

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E DA CAPACIDADE DE
BIOSSORÇÃO DA GRAMA BATATAIS (*Paspalum notatum*)
VISANDO APLICAÇÕES ANALÍTICAS**

GEÓRGIA CHRISTINA LABUTO ARAÚJO*

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTOR EM CIÊNCIAS (área de
concentração: QUÍMICA ANALÍTICA)**

Orientadora: Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira

*** Bolsista FAPESP e CAPES**

SÃO CARLOS – SP

2004

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

A663aq

Araújo, Geórgia Christina Labuto.

Avaliação química e da capacidade de bioissorção da grama batatais (*Paspalum notatum*) / Geórgia Christina Labuto Araújo. -- São Carlos : UFSCar, 2004.

172 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Química analítica. 2. Preparação de amostras (Química analítica). 3. Microondas. 4. Bioissorção. 5. Parede celular vegetal. I. Título.

CDD: 543 (20^a)

E do que é feita a nossa vida senão de momentos compartilhados das vidas de outras pessoas? Mesmo quando estamos sós temos conosco as impressões que outros nos causaram. Tenho tido, muito mais, boas impressões. Fruto das almas dos que me ofereceram a dignidade de partilhar de seus momentos. A essas almas, muitas incluídas em meus agradecimentos, profiro os meus mais profundos desejos na poesia de Drummond.

Desejo

Carlos Drummond de Andrade

Desejo a você...

Fruto do mato

Cheiro de jardim

Namoro no portão

Domingo sem chuva

Segunda sem mau humor

Sábado com seu amor

Filme do Carlitos

Chope com amigos

Crônica de Rubem Braga

Viver sem inimigos

Filme antigo na TV

Ter uma pessoa especial

E que ela goste de você

Música de Tom com letra de Chico

Franco caipira em pensão do interior

Ouvir uma palavra amável

Ter uma surpresa agradável

Ver a Banda passar

Noite de lua Cheia

Rever uma velha amizade

Ter fé em Deus

Não ter que ouvir a palavra não

Nem nunca, nem jamais e adeus.

Rir como criança

Ouvir canto de passarinho

Sarar de resfriado

Escrever um poema de Amor

Que nunca será rasgado

Formar um par ideal

Tomar banho de cachoeira

Pegar um bronzeador legal

Aprender uma nova canção

Esperar alguém na estação

Queijo com goiabada

Pôr-do-Sol na roça

Uma festa

Um violão

Uma seresta

Recordar um amor antigo

Ter um ombro sempre amigo

Bater palmas de alegria

Uma tarde amena

Calçar um velho chinelo

Sentar numa velha poltrona

Tocar violão para alguém

Ouvir a chuva no telhado

Vinho branco

Bolero de Ravel...

E muito carinho meu.

À minha mãezinha Maria de Lourdes pelo amor e exemplos de vida, perseverança e responsabilidade em tudo que faz.

Ao Décio por àquele dia, à beira-mar, ao pôr do sol...

AGRADECIMENTOS

Ao amado Criador pelas oportunidades de crescimento e aprendizado.

À Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira por sua orientação, amizade e ensinamentos nesses 6 anos de convívio fraterno. Que perdurem!

Ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega, pela amizade, sugestões, disponibilidade e principalmente por ter acreditado em mim e me recebido no GAIA.

À Prof^a. Dra. Helena Freitas pela orientação, apoio e recepção afável em seu grupo de pesquisas no Departamento de Botânica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

À Prof^a. Dra. Teresa Batista e a Dra. Teresa Amaral (Dep. Farmácia da Universidade de Coimbra) pela amizade, carinho e presteza com que me receberam e pelas análises de açúcares.

Ao Prof. Dr. Armando Cristóvão (Dep. Bioquímica da Universidade de Coimbra) pela simpatia, horas dedicadas e pelas análises de aminoácidos.

Ao Prof. Dr. Joaquim Vicente pela gentileza e auxílio no isolamento da parede celular.

Ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira pela amizade, análise e explicações didáticas dos espectros de RMN.

Ao Dr. Luiz Alberto Rocha Batista, da Embrapa Pecuária Sudeste pelas sugestões no projeto de pesquisa e disponibilização de amostras para o trabalho.

