.4. Teoria dos Pratos	15
2.1.5. O Processo de Separação	17
2.1.6. O Aparelho de HPLC	18
2.1.7. Cromatografia Iónica	19
2.2. Espectrometria de absorção atómica	22
2.2.1. Definição e Mecanismos de Absorção	22
2.2.2. Lei de Lambert-Beer	23
2.2.3. Equipamento	25
2.2.4. EAA com Atomização por Chama	26
2.2.5. EAA com Atomização Electrotérmica	28
2.3. Voltametria	31
2.3.1. Introdução	31
2.3.2. O Eléctrodo Gotejante de Mercúrio	34
2.3.3. Voltametria de Redissolução Catódica com Adsorção	36
2.3.4. Voltametria com Onda Quadrada	37
PARTE 2 – METODOLOGIAS, RESULTADOS E CONCLUSÕES	40
CAPÍTULO 3 – PARTE EXPERIMENTAL	41
3.1. Equipamento	42
3.1.1. Cromatografia	42

3.1.2.	Voltametria	42
3.1.3.	Absorção Atômica	42
3.2.	Reagentes e soluções	43
3.3.	Descontaminação do material	45
3.4.	Métodos	45
3.4.1.	Determinação de Tióis (Cisteína e Glutathiona)	45
3.4.2.	Determinação de Ácidos Carboxílicos	46
3.4.3.	Determinação das Concentrações de Ligandos Complexantes de Cu e das Constantes de Estabilidade Condicionais dos Respectivos Complexos	47
3.4.4.	Determinação da Concentração de Cu Total Dissolvido nas Amostras	48
3.4.5.	Determinação de Metais por Espectrofotometria de Absorção Atômica	48
3.5.	Cálculos	49
3.6.	Preparação das Plantas para as Experiências	50
3.7.	<i>Cyperus eragrostis</i> Lamarck	52
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO		54
4.1.	Optimização de Metodologias	55
4.1.1.	Características de Resposta dos Métodos Utilizados	55
4.2.	Estudo da Exsudação de Carboxilatos pelas Raízes da Planta <i>Cyperus eragrostis</i> Lamarck	59
4.2.1.	Estudos em Função do Tempo	59
4.2.2.	Influência, na Liberação de Carboxilatos, da Presença de Iões Metálicos no Meio Inicial	66
4.3.	Estudo da Liberação/Fixação de Iões Metálicos pelas Raízes da Planta <i>Cyperus eragrostis</i> Lamarck	68
4.4.	Níveis de Metais Pesados nas Raízes das Plantas <i>Cyperus eragrostis</i> Lamarck	75
4.5.	Influência da Presença de Iões Metálicos na Liberação de Exsudados	77
4.6.1.	Estudo da Exsudação em Termos de Ligandos Orgânicos Totais	80
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES		84
5.1.	Conclusões	85
BIBLIOGRAFIA		86

PARTE I

GENERALIDADES

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO TEÓRICA

1.1. INTRODUÇÃO

A diciminação de metais pesados no ambiente vem ocorrendo desde tempos que remontam à solidificação do magma da terra. Concentrações relativamente elevadas de alguns metais pesados em solos ocorreram desde sempre em resultado de uma mineralização natural causada pela presença de corpos de minério imperturbados perto da superfície. Com o desenvolvimento industrial nos últimos 150 anos teve lugar um aumento da deciminação de metais no ambiente. As fontes antropogénicas de metais são numerosas e diversas, incluindo a exploração de minas, fundições, combustão de fúeis de fósseis, emissões dos escapes de motores de veículos automóveis, descargas de águas residuais, etc.

A níveis vestigiais, a maioria dos metais pesados desempenha funções variadas em sistemas biológicos, sendo componentes estruturais importantes em proteínas e intervindo na regulação de processos biológicos. No entanto, em quantidades relativamente elevadas eles são tóxicos para a maioria das plantas.

É raro encontrar-se solos que estejam completamente desprovidos de plantas, mesmo em ambientes fortemente contaminados por metais. Respostas orquestradas de mecanismos fisiológicos permitem às plantas sobreviver à contaminação por metais. Tais mecanismos de defesa podem ser divididos em duas estratégias: (a) a não permissão, por parte da plantas, da absorção excessiva de metais, e (b) passsivação dos metais acumulados no interior da planta por meio da formação de espécies químicas muito estáveis e por isso indisponíveis para interactuar com as outras moléculas biológicas¹.

Para evitar a absorção excessiva de metais pelas plantas, estas utilizam diversas estratégias, incluindo a formação de micorrizas, alteração da permeabilidade das membranas, proliferação de raízes para zonas não contaminadas, mudanças na capacidade das células em ligar metais ou aumento da exsudação de substâncias quelantes de metais¹.

Os exsudados de raízes de plantas são misturas complexas de substâncias como os açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e muitos outros compostos.² Vitais para o ciclo normal da vida das plantas vasculares, estes compostos poderão

desempenhar diversas funções, nas quais se incluem: servir de substratos de carbono para o crescimento de microorganismos colonizadores de raízes e mediar interações específicas de plantas com microorganismos simbióticos e bactérias que promovem o crescimento de plantas,² complexar cátions metálicos e assim conferir tolerância aos mesmos possibilitando a sobrevivência em meios adversos e/ou facilitar a fixação de micronutrientes em caso de deficiência dos mesmos.

Embora se saiba que as raízes de plantas libertam exsudados, a informação sobre a respectiva natureza, concentração, propriedades complexantes e sobre o papel que globalmente desempenham na especiação química na rizosfera é ainda incipiente.

A rizosfera é uma área muito activa onde um grande número de reacções químicas e processos biológicos ocorrem. Em particular, as raízes de plantas tolerantes ao enxarcamento podem ter uma influência marcada na concentração e especiação de metais no meio envolvente³.

Moléculas orgânicas exsudadas por raízes de plantas podem coordenar iões metálicos na rizosfera e assim alterar a respectiva biodisponibilidade⁴. Certa exsudação poderá resultar de mudanças no potencial electroquímico das células como resultado de toxicidade causada por metais. A exsudação pode conferir tolerância a estes, e assim possibilitar a sobrevivência em meios adversos. No entanto, quelatos de ligandos orgânicos libertados pelas raízes também podem ser usados pelas plantas para transformar iões metálicos do solo em formas mais solúveis, o que facilitará a fixação destes em casos de deficiência de micronutrientes⁴. Há resultados que sugerem que em condições de carência de ferro, certas plantas exsudam compostos orgânicos com vista a permitir uma mais fácil assimilação deste metal².

Portanto, o processo de libertação de exsudados por parte das raízes das plantas parece servir para facilitar a mobilização de nutrientes e, por outro lado ter um papel primordial na tolerância de certos organismos a determinados metais.

A libertação de ácidos orgânicos de baixa massa molecular também contribui para a acidificação da rizosfera e possivelmente para a formação de complexos de metais solúveis⁵, contribuindo para a mobilização de metais tais como o Mn e Fe². Estudos em arroz, milho e *Lupinus* indicaram a fixação por parte

das plantas de complexos de ácido orgânico com o metal mobilizado, resultando numa melhor nutrição para estas⁶.

Uma variedade de compostos orgânicos com enxofre (compostos tiólicos) são produzidos em águas marinhas e em sedimentos por processos biológicos⁷. Tais compostos formam complexos de metais pesados com constantes de formação muito elevadas, tendo portanto importantes implicações ambientais na especiação de metais vestigiais⁷. Foram já identificados compostos tiólicos (cisteína e glutatona) em exsudados de algas marinhas (micro e macro algas)⁸, pelo que será de pensar que complexantes deste tipo também possam ser exsudados por raízes de outras plantas.

1.2. CONTEXTO DO TRABALHO

Num mundo onde a proliferação de locais contaminados com metais é evidente, torna-se cada vez mais necessário procurar novas formas e métodos para a remoção de metais pesados dos solos. Isto torna-se ainda mais importante se levarmos em conta que os métodos já existentes são muito dispendiosos, tornando a sua utilização muito limitada. As formas mais correntes para tratamento de solos contaminados com metais tóxicos são: (1) Remoção de terras: onde se faz a escavação dos solos contaminados, seguida do transporte e deposição desses mesmos solos para locais de armazenamento de resíduos perigosos⁴; (2) Fixação: processamento químico dos solos para imobilizar os metais, seguindo-se normalmente um tratamento da superfície do solo de forma a impermeabilizá-la⁴; e (3) Lixiviação: provocar a desadsorção e lixiviação dos metais do solo com soluções ácidas, ou com propriedades lixivantes, seguidas pelo recobrimento do local com uma camada de solo limpo⁴. Estas formas de tratamento de solos contaminados provocam normalmente a perda da actividade biológica dos próprios solos para além de, como já foi escrito atrás, envolverem custos elevados.

Um problema ainda mais sério do que o tratamento, continua a ser o abandono das áreas afectadas, como acontece na maioria das explorações de

minas abandonadas, ficando estas áreas expostas a uma lixiviação contínua por efeitos erosivos, alargando cada vez mais a dimensão do problema.

É aqui que poderão ter grande projecção e interesse os estudos e trabalhos realizados com plantas na tentativa de recuperar solos contaminados com metais – Fitorremediação. As capacidades das plantas para remediar este tipo de problemas podem subdividir-se em três campos de aplicação: fito-extracção, fito-estabilização e rizofiltração.

Na fito-extracção as plantas devem não só tolerar e acumular teores elevados de metais tóxicos nos órgãos que possam ser colhidos, como também possuir uma rápida taxa de crescimento e a capacidade de produzir um elevado rendimento em biomassa. Neste processo podem ser utilizadas várias culturas/colheitas sequenciais de plantas acumuladoras de forma a reduzir as concentrações de metais nos solos até níveis aceitáveis para o ambiente. Os resíduos das plantas, secos, calcinados ou compostos, muito ricos em metais, podem ser isolados como resíduos perigosos, e tratados como tal, ou então reciclados para lhes serem retirados os metais.

São inúmeras as vantagens na utilização de plantas acumuladoras de metais, para a remoção destes de solos contaminados: baixos custos; produção de material vegetal rico em metais e reciclável; aplicação a uma gama alargada de metais tóxicos; perturbação ambiental mínima; eliminação de produção de resíduos secundários gasosos ou líquidos que outros métodos envolvem; e fácil ou melhor aceitação pública.

A Fito-estabilização é realizada com plantas que para além de tolerarem elevadas concentrações de metais tóxicos no solo, são capazes de os tornar mais inofensivos por absorção através da raiz, precipitação ou redução. Para além disso, estas plantas devem concentrar pouco metal nas suas folhas, de forma a que o material colhido não tenha que ser tratado como resíduo perigoso. Este tipo de plantas pode ser usado na revegetação de zonas muito poluídas por metais pesados, como acontece nas proximidades de indústrias de extracção de minérios, reduzindo assim a mobilidade dos metais pesados, e diminuindo por isso os riscos de uma maior degradação ambiental por lixiviação dos metais para águas superficiais e subterrâneas, para além do espalhamento de partículas pelo vento.

Na Rizofiltração as plantas devem ser capazes de acumular metais a partir de efluentes poluídos e por isso devem possuir raízes de crescimento muito rápido, que possuam a capacidade de remover metais tóxicos em solução durante largos períodos de tempo. A rizofiltração é um processo eficiente e economicamente atractivo quando estão envolvidas baixas concentrações de contaminantes e elevados volumes de água.

Então, pode compreender-se facilmente a importância do conhecimento dos processos metabólicos dos organismos vivos (em que as plantas estão incluídas) com os seus processos de captura, armazenamento, utilização e eliminação dos elementos químicos, o que permitirá por exemplo encontrar soluções para o problema da contaminação de solos que normalmente têm sido objecto de abordagens demasiado simplistas, as quais esquecem os múltiplos equilíbrios que estão em jogo nos processos naturais.

1.3. OBJECTIVOS

O objectivo deste trabalho foi o estudo do papel das raízes na especiação química do meio envolvente.

Para tal, começou-se pela implementação, e optimização de métodos que depois seriam usados nos estudos futuros.

Concretamente foram optimizados métodos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com vista a determinar ácidos carboxílicos e tióis (cisteína e glutatona).

Para a determinação dos tióis, optimizou-se um método por cromatografia em fase reversa e com detecção no UV (detector UV-Vís.).

Para a determinação de ácidos carboxílicos, optimizou-se um método por cromatografia de permuta aniónica com supressor de sinal de fundo e detector de condutividade (cromatografia iónica, CI)

Passou-se depois a realizar estudos com o objectivo de identificar e quantificar exsudados libertados pelas raízes da planta *Cyperus eragrostis* Lamarck em diferentes condições experimentais. Mais concretamente, procurou-se

identificar e quantificar tióis e certos ácidos carboxílicos. Foi também quantificada a concentração total de ligandos orgânicos exsudados e das respectivas constantes de estabilidade condicionais. Estes foram determinados (por voltametria de redissolução catódica) para Cu (II). Este metal foi escolhido por ser, na série de Erwing-Williams, o que forma complexos mais estáveis com uma grande variedade de ligandos. Assim, a determinação dos complexantes de Cu (II) pode ser considerada uma medida de capacidade complexante do sistema em estudo.

Estudou-se a cinética de libertação de exudados e de eventuais efeitos sazonais nessa cinética.

Procedeu-se também à monitorização das concentrações de alguns metais pesados libertados/absorvidos pelas raízes das plantas e investigou-se a influência da presença de certos metais no meio, na libertação de exudados pelas raízes. Para tal usou-se Espectrometria de Absorção Atómica (com atomização por Câmara de Grafite e por Chama).

Nas experiências, as raízes foram mergulhadas em água desionizada ou em água desionizada enriquecida com quantidades conhecidas de alguns metais na forma de nitratos e/ou cloretos.

CAPÍTULO 2

TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS

2.1. CROMATOGRAFIA¹⁰

2.1.1. DEFINIÇÃO

A cromatografia é um processo de separação no qual os componentes da amostra são distribuídos entre duas fases no suporte cromatográfico (fase estacionária e móvel). A fase estacionária pode ser de material sólido, poroso, ou activo à superfície, em forma de pequenas partículas, ou então um filme fino de líquido apoiado num suporte sólido ou na parede de uma coluna. A fase móvel ou é gasosa ou líquida e é sempre explicitada no tipo de cromatógrafo.

2.1.2. TIPOS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

Cromatografia de Fase Reversa – A fase estacionária é menos polar do que a fase móvel. A fase estacionária usada mais frequentemente é constituída por alcanos com 18 átomos de carbono ligados quimicamente, apesar de existirem outras alternativas, tal como, alcanos com 8 átomos de carbono e cadeias ainda mais pequenas e ainda grupos fenílicos e cicloexílicos.

A água é muitas vezes descrita como o eluente mais forte para cromatografia, mas isto é apenas verdade para os processos de adsorção. A água pode interagir fortemente com os centros activos na sílica e na alumina, tornando a adsorção de moléculas na amostra altamente restrita, sendo estas eluídas rapidamente. Em sistemas de fase reversa aplica-se exactamente o contrário, ou seja, a água não consegue “molhar” os grupos alquílicos não polares (repelentes de água-hidrofóbicos) e não interactiva com eles de nenhuma forma. Portanto a água é a fase móvel mais fraca de todas, dando assim a mais reduzida velocidade de eluição da amostra.

Os compostos da amostra têm uma maior retenção pela superfície da fase reversa quanto menos solúveis forem em água.

Cromatografia de Permuta Iónica – Neste tipo de cromatografia a fase estacionária tem cargas eléctricas à sua superfície. Grupos iónicos tais como SO_3^{2-}

COO^- , NH_3^+ ou NR_3^+ são incorporados na resina ou gel constituinte da fase estacionária. As cargas são neutralizadas pelos contra iões móveis. A fase móvel contém iões ou moléculas amostra iónicas que competem com os contra iões da fase móvel por um lugar à superfície da fase estacionária. Uma resina com grupos SO_3^{2-} é um forte permutador catiónico e uma resina com COO^- é um fraco permutador catiónico. Um permutador de aniões contém grupos NR_3^+ (forte) ou NR_2H^+ ou NH_3^+ (fraco) e forma uma ligação com aniões. Nestas circunstâncias, a separação para ocorrer nas melhores condições tem que ter em conta:

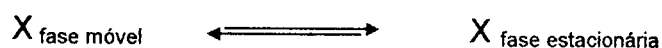
- (a) o tipo de permutador iónico,
- (b) o pH da fase móvel,
- (c) a força iónica (concentração) da fase móvel e
- (d) o tipo de contra ião na fase móvel,

e variando um ou todos se necessário. A ordem de diluição é muitas vezes difícil de prever, uma vez que estão envolvidos muitos factores.

2.1.3. RELAÇÕES E PARÂMETROS IMPORTANTES EM CROMATOGRAFIA¹¹

Desenvolvimento da equação fundamental da cromatografia

Consideremos uma dada espécie X num processo de separação cromatográfico. Esta espécie reparte-se simultaneamente entre a fase móvel e a fase estacionária de acordo com o seguinte equilíbrio:



Este equilíbrio é descrito pela constante de distribuição dada por:

$$K = [X]_{f. \text{ est.}} / [X]_{f. \text{ móvel}} \quad (1)$$

A espécie X desloca-se a uma velocidade inferior relativamente à velocidade da fase móvel devido às interacções que estabelece com a fase estacionária. A

razão entre estas duas velocidades é definida pelo factor de retardação, R:

$$R = \frac{u_x}{u_m} \quad (2)$$

em que u_x é a velocidade linear a que se desloca a espécie $\underline{X}$ e u_m é a velocidade linear da fase móvel. Alternativamente, o factor de retardação também pode ser definido como a velocidade relativa da espécie $\underline{x}$ pela seguinte equação :

$$R = \frac{\text{quantidade da espécie } x \text{ na fase móvel}}{\text{quantidade da espécie } x \text{ na fase móvel e na fase estacionária}} \quad (3).$$

Se n_m e n_e forem respectivamente o número de moles de espécie $\underline{X}$ presentes na fase móvel e na fase estacionária, a equação (2) toma a seguinte forma:

$$R = \frac{n_m}{n_e + n_m} \quad (4),$$

combinando as equações (2) e (4), vem que,

$$\frac{u_x}{u_m} = \frac{n_m}{n_e + n_m} \quad (5).$$

Para uma coluna de comprimento L , a velocidade da espécie $\underline{X}$ é dada pelo cociente, L/t_r , em que, t_r é o tempo de retenção do soluto $\underline{X}$. Do mesmo modo, a velocidade da fase móvel é dada por L/t_m , em que, t_m é o tempo gasto pela fase móvel a percorrer a fase estacionária.

A equação (5) toma a seguinte forma:

$$\frac{t_m}{t_r} = \frac{n_m}{n_e + n_m} \quad (6).$$

Substituindo na equação (6) o número de moles da espécie X pelo produto da sua concentração pelo volume, $n = c \cdot v$, vem que:

$$\frac{t_m}{t_r} = \frac{C_m \cdot v_m}{C_e \cdot v_e + C_m \cdot v_m} \quad (7).$$

Invertendo e rearranjando a equação anterior, obtém-se:

$$t_r = t_m \cdot \left(1 + K_D \cdot \frac{v_e}{v_m}\right) \quad (8)$$

em que, K_D é a constante de distribuição da espécie X atrás descrita.

A equação (8), permite facilmente relacionar os parâmetros, tempo que o eluente leva a atravessar a coluna (ou tempo morto), t_m , volume de fase estacionária, v_e , volume de fase móvel, v_m (que coincide com o volume morto), e o coeficiente de distribuição, K_D , com o tempo de retenção, t_r , de uma espécie X .

A equação anterior também pode ser expressa usando volumes em vez de tempos. Considerando que o volume de retenção v_r , para arrastar a espécie X , é definido pelo produto

$$v_r = F \cdot t_r \quad (9),$$

e que, de modo análogo, é dado por

$$v_m = F \cdot t_m \quad (10),$$

substituindo as constantes t_r e t_m , na equação (8) pelas expressões anteriores vem:

$$v_r = v_m + K_D \cdot v_e \quad (11)$$

A equação (11) é a equação fundamental em cromatografia, pois relaciona os parâmetros experimentais, v_r , v_e , v_m , e K_D .

Factor de capacidade – k'

O factor de capacidade descreve a velocidade relativa da migração das espécies num processo de separação cromatográfico. Para uma espécie X o factor de capacidade é definido por

$$k'_r = K_X \cdot \frac{v_s}{v_m} \quad (12)$$

O factor de capacidade de uma espécie pode ser facilmente obtido a partir de dados experimentais:

$$k'_X = \frac{(t_r)_X - t_M}{t_M} \quad (13)$$

Um valor de k' muito pequeno representa uma eluição da espécie muito rápida; pelo contrário, um valor de k' muito elevado representa uma eluição muito lenta. Idealmente, as separações cromatográficas são realizadas de forma a que os valores de k' estejam compreendidos entre 2 e 10.

