

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



**INTERACÇÃO DE PESTICIDAS DA FAMÍLIA
DOS CARBAMATOS COM ÁCIDOS FÚLVICOS**

DISSERTAÇÃO PARA MESTRADO EM QUÍMICA

JOÃO PEDRO DE MAGALHÃES LIMA

LICENCIADO EM ENGENHARIA QUÍMICA (U.P.)

PORTO

2001

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



INTERACÇÃO DE PESTICIDAS DA FAMÍLIA
DOS CARBAMATOS COM ÁCIDOS FÚLVICOS

DISSERTAÇÃO PARA MESTRADO EM QUÍMICA

JOÃO PEDRO DE MAGALHÃES LIMA

LICENCIADO EM ENGENHARIA QUÍMICA (U.P.)

PORTO
2001

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

INTERACÇÃO DE PESTICIDAS DA FAMÍLIA
DOS CARBAMATOS COM ÁCIDOS FÚLVICOS

DISSERTAÇÃO PARA MESTRADO EM QUÍMICA

JOÃO PEDRO DE MAGALHÃES LIMA
LICENCIADO EM ENGENHARIA QUÍMICA (U.P.)

PORTO
2001

RESUMO

Nesta Tese estudou-se a interacção de alguns pesticidas de carbamatos (carbarilo e carbofurano) e alguns dos seus metabolitos (1-naftol, 2-isopropoxifenol, 3-hidroxicarbofurano, 3-cetocarbofurano e 3-cetocarbofuranofenol) com uma amostra de matéria orgânica dos solos, nomeadamente uma amostra de ácidos fúlvicos (AF) extraída de um solo "Laurentian".

Foram implementados dois métodos de análise das interacções entre as substâncias fluorescentes e os AF: (a) método baseado na extinção da fluorescência de acordo com a equação de Stern-Volmer; e (b) sequência de extracções sólido/sistema aquoso e sistema aquoso/solvente orgânico.

Para além da implementação destas metodologias, uma primeira fase do trabalho consistiu no estudo das propriedades de fluorescência em estado estacionário dos carbamatos e respectivos metabolitos. Neste estudo, verificou-se que estas substâncias eram mais fluorescentes em metanol. As matrizes de excitação-emissão (MEE) foram obtidas em metanol e verificou-se uma dependência linear da intensidade de fluorescência com a concentração. A estrutura das MEE foi estudada por técnicas quimiométricas de decomposição trilinear, nomeadamente pelo modelo PARAFAC, e verificou-se que a fluorescência dos carbamatos e seus metabolitos apresenta uma estrutura trilinear (excitação, emissão e concentração).

O método baseado na extinção de fluorescência permitiu detectar uma associação do carbarilo, 1-naftol, 2-isopropoxifenol, carbofurano e 3-hidroxicarbofurano com os AF numa gama de concentração até cerca de 60 mg de AF/L. Foi aplicado com sucesso um modelo de correcção de efeitos de filtro primário e secundário. Os dados experimentais da extinção de fluorescência, devidamente corrigidos para os efeitos de filtro, foram ajustados com sucesso à equação de Stern-Volmer. Obtiveram-se as seguintes constantes de Stern-Volmer ($\log K_{SV}$): carbarilo (3,85); 1-naftol (3,83); 2-isopropoxifenol (3,96); carbofurano (4,69); e, 3-hidroxicarbofurano (4,03).

O método de extração para a determinação da solubilidade do carbarilo e carbofurano é baseado na seguinte sequência de operações: (a) equilibrar o carbamato sólido com uma solução aquosa; (b) retirar um determinado volume da solução aquosa e extrair a substância orgânica com um solvente imiscível com a água (clorofórmio para o carbarilo e ciclohexano para o carbofurano); e (c) determinar a concentração do carbamato no solvente orgânico. Este método foi usado para determinar a solubilidade (S_w) do carbarilo e carbofurano em água, $47,5 \pm 3,1$ ppm e 330 ± 13 ppm, respectivamente. Foi determinada a solubilidade aparente destes dois carbamatos em soluções de força iônica crescente (0,01, 0,1 e 1,0 M em nitrato de potássio e cloreto de sódio) e soluções aquosas de AF de concentração crescente (de 0 a 200 mg/L). Os resultados obtidos mostraram que a solubilidade aparente dos carbamatos diminuía com o aumento da força iônica – aumento da concentração de sais inorgânicos e aumento da concentração de AF.

AGRADECIMENTOS

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

ÍNDICE GERAL

RESUMO	i
AGRADECIMENTOS	iii
ÍNDICE	iv
ABREVIATURAS	ix
1 – INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 – PESTICIDAS	1
1.1.1 – Aspectos gerais	1
1.1.2 – Carbamatos	2
1.1.2.1 – Introdução	2
1.1.2.2 – Carbarilo	7
1.1.2.3 – Carbofurano	10
1.1.2.4 – Aldicarbe	12
1.2 – SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	14
1.2.1 – Aspectos gerais	14
1.2.2 – Ácidos fúlvicos	16
1.2.3 – Mecanismos de solubilização	17
1.3 – OBJECTIVOS DO TRABALHO	19
1.4 – ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO	20
1.5 – BIBLIOGRAFIA	21
2 – ASPECTOS TEÓRICOS	24
2.1 – FLUORESCÊNCIA MOLECULAR	25
2.1.1 – Relação da intensidade de fluorescência com a concentração	25
2.1.2 – Matriz de excitação-emissão	27
2.1.3 – Análise de estruturas de dados com três vias e sua decomposição	28
2.1.3.1 – Introdução	28
2.1.3.2 – Desdobrar a matriz de três vias	29
2.1.3.3 – O modelo Tucker3	30
2.1.3.4 – O modelo PARAFAC	31
2.1.3.5 – Determinação do número de componentes do modelo PARAFAC	32

2.2 – INTERACÇÕES ENTRE OS AF E CARBAMATOS	33
2.2.1 – Solubilidade em água de um pesticida	33
2.2.2 – Modelo para a interacção	34
2.2.3 – Técnicas baseadas na extinção de fluorescência	35
2.2.3.1 – Extinção de fluorescência dinâmica: equação de Stern-Volmer	35
2.2.3.2 – Derivação da equação de Stern-Volmer	37
2.2.3.3 – Constante de extinção bimolecular	39
2.2.3.4 – Extinção de fluorescência estática	40
2.2.3.5 – Mecanismo de extinção dinâmico ou estático?	42
2.2.3.6 – Efeitos de filtro	43
2.2.3.7 – Correção dos efeitos de filtro	44
2.3 – INTERACÇÕES ENTRE AF E CARBAMATOS	48
2.4 – BIBLIOGRAFIA	50
3 – SECÇÃO EXPERIMENTAL	51
3.1 – REAGENTES	51
3.2 – AMOSTRA DE AF	52
3.3 – SOLUÇÕES	53
3.4 – EQUIPAMENTO	56
3.5 – AQUISIÇÃO DOS DADOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS	57
3.5.1 – UV-Vis	57
3.5.1.1 – Leituras de absorvância para correção dos efeitos de filtro	57
3.5.1.2 – Espectros	58
3.5.2 – Fluorescência molecular	58
3.6 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDOS DE INTERACÇÃO DE AF COM PESTICIDAS MEDIDA POR EXTINÇÃO DE FLUORESCÊNCIA	60
3.6.1 – Estudo inicial das propriedades em fluorescência e UV-Vis	60
3.6.1.1 – Calibrações do carbarilo em tampão fosfato e metanol	60
3.6.1.2 – Calibrações do carbofurano em tampão fosfato, metanol e ciclohexano	60
3.6.1.1 – Calibrações dos metabolitos em tampão fosfato e metanol	61
3.6.2 – Misturas de carbarilos e seus metabolitos	61

3.6.2.1 – Misturas Binárias	62
3.6.2.2 – Misturas Ternárias	63
3.6.3 – Matrizes de emissão-excitação de fluorescência molecular (MEE) e correcção de efeitos de filtro	64
3.7 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDOS DE INTERACÇÃO DE AF COM PESTICIDAS MEDIDA POR MÉTODOS DE EXTRACÇÃO	65
3.7.1 – Estudo da solubilidade do carbarilo em água, soluções aquosas de AF e soluções aquosas de sais inorgânicos	65
3.7.1.1 – Solubilidade de AF em clorofórmio	65
3.7.1.2 – Calibração de carbarilo em clorofórmio hidratado	66
3.7.1.3 – Extracção com clorofórmio	67
3.7.2 – Estudo da solubilidade de carbofurano em água, soluções aquosas de AF e soluções aquosas de sais inorgânicos	68
3.7.2.1 – Solubilidade de AF em ciclohexano	68
3.7.2.2 – Calibração de carbofurano em ciclohexano hidratado	68
3.7.2.3 – Extracção com ciclohexano	69
3.8 – CÁLCULOS QUIMIOMÉTRICOS	71
3.9 – BIBLIOGRAFIA	72
4 – ESTRUTURA DAS MEE DE FLUORESCÊNCIA DOS CARBAMATOS	73
4.1 – INTRODUÇÃO	73
4.2 – MEE DE FLUORESCÊNCIA DOS CARBAMATOS	74
4.2.1 – MEE dos solventes puros	74
4.2.2 – MEE dos carbamatos	74
4.2.2.1 – Efeito do solvente na intensidade de fluorescência	74
4.2.2.2 – MEE em metanol	74
4.2.2.3 – Variação da intensidade de fluorescência com a concentração	74
4.3 – ANÁLISE DE FACTORES DAS MEE DOS CARBAMATOS	79
4.3.1 – Número de factores do modelo das MEE	79
4.3.2 – Características da decomposição trilinear	79
4.3.2.1 – Espectros de emissão e excitação	79

4.3.2.2 – Concentrações	80
4.4 – ANÁLISE DE FACTORES DAS MEE DE MISTURAS DE CARBAMATOS	88
4.4.1 – Número de factores do modelo das MEE	88
4.4.2 – Características da decomposição trilinear	88
4.4.2.1 – Espectros de emissão e excitação	88
4.4.2.2 – Concentrações	88
4.5 – CONCLUSÕES	96
4.6 – BIBLIOGRAFIA	97
5 – INTERACÇÃO DE PESTICIDAS CARBAMATOS COM AF MEDIDOS POR FLUORESCÊNCIA	98
5.1 – INTRODUÇÃO	98
5.2 – EXTINÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DOS PESTICIDAS PELOS AF	99
5.2.1 – Extinção de fluorescência nas MEE dos pesticidas	99
5.2.2 – Extinção de fluorescência nos espectros de emissão dos pesticidas	106
5.3 – ABSORVÂNCIAS AOS COMPRIMENTOS DE ONDA DA EXCITAÇÃO E EMISSÃO	110
5.4 – CORRECÇÃO DOS EFEITOS DE FILTRO	114
5.4.1 – Solução de AF	114
5.4.2 – Solução de pesticidas + AF	115
5.5 – CÁLCULO DOS K_{sv}	118
5.6 – CONCLUSÕES	120
5.7 – BIBLIOGRAFIA	121
6 – INTERACÇÃO DE PESTICIDAS CARBAMATOS COM AF MEDIDOS COM MÉTODOS DE EXTRACÇÃO	122
6.1 – INTRODUÇÃO	122
6.2 – ESTUDO DA SOLUBILIDADE DO CARBARILO EM ÁGUA, SOLUÇÕES AQUOSAS DE AF E SOLUÇÕES AQUOSAS DE SAIS INORGÂNICOS	123

6.2.1 – Calibração do Carbarilo em clorofórmio	123
6.2.2 – Solubilidade do Carbarilo em água	124
6.2.3 – Efeito de sais inorgânicos na solubilidade do carbarilo em água	125
6.2.4. – Efeito de AF na solubilidade do carbarilo em água	129
6.3 – ESTUDO DA SOLUBILIDADE DE CARBOFURANO EM ÁGUA E EM SOLUÇÕES AQUOSAS DE AF	133
6.3.1 – Calibração do carbofurano em ciclohexano hidratado	133
6.3.2 – Solubilidade de carbofurano em água	134
6.3.3. – Efeito de AF na solubilidade do carbofurano em água	134
6.4 – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM OS MÉTODOS DE EXTRACÇÃO E DE EXTINÇÃO DE FLUORESCÊNCIA	138
6.5 – CONCLUSÕES	139
6.6 – BIBLIOGRAFIA	140
7 – CONCLUSÕES	141

ABREVIATURAS

a	atividade de uma substância
AF	ácidos fúlvicos
AH	ácidos húmicos
ANOVA	análise de variância
c	concentração da amostra (numa determinada espécie fluorescente)
C_o	massa de soluto repartida por unidade de massa de MOS
d	percurso óptico
D	coeficiente de difusão
D_f	coeficiente de difusão da molécula fluorescente
DL_{50}	dose letal para 50% dos animais (ratos)
D_q	coeficiente de difusão da espécie extintora
e_{ijk}	erro residual do elemento ijk de uma matriz
F	molécula fluorescente
F^*	molécula fluorescente excitada
f_Q	eficiência de extinção
h	constante de Planck
I	intensidade de radiação fluorescente
I_A	intensidade de radiação absorvida
IHSS	International Humic Substances Society
I_o	intensidade de fluorescência na ausência da espécie extintora
I_T	intensidade de radiação transmitida
I_{Total}	intensidade de radiação incidente
K	constante de equilíbrio do processo de solubilização
k	constante cinética; constante de Boltzman
k_d	constante de extinção bimolecular
K_D	constante de Stern-Volmer para extinção do tipo dinâmico
K_{doc}	coeficiente de partição associado à concentração de carbono orgânico dissolvido
K_{MOD}	coeficiente de partição do soluto entre a MOD e a água pura
K_{OW}	coeficiente de partição água-octanol
K_{SV}	constante de Stern-Volmer
MEE	matriz de excitação-emissão de fluorescência molecular
MOD	matéria orgânica dos solos
N	número de Avogadro
nm	nanómetros
PARAFAC	Análise de Factores Paralelos (PARAllel FACtor analysis)
ppm	partes por milhão
PUR	pesticida de uso restrito
R	raio da colisão
R_f	raio da colisão da molécula fluorescente
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
R_q	raio da colisão da espécie extintora
S^*	solubilidade aquosa aparente
SH	substâncias húmicas
SO	substância orgânica (pesticida)
S_w	solubilidade em água pura
S_w'	solubilidade aparente em função da força iónica

$t_{1/2}$	tempo de semi-vida (persistência no meio ambiente)
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
v	velocidade de um passo elementar
x_{ijk}	elemento de uma matriz X
$x(\lambda_i)$	espectro de excitação ao comprimento de onda λ_i
X	matriz dos espectros de excitação
$y(\lambda_j)$	espectro de emissão ao comprimento de onda λ_j
Y	matriz dos espectros de emissão
Z	frequência de colisões
ϵ	absortividade da amostra
ϕ_f	eficiência de fluorescência
ϕ_f^0	eficiência de fluorescência na ausência da espécie extintora
γ_{\pm}	coeficiente de actividade
η	viscosidade
λ	comprimento de onda
λ_i	comprimento de onda de excitação
λ_j	comprimento de onda de emissão
ν	frequência de uma radiação
τ	tempo de vida da molécula fluorescente na presença da espécie extintora
τ_0	tempo de vida da molécula fluorescente na ausência da espécie extintora

1 – INTRODUÇÃO GERAL

1.1 – PESTICIDAS

1.1.1 – Aspectos gerais

A taxa de crescimento da população mundial atingiu aproximadamente $1,6 \times 10^6$ por semana, exigindo uma disponibilidade de alimentos cada vez maior [1]. Estas necessidades requerem melhorias dramáticas na produtividade da agricultura moderna. As perdas de produção agrícola devido a pragas como animais roedores, insectos, microorganismos e ervas daninhas, conduzem a um agravamento destes problemas demográficos. Quase metade da totalidade dos alimentos destinados à humanidade é consumida ou estragada por estas pestes (30% antes das colheitas e 20% durante o transporte e armazenagem). Os métodos biológicos de protecção das plantas têm grande potencial e são muito importantes, assim como os estimuladores e reguladores do crescimento e desenvolvimento das plantas, mas o controlo químico é a alternativa semelhante correntemente mais utilizada. O controlo químico das pestes é levado a cabo por compostos conhecidos como pesticidas, que incluem os herbicidas, insecticidas, fungicidas, acaricidas, nematocidas, rodenticidas e outros [1].

Por todo o Mundo, aproximadamente 2,5 biliões de toneladas de pesticidas são sistematicamente aplicados em cada ano. Os herbicidas abrangem 50% da utilização total de pesticidas na protecção de plantas. Apesar de os primeiros terem sido aplicados há cerca de 100 anos atrás, o uso generalizado de herbicidas começou apenas depois da Segunda Guerra Mundial. Actualmente, mais de 200 tipos diferentes são utilizados na agricultura. A diminuição nas doses efectivas dos herbicidas modernos (apenas dezenas de gramas por hectare), comparado com as dezenas de quilogramas por hectare das porções inicialmente aplicadas, evidencia o progresso neste campo [1].

Mais de 3 milhões de espécies de insectos habitam a Terra. Destes, cerca de 70 mil podem ser considerados parasitas das plantas. Estes insectos constituem um grande prejuízo para a agricultura já que devoram e inutilizam até cerca de 30 milhões de toneladas de cereais por ano. Em certos países a chegada destas devastadoras pestes, equivale a uma catástrofe nacional. Em tempos passados, estas criaturas vorazes eram associadas à fome uma vez que o seu aparecimento em massa causava frequentemente a fome no homem. A história dos insecticidas começou portanto há muito tempo atrás, e actualmente mais de um milhão de toneladas (cerca de 25% da produção total de

pesticidas) é aplicado anualmente no tratamento dos ecossistemas agrícolas, domésticos e outros [1].

O mecanismo de actuação dos insecticidas consiste na paralisação do sistema nervoso dos insectos contrariando a acção do neurotransmissor natural acetilcolina. Por inibição da enzima colinesterase, os insecticidas impedem a molécula da acetilcolina de se aproximar da enzima. Assim, a transmissão do impulso nervoso é interrompida e os órgãos do insecto deixam de funcionar [1,2].

Os pesticidas podem classificar-se de vários modos: segundo a praga à qual é destinado, segundo a estrutura química do composto utilizado ou ainda segundo a sua toxicidade, grau ou tipo de risco sanitário. Consoante o tipo de aplicação, os pesticidas podem-se dividir em dois tipos: sistémicos (circulam no sistema vascular das plantas) e não sistémicos ou de contacto. As classes químicas mais importantes compreendem os compostos organoclorados, organofosforados e os carbamatos.

1.1.2 – Carbamatos

1.1.2.1 – Introdução

De uma maneira geral os pesticidas constituem, actualmente, um dos maiores contaminantes orgânicos do meio ambiente. Em particular, os pesticidas de carbamatos como o carbofurano, o aldicarbe e o carbarilo (Fig. 1.1), são altamente tóxicos para os peixes em geral, os invertebrados de água e para os pássaros [3-9].

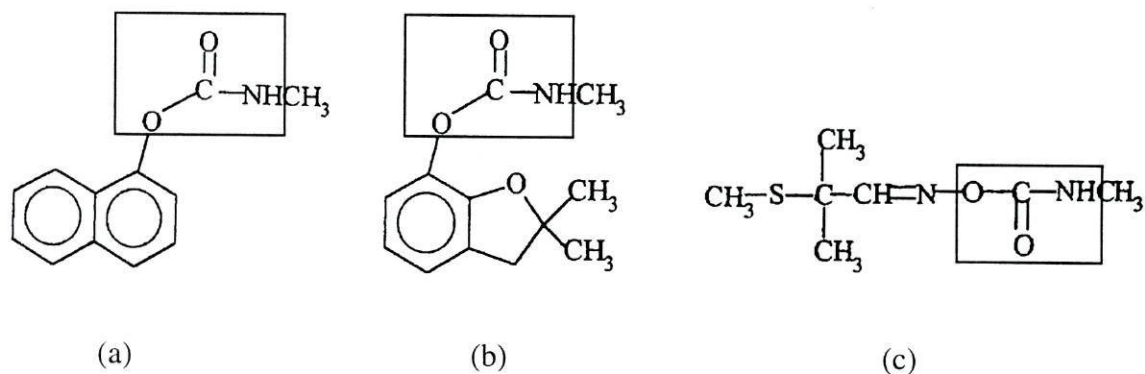


Fig. 1.1 – Fórmulas de estrutura de alguns pesticidas carbamatos: carbarilo (a), carbofurano (b) e aldicarbe (c). Estas figuras evidenciam a unidade estrutural de base comum a todos os pesticidas carbamatos - ácido carbâmico.

Os carbamatos, introduzidos como insecticidas em 1951, derivam do ácido carbâmico, H_2NCOOH . Um dos átomos de hidrogénio ligado ao átomo de azoto é substituído por um grupo alquilo, normalmente metilo, e o átomo de hidrogénio ligado ao átomo de oxigénio é substituído por um grupo orgânico mais longo e mais complexo simbolizado por R como mostra a Fig. 1.2. Assim, os carbamatos constituem o grupo químico dos venenos compostos por ésteres de ácido metilcarbónico ou dimetilcarbónico [1,9].

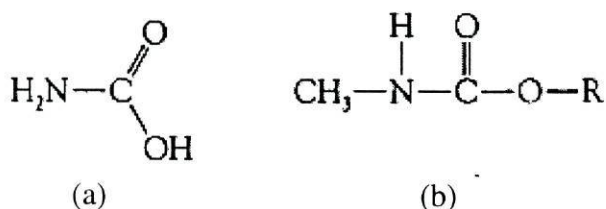


Fig. 1.2 – Fórmulas de estrutura: (a) ácido carbâmico; (b) carbamato.

Os carbamatos actuam inibindo a colinesterase em sinapses nervosas, funcionando como venenos do sistema nervoso, pois impedem a degradação da acetilcolina. Esta substância, que estabelece a comunicação entre as células nervosas, tem de ser destruída depois de executar a sua função para que a transmissão do impulso nervoso seja bem sucedida. A presença da molécula de insecticida suprime assim a transmissão contínua dos impulsos, essencial à coordenação dos processos vitais do organismo, provocando a morte do insecto [1]. Para além disto, muitos destes produtos já foram proibidos em vários países em virtude do seu efeito altamente cancerígeno [9].

A toxicidade potencial de um insecticida, é estimado através do valor da “ DL_{50} ”, que significa “Dose Letal”, expressa em miligramas do insecticida por quilograma de peso do corpo do animal utilizado na experiência, geralmente ratos, e é a quantidade de substância activa que leva à morte de 50% dos animais depois de uma só aplicação. Assim, insecticidas com uma DL_{50} alta têm um valor de toxicidade aguda relativamente baixa. Na Tabela 1.1 encontra-se a classificação dos insecticidas de acordo com a sua toxicidade e em termos de DL_{50} [10]. Segundo esta classificação, alguns carbamatos são altamente tóxicos, como o aldicarbe e o carbofurano com DL_{50} para os ratos, por ingestão de 1 e 8–14 mg/kg, respectivamente, enquanto o carbarilo é conhecido como um insecticida de baixa toxicidade para os mamíferos (DL_{50} para os ratos por ingestão = 850 mg/kg) [3,8,11,12,27].

Os carbamatos têm tempos de residência relativamente curtos no meio ambiente uma vez que reagem com a água e decompõem-se em produtos mais simples eventualmente menos tóxicos. Em suma, os carbamatos (e os organofosfatos) resolvem o problema da persistência e acumulação associadas aos compostos organoclorados, mas, por vezes, às custas de aumentarem a toxicidade aguda no homem e nos animais quando estes contactam com aqueles compostos ainda na sua forma activa [1,9].

Tabela 1.1 – Classificação de insecticidas em função dos valores de DL_{50} nos ratos [10].

Classificação	DL_{50} nos ratos (mg/ kg de peso)	
	Por ingestão	Por absorção da pele
Extremamente tóxico	< 25	< 50
Muito tóxico	25–200	50–400
Moderadamente tóxico	200–2000	400–2000
Pouco tóxico	> 2000	> 2000

Os insecticidas carbamatos são classificados como potenciais poluentes das águas subterrâneas devido à sua elevada solubilidade em água. Um esquema geral das zonas de água abaixo da superfície do solo está representado na Fig. 1.3 [13]. Na água, o tempo médio de degradação é de dias a vários anos [14]. Solos porosos, grandes infiltrações de água devido a chuvas fortes, excessivas épocas chuvosas, excesso de irrigação, superfícies das águas subterrâneas pouco profundas e perdas pela pulverização e por escoamentos são os principais factores que promovem a contaminação das águas subterrâneas por carbamatos [14]. Um exemplo dos diferentes tipos de poluição por pesticidas é apresentado na Fig. 1.4 [13]. Geralmente, devido à sua mobilidade e biodegradabilidade, a persistência dos carbamatos no solo é considerada baixa a moderada (2 semanas a 3 meses dependendo da temperatura, pH, humidade, população microbiana e matéria inorgânica) [12,14]. Não existe, no entanto, muita informação sobre as suas interações com os diversos constituintes que se observam durante a sua migração ao longo das diversas camadas do solo. Em particular,

não existe conhecimento sobre o mecanismo de uma eventual associação com a matéria orgânica.

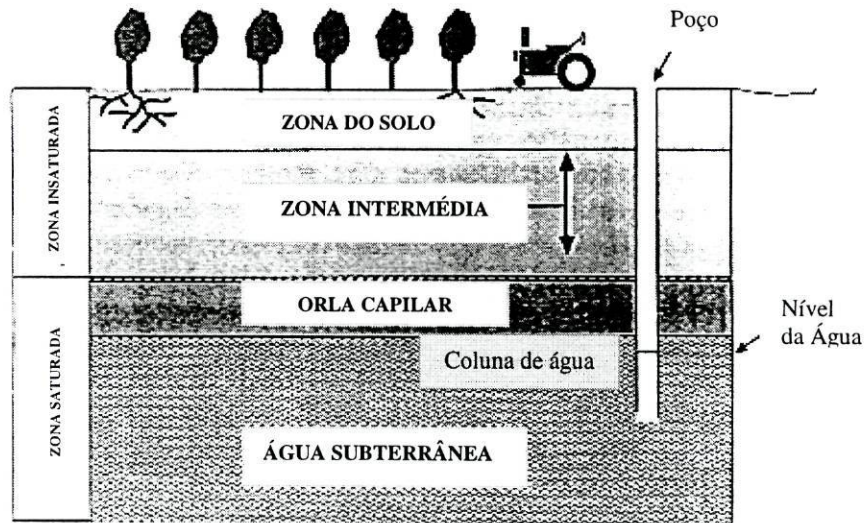


Fig. 1.3 – Zonas de água abaixo da superfície do solo.

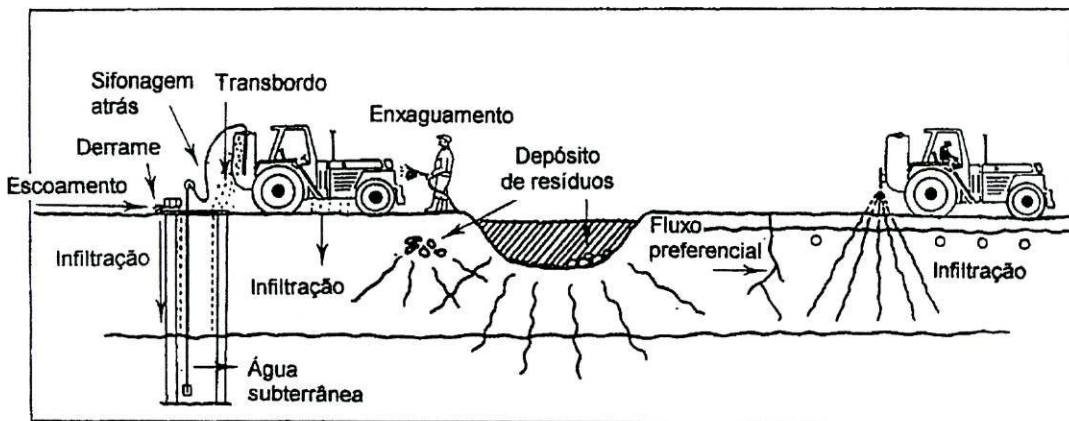


Fig. 1.4 – A poluição da água pelos pesticidas pode ser causada por poluição directa de poços ou furos, por infiltrações a partir de fontes pontuais na superfície do solo, ou em zonas de depósitos de resíduos ou ainda por infiltrações posteriores ao tratamento [13].

Tabela 1.2 – Tempos de semi-vida aproximados ($t_{1/2}$ *) de três carbamatos na água e no solo para diferentes valores de pH [8,12,14,15].

Carbamato	pH=6		pH=7		pH=8	
	Água	Solo	Água	Solo	Água	Solo
Carbarilo	Hidrólise insignificante	4 semanas	2 semanas		1 dia	3 dias
Carbofurano		16 semanas	8 semanas		1 semana	30 dias
Aldicarbe		#	35 semanas	#	38 semanas	#

* – refere-se ao tempo requerido para degradar 50% da substância activa.

– variável (não foram encontrados dados concretos disponíveis).

Pela análise da Tabela 1.2, verifica-se que o carbarilo é o pesticida que se degrada mais rapidamente e que o aldicarbe tem uma biodegradação e uma hidrólise química lentas, persistindo durante mais tempo no ambiente do que os outros dois compostos.

Na Europa, o consumo anual de pesticidas tem vindo a aumentar desde 1992 [16]. Por exemplo, na Grécia e em 1988, a aplicação anual destes pesticidas foi cerca de: carbarilo (85%) – 40 t, carbarilo (10%) – 20 t, carbofurano (10%) – 150 t, carbofurano (25%) – 47000 l, e aldicarbe (80%) – 50 a 60 t [17].

Existe muito pouca informação relativamente à utilização de carbamatos em Portugal nos últimos anos. A existência de carbamatos em amostras ambientais começou a ser analisada pelo laboratório de resíduos de produtos fitofarmacêuticos desde o ano 2000 e os resultados obtidos ainda não estão disponíveis. Segundo informação da Direcção-Geral de Protecção das Culturas, a venda total de Carbamatos em Portugal no ano de 1999 atingiu 174 336 kg sendo 82% herbicidas e 18% insecticidas. Destes últimos, o produto mais vendido foi o carbofurano (24%) e o carbarilo (19%) [18].

Devido à sua grande selectividade e sensibilidade, as técnicas cromatográficas têm sido largamente usadas para análise de pesticidas, mas apresentam algumas reservas. Por exemplo, os carbamatos não podem ser determinados directamente por cromatografia gasosa, porque são termicamente instáveis e deverá ser usado um procedimento de derivatização. As propriedades de fluorescência dos pesticidas têm sido também utilizadas nestes últimos anos para a sua determinação quantitativa [19,20].

Do ponto de vista ambiental, é de grande importância a monitorização dos pesticidas nas águas ou nos alimentos e, contrariamente às técnicas cromatográficas, as espectrofotométricas (UV-Vis e fluorescência molecular) tornam-se expeditas e económicas para este fim.

No presente trabalho utilizaram-se estas últimas técnicas para a determinação do Carbarilo e do Carbofurano, dado estes serem fluorescentes, assim como para alguns dos seus metabolitos. No caso do Aldicarbe, e nas condições experimentais utilizadas, não foi observada fluorescência molecular. Da análise da estrutura deste pesticida não seria de prever propriedades de fluorescência muito intensas porque não existem estruturas aromáticas e conjugação de ligações múltiplas.

1.1.2.2 – Carbarilo

O carbarilo ($C_{12}H_{11}NO_2$) é um insecticida de contacto usado no algodão, em frutos, florestas, nozes e outras culturas, e é inerentemente tóxico para o Homem através do contacto com a pele, inalação, e/ ou ingestão [3,7]. São sintomas de toxicidade humana por carbarilo: náuseas, vómitos, diarreia, visão nublada, salivação excessiva, contracção muscular, cianose, convulsões, coma e deficiência respiratória [7].

O carbarilo (1-naftil-metilcarbamato ou, citando alguns nomes comerciais, Sevin ou Ravyon) tem utilização doméstica como insecticida de jardins e de animais domésticos. Em Portugal os produtos comerciais à base desta substância activa têm venda autorizada, por exemplo, para o combate das traças da uva e do escaravelho da batateira [21,22]. Este insecticida, que apresenta um grau de toxicidade variável entre o moderado e o elevado, não é carcinogénico, embora o produto da sua reacção com o nitrito o seja. Com um efeito duradouro, o carbarilo é aplicado como um pó pulverizado e é mais activo nos insectos do que nos mamíferos. A destruição de populações de abelhas em áreas pulverizadas é, por vezes, um problema. O carbarilo é moderadamente tóxico para os organismos aquáticos e para os pássaros. Este carbamato controla mais de 100 espécies de insectos e tem uma semi-vida de 7 dias em solo aeróbico e 28 dias em solo anaeróbico. Geralmente, devido ao seu rápido metabolismo e rápida degradação, o carbarilo não representa um risco de bioacumulação significativo em águas alcalinas. No entanto, sob condições de pH ácido esse risco pode ser significativo. Assim, em sistemas aquáticos a hidrólise do carbarilo ocorre a valores de pH superiores a 7, dando origem a 1-naftol e metilamina. O carbarilo tem uma vida residual curta nas culturas tratadas. Ele permanece no local de aplicação, onde é absorvido lentamente para a

planta e metabolizado. As propriedades de insecticida são conservadas durante 3 a 10 dias. As perdas de carbarilo são devidas a evaporação e absorção para as plantas. A degradação pela luz não parece ser significativa. Apesar da degradação ser relativamente rápida, devido à sua solubilidade em água, o carbarilo é bastante móvel no solo e a possibilidade de migração da substância nas águas subterrâneas tem de ser levada em consideração [12]. Os metabolitos mais frequentes do carbarilo são o 1-naftol, 2-isopropoxifenol, 1,4-naftoquinona e o 3-hidroxi-1,4-naftoquinona (Fig. 1.5).

O uso de carbarilo deveria ser reduzido tanto quanto possível. Na Alemanha, por exemplo, o seu uso é proibido desde 1994. O valor da quantidade de resíduos deste pesticida nos alimentos, permitida pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS), é de 0,01 ppm [12].

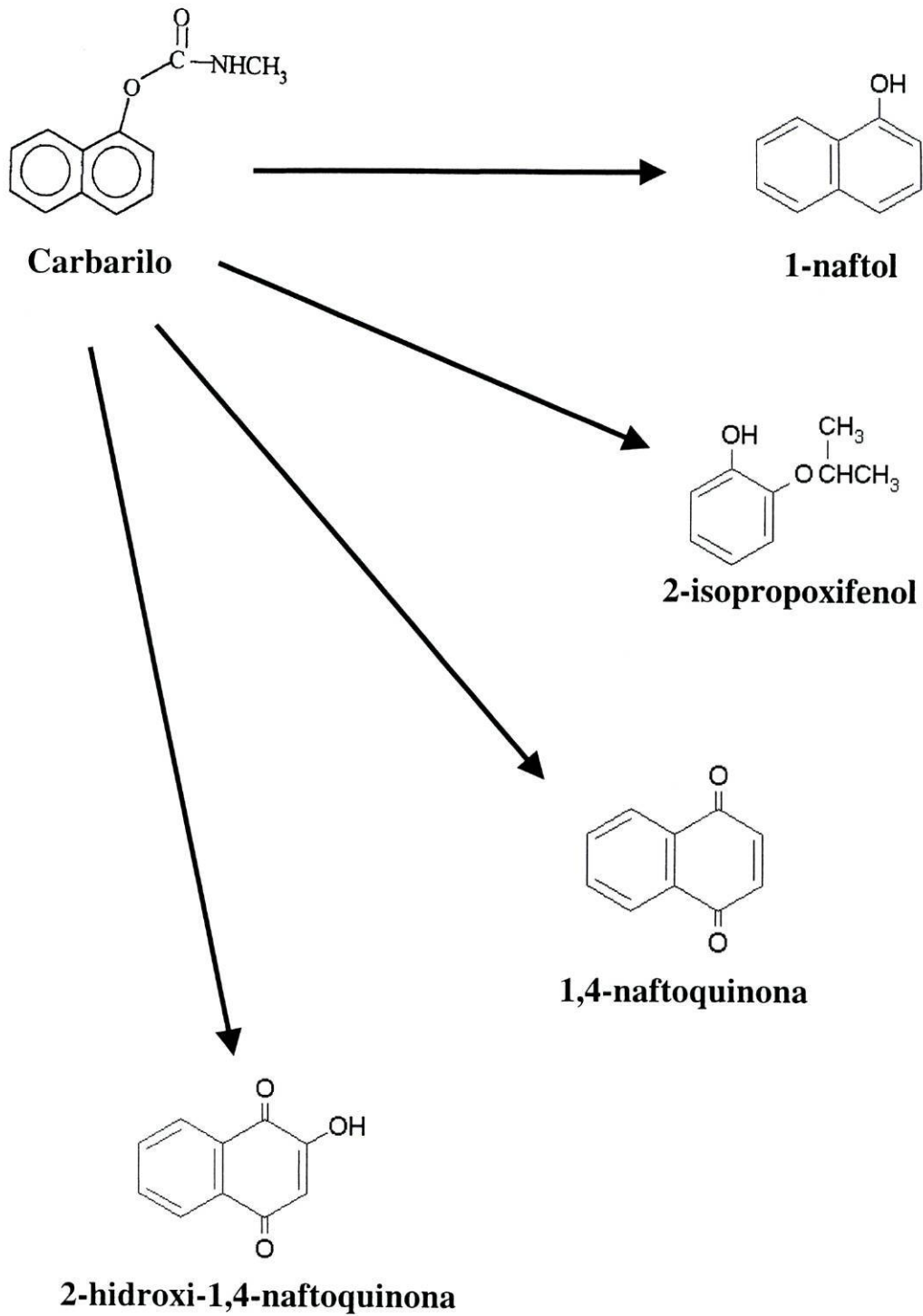


Fig. 1.5 – Fórmulas de estrutura do carbarilo e de quatro dos seus metabolitos.