À minha amiga Elma N. V. Carrillo pela empatia desde o primeiro momento e pelas longas e indispensáveis discussões sobre meu trabalho.

Ao Sherlan G. Lemos por sempre estar presente, mesmo quando estávamos longe, no auxílio nos estudos de titulação potenciométrica e na amenização das saudades dos amigos.

Aos especiais e insubstituíveis amigos do GAIA e aos agregados do grupo o meu profundo agradecimento. Aos que se foram, aos que chegaram e aos que permanecem, pelo esforço de união, cooperação, profissionalismo, amizade e relacionamento familiar. Longevidade ao grupo e felicidades à todos!

À Erika Buscardo por ser minha amiga-irmã, sempre ao meu lado em Portugal; à Cristina Nabais (Kiki) e Susana Gonçalves pela amizade e por compartilharem comigo os problemas, colaborando sempre com as soluções; à Susana Rodriguez pelas horas de suas noites esperando que eu terminasse meu trabalho. Vocês são inesquecíveis!

Aos funcionários e amigos do Departamento de Botânica da Universidade de Coimbra que me receberam como se há muito me conhecessem, Maria João, Lourdes, Lena, Felipe, Luis (zootecnia), Prof. Xavier, Ana, Ana Águas, Profª Dra. Tereza Gonçalves e Carloto (também pelo apoio no trabalho) uma palavra exclusiva da língua portuguesa: Saudades!

À todos os meus colegas do ballet, do coral São Carlos, da evangelização e do Luz e Caridade pelos momentos de descontração.

Aos professores do DQ/UFSCar que contribuíram na minha formação e aos funcionários, especialmente às secretárias da pós-graduação pela prestatividade.

Aos funcionários da EMBRAPA Pecuária Sudeste em especial ao Sr. Nésio por cuidar do canteiro de minhas plantinhas.

Ao Sr. Décio, Cleide, Ieie, Priscila, Adriano, Juninho, Má, Dona Cida, Seu Zé pelos momentos familiares.

À minha mãe Maria de Lourdes Labuto pela vida, pelo amor incondicional e por suportar a ausência, encontrando ainda forças para incentivar-me.

Às minhas irmãs-amigas queridas, Miriã e Elizabeth, por me amarem e sempre me apoiarem. Amo muito vocês e lhes desejo toda a felicidade que é permitida nesse planeta.

Ao Décio, pelo companheirismo, colaboração, incentivo, amizade e amor que me fortalecem.

Ao meu pai.

Ao Jolie pelas alegrias.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar, pela oportunidade oferecida.

À Empresa Brasileira de Agropecuária por ceder espaço e recursos para realização desse trabalho.

À FAPESP e à CAPES pelas bolsas concedidas.

À todos meus mais sinceros agradecimentos.

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 –	Programa utilizado para cominuição das amostras por moagem criogênica.....	14
TABELA 2.2 –	Variações de temperatura e pressão para estabelecimento do programa de aquecimento para digestão de material foliar.....	15
TABELA 2.3 –	Programa de aquecimento para digestão das amostras estudadas em microondas com frascos fechados, (programa desenvolvido para 10 amostras).....	15
TABELA 2.4 –	Parâmetros operacionais empregados para determinação elementar em ICP OES com visão axial para amostras de material foliar.....	17
TABELA 2.5 –	Teores de carbono residual em amostras de <i>P. notatum</i> digeridas com 2 mL de soluções de HNO ₃ com adição de 1 mL de H ₂ O ₂ . Valores médios para amostras digeridas com as diferentes misturas oxidantes estudadas (n = 3).....	21
TABELA 2.6 –	Teores de analitos de interesse (mg kg ⁻¹) em amostras digeridas com 2 mL of HNO ₃ 2 mol L ⁻¹ e 1 mL of H ₂ O ₂ 30 % v v ⁻¹ , n = 3.....	29
TABELA 3.1 –	Programa utilizado para cominuição do material radicular por moagem criogênica.....	47
TABELA 3.2 –	Combinação dos parâmetros experimentais para estabelecimento do procedimento de lixiviação dos elementos presentes originalmente no material radicular.....	48
TABELA 3.3 –	Parâmetros operacionais empregados para determinação elementar em ICP OES com visão radial para sobrenadantes do estudo de sorção em batelada e em sistema em fluxo.....	50
TABELA 3.4 –	Volumes recolhidos nos estudos de sorção em sistema em fluxo.....	52
TABELA 3.5 –	Programa de aquecimento para digestão de material radicular de <i>P. notatum</i> empregando forno de microondas Multiwave (Anton Paar), programa para 6 amostras.....	53