Factor de selectividade – α

O factor de selectividade de duas espécies num processo cromatográfico é definido pela razão entre a constante de distribuição da espécie mais retida sobre a constante de distribuição da espécie menos retida. Para duas espécies X e Y em que X é a espécie mais retida, o factor de selectividade pode ser definido por:

$$\alpha = \frac{K_X}{K_Y} \quad (14)$$

O factor de selectividade de duas espécies pode ser facilmente calculado a partir da seguinte relação:

$$\alpha = \frac{(t_r)_X - t_M}{(t_r)_Y - t_M} \quad (15)$$

O factor de selectividade é uma indicação da capacidade da separação que a coluna possui relativamente a estas duas espécies. Valores de α próximos da unidade indicam que a separação das espécies A e B dificilmente será completa; pelo contrário, valores de α muito superiores a um indicam que a separação cromatográfica das espécies A e B será completa.

2.1.4. TEORIA DOS PRATOS

A teoria dos pratos foi proposta por Martin e Synge em 1941. Estes cientistas explicam o processo de separação dos componentes de uma amostra, considerando que a coluna cromatográfica é composta de sucessivas camadas ou pratos teóricos, nos quais, existe um equilíbrio de distribuição dos componentes da amostra entre a fase móvel e a fase estacionária. Cada prato encontra-se em comunicação com o que o antecede e com o seguinte.

Pressupondo que o equilíbrio que ocorre em cada prato é atingido instantaneamente, uma vez inserida a amostra na coluna, ocorre de imediato a sua distribuição pelas fases móvel e estacionária. De seguida, a fracção de amostra é transportada pela fase móvel para um novo prato teórico onde ocorre novamente a sua distribuição por ambas as fases. Dependendo da maior ou menor afinidade dos componentes para a fase móvel, as velocidades de deslocamento de cada componente para o prato seguinte será diferente, o que provoca a sua separação.

A separação de dois componentes por eluição em coluna será tanto maior quanto o número de pratos teóricos que a coluna possuir, ou ainda, quanto mais baixa for a altura do prato teórico.

Contudo, a teoria dos pratos não é o modelo mais adequado para explicar o

que na realidade acontece num processo de separação cromatográfica. O transporte de espécies através da fase estacionária pela fase móvel é um processo contínuo e não descontínuo, como pressupõe este modelo. A velocidade da fase móvel influi directamente na forma dos picos, e este factor também não é contemplado na teoria dos pratos. Este modelo induz, igualmente, um raciocínio errado: se uma coluna pode ser considerada como um conjunto de pratos, quando se juntam duas colunas, a coluna resultante possuirá um número de pratos equivalente à soma dos pratos respectivos a cada coluna (no entanto, se juntarmos a uma coluna eficiente, uma coluna ineficiente, o número de pratos diminui e a resolução obtida será pior). Por fim, embora a teoria dos pratos preveja a forma gaussiana dos picos, não explica o processo de alargamento dos sinais.

Em 1956, Klinkenburg e Sjenitzer introduziram a seguinte relação para definir o prato teórico:

$$h = \frac{\sigma^2}{L} \quad (16)$$

em que, L , é a distância percorrida pela espécie e σ^2 é a variância da distribuição da espécie em torno do seu ponto de maior concentração. Este termo está directamente relacionado com o alargamento de banda, a largura do pico e com a resolução. Esta abordagem elimina o erro conceptual de os pratos serem aditivos. Foi a partir desta relação, que se deduziu a expressão que estima o número de pratos teóricos através dos parâmetros de um sinal cromatográfico:

$$N = 16 (t_r/W) \quad (17)$$

em que, W , é a largura do pico na sua base e t_r , é o tempo de retenção da espécie em estudo. Esta relação pode também exprimir-se do seguinte modo:

$$N = 5,54 (t_r/W_{1/2})^2 \quad (18)$$

em que, $W_{1/2}$, é a largura do pico a meia altura.

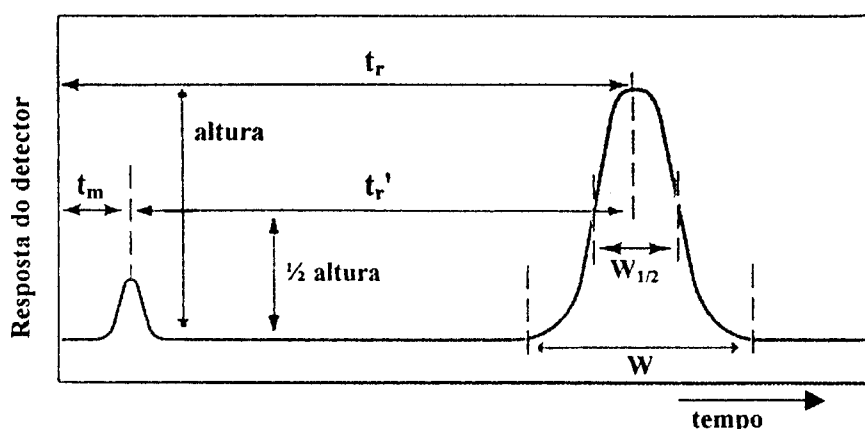


Figura 2.1. – Parâmetros necessários para estimar o número de pratos teóricos de uma coluna a partir de um pico cromatográfico

A teoria dos pratos teóricos é ainda uma ferramenta valiosa de avaliação da eficiência de uma coluna cromatográfica, contudo, a nomenclatura associada a este modelo é errónea, na medida em que, equipara a coluna cromatográfica a um conjunto de segmentos (pratos) nos quais existe um equilíbrio. Ora, a situação de equilíbrio numa separação cromatográfica nunca é atingida devido ao movimento contínuo da fase móvel.

2.1.5. O PROCESSO DE SEPARAÇÃO¹⁰

Uma separação cromatográfica pode ser vista da seguinte forma (Fig. 2.2):

- (a) Uma mistura de dois componentes, • e ▲ é aplicada no suporte cromatográfico.
- (b) O componente ▲ tem maior preferência pela fase estacionária do que o componente •.
- (c) Com a adição de novo eluente segue-se um novo equilíbrio: moléculas da amostra na fase móvel são adsorvidas parcialmente pela superfície “nua” da fase estacionária, enquanto que aquelas moléculas que já tinham sido adsorvidas previamente aparecem novamente na fase móvel.

(d) Após repetições sucessivas deste processo, os dois componentes da amostra são separados. O componente • tem maior preferência pela fase móvel e migra mais rapidamente que o componente ▲, que tende a agarrar-se à fase estacionária.

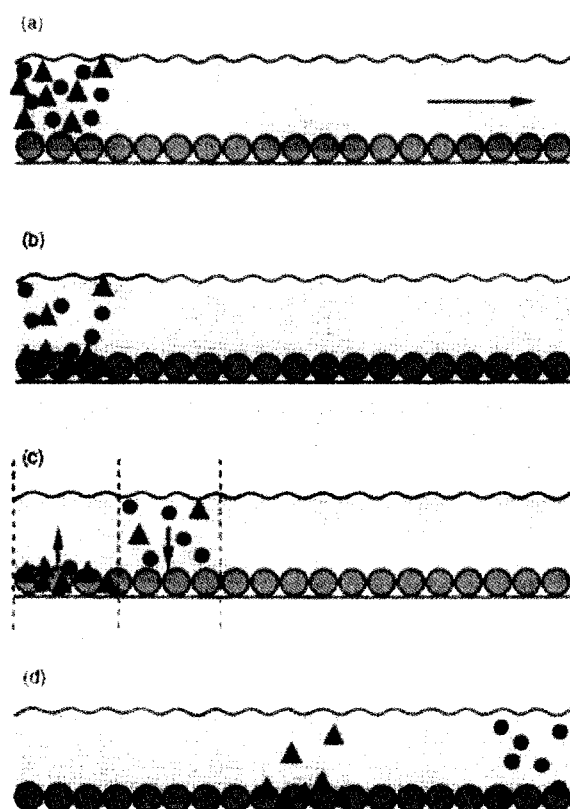


Fig. 2.2. - Representação de uma separação cromatográfica.

2.1.6. O APARELHO DE HPLC¹⁰

Um aparelho de HPLC pode ser considerado como um conjunto de módulos individuais, mas também pode ser concebido como um aparelho único. O conceito dos módulos é mais flexível no caso da falha de um único componente e para além disso as partes individuais não necessitam de ser da mesma marca.

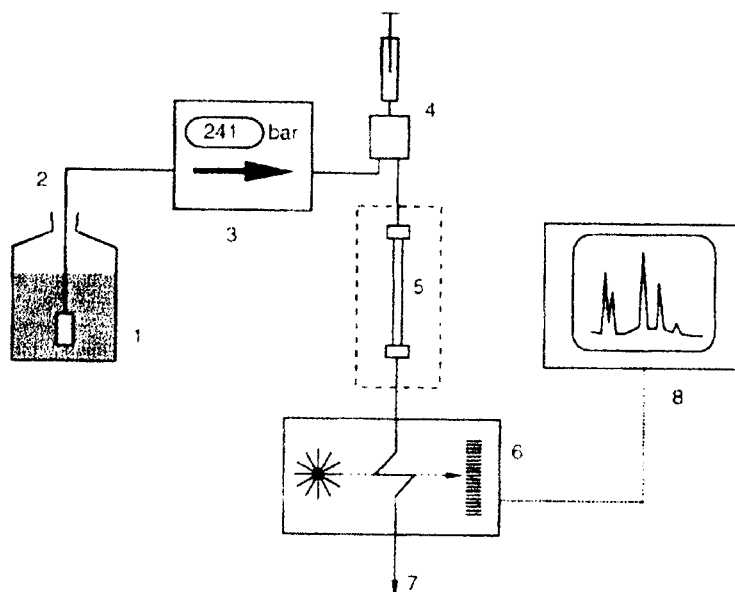


Fig. 2.3. - Diagrama esquemático de um aparelho de HPLC: (1) reservatório do eluente; (2) tubo de admissão com filtro; (3) bomba (com manómetro); (4) injetor da amostra; (5) coluna (com termostato); (6) detector; (7) esgoto; (8) registador de dados.

Um aparelho de HPLC tem pelo menos os elementos mostrados na Fig. 2.3. Apesar da coluna ser a parte mais importante, é normalmente a mais pequena. Para separações com temperatura controlada, a coluna tem que estar enclausurada num termostato. É frequente trabalhar-se com mais do que um eluente, pelo que são necessários um agitador e um controlador. Se a aquisição de dados é feita por um computador, este também pode ser usado para controlar todo o sistema.

2.1.7. CROMATOGRAFIA IÓNICA¹⁰

A cromatografia iónica (CI) é uma técnica de HPLC que foi desenvolvida para aplicação a iões inorgânicos. O princípio de detecção mais comum (universal) é controlando a condutividade da eluição.

As fases estacionárias usadas em CI (resinas sintéticas com grupos funcionais na superfície) têm uma capacidade de permuta inferior às usadas nas separações clássicas de permuta iónica. Portanto, a força iónica do eluente pode ser relativamente baixa e soluções de 1 mM são comuns. Fases móveis diluídas têm condutividade baixa, o que facilita a detecção. No entanto, mesmo com fases móveis com concentração baixa de electrólito, a condutividade de fundo é ainda relativamente alta, o que eleva o limite de detecção da técnica, reduzindo o seu interesse analítico. Para obviar este problema a CI inclui um sistema supressor químico da condutividade de fundo.

A supressão química funciona com a eliminação química dos iões tampão entre a coluna e o detector. O eluato flui através de uma coluna pequena empacotada com uma resina permutadora de iões ou através de um tubo de membrana permeável a iões. Os catiões tampão são substituídos por H^+ , e os aniões por OH^- , e forma-se água que tem uma condutividade muito baixa.

A figura 2.4. explica as reacções na coluna do supressor para a separação de catiões usando como eluentes ácidos diluídos (esquerda) e para a separação de aniões usando bases diluídas como eluentes (direita).

A coluna do supressor pode ser regenerada com a solução de tampão apropriada ou por geração electroquímica de OH^- e H^+ , respectivamente. Se duas destas colunas forem usadas em paralelo, uma delas pode ser usada para supressão do eluato enquanto que a outra é regenerada.

No ensaio cromatográfico seguinte a primeira coluna é regenerada enquanto que a outra funciona como supressor. Se for usado um supressor de membrana ou fibra, este é percorrido continuamente por uma solução básica (para análise de catiões) ou ácida (para análise de aniões) na sua superfície exterior para substituir os iões tampão penetrantes por água.

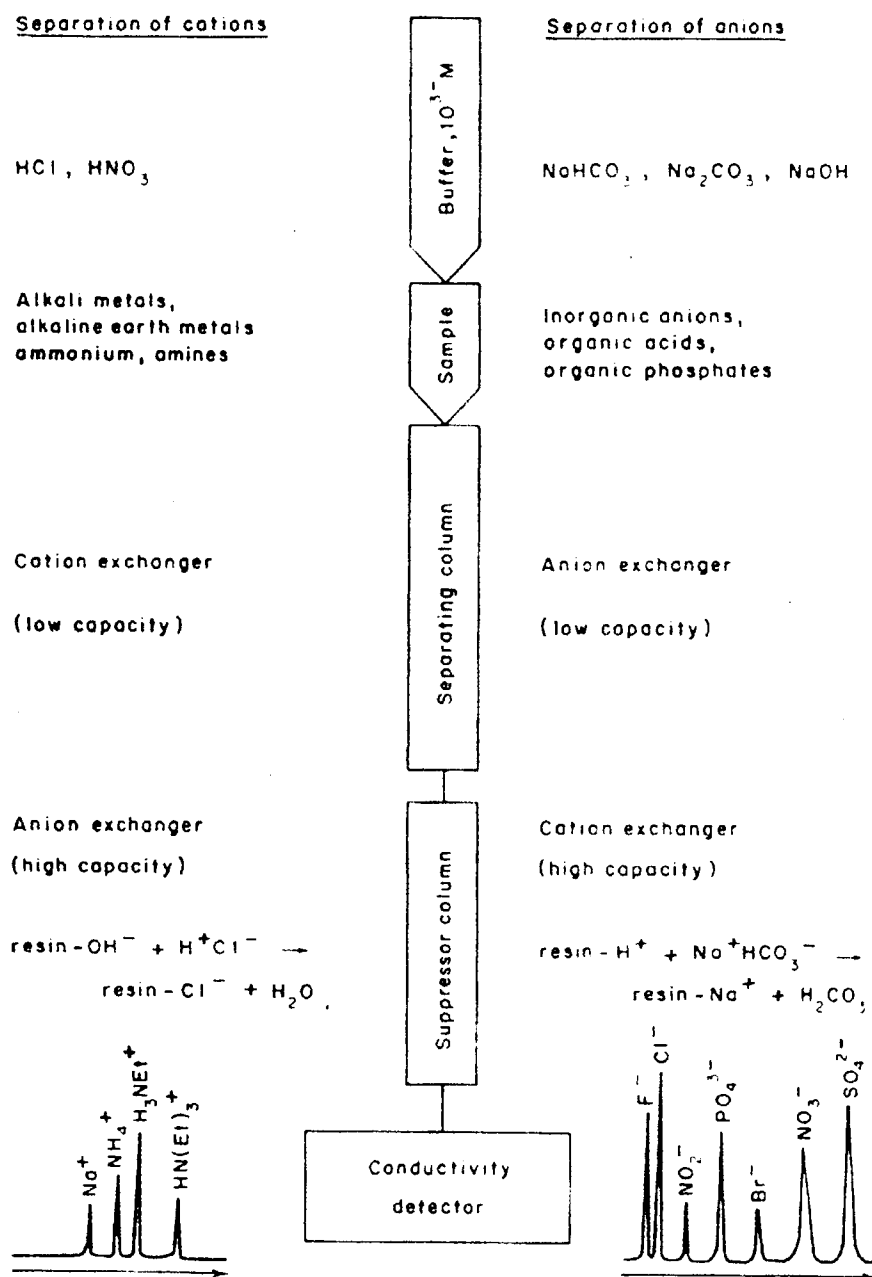


Fig. 2.4. – Cromatografia iónica com coluna de supressão.

É lógico então, que um sistema com supressão química também já tenha sido chamado de *dual-column ion chromatography*. A construção de uma curva de calibração é limitada, mas o limite de detecção é mais baixo do que com supressão electrónica.

A condutividade depende fortemente da temperatura, portanto o detector precisa de ser termostatzado cuidadosamente.

2.2. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA¹²

2.2.1. DEFINIÇÃO E MECANISMOS DE ABSORÇÃO

A espectrometria de absorção atômica trata do estudo da absorção da energia radiante nas zonas do visível e ultravioleta por átomos neutros no estado gasoso.

Se se fizer incidir sobre os átomos neutros dum elemento, no estado de vapor atômico, radiação na zona do visível ou ultravioleta e com a frequência característica do elemento considerado, então os átomos neutros livres do elemento são capazes de absorver essa radiação. Os átomos excitados voltam ao estado inicial de energia, parcialmente, por emissão à mesma frequência. De facto, quando um tal vapor é iluminado por um feixe de energia radiante apropriado, o átomo no estado fundamental absorve um fotão e a energia deste produz uma transição electrónica. Como cada átomo tem os seus níveis de energia bem definidos, somente podem ser absorvidos fotões de determinada frequência, o que corresponde a determinados comprimentos de onda.

Na figura seguinte, onde se mostra a transição entre o nível de energia E e o nível $E + h\nu$, podemos compreender o fenómeno envolvido no mecanismo de absorção atômica.

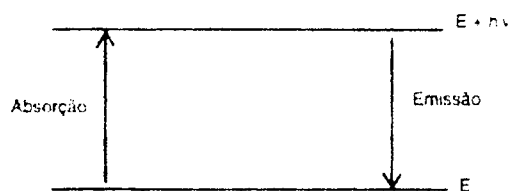


Fig. 2.5. – Mecanismo de Absorção e Emissão de Energia Radiante

Esta transição é produzida num átomo como resultado da absorção de energia radiante correspondente à frequência ν .

O regresso do electrão do nível de energia superior para o nível E é acompanhado de emissão de energia radiante.

$$\Delta E = E_1 - E_2 = h\nu \quad (19)$$

onde

$$\nu = c/\lambda \quad (20)$$

em que c é a velocidade da luz no vácuo e λ o comprimento de onda da radiação.

A energia radiante emitida pelos átomos é transmitida em todas as direcções, mas como a radiação da fonte é modulada para uma dada frequência consegue-se separar a radiação emitida pela fonte da fornecida pela chama.

Na absorção, um feixe de luz de intensidade definida e comprimento de onda específico é emitido pela fonte e passa através do meio absorvente. Se não houver absorção, como no caso em que o branco é pulverizado para a chama, toda a luz atingirá o detector do espectrofotómetro. Mas, se houver alguns átomos neutros no estado fundamental que possam absorver uma parte da energia radiante, esta energia é usada para excitar os átomos, pelo que a intensidade da luz transmitida é menor que anteriormente.

2.2.2. LEI DE LAMBERT-BEER

Em fotometria de chama de absorção atómica o feixe de radiação passa através de uma chama que contém os átomos absorventes. Este meio actua como se fosse a célula absorvente, de espessura definida, em espectrometria do visível e ultra violeta.

Admitindo que todos os átomos existentes no meio absorvente estão na forma neutra e no estado fundamental e ainda que não há efeitos de dispersão, se um feixe de luz paralela I_0 (de uma dada frequência) passa através de um percurso óptico b , o feixe emergente terá uma intensidade I (a essa frequência) dada por

$$I = I_0 \exp - Kb \quad (21)$$

O coeficiente de absorção K varia com a frequência, com o número de átomos presentes no meio absorvente, pressão e temperatura.

Por outro lado, pode também estabelecer-se a relação

$$I = I_0 \exp - K'c \quad (22)$$

em que c é a concentração do elemento no meio absorvente (que é proporcional ao número de átomos presentes na amostra), desde que se mantenham fixas a frequência, a pressão, temperatura e expressão do meio absorvente.

Assim pode chegar-se à lei de Bouguer-Lambert-Beer, vulgarmente conhecida por Lambert-Beer, conjugando as duas leis anteriores.

Tal como em espectrometria do visível e ultravioleta obtém-se

$$I = I_0 \exp - abc \quad (23)$$

ou, depois das transferências necessárias,

$$T = 10^{-abc} \quad (24)$$

$$\log I_0/I = \log 1/T = abc \quad (25)$$

esta expressão pode resumir-se na forma

$$A = abc \quad (26)$$

em que as letras têm o significado já dado anteriormente.