1.1.2.3 – Carbofurano

O carbofurano (Fig. 1.1) é usado na cultura da batata e em culturas rotativas para controlar o escaravelho da batata e os gafanhotos. Ele actua como um inibidor da colinesterase depois que o insecto contacta a superfície tratada e/ou ingere tecido vegetal tratado [3]. Este insecticida sistémico é utilizado ainda como acaricida e nematodocida [7,23].

O carbofurano (Furadan ou Diafuran; nomes de produtos comerciais homologados em Portugal) é altamente tóxico por inalação e ingestão mas é deficientemente absorvido pela pele sendo moderadamente tóxico neste caso. O envenenamento por carbofurano inibe a colinesterase nos animais e nos seres humanos, afectando o funcionamento do sistema nervoso e provocando os sintomas: náuseas, vómitos, suores, diarreia, visão nublada, salivação excessiva, fraqueza, desequilíbrio, dificuldade respiratória, aumento da pressão arterial e incontinência. Em doses elevadas pode levar à morte como resultado da falha do sistema respiratório associada com a exposição ao carbofurano. A recuperação completa de um envenenamento agudo pelo carbofurano, com nenhuns efeitos de saúde a longo prazo, é possível se a exposição cessar e a vítima tiver tempo para recuperar o seu nível normal de colinesterase [7,8]. Este pesticida metabolizado no fígado é excretado na urina e tem um tempo de permanência no corpo humano de 6 a 12 horas [8].

O carbofurano é altamente tóxico para os pássaros. Os seus grânulos assemelham-se a sementes de grão no tamanho e na forma. Um grânulo é suficiente para matar um pássaro pequeno pelo que a sua formulação granular é classificada como pesticida de uso restrito (PUR). Exceptuando nesta formulação, o carbofurano é ainda tóxico para as abelhas. É também classificada como PUR a formulação líquida devido à sua toxicidade aguda por inalação e por via oral nos seres humanos [8].

O carbofurano é altamente tóxico para muitos peixes. Este pesticida é solúvel em água, decompõe-se com a luz solar e é moderadamente persistente no solo. Neste, o carbofurano é degradado por hidrólise química (mais rápida nos solos alcalinos) e por processos microbianos. Os seus metabolitos mais frequentes são o 3-hidroxi-carbofurano, 3-cetocarbofurano e 3-cetocarbofuranofenol (Fig. 1.6), sendo este último o seu principal produto da fotodegradação na água enquanto que os dois primeiros foram identificados nos solos. O carbofurano tem, portanto, um elevado potencial para a contaminação da água dos solos [8].

Carbofurano

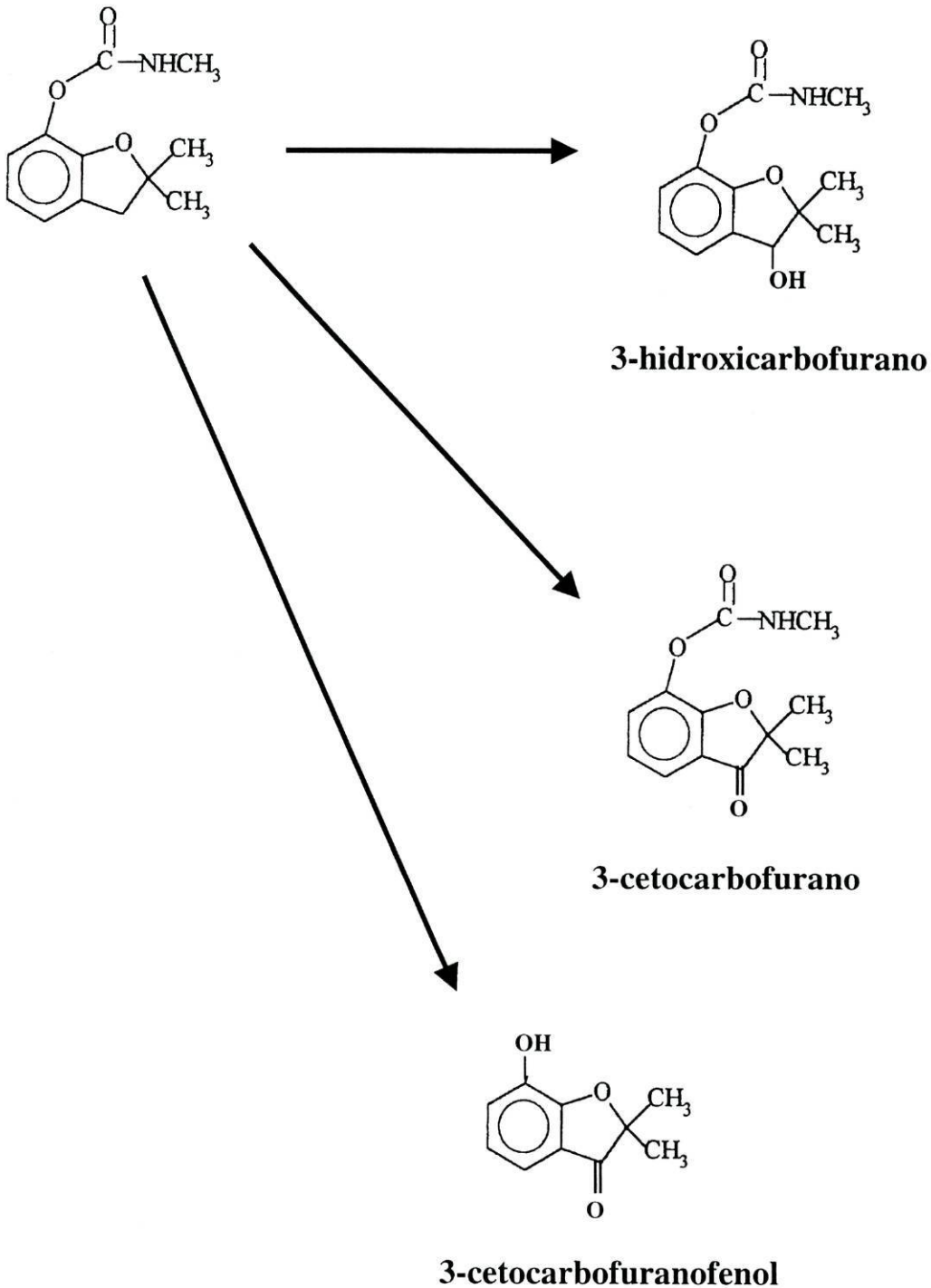


Fig. 1.6 – Fórmulas de estrutura do carbofurano e de três dos seus metabolitos.

Na Tabela 1.3 apresentam-se algumas propriedades físicas do carbarilo e carbofurano [7,8,10,13]. Estas substâncias orgânicas têm as propriedades físicas massa molecular, ponto de fusão e coeficiente de partição octanol/ água semelhantes, diferindo na respectiva solubilidade em água. O carbofurano é cerca de dez vezes mais solúvel em água do que o carbarilo talvez porque o substituinte naftaleno do carbarilo, que é apolar, na molécula de carbofurano está modificado num substituinte polar (Fig. 1.1).

Tabela 1.3 – Propriedades físicas do carbarilo e do carbofurano [7,8,10,13].*

Propriedade	Carbarilo	Carbofurano
Massa molecular	201,22	221,26
Ponto de fusão (°C)	142	150-153
Log S _w a 25 °C	-3,70	-2,84
S _w a 25 °C (M)	1,99 x 10 ⁻⁴	1,45 x 10 ⁻³
S _w a 25 °C (ppm)	40	320
Log K _{ow}	2,3	1,5

* S_w – solubilidade em água.

K_{ow} – coeficiente de partição água-octanol

1.1.2.4 – Aldicarbe

O aldicarbe (Fig. 1.1) é um dos pesticidas mais venenosos que se utiliza em práticas agrícolas. Inseticida sistémico, nematodocida e acaricida, o aldicarbe é largamente usado no controlo de pulgões, traças e vermes nas culturas do algodão, amendoim e da soja [3,23-27]. Em Portugal é recomendado para o controlo de pequenos insectos de flores em culturas como o Crisântemo, o Craveiro, a Roseira e o Gladiolo [25,26].

O aldicarbe (ou Temik; nome comercial por que é conhecido) é extremamente tóxico pela via oral e por absorção da pele. A absorção pelo intestino é rápida e quase completa e é rapidamente absorvido pela pele, sendo esta última toxicidade mil vezes maior que a de outros carbamatos. Nos seres humanos os sintomas por envenenamento

aparecem rapidamente, entre 15 minutos a 3 horas e desaparecem em 4 a 12 horas. O aldicarbe é também um inibidor da colinesterase e assim pode provocar fraqueza, visão nublada, dores de cabeça, náuseas, suores e tremores. Em doses elevadas pode provocar a morte devido à paragem do sistema respiratório. Nos seres humanos e nos animais este pesticida é metabolizado e excretado rapidamente principalmente pela urina mas também no ar expirado pelos pulmões [27].

À semelhança do carbofurano, o aldicarbe é altamente tóxico para os pássaros. Neste caso, a grande causa de intoxicação é pela ingestão não só de grânulos não incorporados no solo como também de minhocas contaminadas. O aldicarbe não é tóxico para as abelhas, mesmo quando aplicado directamente e é moderadamente tóxico para os peixes. O composto tem persistência moderada no solo onde é muito solúvel e móbil. Foi já encontrado nos poços de vários países em concentrações acima do nível máximo de contaminação da água potável. Sendo um pesticida sistémico, é aplicado directamente nas raízes das plantas, podendo facilmente atingir a água subterrânea com a irrigação [14]. O aldicarbe é degradado por bactérias, luz solar e reacções com a água. Por causa da sua taxa rápida de degradação, os níveis na água de superfície podem ser mais baixos do que os existentes na solução do solo [27]. A Fig. 1.7 apresenta a estrutura dos metabolitos sulfona e sulfóxido resultantes da oxidação do aldicarbe [14,28].

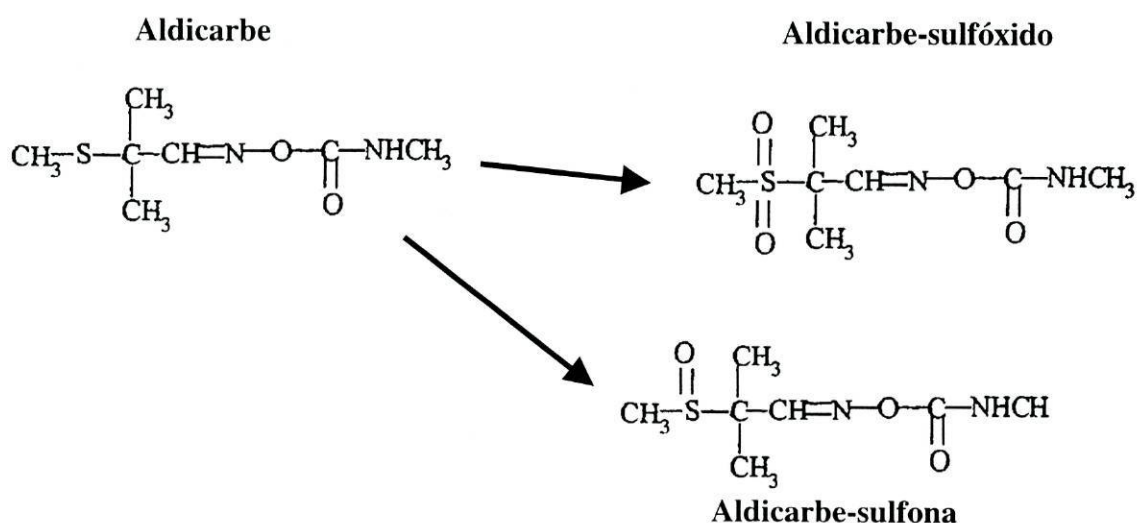


Fig. 1.7 – Fórmulas de estrutura do aldicarbe e de dois dos seus produtos de oxidação.

1.2 – SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

1.2.1 – Aspectos gerais

A matéria orgânica presente nos solos e águas e que não se encontra incorporada nos tecidos vivos dos microorganismos é constituída por misturas complexas de compostos que podem ser agrupados em classes de acordo com a sua composição química e reactividade [29-31]. Assim, uma das classes inclui biomoléculas de composição química e funções biológicas conhecidas (como por exemplo aminoácidos, proteínas, açúcares, gorduras e ácidos orgânicos de baixa massa molecular) que foram produzidas pela actividade de microorganismos sobre restos de plantas e animais. Estes compostos são facilmente assimilados pelos organismos, pelo que persistem nos solos durante períodos de tempo curtos. Uma outra classe compreende produtos intermédios e/ou parcialmente degradados com alguma estabilidade química e biológica (como os tecidos de plantas e animais e produtos da sua decomposição parcial) que foram gerados em processos de decomposição incompleta de restos de materiais orgânicos. Uma terceira classe, a das substâncias húmicas (SH), é formada por um conjunto de compostos orgânicos de cor amarela, castanha ou preta, com uma massa molecular relativamente elevada, propriedades físicas e químicas relativamente estáveis e elevados tempos de vida média nos sistemas ambientais [32].

As SH presentes nos solos e águas são constituídas por misturas heterogéneas de macromoléculas orgânicas com estruturas alifáticas e aromáticas, cuja composição final depende directamente dos materiais de origem e tempo de maturação, e indirectamente de factores externos como o clima (que afecta a existência de diferentes espécies de plantas, a quantidade de material vegetal produzido por estas e a intensidade da actividade dos microorganismos que intervêm na sua decomposição), a morfologia do solo e a incorporação de novos materiais residuais [30,31,33]. Estas substâncias, que derivam de um grande número de compostos provenientes da transformação química e microbiológica da matéria orgânica fresca existente nos solos, são produzidas no decorrer de um conjunto de processos químicos complexos a que se atribui a designação genérica de processo de humificação [33]. No decurso deste processo onde se decompõe biomassa até à obtenção de materiais estabilizados, o carbono orgânico é oxidado por organismos heterotróficos que introduzem no seu próprio metabolismo a energia retirada dos processos de oxidação, realizando a decomposição da matéria orgânica até

os conteúdos de oxigénio e água, temperatura e níveis de nutrientes básicos não se mostrarem adequados à sua actividade biológica [31].

As SH podem ser subdivididas em três grupos de acordo com a sua solubilidade em água. Assim, enquanto os ácidos fúlvicos (AF) são solúveis em solução aquosa a qualquer valor de pH e os ácidos húmicos (AH) apenas em meio alcalino, a humina é insolúvel em meio ácido ou básico [29,31,33,34].

Na Tabela 1.4 apresentam-se características elementares típicas [29] das fracções AF e AH. Da análise desta tabela verifica-se que o carbono e o oxigénio são os seus constituintes principais. Assim, enquanto o carbono varia entre 41 e 59 %, o oxigénio oscila entre 33 e 50 % e as percentagens dos outros elementos apresentam-se na gama dos 3 a 7 % para o hidrogénio, 1 a 4 % para o azoto e 0,1 a 4 % para o enxofre. Quando se confrontam as composições elementares dos AF e dos AH, verifica-se que os AF possuem quantidades inferiores de carbono e quantidades mais elevadas de oxigénio.

Na Tabela 1.4 apresentam-se também valores típicos para os grupos funcionais mais característicos das SH [29]. Verifica-se que os AF possuem uma acidez total superior e quantidades mais elevadas de grupos carboxílicos, fenólicos e carbonilo. Dado que as SH se encontram sempre presentes nos solos em quantidades apreciáveis, a elevada quantidade deste grupo induz uma participação intensa destas substâncias em alguns fenómenos químicos e físicos, como a permuta catiónica, mineralização do solo, capacidade tampão de pH e combinação com micronutrientes e/ou micropoluentes (metais pesados, moléculas orgânicas como os pesticidas, etc.) [30,35]. De uma forma mais genérica, as SH influenciam processos como a biodisponibilidade / fitotoxicidade, mobilização/transporte e imobilização/acumulação de poluentes ou elementos essenciais [30,34]. Por exemplo, as SH fornecem quase todo o azoto, 50 a 60 % do fosfato, cerca de 80 % do enxofre e grande parte do boro e molibdénio adsorvidos pelas plantas em regiões temperadas com solos não fertilizados [31]. A disponibilidade de muitos micronutrientes catiónicos é também grandemente afectada pela presença de SH, uma vez que a formação de complexos estáveis com os catiões diminui a probabilidade de ocorrerem reacções de hidrólise e de precipitação, o que lhes reduziria a solubilidade e disponibilidade [31].

Tabela 1.4 – Características elementares dos AF e AH e quantidades típicas de grupos funcionais [29,32].

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

* – Valores típicos

1.2.2 – Ácidos fúlvicos

Os ácidos fúlvicos (AF) encontram-se em elevada percentagem nas águas e solos, sendo conhecida a sua elevada capacidade de transporte de poluentes tóxicos tais como iões de metais pesados e compostos orgânicos hidrofóbicos [31,33,35,36]. Os AF correspondem à fracção das SH constituída por macromoléculas com menores massas moleculares. Os AF são produtos do processo natural de decomposição dos materiais vegetais e animais mortos que ocorre nos solos e sistemas aquosos. Este processo de decomposição denomina-se de processo de humificação e é constituído por um complexo sistema de mecanismos bioquímicos ainda pouco conhecidos. Assim, os AF não podem ser compreendidos como uma substância química clássica, à qual corresponde uma estrutura molecular bem definida, mas sim como uma mistura extraordinariamente diversa de macromoléculas diferentes e com massas moleculares elevadas e muito variadas [37].

Do ponto de vista químico, os AF correspondem a uma fracção da matéria orgânica dos solos obtida na sequência de um processo de extracção constituído por um conjunto de processos unitários (é, portanto, uma definição operacional) [38]. De forma resumida, os AF correspondem à fracção que é solúvel em solução aquosa com qualquer

valor de pH. Esta relativamente grande solubilidade deve-se à baixa massa molecular e maior quantidade de grupos funcionais, tais como grupos carboxílicos, hidroxílicos e fenóis, das macromoléculas que constituem esta fracção quando comparada com a massa molecular das moléculas que constituem as outras fracções das SH, nomeadamente os AH. Devido à sua elevada solubilidade e grande concentração de estruturas quimicamente reactivas, os AF são substâncias particularmente activas em praticamente todos os processos químicos que ocorrem nos solos e águas naturais, como por exemplo: reacções químicas de ácido-base; complexação de catiões metálicos e adsorção de poluentes orgânicos hidrofóbicos.

1.2.3 – Mecanismos de solubilização

Até meados dos anos oitenta havia alguns estudos sobre a adsorção de espécies orgânicas em sedimentos ou partículas sólidas em suspensão [39]. Os resultados obtidos mostraram que a afinidade das espécies orgânicas para se associarem com a fase sólida estava correlacionada com a hidrofobicidade da substância (expressa como o coeficiente de partição água/octanol) e com a quantidade de matéria orgânica do sedimento [39]. Do ponto de vista do mecanismo de associação esta pode ser descrita por partição do soluto entre duas fases. Por outro lado, havia estudos que mostravam a existência de interacção entre espécies orgânicas (como por exemplo, hidrocarbonetos poliaromáticos, insecticidas e herbicidas) e SH dissolvidas em água da qual resultava um aumento da solubilidade das espécies orgânicas pouco solúveis [39-41]. No entanto, e até aquela data, o tipo de mecanismo em jogo na interacção com SH dissolvidas, tendo como consequência um aumento de solubilidade em solução aquosa das espécies orgânicas pouco solúveis, era muito pouco conhecido [39-41].

Em princípio, um co-soluto pode aumentar a solubilidade de um soluto por alterar a solvatação do meio ou por interacção directa entre os dois (adsorção ou partição). É pouco provável que quando os co-solutos são SH em baixas concentrações haja um forte impacto nas propriedades de solvatação da água. Também, é pouco provável que existam interacções específicas entre os solutos orgânicos não iónicos e os grupos funcionais das SH em solução aquosa, porque estes devem estar mais fortemente associados com água [37].

Atendendo ao facto de que as SH são macromoléculas orgânicas contendo fragmentos apolares, pode-se pôr como hipótese a existência de um mecanismo de partição do soluto entre a solução aquosa e aquele fragmento apolar das SH dissolvidas

[42]. Neste caso, e do ponto de vista do co-soluto (SH), a extensão da interacção do tipo partição dependeria do tamanho e polaridade das moléculas de SH. Assim, para haver partição as SH deverão ser suficientemente grandes e conter fragmentos apolares com tamanho razoável. De acordo com este mecanismo de partição, co-solutos de massa molecular relativamente baixa não deverão aumentar significativamente a solubilidade do soluto. Para que um soluto seja candidato a ter um aumento de solubilidade este terá que ser muito pouco solúvel e uma afinidade muito grande com a fase orgânica apolar. O estudo publicado em 1986 por Chiou *et al* [42] confirmou a existência de uma interacção do tipo partição entre duas fases para justificar o aumento de solubilidade de alguns poluentes orgânicos e pesticidas.

1.3 – OBJECTIVOS DO TRABALHO

O objectivo desta dissertação foi estudar a interacção dos pesticidas carbamatos carbarilo e carbofurano, e dos seus metabolitos, com uma fracção da matéria orgânica dos solos; os AF. Do ponto de vista experimental implementaram-se duas técnicas de estudo das interacções, uma baseada na medição da extinção de fluorescência dos carbamatos fluorescentes pelos AF, e outra baseada numa sequência de operações de extracção para a determinação da solubilidade em soluções aquosas.

Um objectivo secundário foi obter informação sobre as propriedades de fluorescência em estado estacionário dos carbamatos estudados, para estabelecer as bases para a implementação de metodologias de análise química destas substâncias. Nestes procedimentos pretendem-se testar técnicas quimométricas de decomposição trilinear de dados multidimensionais (coleções de matrizes de excitação-emissão), nomeadamente o modelo PARAFAC.

O objectivo final do trabalho é contribuir para o conhecimento dos mecanismos de transporte dos pesticidas carbamatos (poluentes químicos do ambiente) nos solos.

1.4 – ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Para além deste capítulo de introdução geral, esta dissertação contém: um **segundo** capítulo, onde se apresentam os fundamentos teóricos das técnicas experimentais e modelos de análise dos dados usadas neste trabalho; um **terceiro** capítulo, onde se descreve o trabalho experimental; três capítulos, **quarto, quinto e sexto**, onde se apresentam e se discutem os resultados obtidos com a análise das propriedades de fluorescência do carbarilo e carbofurano e seus metabolitos, e análise das interações dessas substâncias com os AF; e, finalmente, um **sétimo** capítulo de conclusões globais.

1.5 – BIBLIOGRAFIA

1. A. F. Pozharskii, A. T. Soldatenkov, A. R. Katritzky, *Heterocycles in Life and Society*, John Wiley & Sons Ltd, England (1997) 165.
2. C. Baird, *Environmental chemistry*, W.H. Freeman and Company, New York (1999) Cap.6.
3. F. Fang, S. Kanan e H. H. Patterson, *Anal. Chim. Acta*, 373 (1998) 139.
4. Stuart, R. Ansell, J. MacLachlan e P. Bather, *Analyst*, 124 (1999) 275.
5. K. Mohan, A. Ramesh e K. Seshaih, *Analyst*, 125 (2000) 323.
6. W. Everett e G. Rechnitz, *Anal. Letters*, 32 (1999) 1.
7. *The Merck Index*, 11 Edition, Merck & Co., Inc, Rahway, N.J., USA (1989).
8. <http://ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/carbofur.htm> (12-01-2001).
9. <http://www.sytonia.com/textos/textosnatural/textosagricultura/agrotoxicos1.htm> (09-04-2001).
10. <http://www.fao.org/inpho/vlibrary/gtzhhtml/x0065p/X0065P0e.htm> (09-04-2001).
11. N. de Bertrand e D. Barceló, *Anal. Chim. Acta*, 254 (1991) 235.
12. <http://www.nccnsw.org.au/member/tec/projects/tcye/tox/carbaryl.html> (27-09-2000).
13. D. Barceló e M.-C. Hennion, *Trace Determination of Pesticides and Their Degradation Products in Water*, The Netherlands (1997) Cap. 1.
14. Y. Mason, E. Choshen e C. Rav-Acha, *Wat. Res.*, 24 (1990) 11.
15. R. P. Maas, S. A. Dressing, J. Spooner, M. D. Smolen, F. J. Humenik, *Best Management Practices for Agricultural Nonpoint Source Control – IV. Pesticides*, United States Environmental Protection Agency, North Carolina (1984) Cap. 2.
16. <http://www.dga.min-amb.pt/rea99/rea99-27-2710.htm> (16-05-2001).
17. V. Samanidou, K. Fytianos, G. Pfister e M. Bahadir, *The Science of the Total Environment*, 76 (1988) 85.
18. Informação particular obtida junto da Direcção-Geral de Protecção das Culturas – Div. Homologação (09-05-2001).
19. A. Coly e J. Aaron, *Analyst*, 119 (1994) 1205.
20. A. Coly e J. Aaron, *Talanta*, 41 (1994) 1475.
21. E.L. Leite, *Ficha técnica*, 9, Divisão de Controlo Fitossanitário, Direcção Regional de Agricultura de Entre-Douro e Minho (1999).

-
22. B. Ribeiro e E.L. Leite, Ficha técnica, 38, Divisão de Controlo Fitossanitário, Direcção Regional de Agricultura de Entre-Douro e Minho (1994).
 23. J.B. Sobreiro e C. J. Reis, Guia dos Produtos Fitofarmacêuticos – Lista dos Produtos com Venda Autorizada, Direcção-Geral de Protecção das Culturas, Oeiras (2000).
 24. A. F. C. Cêa, A. Veloso e M. Matos, O Minho, a terra e o homem, 41, Direcção Regional de Agricultura de Entre-Douro e Minho (1999).
 25. E.L. Leite, Ficha técnica, 11, Divisão de Controlo Fitossanitário, Direcção Regional de Agricultura de Entre-Douro e Minho (1999).
 26. E.L. Leite e J. F. Pinto, Ficha técnica, 85, Divisão de Controlo Fitossanitário, Direcção Regional de Agricultura de Entre-Douro e Minho (2000).
 27. <http://ace.ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/aldicarb.htm> (26-06-2000).
 28. N. Aharonson, Pure Appl. Chem., 59 (1987) 1419.
 29. G.G Choudhry, Humic Substances: Structural, Photophysical, Photochemical and Free Radical Aspects and Interactions with Environmental Chemicals, Gordon and Breach Science Publishers, New York (1984) Part I.
 30. N. Senesi, T. M. Miano e G. Brunetti, Humic-like Substances in Organic Amendments and Effects on Native Soil Humic Substances, A. Piccolo (Ed.), em Humic Substances in Terrestrial Ecosystems, Elsevier, Amsterdam (1996) Cap. 14.
 31. F.J. Stevenson, Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions, Wiley, New York (1992) Cap.s 1 e 2.
 32. C.J.S. Oliveira, Caracterização de Ácidos Fúlvicos extraídos de Resíduos Reciclados para Actividades Agrícolas, Tese de Doutoramento, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto (2000).
 33. M.A. Rashid, Geochemistry of Marine Humic Compounds, Springer-Verlag, New York (1985) Cap. 2.
 34. W. Kordel, M. Dassenakis, J. Lintelmann e S. Padberg, Pure Appl. Chem., 69 (1997) 1571.
 35. F.J. Stevenson, Geochemistry of Soil Humic Substances, G. R. Aiken, D. M. Mcknight, R. L. Wershaw e P. MacCarthy (Eds.), em Humic Substances in Soil, Sediment and Water, Wiley, New York (1985) Cap. 2.
 36. I.H. Sufert e P. MacCarthy (Eds.), Aquatic Humic Substances – Influence on Fate and Treatment of Pollutants, ACS (219), American Chemical Society, Washington (1989).
-

37. M.C.P.O. Marques, *Interacção de Ácidos Fúlvicos com Pentaclorofenol e Pireno: Metodologias para a Análise Rápida de Clorofenóis e Hidrocarbonetos Poliaromáticos*, Tese de Mestrado, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto (2000).
38. E. M. Thurman (Rapporteur), *Isolation of Soil and Aquatic Substances (Group Report)*, em F. H. Frimmel, R. F. Christmant (Eds.), *Humic Substances and Their Role in the Environment*, Wiley-Interscience, New York (1988) 31.
39. S.W. Karickhoff, D.S. Brown e T.A. Scott, *Water Res.*, 13 (1979) 241.
40. P.M. Roemelt e W.R. Seitz, *Environ. Sci. Technol.*, 16 (1982) 613.
41. J.F. McCarthy e B.D. Jimenez, *Environ. Sci. Technol.*, 19 (1985) 1072.
42. C. T. Chiou, R. L. Malcolm, T. I. Brinton e D. E. Kile, *Environ. Sci. Technol.*, 20 (1986) 502.

2 – ASPECTOS TEÓRICOS

Neste capítulo apresentam-se os fundamentos teóricos das metodologias experimentais e de cálculo utilizadas nesta dissertação. Será dado particular destaque aos princípios teóricos da fluorescência molecular, atendendo ao relevo que teve no trabalho experimental desta dissertação. A utilização da espectroscopia de fluorescência molecular está relacionada com a sua importância no estudo de pesticidas da família dos carbamatos com propriedades fluorescentes. De facto, as metodologias analíticas baseadas em cromatografia gasosa, vulgarmente utilizadas na análise química de pesticidas, não podem ser directamente aplicadas à análise de pesticidas da família dos carbamatos devido a estes se decomporem termicamente.

2.1 – FLUORESCÊNCIA MOLECULAR

2.1.1 – Relação da intensidade de fluorescência com a concentração

Quando um feixe de radiação de intensidade I_{Total} atravessa uma amostra, pode ocorrer a sua absorção (I_{A}) pelas substâncias que lá existem (Fig. 2.1). Alguma da radiação absorvida poderá ser emitida sob a forma de radiação fluorescente (I). A fracção de I_{Total} que atravessa a amostra denomina-se de radiação transmitida (I_{T}). A radiação absorvida é calculada como:

$$I_{\text{A}} = I_{\text{Total}} - I_{\text{T}} \quad (2.1)$$

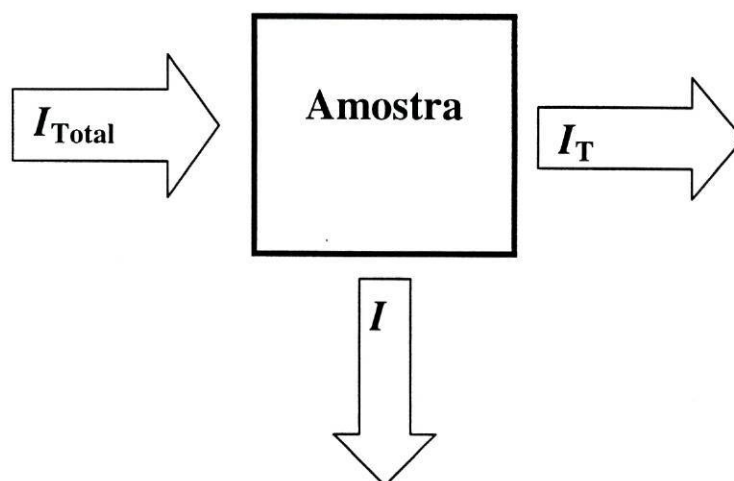


Fig. 2.1 – Esquema das observações de quando um feixe de luz de intensidade I_{Total} atravessa uma amostra. Alguma da radiação é transmitida (I_{T}) e alguma é emitida como fluorescência (I).

A eficiência de fluorescência (ϕ_{f}) é definida como a fracção de radiação incidente que é reemitida como fluorescência,

$$\phi_{\text{f}} = \text{número de fótons emitidos} / \text{número de fótons absorvidos} = I / I_{\text{A}} \quad (2.2)$$

ou,

$$I = \phi_{\text{f}} I_{\text{A}} = \phi_{\text{f}} (I_{\text{Total}} - I_{\text{T}}) \quad (2.3)$$

$$I = \phi_f I_{\text{Total}} = \phi_f I_{\text{Total}} (1 - I_T / I_{\text{Total}}) \quad (2.4)$$

No entanto a razão I_T / I_{Total} é a transmitância da amostra e que está relacionada com a sua absorvância [1],

$$\text{Log} (I_T / I_{\text{Total}}) = I_A = \epsilon c d \quad (2.5)$$

$$I_T / I_{\text{Total}} = e^{(-k c d)} \quad (2.6)$$

onde ϵ é a absorvância da amostra ($k=2,303.\epsilon$), c a sua concentração e d o percurso óptico. Assim, juntando as equações 2.4 e 2.6 vem,

$$I = \phi_f I_{\text{Total}} [1 - e^{(-k c d)}] \quad (2.7)$$

Esta equação traduz a relação que existe entre a intensidade da radiação fluorescente e os parâmetros característicos da amostra e do compartimento de amostragem.

Se o termo $(-k c d)$ for relativamente pequeno a transformação do factor exponencial numa série de potências pode ser truncada no termo de ordem 1 e a equação 2.7 vem [1],

$$I = \phi_f I_{\text{Total}} k c d \quad (2.8)$$

ou,

$$I = 2,303 \phi_f I_{\text{Total}} \epsilon c d \quad (2.9)$$

Esta equação mostra que para soluções diluídas das moléculas fluorescentes observa-se uma dependência linear entre a intensidade de fluorescência e a concentração.

Se a concentração das moléculas fluorescentes não for relativamente pequena podem ser observados desvios de linearidade que poderão ser corrigidos incluindo termos de ordem superior a 1 na equação 2.9, que fica com a forma seguinte,

$$I = \phi_f I_{\text{Total}} [(2,303 \epsilon c d) - (2,303 \epsilon c d)^2 / 2 + (2,303 \epsilon c d)^3 / 3 + \dots] \quad (2.10)$$

2.1.2 – Matriz de excitação-emissão

A intensidade da fluorescência (I) emitida por uma espécie fluorescente será sempre uma função do comprimento de onda utilizado para excitar as moléculas (comprimento de onda de excitação, λ_i) e do comprimento de onda ao qual se está a efectuar a medição da intensidade de fluorescência (comprimento de onda de emissão, λ_j). Assim, a intensidade de fluorescência será sempre uma função destes dois parâmetros, e esta relação pode ser representada pela seguinte equação [2]:

$$I_{ij} = c x(\lambda_i) y(\lambda_j) \quad (2.11)$$

onde c é a concentração da espécie fluorescente, $x(\lambda_i)$ e $y(\lambda_j)$ são os espectros de excitação e emissão aos respectivos comprimentos de onda. Esta equação pode ser escrita numa forma matricial,

$$\mathbf{I} = c \mathbf{x} \mathbf{y}^T \quad (2.12)$$

Onde \mathbf{I} representa o **espectro de fluorescência total ou matriz de excitação emissão (MEE)** da espécie em estudo (Fig. 2.2), \mathbf{x} o vector correspondente ao espectro de excitação e \mathbf{y} o vector correspondente ao espectro de emissão. Se na amostra em análise existem várias espécies fluorescentes (nf) a MEE global corresponde à soma das MEE de cada uma das espécies fluorescentes.

$$I = \sum_{k=1}^{nf} I_k = \sum_{k=1}^{nf} c_k x_k y_k^T \quad (2.13)$$

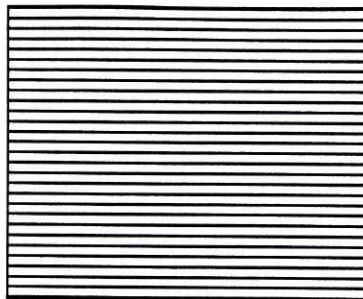
Esta equação, pode ser escrita com a forma seguinte:

$$\mathbf{I} = \mathbf{X} \beta \mathbf{Y} \quad (2.14)$$

onde é β uma matriz diagonal que contém na diagonal principal as concentrações c_k de cada uma das espécies fluorescentes. Esta equação traduz o **modelo linear de base** de uma MEE. No entanto, todas as MEE experimentais contêm bandas de dispersão

(primeira e segunda ordem), pelo que o modelo de base muitas vezes não é linear devido à existência destas bandas.

Número de comprimentos de onda de cada espectro de excitação = número de espectros de emissão



Número de comprimentos de onda de cada espectro de emissão = número de espectros de excitação

Fig. 2.2 – Esquema de uma MEE.