TABELA 3.6 –	Teores de elementos de interesse (mg Kg^{-1}) presentes na amostra de material radicular não lixiviado, $n=3$	54
TABELA 3.7 –	Teores de elementos de interesse (mg Kg^{-1}) presentes na amostra de material radicular lixiviado com 5 alíquotas de 10 mL de solução de HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$, $n=3$	62
TABELA 3.8 –	Parâmetros teóricos obtidos através da aplicação de modelos de isothermas sobre os dados experimentais para a sorção de Cu^{2+} em material radicular lixiviado e não lixiviado a pH 6,5 e meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	74
TABELA 3.9 –	Parâmetros teóricos obtidos através da aplicação de modelos de isothermas sobre os dados experimentais para a sorção de Ni^{2+} em material radicular lixiviado e não lixiviado a pH 6,5 e meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	77
TABELA 3.10 –	Parâmetros teóricos obtidos através da aplicação de modelos de isothermas sobre os dados experimentais para a sorção de Al^{3+} em material radicular lixiviado e não lixiviado a pH 6,5 e meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	79
TABELA 3.11 –	Parâmetros teóricos obtidos através da aplicação de modelos de isothermas sobre os dados experimentais para a sorção de Fe^{3+} em material radicular lixiviado e não lixiviado a pH 6,5 e meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	82
TABELA 3.12 –	Constantes de termodinâmicas de formação para complexos formados à partir dos íons Cu^{2+} , Ni^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , H_3CCOO^- . Dados apresentados para a temperatura de 25°C	87
TABELA 3.13 –	Parâmetros teóricos obtidos através da aplicação de modelos de isothermas sobre os dados experimentais para a sorção de Cu^{2+} a pH 6,5 em meio KNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	88
TABELA 3.14 –	Parâmetros teóricos obtidos através da aplicação de modelos de isothermas sobre os dados experimentais para a sorção de Ni^{2+} a pH 6,5 em meio KNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	89
TABELA 3.15 –	Parâmetros teóricos obtidos através da aplicação de modelos de isothermas sobre os dados experimentais para a sorção de Al^{3+} a pH 6,5 em meio KNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	91

TABELA 3.16 –	Parâmetros teóricos obtidos através da aplicação de modelos de isotermas sobre os dados experimentais para a sorção de Fe^{3+} a pH 6,5 em meio KNO_3 0,5 mol L^{-1}	93
TABELA 3.17 –	Capacidades máximas de sorção em mmol g^{-1} para os analitos estudados, em diferentes meios e soluções mono e multielementares.....	94
TABELA 3.18 –	Teores (%) de Cu, Ni, Al e Fe desorvidos para os diferentes meios em relação aos teores sorvidos, n=3.....	97
TABELA 4.1 –	Funções de alguns nutrientes inorgânicos em plantas (RAVEN <i>et al.</i> , 1996).....	103
TABELA 4.2 –	Principais componentes das paredes primária e secundária de células vegetais (REID, 1997 e DEY <i>et al.</i> , 1997).....	106
TABELA 4.3 –	Unidades de nucleotídeos de açúcares formadores de pectinas e hemiceluloses (REID, 1997).....	107
TABELA 4.4 –	Diâmetros comparativos entre poros presentes nas raízes de milho e íons hidratados, (adaptado de MARSCHNER, 1986).....	107
TABELA 4.5 –	Solução nutriente para cultivo de <i>Paspalum notatum</i> em canteiro de areia.....	111
TABELA 4.6 –	Programa utilizado para rompimento da parede celular do material radicular jovem por moagem criogênica.....	119
TABELA 4.7 –	Etapas de extração seqüencial dos componentes da parede celular e os principais componentes extraídos (CHANG <i>et al.</i> , 1999).....	121
TABELA 4.8 –	Programa de aquecimento para digestão de resíduos do procedimento de extração seqüencial de componentes da parede celular empregando forno de microondas Multiwave (Anton Paar), programa para 6 amostras.....	124
TABELA 4.9 –	Programas de aquecimento estabelecidos para determinação de Cu e Ni por GF AAS em meio ácido (HNO_3 0,14 mol L^{-1}) sem uso de modificador químico. Volume de solução: 15 μL	124