O coeficiente a é conhecido como absortividade e tem um valor característico para cada elemento e conjunto de parâmetros instrumentais, entre os quais o comprimento de onda. Por outro lado, é preciso notar que o valor de c se refere à concentração dos átomos na chama, ou seja, a sua pressão parcial.

Este valor é proporcional à concentração de solução aspirada através do valor do caudal de aspiração.

2.2.3. EQUIPAMENTO

Em qualquer aparelho de absorção atómica podemos distinguir os seguintes sistemas instrumentais:

- (a) Sistema de emissão – consiste numa fonte de radiação que emite o espectro do elemento a analisar; a radiação emitida é dirigida para o meio absorvente formado pelos átomos da amostra.
- (b) Sistema de absorção – o vapor atómico constitui o principal componente deste sistema e vai absorver parte da energia emitida pela fonte. Os sistemas e acessórios que estão envolvidos na produção do vapor atómico também fazem parte do sistema de absorção. No caso da EAA-C este sistema consiste na chama, no queimador, no pulverizador, capilares, tubos ou sistemas de injeção, reguladores e manómetros para controlar a pressão dos gases, chaminé, etc.
- (c) Sistema de selecção – diz respeito somente ao equipamento para selecção espectral. Este sistema inclui a parte óptica para selecção da zona do espectro em que será feita a determinação (filtros, monocromadores com prisma ou rede) e acessórios mecânicos (fendas, etc.).
- (d) Sistemas de detecção ou registo – consiste em sistemas para fotodetecção (fotodetectores não multiplicadores e fotomultiplicadores) e de medida. O sistema de detecção inclui todo o equipamento necessário para alimentar o fotomultiplicador, amplificação, etc.

Na próxima figura é mostrado esquematicamente um espectrofotómetro de absorção atómica com chama.

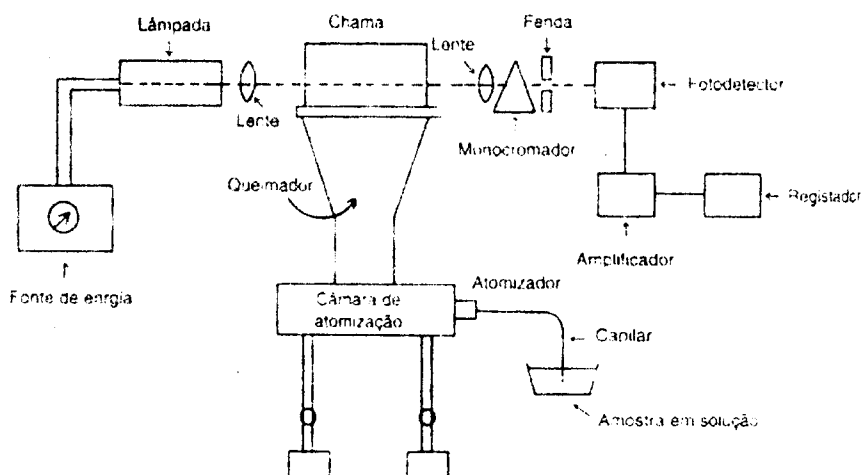


Fig. 2.6. - Esquema de um Espectrofotômetro de Absorção Atômica com Chama.

2.2.4. EAA COM ATOMIZAÇÃO POR CHAMA

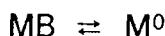
Quando a solução do elemento em estudo é vaporizada numa chama, dispondo-se uniformemente em pequeninas gotas e constituindo o que se pode chamar um aerossol, verificam-se os seguintes acontecimentos em série, num intervalo de tempo extraordinariamente curto:

- (1) A água (ou outro solvente) é vaporizada deixando partículas diminutas do sal, que são primeiro fundidas e depois vaporizadas.
- (2) Por vezes podem formar-se compostos intermediários e uma parte ou a totalidade das moléculas gasosas são progressivamente dissociadas de modo a originarem átomos neutros.
- (3) Uma percentagem dos átomos metálicos livres pode combinar-se com radicais, ou átomos presentes nos gases da chama, ou introduzidos concomitantemente com o elemento em estudo.
- (4) Os vapores dos átomos metálicos neutros, ou das moléculas contendo o átomo metálico encontram-se na sua quase totalidade no estado fundamental, podendo absorver radiação incidente específica

proveniente da fonte de emissão. Pode ocorrer ionização e excitação de átomos neutros à custa da temperatura da chama.

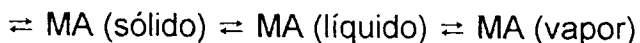
- (5) Dá-se uma inversão dos níveis excitados dos átomos, moléculas ou iões, para o estado electrónico fundamental, parcialmente por impactos com outras espécies e também espontaneamente por emissão de radiação.

Em resumo: os átomos livres na chama podem ser provenientes da dissociação directa do sal, ou podem formar-se a partir de compostos intermediários do metal com outras espécies existentes na amostra, ou nos gases da chama. Dentro destes, o caso mais vulgar é o da formação de óxidos podendo todo este processo esquematizar-se do seguinte modo:



onde M^0 é o metal livre, MA e MB são sais de átomos presentes nos gases da chama (ou introduzidos com o elemento em estudo) e MO é o óxido do metal.

Quando não se formam compostos intermediários, como se pode considerar, numa certa aproximação, para os metais alcalinos, as moléculas gasosas são totalmente dissociadas em átomos, não se formando, pelo menos em quantidades apreciáveis, quaisquer tipos de óxidos. Neste caso o mecanismo da dissociação pode esquematizar-se do modo seguinte:



A formação de compostos como os óxidos e os hidróxidos também pode ser uma consequência de reacções no estado gasoso. Assim, por exemplo, para o

cloreto de cálcio, depois de se formarem os átomos neutros, uma dada fracção desses átomos pode não só ionizar-se mas também formar moléculas CaOH e CaO .

O tipo de atomização mais usado é por chama, em grande parte devido à sua simplicidade e também à rapidez de análise. As chamas mais usadas são as de Ar-Acetileno e Protóxido de Azoto-Acetileno. A chama de Ar-Acetileno chega a atingir temperaturas de 2100-2400 K, o suficiente para cerca de 30 elementos. A chama de protóxido de azoto-acetileno pode atingir temperaturas de 2650-2800 K, o que dá para atomizar cerca de 60 elementos.

No entanto, a EAA-C tem algumas limitações:

- (a) Baixo tempo de residência dos átomos (< 0.001 s) sob acção directa da radiação na chama, devido à elevada velocidade de transporte pelos gases (≈ 200 cm/s).
- (b) Apenas as gotas mais pequenas (com $\phi < 1$ μm) da solução aspirada atingem a chama, o que corresponde apenas a aproximadamente 10 %.

Estes dois factores contribuem para uma sensibilidade da técnica relativamente baixa, ou seja, com limites de detecção da ordem dos mg/l. Para além disso, é necessário um volume apreciável de amostra (≈ 1 ml no mínimo), não permitindo esta técnica a análise de amostras sólidas ou em suspensão.

2.2.5. EAA COM ATOMIZAÇÃO ELECTROTÉRMICA

Na atomização electrotérmica, a amostra líquida, em suspensão ou sólida, é introduzida numa pequena câmara de grafite com 2-3 cm de comprimento, que é submetida a um aquecimento progressivo previamente programado. A temperatura da câmara aumenta proporcionalmente à diferença de potencial aplicada nos extremos da câmara, sendo o aquecimento desenvolvido por efeito de Joule. Nesta técnica reduz-se a formação de óxidos porque tudo se passa em atmosfera de gás inerte e as temperaturas são mais elevadas. O gás inerte serve também para evitar a desintegração da câmara de grafite por oxidação do carbono.

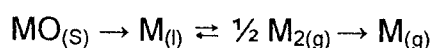
O programa de temperatura aplicado na câmara depende do elemento a analisar e também da composição global da amostra. Um programa típico tem 4 estágios de temperatura:

- (1) secagem, para a evaporação lenta do solvente;
- (2) pirólise, para destruição da matriz da amostra;
- (3) atomização do elemento;
- (4) limpeza da câmara.

Durante os estágios (1), (2) e (4) (e em alguns casos também durante a atomização), um gás inerte (azoto ou argon) passa através da câmara, criando assim uma atmosfera inerte que também seca a amostra e elimina vapores dos constituintes da matriz.

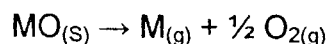
A redução dos óxidos sólidos na câmara de grafite originando átomos neutros no estado gasoso pode dar-se de acordo com diferentes reacções, como se indica a seguir:

1)



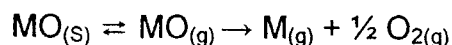
no caso dos metais Co, Cr, Cu, Fe, Mo, Ni, Pb, Zn e V

2) a decomposição térmica do óxido sólido, de acordo com a reacção:



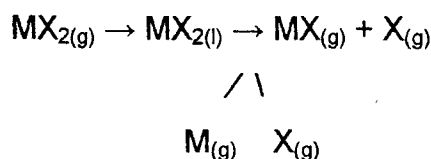
no caso do Al, Cd, Zn

3) dissociação de moléculas do óxido na fase vapor, de acordo com:



para M = Cd, Mg, Mn, Zn

4) dissociação de moléculas de halogenetos na fase de vapor, de acordo com:



para M = Cd, Ta, Zn e X = Cl.

O sinal que resulta da absorção é de natureza transitória, pois a análise é realizada em "batch". A área do sinal (e também a respectiva altura em muitos casos) é directamente proporcional à quantidade de elemento presente na câmara. A maior sensibilidade da EAA-AE em relação à EAA-C resulta do facto dos átomos permanecerem no atomizador por um período de tempo muito superior (< 1 s). Os limites de detecção estão normalmente dentro do intervalo 0.1-1 µg/l. Para a realização de um ensaio é necessário apenas um pequeno volume de amostra (10-50 µl), sendo a técnica compatível com a análise directa de sólidos em suspensão ou sólidos, sendo estes colocados directamente num atomizador adequado para esse efeito. O tempo de cada análise é de cerca de dois minutos.

As determinações por EAA-AE têm um tipo de interferências diferentes: interferências físicas (no caso da viscosidade e da tensão superficial das amostras ser diferente das dos padrões usados nas calibrações), absorção de fundo (no caso da existência no atomizador de espécies moleculares que absorvam a radiação ao mesmo comprimento de onda do analito), e interferências químicas e efeitos de matriz (F, Br e I, e principalmente Cl, geralmente presente nas amostras podem formar moléculas diatómicas que dão origem a interferências químicas na atomização). Se parte de um sal volátil do analito se perder na fase de pirólise e/ou se a dissociação na fase de atomização não for completa, a absorção do analito será afectada.

As interferências físicas são normalmente minimizadas pela adição à amostra de padrões e um branco de um surfatante, por exemplo o Triton X – 100, que modifica e uniformiza a tensão superficial da amostra. Se este procedimento não for suficiente, a matriz da amostra deverá ser destruída previamente. A

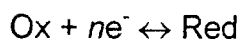
absorção de fundo é corrigida automaticamente nos aparelhos comerciais que têm sistemas de correcção eficientes. As interferências químicas e os efeitos de matriz são normalmente minimizados pela adição à amostra de um modificador de matriz (ácidos sulfúrico, ascórbico e nítrico, e sais de amónio, nitrato ou dihidrogenofosfato, e sais de Pd(II)) que têm a função de facilitar a remoção do halogénio na fase de pirólise e/ou estabilizar o analito.

2.3. VOLTAMETRIA⁸

2.3.1. INTRODUÇÃO

A Voltametria é o ramo da Química Analítica que trata da medição e interpretação da relação corrente-potencial, durante a electrólise duma solução.

Numa experiência voltamétrica, o potencial é variado de forma sistemática. Na presença de uma espécie electroactiva e para valores de potencial pequenos há apenas uma corrente residual, até se atingir o potencial de decomposição da espécie. Se se aumenta mais o potencial aplicado, a concentração da espécie electroactiva à superfície do minieléctrodo diminui, até que se torna praticamente nula. Nesta altura, um aumento no valor do potencial já não pode aumentar a intensidade de corrente, que é agora limitada pela velocidade com que os iões da espécie electroactiva atingem a superfície do eléctrodo vindos do interior da solução, onde são imediatamente reduzidos. Nestas condições, o cátodo apresenta sobretensão de concentração e a corrente que passa através da célula depende da concentração da espécie electroactiva, no interior da solução. Portanto, na presença de uma espécie electroactiva, será registada uma corrente quando o potencial aplicado se torna suficientemente positivo ou negativo para que a espécie sofra electrólise (em ambos os lados do potencial padrão, E^0 , para a equação redox da espécie). Para sistemas controlados pelas leis da termodinâmica, o potencial aplicado, E , controla a concentração da espécie electroactiva:



na superfície do eléctrodo de acordo com a equação de Nernst:

$$E = E^0 + 2.303 (RT/nF) \log (C_{\text{Ox}}/C_{\text{Red}}) \quad (27)$$

onde C_{Ox} e C_{Red} são as concentrações das formas oxidada e reduzida da espécie electroactiva, respectivamente, n é o número de electrões transferidos na reacção, R é a constante dos gases ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T é a temperatura (K), e F é a constante de Faraday (96490 C mol^{-1}).

A corrente resultante da mudança do estado de oxidação da espécie electroactiva é denominada como “corrente farádica” uma vez que obedece à Lei de Faraday. A corrente farádica é uma medida directa da velocidade da reacção redox que toma lugar no eléctrodo, e depende sobretudo de duas coisas: (1) a velocidade à qual a espécie se desloca do meio da solução para o eléctrodo (transporte de massa); (2) a velocidade à qual os electrões se transferem do eléctrodo para as espécies em solução e vice-versa (transferência de carga). O processo com menor velocidade vai controlar a grandeza da corrente.

O gráfico resultante da representação corrente-potencial é chamando de voltamograma. Dependendo da natureza da medição, podemos observar a resposta em forma de pico ou onda. A forma de S obtida quando se representa a intensidade de corrente em função do potencial, é explicada pela equação de Heyrovsky-Illkovic (derivada da equação de Nernst):

$$E = E^0 - 2.303 (RT/nF) \log (i/(i_d - i)) \quad (28)$$

A corrente máxima de redução (i_d) é obtida a potenciais muito mais negativos do que o potencial de redução da espécie redox; a corrente é então limitada pela difusão da espécie electroactiva para o eléctrodo, e é chamada de corrente limitada por difusão. Como o potencial de decomposição característico da espécie é difícil de determinar, é preferível usar o potencial de meia onda ($E_{1/2}$ -

valor para o qual a intensidade de corrente é metade da corrente de difusão) para caracterizar uma dada substância.

As medições voltamétricas são realizadas normalmente numa célula electroquímica, que inclui normalmente um vaso (10 a 200 ml de capacidade) de vidro, quartzo ou politetrafluoroetileno. A célula contém 3 eléctrodos (de trabalho, referência, e auxiliar) que estão imersos na solução amostra. Estes eléctrodos, assim como um tubo para borbulhar o gás de desoxigenação e um agitador, estão suportados em buracos na cobertura. A cobertura é feita de PTFE ou Plexiglas. Existe outro buraco na cobertura que é usado para fazer adições de padrão. A célula usada no presente trabalho é apresentada na figura seguinte.

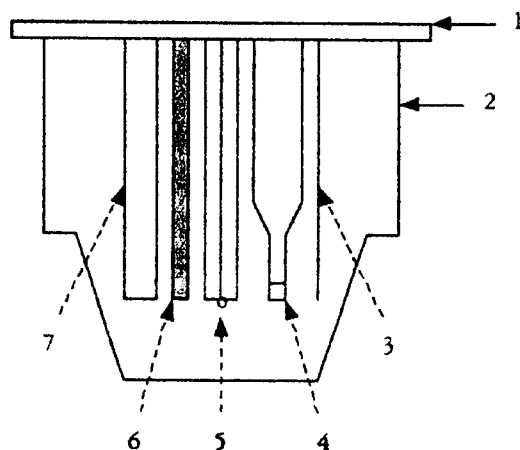


Fig. 2.7. - Célula electroquímica usada no presente trabalho. (1) cobertura; (2) vaso; (3) tubo do gás inerte; (4) eléctrodo de referência; (5) eléctrodo de trabalho; (6) eléctrodo auxiliar; (7) agitador.

Normalmente, os eléctrodos de trabalho em voltametria caracterizam-se pela sua pequena área de superfície, que minimiza perda (por electrólise) do analito. Os eléctrodos de mercúrio, sobretudo o eléctrodo de mercúrio de gota suspensa são por norma utilizados. Eléctrodos sólidos feitos de ouro, carbono ou platina são usados para a determinação de metais, com potenciais de oxidação

mais anódicos do que o mercúrio (Se, Ag, Au). Os eléctrodos de mercúrio são usados mais frequentemente, pois cumprem as necessidades de sensibilidade e reprodutibilidade, para além de terem um potencial catódico alargado.

O eléctrodo de referência tem um potencial estável e conhecido, que é insensível à composição da solução em estudo, e com o qual é comparado o potencial do eléctrodo de trabalho. Como resultado da sua composição constante, o eléctrodo de referência permanece impolarizável durante a análise. O eléctrodo de prata-cloreto de prata (usado no presente trabalho) e o saturado de calomelanos, ligados à solução amostra por uma ponte salina, são escolhas comuns para eléctrodos de referência.

O terceiro eléctrodo, o eléctrodo auxiliar (contra eléctrodo), é usado normalmente para minimizar erros de resistência da célula no controle do potencial do eléctrodo de trabalho. O eléctrodo auxiliar é feito de um material condutor quimicamente inerte com uma área de superfície razoável. Os eléctrodos de platina ou de grafite (usado neste trabalho), são os mais usados.

2.3.2. O ELÉCTRODO GOTEJANTE DE MERCÚRIO

Um eléctrodo gotejante de mercúrio consiste essencialmente num tubo capilar, ligado a um reservatório que contém uma coluna de mercúrio metálico puro. À medida que o mercúrio passa através do capilar forma-se uma gota no orifício de saída. Esta cresce até atingir um tamanho máximo, de uma forma perfeitamente definida, que depende do raio de abertura do capilar e da tensão superficial entre o mercúrio e a solução. Depois, a gota cai e uma outra começa a formar-se e este processo repete-se indefinidamente.

Uma das mais importantes vantagens deste tipo de eléctrodo em relação a um eléctrodo de metal sólido, como a platina, é o valor elevado da sobretensão para a libertação de hidrogénio em mercúrio. Este facto, torna possível estudar a redução de muitas substâncias, incluindo mesmo os iões de metais alcalinos e os alcalino-terrosos, que não se podiam depositar num cátodo de platina sem influência da redução simultânea da água, ou do hidrogenião. Ao contrário de um

eléctrodo sólido, um eléctrodo gotejante tem uma superfície perfeitamente lisa, livre de estrias, ou outras quaisquer irregularidades, o que simplifica bastante o cálculo da área do eléctrodo. Devido à superfície do eléctrodo ser renovada todos os três, ou quatro, segundos pela queda de uma gota e crescimento de uma outra gota não se acumulam substâncias adsorvidas ou depositadas à superfície do eléctrodo. Os numerosos metais solúveis em mercúrio comportam-se mais reprodutivelmente e reversivelmente quando amalgamados do que no estado sólido puro, e é esta a razão por que os eléctrodos indicadores feitos de tais metais são frequentemente amalgamados para o uso potenciométrico. Finalmente, o eléctrodo gotejante é muito menos sensível a perturbações mecânicas do que os microeléctrodos sólidos estacionários porque qualquer perturbação que faça o segundo vibrar durante algum tempo faz somente cair uma gota do eléctrodo gotejante sem ter grande efeito na seguinte. Num microeléctrodo sólido estacionário, o gradiente de concentração, devido ao fluxo da corrente que vai passando na solução, vai-se estendendo através dela com o tempo e faz com que os iões se tenham que difundir de uma distância cada vez maior para atingir a superfície do eléctrodo, resultando num decrescimento da corrente. Com o eléctrodo gotejante verifica-se que a queda de cada gota agita a solução, em torno da abertura do capilar, e portanto cada nova gota vai-se formar num meio que tem quase exactamente a mesma composição que a anterior.