2.1.3 – Análise de estruturas de dados com três vias e sua decomposição

2.1.3.1 – Introdução

A análise de estruturas de dados experimentais com três vias (Fig. 2.3) tem observado grandes desenvolvimentos em química analítica (técnicas quimiométricas) devido à crescente utilização de instrumentação analítica que gera este tipo de estruturas para cada amostra [2-8].

Um espectrofotómetro de fluorescência molecular é um caso típico de um equipamento de análise química que permite gerar uma matriz de dados com duas vias por amostra (MEE). Juntando a informação de várias amostras obtém-se uma matriz de dados com três vias (Fig. 2.3).

Nesta dissertação uma matriz de dados com três vias é definida por n linhas, p colunas e q camadas, com os índices i , j e k , respectivamente. No caso concreto das matrizes de três vias com MEE o número de linhas é igual ao número de comprimentos de onda de cada espectro de excitação (= número de espectros de emissão), o número de colunas é igual ao número de comprimentos de onda de cada espectro de emissão (= número de espectros de excitação) e o número de camadas é igual ao número de amostras (= número de MEE).

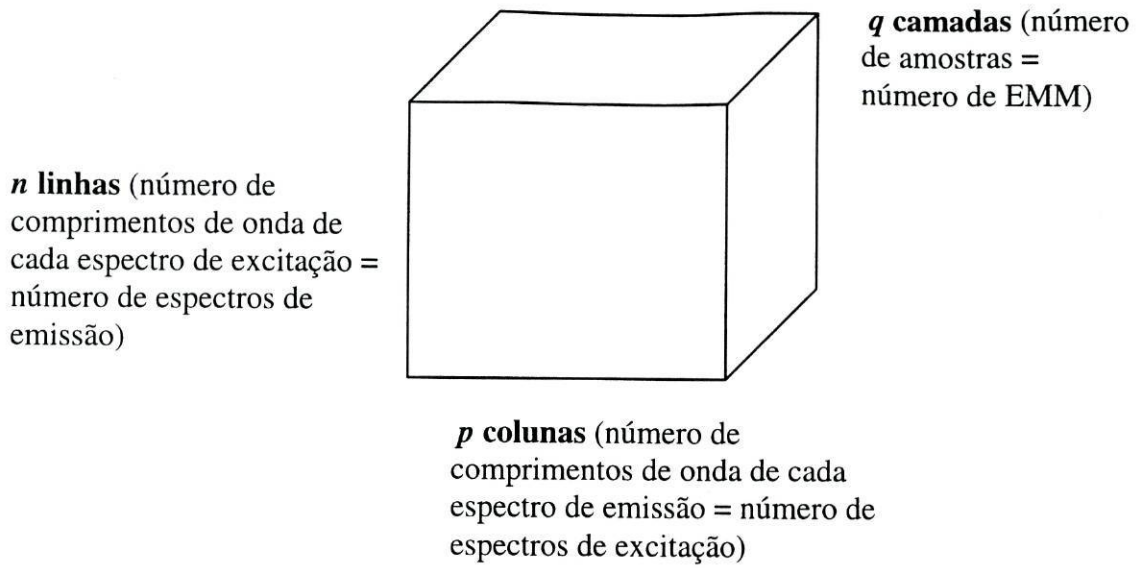


Fig. 2.3 – Esquema de uma matriz de dados com três vias.

2.1.3.2 – Desdobrar a matriz de três vias

Um dos processos de analisar uma matriz de três vias é desdobrar a estrutura tridimensional numa estrutura bidimensional (tabela rectangular) que pode ser processada usando técnicas clássicas de acordo com o objectivo em vista [4,8]. A desdobragem da matriz com três vias $\mathbf{X}(n \times p \times q)$ pode ser efectuada de três maneiras originando três tabelas diferentes (Fig. 2.4): $n \times (p \times q)$; $p \times (n \times q)$; $q \times (n \times p)$.

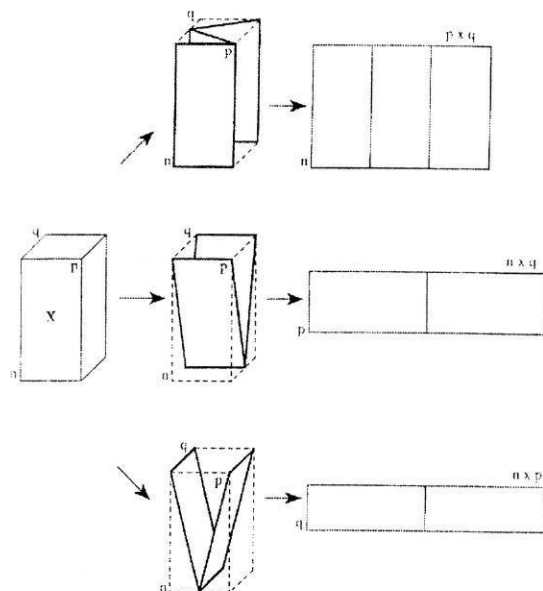


Fig. 2.4 – As três maneiras possíveis de desdobrar a matriz com três vias.

Os resultados da análise das três tabelas de dados não são iguais pelo que a sua análise global terá que ser efectuada com alguns cuidados.

2.1.3.3 – O modelo Tucker3

O denominado modelo Tucker3 [4,8] define a decomposição de uma matriz com três vias \mathbf{X} numa matriz núcleo com três vias \mathbf{Z} e três matrizes de duas vias \mathbf{A} , \mathbf{B} , e \mathbf{C} (uma para cada uma das vias) (Fig. 2.5):

$$x_{ijk} = \sum_f^r \sum_g^s \sum_h^t a_{if} b_{jg} c_{kh} z_{fgh} + e_{ijk} \quad (2.15)$$

onde e_{ijk} representa o termo de erro residual.

Segundo este modelo a matriz $\mathbf{X}(n \times p \times q)$ é decomposta numa matriz núcleo $\mathbf{Z}(r \times s \times t)$ e três matrizes de carga $\mathbf{A}(n \times r)$, $\mathbf{B}(p \times s)$ e $\mathbf{C}(q \times t)$, respectivamente para as linhas, colunas e camadas da matriz \mathbf{X} (Fig. 2.5). As três matrizes de carga são ortonormais segundo as colunas,

$$\mathbf{A}^T \mathbf{A} = \mathbf{I}_r, \mathbf{B}^T \mathbf{B} = \mathbf{I}_s \text{ e } \mathbf{C}^T \mathbf{C} = \mathbf{I}_t \quad (2.16)$$

onde \mathbf{I}_r , \mathbf{I}_s e \mathbf{I}_t representam as matrizes unidade com dimensões r , s e t , respectivamente.

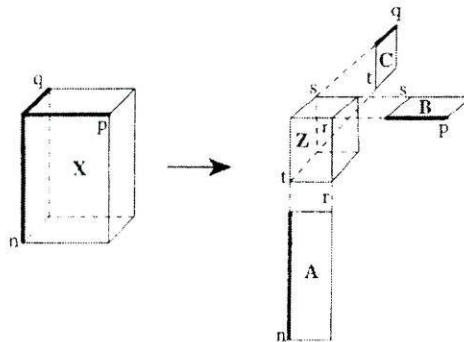


Fig. 2.5 – Decomposição de uma matriz de dados com três vias segundo o modelo Tucker3.

O número de factores atribuídos a cada via é geralmente diferente. Estes valores são escolhidos de modo a se atingir uma redução significativa da quantidade de dados. Os elementos de \mathbf{Z} representam a grandeza dos factores e a extensão da sua interacção.

As matrizes **Z**, **A**, **B** e **C** são calculadas de modo a minimizar a soma dos quadrados dos resíduos.

O modelo de Tucker3 pode ser representado na seguinte forma matricial,

$$\mathbf{X} = \mathbf{A} \cdot \overset{\mathbf{C}}{\mathbf{Z}} \cdot \mathbf{B} + \mathbf{E} \quad (2.17)$$

2.1.3.4 – O modelo PARAFAC

A decomposição de uma matriz com três vias **X** também pode ser definida pelo modelo PARAFAC originando três matrizes com duas vias **A**, **B** e **C**:

$$x_{ijk} = \sum_f a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad (2.18)$$

Esta decomposição também é definida como o modelo trilinear [4-8].

Segundo este modelo a matriz **X**($n \times p \times q$) é decomposta em três matrizes de carga **A**($n \times F$), **B**($p \times F$) e **C**($q \times F$), respectivamente para as linhas, colunas e camadas da matriz **X**. Estas três matrizes de carga não são necessariamente ortonormais. No entanto, a solução do modelo PARAFAC é única e não sofre da indeterminação da decomposição equivalente a duas dimensões (que se observa na análise dos componentes principais de matrizes com duas vias).

Em contraste com o modelo Tucker3 o número de factores em cada via é semelhante e é escolhido de modo a ser muito mais pequeno que as dimensões originais da matriz **X** de modo a conseguir uma grande redução nos dados. Os elementos das matrizes de carga são calculados de modo a minimizar a soma dos quadrados dos resíduos.

O modelo PARAFAC pode ser representado na seguinte forma matricial,

$$\mathbf{X} = \mathbf{A} \cdot \overset{\mathbf{C}}{\mathbf{I}} \cdot \mathbf{B} \quad (2.19)$$

onde **I** representa a matriz identidade $F \times F \times F$ (matriz com 1 na superdiagonal e 0 nas posições fora da superdiagonal). Comparando as equações dos modelos Tucker3 e PARAFAC verifica-se que este é um caso particular do primeiro quando **Z=I** e $r=s=t=F$.

2.1.3.5 - Determinação do número de componentes do modelo PARAFAC

O número de factores do modelo PARAFAC pode ser estimado por análise da percentagem do ajuste (%), definido como [4,6]:

$$Ajuste\% = 100 \left(1 - \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K e_{ijk}^2}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K x_{ijk}^2} \right) \quad (2.20)$$

onde e_{ijk} é o resíduo do elemento ijk e x_{ijk} é o respectivo elemento da matriz de dados. A decomposição PARAFAC pode também ser avaliada por análise da consistência do núcleo (%), definida como [4,6]:

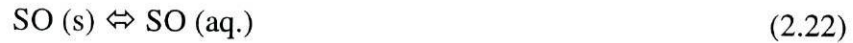
$$Consistêncianúcleo\% = 100 \left(\frac{1 - \sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F (g_{def} - t_{def})^2}{\sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F t_{def}^2} \right) \quad (2.21)$$

onde g_{def} e t_{def} são os elementos calculados e intrínsecos do núcleo da superdiagonal, respectivamente, e F o número de factores do modelo. Se g_{def} são iguais a t_{def} , a consistência do núcleo é perfeita e tem um valor unitário (100%).

2.2 – INTERACÇÕES ENTRE OS AF E CARBAMATOS

2.2.1 – Solubilidade em água de um pesticida

O processo de solubilização de um pesticida (substância orgânica – SO) em água pode ser representado pela seguinte equação química,



A constante de equilíbrio para este processo a 25°C, representado por K, é igual à actividade de SO ($a_{\text{SO(aq.)}}$ – solubilidade em água pura, S_w). Também, como por definição a actividade ($a_{\text{SO(aq.)}}$) é igual à concentração ($|\text{SO}_{(\text{aq.})}| = S_w'$) multiplicada pelo coeficiente de actividade (γ_{\pm}) ($a_{\text{SO(aq.)}} = \gamma_{\pm} |\text{SO}_{(\text{aq.})}|$), obtêm-se as seguintes equações

$$K = a_{\text{SO(aq.)}} = \gamma_{\pm} |\text{SO}_{(\text{aq.})}| = \gamma_{\pm} S_w' = S_w \quad (2.23)$$

$$\text{Log } \gamma_{\pm} = \text{log } S_w / S_w' \quad (2.24)$$

Como a SO não tem carga e/ou a sua concentração é muito pequena o respectivo coeficiente de actividade vai depender das contribuições das outras espécies carregadas que existem na solução para a força iónica (I). O efeito geral da força iónica no processo de solubilização é devido a um efeito no coeficiente de actividade (γ_{\pm}) e, usando a equação de Davis [9] para estimar este tipo de coeficiente, a seguinte equação que relaciona a solubilidade em água (S_w') em função da força iónica é obtida,

$$-\text{Log } \gamma_{\pm} = \text{Log } (S_w' / S_w) = A I^{1/2} / (1 + I^{1/2}) - B I \quad (2.25)$$

onde, A e B são constantes específicas da solução. Esta equação mostra que para forças iónicas relativamente baixas {o termo $[A I^{1/2} / (1 + I^{1/2})]$ predomina} observa-se um aumento da solubilidade, *i.e.* “salting-in”, e para forças iónicas relativamente elevadas [o termo $(- B I)$ predomina] observa-se uma diminuição da solubilidade, *i.e.* “salting-out”.

A presença na água de ácidos fúlvicos (AF) que interactuam com a SO contribui para um aumento da concentração total da SO na fase aquosa. Deste modo, a

solubilidade aquosa aparente de SO ($= S_w^*$) é devida a três factores: (i) S_w ; (ii) um efeito de força iónica; e (iii) interacções com AF.

2.2.2 – Modelo para a interacção

A interacção entre um pesticida (SO) e a matéria orgânica dos solos (MOD) pode ser esquematizada pela seguinte equação:



A interacção que dá origem a uma hipotética espécie SO-MOD pode ser diversa, como por exemplo: ligação química covalente; pontes de hidrogénio; interacções de van der Waals, etc. Se se assumir que a interacção entre a MOD e os pesticidas é uma interacção do tipo partição e que resulta num aumento da solubilidade, a grandeza deste efeito pode ser expresso como [10]:

$$S_w^* = S_w + [MOD] C_o \quad (2.27)$$

onde:

S_w^* – solubilidade aparente numa solução contendo MOD numa concentração

$[MOD]$ (gramas por mililitro de água);

S_w – solubilidade em água pura;

C_o – massa de soluto repartida por unidade de massa de MOD.

A quantidade pode ser relacionada com S_w e um novo coeficiente de partição do soluto entre a MOD e a água pura (K_{MOD}), dando

$$K_{MOD} = C_o / S_w \quad (2.28)$$

Combinando as equações 2.27 e 2.28 dá,

$$S_w^* = S_w (1 + [MOD] K_{MOD}) \quad (2.29)$$

A análise desta equação mostra que a solubilidade aparente deverá ser maior que a solubilidade em água pura se a grandeza de $([MOD]K_{MOD})$ for significativa. Experimentalmente o valor de $[MOD]$ é conhecido. A grandeza do coeficiente de partição (K_{MOD}) depende da MOD e do pesticida em estudo e pode ser determinado por representação de S_w^* em função de $[MOD]$. Esta representação deverá dar origem a uma recta com declive igual a $(S_w.K_{MOD})$ e intercepção igual a S_w .

Embora o valor de K_{MOD} seja característico de uma determinada amostra de MOD, na literatura o coeficiente de partição está normalmente associado à concentração de carbono orgânico dissolvido (K_{doc}) e não à concentração de MOD. Por este motivo, a equação (2.29) pode ser rescrita como:

$$S_w^* = S_w (1 + [MOD] K_{doc}) \quad (2.30)$$

onde K_{doc} pode ser calculado a partir do K_{MOD} de acordo com a seguinte relação,

$$K_{MOD} = (\%C / 100) K_{doc} \quad (2.31)$$

2.2.3 – Técnicas baseadas na extinção de fluorescência

A extinção (“quenching”) de fluorescência refere-se a qualquer processo que provoque a diminuição da intensidade de fluorescência de uma amostra. Os processos que podem dar origem à extinção de fluorescência são diversos, como por exemplo: rearranjos moleculares, formação de complexos (extinção estática) e colisões moleculares (extinção dinâmica).

2.2.3.1 – Extinção de fluorescência dinâmica: equação de Stern-Volmer

A extinção de fluorescência observada em consequência de colisões (Fig. 2.6) entre moléculas fluorescentes e as espécies extintoras (denominado de “quencher”) é descrita pela equação de Stern-Volmer [11-14].

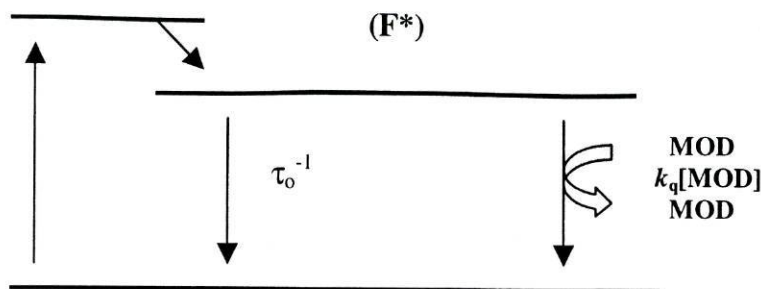


Fig. 2.6 – Esquema de um mecanismo de extinção dinâmico.

No caso da espécie extintora ser matéria orgânica dissolvida (MOD) a equação de Stern-Volmer toma a seguinte forma:

$$I_0/I = 1 + k_d \tau_0 [\text{MOD}] = 1 + K_D [\text{MOD}] \quad (2.32)$$

Nesta equação, I_0 e I são as intensidades de fluorescência na ausência e presença de espécie extintora ($[\text{MOD}]$), respectivamente, k_d é a constante de velocidade bimolecular, τ_0 é o tempo de vida da molécula fluorescente na ausência do extintor, e $[\text{MOD}]$ é a concentração de espécie extintora. Se a extinção for do tipo dinâmico, a constante é descrita como K_D . Se não for do tipo dinâmico, será representada como K_{SV} .

Os dados de experiências de extinção de fluorescência são normalmente representados sob a forma de gráficos de I_0/I em função de $[\text{MOD}]$. Espera-se que esta representação (equação 2.32) seja linear com uma ordenada na origem de 1 e um declive igual a K_D . Se existirem duas populações de espécies fluorescentes, e uma das classes não estiver acessível à espécie extintora, esperam-se desvios nas representações de Stern-Volmer. Nestes casos terão que ser utilizados outros tipos de representações para se obter gráficos lineares [13,14].

No entanto, o facto de uma representação de dados experimentais de extinção de fluorescência ser linear não significa necessariamente que um mecanismos dinâmico está a ocorrer. Na realidade, como se apresentará em baixo, o modelo de base para uma extinção estática é semelhante à equação 2.32 [13,14].

2.2.3.2 – Derivação da equação de Stern-Volmer

Os passos elementares do mecanismo associado à emissão de fluorescência na ausência de espécie extintora são os seguintes [13]:

1 – Absorção de energia dando origem a uma espécie excitada (F^*),



2 – Emissão de radiação pela espécie excitada voltando ao estado fundamental,



3 – Retorno ao estado fundamental via processos não radiativos,



As correspondentes equações diferenciais de velocidade são:

$$-v_a = k_a [F] \quad (2.36)$$

$$-v_e = \Gamma [F^*] \quad (2.37)$$

$$-v_{nr} = k_{nr} [F^*] \quad (2.38)$$

A intensidade de fluorescência observada é proporcional à concentração de moléculas fluorescentes existentes no estado excitado – $[F^*]$. Sob iluminação continuada estabelece-se uma população constante de moléculas fluorescentes excitadas e portanto $d[F^*]/dt = 0$. Então, aplicando a hipótese dos estados estacionários ao três passos elementares do mecanismo, vem

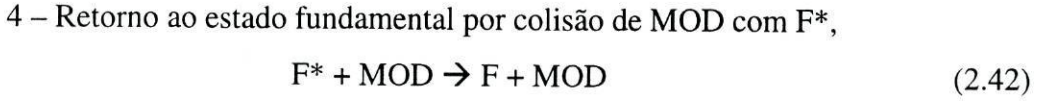
$$k_a [F] = \Gamma [F^*] + k_{nr} [F^*] = (\Gamma + k_{nr}) [F^*] \quad (2.39)$$

$$[F^*] = [k_a / (\Gamma + k_{nr})] [F] \quad (2.40)$$

A eficiência de fluorescência (equação 2.2) na ausência de espécie extintora pode ser escrita como:

$$\begin{aligned}\phi_f^o &= \text{número de fótons emitidos} / \text{número de fótons absorvidos} = v_e/v_a = \\ &= \Gamma [F^*] / k_a [F]\end{aligned}\quad (2.41)$$

Na presença de uma espécie extintora (MOD) existe mais um passo elementar,



e a correspondente equação diferencial de velocidades,

$$-v_q = k_q [F^*] [\text{MOD}]\quad (2.43)$$

Aplicando a hipótese dos estados estacionários ao conjunto de passos elementares 1 a 4 vem,

$$k_a [F] = \Gamma [F^*] + k_{nr} [F^*] + k_q [F^*] [\text{MOD}] = (\Gamma + k_{nr} + k_q [\text{MOD}]) [F^*]\quad (2.44)$$

$$[F^*] = [k_a / (\Gamma + k_{nr} + k_q [\text{MOD}])] [F]\quad (2.45)$$

Combinando as equações 2.45 e 2.41 (substituindo este novo valor de F* na equação 2.41) obtém-se uma expressão para o rendimento quântico na presença de uma espécie extintora:

$$\phi_f = \{\Gamma / [k_a / (\Gamma + k_{nr} + k_q [\text{MOD}])]\} [F]\quad (2.46)$$

Dividindo a equação 2.41 pela equação 2.46 obtém-se a equação de Stern-Volmer,

$$\phi_f^o/\phi_f = 1 + [k_d/(\Gamma + k_{nr})] [\text{MOD}]\quad (2.47)$$

Esta equação é semelhante à equação 2.32 em que $\phi_f^o/\phi_f = I_o/I$ e $K_D = [k_d/(\Gamma + k_{nr})]$. Uma vez que a extinção colisional é um processo que provoca a diminuição da população do estado excitado, os tempos de vida na ausência (τ_o) e presença (τ) de espécie extintora é dada por [14],

$$\tau_0 = 1 / (\Gamma + k_a) \quad (2.48)$$

$$\tau = (\Gamma + k_a + k_q [\text{MOD}])^{-1} \quad (2.49)$$

e, portanto

$$\tau_0 / \tau = 1 + k_q \tau_0 [\text{MOD}] \quad (2.50)$$

Esta equação ilustra uma característica importante da extinção colisional, que é a equivalente diminuição na intensidade de fluorescência e tempo de vida. Para a extinção colisional,

$$I_0 / I = \tau_0 / \tau \quad (2.51)$$

e,

$$K_D = k_q \tau_0 \quad (2.52)$$

A diminuição no tempo de vida existe porque a extinção é um processo adicional que diminui a população do estado excitado. A diminuição no rendimento ocorre porque a extinção diminui a população do estado excitado diminuindo a emissão de fluorescência. **A extinção estática não diminui o tempo de vida** porque apenas as moléculas fluorescentes são observadas e as moléculas fluorescentes não complexadas têm um tempo de vida de τ_0 .

2.2.3.3 – Constante de extinção bimolecular

A constante de extinção bimolecular (k_d) dá uma medida da eficiência de extinção ou da acessibilidade dos extintores às moléculas fluorescentes. Os valores típicos de k_d **controlados por difusão são da ordem dos $1 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$** . Valores mais pequenos para esta constante podem resultar de algum impedimento estéreo da molécula fluorescente, e valores maiores indicam uma outra forma de interação entre as moléculas fluorescentes e as espécies extintoras [14].

O significado da constante de extinção bimolecular pode ser compreendido em termos da frequência das colisões entre moléculas que se difundem livremente. A frequência de colisões (Z) de uma molécula fluorescente com um extintor é dada por,

$$Z = k_0 \text{ [MOD]} \quad (2.53)$$

onde k_0 é a constante de velocidade controlada por difusão. Uma estimativa desta constante pode ser obtida pela **equação de Smoluchoski**,

$$k_0 = \frac{4\pi RDN}{1000} = \frac{4\pi N}{1000} (R_f + R_q) (D_f + D_q) \quad (2.54)$$

onde R é o raio da colisão, D é a soma dos coeficientes de difusão da molécula fluorescente (D_f) e da espécie extintora (D_q), e N é o número de Avogadro. O raio da colisão é vulgarmente assumido como sendo a soma do raio da molécula fluorescente (R_f) e da espécie extintora (R_q). O factor 1000 nesta equação é necessário para as unidades correctas quando a concentração é expressa em molaridade. O termo $N/1000$ converte molaridade em moléculas por cm^3 .

A frequência de colisões está relacionada com a constante de extinção bimolecular pela eficiência de extinção (f_Q),

$$k_q = f_Q k_0 \quad (2.55)$$

A eficiência de extinção pode ser calculada através do valor observado de k_d , se os coeficientes de difusão e raios moleculares forem conhecidos. Os coeficientes de difusão podem ser obtidos a partir da **equação de Stokes-Einstein**,

$$D = k T / 6 \pi \eta R \quad (2.56)$$

Onde k é a constante de Boltzmann, η é a viscosidade do solvente e R o raio molecular.

2.2.3.4 – Extinção de fluorescência estática

Nas secções anteriores discutiu-se um tipo de extinção de fluorescência que resultava de encontros difusivos da molécula fluorescente com as espécies extintoras durante o tempo de vida do estado excitado. A extinção de fluorescência também pode resultar da formação de um complexo não fluorescente entre a molécula fluorescente e a

espécie extintora. Quando esta espécie complexa absorve luz ela imediatamente retorna ao estado fundamental sem a emissão de luz (Fig. 2.7) [13,14].

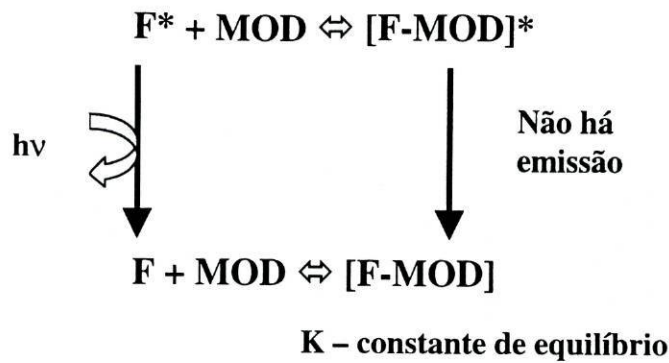


Fig. 2.7 – Esquema de um mecanismo de extinção estático.

A dependência da intensidade de fluorescência com a concentração da espécie extintora é facilmente obtida a partir da expressão da constante de equilíbrio da formação do complexo,

$$K_S = [F-MOD] / ([F] [MOD]) \quad (2.57)$$

Onde [F-MOD] é a concentração do complexo, [F] é a concentração das moléculas fluorescentes não complexadas, e [MOD] a concentração das espécies extintoras. Se as espécies complexas são não fluorescentes, então a fracção de fluorescência que permanece, I/I_0 , é dada pela fracção de moléculas fluorescentes não complexadas, $f = I/I_0$. Se a concentração total de moléculas fluorescentes for $[F]_0$,

$$[F]_0 = [F] + [F-MOD] \quad (2.58)$$

Substituindo esta expressão do balanço de massas na expressão da constante de equilíbrio vem,

$$K_S = \frac{[F]_0 - [F]}{[F][MOD]} = \frac{[F]_0}{[F][MOD]} - \frac{1}{[MOD]} \quad (2.59)$$

Substituindo as intensidades de fluorescência pelas concentrações e rearranjando vem,

$$I_0/I = 1 + K_S [\text{MOD}] \quad (2.60)$$

Note-se que a dependência de I_0/I com $[\text{MOD}]$ é linear e idêntica à observada na extinção dinâmica com a excepção de que a constante de extinção é agora uma constante de associação.

2.2.3.5 – Mecanismo de extinção dinâmico ou estático?

No caso dos carbamatos, e com base em resultados da literatura [15], os valores de K_{SV} são da ordem de grandeza de $1 \times 10^5 \text{ L kg}^{-1}$. Para converter esta constante em unidades molares é necessário efectuar uma estimativa da massa molecular da amostra que se está a estudar. Na Tabela 2.1 apresentam-se alguns valores possíveis da massa molecular assim como a correspondente K_{SV} .

Tabela 2.1 – Valores de K_q para possíveis valores de massa molecular.

Massa molecular	$K_{SV} (\text{L mol}^{-1})$	$K_q (\text{L mol}^{-1} \text{ s}^{-1})^*$
1000	$1,00 \times 10^5$	$1,00 \times 10^{13}$
5000	$5,00 \times 10^5$	$5,00 \times 10^{13}$
10000	$1,00 \times 10^6$	$1,00 \times 10^{14}$
20000	$2,00 \times 10^6$	$2,00 \times 10^{14}$
50000	$5,00 \times 10^6$	$5,00 \times 10^{14}$

* Pondo como hipótese $t_0 = 10^{-8} \text{ s}$.

Como se viu em cima,

$$K_D = k_q \tau_0 \quad (2.52)$$

donde se pode estimar a constante bimolecular de extinção (k_q). Em solução aquosa esta constante não pode exceder os $1 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [14,15]. Se o valor estimado for superior a este então o mecanismo de extinção deverá ser do tipo estático. A análise da Tabela 2.1 mostra que, para várias possibilidades de massa molecular da fracção de MOD, os valores estimados de k_q são sempre superiores a $1 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pelo que neste exemplo deverá estar a ocorrer uma extinção de fluorescência do tipo estático.

2.2.3.6 – Efeitos de filtro

As medições de emissão de fluorescência molecular são normalmente efectuadas a 90° relativamente ao feixe de excitação – fluorescência em ângulo recto (Fig. 2.8). A atenuação que se observa no feixe de excitação quando este atravessa a célula de amostragem denomina-se de efeito de absorção primário. A absorção pela solução de amostra da radiação de fluorescência emitida denomina-se de efeito de absorção secundário. Estes dois processos, vulgarmente denominados de **efeitos de filtro internos (primário e secundário)**, têm que ser considerados quando a concentração do analito ou outras espécies cromóforas que existem nas amostras é relativamente alta podendo provocar uma atenuação significativa nos feixes de excitação e emissão.

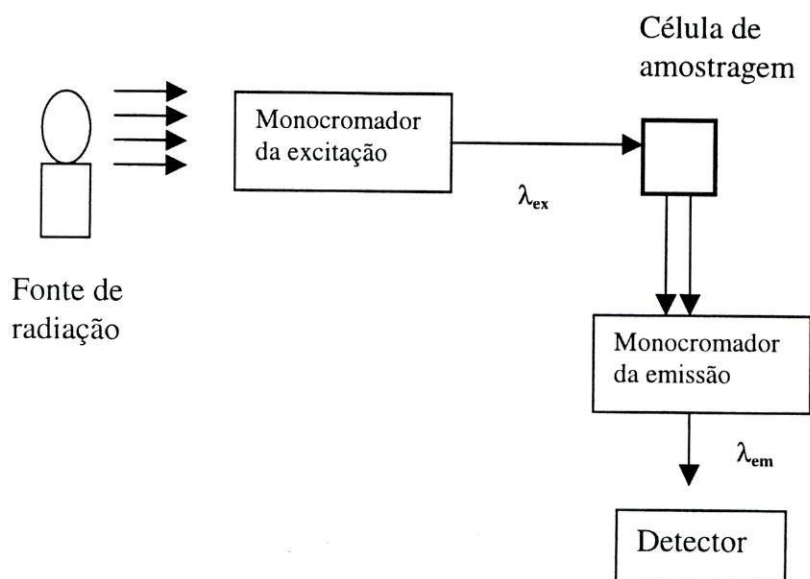


Fig. 2.8 – Esquema de uma fluorescência de ângulo recto.

Efeitos de filtro significativos devidos a absorção do analito dão origem a curvas de calibração não lineares. Efeitos deste tipo, provocados por outras espécies que existem em solução, podem dar origem a sinais de fluorescência do analito relativamente fracos. A atenuação dos feixes de excitação e emissão também podem originar distorções nos espectros de emissão. De uma maneira geral, a absorvância de uma solução aos comprimentos de onda de excitação e emissão deve ser menor do que **0,01 unidades de absorvância** para manter os erros e não linearidades devidos a efeitos de absorção abaixo dos 1% [16]. Medições quantitativas de fluorescência só podem ser analisadas após conveniente correcção dos dados experimentais porque, de outro modo,

uma eventual diminuição de fluorescência pode ser devida ao processo de extinção de fluorescência e à atenuação da radiação por efeitos de filtro.

2.2.3.7 – Correção dos efeitos de filtro

Os efeitos de filtro devidos à absorção de matéria orgânica dissolvida (MOD) aos comprimentos de onda de excitação e emissão podem ser corrigidos pela seguinte equação [15,16]:

$$I_c = cf \times I_{ob} \quad (2.61)$$

onde:

I_c – intensidade de fluorescência corrigida;

cf – factor de correção;

I_{ob} – intensidade de fluorescência observada experimentalmente.

O factor de correção pode ser estimado com a seguinte equação:

$$cf = \frac{2,3A_{ex}\Delta y \exp(2,3A_{ex}y_1)}{1 - \exp(-2,3A_{ex}\Delta y)} \cdot \frac{2,3A_{em}\Delta x \exp(2,3A_{em}x_1)}{1 - \exp(-2,3A_{em}\Delta x)} \quad (2.62)$$

onde A_{ex} e A_{em} são as absorvâncias da solução da MOD aos comprimentos de onda de excitação (λ_{ex}) e emissão (λ_{em}), respectivamente. Os parâmetros geométricos (y_1 , $\Delta y=y_2-y_1$, x_1 , $\Delta x=x_2-x_1$) estão definidos na Fig. 2.9.

A matéria orgânica dissolvida (MOD) é conhecida por apresentar absorvâncias específicas (por unidade de massa) relativamente elevadas pelo que poderá actuar como filtro em estudos de fluorescência molecular [15,16]. Como a MOD apresenta fluorescência, esta pode ser utilizada para verificar a qualidade da correção dos filtros usando as equações 2.61 e 2.62.

A emissão de fluorescência da MOD em função da sua concentração tem tipicamente a forma da Fig. 2.10 e Tabela 2.2. Para baixas concentrações, a intensidade de fluorescência é aproximadamente linear com a concentração. Com o aumento da concentração, a absorvância da solução aumenta significativamente e, conseqüentemente os efeitos de filtro também aumentam. Deste modo, a fluorescência diminui.

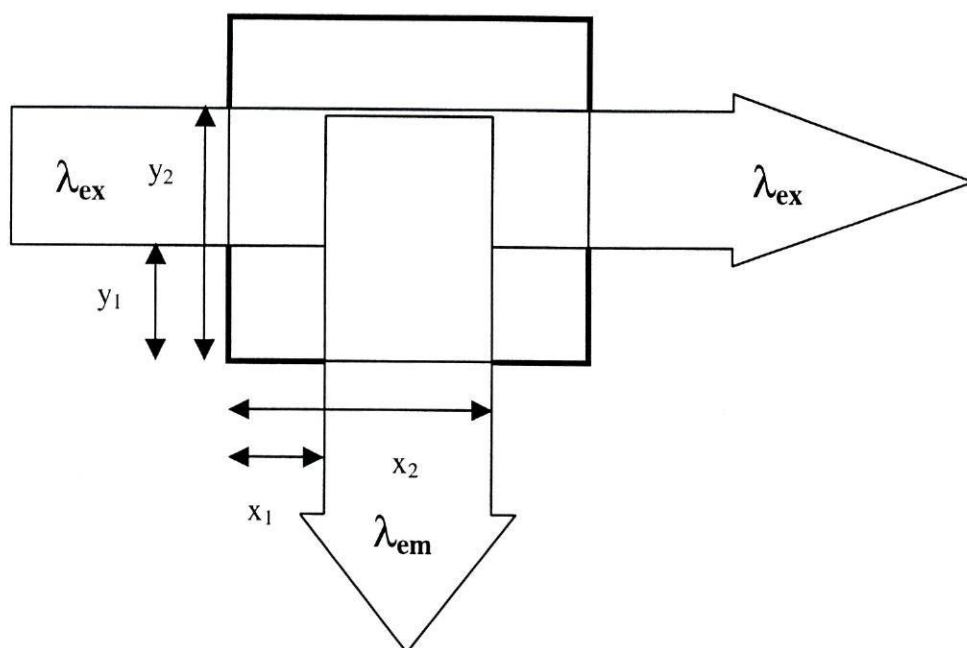


Fig. 2.9 – Geometria típica de uma célula usada em fluorescência de ângulo recto.

Tabela 2.2 – Valores de absorvância, intensidade de fluorescência e factor de correcção de soluções de MOD.

[MOD]	Absorvância (λ_{ex})	Absorvância (λ_{em})	Intensidade de fluorescência experimental	Factor de correcção*	Intensidade de fluorescência corrigida
0	0	0	2322	1	2322
4,6	0,075	0,0232	92287	1,124	103682
9,1	0,1452	0,0458	150900	1,257	189643
13,7	0,2155	0,0657	203300	1,401	284893
18,2	0,2941	0,0956	232100	1,597	370753
27,4	0,4379	0,1377	267300	1,999	534267
36,5	0,5852	0,184	286000	2,524	721785
45,6	0,7355	0,2311	279800	3,200	895477
60,8	0,9700	0,3068	245100	4,646	1138820
76,0	1,2312	0,3833	209200	6,967	1457518
91,2	1,4524	0,4601	169100	9,956	1683563
121,6	1,9186	0,6149	107200	20,911	2241678
136,8	2,176	0,6931	82346	31,195	2568823
152,0	2,4739	0,7855	61234	49,630	3043523

* Para a correcção foram utilizados $x_1=y_1=0,15$ cm e $\Delta x=\Delta y=0,45$ cm.