TABELA 4.10 –	Parâmetros operacionais empregados para determinação de Al e Fe por ICP OES com visão axial.....	125
TABELA 4.11 –	Resultados da caracterização dos sítios ácido-base do material radicular não lixiviado e lixiviado por titulação ácido-base.....	137
TABELA 4.12 –	Teores certificados recuperados para materiais de referência digeridos com o mesmo procedimento empregado para resíduos da extração seqüencial (mg g^{-1}), $n = 3$	139
TABELA 4.13 –	Aminoácidos encontrados nas diferentes amostras de material radicular.....	144
TABELA 4.14 –	Correlação metais \times aminoácidos para material não lixiviado. Em negrito as correlações significativas.....	148
TABELA 4.15 –	Correlação metais \times aminoácidos para material radicular lixiviado. Em negrito as correlações significativas.....	151
TABELA 4.16 –	Correlação metais \times aminoácidos para material radicular jovem. Em negrito as correlações significativas.....	154
TABELA 4.17 –	Açúcares encontrados nas diferentes amostras de material radicular.....	156
TABELA 4.18 –	Correlação metais \times açúcares para material radicular não lixiviado. Em negrito as correlações significativas.....	157
TABELA 4.19 –	Correlação metais \times açúcares para material radicular lixiviado. Em negrito as correlações significativas.....	157
TABELA 4.20 –	Correlação metais \times açúcares para material radicular jovem. Em negrito as correlações significativas.....	158
TABELA 4.21 –	Classificação de Pearson para os analitos e grupos ligantes envolvidos nesse trabalho (COTTON & WILKINSON, 1988)..	159

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 –	Visualização do sistema radicular fasciculado da espécie <i>P. notatum</i>	2
FIGURA 1.2 –	Distribuição mundial de <i>Paspalum</i>	3
FIGURA 1.3 –	Visão das sementes de uma inflorescência de <i>Paspalum</i>	3
FIGURA 2.1 –	Conjunto de moagem do moinho criogênico (a) amostra, (b) barra metálica de impacto, (c) tubo de policarbonato e (d) tampas de aço inoxidável.....	14
FIGURA 2.2 –	Perfis das curvas de temperatura e pressão monitoradas no estudo para estabelecimento do programa de digestão de amostras de material foliar.....	16
FIGURA 2.3 –	Perfil da variação da pressão e da temperatura durante o procedimento de digestão de material foliar de <i>Paspalum</i> com diferentes misturas oxidantes.....	20
FIGURA 2.4 –	Teores residuais de HNO ₃ nas amostras de <i>P. notatum</i> digeridas com soluções de diferentes concentrações, (n=3)...	22
FIGURA 2.5 –	Visão total dos espectros de NMR de ¹ H para os resíduos de material foliar de <i>P. notatum</i> digeridos com solução 2 e 14 mol L ⁻¹ de HNO ₃ . 1) Sinal do pentafluorbenzaldeído; 2) região correspondente aromáticos; 3) Sinal intenso presente em todos os espectros, provavelmente referente a nitrocompostos alifáticos; 4) sinal da água não pré-saturado; 5) região de hidrogênios carbinólicos; 6) sinal do solvente (CD ₃ OD); 7) região alifática.....	23
FIGURA 2.6 –	Espectros de ¹ H NMR dos resíduos de <i>P. notatum</i> digeridos com diferentes concentrações de HNO ₃ para a região δ 7.0-10.5 ppm.....	25
FIGURA 2.7 –	Espectros de ¹ H NMR dos resíduos de <i>P. notatum</i> digeridos com diferentes concentrações de HNO ₃ para a região δ 0.5-3.0 ppm.....	26