Por outro lado, há certas limitações associadas ao eléctrodo gotejante. O mercúrio metálico pode oxidar-se e assim, mesmo em soluções que contenham aniões não complexantes, como perclorato e nitrato, a oxidação do mercúrio começa a um potencial próximo de + 0.4 V, em relação ao eléctrodo saturado de calomelanos. Como a actividade do mercúrio metálico, à superfície do eléctrodo gotejante, é naturalmente unitária, verifica-se, atendendo à equação de Nernst, que a concentração de ião mercurioso dissolvido, ou mercúrio presente em torno da gota, deve ser muito grande, mesmo para potenciais só ligeiramente mais positivos que o indicado. Assim, começa a passar uma corrente negativa (anódica) de grande intensidade, tornando impossível medir, ou mesmo detectar, uma pequena corrente adicional, devido à redução, ou oxidação, de qualquer substância inicial presente na solução. Este limite de potenciais, para os quais, se

podem obter valores com este eléctrodo, é mesmo menos positivo, em soluções que contenham iões como cloreto, cianeto, ou hidróxido, que se combinam tanto com o ião mercurioso como mercúrico, facilitando assim a oxidação do mercúrio metálico. Para zonas de potencial em que o mercúrio se oxida, não há modo de evitar as desvantagens de um microeléctrodo sólido.

2.3.3. VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO CATÓDICA COM ADSORÇÃO

Na Voltametria de Redissolução Catódica com Adsorção (VRCA) o microeléctrodo, em geral o de gota suspensa de mercúrio, é introduzido numa solução agitada durante vários minutos, adicionando-se um reagente auxiliar que complexa o ião metálico e fica adsorvido no eléctrodo. A deposição é devida a um fenómeno de adsorção à superfície do eléctrodo, não sendo pois uma deposição electrolítica. Depois de um tempo de acumulação suficiente, para-se a agitação e a espécie depositada é determinada por voltametria, podendo-se variar o potencial dum modo linear, diferencial com impulsos ou em onda quadrada.

Desta forma o método pode ser aplicado à determinação de uma grande variedade de catiões inorgânicos, para valores de concentração muito baixos.

Neste caso, não é necessário que um metal seja solúvel em mercúrio, como acontece na voltametria de redissolução anódica. A técnica de voltametria de redissolução catódica com adsorção apresenta ainda duas outras vantagens: (1) qualquer estado de oxidação do elemento pode ser depositado no eléctrodo e não somente o metal e (2) a substância é depositada como uma monocamada à superfície do eléctrodo, de modo que toda a espécie está disponível para a redução. Assim, a intensidade da corrente não depende da difusão, podendo aplicar-se valores mais elevados da velocidade de varrimento que os utilizados na voltametria de redissolução anódica usual, o que produz intensidades de corrente superiores e permite atingir-se limites de detecção da ordem de 10^{-9}M (nM).

Neste tipo de métodos o eléctrodo de gota suspensa tem a grande vantagem de reproduzir facilmente uma nova superfície, após formação de uma

nova gota de mercúrio, já sem os efeitos de qualquer contaminação provocada pelo processo de adsorção.

Usando voltametria com onda quadrada no processo de redissolução existe a vantagem de que o oxigénio dissolvido interfere menos (ou não interfere mesmo) no processo electroquímico devido ao uso de frequências elevadas nesta técnica. Este comportamento é devido ao facto da redução de oxigénio no mercúrio ser um processo irreversível.

2.3.4. VOLTAMETRIA COM ONDA QUADRADA¹³

Neste tipo de voltametria aplica-se uma variação do potencial em onda quadrada (ver Fig. 2.8), sobreposta a uma rampa de potencial aplicado durante um tempo extraordinariamente curto, sendo a intensidade da corrente medida somente na última fase de cada meio ciclo. Este tipo de voltametria discrimina a corrente de carga, baseada nas diferentes velocidades de decaimento da corrente seguindo um degrau de potencial.

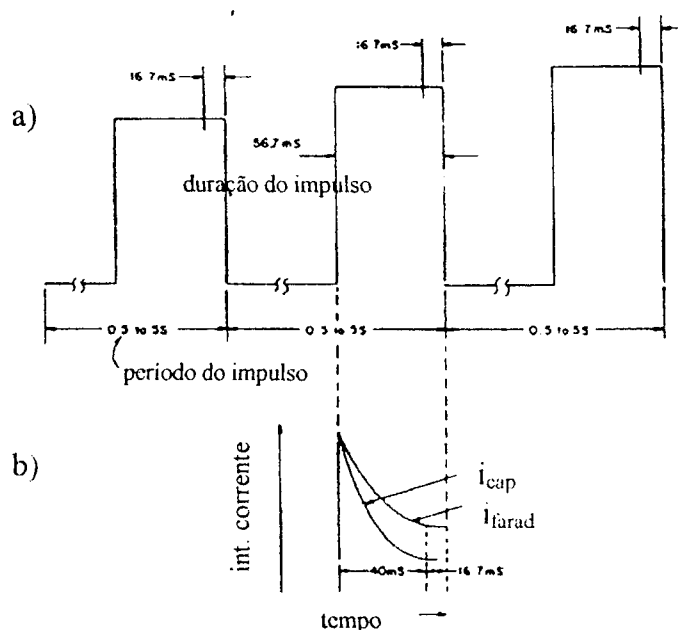


Fig. 2.8. – a) Forma de variação do potencial em voltametria normal por impulsos e b) variação da intensidade de corrente durante a aplicação do impulso.

A corrente total é representada em função do potencial. A alta frequência dos ciclos de onda quadrada necessita de soluções de alto conteúdo de electrólito de suporte para permitir o decaimento rápido da corrente de carga. Para além da correcção da corrente de carga, a corrente analítica é realçada pela corrente inversa associada à deposição do metal.

A corrente do pico (altura), i_p , é proporcional à concentração do metal na solução da amostra, se forem assumidas condições de deposição reprodutíveis. O potencial do pico (potencial correspondente ao valor máximo), E_p , serve para identificar o metal na amostra (potencial de meia onda, que está relacionado com o potencial normal de redução do metal).

Hoje em dia é possível determinar cerca de 40 elementos numa grande variedade de amostras por ACSV.

A ACSV é uma técnica que também pode servir para fazer especiação química, uma vez que apenas uma fracção reactiva (lábil) é determinada. De facto, a especiação na amostra é perturbada pela adição de um ligando activo ou ligando competitivo (L_c); a extensão da alteração depende da estabilidade do complexo ML_c , e pode ser regulado variando a concentração de L_c ou seleccionando ligandos de estabilidades variáveis. Portanto, é possível investigar selectivamente complexos naturais fortes ou fracos variando a "janela de detecção". A janela de detecção é determinada pela sensibilidade do procedimento analítico (o limite de detecção define as menores concentrações determináveis de metal lábil ou livre e portanto os seus complexos mais fortes) e por outros aspectos da técnica tais como a perturbação do equilíbrio e a sua definição de concentração de metal lábil (reactivo). A concentração de metal lábil em ACSV equivale a todo o metal ligado pelo ligando adicionado na escala de tempo da técnica, que compreende todos os complexos de metal cineticamente lábeis, mais fracos do que aqueles com L_c .

As medições da concentração de metal lábil são realizadas em condições de equilíbrio se o quelante adicionado tiver tempo suficiente para equilibrar com a espécie metálica (pode demorar várias horas).

A "capacidade complexante" de águas naturais (a quantidade de metal que está ligado por material orgânico dissolvido) também pode ser determinada por

titulação por ACSV de uma amostra com um metal e controlando a concentração do metal lábil. A concentração de ligandos complexantes naturais é assim determinada. Para além disso, o valor da constante de estabilidade condicional do complexo formado pode ser calculada a partir da linearização dos dados. A ACSV tem vantagem para a determinação das capacidades de complexação de águas naturais, quando comparada com ASV, uma vez que não envolve a deposição de metal a potenciais negativos, levando à dissociação de complexos naturais e, consequentemente a falsos valores de capacidade baixa.

CAPÍTULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

PARTE II

METODOLOGIAS, RESULTADOS E CONCLUSÕES

3.1. EQUIPAMENTO

3.1.1. CROMATOGRAFIA

Nas determinações cromatográficas usou-se um sistema de HPLC/CI da marca Dionex (modelo 4000 i).

Na cromatografia em fase reversa para determinação de tióis usou-se uma coluna Vydac 218TP5405 (C18, 5 μ m, 4.6 mm ID x 59 mm L) e um detector UV-Vís (modelo 204, da KONIK INSTRUMENTS).

Na cromatografia de permuta aniónica para a determinação de ácidos carboxílicos usou-se uma coluna AS5A (5 μ m, com 12 cm de comprimento) e um detector de condutividade (DIONEX). Alternativamente usou-se um detector electroquímico (DIONEX).

3.1.2. VOLTAMETRIA

O equipamento voltamétrico usado era constituído por um sistema Autolab (Ecochemie, Utrecht, The Netherlands) acoplado a um posto de titulação da marca Metrohm, modelo 663 VA (Herisau, Switzerland), provido de um Eléctrodo de Mercúrio de Gota Suspensa (tamanho da gota: 0,52 mm²). O eléctrodo de referência era de dupla junção $\text{Ag(s)}|\text{AgCl (s)}|3 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}||3 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$, e o eléctrodo auxiliar era de carbono vítreo. Durante o passo de adsorção as soluções foram agitadas com uma vara rotativa de politetrafluoroetileno (PTFE) a 2500 rpm. O polarógrafo Autolab era controlado por um computador compatível (IBM-AT).

3.1.3. ABSORÇÃO ATÓMICA

Usou-se um Espectrofotómetro de Absorção Atómica Philips PU 9200 X para as análises por chama, e um Espectrofotómetro de Absorção Atómica Perkin Elmer 4100 ZL com Atomizador de Grafite Aquecido Transversalmente para as análises por câmara de grafite.

3.2. REAGENTES E SOLUÇÕES

A água usada no decorrer das experiências era desionizada (condutividade $< 0.1 \mu\text{S cm}^{-1}$).

Todos os reagentes usados eram de qualidade *pro analyse*.

Soluções de stock. As soluções de cisteína e glutatona 0.01 M (ambas da BDH, Biochemicals) foram preparadas, no próprio eluente cromatográfico por pesagem, semanalmente e mantidas a 4 °C.

As soluções dos ácidos fórmico (Merck), succínico (Merck), malónico (Merck), maleico (M & B), oxálico (Prolabo) e cítrico (Merck) foram preparadas, por pesagem, semanalmente e mantidas a 4 °C.

Soluções padrão. As soluções da cisteína e glutatona foram preparadas por diluição das soluções stock em ácido trifluoroacético (TFA, Merck) a 0.1% (v/v).

As soluções dos ácidos carboxílicos foram preparadas por diluição em H₂O desionizada.

Solução para o supressor de sinal do Cl. Usou-se uma solução de H₂SO₄ 12.5 mM

Eluentes. Como eluentes em cromatografia em fase reversa usou-se soluções aquosas de (1) TFA a 0.1% (v/v) e (2) acetonitrilo 50% (ACN, Merck) e TFA 0.1% preparados por diluição de soluções concentradas.

Como eluentes em cromatografia iônica usou-se uma mistura de NaHCO₃ 0.0028M e Na₂CO₃ 0.0033M (ambos da May & Baker LTD) para determinação dos carboxilatos formato, succinato, malonato, malato e oxalato, enquanto que para a determinação de citrato se usou NaOH 100 mM (Merck).

Solução nutriente. A solução nutriente usada na conservação das plantas continha 2 mM de Ca(NO₃)₂ (M & B), 1 mM de KNO₃ (Merck), 0.5 mM de MgSO₄ (Fluka), 0.08 mM de KH₂PO₄ (Merck), 0.01 mM de H₃BO₃ (Aldrich), 1.0 mM de ácido 2-(4-morpholino)-etano sulfônico (Sigma), 0.5 mM de NaOH (Merck), 0.1 μM de NaMoO₄ (Aldrich), 8.0 μM de ZnCl₂ (Merck), 0.6 μM de MnCl₂ (Dupermo), 1.0 μM de CuCl₂ (Merck), 75 μM de FeCl₃ (Sigma) e 100 μM de ácido N-hidroxietililenodiaminotriacético (HEDTA, Merck) para quelatar os metais e

tamponar a disponibilidade de nutrientes solúveis contra remoção por absorção pelas plantas.

Solução de hipoclorito de sódio. Usou-se uma solução de hipoclorito de sódio a 20 % (José M. Vaz Pereira, Lda.) com uma gota de Triton X (Merck) para destruir e remover microorganismos das plantas.

Soluções padrão de metal. As soluções padrão de íões metálicos usadas nas determinações voltamétricas e espectrofotométricas foram preparadas por diluição das soluções padrão para espectrometria de absorção atômica (BDH, Spectrosol).

Soluções de salicilaldóxima. Foi preparada mensalmente uma solução de salicilaldóxima (Aldrich) 0.01 M em HCl 0.1 M, que foi armazenada a 4°C.

Soluções tampão. Foi preparada uma solução 1 M em ácido bórico e 0.35 M em amoníaco (tampão borato) para ser usada nas determinações voltamétricas; 100 µl deste tampão em 10 ml de amostra a analisar resultavam num pH de 8.35.

Soluções usadas na realização de algumas experiências

- Solução A - 100 ml água desionizada (controlo);
- Solução B - 100 ml de uma solução 1µM em Cu (partindo de uma solução padrão 15.7 mM de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (BDH, Spectrosol);
- Solução C - 100 ml de uma solução 1µM em Pb (partindo de uma solução padrão 4.83 mM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (BDH, Spectrosol);
- Solução D - 100 ml de uma solução 1µM em Cd (partindo de uma solução padrão 8.90 mM de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (BDH, Spectrosol).

Solução semelhante à do lago quanto a alguns metais. Após analisar água retirada de lagos do Parque da Cidade do Porto, onde cresce a *Cyperus eragrostis* Lamarck foi preparada uma solução "semelhante" com a seguinte composição: $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$ $1.18 \times 10^{-6} \text{M}$ (BDH, Spectrosol), $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ $1.68 \times 10^{-7} \text{M}$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ $1.57 \times 10^{-7} \text{M}$ (Panreac), $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ $8.01 \times 10^{-7} \text{M}$ (BDH Spectrosol), $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ $2.06 \times 10^{-4} \text{M}$ (Panreac), CaCl_2 $8.60 \times 10^{-4} \text{M}$ (Merck), NaCl $7.81 \times 10^{-4} \text{M}$ (Panreac) e KCl $3.89 \times 10^{-4} \text{M}$ (Panreac).

3.3. DESCONTAMINAÇÃO DO MATERIAL

Todo o material incluindo filtros, erlenmeyers e material de plástico, garrafas de polycarbonato e plástico (pontas de pipetas, sistemas de filtração, etc) foram previamente lavadas com ácido (com HCl 1 M durante 1 semana) e posteriormente passadas por água desionizada.

A manipulação das amostras foi realizada, usando luvas, numa câmara de fluxo laminar num laboratório de limpos com ar filtrado num filtro de alta eficiência de remoção de partículas.

3.4. MÉTODOS

3.4.1. DETERMINAÇÃO DE TIÓIS (Cisteína e Glutathiona)

Usando HPLC

Após estudos preliminares de optimização as condições seleccionadas para determinação dos tióis foram as seguintes:

O volume de solução padrão injectada foi de 50 µl.

Na eluição usou-se um sistema de gradiente programado do seguinte modo:

- 0 minutos - TFA 0.1% (v/v);
- 20 minutos - ACN 50%, TFA 0.1%.

Utilizou-se um detector UV/Vís, a operar a 215 nm. Inicialmente usou-se um detector electroquímico, mas foi abandonado pois o sinal obtido era bastante instável, o que levava a que os picos fossem pouco definidos.

O fluxo da fase móvel foi de 1 ml/min.. Fluxos menores diminuíam a sensibilidade dos picos, enquanto que fluxos superiores reduziam a resolução.

Foram traçadas rectas de calibração usando soluções padrão mistas de cisteína e glutathiona. O tempo de retenção da cisteína foi de 3.5 minutos e o da glutathiona de 5.5 minutos. A partir das curvas de calibração determinou-se os respectivos limites de detecção do método.

Usando Voltametria

O método para determinação de tióis já estava estabelecido⁸.

Os padrões foram medidos pipetando 10 ml de solução para uma célula voltamétrica e adicionado tampão borato (0.01 M).

A solução foi purgada (5 minutos) com Argon (livre de O₂) ao qual se seguiu o passo de adsorção. O tempo de adsorção (tempo de deposição, t_d) foi de 60 s a um potencial de deposição (E_d) de - 0.25 V. O varrimento de potencial foi de -0.15 a -0.90 V, usando modulação por onda quadrada. Os parâmetros de varrimento foram: velocidade, 20 mVs⁻¹; amplitude de modulação, 25 mV; degrau de potencial, 2.44 mV; frequência, 50 Hz.

O pico da cisteína aparece a -0.47 V e o da glutatona a -0.58 V.

3.4.2. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

As condições seleccionadas para a determinação de ácidos carboxílicos, por cromatografia de permuta aniónica foram as seguintes:

O volume de solução padrão injectada foi de 50 µl.

O fluxo da fase móvel foi de 1 ml/min.

Foram traçadas rectas de calibração usando soluções padrão de formato, succinato, malonato, maleato e oxalato juntos em solução do eluente (NaHCO₃ 0.0028M e Na₂CO₃ 0.0033M) e a partir delas determinou-se o respectivo limite de detecção do método. Foi feito o mesmo para o citrato, mas usando apenas este em NaOH 100 mM. Os tempos de retenção foram os seguintes: formato, 2.1 minutos; succinato, 6.4 minutos; malonato, 7.6 minutos; malato, 9.5 minutos; oxalato, 12.8 minutos; citrato, 2.4 minutos.

3.4.3. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE LIGANDOS COMPLEXANTES DE Cu E DAS CONSTANTES DE ESTABILIDADE CONDICIONAIS DOS RESPECTIVOS COMPLEXOS

A concentração total de ligandos orgânicos que formam complexos de Cu inertes em VRC (C_L) e as respectivas constantes de estabilidade condicionais (K'_{CuL}) foram determinadas por titulação com Cu, por VRC usando um ligando de competição (salicilaldóxima, SA). Para o efeito, as amostras foram primeiramente filtradas, através de um filtro com porosidade de 0.45 μm . Adicionou-se tampão borato (0.01 M) e SA (5 μM) a 100 ml (volume final de amostra diluída). Aliquotas de 10 ml foram pipetadas para 10 tubos de poliestireno (Sterilins de ≈ 28 ml de volume) contendo Cu adicionado na gama de 0-180 nM, em incrementos aproximadamente iguais. As soluções ficaram em equilíbrio durante a noite (12-15 h) anterior às medições.

A concentração de metal operacionalmente lábil ($[Cu]_{l\acute{a}bil}$) foi determinada após 5 minutos de purga com Argon livre de O_2 , usando um t_d de 60 s e um E_d de -0.2 V, com agitação. Este E_d foi usado em vez do mais negativo - 1.1 V usado para $[Cu]_d$ para prevenir a dissociação dos complexos CuL durante o passo de adsorção. O varrimento de potencial foi realizado na direcção negativa, após 10 s de período de repouso, desde -0.15 a -0.90 V, usando modulação por onda quadrada. Os parâmetros de varrimento foram os mesmos que os usados nas medições de $[Cu]_d$.

A sensibilidade foi obtida da porção linear da titulação, onde todos os ligandos estavam saturados com o metal. A sensibilidade foi determinada por medição do declive obtido com mais adições de metal no fim da titulação, quando todo o metal adicionado fica livre em solução.

A célula voltamétrica não foi lavada entre aliquotas, de forma a que se mantivesse condicionada em relação a Cu e SA. As aliquotas foram medidas sequencialmente de 0 a 180 nM de Cu adicionado. Os tubos Sterilin foram lavados, com água, entre titulações, e a sua ordem foi sempre mantida.

3.4.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE Cu TOTAL DISSOLVIDO NAS AMOSTRAS

As concentrações de Cu total dissolvido ($[Cu]_d$) nas amostras resultantes de exposição às raízes de muito curto prazo foram determinadas após filtração (filtro de 0.45 μm , Millipore).

As amostras foram irradiadas no ultravioleta (UV), por meio de uma lâmpada de 1000 W de vapor de mercúrio de alta pressão (Ultramed, Osram), durante 1 hora. Para tal, alíquotas acidificadas (10 μl de HCl 12 M por 10 ml de amostra, pH 2.2) foram posicionadas concêntricamente em relação à lâmpada de UV, em tubos de sílica com tampas de PTFE. Este sistema foi inserido numa caixa fechada de alumínio, com ventilação apropriada, protectora contra a radiação UV.

O Cu foi determinado por VRC, após neutralização do pH com amoníaco 6 M. Pipetou-se 10 ml de amostra para uma célula voltamétrica e adicionou-se tampão borato (concentração final: 0.01 M) e o ligando de competição SA (concentração final: 25 μM). A solução foi purgada (5 minutos) com Argon (livre de O_2). O passo de pré-concentração (t_d , de 60 s) foi realizado a um $E_d = -1.1$ V, com agitação. O varrimento de potencial foi realizado na direcção negativa, após 10 segundos de período de repouso, desde -0.15 a -0.90 V usando modulação por onda quadrada. Os parâmetros de varrimento foram: velocidade, 20 $mV s^{-1}$; amplitude de modulação, 25 mV; degrau de potencial, 2.44 mV; frequência, 50 Hz. Cada varrimento era repetido 3 vezes e o procedimento repetido após adição padrão de metal (10 nM), de forma a calibrar a sensibilidade.