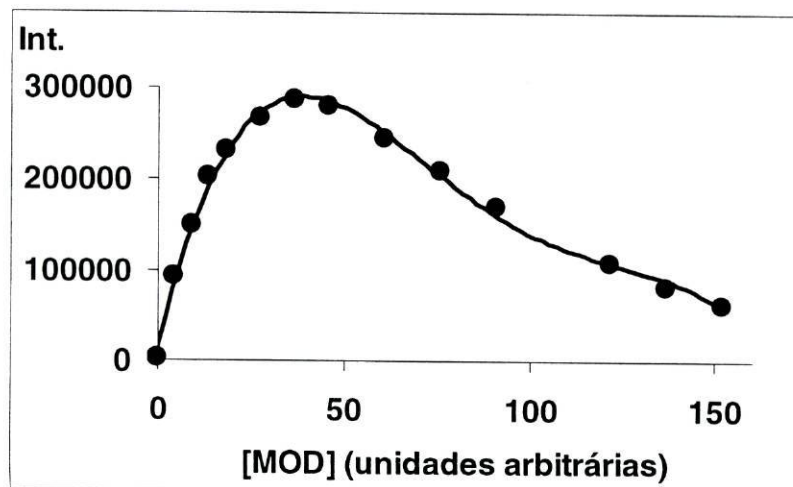


Fig. 2.10 – Curva típica da fluorescência da MOD em função da sua concentração.

Os desvios de linearidade da fluorescência em função da concentração devidos a efeitos de filtro podem ser corrigidos usando a equação 2.62 e o resultado pode ser observado na Fig. 2.11 e Tabela 2.2. Se, como neste caso, os desvios da linearidade são corrigidos significa que o modelo utilizado no desenvolvimento da equação 2.62 está correcto [16].

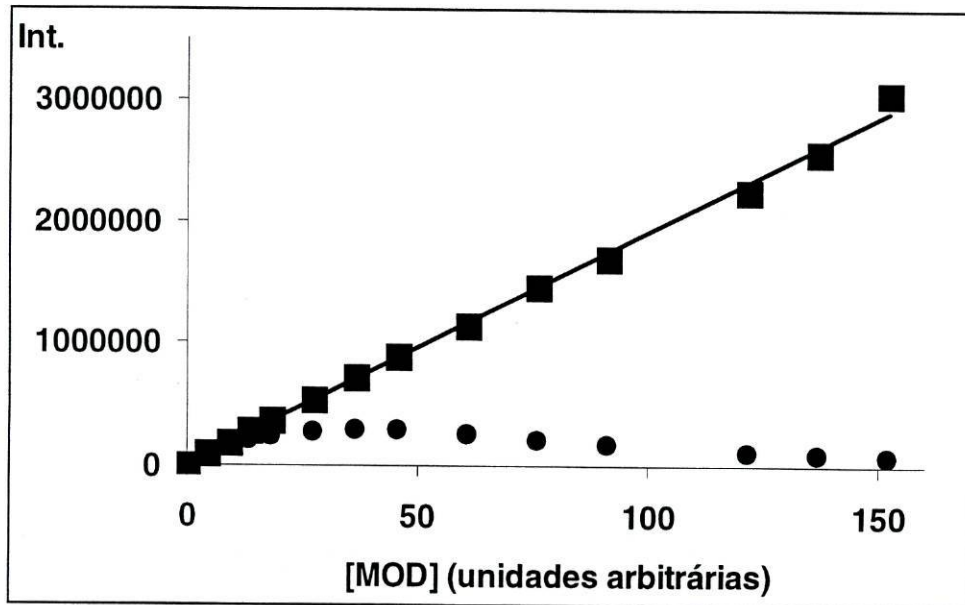


Fig. 2.11 – Curva típica da fluorescência da MOD em função da sua concentração: sem correção (bolhas); e, com correção (quadrados).

2.3 – INTERACÇÕES ENTRE AF E CARBAMATOS

Embora a quantidade de trabalho científico que tem sido publicado sobre as interações entre substâncias húmicas e substâncias orgânicas seja vasto, no caso concreto das interações com pesticidas da família dos carbamatos esse número é bastante reduzido. De facto, apenas um trabalho foi encontrado sobre a interacção entre substâncias húmicas e carbofurano, carbarilo e aldicarbe [15], e onde se utilizou a fluorescência molecular para medir a extensão dessa associação. Na Tabela 2.3 apresenta-se um resumo dos resultados mais importantes desse trabalho.

Tabela 2.3 – Constantes de associação de ácidos húmicos Aldrich com carbamatos [15].

Carbamato	Constante de associação (L kg⁻¹)
Carbofurano	8,75 x 10 ⁴
Carbarilo	7,21 x 10 ⁴
Aldicarbe	0,96x 10 ⁴

A associação de um ácido húmico de solo dissolvido com 1-naftol, um dos principais metabolitos do carbarilo, foi estudada por fluorescência molecular usando representações de Stern-Volmer [17]. O valor da constante de associação obtida neste trabalho foi de 6,5 L (kg de C)⁻¹. Um segundo artigo dos autores do estudo anterior efectuou uma análise pormenorizada das representações de Stern-Volmer relativas à extinção da fluorescência do 1-naftol provocada por ácidos húmicos [18]. Neste caso foram observados desvios da linearidade das representações de Stern-Volmer que poderiam ser devidos à simultânea ocorrência de extinção dinâmica e estática. Tentativas para separar estas duas contribuições não foram conseguidas.

Num outro estudo mais recente sobre a associação de um ácido húmico padrão da IHSS com 1-naftol, em que se usou uma técnica de fluorescência semelhante às anteriores mas agora complementada com medições de tempo de vida de fluorescência, obteve-se um resultado para a constante de associação na mesma ordem de grandeza que o anterior (2,01 L (kg de C)⁻¹) [19]. Este estudo também permitiu verificar que o mecanismo de associação não poderia ser do tipo dinâmico mas principalmente do tipo estático.

Um aspecto comum a todos estes estudos de associação de substâncias húmicas com carbamatos ou 1-naftol é a tentativa de esclarecer o tipo de mecanismo de extinção de fluorescência que está a ser observado e a tentativa de separar as contribuições estáticas e dinâmicas. Um teste que é frequentemente efectuado às constantes de associação calculadas é a obtenção da constante de extinção bimolecular (k_q). O valor desta constante foi sempre muito superior a $1 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, que é considerado um valor máximo em solução aquosa, e portanto não há evidência para um mecanismo de extinção dinâmica.

2.4 - BIBLIOGRAFIA

1. A. Sharma e S.G. Schulman, *Introduction to Fluorescence Spectroscopy*, Wiley, New York, 1999.
2. T. Roch, *Anal. Chim. Acta*, 356 (1997) 61.
3. K. Booksh, B.R. Kowalski, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 782A.
4. R. Bro, *Multi-way Analysis in the Food Industry. Models, Algorithms and Applications*, Doctoral Dissertation, University of Amsterdam, 1998.
5. J.C.G. Esteves da Silva, S.A.G. Novais, *Analyst*, 123 (1998) 2067.
6. R. Bro, *Chemom. Intel. Lab. Syst.*, 46 (1999) 133.
7. J.C.G. Esteves da Silva, C.J. Oliveira, *Talanta*, 49 (1999) 889.
8. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. Jong, P.J. Lewi e J. Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics – Part A*, Elsevier, Amsterdam, 1997, pp. 153-156.
9. G.A. Nancollas e M.B. Tomson, *Pure & Appl Chem*, 54 (1982) 2675.
10. C.T. Chiou, R.L. Malcom, T.I. Brinton e D.E. Tile, *Environ. Sci. Technol.*, 20 (1986) 502.
11. D. Rendell e D. Mowthorpe, *Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy*, ACOL, Willey, 1987.
12. G.G. Guilbault, *Molecular Fluorescence Spectroscopy*, em G. Svehla (Ed.), *Comprehensive Analytical Chemistry*, Volume VIII, Elsevier, 1977.
13. L.K. Fraiji, D.M. Hayes e T.C. Werner, *J. Chem. Edu.*, 69 (1992) 424.
14. J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2. Ed., Kluwer Academic, New York, 1999.
15. F. Fang, S. Kanan, H.H. Patterson e C.S. Cronan, *Anal. Chim. Acta*, 373 (1998) 139.
16. B.C. MacDonald, S.J. Lvin e H. Patterson, *Anal. Chim. Acta*, 338 (1997) 155.
17. M.J. Morra, M.O. Corapcioglu, R.M. von Wandruszka, D.B. Marshall, K. Topper, *Soil. Sci. Soc. Am. J.*, 54 (1990) 1283.
18. M.M. Puchalski, M.J. Morra, R.M. von Wandruszka, *Environ. Sci. Technol.*, 26 (1992) 1787.
19. S. Chen, W.P. Inskeep, S.A. William, P.R. Callis, *Environ. Sci. Technol.*, 28 (1994) 1582.

3 – SECÇÃO EXPERIMENTAL

Neste capítulo são apresentados todos os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho. Como tal, os reagentes utilizados, a preparação de todas as soluções e o equipamento usado para todas as medições que foram efectuadas. Apresentam-se, também, as ferramentas de software utilizadas nos cálculos.

3.1 – REAGENTES

Foram utilizados como reagentes o carbarilo (99,7%, Riedel-de Haën), o carbofurano e o aldicarbe (ambos 99,9%, Riedel-de Haën). Os metabolitos daquelas substâncias que foram utilizados apresentavam igualmente elevado grau de pureza: 1-naftol (superior a 99%, Sigma), 2-isopropoxifenol (97%, Aldrich), 1,4-naftoquinona (97%, Riedel-de-Haën), 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (97%, Sigma), 3-hidroxicarbofurano (99%, Supelco), 3-cetocarbofurano (99%, Supelco) e 3-cetocarbofuranofenol (99%, Supelco). Os restantes reagentes utilizados foram de qualidade p.a. ou semelhante.

Na Tabela 3.1 apresentam-se os valores das massas molares das substâncias pesticidas estudadas.

Tabela 3.1 – Massas moleculares dos vários reagentes utilizados neste trabalho.

Composto	Massa molar (g mol ⁻¹)
carbarilo	201,22
1-naftol	144,2
2-isopropoxifenol	152,19
1,4-naftoquinona	158,16
2-hidroxi-1,4-naftoquinona	174,2
carbofurano	221,26
3-hidroxicarbofurano	237,25
3-cetocarbofurano	235,239
3-cetocarbofuranofenol	178,1872
aldicarbe	190,27

3.2 – AMOSTRA DE AF

A amostra de AF que foi disponibilizada para o presente trabalho (Fredriks Research Products - Holanda) foi extraída de um solo de referência Laurentian, e as suas características, segundo informação do fornecedor da amostra, são apresentadas na Tabela 3.2 [1].

Tabela 3.2 - Características da amostra de AF utilizada neste trabalho.

Análise elementar (% massa/massa):

%C	43,2
%N	0,83
%H	4,0
%Na	0,27
%Fe	0,013
%cinzas	< 1,0

% carbono (^{13}C -RMN):

Intervalos do deslocamento químico (grupos funcionais)

220-190 ppm (carbonilos)	8,8
190-162 ppm (carboxílicos)	33,8
164-145 ppm (fenólicos)	2,2
145-108 ppm (aromáticos)	12,0
108-96 ppm (O-C-O)	3,5
96-50 ppm (carbohidratos)	17,8
50-0 ppm (alifático)	21,8

3.3 – SOLUÇÕES

Foram preparadas as seguintes soluções:

- Soluções padrão de carbarilo, de carbofurano, de aldicarbe e dos respectivos metabolitos

Uma solução padrão de cada pesticida ou metabolito era preparada periodicamente por pesagem, dissolução e diluição rigorosas do sólido em metanol (para os estudos em solução aquosa e em metanol) ou em ciclohexano (estudos em ciclohexano) até ao volume final de 25,00 mL e agitando-se para homogeneização.

As concentrações das soluções padrão de cada composto eram sempre da mesma ordem de grandeza; variando entre cerca de 5×10^{-4} M e cerca de 5×10^{-3} M.

- Solução padrão de 2-isopropoxifenol

A solução padrão do 2-isopropoxifenol ($5,01 \times 10^{-4}$ M) foi preparada pipetando rigorosamente um volume do reagente concentrado (1,85 μ L) para um balão de 25,00 mL, dado este metabolito do carbarilo se apresentar no estado líquido ($d=1,030$), completando o volume até à marca com metanol e agitando posteriormente para homogeneização.

- Solução de tampão fosfato usada como solvente

Nos estudos das propriedades de fluorescência molecular em solução aquosa foi utilizada uma solução tampão de diidrogenofosfato de potássio e hidrogenofosfato de disódio (pH = 6,9). Esta solução foi preparada por pesagem, dissolução e diluição rigorosas dos respectivos sólidos (0,0343 g e 0,0904 g, respectivamente, em 500,0 mL de água desionizada).

- Soluções tampão de pH

As soluções tampão de pH de ftalato (pH=3,883), fosfato (pH=6,784) e bórax (pH=9,043) foram preparadas segundo procedimento descrito em [2]

- Soluções diluídas de carbarilo, de carbofurano e de aldicarbe

As soluções diluídas deste trabalho foram preparadas em água (tampão fosfato) ou no mesmo solvente das respectivas soluções padrão: metanol ou ciclohexano. Foram ainda preparadas em tampão fosfato contendo uma determinada quantidade de AF (15, 30 e 60 mg/L).

Independentemente do solvente as diluições das soluções padrão concentradas foram sempre as mesmas, nomeadamente: 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0; 250,0; 500,0 e 1000,0 μ L em 10,00 mL.

- Soluções de ácidos fúlvicos (AF)

As soluções aquosas padrão de AF, de concentração variável entre 20 mg/L e 200 mg/L foram preparadas por diluição rigorosa de uma solução mais concentrada com o seu pH ajustado 6,0 por adição uma solução de hidróxido de potássio.

Independentemente do solvente, as diluições das soluções padrão concentradas foram sempre rigorosas até ao volume final de 10,00 mL e foram sempre as mesmas, nomeadamente eram 10 soluções com concentrações compreendidas entre 5 mg/L e 50 mg/L com incrementos de 5 mg/L entre elas.

- Solução de hidróxido de potássio para ajuste do pH

As soluções de hidróxido de potássio, aproximadamente 0,05 M, foram preparadas e descarbonatadas segundo o processo descrito em [2]. As soluções descarbonatadas foram mantidas sob atmosfera inerte de azoto.

- Solução padrão de carbarilo em etanol

A solução padrão de carbarilo em etanol de concentração $1,09 \times 10^{-2}$ M, foi preparada por pesagem ($m = 0,1098$ g), dissolução e diluição rigorosas, até volume final de 50,00 mL. Deixou-se a solução a agitar até total dissolução do carbarilo.

- Solução padrão de carbarilo em clorofórmio

A solução padrão de carbarilo em clorofórmio de concentração $7,15 \times 10^{-3}$ M foi preparada por pesagem ($m = 0,01438$ g), dissolução e diluição rigorosas, até volume final de 10,00 mL. Deixou-se a solução a agitar até total dissolução do carbarilo.

- Solução padrão de carbofurano em etanol

A solução padrão de carbofurano em etanol de concentração $8,50 \times 10^{-2}$ M, foi preparada por pesagem ($m = 0,1880$ g), dissolução e diluição rigorosas, até volume final de 10,00 mL. Deixou-se a solução a agitar até total dissolução do carbofurano.

- Solução padrão de carbofurano em ciclohexano

A solução padrão de carbofurano em ciclohexano de concentração $2,45 \times 10^{-3}$ M, foi preparada por pesagem ($m = 0,00271$ g), dissolução e diluição rigorosas, até volume final de 5,00 mL. Deixou-se a solução a agitar até total dissolução do carbofurano.

- Soluções de sais inorgânicos

As soluções de NaCl e KNO₃ em água desionizada de concentração 1 M, foram preparadas por pesagem ($m_{\text{NaCl}} = 5,7421$ g e $m_{\text{KNO}_3} = 10,3346$ g) e diluição rigorosas do sólido, até ao volume final de 100 mL. As soluções de concentração 0,1 M e 0,01 M foram preparadas por diluição, respectivamente 1:10 e 1:100, daquela solução concentrada.

3.4 – EQUIPAMENTO

- Espectroscopia de UV-Vis: na aquisição dos espectros de absorção de UV-Vis foi utilizado um espectrofotómetro de UV-Vis com detector de díodos de marca Hewlett Packard e modelo 8452A. As medições de absorvância, a comprimento de onda fixo, foram executadas com um espectrofotómetro de UV-Vis de marca UNICAM e modelo Heλios γ. Em ambos os aparelhos utilizou-se uma célula de quartzo com 1 cm de percurso óptico.
- Espectroscopia de fluorescência: as medições de fluorescência molecular foram efectuadas com um espectrofotómetro de luminescência de marca Perkin Elmer e modelo LS-50, provido de células de quartzo com comprimento óptico de 1 cm.
- Potenciometria: as medições potenciométricas com medição de pH, foram efectuadas com um sistema de titulação controlado por PC, constituído por um medidor de pH Crison micropH 2002 e uma microbureta Crison microBu 2030. Nas medições de pH utilizaram-se um eléctrodo de vidro da marca Ingold, e um eléctrodo de referência saturado, de junção dupla, da marca Ingold.
- Banho termostático com agitação de marca GFL e modelo 1086.

3.5 – AQUISIÇÃO DOS DADOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

3.5.1 – UV-Vis

3.5.1.1 – Leitura de absorvância para correcção dos efeitos de filtro

As leituras da absorvância no UV-Vis foram efectuadas aos comprimentos de onda de emissão e excitação de fluorescência máxima (Tabela 3.3), com marcação prévia do zero de absorvância para o branco (água) e utilizando as amostras por ordem crescente da sua concentração.

Tabela 3.3 – Comprimentos de onda utilizados na leitura directa das absorvâncias no UV-Vis. *

Substância	$\lambda_{\text{excitação}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emissão}}$ (nm)
AF	330	446
Carbarilo	280	333
1-naftol	280	460 (357)
2-isopropoxifenol	280	313 (310)
Carbofurano	250 (280)	368 (307)
3-hidroxicarbofurano	280	307
3-cetocarbofurano	250 (350)	423 (444)
3-cetocarbofuranofenol	250	424

* Entre parêntesis apresentam-se os resultados para o solvente metanol, apenas nos casos em que estes são diferentes dos observados em água.

3.5.1.2 – Espectros

Os espectros de absorção no UV-Vis foram obtidos nas condições apresentadas na Tabela 3.4 e analisando as amostras por ordem crescente da sua concentração.

Tabela 3.4 – Parâmetros experimentais utilizados na aquisição dos espectros de UV-Vis.

Característica	Valor
Gama de comprimentos de onda	190 – 700 nm
Tempo de integração	0,5 segundos

3.5.2 – Fluorescência molecular

As condições de aquisição dos dados de fluorescência molecular de todas as soluções de carbarilo e de carbofurano deste trabalho (assim como dos seus metabolitos, das misturas de cada composto com AF e das misturas binárias e ternárias) estão indicadas nas Tabelas 3.5 e 3.6 respectivamente, tendo-se utilizado uma célula de quartzo com 1 cm de percurso óptico e ensaiado as amostras por ordem crescente da sua concentração. Para a aquisição dos dados das misturas binárias e ternárias, cujo procedimento é descrito mais adiante, os parâmetros utilizados foram os da Tabela 3.5, em que o intervalo de excitação foi de 200 a 390 nm, ou seja, obtiveram-se 20 espectros de emissão nas MEE.

Nos procedimentos experimentais para a correcção de efeitos de filtro, a abertura para o feixe de emissão era fixado em 0,45 cm por colocação de um papel, com uma fenda desta espessura, na respectiva face da célula.

Tabela 3.5 – Parâmetros utilizados para obter os espectros de fluorescência molecular do carbarilo, metabolitos e suas misturas binárias e ternárias. *

Intervalo de excitação	220 a 360 nm (em incrementos de 10 nm)
Intervalo de emissão	250 a 500 nm (em incrementos de 0,5 nm)
Velocidade do varrimento	200 nm/min
Abertura dos monocromador	
Excitação	10 nm
Emissão	7.5 nm

* Nos estudos com metabolitos o varrimento da excitação foi iniciado em 200 nm e terminado em 340 nm e para as misturas binárias e ternárias foi iniciado em 200 nm e terminado em 390 nm.

Tabela 3.6 – Parâmetros utilizados para obter os espectros de fluorescência molecular do carbofurano e seus metabolitos.

Intervalo de excitação	250 a 390 nm (em incrementos de 10 nm)
Intervalo de emissão	300 a 600 nm (em incrementos de 0,5 nm)
Velocidade do varrimento	200 nm/min
Aberturas do monocromadores	
Excitação	15 nm
Emissão	10 nm

3.6 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDOS DE INTERACÇÃO DE AF COM PESTICIDAS MEDIDA POR EXTINÇÃO DE FLUORESCÊNCIA

3.6.1 – Estudo inicial das propriedades de fluorescência e UV-Vis

3.6.1.1 – Calibrações do carbarilo em tampão fosfato e metanol

Prepararam-se 8 soluções diluídas de carbarilo para cada calibração, em tampão fosfato e em metanol, em balões de 10,00 mL, a partir de uma solução padrão em metanol ($5,41 \times 10^{-4}$ M), pipetando diferentes volumes desta solução para os vários balões e adicionando tampão fosfato ou metanol até à marca do balão e posterior agitação (Tabela 3.7).

Tabela 3.7 – Quantidades de solução padrão de carbarilo em metanol adicionadas a cada balão para diluição em tampão fosfato ou em metanol e a sua concentração.

Balão n°.	Volume de solução adicionado (μL)	Concentração de carbarilo (M)	Concentração de carbarilo (mg/L)
1	1000	$5,41 \times 10^{-5}$	10,88
2	500	$2,70 \times 10^{-5}$	5,44
3	250	$1,35 \times 10^{-5}$	2,72
4	100	$5,41 \times 10^{-6}$	1,09
5	50	$2,70 \times 10^{-6}$	0,54
6	25	$1,35 \times 10^{-6}$	0,27
7	10	$5,41 \times 10^{-7}$	0,11
8	5	$2,70 \times 10^{-7}$	0,05

3.6.1.2 – Calibrações do carbofurano em tampão fosfato, metanol e ciclohexano

Prepararam-se 3 séries (uma para cada solvente) de 5 soluções diluídas, em balões de 10,00 mL, de carbofurano em tampão fosfato e em metanol a partir de uma solução padrão em metanol ($6,18 \times 10^{-4}$ M) e em ciclohexano a partir de uma solução padrão neste solvente com a mesma concentração. Pipetaram-se diferentes volumes

destas soluções para os vários balões e adicionou-se o solvente até à marca do balão, agitando-se posteriormente (Tabela 3.8).

Tabela 3.8 – Quantidades de solução padrão de carbofurano em metanol ou em ciclohexano adicionadas a cada balão para diluição e a sua concentração.

Balão n.º	Volume de solução adicionado (µL)	Concentração de carbarilo (M)	Concentração de carbarilo (mg/L)
1	1000	$6,18 \times 10^{-5}$	13,68
2	500	$3,09 \times 10^{-5}$	6,84
3	250	$1,55 \times 10^{-5}$	3,42
4	100	$6,18 \times 10^{-6}$	1,37
5	50	$3,09 \times 10^{-6}$	0,68

3.6.1.2 – Calibrações dos metabolitos em tampão fosfato e metanol

Com o mesmo tipo de procedimentos, prepararam-se as soluções para a calibração dos metabolitos, em tampão fosfato e metanol, a partir das respectivas soluções padrão em metanol (concentrações da mesma ordem de grandeza), de acordo com as Tabelas 3.7 e 3.8, respectivamente para os metabolitos do carbarilo e do carbofurano.

3.6.2 – Misturas de carbarilo e seus metabolitos

Prepararam-se, em balões de 25,00 mL e em metanol, soluções padrão de carbarilo ($5,13 \times 10^{-4}$ M) e de cada um dos seus metabolitos mais fluorescentes: 1-naftol ($7,99 \times 10^{-4}$ M) e 2-isopropoxifenol ($5,01 \times 10^{-4}$ M). Procedeu-se, de seguida, à preparação de várias soluções diluídas em metanol, em balões de 10,00 mL, de 14 misturas binárias (Tabela 3.9) de carbarilo com um dos outros compostos e de 15 misturas dos três componentes (Tabela 3.10). Destas misturas, obtiveram-se as respectivas MEE com os parâmetros constantes da Tabela 3.5 para posterior análise.

3.6.2.1 – Misturas Binárias

Na Tabela 3.9 estão apresentados os volumes das soluções padrão de carbarilo, de 1-naftol e de 2-isopropoxifenol utilizados para preparar dois conjuntos de 7 soluções com misturas binárias (a mistura dos balões nº. 1 e nº. 9 contém o branco).

Tabela 3.9 – Volumes das soluções padrão de carbarilo, de 1-naftol e de 2-isopropoxifenol adicionados a cada balão para as misturas binárias e sua concentração.

Balão nº.	Volumes (μL)			Concentração (M)		
	carbarilo	1-naftol	2-isoprop.	carbarilo	1-naftol	2-isoprop.
1	0	0	----	0	0	----
2	0	50	----	0	$4,00 \times 10^{-6}$	----
3	50	0	----	$2,56 \times 10^{-6}$	0	----
4	50	50	----	$2,56 \times 10^{-6}$	$4,00 \times 10^{-6}$	----
5	25	25	----	$1,28 \times 10^{-6}$	$2,00 \times 10^{-6}$	----
6	25	100	----	$1,28 \times 10^{-6}$	$8,00 \times 10^{-6}$	----
7	100	25	----	$5,13 \times 10^{-6}$	$2,00 \times 10^{-6}$	----
8	100	100	----	$5,13 \times 10^{-6}$	$8,00 \times 10^{-6}$	----
9	0	----	0	0	----	0
10	0	----	50	0	----	$2,50 \times 10^{-6}$
11	50	----	0	$2,56 \times 10^{-6}$	----	0
12	50	----	50	$2,56 \times 10^{-6}$	----	$2,50 \times 10^{-6}$
13	25	----	25	$1,28 \times 10^{-6}$	----	$1,25 \times 10^{-6}$
14	25	----	100	$1,28 \times 10^{-6}$	----	$5,01 \times 10^{-6}$
15	100	----	25	$5,13 \times 10^{-6}$	----	$1,25 \times 10^{-6}$
16	100	----	100	$5,13 \times 10^{-6}$	----	$5,01 \times 10^{-6}$

3.6.2.2 – Misturas Ternárias

Na Tabela 3.10 estão apresentados as características das soluções padrão de carbarilo, de 1-naftol e de 2-isopropoxifenol utilizados para preparar 15 soluções com misturas binárias (a mistura do balão nº 8 contém o branco).

Tabela 3.10 – Volumes das soluções padrão de carbarilo, de 1-naftol e de 2-isopropoxifenol adicionados a cada balão para as misturas ternárias e sua concentração.

Balão nº.	Volumes (µL)			Concentração (M)		
	carbarilo	1-naftol	2-isoprop.	carbarilo	1-naftol	2-isoprop.
1	50	50	50	$2,56 \times 10^{-6}$	$4,00 \times 10^{-6}$	$2,50 \times 10^{-6}$
2	0	50	50	0	$4,00 \times 10^{-6}$	$2,50 \times 10^{-6}$
3	50	0	50	$2,56 \times 10^{-6}$	0	$2,50 \times 10^{-6}$
4	0	0	50	0	0	$2,50 \times 10^{-6}$
5	50	50	0	$2,56 \times 10^{-6}$	$4,00 \times 10^{-6}$	0
6	0	50	0	0	$4,00 \times 10^{-6}$	0
7	50	0	0	$2,56 \times 10^{-6}$	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	250	250	250	$1,28 \times 10^{-5}$	$2,00 \times 10^{-5}$	$1,25 \times 10^{-5}$
10	10	250	250	$5,13 \times 10^{-7}$	$2,00 \times 10^{-5}$	$1,25 \times 10^{-5}$
11	250	10	250	$1,28 \times 10^{-5}$	$7,99 \times 10^{-7}$	$1,25 \times 10^{-5}$
12	10	10	250	$5,13 \times 10^{-7}$	$7,99 \times 10^{-7}$	$1,25 \times 10^{-5}$
13	250	250	10	$1,28 \times 10^{-5}$	$2,00 \times 10^{-5}$	$5,01 \times 10^{-7}$
14	10	250	10	$5,13 \times 10^{-7}$	$2,00 \times 10^{-5}$	$5,01 \times 10^{-7}$
15	250	10	10	$1,28 \times 10^{-5}$	$7,99 \times 10^{-7}$	$5,01 \times 10^{-7}$
16	10	10	10	$5,13 \times 10^{-7}$	$7,99 \times 10^{-7}$	$5,01 \times 10^{-7}$

3.6.3 – Matrizes de excitação-emissão de fluorescência molecular (MEE) e correcção de efeitos de filtro

Para cada carbamato ou metabolito analisado, foram preparadas, em balões de 10,00 mL, séries de 10 soluções aquosas contendo, em cada série, um daqueles compostos com concentração fixa em cada balão (na ordem de 10^{-5} M) e concentrações diferentes de AF compreendidas entre 5 mg/L e 50 mg/L com incrementos de 5 mg/L entre elas (para além da solução aquosa sem AF; do branco). Efectuou-se a determinação dos espectros de fluorescência total destas soluções seguindo o procedimento descrito em 3.5.2.

3.7 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDOS DE INTERACÇÃO DE AF COM PESTICIDAS MEDIDA POR MÉTODOS DE EXTRACÇÃO

3.7.1 – Estudo da solubilidade do carbarilo em água, soluções aquosas de AF e soluções aquosas de sais inorgânicos

3.7.1.1 Solubilidade de AF em clorofórmio

Para se verificar a solubilidade dos AF em clorofórmio, utilizaram-se 5 séries independentes (a, b, c, d, e) de seis frascos de cintilação de 25 mL (1, 2, 3, 4, 5, 6) e adicionaram-se, a cada um destes frascos e em cada série, diferentes volumes de uma solução padrão de AF (237,60 mg/L) e de água desionizada, diluindo no frasco até perfazerem o volume total de 10,00 mL (Tabela 3.11). Fizeram-se ainda 15 ensaios para o branco em outros tantos frascos com apenas 10,00 mL de água desionizada (frasco nº 0)

De seguida adicionou-se a cada frasco 10,00 mL de clorofórmio. Deixou-se os frascos a agitar durante 24 horas à temperatura de 25 °C, no final centrifugou-se a solução durante 15 minutos e efectuou-se a medição dos espectros de UV-Vis da solução orgânica com os parâmetros experimentais indicados na Tabela 3.4.

Tabela 3.11 – Quantidades de solução padrão de AF adicionadas a cada frasco e a sua concentração.

Frasco nº.	Volume de solução de AF adicionado (mL)	Concentração de AF (mg/L)
0	0,00	0,00
1	0,90	21,38
2	1,70	40,39
3	3,50	83,16
4	5,00	118,80
5	7,00	166,32
6	10,00	237,60

3.7.1.2 Calibração de carbarilo em clorofórmio hidratado

Prepararam-se em seis balões de 10,00 mL seis soluções padrão de carbarilo em clorofórmio, para isso adicionaram-se volumes diferentes (Tabela 3.12) de solução padrão de carbarilo em clorofórmio ($7,15 \times 10^{-3}$ M) e completou-se o volume até à marca com clorofórmio. De seguida transferiu-se 5,00 mL das soluções padrão para frascos de cintilação de 25 mL e adicionou-se 5,00 mL de H₂O desionizada, tapou-se os frascos e deixou-se a agitar durante 24 horas, no final efectuou-se a medição dos espectros de UV-Vis da fase orgânica, utilizando-se os parâmetros da Tabela 3.4. Na obtenção dos espectros de fluorescência houve algumas limitações na medida em que, para menores concentrações de carbarilo observava-se um aumento da intensidade de fluorescência com a concentração dos padrões mas, para maiores concentrações de carbarilo, a fluorescência ia sendo atenuada o que se podia dever ao “quenching” do carbarilo provocado pelo clorofórmio. Este facto alterou o seguimento do trabalho, passando-se a utilizar a espectroscopia de UV-Vis em substituição da fluorescência molecular.

Tabela 3.12 – Quantidades de solução padrão de carbarilo adicionado e sua concentração na fracção clorofórmio.

Balão n°.	Volume de solução Adicionado (μL)	Concentração de carbarilo na fracção clorofórmio (M)
0	0,00	0,00 (0 ppm)
1	34,77	$4,97 \times 10^{-5}$ (10 ppm)
2	173,85	$2,48 \times 10^{-4}$ (50 ppm)
3	347,71	$4,97 \times 10^{-4}$ (100 ppm)
4	625,87	$8,95 \times 10^{-4}$ (180 ppm)
5	869,26	$1,24 \times 10^{-3}$ (250 ppm)
6	1043,12	$1,49 \times 10^{-3}$ (300 ppm)

3.7.1.3 Extracção com clorofórmio

Efeito de sais inorgânicos na solubilidade do carbarilo em água

Adicionou-se para frascos de cintilação de 25 mL, 700 µL de solução padrão de carbarilo em etanol ($1,09 \times 10^{-2}$ M), deixando-se a solução ao ar durante 24 horas para que o etanol evaporasse totalmente e o carbarilo sólido ficasse agarrado às paredes do frasco. De seguida adicionou-se para dentro do frasco, 10,00 mL de solução aquosa dos sais inorgânicos (KNO_3 e NaCl), preparando-se para cada um dos sais inorgânicos três séries de três ensaios independentes: série A; B e C, correspondentes às concentrações de 0,01 M, 0,1 M e 1 M, respectivamente. Simultaneamente preparou-se mais uma série de 18 ensaios independentes, em que se adicionou apenas água sem sais inorgânicos para a determinação da solubilidade de carbarilo em água a 25 °C. Deixou-se os frascos a agitar durante 24 horas à temperatura de 25 °C, centrifugou-se a solução durante 15 minutos e pipetou-se 5,00 mL da solução aquosa para um novo frasco de 25 mL, com o cuidado de não pipetar carbarilo sólido que pudesse existir em suspensão. Adicionou-se ao frasco 5,00 mL de clorofórmio para extrair o carbarilo que se tinha solubilizado e deixou-se agitar durante cerca de uma hora à temperatura de 25 °C. No final efectuou-se a medição dos espectros de UV-Vis da fase orgânica, utilizando-se os parâmetros da Tabela 3.4.

Efeito de AF na solubilidade do carbarilo em água

Prepararam-se soluções de AF com concentrações variáveis de 20 mg/L, 80 mg/L, 140 mg/L e 200 mg/L em água desionizada e ajustou-se o pH a 6 com KOH.

Adicionou-se para frascos de 25 mL, 200 µL de solução padrão de carbarilo em etanol ($1,09 \times 10^{-2}$ M), deixando-se a solução ao ar durante 24 horas para que o etanol evaporasse totalmente e o carbarilo sólido ficasse agarrado às paredes do frasco. De seguida adicionou-se para dentro do frasco, 10,00 mL de solução aquosa dos AF, preparando-se quatro séries de quatro ensaios independentes: série A, B, C e D, correspondentes às concentrações de 20 mg/L, 80 mg/L, 140 mg/L e 200 mg/L, respectivamente. Simultaneamente prepararam-se mais duas séries de 5 ensaios independentes, em que se adicionou apenas água sem AF para a determinação da solubilidade do carbarilo em água a 25 °C. Deixaram-se os frascos a agitar durante 24 horas à temperatura de 25 °C, centrifugou-se a solução durante 15 minutos e pipetou-se 5,00 mL da solução aquosa para um novo frasco de 25 mL, com o cuidado de não se

pipetar carbarilo sólido que pudesse existir em suspensão. Adicionou-se ao frasco 5,00 mL de clorofórmio para extrair o carbarilo que se tinha solubilizado e deixou-se agitar durante cerca de uma hora à temperatura de 25 °C. No final efectuou-se a medição dos espectros de emissão de UV-Vis da fase orgânica, utilizando-se os parâmetros da Tabela 3.4.

3.7.2 – Estudo da solubilidade do carbofurano em água, soluções aquosas de AF e soluções aquosas de sais inorgânicos

3.7.2.1 Solubilidade de AF em ciclohexano

Estudos anteriores [3,4] verificaram que não havia extracção de material dos AF pelo ciclohexano pelo que neste trabalho não foi verificado esta observação.

3.7.2.2 Calibração de carbofurano em ciclohexano hidratado

Prepararam-se em sete balões de 5,00 mL sete soluções padrão de carbofurano em ciclohexano, para isso adicionaram-se volumes diferentes (Tabela 3.13) de solução padrão de carbofurano em ciclohexano ($2,45 \times 10^{-3}$ M) e completou-se o volume até ao menisco com ciclohexano. De seguida transferiu-se 5,00 mL da solução padrão para frascos de cintilação de 25 mL e adicionou-se 5,00 mL de H₂O desionizada, taparam-se os frascos e deixou-se a agitar durante 24 horas, no final efectuou-se a medição dos espectros de emissão de fluorescência da fase orgânica, utilizando-se os parâmetros da Tabela 3.6.