FIGURA 2.8 –	Espectros de NMR ^1H dos resíduos de <i>P. notatum</i> digeridos com diferentes concentrações de HNO_3 para a região δ 4.0-4,7 ppm.....	27
FIGURA 3.1 –	Classificação dos mecanismos de bioissorção: (a) quanto à dependência do metabolismo celular, (b) quanto à localização do metal retido. Destaque em cinza para os mecanismos relacionados com bioissorção em materiais mortos (VEGLIO & BEOLCHINI, 1997).....	33
FIGURA 3.2 –	Visão geral da aplicação de materiais biológicos e suas características na aplicação para sorção de elementos químicos (MADRID & CÁMARA, 1997).....	36
FIGURA 3.3 –	Teores de Al lixiviados por soluções de HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$ e HCl $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ nos experimentos com alíquota única, em diferentes temperaturas e tempos de exposição, $n = 3$	55
FIGURA 3.4 –	Teores de Fe lixiviados por soluções de HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$ e HCl $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ nos experimentos com alíquota única, em diferentes temperaturas e tempos de exposição, $n = 3$	56
FIGURA 3.5 –	Teores de Cu lixiviados por soluções de HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$ e HCl $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ nos experimentos com alíquota única, em diferentes temperaturas e tempos de exposição, $n = 3$	56
FIGURA 3.6 –	Teores de Al lixiviados por soluções de HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$ e HCl $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ nos experimentos com 3 alíquotas, em diferentes temperaturas e tempos de exposição, $n = 3$	57
FIGURA 3.7 –	Teores de Fe lixiviados por soluções de HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$ e HCl $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ nos experimentos com 3 alíquotas, em diferentes temperaturas e tempos de exposição, $n = 3$	58
FIGURA 3.8 –	Teores de Cu lixiviados por soluções de HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$ e HCl $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ nos experimentos com 3 alíquotas, em diferentes temperaturas e tempos de exposição, $n = 3$	59
FIGURA 3.9 –	Teores de Na lixiviados por soluções de HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$ e HCl $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ nos experimentos com 3 alíquotas, em diferentes temperaturas e tempos de exposição, $n = 3$	60

FIGURA 3.10 –	Teores de Ca lixiviados por soluções de HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$ e HCl $0,12 \text{ mol L}^{-1}$ nos experimentos com 3 alíquotas, em diferentes temperaturas e tempos de exposição, $n = 3$	61
FIGURA 3.11 –	Perfil das curvas de sorção K^+ em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$	63
FIGURA 3.12 –	Perfil das curvas de sorção Na^+ em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$	64
FIGURA 3.13 –	Perfil das curvas de sorção Mg^{2+} em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$	64
FIGURA 3.14 –	Perfil das curvas de sorção Ca^{2+} em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$	65
FIGURA 3.15 –	Perfil das curvas de sorção Mn^{2+} em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$	65
FIGURA 3.16 –	Perfil das curvas de sorção Cd^{2+} em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$	66
FIGURA 3.17 –	Perfil das curvas de sorção Co^{2+} em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$	66

FIGURA 3.18 –	Perfil das curvas de sorção Ni^{2+} em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$	67
FIGURA 3.19 –	Perfil das curvas de sorção Zn^{2+} em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$	67
FIGURA 3.20 –	Perfil das curvas de sorção Cu^{2+} em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$	68
FIGURA 3.21 –	Perfil das curvas de sorção Fe^{3+} em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$	69
FIGURA 3.22 –	Perfil das curvas de sorção Al^{3+} em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$	70
FIGURA 3.23 –	Cinética de sorção para espécies iônica de Al^{3+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} em suspensão de material radicular de <i>P. notatum</i> lixiviado $2,5 \text{ g mL}^{-1}$ em solução multielementar a pH 6,5; $n = 3$	72
FIGURA 3.24 –	Linearização, segundo o modelo de Freundlich, para sorção de Cu^{2+} em material radicular lixiviado e não lixiviado em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	75
FIGURA 3.25 –	Isotermas e modelos teóricos de melhor ajuste para a sorção de Cu^{2+} em material radicular lixiviado e não lixiviado, empregando solução monoelementar a pH 6,5 e meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	76