3.4.5. DETERMINAÇÃO DE METAIS POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA

As concentrações de metais nas soluções em contacto com as raízes das plantas foram determinadas por espectrofotometria de absorção atômica. Para tal essas soluções foram acidificadas a 5% em HNO_3 p.a. e posteriormente analisadas.

As raízes das plantas foram digeridas adicionando HNO_3 p.a. e aplicando um programa adequado no microondas, e ajustando finalmente a percentagem de HNO_3 a 5%.

3.5. CÁLCULOS

Para o cálculo de C_L e K'_{CuL} os dados foram tratados usando a linearização de van den Berg/Ruzic^{14, 15}:

$$[\text{Cu}^{2+}] / [\text{CuL}] = [\text{Cu}^{2+}] / C_L + 1 / (K'_{\text{CuL}} C_L) \quad (1)$$

No estudo efectuado o metal lábil, $[\text{Cu}]_{\text{lábil}}$, foi determinado, em vez de $[\text{Cu}^{2+}]$, sendo obtido da seguinte forma,

$$[\text{Cu}]_{\text{lábil}} = i_p / s \quad (2)$$

i_p – corrente medida na titulação com o metal

s – sensibilidade do sistema ($\Delta i_p / \Delta [\text{Cu}]_{\text{adicionado}}$)

O $[\text{Cu}]_{\text{lábil}}$ relaciona-se com $[\text{Cu}^{2+}]$ pela equação:

$$[\text{Cu}]_{\text{lábil}} = [\text{Cu}^{2+}] \alpha \quad (3)$$

onde α é o coeficiente global de reacções laterais, que é definido da seguinte forma:

$$\alpha = \alpha_{\text{Cu}} + \alpha_{\text{CuSA}} \quad (4)$$

em que α_{Cu} é o coeficiente inorgânico de reacções laterais

$$\alpha_{\text{Cu}} = [\text{Cu}'] / [\text{Cu}^{2+}] = 1 + \beta_{\text{Cu}(\text{OH})_n} [\text{OH}]^n \quad (5)$$

onde $\alpha_{Cu} = 1.40$ nas condições do presente trabalho e β é a constante global de estabilidade condicional para o complexo inorgânico $Cu(OH)_n$ e $[OH^-]$ é a concentração de OH^- não complexado.

α_{CuSA} é calculado através da equação:

$$\alpha_{CuSA} = \sum \beta_{Cu(SA)_n} [SA]^n \quad (6)$$

onde $\log K'_{CuSA} = 9.52$, $\log \beta'_{Cu(SA)_2} = 14.89^{16}$ e $[SA] = 5E-06M$ ($\alpha_{CuSA} = 3,60E-03$).

Por substituição de $[Cu^{2+}]$ por $[Cu]_{lável}$ na equação (1), obtém-se a seguinte relação¹⁵:

$$[Cu]_{lável} / [CuL] = [Cu]_{lável} / C_L + \alpha / (K'_{CuL} C_L) \quad (7)$$

onde $[CuL]$ é calculado da seguinte forma:

$$[CuL] = [Cu]_d - [Cu]_{lável} \quad (8)$$

em que $[Cu]_d$ é a concentração total de metal dissolvido.

3.6. PREPARAÇÃO DAS PLANTAS PARA AS EXPERIÊNCIAS

Todas as experiências foram realizadas com a planta *Cyperus eragrostis lamarck*, recolhidas em zonas pantanosas no Parque da Cidade do Porto.

A maioria das experiências foram realizadas no próprio dia em que as plantas foram recolhidas, tendo estas sido preparadas da seguinte forma:

- retirou-se, de modo a não danificar as raízes, a terra que estava agarrada às mesmas;
- lavou-se bem as raízes, primeiro com água dos Serviços Municipalizados de Água e Saneamento (SMAS) e de seguida com água desionizada;

- mergulhou-se as raízes em hipoclorito de sódio a 4 % (com uma gota de Triton X) durante 20 minutos, agitando-se frequentemente, para destruir e remover microorganismos;
- lavou-se novamente, as raízes em água desionizada;
- mergulhou-se as raízes em água desionizada esterilizada (no sistema de microondas) durante 10 minutos;

Separou-se as plantas por grupos, o mais homogêneos possível, em número suficiente para a realização de cada experiência. Mergulharam-se as raízes das plantas de cada grupo em água desionizada ou numa solução de composição descrita adiante caso a caso.

Em alguns casos, especificados adiante, as experiências foram realizadas alguns dias após a colheita das plantas. Entretanto, as plantas foram conservadas em solução nutriente (composição descrita em 3.2.).

3.7. *Cyperus eragrostis* Lamarck

A planta utilizada neste trabalho tem o nome científico de *Cyperus eragrostis* Lamarck, sendo conhecida vulgarmente por junça.

Nas figuras seguintes mostram-se fotografias tiradas no local de recolha das plantas.



Figura 3.1. Fotografia da planta *Cyperus eragrostis* Lamarck tirada no Parque da Cidade do Porto.



Figura 3.2. Fotografia da planta *Cyperus eragrostis* Lamarck evidenciando a zona pantanosa.

Esta planta, com altura entre 20 e 100 cm, cresce normalmente em tufos densos. Apresenta-se de tronco curto, com rizoma denso sem tubérculo e folhas verde claro, planas com largura entre 4 a 6 mm. Inflorescência em espigas verdes amareladas, lanceoladas, reunidas em pseudo capítulos de 2 cm de comprimento, sendo estes agrupados em pseudo umbelas de grande tamanho, sobre numerosos pedúnculos desiguais espaçados por 4 a 7 braços longos folheados. Em seguida

apresenta-se esquema do local onde foram recolhidas as plantas para a realização das experiências, o Parque da Cidade.



Figura 3.3. Esquema do Parque da Cidade no Porto, onde se pode ver assinalado no mapa o desenho dos lagos (*).

Este tipo de planta é encontrado normalmente em zonas húmidas ou mesmo pantanosas, como margens de rios e lagos, existindo durante todo o ano.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. OPTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIAS

Não se dispondo de experiência prévia referente a algumas metodologias a utilizar neste trabalho foi necessário começar pela respectiva implementação e optimização de métodos.

Concretamente foram optimizados métodos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para determinar ácidos carboxílicos e tióis (cisteína e glutathiona).

Para a determinação de ácidos carboxílicos, usou-se cromatografia de permuta aniónica com supressor do sinal de fundo e detector de condutividade.

Para a determinação dos tióis, optimizou-se cromatografia em fase reversa e com detecção no UV (detector UV-Vís).

As condições experimentais seleccionadas após estudos preliminares foram descritas em 3.4.. As características dos métodos utilizados serão descritas seguidamente.

4.1.1. CARACTERÍSTICAS DE RESPOSTA DOS MÉTODOS UTILIZADOS

Resposta a Tióis

Na figura seguinte apresentam-se cromatogramas típicos obtidos para padrões mistos de cisteína e glutathiona.

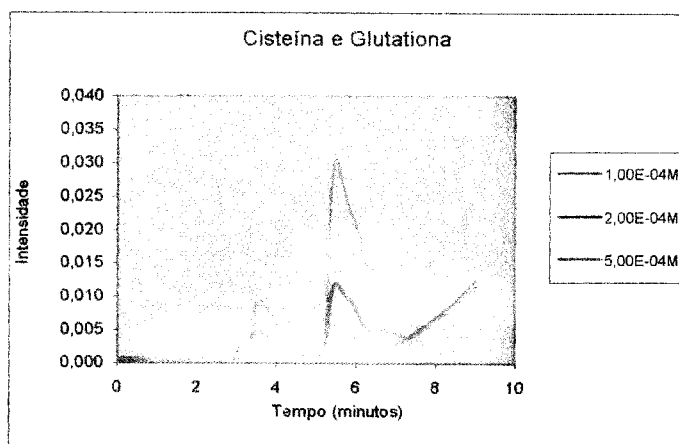


Figura 4.1. Sobreposição de cromatogramas obtidos para misturas padrão de cisteína e glutathiona em diferentes concentrações, que eram aproximadamente iguais para os dois compostos em cada solução.

Foram traçadas rectas de calibração a partir das quais se determinou a sensibilidade e o limite de detecção.

Na tabela seguinte apresentam-se os parâmetros obtidos para a determinação de compostos tiólicos.

Tabela 4.1. Parâmetros associados à resposta do método cromatográfico aplicado à determinação de compostos tiólicos.

Concentração Padrão (µM)	Área do Pico	T _R (min.)	Curva de Calibração	Limite de Detecção (µM)
Cisteína				
102	116339	3,5	$y = (9,94 \times 10^2 \pm 2,14 \times 10^2) + (1,20 \times 10^4 \pm 6,91 \times 10^4) x$	15
204	210786			
511	520943			
Glutathione				
104	224791	5,5	$y = (2,64 \times 10^3 \pm 4,46 \times 10^2) - (4,32 \times 10^4 \pm 1,47 \times 10^5) x$	12
208	513880			
520	1326392			

T_R - Tempo de Retenção

Resposta a Carboxilatos

Nas figuras 4.2 e 4.3. apresentam-se cromatogramas típicos obtidos para os diferentes carboxilatos estudados.

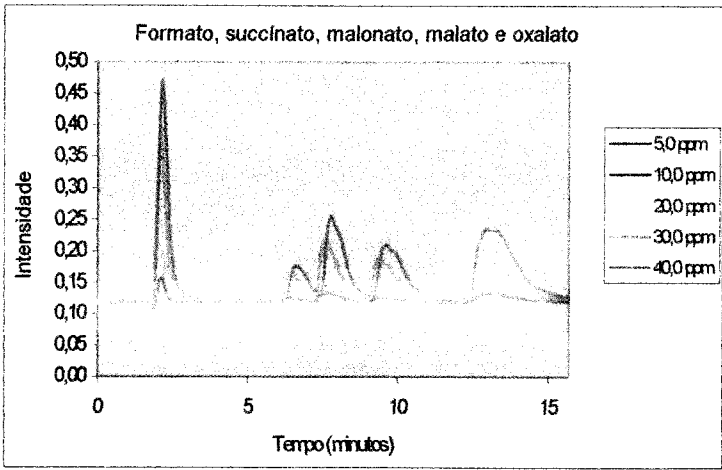


Figura 4.2. Cromatogramas típicos obtidos na calibração com padrões mistos contendo os carboxilatos seguintes: formato, succinato, malonato, malato e oxalato (apresentados pela ordem de eluição).

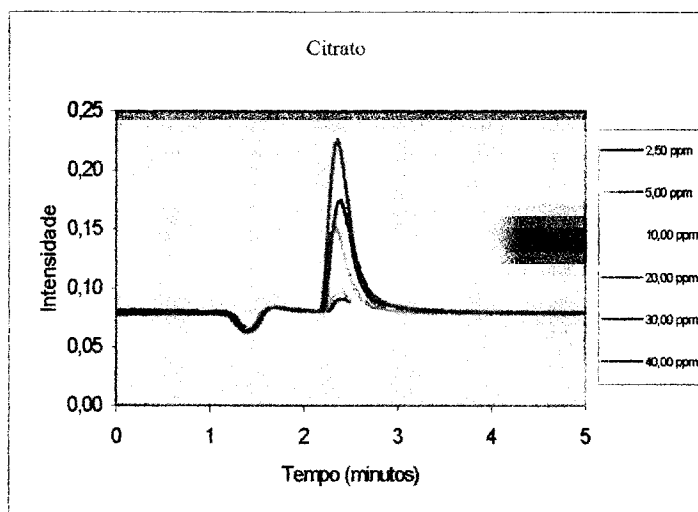


Figura 4.3. Cromatogramas obtidos na calibração com padrões de citrato.

Em todos os casos as respostas foram praticamente lineares nos intervalos abrangidos nas determinações. Os limites de detecção foram em geral ligeiramente mais elevados para os tióis do que para os carboxilatos. Destes, o método revelou-se mais sensível para o succinato, malato e citrato e o limite de detecção mais elevado ocorreu para o malonato.

Na tabela seguinte são apresentados os parâmetros obtidos nas calibrações dos diferentes carboxilatos.

Tabela 4.2. Parâmetros associados à resposta do método cromatográfico aplicado à determinação de aniões carboxilatos.

Concentração Padrão (µM)	Área do Pico	T _R (min.)	Curva de Calibração	Limite de Detecção (µM)
Formato				
108	884597	2,1	$y = (1,01 \times 10^4 \pm 1,52 \times 10^2) - (1,82 \times 10^5 \pm 8,11 \times 10^4) x$	8,8
216	2038869			
434	4203085			
651	6434525			
868	8596058			
Succinato				
42,1	250298	6,4	$y = (6,26 \times 10^3 \pm 1,32 \times 10^2) - (1,14 \times 10^4 \pm 2,78 \times 10^4) x$	4,8
83,9	516643			
168	1046555			
252	1552212			
336	2099589			
Malonato				
51,7	672007	7,6	$y = (1,42 \times 10^4 \pm 6,57 \times 10^2) - (1,35 \times 10^5 \pm 1,67 \times 10^5) x$	13
103	1279710			
207	2740590			
311	4256484			
414	5760665			
Malato				
47,7	521599	9,5	$y = (1,27 \times 10^4 \pm 2,29 \times 10^4) - (1,08 \times 10^5 \pm 5,39 \times 10^4) x$	4,6
95,1	1093822			
191	2295327			
286	3530675			
382	4759966			
Oxalato				
39,4	1148804	12,8	$y = (3,18 \times 10^4 \pm 1,39 \times 10^3) - (9,00 \times 10^4 \pm 2,69 \times 10^5) x$	9,3
78,5	2371209			
157	4854430			
236	7552210			
315	9839146			
Citrato				
11,9	146804	2,4	$y = (1,21 \times 10^4 \pm 4,60 \times 10^2) - (1,32 \times 10^4 \pm 4,53 \times 10^4) x$	5,2
23,8	290764			
47,5	539746			
95,3	1132277			
191	2310564			

4.2. ESTUDO DA EXSUDAÇÃO DE CARBOXILATOS PELAS RAÍZES DA PLANTA *Cyperus eragrostis* Lamarck

Para averiguar se as raízes libertavam compostos da família dos derivados de ácidos carboxílicos realizaram-se várias experiências como se passa a descrever.

4.2.1 ESTUDOS EM FUNÇÃO DO TEMPO

Numa primeira experiência, realizada no próprio dia em que as plantas foram recolhidas (início de Abril de 2000), as plantas foram separadas em 3 grupos, de 3 plantas cada, e cada grupo mergulhado em 200 ml de água desionizada. Após 2, 6 e 24 h de contacto verificou-se a presença de tióis e carboxilatos nas respectivas soluções. Para cada tempo de contacto usou-se um dos 3 grupos de plantas.

Os resultados obtidos constam da figura seguinte:

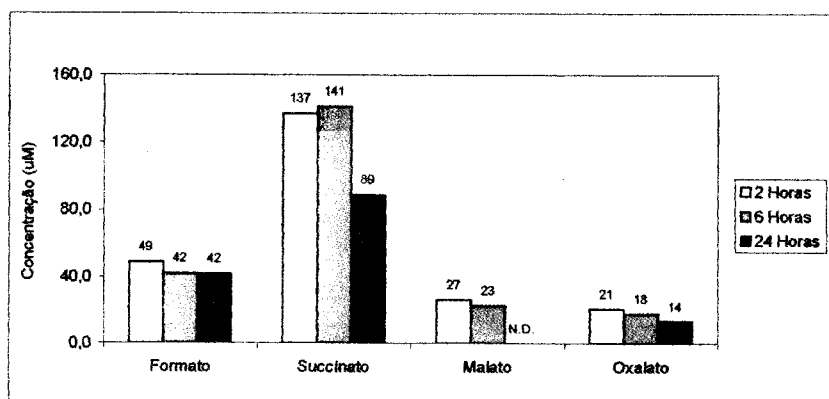


Figura 4.4. Variação da concentração de carboxilatos ao longo do tempo de exposição das raízes a água desionizada.

A figura mostra que as raízes libertaram pelo menos succinato, formato, malato e oxalato, em concentrações decrescentes por esta ordem.

De um modo geral, as concentrações foram semelhantes para 2 e 6 h de exposição e decresceram após 24 h, com excepção do formato que se manteve aproximadamente constante.

Não foram identificados tióis, designadamente cisteína e glutatona, nem por VRC nem por HPLC, isto é, as respectivas concentrações estariam abaixo dos respectivos limites de detecção das técnicas utilizadas.

Fez-se uma outra experiência semelhante, mas em que se mediu as concentrações das mesmas espécies após tempos de exposição mais curtos, que foram 30, 60 e 90 minutos de contacto com água desionizada.

Nesta experiência utilizaram-se plantas que estavam há 5 dias em solução nutriente, e que foram previamente lavadas como habitualmente e mergulhadas (em grupos de 3) em volumes de 100 ml de água desionizada.

Os resultados obtidos, por HPLC, são apresentados na figura seguinte:

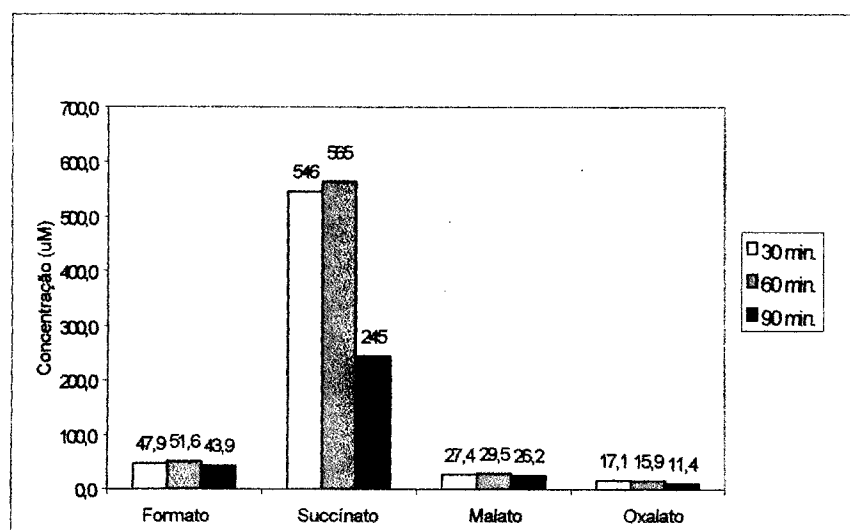


Figura 4.5. Concentrações dos aniões observadas após exposição da *Cyperus eragrostis* Lamarck, em água desionizada durante 30, 60 e 90 minutos.

As concentrações dos aniões formato, malato e oxalato foram aproximadamente constantes entre 30 e 90 min. de exposição e semelhantes às que tinham sido observadas após 2 h de exposição, na experiência anterior. Como neste caso o volume de solução era apenas metade do anterior, poderá concluir-se que a libertação destes exudatos foi mais reduzida.

Porém, a concentração de succinato foi muito mais elevada (mais de uma ordem de grandeza) que a dos restantes aniões carboxílicos após 30 e 60 min. de

exposição (os valores foram semelhantes neste período), mas decresceu para cerca de metade ($245 \mu\text{M}$) após 90 min. de exposição. Ora, na experiência anterior (volume de solução duplo) havia sido encontrado cerca de $140 \mu\text{M}$ após 120 min.. Assim, os resultados das duas experiências são compatíveis. Além disso indicam uma rápida e intensa libertação de succinato pelas raízes num período inicial de contacto destas com água desionizada. No entanto, a libertação de succinato não prosseguiu durante a experiência e até parece ter havido uma reassimilação do composto.

Também neste caso não se conseguiu identificar cisteína ou glutatona nas soluções.

Seguidamente realizaram-se experiências para tempos de exposição ainda mais reduzidos, de 5 a 30 minutos.

As raízes das plantas (em grupos de 7) foram mergulhadas em volumes de 100 ml de água desionizada, tendo sido retiradas sucessivamente alíquotas de 20 ml, após 5, 10 e 20 min., de contacto. As plantas foram retiradas da solução ao fim de 30 minutos. A composição das diferentes soluções foi analisada, quanto a tióis, aniões carboxilato (e quanto à concentração de ligandos orgânicos complexantes de Cu (II), ver adiante). O facto de se remover parte da solução durante a experiência, correspondia a concentrar o meio envolvente das raízes. Este factor de concentração foi corrigido no cálculo dos resultados, de modo a que estes pudessem ser comparados. Porém, poderá ter tido algum efeito na resposta biológica, por exemplo, inibição de exudação por aumento de concentração de exudados, que não pode ser contabilizado.