Tabela 3.13 – Quantidades de solução padrão de carbofurano adicionado e sua concentração na fracção ciclohexano.

Balão n°.	Volume de solução Adicionado (μL)	Concentração de carbofurano na fracção ciclohexano (M)	
0	0,00	0,00	(0 ppm)
1	9,22	$4,52 \times 10^{-6}$	(1 ppm)
2	27,67	$1,36 \times 10^{-5}$	(3 ppm)
3	46,12	$2,26 \times 10^{-5}$	(5 ppm)
4	64,56	$3,16 \times 10^{-5}$	(7 ppm)
5	83,01	$4,07 \times 10^{-5}$	(9 ppm)
6	110,68	$5,42 \times 10^{-5}$	(12 ppm)
7	138,35	$6,78 \times 10^{-5}$	(15 ppm)

3.7.2.3 Extração com ciclohexano

Efeito de AF na solubilidade do carbofurano em água

Prepararam-se soluções de AF com concentrações variáveis de 20 mg/L, 50 mg/L, 70 mg/L e 100 mg/L em água desionizada e ajustou-se o pH a 6 com KOH.

Adicionou-se para frascos de cintilação de 25 mL, 200 μL de solução padrão de carbofurano em etanol ($8,50 \times 10^{-2}$ M), deixando-se a solução ao ar durante 24 horas para que o etanol evaporasse totalmente e o carbofurano sólido ficasse depositado nas paredes do frasco. De seguida, adicionou-se para dentro dos frascos, 10,00 mL de solução aquosa dos AF, preparando-se quatro séries de três ensaios independentes: série A, B, C e D, correspondentes às concentrações de 20 mg/L, 50 mg/L, 70 mg/L e 100 mg/L, respectivamente. Simultaneamente prepararam-se mais 6 ensaios independentes, em que se adicionou apenas água sem AF para a determinação da solubilidade do carbofurano em água a 25 °C. Deixaram-se os frascos a agitar durante 24 horas à temperatura de 25 °C, centrifugou-se a solução durante 15 minutos e pipetou-se 5,00 mL da solução aquosa para um novo frasco de 25 mL, com o cuidado de não se pipetar carbofurano sólido que pudesse existir em suspensão. Adicionou-se ao frasco 5,00 mL de ciclohexano para extrair o carbofurano que se solubilizou na solução aquosa e

deixou-se agitar durante cerca de uma hora à temperatura de 25 °C. No final efectuou-se a medição dos espectros de emissão de fluorescência da fase orgânica, utilizando-se os parâmetros da Tabela 3.6.

3.8 – CÁLCULOS QUIMIOMÉTRICOS

A observação preliminar dos espectros de UV-Vis e de fluorescência molecular foi realizado com programa Grams-32 (Galactic Industries Co, USA). Este programa foi também usado para converter o formato original dos espectros de fluorescência molecular.

Os parâmetros de regressão linear das curvas de calibração espectrofotométricas e de ANOVA foram calculados com o programa EXCEL (Microsoft).

A análise multidimensional das MEE foi realizada em MATLAB utilizando rotinas de cálculo (nomeadamente o modelo PARAFAC) desenvolvidas por Ramos Bro e disponíveis na internet [5].

3.9 – BIBLIOGRAFIA

1. <http://www.fredriks.cistron.nl> (Setembro de 2001)
2. Joaquim C.G. Esteves da Silva, Utilidade de misturas sintéticas e de modelos computacionais no estudo de equilíbrios de ácido-base e de complexação de ácidos fúlvicos por potenciometria, Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto, 1988.
3. Miguel C.P.O. Marques, Interação de ácidos fúlvicos com pentaclorofenol e pireno, Tese de Mestrado, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto, 2000.
4. C.J.S. Oliveira, Caracterização de Ácidos Fúlvicos extraídos de Resíduos Reciclados para Actividades Agrícolas, Tese de Doutoramento, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto (2000).
5. www.models.kvl.dk/source/nwaytoolbox (Setembro de 2001)

4 – ESTRUTURA DAS MEE DE FLUORESCÊNCIA DOS CARBAMATOS

4.1 – INTRODUÇÃO

Neste capítulo avaliam-se as propriedades de fluorescência molecular em estado estacionário dos carbamatos e alguns dos seus metabolitos em estudo, no que diz respeito às potencialidades desta técnica de análise química para a sua determinação quantitativa. De facto, devido à instabilidade térmica dos carbamatos, o que impossibilita a sua determinação por técnica de cromatografia gasosa, a fluorescência molecular é uma alternativa útil na sua detecção e quantificação [1].

Para além das suas propriedades de fluorescência apresentam-se as observações sobre o efeito do solvente nessas propriedades, nomeadamente em água, metanol e ciclohexano. Em princípio, o maior interesse da quantificação de carbamatos é em amostras aquosas (amostras ambientais). No entanto, a água nem sempre é um solvente adequado porque provoca extinção da fluorescência das substâncias diminuindo a sensibilidade das metodologias analíticas. Por este motivo, avaliaram-se dois outros solventes vulgares no laboratório, o metanol e o ciclohexano.

Também, apresentam-se neste capítulo os resultados obtidos na análise multidimensional de conjuntos de MEE dos carbamatos. O objectivo deste estudo é conhecer a estrutura destas matrizes e avaliar as potencialidades da sua utilização no desenvolvimento de metodologias de análise quantitativa baseadas na vantagem de segunda ordem [2-11]. Esta vantagem consiste na possibilidade de quantificação de espécies químicas na presença de interferentes desconhecidos.

4.2 – MEE DE FLUORESCÊNCIA DOS CARBAMATOS

4.2.1 – MEE dos solventes puros

Na Fig. 4.1 apresentam-se as MEE dos três solventes utilizados neste trabalho, água, metanol e ciclohexano. Uma análise da Fig. 4.1 mostra que as MEE dos solventes puros têm um conjunto de bandas devidas fundamentalmente à dispersão (comprimento de onda de emissão igual ou duplo do da excitação).

4.2.2 – MEE dos carbamatos

4.2.2.1 – Efeito do solvente na intensidade de fluorescência

A comparação das MEE de todos os carbamatos e seus metabolitos estudados nos três solventes permitiu verificar que eles apresentam maior intensidade de fluorescência em metanol. Como exemplo mostra-se na Fig. 4.2 o caso do carbofurano. Neste caso, em água (Fig. 4.2.a) a sua fluorescência é bastante fraca sendo muito mais intensa em metanol (Fig. 4.2.b).

Atendendo a estas observações preliminares optou-se pelo solvente metanol para os estudos descritos neste capítulo.

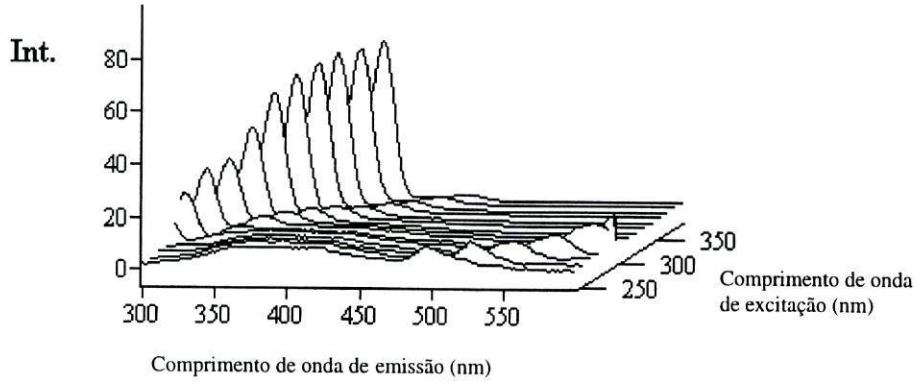
4.2.2.2 – MEE em metanol

Na Fig. 4.3 apresentam-se MEE típicas de alguns carbamatos estudados neste trabalho. Na Tabela 4.1 resumem-se os máximos de excitação e emissão de fluorescência para cada substância. De notar que os metabolitos do carbofurano 1,4-naftoquinona e 2-hidroxi-1,4-naftoquinona não são fluorescentes.

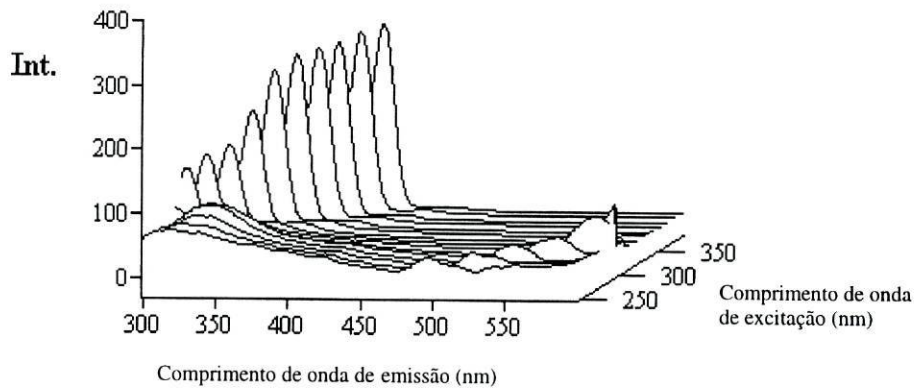
4.2.2.3 – Variação da intensidade de fluorescência com a concentração

Todas as substâncias fluorescentes analisadas apresentavam em metanol uma variação linearmente proporcional à respectiva concentração. Como esta variação será analisada mais à frente não se apresentam resultados aqui.

a.



b.



c.

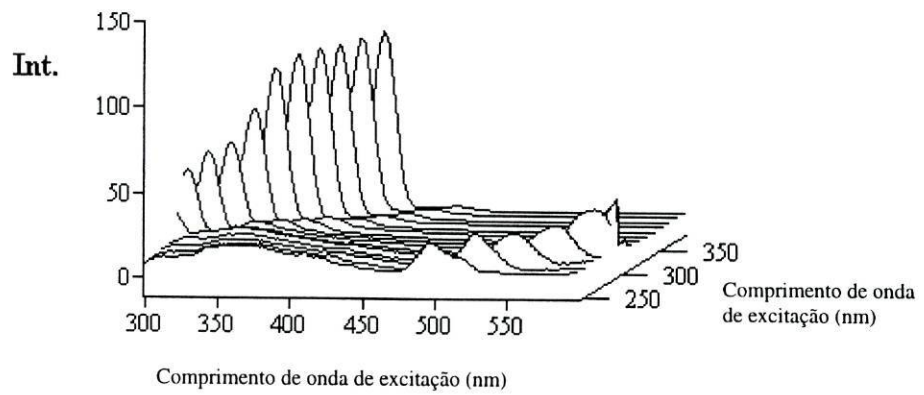
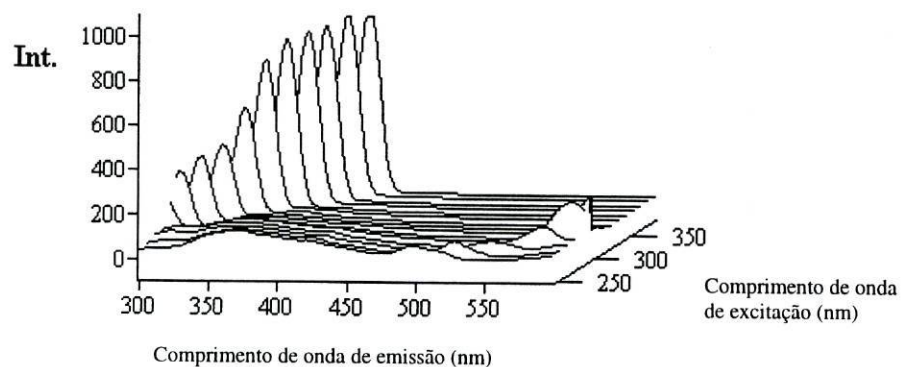
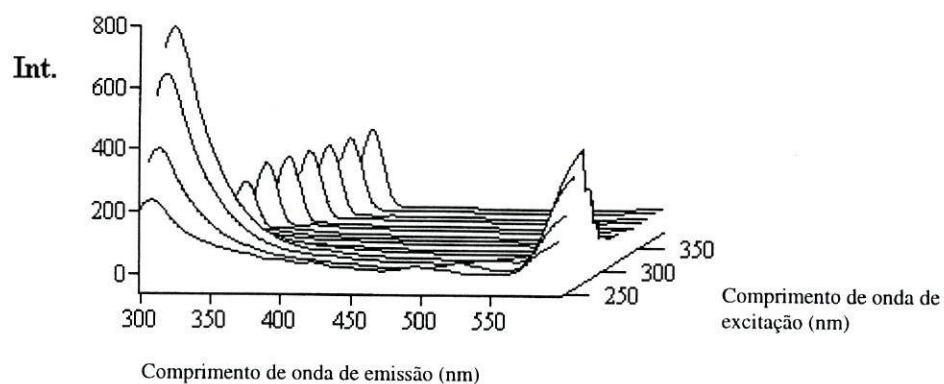


Fig. 4.1 - MEE dos solventes puros utilizados: (a) água; (b) ciclohexano; e (c) metanol.

a.



b.



c.

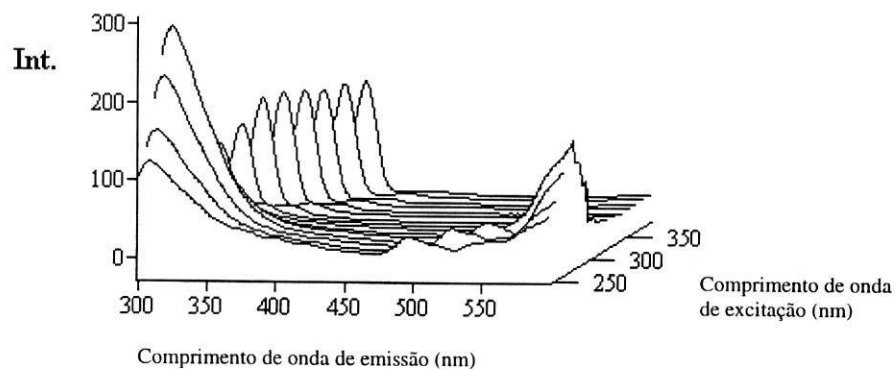


Fig. 4.2 – MEE de soluções de carbofurano (cerca de 13 ppm) em três solventes: (a) água; (b) metanol; e (c) ciclohexano.

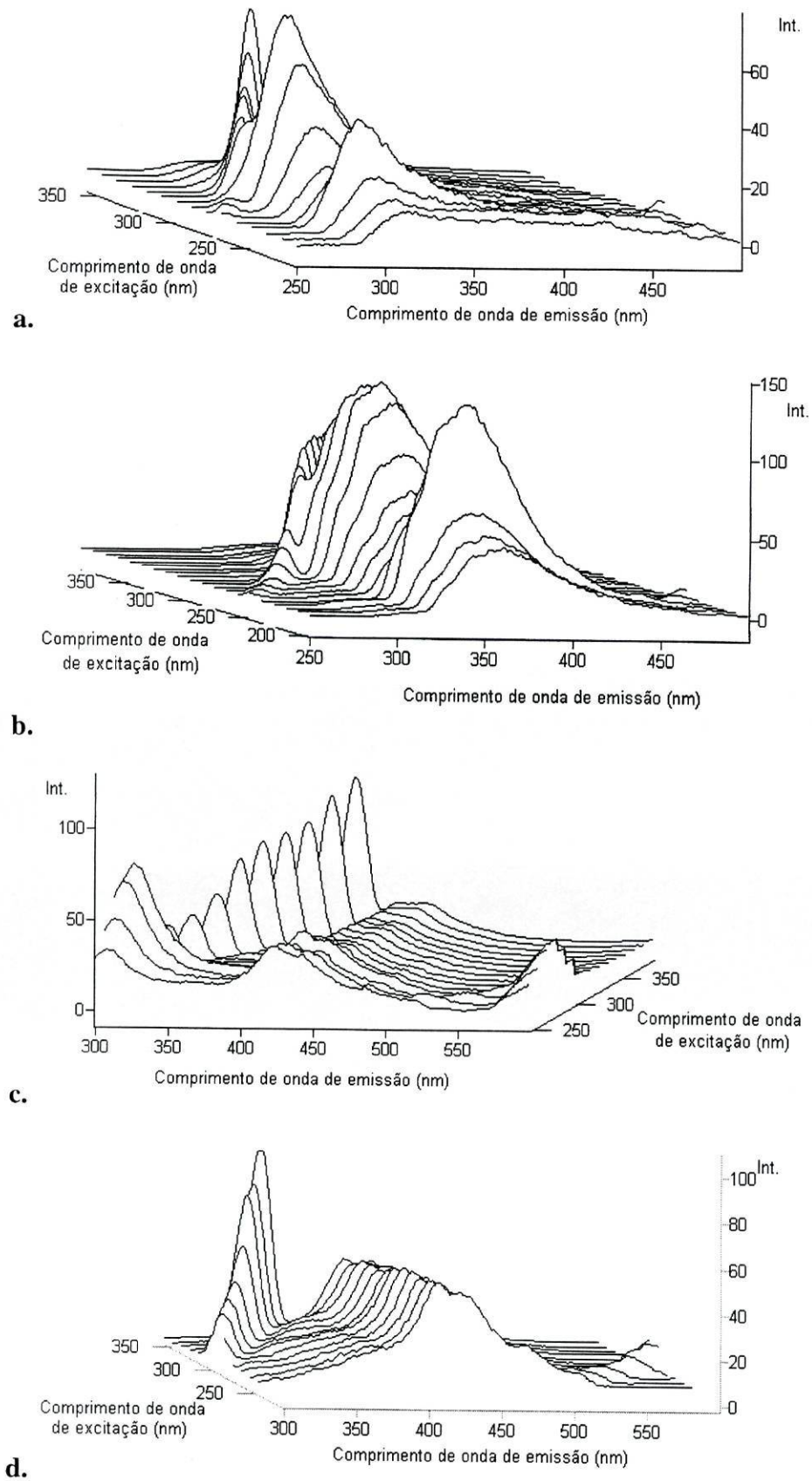


Fig. 4.3 – MEE de alguns carbamatos em metanol: (a) 2-isopropoxifenol; (b) 1-naftol; (c) 3-hidroxicarbofurano; e (d) 3-cetocarbofurano.

Tabela 4.1 – Comprimentos de onda dos máximo de excitação e emissão de fluorescência das MEE dos carbamatos e seus metabolitos em metanol.

Substância	$\lambda_{\text{excitação}}$ (nm)	$\lambda_{\text{emissão}}$ (nm)
Carbarilo	280	333
2-isopropoxifenol	280	310
1-naftol	280	357
Carbofurano	280	307
3-hidroxicarbofurano	280	307
3-cetocarbofurano	350	444
3-cetocarbofuranofenol	250	424

4.3 – ANÁLISE DE FACTORES DAS MEE DOS CARBAMATOS

4.3.1 – Número de factores do modelo das MEE

Com determinação do número de factores de conjuntos de MEE pretende-se estimar a dimensionalidade intrínseca dessas matrizes [2-14]. Esta operação é equivalente a determinar o número de componentes a duas dimensões utilizando uma análise dos componentes principais [12-14]. Como os conjuntos de MEE apresentam mais do que duas dimensões (ver secções 2.1.1 e 2.1.3) um modelo equivalente à análise dos componentes principais que se utilizou neste trabalho foi o PARAFAC (secção 2.1.3).

A estratégia utilizada para determinar o número de factores das MEE correspondentes às soluções simples de carbamatos e seus metabolitos em metanol foi a de aplicar o modelo PARAFAC com um número crescente de factores (de 1 até 5) e verificar qual o número de factores que permitia um melhor ajuste. Como critérios de melhor ajuste foi utilizada a consistência do núcleo (secção 2.1.3) e o número de iterações necessárias para a convergência. Quando o número de factores do modelo é superior ao verdadeiro o número de iterações aumenta bastante e a consistência do núcleo cai para valores significativamente inferiores aos 100%.

Nas Tabelas 4.2 a 4.5 mostram-se os resultados obtidos com a análise do número de factores para o carbarilo, 2-isopropoxifenol, 1-naftol e carbofurano. A análise destas tabelas mostra que são necessários dois factores para todas as substâncias com a excepção do 2-isopropoxifenol onde são necessários três factores. Um dos factores corresponde às bandas de fluorescência da substância e o outro (ou, no caso do 2-isopropoxifenol, os outros dois) às bandas de dispersão.

4.3.2 – Características da decomposição trilinear

Considerando o número de factores previamente determinado obtiveram-se estimativas, por decomposição PARAFAC, dos espectros de emissão e excitação e das concentrações.

4.3.2.1 - Espectros de emissão e excitação

Nas Figs. 4.4 a 4.7 apresentam-se os espectros de emissão e excitação correspondentes às quatro substâncias analisadas e estimadas por decomposição PARAFAC. Uma análise destes espectros permite verificar a sua semelhança

relativamente aos experimentais (Tabela 4.1) o que mostra o sucesso do modelo PARAFAC na análise das MEE dos carbamatos e alguns dos seus metabolitos.

4.3.2.2 - Concentrações

Na Tabela 4.7 apresentam-se os parâmetros do ajuste linear entre a concentração experimental e a estimada por PARAFAC. Uma análise desta tabela mostra a existência de uma boa dependência linear entre a concentração experimental e a obtida por decomposição PARAFAC.

Uma análise global dos resultados da decomposição PARAFAC das MEE em análise permite verificar a sua trilinearidade relativamente aos espectros de fluorescência e à variação da intensidade de fluorescência com a concentração.

Tabela 4.2 - Resultados do ajuste do modelo PARAFAC a um conjunto de MEE obtidas para diversas concentrações de carbarilo (água).

Nº de factores do modelo	Nº de iterações	Erro do ajuste	Consistência do núcleo (%)
1	3	$2,91 \times 10^5$	100
2	4	$2,10 \times 10^5$	100
3	22	$1,47 \times 10^5$	41
4	91	$9,43 \times 10^4$	37
5	282	$5,95 \times 10^4$	-0,2

Tabela 4.3 - Resultados do ajuste do modelo PARAFAC a um conjunto de MEE obtidas para diversas concentrações de carbarilo (metanol).

Nº de factores do modelo	Nº de iterações	Erro do ajuste	Consistência do núcleo (%)
1	3	$3,39 \times 10^5$	100
2	8	$2,41 \times 10^5$	100
3	2	$1,61 \times 10^5$	48
4	2	$1,00 \times 10^5$	27
5	536	$6,76 \times 10^4$	0,1

Tabela 4.4 - Resultados do ajuste do modelo PARAFAC a um conjunto de MEE obtidas para diversas concentrações de 2-isopropoxifenol (metanol).

Nº de factores do modelo	Nº de iterações	Erro do ajuste	Consistência do núcleo (%)
1	5	$1,88 \times 10^6$	100
2	2	$8,09 \times 10^5$	100
3	236	$3,99 \times 10^5$	99
4	154	$2,16 \times 10^5$	12
5	194	$1,23 \times 10^5$	2,8

Tabela 4.5 - Resultados do ajuste do modelo PARAFAC a um conjunto de MEE obtidas para diversas concentrações de 1-naftol (metanol).

Nº de factores do modelo	Nº de iterações	Erro do ajuste	Consistência do núcleo (%)
1	4	$2,41 \times 10^7$	100
2	2	$1,08 \times 10^7$	100
3	298	$3,28 \times 10^6$	3,9
4	130	$1,96 \times 10^6$	-0,6
5	2500	$1,65 \times 10^6$	-0,1

Tabela 4.6 - Resultados do ajuste do modelo PARAFAC a um conjunto de MEE obtidas para diversas concentrações de carbofurano (metanol).

Nº de factores do modelo	Nº de iterações	Erro do ajuste	Consistência do núcleo (%)
1	5	$5,84 \times 10^6$	100
2	2	$3,59 \times 10^6$	100
3	2	$2,25 \times 10^6$	12
4	8	$1,37 \times 10^6$	15
5	194	$8,59 \times 10^5$	0,4

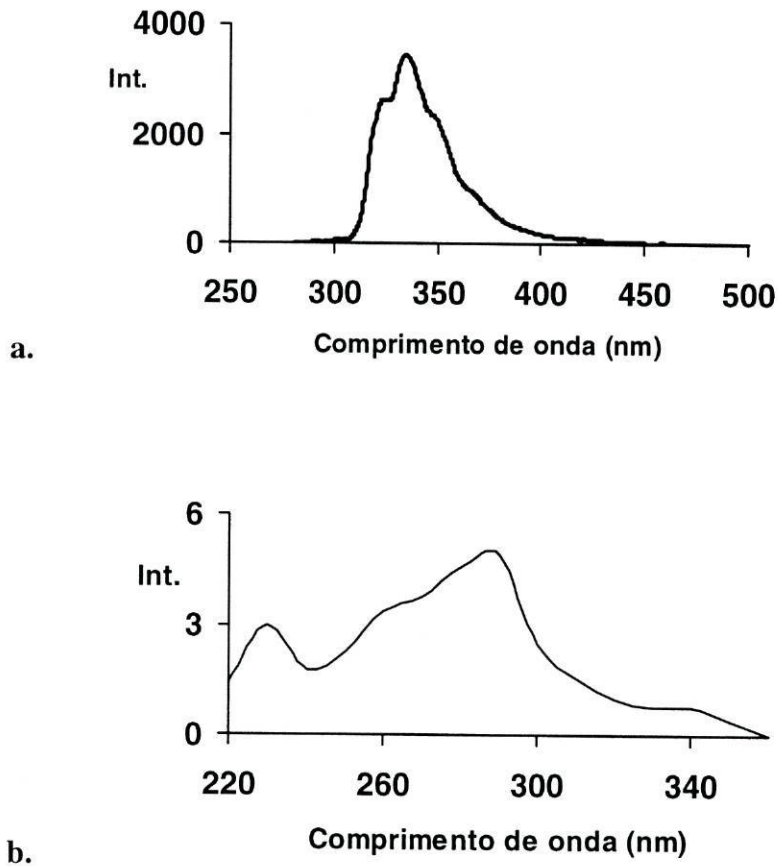


Fig. 4.4 - Espectros de emissão (a) e excitação (b) estimados por PARAFAC (modelo de 2 factores) para o carbarilo.

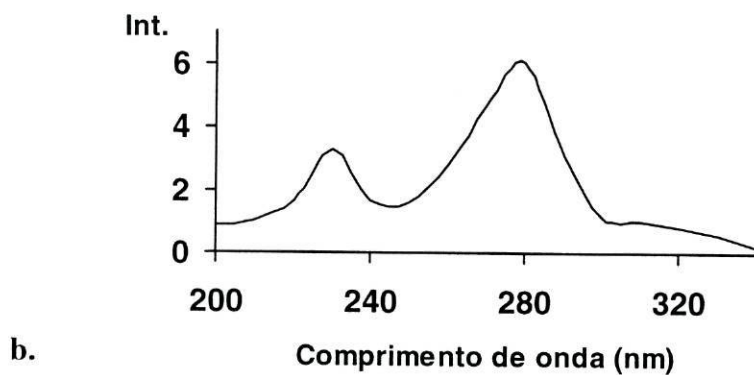
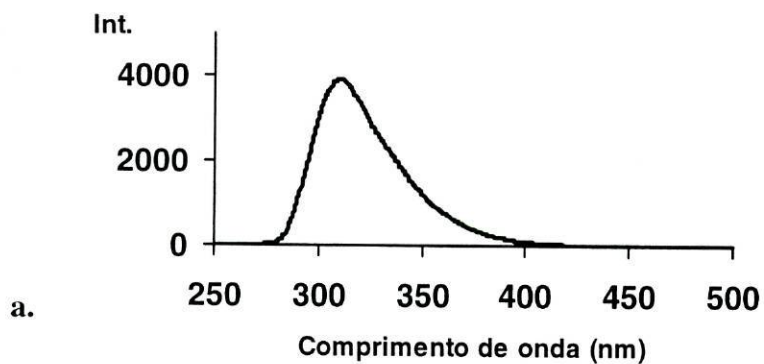


Fig. 4.5 - Espectros de emissão (a) e excitação (b) estimados por PARAFAC (modelo de 3 factores) para o 2-isopropoxifenol.

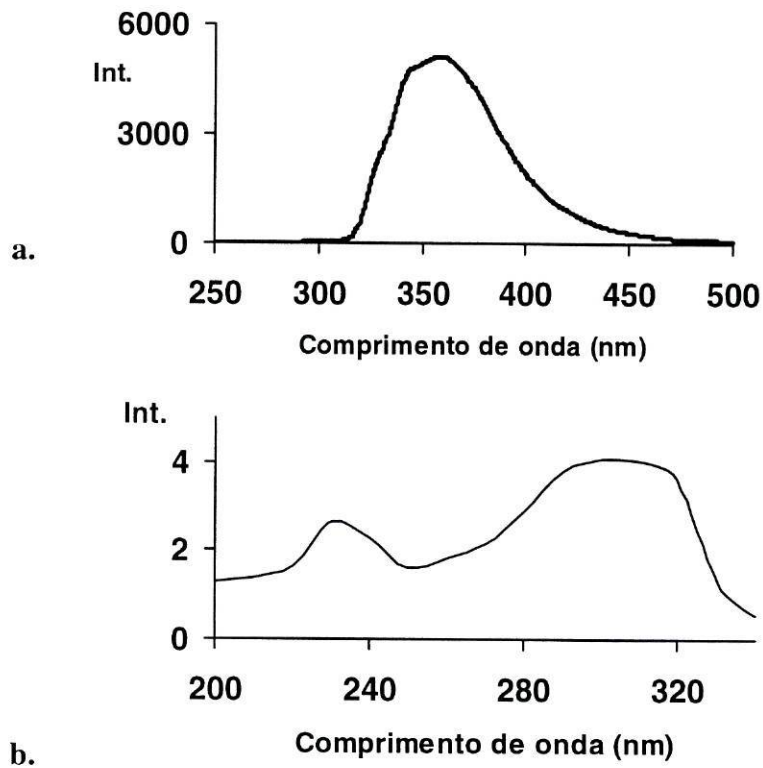


Fig. 4.6 - Espectros de emissão (a) e excitação (b) estimados por PARAFAC (modelo de 2 factores) para o 1-naftol.

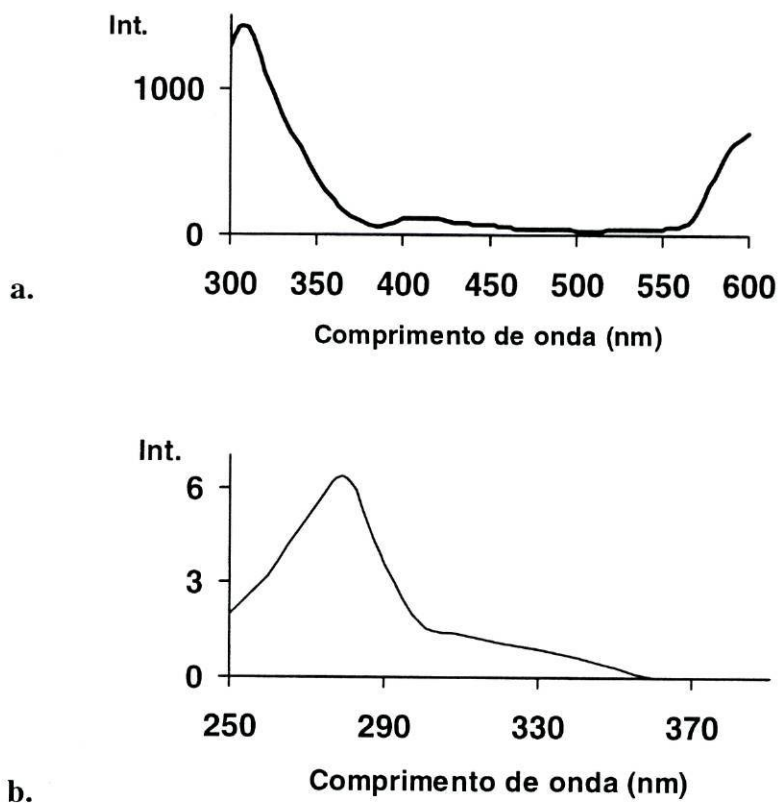


Fig. 4.7 - Espectros de emissão (a) e excitação (b) estimados por PARAFAC (modelo de 2 factores) para o carbofurano.

Tabela 4.7 - Parâmetros da correlação linear entre a estimativa das concentrações obtida por PARAFAC (modelo de dois factores) e a concentração experimental para as preparações em metanol.

	Carbarilo	2-isopropoxifenol	1-naftol	Carbofurano
Ordenada na origem (oo)	3,31	1,00	5,14	9,35
Desvio padrão da oo	1,97	1,68	2,41	2,30
Declive	7,47	11,20	6,78	5,30
Desvio padrão do declive	0,45	0,47	0,45	0,33
Correlação	0,989	0,997	0,987	0,994

4.4 – ANÁLISE DE FACTORES DAS MEE DE MISTURAS DE CARBAMATOS

4.4.1 – Número de factores do modelo das MEE

Na Fig. 4.8 mostram-se MEE típicas das misturas binária (Fig. 4.8.a) e ternária (Fig. 4.8.b). Nas Tabelas 4.8 e 4.9 mostram-se os resultados obtidos com a análise do número de factores para a mistura binária e ternária. A análise destas tabelas mostra que são necessários dois factores para a mistura binária e eventualmente três factores para a mistura ternária. Este resultado mostra que em ambos os casos o número de factores detectado é inferior ao previsto. De facto, tal como se observou na secção anterior, para além de um factor por cada espécie fluorescente deve-se somar mais um devido às bandas de dispersão.

4.4.2 – Características da decomposição trilinear

4.4.2.1 - Espectros de emissão e excitação

Os espectros de excitação e de emissão estimados por decomposição PARAFAC para a mistura binária e para a mistura ternária são apresentados nas Figs. 4.9 e 4.10 e Figs. 4.11 e 4.12, respectivamente.

Comparando os espectros dos factores da mistura binária com os espectros dos seus constituintes verifica-se que um dos factores corresponde efectivamente ao 1-naftol mas o outro não corresponde ao carbarilo. Este resultado mostra que as bandas de fluorescência do carbarilo, nas condições experimentais utilizadas (principalmente concentração de carbarilo), misturaram-se com as do 1-naftol (que é de facto muito mais fluorescente) ou com as bandas de dispersão.

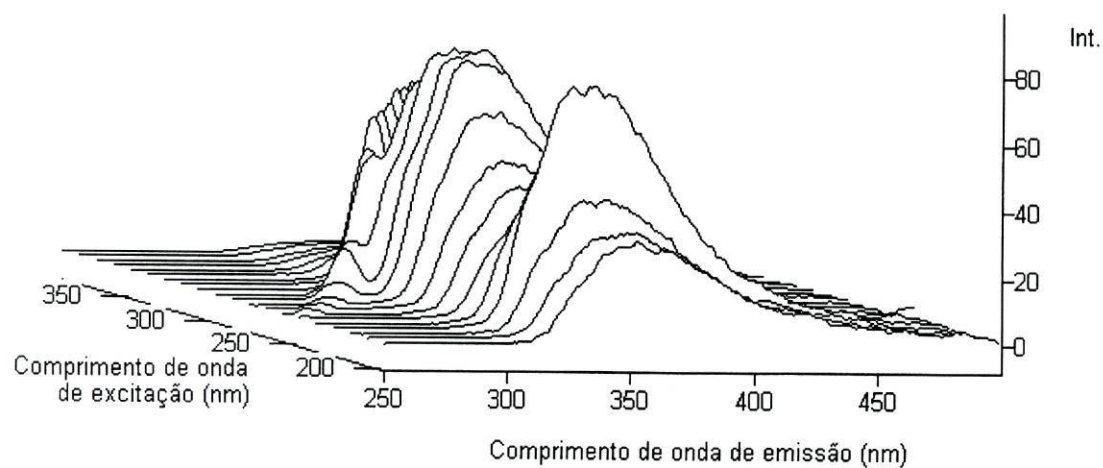
No caso da mistura ternária, a análise das Figs. 4.11 e 4.12 permite verificar que um dos factores corresponde ao 1-naftol, outro factor corresponde a uma mistura de carbarilo e 2-isopropoxifenol, e o último corresponde provavelmente a bandas de dispersão.