FIGURA 3.26 – Linearização, segundo o modelo de Langmuir, para sorção de Ni^{2+} em material radicular lixiviado e não lixiviado em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	77
FIGURA 3.27 – Isotermas e modelos teóricos de melhor ajuste para a sorção de Ni^{2+} em material radicular lixiviado e não lixiviado, empregando solução monoelementar a pH 6,5 e meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	78
FIGURA 3.28 – Isotermas e modelos teóricos de melhor ajuste para a sorção de Al^{3+} em material radicular lixiviado e não lixiviado, empregando solução monoelementar a pH 6,5 e meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	80
FIGURA 3.29 – Linearização, segundo o modelo de Langmuir, para sorção de Al^{3+} em material radicular lixiviado e não lixiviado em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	80
FIGURA 3.30 – Linearização, segundo o modelo de Freundlich, para sorção de Al^{3+} em material radicular lixiviado e não lixiviado em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	81
FIGURA 3.31 – Linearização, segundo o modelo de Freundlich, para sorção de Fe^{3+} em material radicular lixiviado e não lixiviado em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	83
FIGURA 3.32 – Linearização, segundo o modelo de Languimuir, para sorção de Fe^{3+} em material radicular lixiviado e não lixiviado em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	84
FIGURA 3.33 – Isotermas e modelos teóricos de melhor ajuste para a sorção de Fe^{3+} em material radicular lixiviado e não lixiviado, empregando solução monoelementar a pH 6,5 e meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	85
FIGURA 3.34 – Isotermas e modelos teóricos de melhor ajuste para a sorção de Cu^{2+} a pH 6,5 nos meios KNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	88
FIGURA 3.35 – Linearização, segundo o modelo de Langmuir, para sorção de Ni^{2+} em material radicular lixiviado em meio KNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$	89

FIGURA 3.36 –	Isotermas e modelos teóricos de melhor ajuste para a sorção de Ni^{2+} a pH 6,5 nos meios KNO_3 0,5 mol L^{-1} e $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ 0,5 mol L^{-1}	90
FIGURA 3.37 –	Linearização, segundo o modelo de Freundlich, para sorção de Al^{3+} em material radicular lixiviado em meio KNO_3 0,5 mol L^{-1}	91
FIGURA 3.38 –	Isotermas e modelos teóricos de melhor ajuste para a sorção de Al^{3+} a pH 6,5 nos meios KNO_3 0,5 mol L^{-1} e $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ 0,5 mol L^{-1}	92
FIGURA 3.39 –	Isotermas e modelos teóricos de melhor ajuste para a sorção de Fe^{3+} a pH 6,5 nos meios KNO_3 0,5 mol L^{-1} e $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ 0,5 mol L^{-1}	93
FIGURA 3.40 –	Perfis comparativos para isotermas de sorção obtidas com soluções mono e multielementar em meio KNO_3 0,5 mol L^{-1} , $n = 3$	95
FIGURA 3.41 –	Perfis comparativos para isotermas de sorção obtidas com soluções mono e multielementar em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ 0,5 mol L^{-1} , $n = 3$	96
FIGURA 4.1 –	Diagrama ilustrando uma raiz primária e suas estruturas. (RAVEN <i>et al</i> , 1996).....	101
FIGURA 4.2 –	Diagrama apresentando o desenvolvimento relativo do sistema radicular de plantas de aveia (<i>Avena sativa</i>), (a) 31, (b) 45 e (c) 80 dias após o plantio.....	101
FIGURA 4.3 –	Micrografia da presença de endomicorrizas <i>Glomus versiforme</i> (estruturas ovais, escuras) em associação com as raízes de alho porró (<i>Allium porrum</i>), (RAVEN <i>et al</i> , 1996).....	102
FIGURA 4.4 –	Representação da das estruturas dos polissacarídeos constituintes da parede celular e localização desses constituintes na parede celular primária (DEY <i>et al.</i> , 1997).....	106
FIGURA 4.5 –	Fluxograma apresentando o número de amostras empregado para a extração seqüencial dos componentes da parede celular e a seqüência de reagentes extratores.....	121