Os resultados são apresentados nas figuras seguintes:

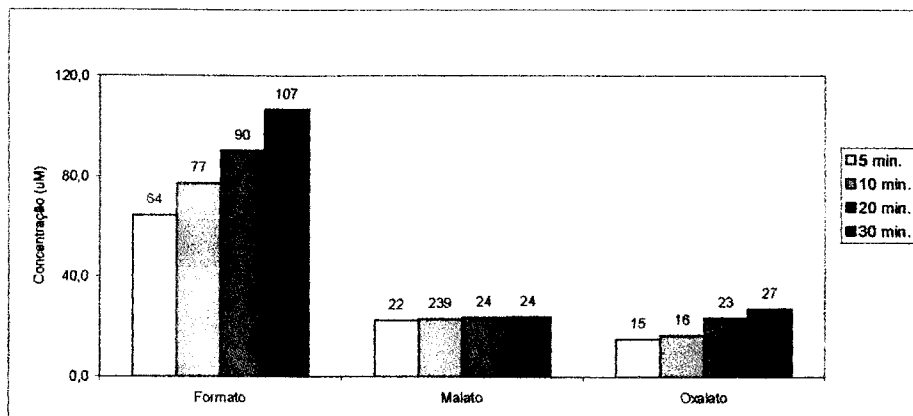


Figura 4.6. Concentração dos aniões carboxilatos observadas para tempos de exposição menores ou iguais a 30 min..

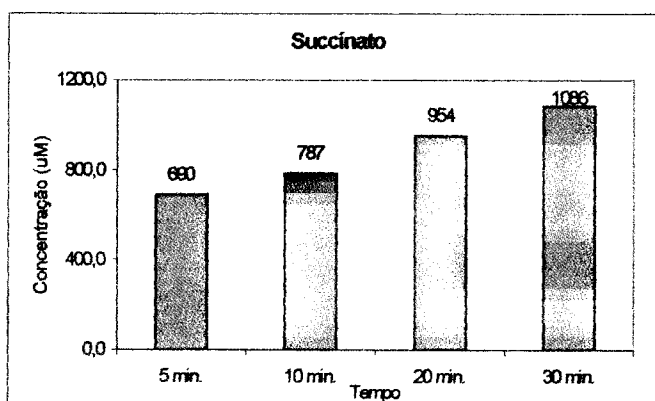


Figura 4.7. Variação da concentração do anião succinato para tempos de exposição iguais ou inferiores a 30 min..

Os níveis do formato e particularmente os do succinato já eram relativamente elevados após 5 minutos de exposição e aumentaram sistematicamente até aos 30 minutos. Os níveis do oxalato também aumentaram embora ligeiramente, ao passo que os do malato foram praticamente constantes entre 5, 10, 20 e 30 minutos de exposição.

O aspecto mais interessante a realçar desta experiência foi a muito rápida libertação de carboxilatos por parte das raízes.

Comparando os resultados desta experiência com os obtidos na anterior para 30 min. de exposição, os níveis de aniões carboxilato foram na última experiência superiores, cerca do dobro na maior parte dos casos. Estas diferenças resultaram, em grande parte, de nesta experiência se ter usado mais do dobro das

plantas (7 em vez de 3) para o mesmo volume de solução. Deve, portanto, ter-se tratado de um efeito de concentração.

Nesta experiência também não foram detectados tióis.

Repetiu-se o estudo, abrangendo agora o tempo de exposição mínimo tecnicamente possível, de 2 min.. Foram usados grupos de 12 plantas que foram mergulhadas em 500 ml de água desionizada. A experiência prosseguiu até às 24 h com determinações periódicas. Além disso, para cada ponto experimental foram medidos resultados de 3 sistemas plantas/solução independentes, para estudar a variabilidade dos resultados.

Neste caso usaram-se plantas retiradas do campo em Fevereiro de 2001, as quais foram utilizadas no próprio dia. Os resultados são apresentados na figura seguinte.

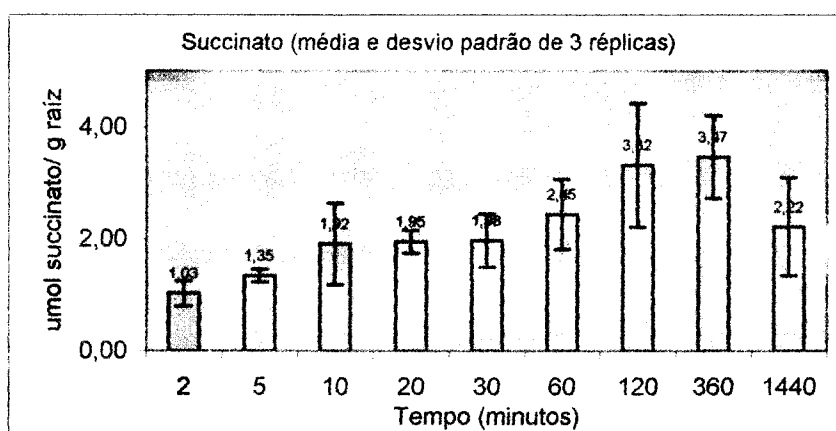


Figura 4.8. Concentração de succinato ao longo do tempo de exposição a água desionizada.

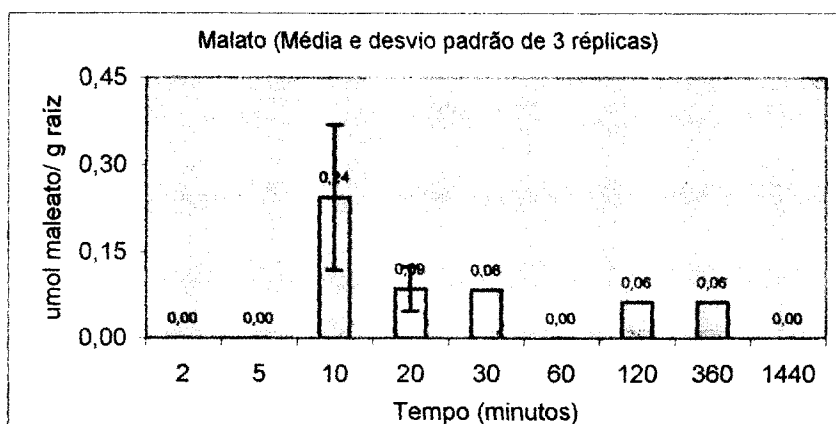


Figura 4.9. Concentração de malato ao longo do tempo de exposição a água desionizada.

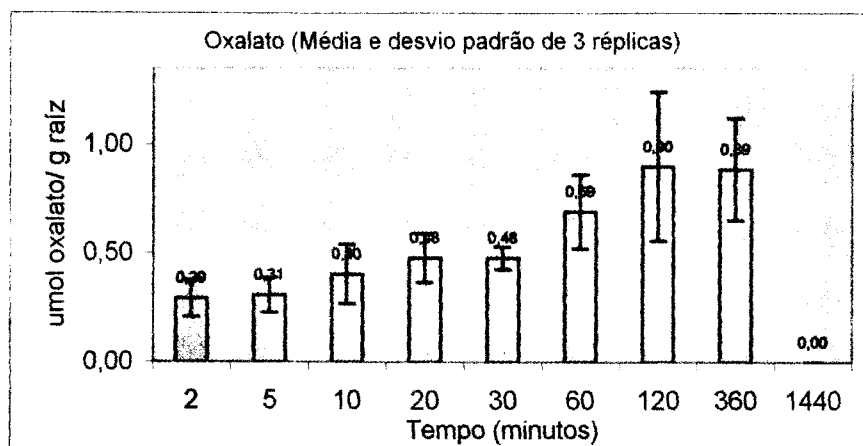


Figura 4.10. Concentração de oxalato ao longo do tempo de exposição a água desionizada.

Observou-se uma reprodutibilidade razoável na resposta das diferentes plantas. Por exemplo, para o succinato, que foi o anião libertado em maior quantidade, o desvio padrão relativo ($n=3$) foi em geral da ordem dos 10%.

A concentração de succinato era já relativamente elevada após dois minutos de exposição em água desionizada e aumentou progressivamente até às 2 h. Após 24 h tinha decrescido, mas apenas cerca de 35 % relativamente ao valor máximo observado.

Quanto ao oxalato, o comportamento foi semelhante ao do succinato, mas os níveis foram mais baixos, por exemplo para um tempo de 120 min. foi cerca de quatro vezes menor, ($3.32 \mu\text{mol/g}$ raiz para o succinato, e $0.90 \mu\text{mol/g}$ raiz para o oxalato).

Em relação ao malato, o comportamento das plantas não foi reprodutível (por ser muito baixo) e em muitos casos o composto não foi sequer detectado.

No que diz respeito ao formato, não se conseguiu detectar este anião, ao contrário do que tinha acontecido nas experiências anteriores. A razão deste resultado poderá residir em diferenças na actividade biológica das plantas, dado que esta experiência foi realizada em Fevereiro e as anteriores no mês de Abril.

No mês de Julho (2001) repetiu-se a experiência anterior. Os resultados obtidos são apresentados nas figuras seguintes.

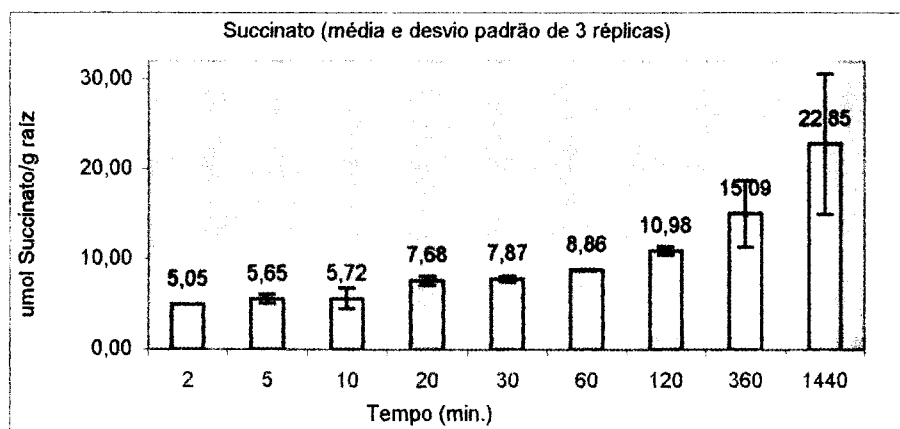


Figura 4.11. Concentração de succinato observada na solução ao longo do tempo de exposição a água desionizada.

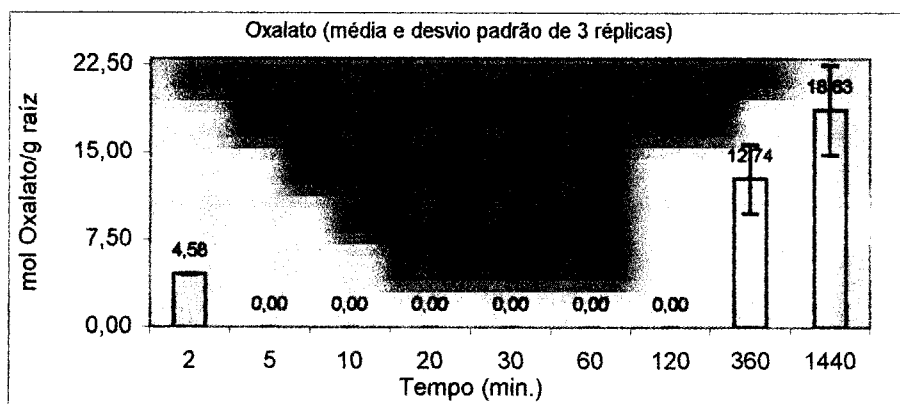


Figura 4.12. Concentração de oxalato observada na solução ao longo do tempo de exposição a água desionizada.

Nesta experiência constatou-se apenas a libertação dos aniões succinato e oxalato. Para o succinato observou-se um aumento gradual da concentração desde o início (2 min.) até ao final da experiência. Em relação ao oxalato, este foi detectado só nas formas analisadas após 2 min., 6 e 24 h, sendo estes também crescentes.

Comparando com a experiência anterior, a libertação de succinato nesta última experiência atingiu níveis cinco vezes superiores (15.09 $\mu\text{mol/g}$ de raiz nesta experiência contra 3.47 $\mu\text{mol/g}$ de raiz na experiência anterior, para o tempo de 360 min.), e teve um comportamento diferente entre as 6 e as 24 h. (neste caso

aumentou e no anterior diminuiu). A libertação de oxalato, por sua vez, apresentou bastantes diferenças de uma experiência para a outra, provavelmente devido a variações na actividade das plantas.

4.2.2. INFLUÊNCIA, NA LIBERTAÇÃO DE CARBOXILATOS, DA PRESENÇA DE IÕES METÁLICOS NO MEIO INICIAL

Utilizando plantas recolhidas em Julho (2001) realizou-se uma experiência semelhante à realizada em água desionizada, mas numa solução com teores em iões metálicos semelhantes aos encontrados no lago (ver composição em 3.1). A composição dessa solução, incluindo os contra iões, nos quais se inclui o nitrato (macronutriente) encontra-se descrita na secção 3.2..

Os resultados obtidos constam das figuras seguintes.

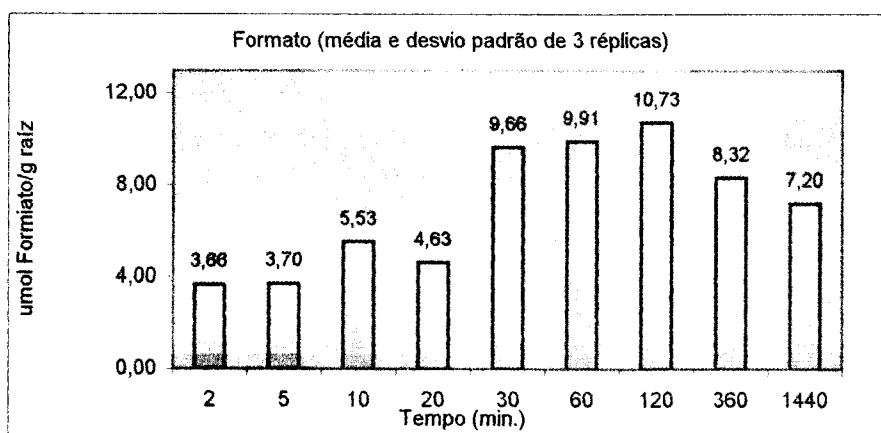


Figura 4.13. Concentração de formato observada ao longo do tempo de exposição numa solução contendo iões metálicos em concentração semelhante à do lago.

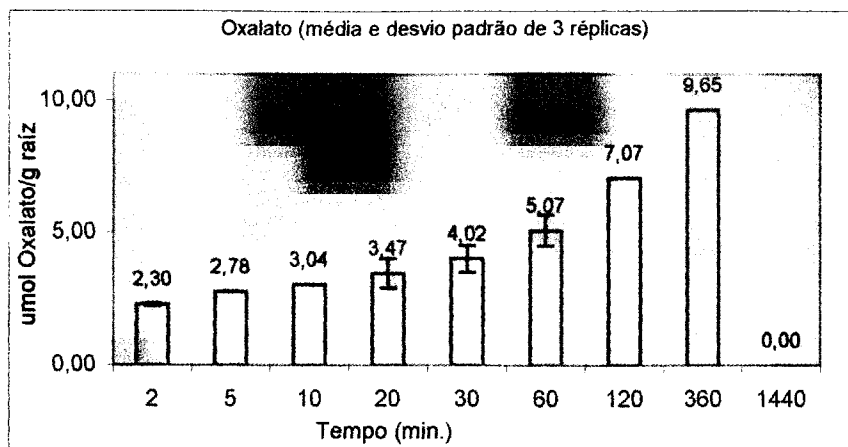


Figura 4.14. Concentração de oxalato observada ao longo do tempo de exposição numa solução contendo iões metálicos em concentração semelhante à do lago.

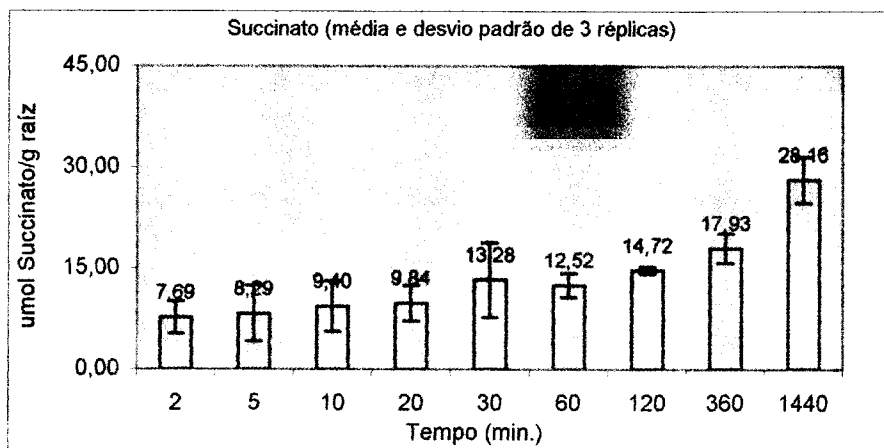


Figura 4.15. Concentração de succinato observada ao longo do tempo de exposição numa solução contendo iões metálicos em concentração semelhante à do lago.

Uma análise dos resultados, mostra que os níveis de succinato foram ligeiramente superiores aos obtidos quando as raízes das plantas foram colocadas apenas em água desionizada.

Outra diferença importante foi a libertação de formato, em concentrações relativamente baixas mas crescentes com o tempo de exposição. Em água desionizada não se observou formato no mês de Julho, sugerindo que este composto tenha sido libertado em resposta a certos componentes do meio (não identificados).

4.3. ESTUDO DA LIBERTAÇÃO/FIXAÇÃO DE IÕES METÁLICOS PELAS RAÍZES DA PLANTA *Cyperus eragrostis* Lamarck

Nas experiências realizadas em Fevereiro de 2001, também se mediu, por espectrometria de absorção atómica com atomização electrotérmica, o teor em diversos metais pesados (Cu, Cd, Zn, Pb, Mn e Fe) nas soluções (inicialmente água desionizada) após contacto com as respectivas plantas. A experiência abrangeu tempos de exposição entre o mínimo tecnicamente possível (2 min.) até 24 h. Os resultados obtidos são apresentados nas figuras seguintes.

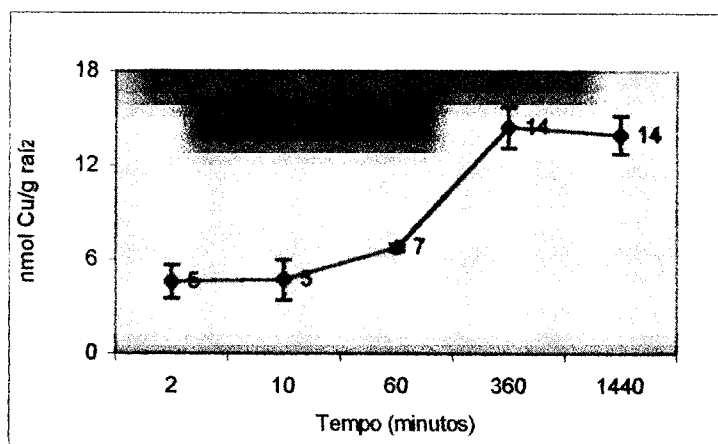


Figura 4.16. Variação da concentração de Cu ao longo do tempo de exposição das plantas a água desionizada.

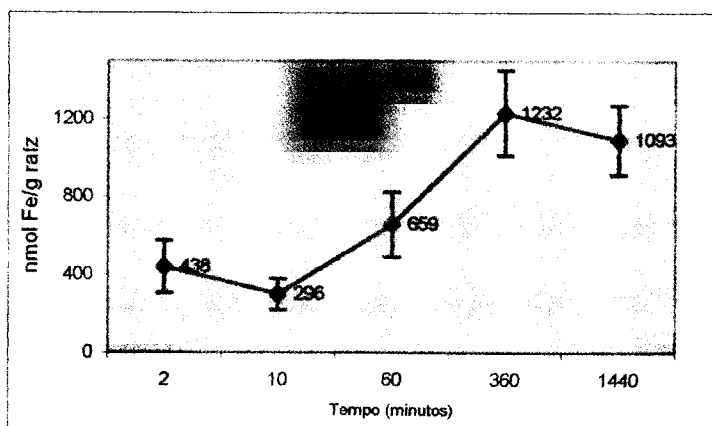


Figura 4.17. Variação da concentração de Fe ao longo do tempo de exposição das plantas a água desionizada.