4.4.2.2 - Concentrações

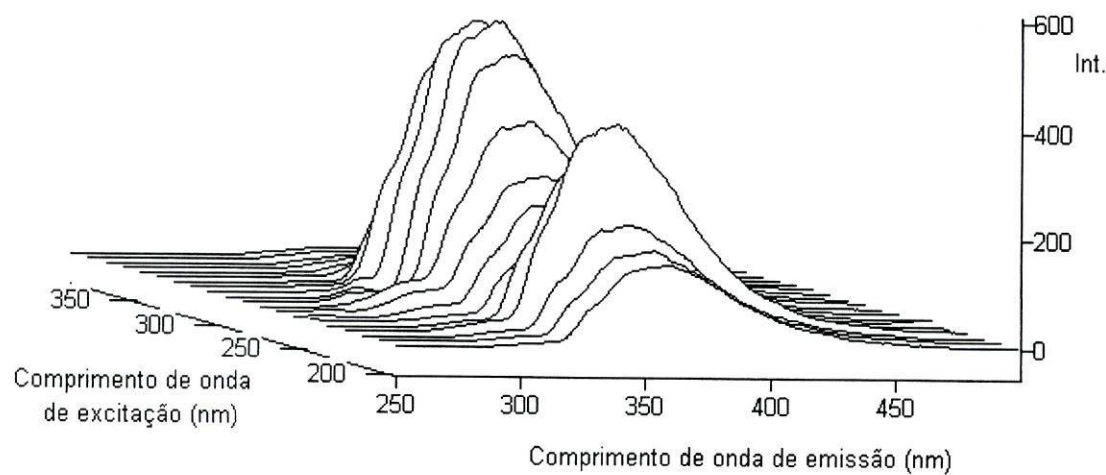
Apresentam-se nas Tabelas 4.10 e 4.11 os parâmetros do ajuste linear entre a concentração experimental e a estimada por PARAFAC para os constituintes das misturas binárias e ternárias detectados atrás. Uma análise desta tabela mostra que a estimativa da concentração de 1-naftol nas misturas binária e ternária foi razoavelmente

conseguida. Por outro lado a concentração individual dos outros constituintes das misturas não conseguiu ser estimada. No caso da mistura ternária, obteve-se uma correlação razoável entre a soma das concentrações de carbarilo e 2-isopropoxifenol e a concentração estimada para um dos factores.

Este resultados mostram que a decomposição por PARAFAC de misturas do carbarilo e dos seus metabolitos poderá falhar, principalmente porque a intensidade de fluorescência do 1-naftol é muito superior à dos outros dois.



a.



b.

Fig. 4.8 – MEE de misturas de carbarilo com os seus metabolitos: (a) mistura binária de de carbarilo ($5,13 \times 10^{-6}$ M) e 1-naftol ($2,00 \times 10^{-6}$ M); (b) mistura ternária de carbarilo, 2-isopropoxifenol e 1-naftol.

Tabela 4.8 - Resultados do ajuste do modelo PARAFAC a um conjunto de MEE de uma mistura binária de carbarilo e 1-naftol.

Nº de factores do modelo	Nº de iterações	Erro do ajuste	Consistência do núcleo (%)
1	3	$1,66 \times 10^6$	100
2	2	$1,21 \times 10^6$	100
3	104	$8,90 \times 10^5$	34
4	258	$6,19 \times 10^5$	0,22
5	210	$4,08 \times 10^5$	0,01

Tabela 4.9 - Resultados do ajuste do modelo PARAFAC a um conjunto de MEE de uma mistura ternária de carbarilo, 2-isoproxifenol e 1-naftol.

Nº de factores do modelo	Nº de iterações	Erro do ajuste	Consistência do núcleo (%)
1	3	$1,15 \times 10^7$	100
2	2	$8,24 \times 10^6$	100
3	72	$5,96 \times 10^6$	41
4	108	$4,38 \times 10^6$	6,1
5	101	$3,17 \times 10^6$	0,1

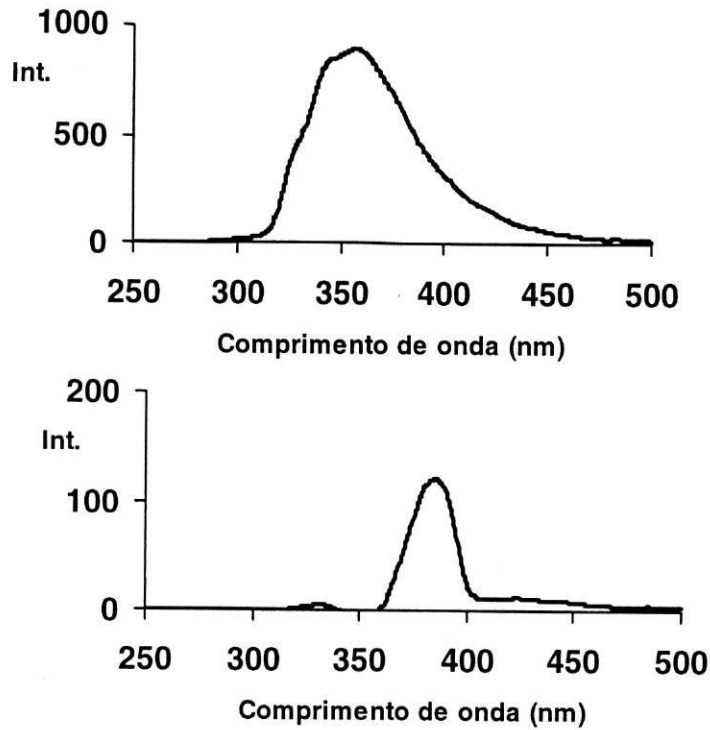


Fig. 4.9 - Espectros de emissão estimados por PARAFAC (modelo de 2 factores) para mistura binária de carbarilo e 1-naftol.

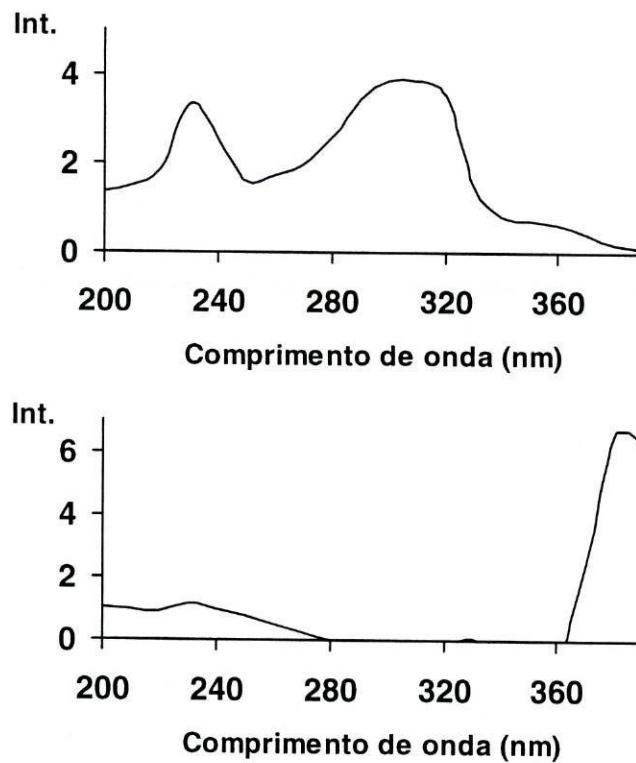


Fig. 4.10 - Espectros de excitação estimados por PARAFAC (modelo de 2 factores) para mistura binária de carbarilo e 1-naftol.

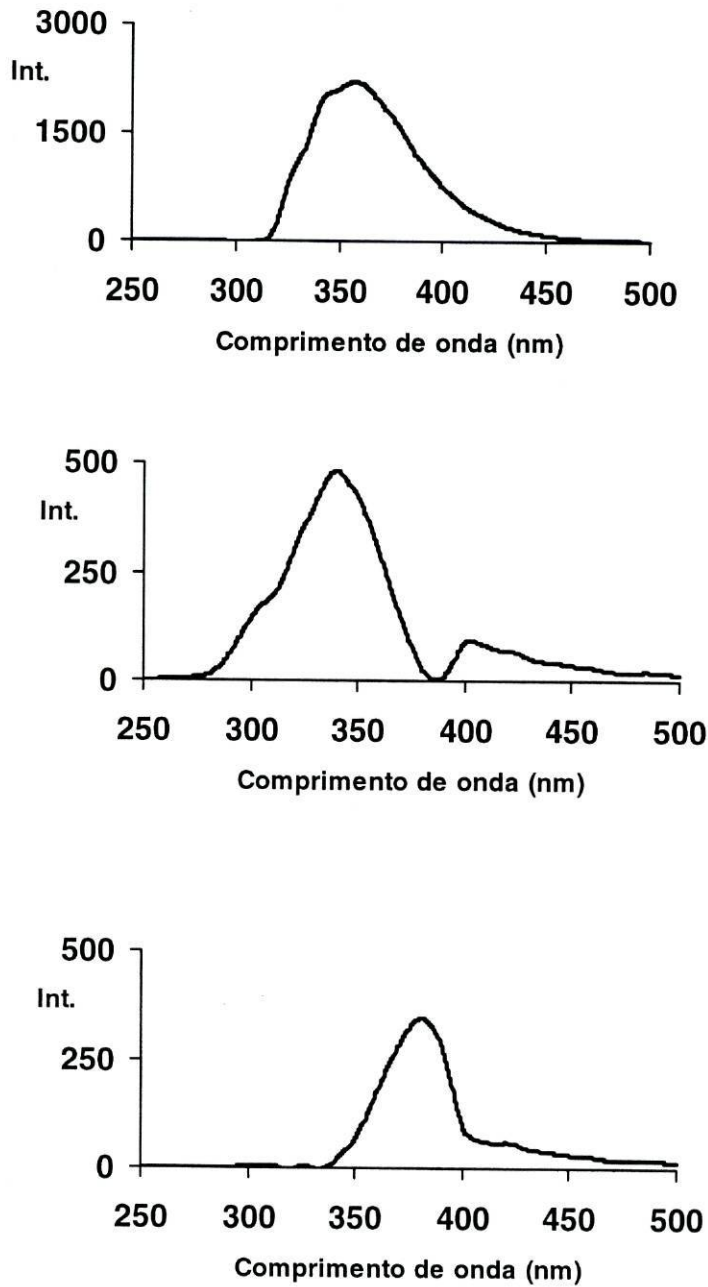


Fig. 4.11 - Espectros de emissão estimados por PARAFAC (modelo de 3 factores) para a mistura ternária de carbarilo, 2-isopropoxifenol e 1-naftol.

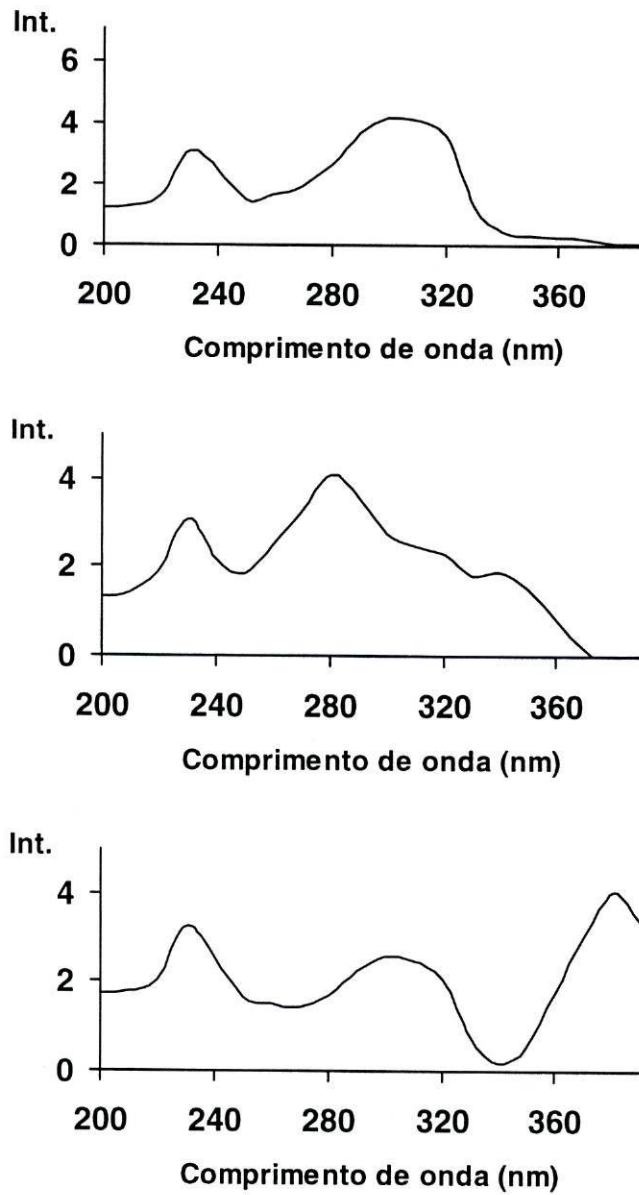


Fig. 4.12 - Espectros de excitação estimados por PARAFAC (modelo de 3 factores) para a mistura ternária de carbarilo, 2-isopropoxifenol e 1-naftol.

Tabela 4.10 - Parâmetros da correlação linear entre a estimativa das concentrações obtida por PARAFAC (modelo de dois factores) e a concentração experimental para a mistura binária de carbarilo e 1-naftol.

	Carbarilo*	1-naftol
Ordenada na origem (oo)	-	0,50
Desvio padrão da oo	-	0,30
Declive (s)	-	0,055
Desvio padrão do declive	-	0,005
Correlação	-	0,981

* Não se obtiveram estimativas razoáveis da concentração.

Tabela 4.11 - Parâmetros da correlação linear entre a estimativa das concentrações obtida por PARAFAC (modelo de dois factores) e a concentração experimental para a mistura ternária de carbarilo, 2-isopropoxifenol e 1-naftol.

	Carbarilo + 2-isopropoxifenol	1-naftol
Ordenada na origem (oo)	1,41	-0,20
Desvio padrão da oo	0,10	0,05
Declive (s)	0,066	0,021
Desvio padrão do declive	0,004	0,004
Correlação	0,976	0,998

4.5 – CONCLUSÕES

Os resultados apresentados e discutidos neste capítulo mostram que a análise química quantitativa de carbamatos fluorescentes é possível por fluorescência molecular. De facto, observou-se uma resposta linear da intensidade de fluorescência em função da concentração em metanol. Por outro lado, verificou-se que as suas MEE apresentam uma estrutura trilinear o que poderá facilitar o desenvolvimento de novas metodologias de análise quimiométrica multidimensional quantitativa e robusta.

No entanto, verificou-se que as características de fluorescência (espectros de emissão e excitação) de cada carbamato (carbarilo e carbofurano) não diferem significativamente das dos seus metabolitos (principalmente no caso do carbofurano) e apresentam uma eficiência de fluorescência bastante diferente (o 1-naftol é uma substância muito mais fluorescente do que o carbarilo e o 2-isopropoxifenol). Estas propriedades poderão dar origem a problemas de análise quantitativa de misturas de um carbamato e seus metabolitos, que será a situação esperada em amostras ambientais. Este aspecto necessitará de mais investigação.

4.6 – BIBLIOGRAFIA

1. A.Coly e J.J. aaron, *Talanta*, 41 (1994) 1475.
2. J.C.G. Esteves da Silva, S.A.G.Novais, *Analyst*, 123 (1998) 2067.
3. R.Bro, *Chemom. Intel. Lab. Syst.*, 46 (1999) 133.
4. S. Bijlsma, D.J. Louwarse, A.K. Smilde, *J. Chemometrics*, 13 (1999) 311.
5. K. Johnson, A. Juan, S.C. Rutan, *J. Chemometrics*, 13 (1999) 331.
6. J.C.G. Esteves da Silva, C.J. Oliveira, *Talanta*, 49 (1999) 889.
7. R.D. Jiji, G.A. Cooper, K.S. Booksh, *Anal. Chim. Acta*, 397 (1999) 61.
8. R.D. Jiji, K.S. Booksh, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 718.
9. R.D. Jiji, G.G. Anderson, K.S. Booksh, *J. Chemometrics*, 14 (2000) 171.
10. R. Bro, *Chemom. Intel. Lab. Syst.*, 46 (1999) 133.
11. R.Bro, *Multi-way Analysis in the Food Industry. Models, Algorithms and Applications*, Doctoral Dissertation, University of Amsterdam, 1998.
12. J.C.G. Esteves da Silva, *Tese de Doutoramento em Química*, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 1986.
13. Miguel Marques, *Tese de Mestrado em Química*, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2000.
14. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. Jong, P.J. Lewi e J. Verbeke, *Handbook of Chemometrics Qualimetrics, Part A*, Elsevier, Amsterdam, 1997, Cap.17.

5 – INTERACÇÃO DE PESTICIDAS CARBAMATOS COM AF MEDIDA POR FLUORESCÊNCIA

5.1 – INTRODUÇÃO

Neste capítulo será abordada a interação dos pesticidas carbamatos em estudo, assim como dos respectivos metabolitos fluorescentes, com os AF utilizando a fluorescência molecular como técnica para monitorizar a interação em solução aquosa. São apresentadas as propriedades de fluorescência destas substâncias em soluções aquosas com concentrações crescentes de uma amostra de AF. Espera-se observar a extinção de fluorescência dos pesticidas e seus metabolitos provocada pela sua associação com os AF.

Apresenta-se, de forma sistemática, o procedimento de correção dos efeitos de filtro primários e secundários provocados na fluorescência dos carbamatos e seus metabolitos pela presença de AF nas soluções aquosas. Os resultados observados para a extinção da fluorescência dos carbamatos e seus metabolitos pelos AF, após correção dos efeitos de filtro, serão utilizados para estimar constantes de associação.

5.2 - EXTINÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DOS PESTICIDAS PELOS AF

5.2.1 – Extinção de fluorescência nas MEE dos pesticidas

Apresenta-se na Fig. 5.1 a MEE de soluções aquosas da amostra de AF. Como se verifica, esta amostra apresenta uma banda de emissão de fluorescência larga com um máximo a cerca de 446 nm e um máximo de excitação a cerca de 330 nm.

Nas Fig. 5.2 a 5.7 mostram-se MEE dos carbamatos e dos seus metabolitos fluorescentes em estudo na presença de diferentes concentrações de AF. Uma análise global destas figuras mostra uma diminuição progressiva das bandas de fluorescência, características de cada pesticida, quando a concentração de AF aumenta. Assim, verifica-se que a presença de AF na solução aquosa dos carbamatos e seus metabolitos provoca a extinção da sua fluorescência. Também, na zona da MEE onde os AF são fluorescentes observa-se um aumento da intensidade com o aumento da concentração de AF.

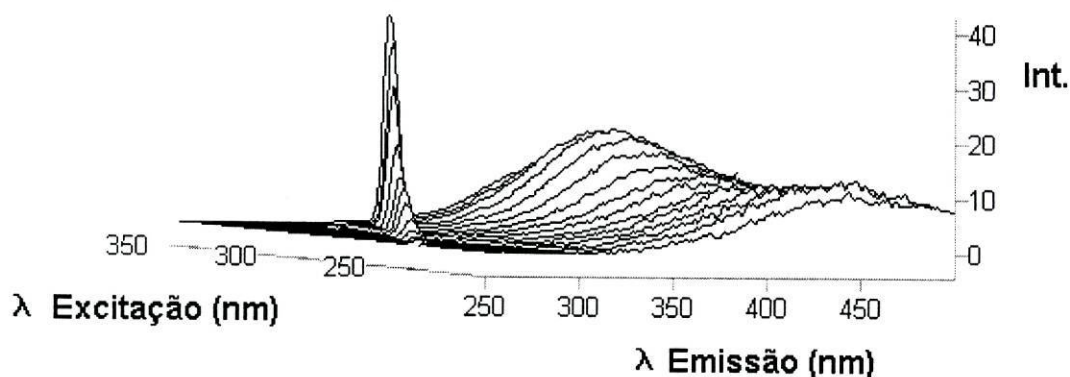
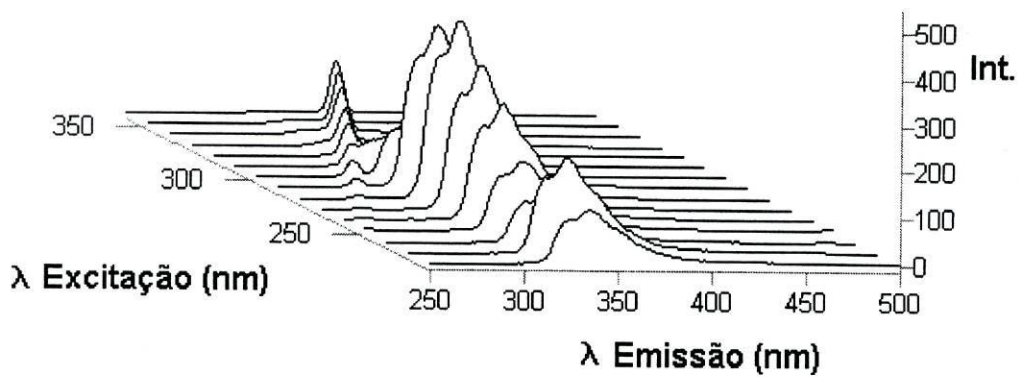
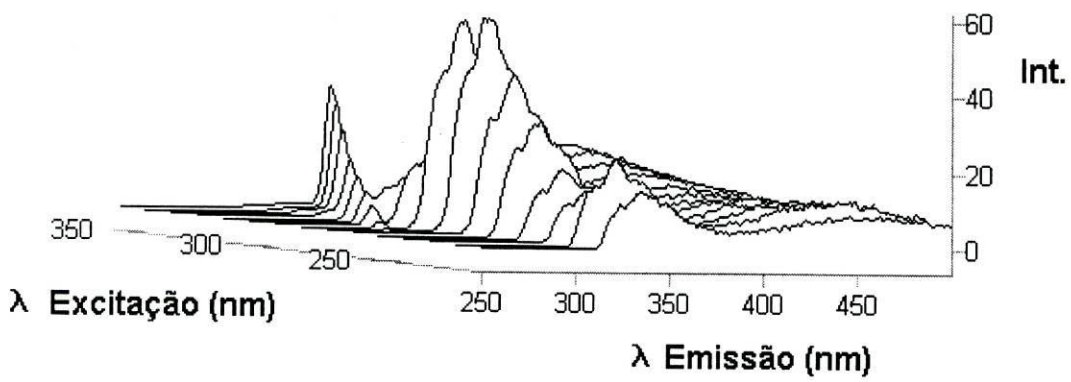


Fig. 5.1 – Espectro de fluorescência total da amostra de AF utilizada.



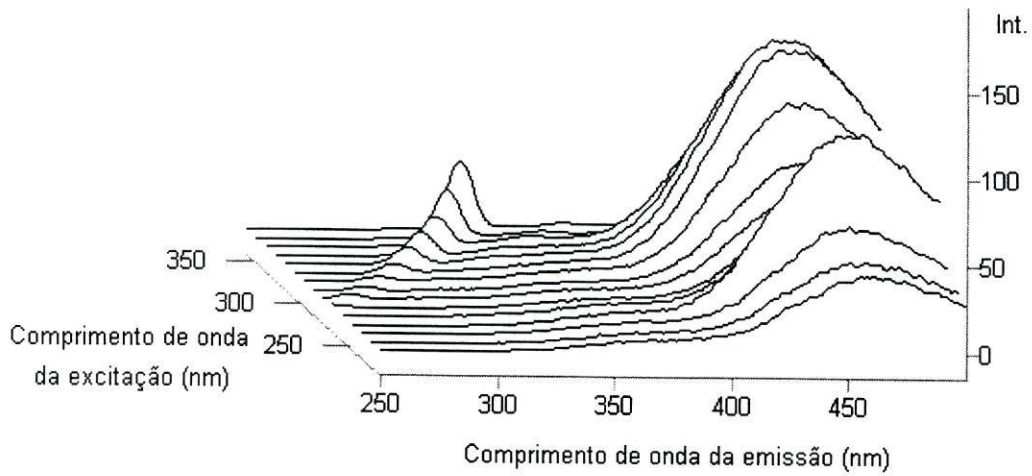
a.



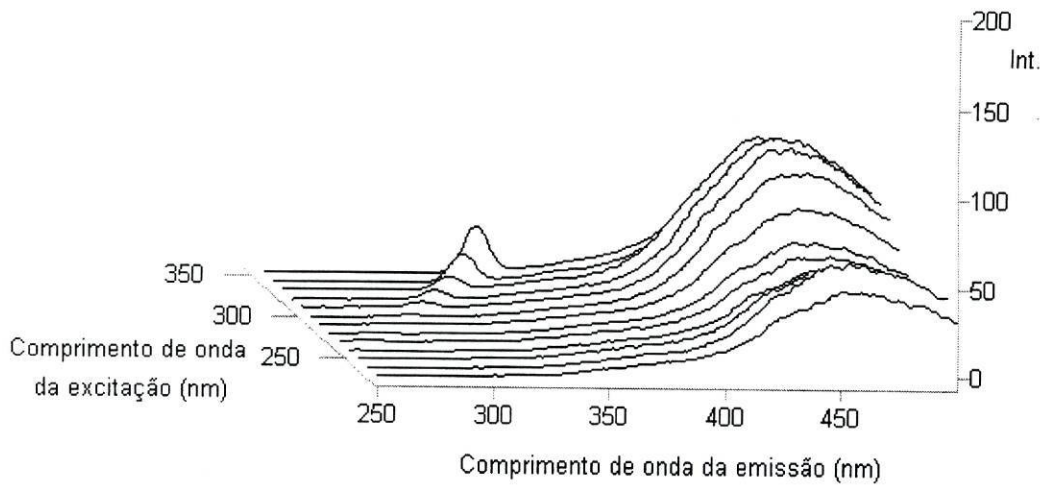
b.

Fig. 5.2 – MEE do carbarilo (5,4 ppm) (a) e de uma mistura de carbarilo (5,4 ppm) e AF (60 ppm) (b).

a.



b.



c.

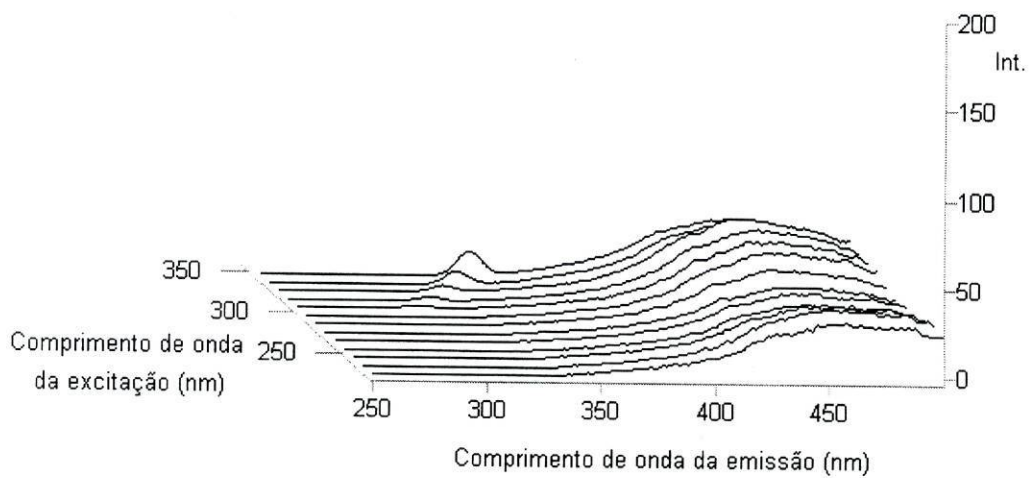
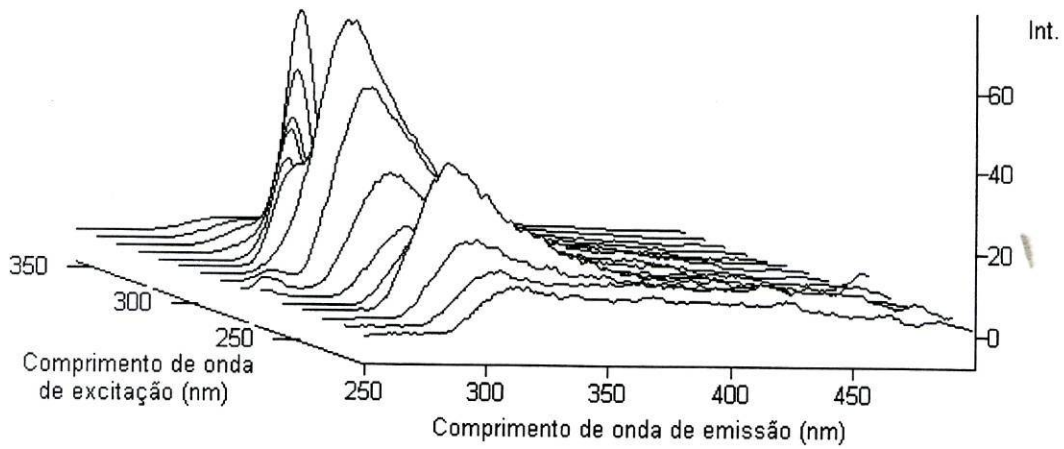
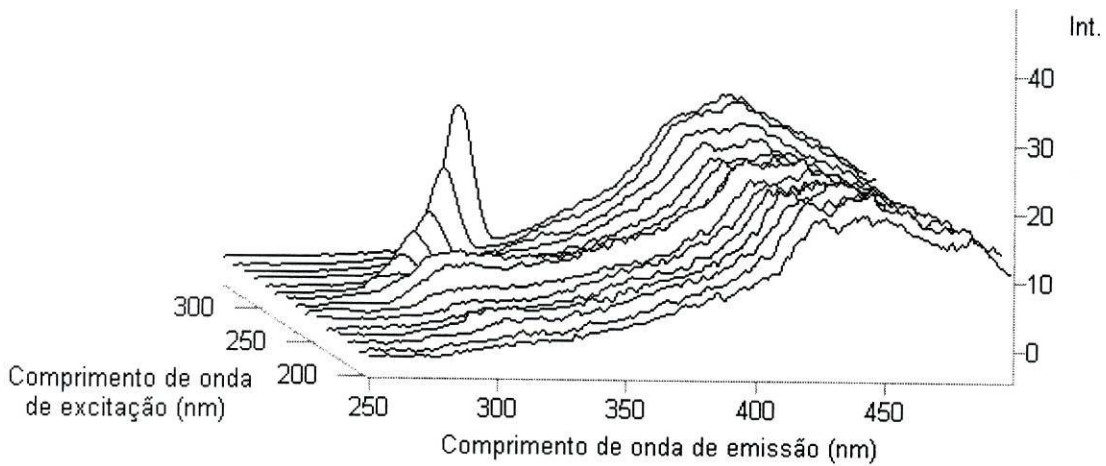


Fig. 5.3 – MEE do 1-naftol (2,9 ppm) (a), de uma mistura de 1-naftol (2,9 ppm) e AF (25 ppm) (b) e de uma mistura de 1-naftol (2,9 ppm) e AF (50 ppm) (c).

a.



b.



c.

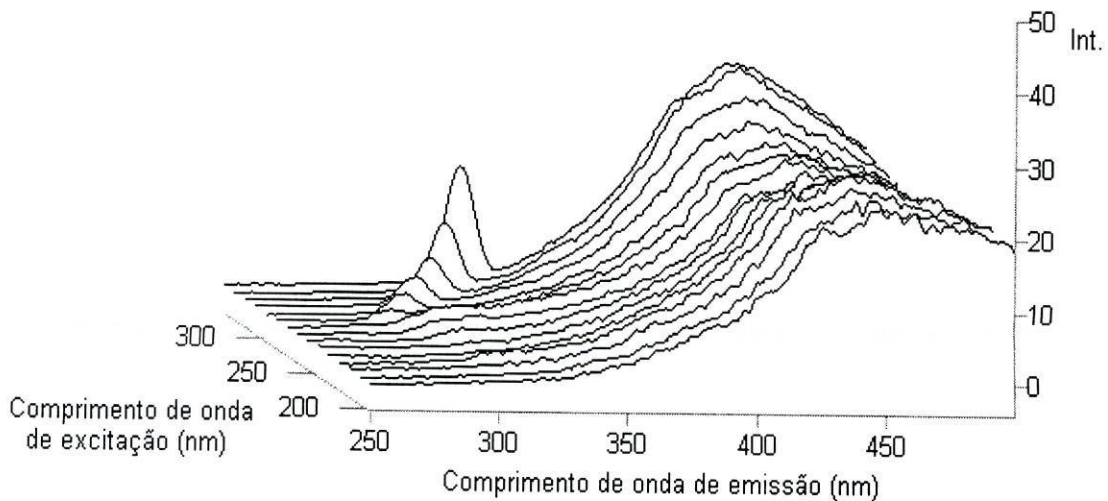


Fig. 5.4 – MEE do 2-isopropoxifenol (1,9 ppm) (a), de uma mistura de 2-isopropoxifenol (1,9 ppm) e AF (25 ppm) (b) e de uma mistura de 2-isopropoxifenol (1,9 ppm) e AF (50 ppm) (c).

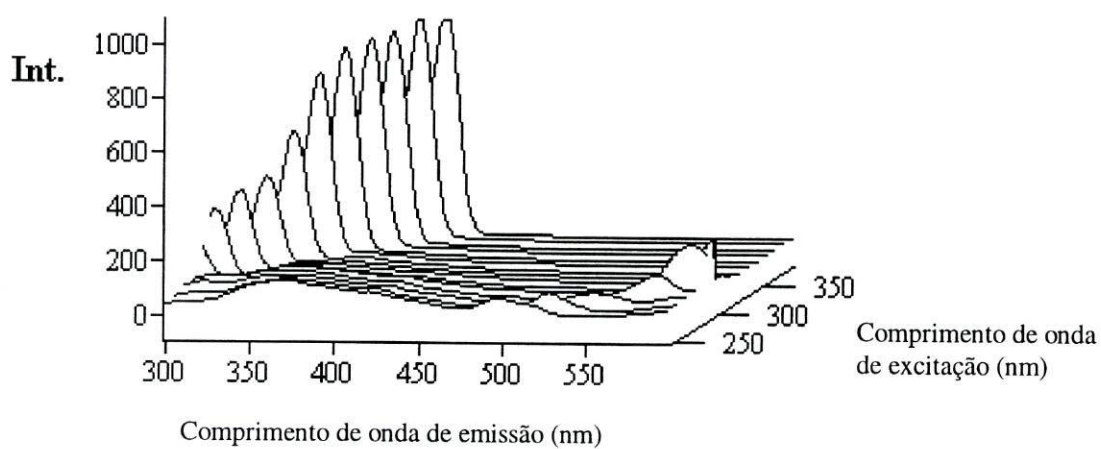
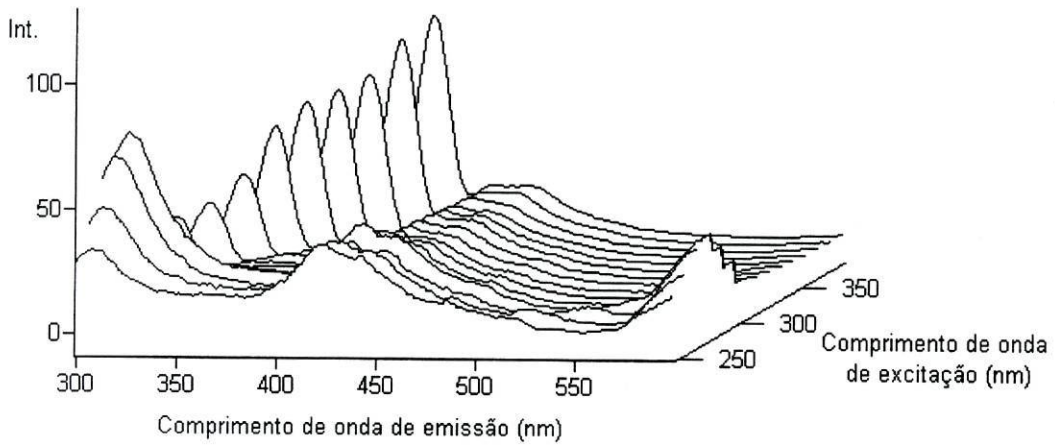
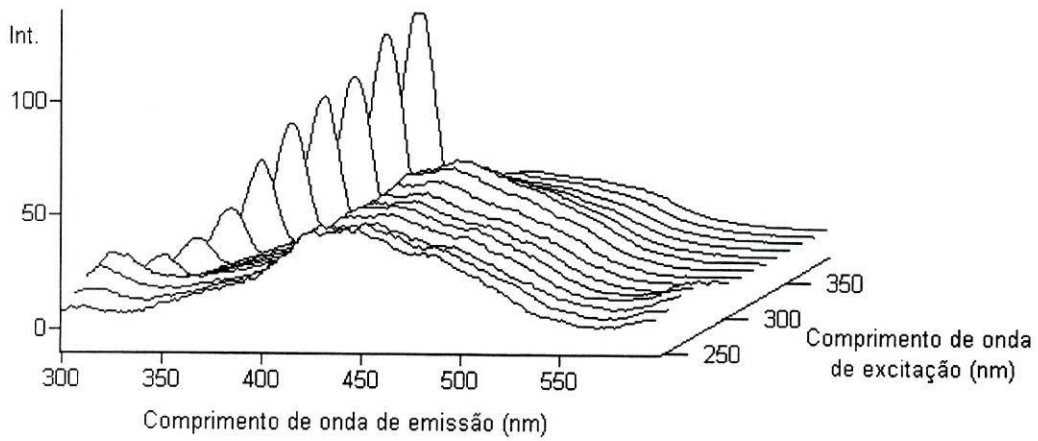


Fig. 5.5 – MEE carbofurano em água (13,68 ppm). A presença de AF não provoca uma diminuição visualmente mensurável na banda de fluorescência do carbofurano porque ela é muito pouco intensa em solução aquosa.

a.



b.



c.