FIGURA 4.6 –	(I) esquema do recipiente de amostras dentro do frasco do forno microondas com cavidade, (II) corte transversal do recipiente de amostras.....	123
FIGURA 4.7 –	Distribuição de tamanho de partículas para material radicular de <i>P. notatum</i> moído duas vezes em moinho criogênico.....	129
FIGURA 4.8 –	Micrografia de varredura eletrônica de material radicular de <i>P. notatum</i> moída duas vezes, aumento de 1000 vezes.....	130
FIGURA 4.9 –	Micrografia de varredura eletrônica com visão das paredes celulares das células vegetais, aumento de 1000 vezes.....	131
FIGURA 4.10 –	Micrografia de varredura eletrônica da parede celular ampliada com visão de poros de comunicação, aumento de 3000 vezes.....	131
FIGURA 4.11 –	Micrografia de varredura eletrônica apresentando microorganismo encontrado na amostra de raiz de <i>P. notatum</i> , aumento de 3000 vezes.....	132
FIGURA 4.12 –	Espectros Espectros de ^1H NMR do material radicular de <i>P. notatum</i> não lixiviado e lixiviado para a região δ 5,4-1,5 ppm.....	133
FIGURA 4.13 –	Gráficos das titulações potenciométricas das suspensões do material radicular não lixiviado e lixiviado.....	136
FIGURA 4.14 –	Cobre nas diferentes frações da extração seqüencial dos componentes da parede celular de material radicular não lixiviado, lixiviado e jovem, n=3.....	140
FIGURA 4.15 –	Níquel nas diferentes frações da extração seqüencial dos componentes da parede celular de material radicular não lixiviado, lixiviado e jovem, n=3.....	141
FIGURA 4.16 –	Alumínio nas diferentes frações da extração seqüencial dos componentes da parede celular de material radicular não lixiviado, lixiviado e jovem, n=3.....	142
FIGURA 4.17 –	Ferro nas diferentes frações da extração seqüencial dos componentes da parede celular de material radicular não lixiviado, lixiviado e jovem, n=3.....	143

FIGURA 4.18 – Proporção e distribuição de aminoácidos e metais determinados em cada fração da parede celular de material radicular não lixiviado.....	147
FIGURA 4.19 – Proporção e distribuição de aminoácidos e metais determinados em cada fração da parede celular de material radicular lixiviado.....	150
FIGURA 4.20 – Proporção e distribuição de aminoácidos e metais determinados em cada fração da parede celular de material radicular jovem.....	153
FIGURA 4.21 – Placa de Kieselgur G com aplicações de amostras de material radicular hidrolisadas e devidamente revelada.....	155

ACRÔNIMOS

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

GF AAS – Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (do inglês Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry)

ICP OES – Espectrometria de Emissão Ótica Acoplado a Plasma Induzido (do inglês Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry)

MW – Microondas (do inglês Microwave)

NIST – Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês National Institute of Standards and Technology)

PTFE – Politetrafluoretileno (do inglês Polytetrafluorethylene)

SRM – Material de Referência Certificado (do inglês Standard Reference Material)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (em inglês High Pressure Liquid Chromatography)

TLC – Cromatografia Líquida em camada delgada (do inglês Thin Liquid Chromatography)

NMR – Ressonância magnética nuclear (do inglês Nuclear Magnetic Resonance)

FID – Indução livre de decaimento (do inglês Free Induction Decay)

HR/MAS – Alta Resolução no Anglo Mágico de Giro (do inglês High Resolution Magic Angle Spinning)