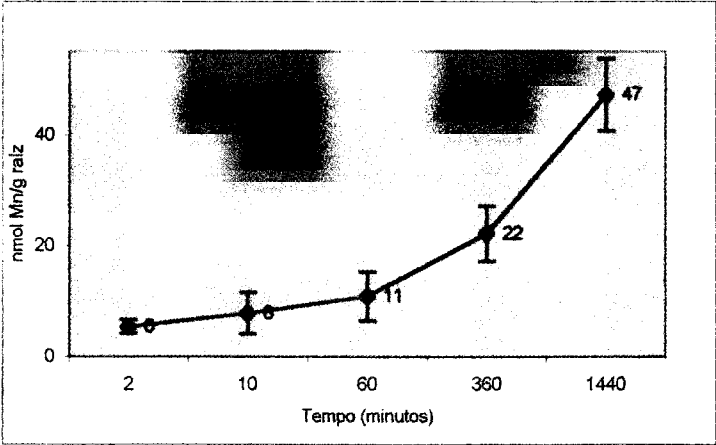


Figura 4.18. Variação da concentração de Mn ao longo do tempo de exposição das plantas a água desionizada.

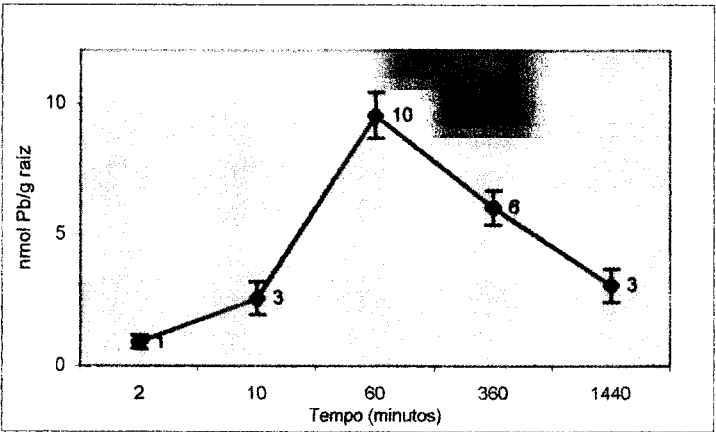


Figura 4.19. Variação da concentração de Pb ao longo do tempo de exposição das plantas a água desionizada.

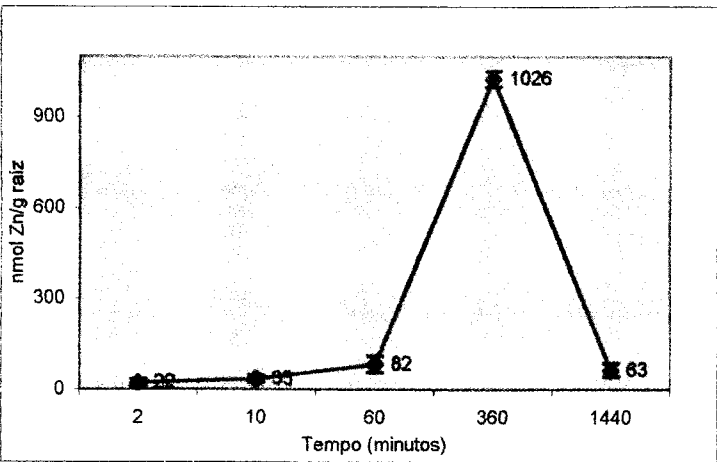


Figura 4.20. Variação da concentração de Zn ao longo do tempo de exposição das plantas a água desionizada.

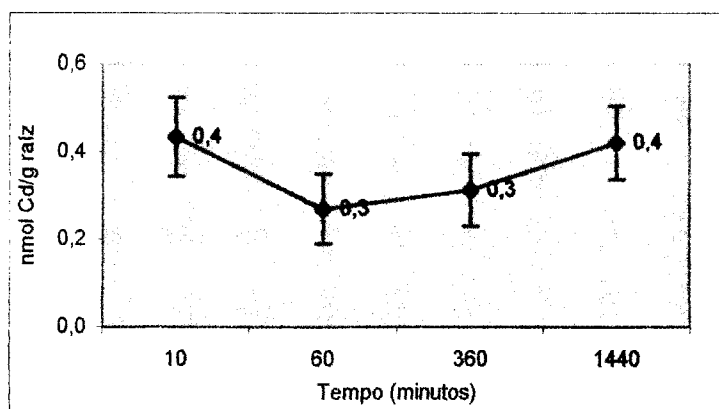


Figura 4.21. Variação da concentração de Cd ao longo do tempo de exposição das plantas a água desionizada.

A libertação de metais pelas plantas foi muito variável de elemento para elemento. O comportamento relativamente a Cu e Fe foi muito semelhante, notando-se um crescimento gradual das concentrações na solução até cerca dos 360 minutos ([Cu] aumentou de 4.60 para 14.46 nmol/g de raiz e [Fe] aumenta de 0.44 para 1.23 $\mu\text{mol/g}$ de raiz), seguindo-se uma estabilização nos valores das concentrações destes metais. Aparentemente, a raiz da planta teria libertado estes dois metais até ter atingido um equilíbrio com a solução envolvente (observou-se um nível de concentração praticamente constante no intervalo entre 360 e 1440 minutos). Mas, poderá ter ocorrido formação de hidróxidos insolúveis dos metais, os quais por terem precipitado, não foram quantificados na solução.

O Mn aparentemente foi libertado gradual e progressivamente durante as 24 h da experiência ([Mn]_{2 min} = 5.52 nmol/g e [Mn]_{24 h} = 47.21 nmol/g), dando indicação de que não se chegou a atingir o aparente equilíbrio verificado para os metais Cu e Fe.

Para o Pb ocorreu um aumento da concentração na solução até aos 60 minutos ([Pb] variou entre 0.91 e 9.55 nmol/g), após o que houve uma diminuição chegando-se mesmo a atingir, ao fim de 24 h, um valor de concentração muito semelhante ao obtido após 10 minutos de exposição (3.06 nmol/g). Também neste caso poderá ter ocorrido formação de hidróxido e precipitação.

Relativamente ao Zn, o padrão de variação foi muito semelhante ao obtido para o Pb, verificando-se um aumento da concentração até aos 360 minutos ([Zn] = 1.03 $\mu\text{mol/g}$), após o que ocorreu uma diminuição da mesma até valores próximos

dos observados nos primeiros minutos de exposição das plantas em água desionizada ($[Zn] = 63.07 \text{ nmol/g}$).

Em relação ao Cd, a concentração medida na solução foi praticamente constante e bastante baixa (da ordem das décimas de nmol/g).

Para as plantas recolhidas em Julho (2001) averiguou-se, também, como variavam as concentrações de alguns metais na solução onde foram mergulhadas as raízes. Neste caso, para além de mergulhar raízes em água desionizada, realizou-se, em paralelo, outra experiência na qual as plantas foram mergulhadas numa solução com teores de metais totais semelhantes aos medidos na água do lago de onde provinham as plantas.

Os resultados das duas experiências são apresentados nas figuras seguintes.

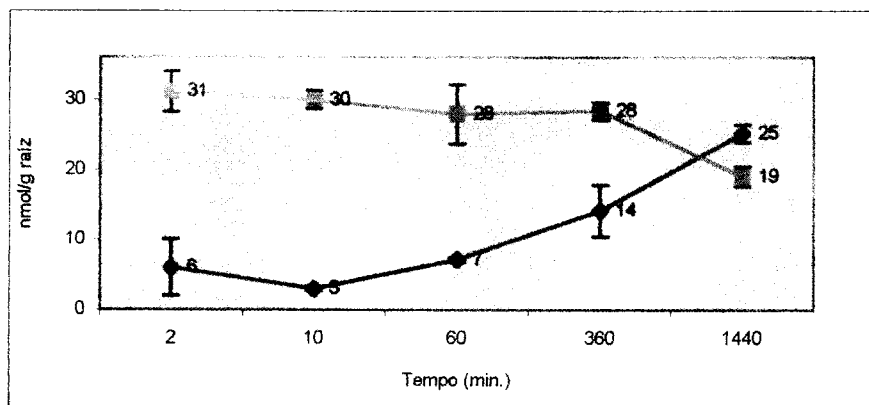


Figura 4.22. Variações da concentração de Cu (mediana e intervalo de variação para duas réplicas) nas soluções onde foram mergulhadas as raízes. A curva a verde refere-se à imersão das raízes em água “semelhante” à do lago; a curva a azul refere-se a água desionizada.

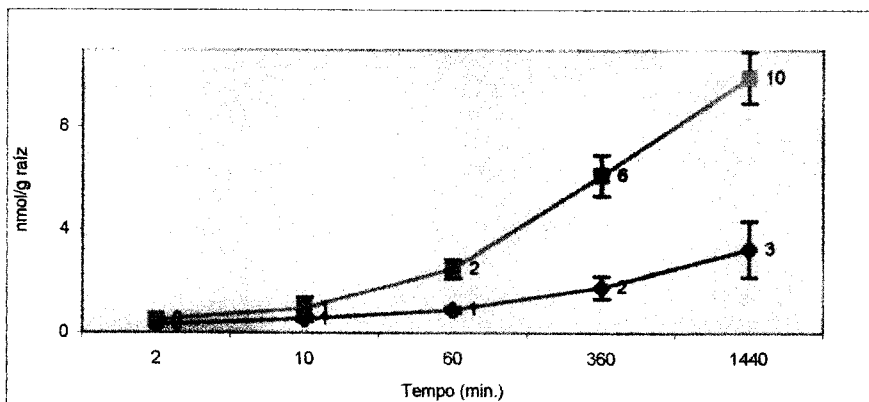


Figura 4.23. Variações da concentração de Fe (mediana e intervalo de variação para duas réplicas) nas soluções onde foram mergulhadas as raízes. A curva a verde refere-se à imersão das raízes em água “semelhante” à do lago; a curva a azul refere-se a água desionizada.

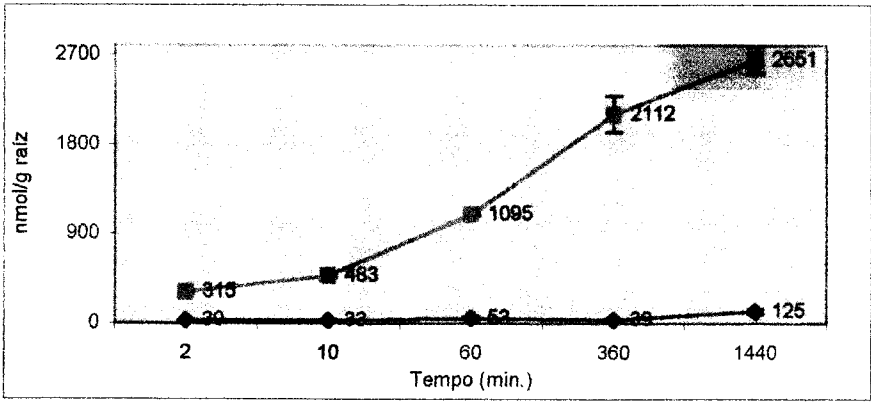


Figura 4.24. Variações da concentração de Mn (mediana e intervalo de variação para duas réplicas) nas soluções onde foram mergulhadas as raízes. A curva a verde refere-se à imersão das raízes em água “semelhante” à do lago; a curva a azul refere-se a água desionizada.

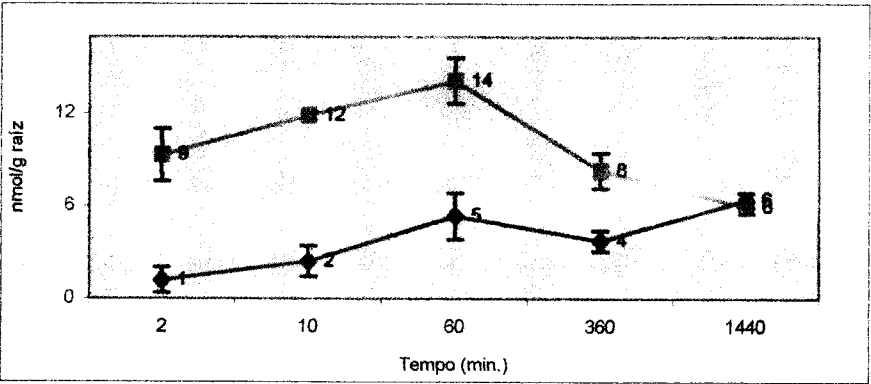


Figura 4.25. Variações da concentração de Pb (mediana e intervalo de variação para duas réplicas) nas soluções onde foram mergulhadas as raízes. A curva a verde refere-se à imersão das raízes em água “semelhante” à do lago; a curva a azul refere-se a água desionizada.

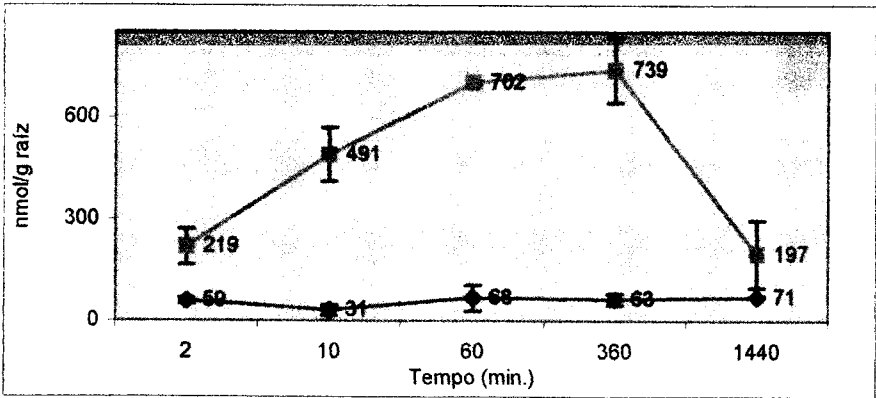


Figura 4.26. Variações da concentração de Zn (mediana e intervalo de variação para duas réplicas) nas soluções onde foram mergulhadas as raízes. A curva a verde refere-se à imersão das raízes em água “semelhante” à do lago; a curva a azul refere-se a água desionizada.

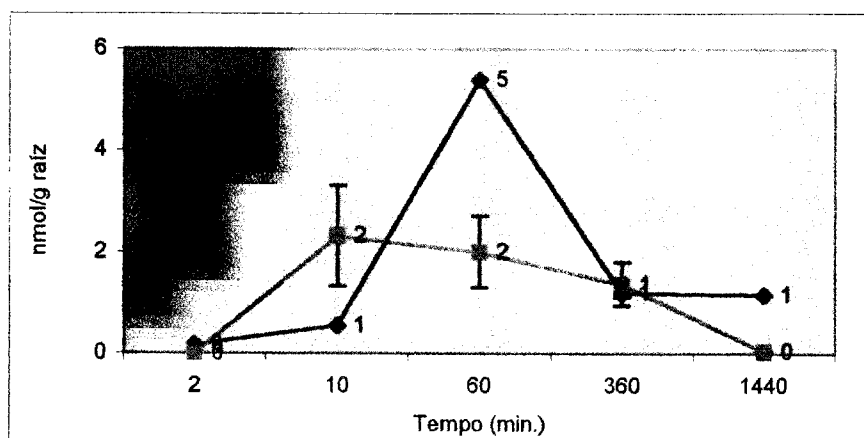


Figura 4.27. Variações da concentração de Cd (mediana e intervalo de variação para duas réplicas) nas soluções onde foram mergulhadas as raízes. A curva a verde refere-se à imersão das raízes em água “semelhante” à do lago; a curva a azul refere-se a água desionizada.

Analisando os resultados obtidos quando as plantas foram mergulhadas em água desionizada, constata-se que eles não diferiram muito dos observados na experiência de Fevereiro de 2001, para Cu, Pb e Zn. Porém, neste caso a concentração de Fe foi cerca de três ordens de grandeza inferior, a concentração de Mn foi dupla e a de Cd foi tripla das observadas em Fevereiro de 2001. Comparando, agora os resultados obtidos em Junho de 2001 nas duas situações (sem e com adição de metais ao meio) constata-se que, para o Cu, na solução que já continha este (e outros iões metálicos) a concentração se manteve constante ao longo das primeiras 6 h de duração do estudo, tendo decrescido ligeiramente após 24 h. Em contraste, na solução em que se partiu de água desionizada, a concentração de Cu aumentou progressivamente, chegando mesmo as duas soluções a atingir valores de Cu muito semelhantes no final da experiência, cerca de 20 nmol/g de raiz.

Para o Pb, o comportamento foi semelhante ao do Cu, embora até aos 60 min. se tenha verificado um ligeiro aumento de concentração também na solução mais salina. Após 24 h a concentração de Pb na solução foi semelhante nas duas soluções.

Para o Cd, os níveis eram inicialmente (2 min) praticamente nulos (não detectados) nos dois casos e cresceram ligeiramente até 6 h. As diferenças entre as duas experiências patentes na figura não merecem discussão, por se suspeitar que se tratem apenas de erros experimentais, uma vez que os níveis eram muito baixos e próximos do limite de detecção da técnica analítica utilizada. Constatou-se que a água do lago era muito pobre em Cd, pelo que as raízes não deveriam conter reservas desse metal (ver 4.4), o que é compatível com o facto da libertação do mesmo ter sido incipiente.

Quanto ao Zn, que era um elemento relativamente abundante na água do lago, foi libertado em grande quantidade pelas raízes mergulhadas em água salina até 6 h, sendo já bastante mais baixo após 24 h. Em água desionizada houve também uma libertação rápida de Zn, mas em pequena quantidade, e depois uma certa estabilização durante as 24 h que durou a experiência. Os resultados obtidos na água mais salina são interessantes e sugerem que o Zn tenha sido substituído na planta por outro elemento presente no meio e libertado em resposta a algum ião do meio.

Para o Mn e para o Fe, verificou-se também uma libertação gradual e progressiva destes metais, não se tendo observado estabilização na libertação mesmo após 24 h. A libertação destes dois metais deu-se tanto na água salina como na água desionizada, mas em muito maior extensão na água salina, sugerindo que essa libertação ocorreu em resposta ou fomentada por algum outro ião presente na solução.

Os resultados deste estudo evidenciaram bem a influência que as raízes têm no meio envolvente, sendo capazes de alterar marcadamente a sua composição.

Por outro lado, o comportamento das raízes em termos de assimilação de espécies químicas presentes na rizosfera varia marcadamente com a composição química da mesma, pelo que a influência meio/raíz é bionívoca.

4.4. NÍVEIS DE METAIS PESADOS NAS RAÍZES DAS PLANTAS *Cyperus eragrostis* Lamarck

Após as experiências realizadas em água desionizada em Fevereiro de 2001 as concentrações de diversos metais pesados nas raízes também foram determinadas por EAA, sendo os resultados obtidos, apresentados na seguinte tabela.

Tabela 4.3. Concentração dos diferentes metais nas raízes das plantas.

Metal	Concentração ($\mu\text{mol/g}$ raiz)
Cu	14.4 ± 0.9
Cd	0.6 ± 0.2
Zn	11 ± 1
Pb	10 ± 2
Mn	129 ± 16
Fe	$(26 \pm 4) \times 10^3$

Com a excepção do Fe, cuja concentração nas raízes foi muito maior que a dos outros elementos, as concentrações medidas em solução (descritas em 4.3) variaram pela mesma ordem que as medidas nas raízes. O facto dos níveis de Fe na solução terem sido relativamente baixos resultou , provavelmente, do metal ter precipitado na forma de $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Este hidróxido é muito insolúvel e a sua precipitação ocorre a valores de pH superiores a 3. Um fenómeno semelhante pode também ter ocorrido, em alguma extensão, para Mn.

Após a experiência de Junho de 2001, descrita em 4.3, analisou-se também a composição das raízes em termos do teor em diversos metais pesados (tabela 4.4).

Tabela 4.4. Concentração de diferentes metais nas raízes das plantas.