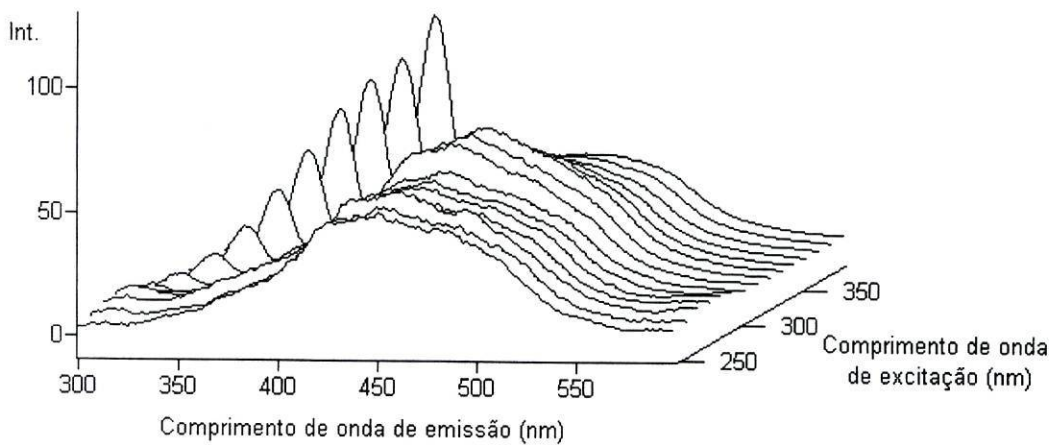
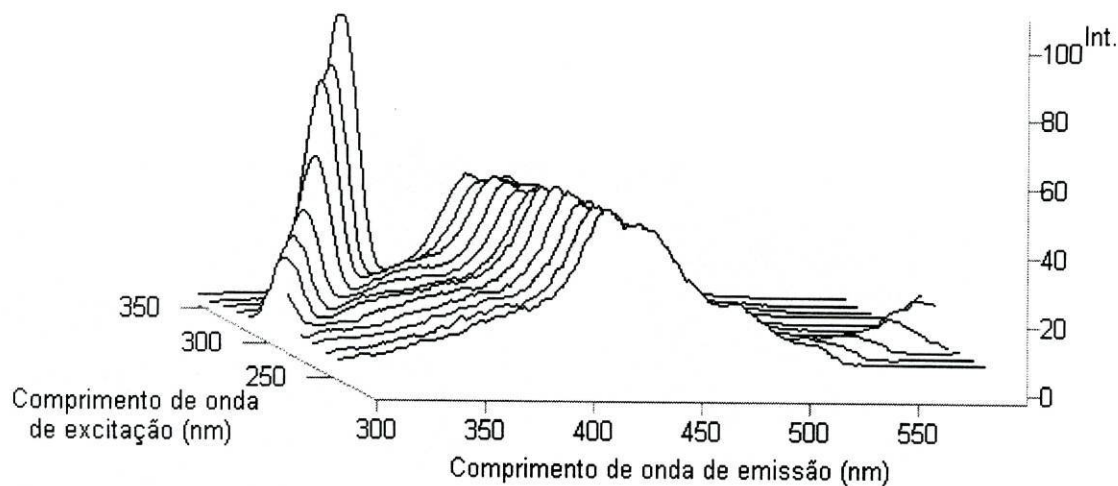
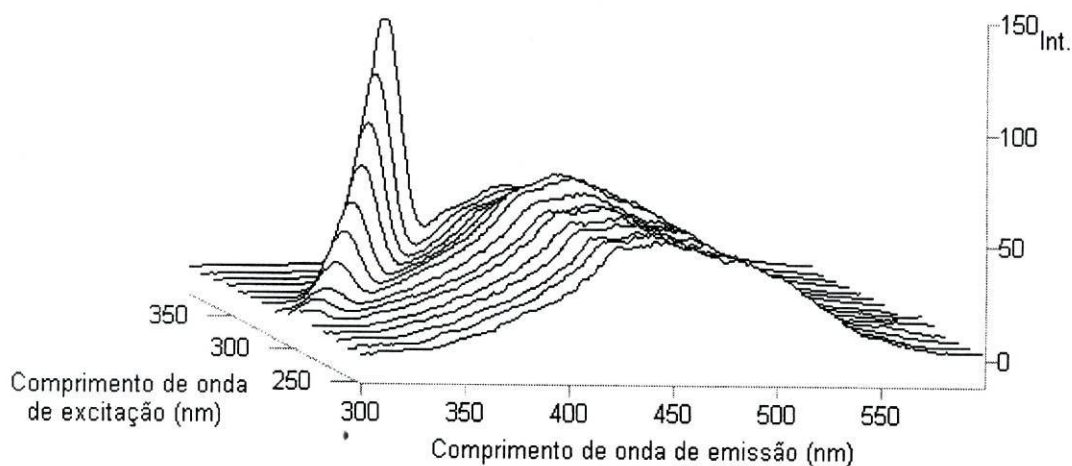


Fig. 5.6 – MEE do 3-hidroxicarbofurano (4,4 ppm) (a), de uma mistura de 3-hidroxicarbofurano (4,4 ppm) e AF (25 ppm) (b) e de uma mistura de 3-hidroxicarbofurano (4,4 ppm) e AF (50 ppm) (c).

a.



b.



c.

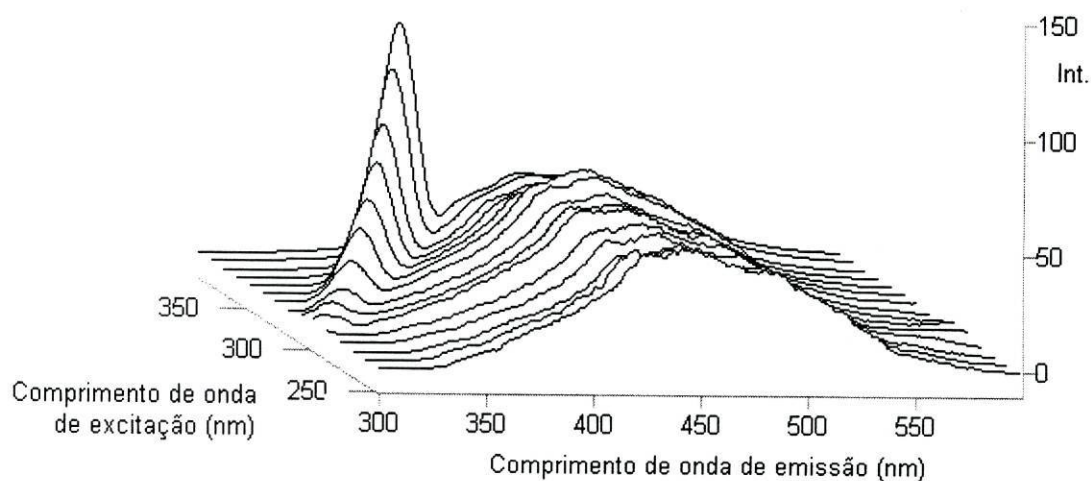


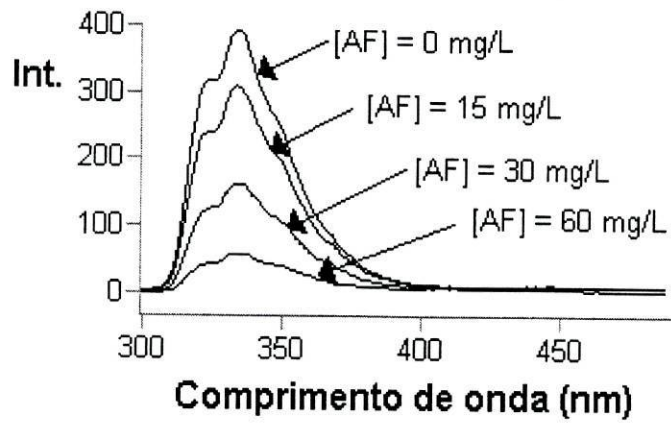
Fig. 5.7 – MEE do 3-cetocarbofurano (4,4 ppm) (a), de uma mistura de 3-cetocarbofurano (4,4 ppm) e AF (25 ppm) (b) e de uma mistura de 3-cetocarbofurano (4,4 ppm) e AF (45 ppm) (c).

5.2.2 – Extinção de fluorescência nos espectros de emissão dos pesticidas

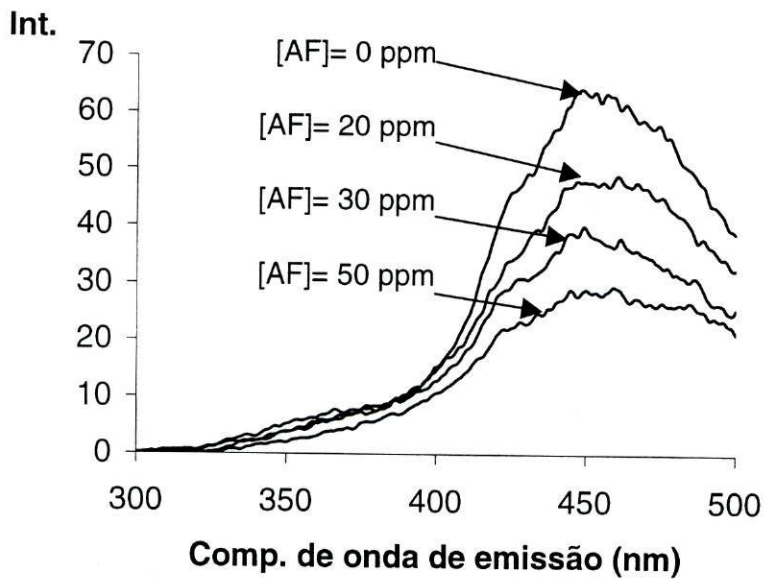
Uma análise pormenorizada da extinção da fluorescência dos carbamatos e seus metabolitos é difícil de ser efectuada por análise directa das respectivas MEE. Por este motivo, mostra-se na Fig. 5.8 os espectros de emissão de fluorescência em função da concentração de AF.

A análise da Fig. 5.8 confirma as observações anteriores sobre a existência de extinção de fluorescência dos carbamatos e seus metabolitos pelos AF. No entanto, como os AF são moléculas com uma absorptividade específica relativamente elevada, as variações observadas nos espectros de emissão da Fig. 5.8 podem-se também ficar a dever a efeitos de filtro (ver secção 2.2.3.6), para além da eventual associação entre as moléculas de carbamatos e seus metabolitos e os AF. Deste modo, é necessário avaliar qual o peso dos efeitos de filtro nas diminuições de fluorescência observadas e esta análise será efectuada nas próximas secções.

Carbarilo

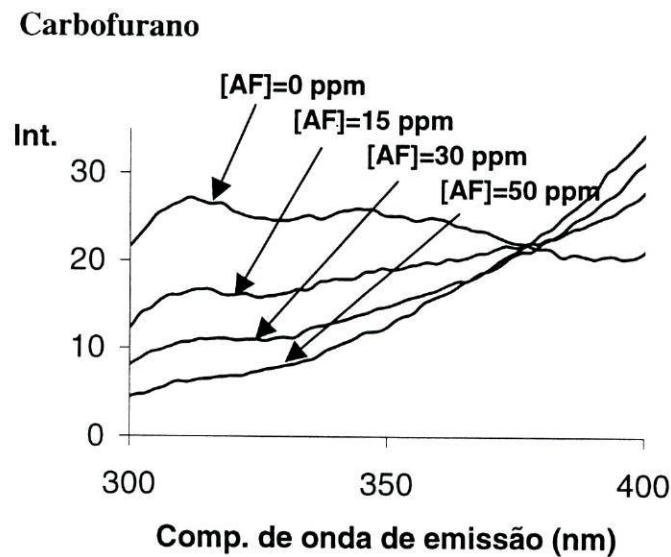
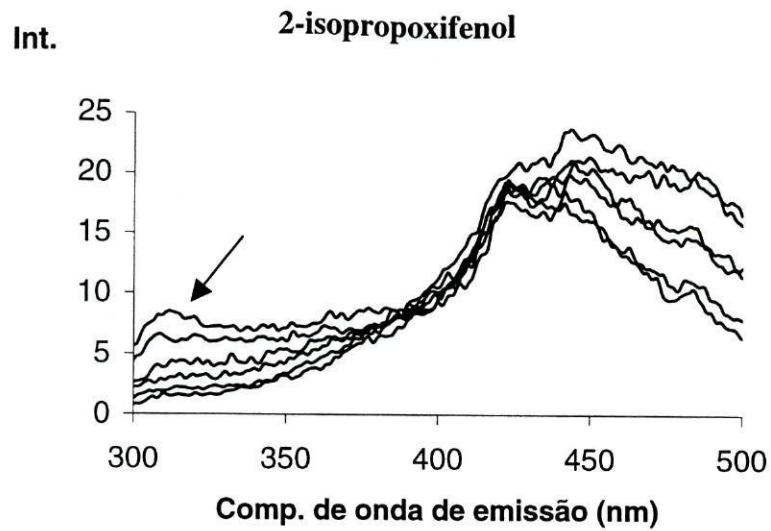


1-naftol



(continua)

Fig. 5.8 – Sobreposição dos espectros de emissão de fluorescência molecular (aos comprimentos de onda máximos de excitação) do carbarilo e 1-naftol em soluções aquosas na presença de AF em concentrações crescentes.



(continua)

Fig. 5.8 (continuação) – Sobreposição dos espectros de emissão de fluorescência molecular (aos comprimentos de onda máximos de excitação) do 2-isopropoxifenol e do carbofurano em soluções aquosas na presença de AF em concentrações crescentes.

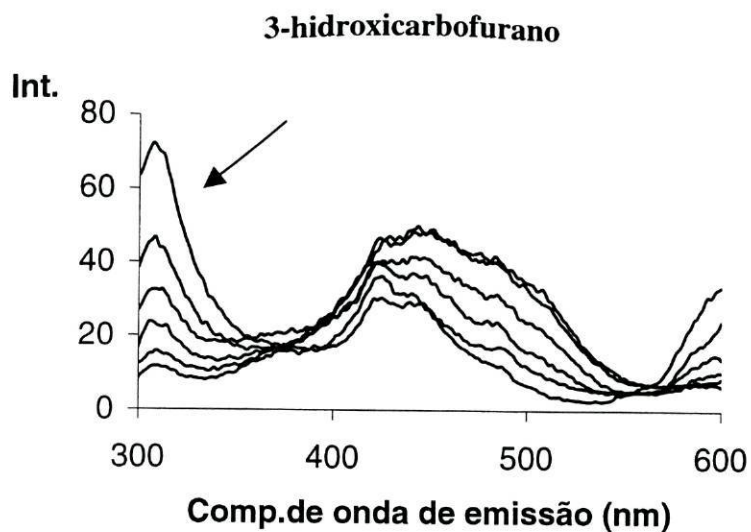


Fig. 5.8 (continuação) – Sobreposição dos espectros de emissão de fluorescência molecular (aos comprimentos de onda máximos de excitação) do 3-hidroxicarbofurano em soluções aquosas na presença de AF em concentrações crescentes.

5.3 – ABSORVÂNCIAS AOS COMPRIMENTOS DE ONDA DA EXCITAÇÃO E EMISSÃO

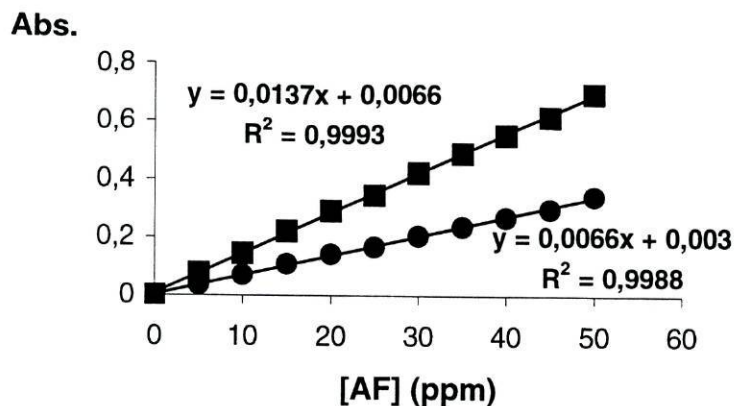
De acordo com o modelo adoptado para este estudo para se efectuar a correcção dos efeitos de filtro (secção 2.2.3.6) é necessário determinar a absorvância das soluções aquosas de AF aos comprimentos de onda de excitação e emissão da substância fluorescente em análise (eq. 2.61 e 2.62). Na Fig. 5.9 representam-se os valores de absorvância medidos em função da concentração de AF aos comprimentos de onda de emissão e de excitação dos carbamatos e respectivos metabolitos estudados.

A análise da Fig. 5.9 mostra que para o intervalo de concentração de AF estudado, e independentemente dos comprimentos de onda analisados, observou-se uma dependência linear entre a absorvância e a concentração das soluções aquosas de AF.

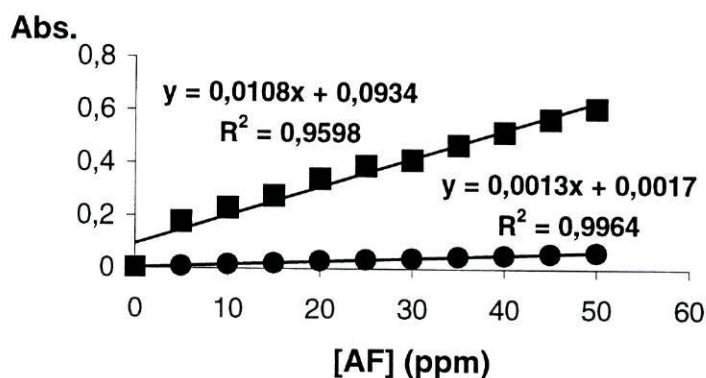
Como os AF têm um comprimento de onda de excitação a cerca de 330 nm (Fig. 5.1), e como é nesta gama que os carbamatos e seus metabolitos também apresentam máximos de excitação, a absorvância das soluções aos comprimentos de onda de excitação é maior (representações com quadrados pretos na Fig. 5.9). Também, da análise da Fig. 5.9, observam-se absorvâncias relativamente elevadas (superiores a 0,3), pelo que se espera a ocorrência de efeitos de filtro primário relativamente elevados.

No caso do 1-naftol (Fig. 5.9.b), 3-cetocarbofurano (Fig. 5.9.f) e 3-cetocarbofuranofenol (Fig. 5.9.g) a absorvância das soluções de AF ao respectivo comprimento de onda de emissão é relativamente pequena. Esta situação acontece porque os comprimentos de onda de emissão destas substâncias ocorrem para valores relativamente elevados (superior a 360 nm) afastados do máximo de excitação dos AF. Para estas três substâncias é de prever efeitos de filtro secundários relativamente pequenos. Para as outras substâncias fluorescentes, e como a sua emissão de fluorescência ocorre para valores de comprimento de onda na zona de excitação dos AF, prevêem-se efeitos de filtro secundário relativamente elevados.

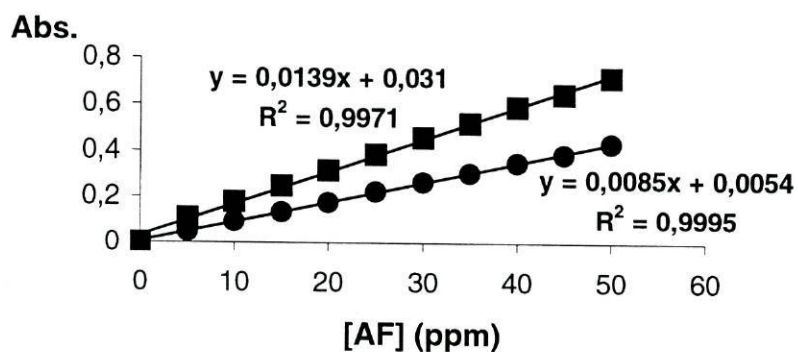
a.



b.



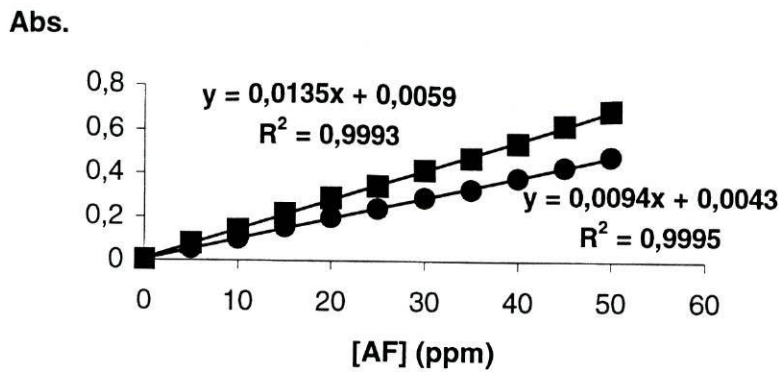
c.



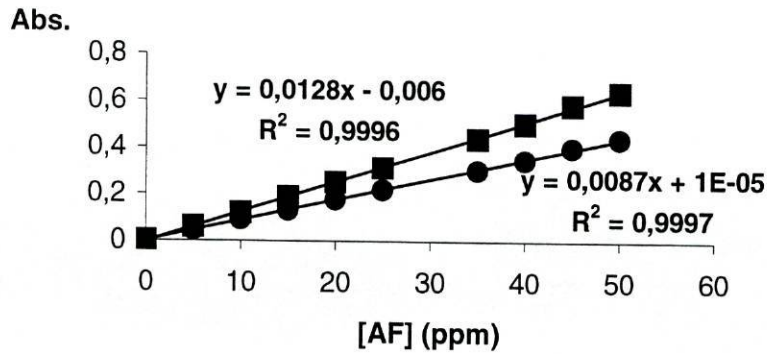
(continua)

Fig. 5.9 – Valores de absorvância medidos em função da concentração de AF em ppm aos comprimentos de onda de emissão - ● e de excitação - ■ em que se observaram máximos de fluorescência e respectivos parâmetros de ajuste linear para o carbaril (a), 1-naftol (b) e 2-isopropoxifenol (c).

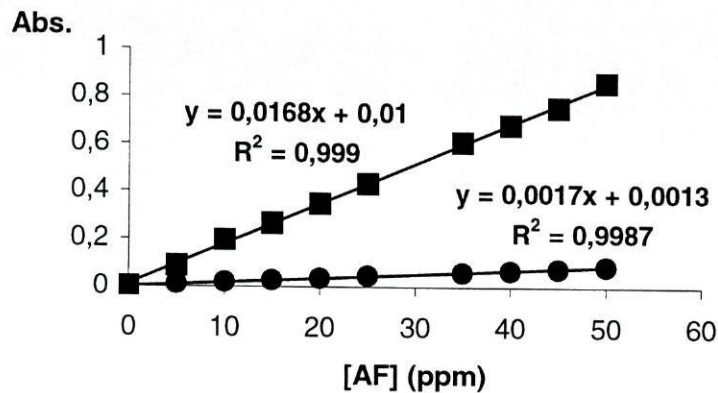
d.



e.



f.



(continua)

Fig. 5.9 (continuação) – Valores de absorvância medidos em função da concentração de AF em ppm aos comprimentos de onda de emissão - ● e de excitação - ■ em que se observaram máximos de fluorescência e respectivos parâmetros de ajuste linear para o carbofurano (d), 3-hidroxicarbofurano (e), 3-cetocarbofurano (f).

g.

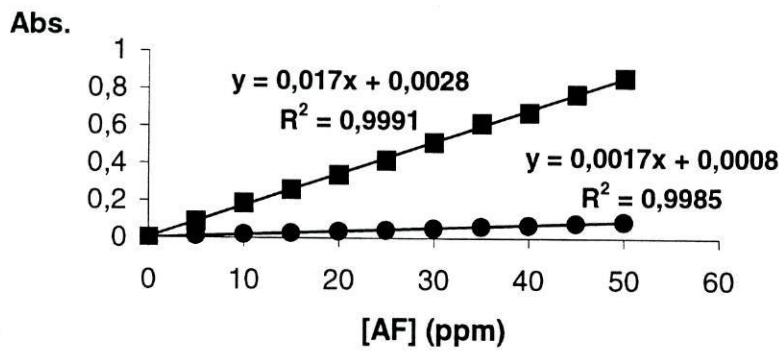


Fig. 5.9 (continuação) – Valores de absorvância medidos em função da concentração de AF em ppm aos comprimentos de onda de emissão - ● e de excitação - ■ em que se observaram máximos de fluorescência e respectivos parâmetros de ajuste linear para o 3-cetocarbofuranofenol (g).

5.4 – CORRECÇÃO DOS EFEITOS DE FILTRO

5.4.1 – Solução de AF

A Fig. 5.10 apresenta a representação gráfica da intensidade de fluorescência de 10 soluções de AF em função da sua concentração, com os resultados observados experimentalmente (círculos) e os corrigidos de efeitos de filtro (quadrados).

A curva com os resultados experimentais (círculos) mostra que para valores de concentração de AF de 20 mg/L começa a ocorrer desvios da linearidade significativos que se devem a efeitos de filtro.

Analisando a Fig. 5.10, verifica-se que, após a correcção, os valores experimentais se ajustam a uma recta como se previa na secção 2.2.3.7. Assim, verifica-se que o modelo de correcção dos efeitos de filtro é eficaz e válido para o tipo de sistemas químicos em estudo neste trabalho.

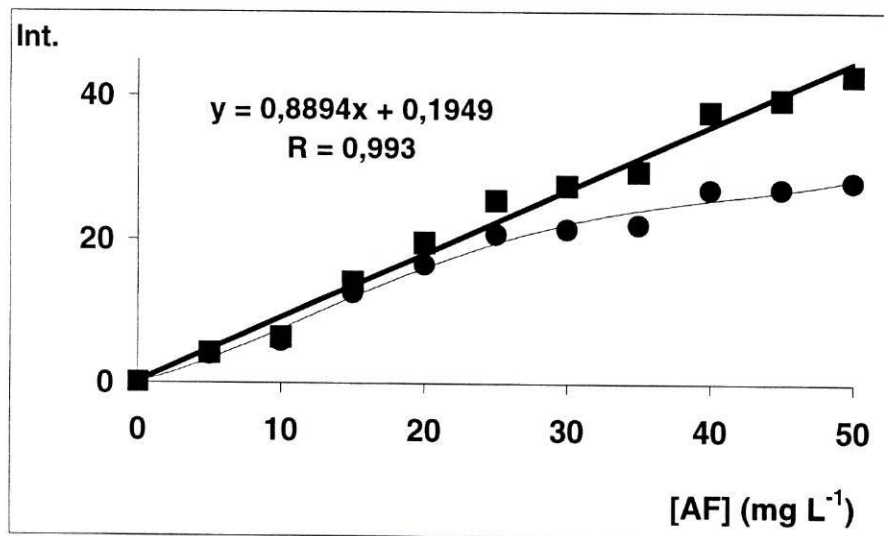


Fig. 5.10 – Representação da intensidade de fluorescência de várias soluções de AF em função da sua concentração e respectivos parâmetros do ajuste linear. Valores observados experimentalmente – ● e valores corrigidos – ■.

5.4.2 – Solução de pesticidas + AF

Apresentam-se nas Fig. 5.11 e 5.12 representações de Stern-Volmer (eq. 2.60) para a extinção de fluorescência dos carbamatos e seus metabolitos provocada pelos AF. Nestas figuras representam-se os gráficos de Stern-Volmer utilizando as intensidades de fluorescência não corrigidas (círculos) e corrigidas (quadrados) para os efeitos de filtro utilizando as equações 2.61 e 2.62.

Uma análise global das Fig. 5.11 e 5.12 mostra que as representações de Stern-Volmer com os dados não corrigidos para os efeitos de filtro dão origem a curvas com uma concavidade virada para cima pronunciada. Também, estas figuras mostram que a correção dos efeitos de filtro tendem a linearizar as representações de Stern-Volmer, o que está de acordo com a teoria (secção 2.2.3.2). A linearização dos dados originais confirma a validade do modelo utilizado para a correção dos efeitos de filtro.

No entanto, não se observaram representações lineares de Stern-Volmer para alguns dos metabolitos do carbofurano, nomeadamente para o 3-cetocarbofurano (Fig. 5.12.c) e 3-cero-carbofuranofenol. As representações de Stern-Volmer para estas duas substâncias são bastante difusas e não mostram a ocorrência de extinção significativa. Como primeira hipótese, este resultado pode-se atribuir à não interação entre estas substâncias e os AF. Contudo, como o carbofurano e o hidroxicarbofurano apresentam representações de Stern-Volmer aproximadamente lineares, esta hipótese pode não ser totalmente válida. Uma hipótese mais provável para justificar o resultado obtido poderá ser uma falha da metodologia experimental nestes dois casos. De facto, tanto o carbofurano como os seus metabolitos apresentam uma fluorescência muito fraca em solução aquosa, pelo que a técnica de medição da extinção de fluorescência poderá não ser a melhor técnica para medir a associação entre essas substâncias e os AF.

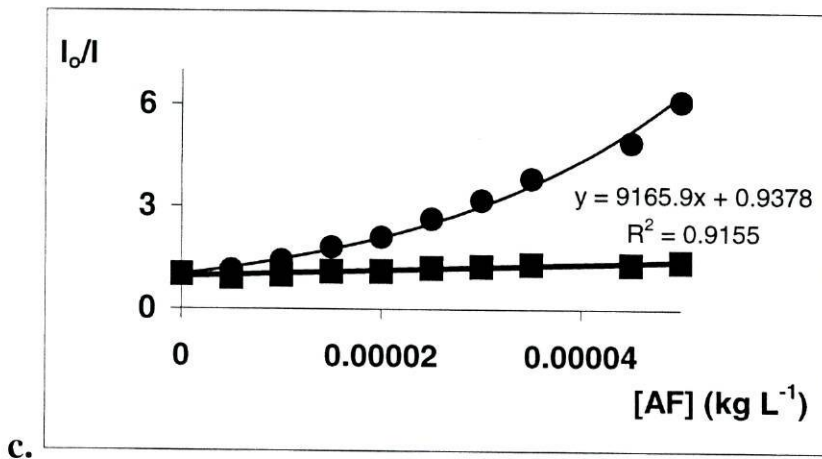
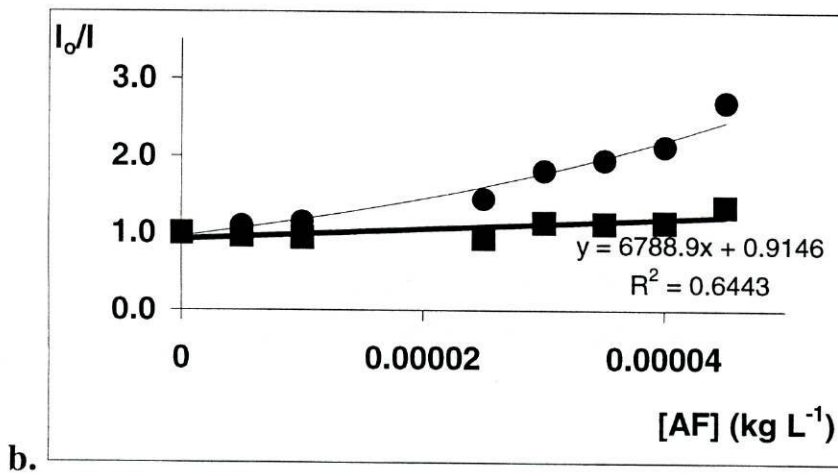
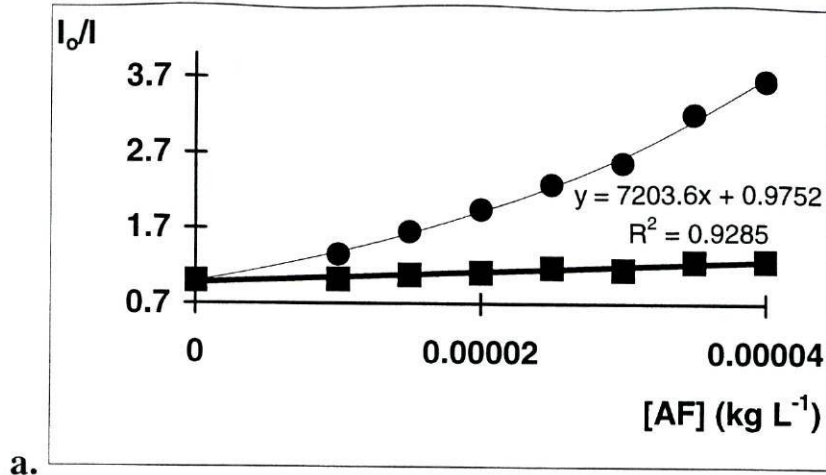


Fig. 5.11 – Representação da razão I_0/I de várias soluções de carbaril (a.) e dos seus metabolitos: 1-naftol (b.) e 2-isopropoxifenol (c.) com concentração fixa (10^{-5} M) em função da concentração de AF. Valores observados experimentalmente (●) e valores corrigidos (■).

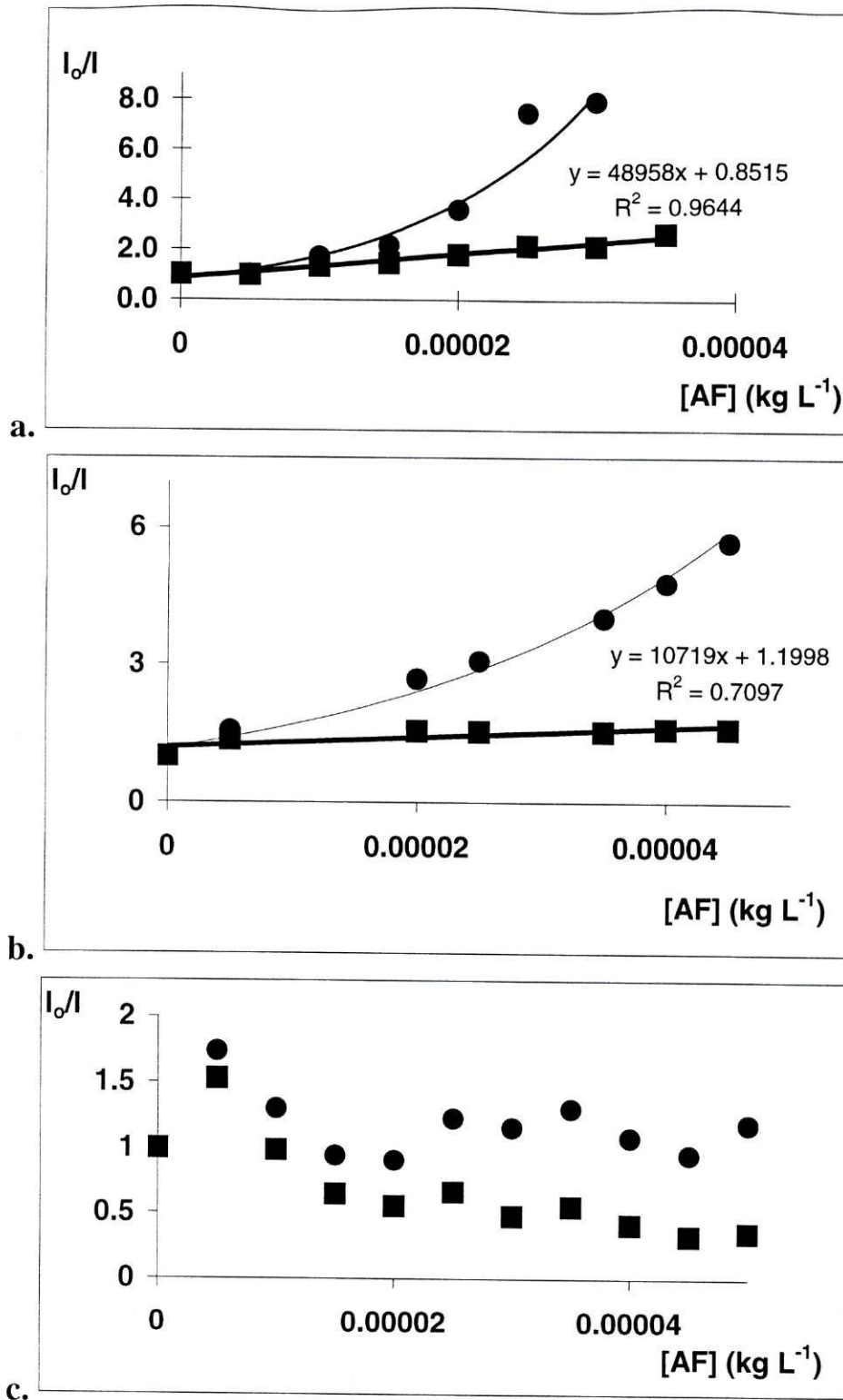


Fig. 5.12 – Representação da razão I_0/I de várias soluções de carbofurano (a) e 3-hidroxicarbofurano (b) e 3-cetocarbofurano (c) com concentração fixa (10^{-5} M) em função da concentração de AF e respectivos parâmetros do ajuste linear. Valores observados experimentalmente (●) e valores corrigidos (■).