Metal	Concentração ($\mu\text{mol/g}$ raiz) nas raízes, após contacto com água desionizada	Concentração ($\mu\text{mol/g}$ raiz) nas raízes, após contacto com água enriquecida em metais
Cu	20 ± 4	19 ± 4
Cd	0.35 ± 0.03	0.45 ± 0.09
Zn	8.4 ± 1.4	4.3 ± 1.1
Pb	12 ± 2	13.0 ± 0.6
Mn	175 ± 8	96 ± 7
Fe	$(12.2 \pm 0.9) \times 10^3$	$(16 \pm 5) \times 10^3$

Comparando as tabelas 4.3 e 4.4 podemos constatar que as diferenças encontradas entre os valores obtidos não foram muito acentuadas. De facto, comparando a tabela 4.3 com a primeira coluna da tabela 4.4 (experiências semelhantes) apenas são encontradas diferenças significativas para o Cd e para o Fe que apresentam aproximadamente metade da concentração de uma experiência para a outra (0.60 e $0.35 \mu\text{mol/g}$ para o Cd e 26×10^3 e $12 \times 10^3 \mu\text{mol/g}$ para o Fe). Comparando a tabela 4.3 e a primeira coluna da 4.4 (ambas correspondendo a experiências realizadas com água desionizada) com a segunda coluna da tabela 4.4 (que corresponde à experiência em que as raízes foram colocadas em contacto com água enriquecida em metais) as diferenças relevantes dizem respeito ao Zn e ao Mn que apresentam concentrações consideravelmente inferiores (cerca de metade) no caso da experiência realizada com água enriquecida em metais ($4.3 \mu\text{mol/g}$ quando comparado com 10.6 e $8.4 \mu\text{mol/g}$ para o Zn e $96 \mu\text{mol/g}$ quando comparado com 129 e $175 \mu\text{mol/g}$ para o Mn). Estas reduções de metal na raiz são compatíveis com as extensas quantidades de Zn e Mn libertadas pelas raízes no caso da água enriquecida.

4.5. INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DE IÕES METÁLICOS NA LIBERTAÇÃO DE CARBOXILATOS

Considerou-se de interesse averiguar de que modo a presença de alguns catiões metálicos (M^{2+}), designadamente o micronutriente Cu(II) e ainda Pb(II) e Cd(II) influenciavam a libertação de aniões correspondentes aos ácidos carboxílicos estudados. Para tal, estes catiões, um de cada vez, foram adicionados a água desionizada na forma de nitratos. Portanto, as soluções onde as raízes das plantas foram mergulhadas continham quase exclusivamente M^{2+} 1 μ M e NO_3^- 2 μ M. Sendo o nitrato um macronutriente, a sua presença condicionou, provavelmente, os resultados obtidos.

Nesta experiência, que também foi realizada no próprio dia em que as plantas foram recolhidas no campo (fim de Abril de 2000), as plantas foram tratadas como habitualmente, após o que as raízes foram mergulhadas em grupos de 3 plantas cada, nas 4 soluções seguintes:

- 100 ml de água desionizada (controlo);
- 100 ml de uma solução 1 μ M em Cu;
- 100 ml de uma solução 1 μ M em Pb;
- 100 ml de uma solução 1 μ M em Cd;

A composição das soluções quanto a tióis e carboxilatos foi analisada ao fim de 2 h, sendo os resultados obtidos apresentado nas figuras seguintes.

Nestas experiências não foi possível quantificar o succinato, porque o sinal de nitrato se sobrepunha ao daquele anião, mascarando os resultados.

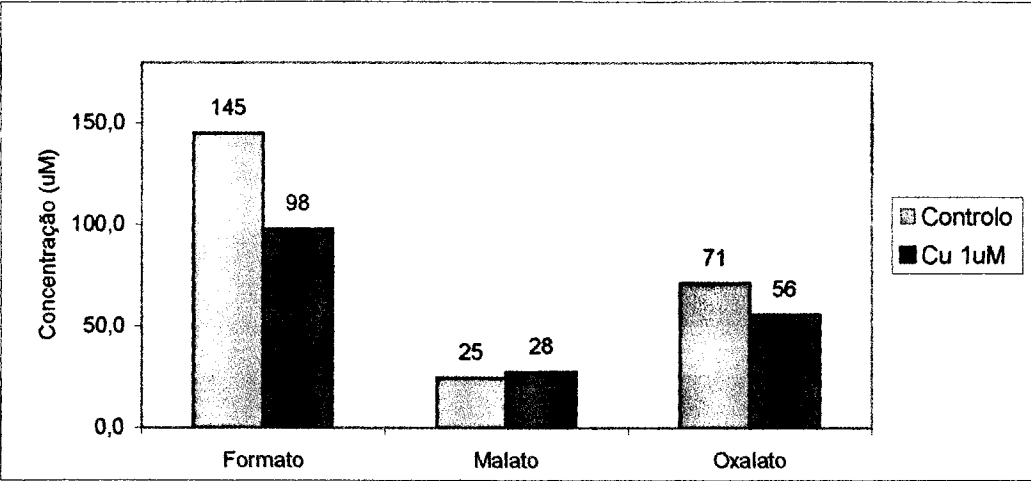


Figura 4.28. Diferenças verificadas, após 2 h de exposição, na concentração de carboxilatos entre a solução de água desionizada e a solução a que se adicionou 1 μM de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$.

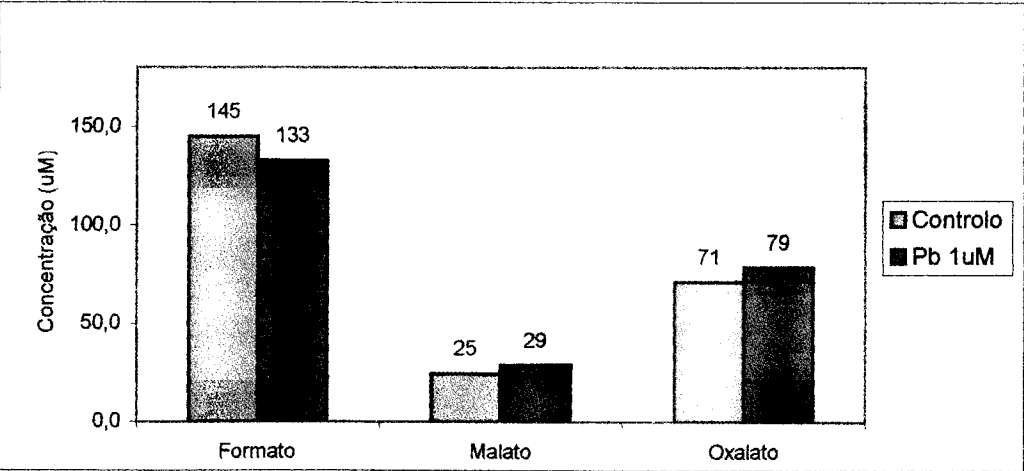


Figura 4.29. Diferenças verificadas, após 2 h de exposição, na concentração de carboxilatos entre a solução de água desionizada e a solução a que se adicionou 1 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$.

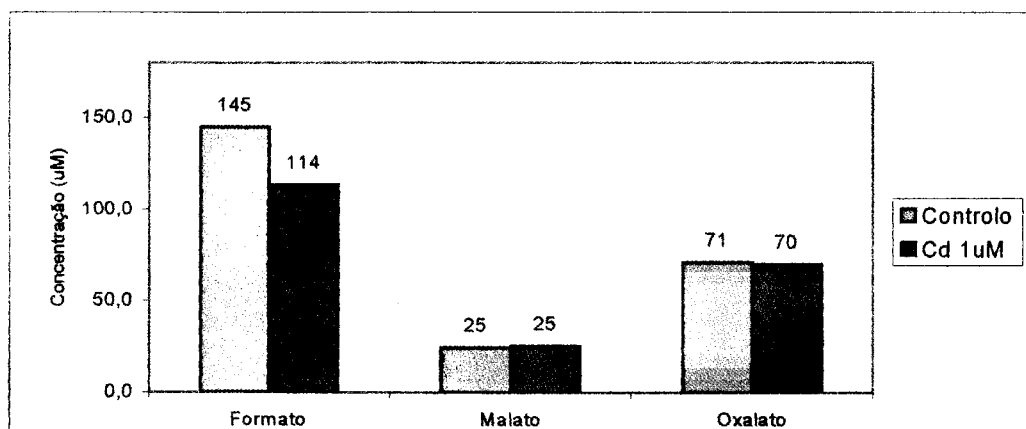


Figura 4.30. Diferenças verificadas, após 2 h de exposição, na concentração de carboxilatos entre a solução de água desionizada e a solução a que se adicionou 1 μM de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$.

De um modo geral, a presença dos catiões metálicos (e de nitrato) não alterou muito os níveis de libertação de aniões carboxilato, visto que os resultados na presença e ausência de sal foram semelhantes. As maiores diferenças foram observadas para o formato, particularmente na presença de Cu^{2+} e Cd^{2+} . Porém, como não se realizaram réplicas, não é possível afirmar se as diferenças foram ou não significativas.

De novo não se encontrou cisteína ou glutatona, tanto por CSV como por HPLC.

4.6. ESTUDO DA EXUDAÇÃO EM TERMOS DE LIGANDOS ORGÂNICOS TOTAIS

Para as plantas colhidas em Abril de 2000, cujas raízes haviam sido mergulhadas em água desionizada, também foram determinadas as concentrações totais de ligandos orgânicos. Estas foram avaliadas através da respectiva capacidade de complexação de Cu(II), que é, na série de Erwing-Williams o metal que forma complexos mais estáveis com a maioria dos ligandos. Para tal, foi necessário proceder à determinação das concentrações totais de Cu(II) em solução, de acordo com o descrito na parte experimental (ver tabela 4.5). Os valores da concentração total de ligandos, C_L , e da respectiva constante de formação de complexos de Cu(II), K'_{CuL} , foram determinados, por titulações por CSV, usando Cu e salicilaldóxima como ligando de competição, a pH 8,35.

Tabela 4.5. Concentrações totais de Cu, nas soluções, após exposição de raízes a água desionizada por tempos variados.

Tempo (minuto)	5	10	20	30
Cu total (nM)	547	315	194	462

Nas figuras 4.31 e 4.32 ilustram-se os resultados experimentais obtidos neste estudo.

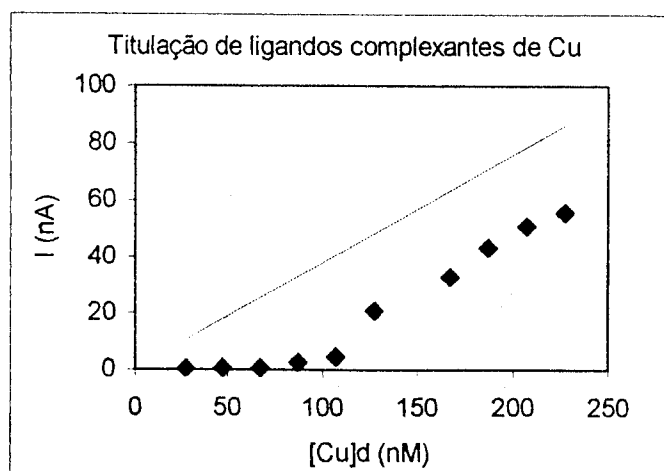


Figura 4.31. Titulação de ligandos complexantes de Cu em amostras após diluição (10×) e ao pH de 8,35.

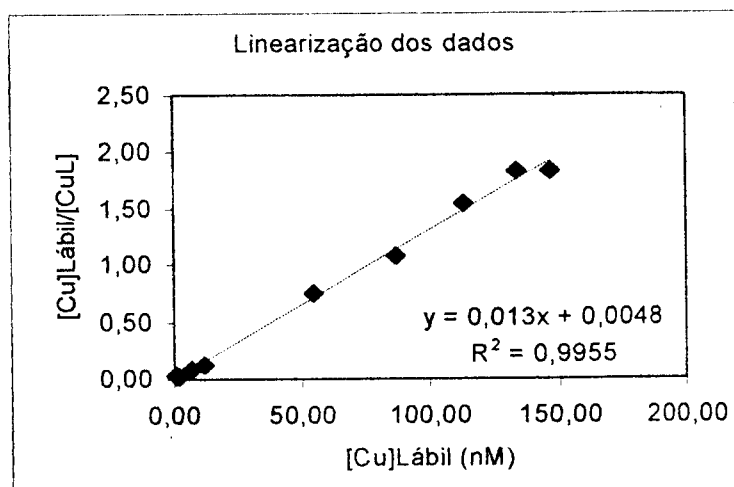


Figura 4.32. Linearização dos dados mostrados na figura anterior usando a equação de Van den Berg-Ruzic.

Os resultados obtidos são apresentados na tabela 4.6.

Tabela 4.6. Concentrações totais de ligandos orgânicos estimadas em equivalentes de Cu e respectivas constantes de estabilidade condicionais, determinadas nas soluções onde estiveram mergulhadas as raízes*.

Tempo (min.)	5	10	20	30
$C_L \text{ (nM)}$	1223 ± 5	1143 ± 5	1555 ± 3	1535 ± 2
$\log K'_{CuL}$	$12,5 \pm 0,1$	$12,6 \pm 0,1$	$13,9 \pm 0,9$	$14,0 \pm 0,8$

* - Médias e desvios padrão de três réplicas.

Tal como havia sido verificado para os ácidos carboxílicos, os níveis de concentração de ligandos orgânicos totais já eram também muito elevados ($> 1\mu\text{M}$) na solução após 5 minutos de exposição das raízes a água desionizada e aumentaram ligeiramente com o tempo.

Quanto aos valores $\log K'_{CuL}$ eles foram também bastante elevados e, o que é interessante, aumentaram com o tempo de exposição sugerindo que a natureza dos ligandos variou.

Estes resultados são compatíveis, por exemplo, com um aumento muito grande da concentração de ácido succínico entre 5 e 30 minutos de exposição.

Também foram determinadas as concentrações de ligandos orgânicos complexantes de Cu, assim como as respectivas constantes de estabilidade condicionais, nas experiências realizadas com plantas colhidas em Fevereiro de 2001 e em Julho de 2001. Os resultados são apresentados nas tabelas 4.7. e 4.8..

Tabela 4.7 . Constantes de estabilidade condicionais e concentrações totais de ligandos orgânicos do Cu, determinadas na solução de água desionizada onde estiveram mergulhadas as raízes nas experiências realizadas em Fevereiro de 2001*.

Amostra	Solução de água desionizada	
	CL (μM)	logK'CuL
2 min.	$1,7 \pm 0,1$	$15,0 \pm 0,1$
10 min.	$1,4 \pm 0,0$	$15,1 \pm 0,1$
24 horas	$4,4 \pm 0,2$	$15,7 \pm 0,5$

* - Médias e desvio padrão de 2 réplicas

Tabela 4.8. Constantes de estabilidade condicionais e concentrações totais de ligandos orgânicos do Cu, determinadas na solução de água desionizada e na solução rica em metais pesados (semelhante à do lago) onde estiveram mergulhadas as raízes nas experiências realizadas em Julho de 2001*.

Amostra	Controlo**		Solução com metais***	
	CL (μM)	LogK'CuL	CL (μM)	LogK'CuL
2 min.	$1,6 \pm 0,1$	$15,6 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,1$	$15,7 \pm 0,2$
10 min.	$1,18 \pm 0,05$	$15,7 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$	$15,5 \pm 0,2$
60 min.	$1,4 \pm 0,0$	$15,3 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,2$	$14,9 \pm 0,3$

* - Médias e desvio padrão de 2 réplicas

** - Água desionizada

*** - Concentração de metais semelhante à do lago

Analisando os resultados obtidos no que diz respeito às concentrações totais de ligandos orgânicos libertados, verifica-se que estas são sempre superiores no caso em que a solução em contacto com as raízes continha metais,

parecendo evidenciar desta forma que a presença destes mesmos metais terá estimulado a libertação de ligandos, provavelmente como mecanismo de defesa contra a potencial toxicidade dos metais.

Em relação aos valores $\log K'_{CuL}$, eles foram sempre bastante elevados. As diferenças observadas de caso para caso provavelmente resultarão de erros experimentais, não merecendo por isso discussão.

A concentração total de ligandos fortes (com constantes de estabilidade elevada) foi inferior à soma das concentrações dos carboxilatos quantificados, medidas na mesma experiência. Este facto indica que alguns (ou todos) dos carboxilatos quantificados não foram contabilizados nos ligandos totais determinados, o que é compreensível dado que as constantes de estabilidade dos respectivos complexos de Cu (II) são relativamente baixas quando comparadas, por exemplo, com as de ligandos com grupos tiólicos, que provavelmente também serão libertados pelas plantas, embora não tenha sido possível identifica-los neste trabalho.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

5.1. CONCLUSÕES

O presente trabalho mostrou que as raízes de plantas são capazes de não só captar constituintes químicos do meio, mas também de libertar para o meio envolvente quantidades apreciáveis quer de ligandos orgânicos quer de metais.

Concretamente, da exposição da *Cyperus eragrostis* Lamarck, colhida num lago do Parque da Cidade do Porto, em água desionizada, resultou o enriquecimento da solução em diversos carboxilatos (a níveis da ordem dos μ molar), designadamente, formato, succínato, malato e oxalato e outros ligandos orgânicos não identificados mas que se constatou serem complexantes fortes de metais pesados, em particular de cobre, que foi o metal usado para a respectiva quantificação.

Também se observou a libertação de metais pesados, designadamente de cobre, ferro, manganês, chumbo, zinco e cádmio mesmo em soluções relativamente ricas nesses metais (concentrações iniciais de 1.18×10^{-6} M em Fe, 1.68×10^{-7} M em Zn, 1.57×10^{-7} M em Cu, 8.01×10^{-7} M em Mn e 2.06×10^{-4} M em Mg).

Um aspecto a destacar é que as trocas ao nível da rizosfera são bastante rápidas, tendo-se observado já alterações importantes na composição do meio apenas dois minutos depois das raízes terem sido mergulhadas na solução. Tempos inferiores a dois minutos não foram estudados por limitações técnicas.

Os resultados dos trabalhos demonstraram claramente a importância das raízes na composição do meio e na especiação de metais pesados de solos e áreas húmidas onde as plantas habitam.

Mas os conhecimentos existentes sobre este tema são ainda incipientes mesmo a nível internacional, pelo que merecem investigação mais extensa e mais aprofundada no futuro.

BIBLIOGRAFIA

1. Turner A. P., 1994. *The Responses of Plants to Heavy Metals*, em *Toxic Metals in Soil-Plant Systems*, Ross S. M., Wiley, Chichester.
2. Fan T. W. M., Lane A. N., Pedler J., Crowley D. and Higashy R. M., 1997. Comprehensive Analysis of Organic Ligands in Whole Root Exudates Using Nuclear Magnetic Resonance and Gas Chromatography - Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 251: 57-68.
3. Caçador I., Vale C. & Catarino I., 1996. The influence of plants on concentration and fractionation of Zn, Pb, and Cu in salt marsh sediments (Tagus Estuary, Portugal). *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 5: 193-198.
4. Ross S. M. e Kaye K. J., 1994. *The Meaning of Metal Toxicity in Soil Plant Systems*, em *Toxic Metals in Soil-Plant Systems*, Ross S. M., ed. Wiley, Chichester.
5. Szmigielska A. M., Rees K. C. J. V., Cieslinski G., Huang P. M., Knott E. R., 1995. Determination of Low Molecular Weight Dicarboxylic Acids in Root Exudates by Gas Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 956-959.
6. Barbas C., García J. A. L. and Mañero F. J. G., 1999. Separation and Identification of Organic Acids in Root Exudates of *Lupinus luteus* by Capillary Zone Electrophoresis. Spain. *Phytochemical Analysis*, 10: 55-59.
7. Shea D. and MacCrehan W. A., 1988. Determination of Hydrophilic Thiols in Sediment Porewater Using Ion-Pair Liquid Chromatography Coupled to Electrochemical Detection. *Anal. Chem*, 60: 1449-1454.
8. Leal M. F. C., 2000. *Trace Metal Speciation in Seawater*. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto.

9. David E. Salt, 2000. *Phytoextraction: Present Application and Future Promise*, em *Bioremediation of Contaminated Soils*, D. L. Wise, D. Y. Trantolo, E. J. Cichon, H. J. Inyang e U. Stottmeister, (Ed.), Marcell Dekker, Nova Iorque.
10. Meyer V. R., 1998. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 3rd Edition. Wiley, Chichester.
11. Sewell, P. A., Clarke, B., 1987. *Chromatographic Separations*. John Wiley and Sons.
12. Gonçalves M. L., 2001. *Métodos Instrumentais para Análise de Soluções*. 4^a Edição. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
13. Wang, J., 1985, *Stripping Analysis – Principles, Instrumentation and Applications*. VCH Publishers, Florida.
14. Ruzic, I., 1982. Theoretical aspects of the direct titration of natural waters and its information yield for trace metal speciation. *Anal. Chim. Acta*, 140: 99-113.
15. van den Berg, C. M. G., 1982. Determination of copper complexation with natural organic ligands in sea water by equilibration with MnO_2 . I. Theory. *Mar. Chem.*, 11: 307-322.
16. Campos, M. L. A. M. and van den Berg, C. M. G., 1994. Determination of copper complexation in sea water by cathodic stripping voltammetric and ligand competition with salicylaldoxime. *Anal. Chim Acta*, 284: 481-496.