5.5 – CÁLCULO DOS K_{SV}

Para as representações de Stern-Volmer lineares (Figs. 5.11 e 5.12) obtiveram-se as constantes de Stern-Volmer respectivas (Tabela 5.1).

Analisando os resultados da Tabela 5.1, verifica-se que os resultados experimentais, após correcção dos efeitos de filtro ajustaram-se bem a uma recta como previa a equação de Stern-Volmer. De facto, tanto o coeficiente de correlação é elevado como o intervalo de confiança da ordenada na origem (95%) inclui sempre a unidade. Por outro lado a ordem de grandeza das constantes K_{SV} obtidas para a amostra de AF em estudo são da mesma ordem de grandeza das obtidas para outras substâncias húmicas [1] – entre 1×10^3 e $9 \times 10^4 \text{ L kg}^{-1}$.

A comparação das constantes de associação obtidas permite verificar que o carbofurano terá uma maior tendência para se associar com os AF do que o carbarilo. Uma tendência semelhante tinha sido anteriormente observada [1]. Por outro lado, verifica-se que os metabolitos do carbarilo apresentam associações quantitativamente semelhantes ao carbarilo, todos com constantes de associação da ordem dos $7 \times 10^3 \text{ L kg}^{-1}$. No caso do carbofurano, o hidroxicarbofurano ($1,07 \times 10^4 \text{ L kg}^{-1}$) apresenta uma associação ligeiramente inferior ao carbofurano ($4,90 \times 10^4 \text{ L kg}^{-1}$) mas ligeiramente superior ao carbarilo e seus metabolitos.

Em termos absolutos os valores dos K_{SV} obtidos são relativamente elevados pelo que se deve estar na presença de um mecanismo de extinção da fluorescência do tipo estático. De facto, como se discutiu na secção 2.2.3.5 e 2.3, uma constante de Stern-Volmer com esta grandeza para os AF só poderá corresponder a um mecanismo desse tipo.

Tabela 5.1 - Parâmetros típicos do ajuste da equação de Stern-Volmer aos dados de extinção de fluorescência.*

Pesticida	K_{SV}	$\log K_{SV}$	oo	R
carbarilo	$7,20 \times 10^3 \pm 0,82 \times 10^3$	3,85	$0,98 \pm 0,02$	0,963
1-naftol	$6,79 \times 10^3 \pm 2,06 \times 10^3$	3,83	$0,91 \pm 0,06$	0,803
2-isopropoxifenol	$9,17 \times 10^3 \pm 0,98 \times 10^3$	3,96	$0,94 \pm 0,03$	0,957
carbofurano	$4,90 \times 10^4 \pm 0,38 \times 10^4$	4,69	$0,85 \pm 0,08$	0,982
3-hidroxicarbofurano	$1,07 \times 10^4 \pm 0,31 \times 10^4$	4,03	$1,20 \pm 0,09$	0,842

* K_{SV} – Constante de Stern-Volmer \pm desvio padrão

oo – ordenada na origem \pm desvio padrão

R – Coeficiente de correlação

5.6 – CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste capítulo mostram que os AF se associam com o carbarilo e carbofurano e, pelo menos, alguns dos seus metabolitos. Este resultado é suportado pela obtenção de uma constante de Stern-Volmer para um mecanismo estático.

No que diz respeito ao procedimento experimental e de cálculo implementado e utilizado neste trabalho pode-se concluir da sua validade e utilidade em face dos resultados obtidos. Nomeadamente, o modelo de correcção dos efeitos de filtro conseguiu corrigir os desvios observados na intensidade de fluorescência causados pela elevada absorvância da solução de AF. A linearidade das representações de Stern-Volmer suporta, também, o sucesso da aplicação do referido modelo de correcção dos efeitos de filtro.

5.7 – BIBLIOGRAFIA

1. F. Fang, S. Kanan, H.H. Patterson e C.S. Cronan, *Anal. Chim. Acta*, 373 (1998) 139.

6 – INTERACÇÃO DE PESTICIDAS CARBAMATOS COM AF MEDIDOS COM MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

6.1 – INTRODUÇÃO

Neste capítulo será estudada a interação dos pesticidas carbamatos carbarilo e carbofurano com os AF utilizando uma metodologia baseada nas extrações sólido/solução aquosa e solução aquosa/ solvente orgânico. Esta metodologia é utilizada para determinar a solubilidade em soluções aquosas.

Apresentam-se os valores das solubilidades do carbarilo e carbofurano nas seguintes soluções aquosas: água, soluções de sais inorgânicos e soluções de AF. Comparam-se os resultados obtidos neste capítulo com os obtidos no capítulo anterior.

6.2 – ESTUDO DA SOLUBILIDADE DO CARBARILO EM ÁGUA, SOLUÇÕES AQUOSAS DE AF E SOLUÇÕES AQUOSAS DE SAIS INORGÂNICOS

6.2.1 – Calibração do Carbarilo em clorofórmio

Na Fig. 6.1 mostram-se espectros de UV-Vis típicos de calibração dos padrões de carbarilo em clorofórmio, verificando-se um aumento da absorvância proporcional ao aumento da concentração dos padrões.

Na Fig. 6.2, mostra-se uma curva de calibração de carbarilo em clorofórmio, na qual se representa graficamente o máximo de absorvância (a 282 nm) em função da concentração de carbarilo. A análise dos parâmetros do ajuste linear da curva de calibração permite concluir da sua validade para a determinação da concentração de carbarilo.

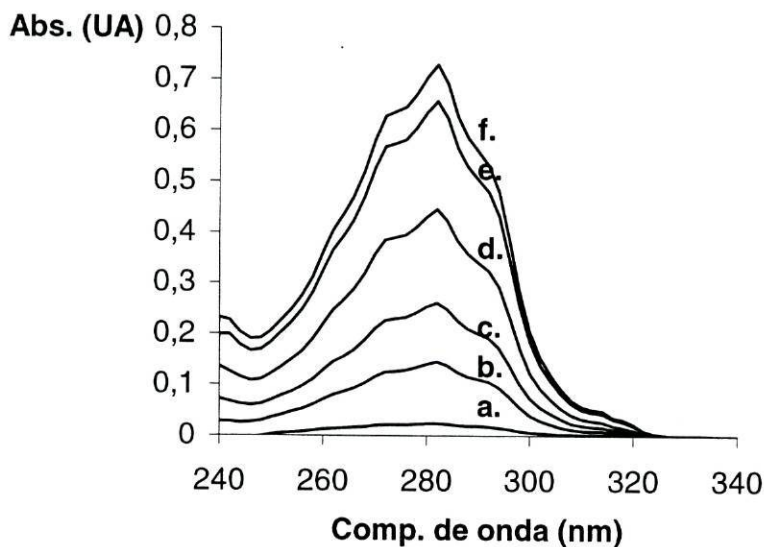


Fig. 6.1 - Sobreposição dos espectros de UV-Vis dos padrões de carbarilo em clorofórmio: 10 ppm (a), 50 ppm (b), 100 ppm (c), 180 ppm (d), 250 ppm (e) e 300 ppm (f).

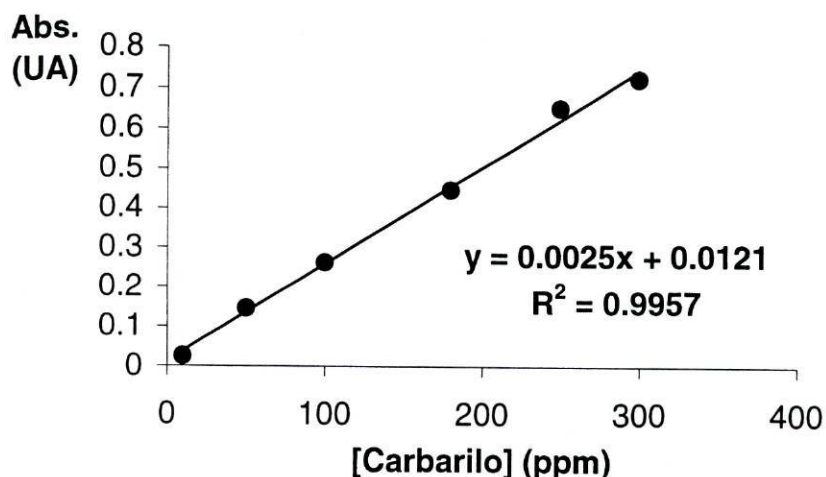


Fig. 6.2 - Curva de calibração típica do carbarilo em clorofórmio e respectivos parâmetros do ajuste linear.

6.2.2 – Solubilidade do Carbarilo em água

O cálculo da solubilidade do carbarilo em água foi efectuado utilizando extracções sólido/água e água/clorofórmio. O resultado obtido foi de $2,36 \times 10^{-4} \pm 0,15 \times 10^{-4}$ M (ou, $47,5 \pm 3,1$ ppm), resultante da média de 18 ensaios independentes efectuados em 3 séries de experiências realizadas em dois dias diferentes. Este resultado é da mesma ordem de grandeza de outros valores de solubilidade do carbarilo em água a 25 °C existentes na bibliografia: $2,48 \times 10^{-4}$ M (ou 50 ppm, a 20° C) [1]; e, $1,99 \times 10^{-4}$ M (ou 40 ppm, a 30° C) [2,3,4]. Também, existem outras referências que apresentam solubilidades de cerca de $5,96 \times 10^{-4}$ M (ou 120 ppm) a 30 °C [5] ou 20-25 °C [6]. Neste contexto, e atendendo à baixa solubilidade do carbarilo em água, o resultado obtido poderá ser considerado bastante razoável o que demonstra a validade da metodologia baseada na extração com clorofórmio.

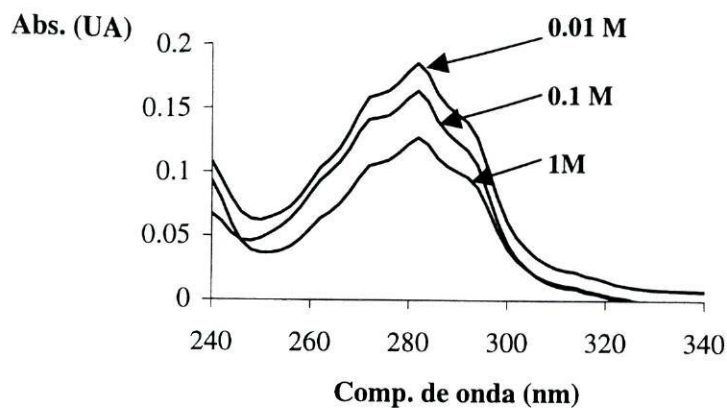
6.2.3 – Efeito de sais inorgânicos na solubilidade do carbarilo em água

Na Fig. 6.3 mostram-se dois exemplos do efeito de sais na solubilidade do carbarilo em água. Concretamente, na Fig. 6.3.a e 6.3.b apresentam-se em cada uma três espectros de UV-Vis correspondentes a três concentrações de nitrato de potássio e cloreto de sódio, respectivamente. A análise destas figuras mostra uma diminuição da banda devida ao carbarilo (máximo da banda a 282 nm) com o aumento da concentração dos sais.

Para se efectuar uma análise mais pormenorizada do efeito dos dois sais estudados apresenta-se na Fig. 6.4 a representação da solubilidade do carbarilo em função da concentração dos sais. Na Tabela 6.1 mostram-se os valores da solubilidade de carbarilo em soluções aquosas dos diferentes sais inorgânicos e na Tabela 6.2 a ANOVA do efeito da força iónica.

Como se pode verificar da análise da Fig. 6.4 e da Tabela 6.1, é evidente uma diminuição do valor da solubilidade com o aumento da concentração dos sais em solução, verificando-se para valores de maior concentração uma maior variação dos valores da solubilidade para cada tipo de ião. Tal constatação é confirmada através da análise da ANOVA. Na Tabela 6.2 avalia-se o efeito do aumento da concentração dos sais na diminuição da solubilidade do carbarilo, concluindo-se que para cada um dos sais o efeito é significativo (Valor de F consideravelmente superior a $F_{crit.}$). Da análise da Fig. 6.4 podemos concluir que a diminuição da solubilidade do carbarilo nas soluções dos dois sais se deve fundamentalmente a um efeito de força iónica (e não a um efeito do tipo de sal inorgânico). Esta variação corresponde a um efeito de “salting out” descrito atrás na secção 2.2.1.

a.



b.

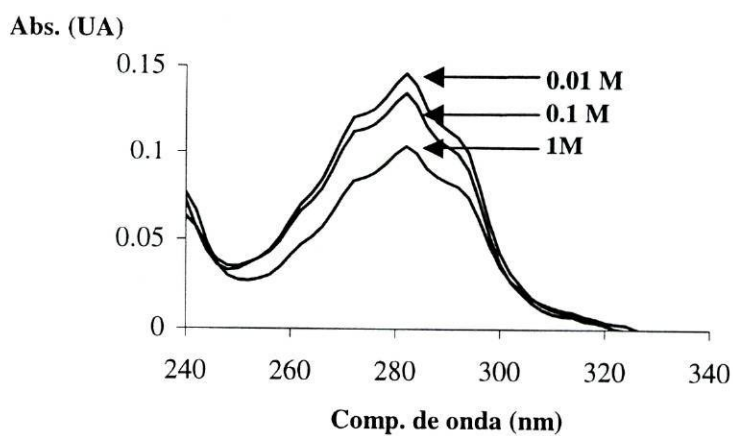


Fig 6.3 - Sobreposição dos espectros UV-Vis da banda de carbarilo para três concentrações de KNO_3 (a.) e NaCl (b.).

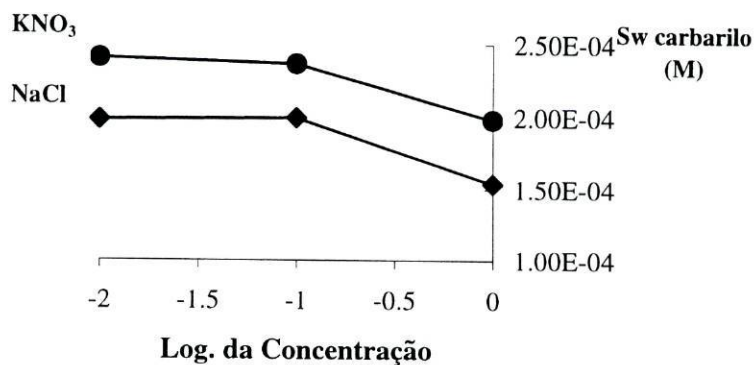


Fig. 6.4 - Efeito dos sais inorgânicos na solubilidade de carbarilo em água.

Tabela 6.1 - Solubilidade de carbarilo em soluções aquosas de sais inorgânicos a 25 °C ⁽¹⁾.

Sais inorgânicos	Concentração (M)		
	0,01	0,1	1
KNO₃	48,4 (1,4)	47,6 (1,2)	39,9 (1,0)
NaCl	39,9 (3,0)	40,2 (0,6)	31,0 (1,8)

(1) Valores médios e desvio padrão entre parêntesis de 3 ensaios independentes.

$S_w = 47,5 \pm 3,1$ ppm resultante da média de 18 ensaios independentes.

Tabela 6.2 – ANOVA para estudo do efeito da concentração dos sais na solubilidade de carbarilo a 25 °C.

Origem da variação	Nº de graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F
KNO₃				
Entre os grupos	2	133	66,5	43,23
Dentro dos grupos	6	9,23	1,54	
NaCl				
Entre os grupos	2	166	83,0	19,89
Dentro dos grupos	6	25,1	4,18	
				F crit = 5,143

6.2.4 – Efeito de AF na solubilidade do carbarilo em água

Na Fig. 6.5 mostra-se um exemplo do efeito de AF na solubilidade do carbarilo em água. Concretamente, nesta figura, apresentam-se cinco espectros de UV-Vis do carbarilo correspondentes a cinco concentrações de AF. A análise desta figura mostra uma diminuição da banda devida ao carbarilo (máximo da banda a 282 nm) com o aumento da concentração dos AF. Como se pode observar, essa diminuição não é muito evidente e é progressivamente menos acentuada à medida que a concentração de AF aumenta. Esta última observação é compatível com a Fig. 6.6 - representação da solubilidade do carbarilo em função da concentração dos AF. Na Tabela 6.3 mostram-se os valores da solubilidade de carbarilo em soluções aquosas com diferentes concentrações de AF e na Tabela 6.4 a ANOVA do efeito da concentração de AF na solubilidade do carbarilo.

Como se pode verificar da análise da Fig. 6.6 e da Tabela 6.3, há uma ligeira diminuição do valor da solubilidade aparente com o aumento da concentração dos AF. Para concentrações mais baixas de AF existe uma diminuição mais significativa do que para maiores concentrações. No entanto, em termos absolutos, a diminuição observada não parece ser muito significativa. De facto, os resultados da ANOVA (Tabela 6.4) permitem verificar que o efeito da concentração de AF na solubilidade será relativamente pouco significativo (Valor de F apenas ligeiramente superior a F_{crit}).

Se a interação entre o carbarilo e os AF seguisse um modelo de partição (secção 2.2.2, eq. 2.29) esperava-se um aumento da solubilidade aparente com a concentração de AF. De facto, este tipo de variação não foi observado.

Esta limitação do modelo de partição pode-se ficar a dever à relativamente elevada solubilidade do carbarilo em água – o modelo de partição foi desenvolvido para substâncias relativamente pouco solúveis [7,8]. De facto, quando a solubilidade de uma substância é relativamente elevada a sua concentração na solução saturada é, também, relativamente elevada. Por outro lado, quanto maior a solubilidade de uma substância menor a sua afinidade pelos sítios apolares dos AF, pelo que a quantidade da substância que está associada às moléculas de AF é relativamente pequena. Assim, a solubilidade aparente (concentração total da substância em solução = substância livre aquosa + associada aos AF) não será significativamente afectada pela quantidade associada aos AF (substância livre aquosa \gg associada aos AF).

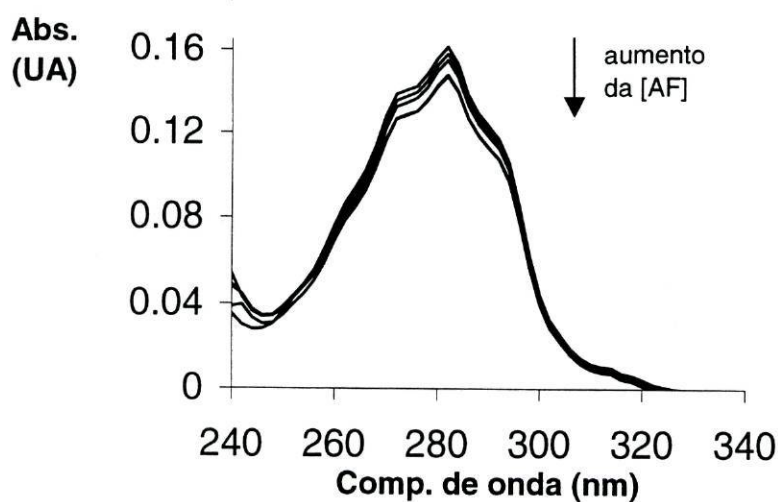


Fig 6.5 – Sobreposição dos espectros de UV-Vis típicos da banda do carbarilo para cinco concentrações de AF: 20 ppm, 40 ppm, 80 ppm, 120 ppm e 160 ppm.

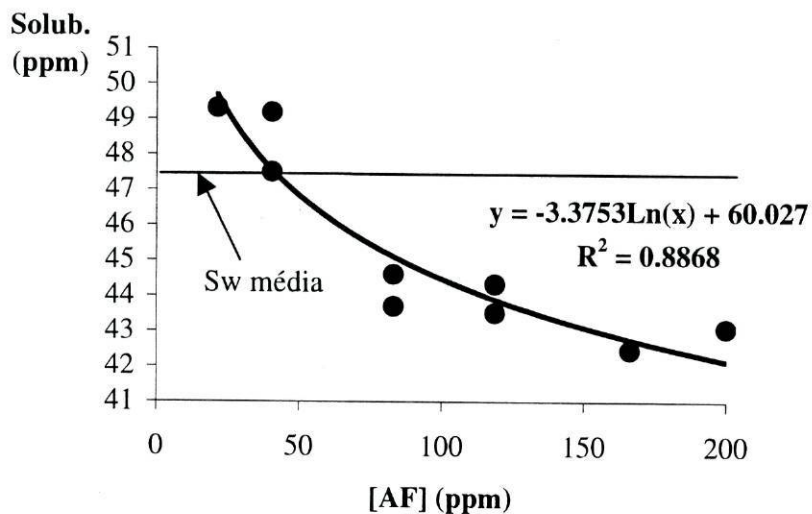


Fig. 6.6 – Variação da solubilidade aparente do carbarilo em água com a concentração de AF presentes e respectivos parâmetros do ajuste logarítmico. A seta indica o valor médio (de 18 ensaios independentes) da solubilidade do carbarilo na água pura.

Tabela 6.3 – Solubilidade aparente do carbarilo em soluções aquosas de AF a 25 °C expressa em ppm ⁽¹⁾.

Concentração (mg/L)					
20	40	80	120	160	200
49,3	48,3	44,2	43,9	42,5	43,1
(1,2)	(1,8)	(2,9)	(2,4)	(4,8)	(1,1)

⁽¹⁾ Valores médios e desvio padrão entre parêntesis de 6 ensaios independentes.

$S_w = 47,5 \pm 3,1$ ppm resultante da média de 18 ensaios independentes.

Tabela 6.4 – ANOVA para estudo do efeito da concentração dos AF na solubilidade do carbarilo a 25 °C.

Origem da variação	Nº de graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F
Entre os grupos	11	251	22,8	3,56
Dentro dos grupos	24	154	6,41	

F crit = 2,22

A variação observada na solubilidade aparente do carbarilo em função da concentração de AF tem uma tendência semelhante à observada com a força iónica, ou seja uma ligeira diminuição de solubilidade com o aumento da força iónica (os AF a pH neutro são polielectrólitos que contribuem para a força iónica do meio). Deste modo, e no que diz respeito à solubilidade do carbarilo em água, o factor força iónica parece ser o mais importante.

6.3 – ESTUDO DA SOLUBILIDADE DE CARBOFURANO EM ÁGUA E EM SOLUÇÕES AQUOSAS DE AF

6.3.1 – Calibração do carbofurano em ciclohexano hidratado

Na Fig. 6.7 mostra-se uma sobreposição dos espectros típicos de emissão de fluorescência molecular (excitação a 280 nm) dos padrões de carbofurano em ciclohexano hidratado verificando-se um aumento na intensidade de fluorescência proporcional ao aumento da concentração dos padrões.

Na Fig. 6.8 mostra-se uma curva de calibração do carbofurano em ciclohexano hidratado, na qual se representa graficamente a intensidade da emissão de fluorescência [comprimento de onda do máximo do espectro de emissão (com excitação a 280 nm) = 307 nm] em função da concentração de carbofurano. A análise dos parâmetros do ajuste linear da curva de calibração permite concluir da sua validade para a determinação da concentração de carbofurano.

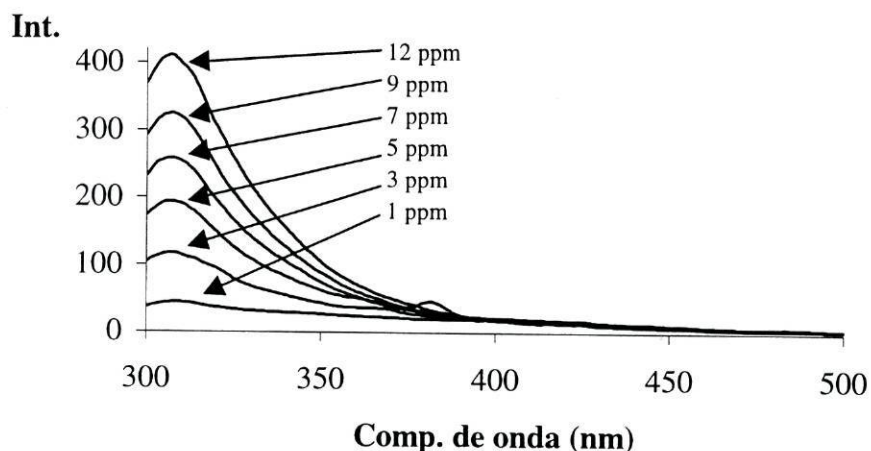


Fig. 6.7 - Sobreposição dos espectros típicos de emissão de fluorescência molecular dos padrões de carbofurano em ciclohexano hidratado usados na calibração.

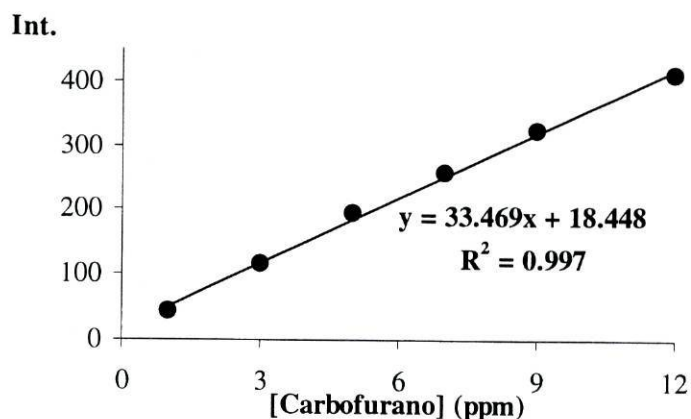


Fig. 6.8 - Curva de calibração típica do carbofurano em ciclohexano e respectivos parâmetros do ajuste linear.

6.3.2 – Solubilidade de carbofurano em água

O cálculo da solubilidade do carbofurano em água foi efectuada utilizando extracções sólido/água e água/ciclohexano. O resultado obtido foi de $1,49 \times 10^{-3} \pm 0,06 \times 10^{-3}$ M (330 ± 13 ppm), resultante da média de 6 ensaios independentes efectuados numa série de experiências. Este resultado é idêntico ao valor de solubilidade do carbofurano em água a 25 °C existente na bibliografia [6,9] ($1,45 \times 10^{-3}$ M ou 320 ppm), o que mostra que a metodologia usada é válida.

6.3.3 – Efeito de AF na solubilidade do carbofurano em água

Na Fig. 6.9 mostra-se um exemplo do efeito de AF na solubilidade do carbofurano em água. Concretamente, apresentam-se quatro espectros de emissão de fluorescência molecular do carbofurano correspondentes a quatro concentrações de AF. Na Tabela 6.5 apresentam-se os resultados das solubilidades aparentes na presença de AF. A análise da Fig. 6.9 mostra uma pequena diminuição da banda devida ao carbofurano (máximo da banda a 307 nm) com o aumento da concentração dos AF. Essa variação não é muito evidente, o que se traduz por uma quase coincidência dos espectros.

Para se efectuar uma análise mais pormenorizada do efeito dos AF estudados, apresenta-se na Fig. 6.10 a representação gráfica da solubilidade do carbofurano em função da concentração dos AF (Tabela 6.5) e na Tabela 6.6 a ANOVA do efeito da concentração de AF. Como se pode verificar pela análise desses resultados (Fig. 6.10 e Tabela 6.5), existe um aumento do valor da solubilidade aparente com o aumento da concentração dos AF para as mais baixas concentrações de AF, mas para concentrações superiores a cerca de 60 ppm, o efeito é inverso. No entanto, esta variação mostrou ser pouco significativa na gama de concentrações de AF utilizada - ANOVA do efeito da concentração de AF (Tabela 6.6) indica um efeito muito pouco significativo (F ligeiramente superior a $F_{crit.}$).

O resultado obtido para o carbofurano é qualitativamente semelhante ao observado atrás para o carbarilo. Assim, também para o carbofurano não se observa uma associação do tipo partição devido à sua relativamente grande solubilidade em solução aquosa. Também, o factor força iónica parece ser o factor mais importante na variação da solubilidade aparente do carbofurano em água na presença de AF.

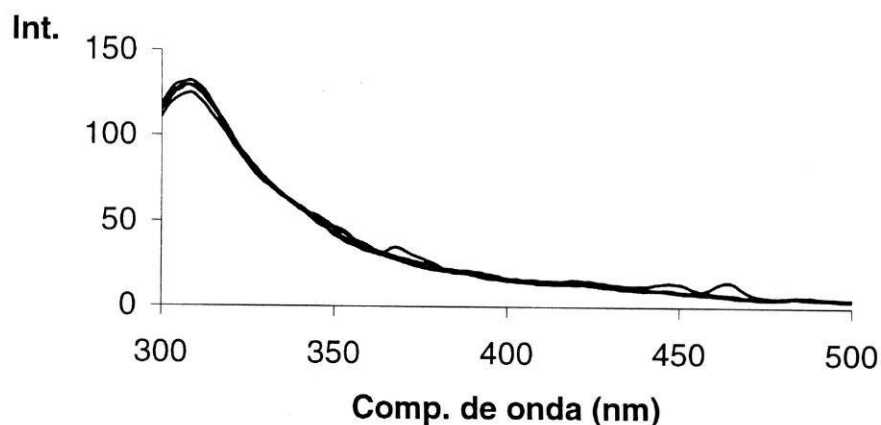


Fig 6.9 - Sobreposição dos espectros de emissão de fluorescência molecular do carbofurano para quatro concentrações de AF: 20 ppm, 50 ppm, 70 ppm e 100 ppm.

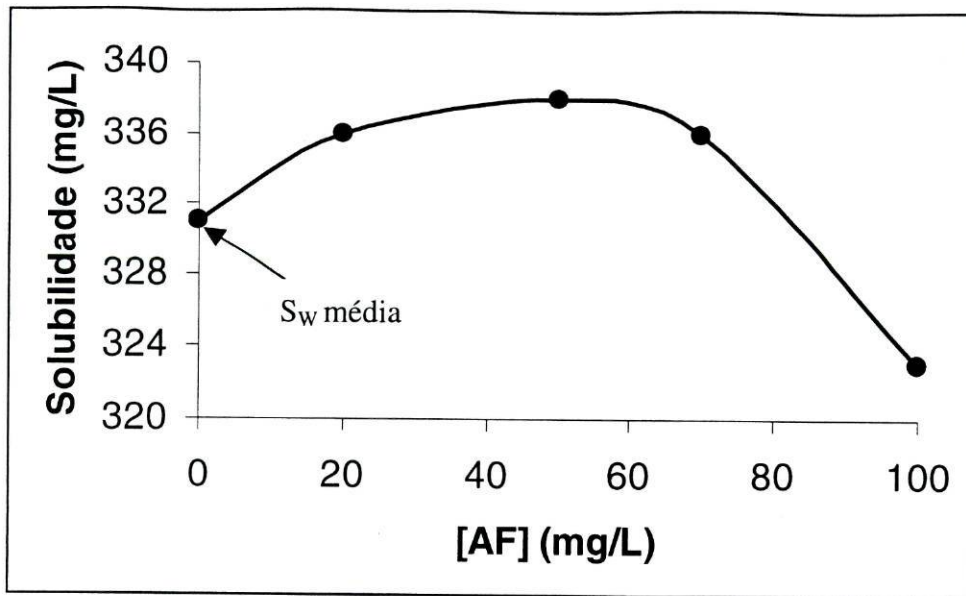


Fig. 6.10 – Efeito dos ácidos fúlvicos na solubilidade do carbofurano em água.

Tabela 6.5 – Solubilidade do carbofurano em soluções aquosas de AF a 25 °C expressa em ppm ⁽¹⁾.

Concentração (mg/L)			
20	50	70	100
336	338	336	323
(6)	(4)	(2)	(2)

⁽¹⁾ Valores médios e desvio padrão entre parêntesis de 3 ensaios independentes.

$S_w = 330 \pm 13$ ppm resultante da média de seis resultados independentes.

Tabela 6.6 – ANOVA para estudo do efeito da concentração dos AF na solubilidade de carbofurano a 25 °C.

Origem da variação	Nº de graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	Valor de F
Entre os grupos	4	454	114	4,61
Dentro dos grupos	10	246	24,6	

F crit = 3,48

6.4 – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM OS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E DE EXTINÇÃO DE FLUORESCÊNCIA

Ao contrário do que se tinha observado no capítulo anterior, os resultados obtidos com os métodos de extração não permitiram verificar uma interação significativa entre o carbarilo e o carbofurano e a amostra de AF estudados. As medições de solubilidade com métodos de extração também não permitiram confirmar uma associação crescente com o aumento da concentração de AF.

As diferenças que se observam nestes dois conjuntos de resultados podem traduzir dois factores:

(i) Por um lado a associação entre os dois carbamatos e os AF é relativamente fraca da qual resulta uma quantidade relativamente pequena (quando comparada com a solubilidade em água) de carbarilo e carbofurano associada às moléculas de AF. Deste modo, embora haja associação entre os carbamatos e os AF, o aumento de solubilidade aparente não é significativo.

(ii) Por outro lado, as metodologias de extração utilizadas neste capítulo contêm um aspecto cinético da associação entre os carbamatos e os AF. Note-se, que nas técnicas que medem a extinção de fluorescência as observações experimentais são efectuadas directamente na mistura de AF e carbamatos. As diferenças observadas entre os resultados deste capítulo e do anterior poderão estar relacionadas com a labilidade dos “complexos” formados entre os AF e os carbamatos. No entanto, não parece existir uma relação evidente entre uma eventual labilidade dos complexos formados e os resultados observados.

6.5 – CONCLUSÕES

A metodologia implementada neste trabalho para a determinação da solubilidade do carbarilo em água [extração sólido (carbarilo)/ líquido (solução aquosa) + extração líquido (solução aquosa)/líquido (clorofórmio)] mostrou ser um instrumento eficaz para a determinação da solubilidade do carbarilo e carbofurano.

No que diz respeito ao efeito de sais inorgânicos e AF na solubilidade em água do carbarilo e carbofurano observa-se um efeito geral de “salting out”. No caso concreto dos AF, o resultado obtido mostra que quando a solução aquosa está saturada com o carbamato, a percentagem que se liga aos AF é muito pequena, pelo que macroscopicamente o efeito não específico da força iónica é o factor predominante na sua solubilidade.

6.6 - BIBLIOGRAFIA

1. <http://www.nccnsw.org.au/member/tec/projects/tcye/tox/Carbaryl.html> (27-09-2000).
2. <http://chrom.tutms.tut.ac.jp/JINNO/PESDATA/03carbaryl.html> (27-09-2000).
3. “Saishin nouyaku data book”, 1989 (Pesticide data book revised edition, Soft Science, Tokyo, 1989).
4. R. P. Maas, S. A. Dressing, J. Spooner, M. D. Smolen, F. J. Humenik, Best Management Practices for Agricultural Nonpoint Source Control – IV. Pesticides, United States Environmental Protection Agency, North Carolina (1984) Cap. 2.
5. The Merck Index, 11 Edition, Merck & Co., Inc, Rahway, N.J., USA (1989).
6. D. Barceló e M.-C. Hennion, Trace Determination of Pesticides and Their Degradation Products in Water, The Netherlands (1997) Cap. 1.
7. C.J.S. Oliveira, Caracterização de Ácidos Fúlvicos extraídos de Resíduos Reciclados para Atividades Agrícolas, Tese de Doutorado, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto (2000).
8. M.C.P.O. Marques, Interação de Ácidos Fúlvicos com Pentaclorofenol e Pireno: Metodologias para a Análise Rápida de Clorofenóis e Hidrocarbonetos Poliaromáticos, Tese de Mestrado, Departamento de Química, Faculdade de Ciências do Porto (2000).
9. <http://ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/carbofur.htm> (12-01-2001).

7 – CONCLUSÕES

Nesta dissertação estudou-se a associação de uma amostra de AF de um solo com os pesticidas carbamatos carbarilo e carbofurano e os seus metabolitos 1-naftol, 2-isopropoxifenol e 3-hidroxicarbofurano. Para estas cinco substâncias fluorescentes foi observado um mecanismo de associação estática, ou seja a formação de uma espécie mais ou menos estável [pesticida-AF].

No entanto, uma análise global dos resultados obtidos neste trabalho permite concluir que, no caso do carbarilo e carbofurano, a quantidade destes carbamatos que se associam aos AF será pouco significativa quando comparada com a sua solubilidade em água. Por este motivo, o papel dos AF na solubilização dos carbarilo e carbofurano nos solos poderá estar limitado a um efeito não específico de variação da força iónica juntamente com os sais dissolvidos na solução do solo. Deste modo, prevê-se que todas as substâncias que contribuam para um aumento da força iónica contribuam para a diminuição da solubilidade do carbarilo e carbofurano na solução dos solos.

Os resultados obtidos quanto às propriedades de fluorescência em estado estacionário dos carbamatos e seus metabolitos, permitem concluir que uma análise directa por fluorescência molecular de soluções aquosas será difícil, porque essas substâncias são muito pouco fluorescentes em água e apresentam propriedades de fluorescência semelhantes. Por este motivo, terá que se optar por uma metodologia de extracção, e eventual concentração, de amostras ambientais antes de se efectuarem análises quantitativas por fluorescência molecular. As técnicas quimiométricas de análise de conjuntos de MEE poderão ter um papel importante no desenvolvimento de metodologias de análise química robustas de pesticidas carbamatos fluorescentes.