RESUMO

AVALIAÇÃO QUÍMICA E DA CAPACIDADE DE BIOSSORÇÃO DA GRAMA BATATAIS (*Paspalum notatum*) VISANDO APLICAÇÕES ANALÍTICAS. Este trabalho propõe a caracterização química do gênero *Paspalum* e, para tanto foi dividido em 3 etapas: 1) preparo de amostras vegetais com ácido diluídos; 2) estudos de bioissorção empregando material radicular de *Paspalum notatum* e 3) investigação de constituintes da parede celular do material radicular. Assim, para a primeira etapa, foram empregadas soluções de HNO_3 (2 a 14 mol L^{-1}) para a digestão de amostras vegetais assistida por forno de microondas com cavidade. Foram obtidas recuperações quantitativas de analitos, incluindo Fe e Al, empregando-se 2 mL de solução de HNO_3 2 mol L^{-1} e 1 mL de H_2O_2 30 % v v⁻¹. Os teores de carbono residual obtidos foram ≤ 11 %. A análise dos espectros de ^1H NMR indicou menor variedade de nitrocompostos para as amostras preparadas com ácidos diluídos. Para a segunda etapa realizaram-se estudos de sorção em material radicular de *Paspalum notatum* não lixiviado e lixiviado com HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$. Foram obtidas sorções mais elevadas para o material previamente lixiviado. Isotermas de sorção para Al^{3+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ e KNO_3 , com soluções mono e multielementares, foram traçadas, sendo ajustados os modelos teóricos mais representativos dos resultados experimentais. O meio KNO_3 apresentou sorção mais elevada de Fe e Cu para estudos monoelementares do que o meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$, provavelmente à ausência de íons complexantes. Em estudos multielementares a sorção em meio KNO_3 foi reduzida para todos os analitos, provavelmente devido à competição pelos sítios de sorção. Por outro lado, o meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ apresentou o dobro de sorção para Fe e Al, provavelmente em função de interações laterais entre os analitos e à superfície do bioissorvente, fatos verificados a partir do perfil das isotermas de sorção. Na última etapa do trabalho, espectros de ^1H NMR e titulação potenciométrica indicaram que a lixiviação ácida alterou o material. Neste caso, a titulação potenciométrica indicou grupamentos aminos e fenólicos como prováveis sítios de sorção. A determinação de Al, Fe, Cu, Ni, aminoácidos e açúcares nas frações obtidas a partir da extração seqüencial dos componentes da parede celular, aliada a estudos de correlação de Pearson, permitiu evidenciar diferentes distribuições dos analitos nas frações e nos materiais. Assim, os grupos funcionais relacionados a cada metal puderam ser estimados.

ABSTRACT

CHEMICAL AVALIATION AND BIOSORPTION CAPACITY OF BATATAIS GRASS (*Paspalum notatum*) SEEKING ANALITICAL APLICATIONS. This work suggests the chemical characterization of the genus *Paspalum* and was divided in 3 steps: 1) sample preparation of plants with diluted acids; 2) biosorption studies employing *Paspalum notatum* root material, and 3) investigation of root cellular wall constituents. Therefore, in the first step, solutions ranging from 2 to 14 mol L⁻¹ HNO₃ were used to assisted high-pressure microwave plant samples digestion. Quantitative amounts of analytes were obtained, including Fe and Al, by using 2 mL of 2 mol L⁻¹ HNO₃ solution plus 1 mL of H₂O₂ 30 % v v⁻¹. Residual carbon contents were ≤ 11 %. The ¹H NMR spectra indicated lower variety of nitrocompounds for samples digested with diluted acids. For the second step, sorption studies in root material leached and no-leached with 0.14 mol L⁻¹ HNO₃ solution were performed. The sorption obtained for the former was higher than for the latter material. Sorption isotherms of Al³⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ and Ni²⁺ in H₃CCOONH₄ and KNO₃ environments with mono and multielemental solutions were plotted and adjusted to the more representative theoretical models for the experimental results. The KNO₃ monoelemental studies presented higher sorption for Fe and Cu than for H₃CCOONH₄ environment, probably owing to the absence of bounding ions. Sorption has reduced for all analytes in KNO₃ multielemental studies, probably owing to the competition by the sorption sites. In the other hand, H₃CCOONH₄ multielemental studies showed an increasing of two times for Fe and Al sorption, probably due to lateral interactions between the analytes and the biosorbent surfaces, which were verified with sorption isotherm profiles. In the last step, the ¹H NMR spectra and the potentiometric titration indicated that the acid rinsing changed the material. In this case, interpretation of the results obtained with potentiometric titration suggests the amine and phenol groups as likely sorption sites. The determination of Al, Fe, Cu, Ni, aminoacids and sugar in fractions obtained from the sequential extraction of the cell wall compounds, combined to Pearson's correlation coefficient studies, evidenced different distributions of the analytes at the fractions and material. Thus, the functional groups related to each metal could be estimated.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Introdução.....	2
1.2 – Objetivos.....	4
CAPÍTULO 2 – PREPARO DE AMOSTRAS VEGETAIS COM ÁCIDO DILUÍDOS.....	5
2.1 – Revisão bibliográfica.....	6
2.1.1 - Preparo de amostras vegetais.....	6
2.1.1.1 – Considerações sobre HNO ₃ e H ₂ O ₂	9
2.1.2 – Investigação de resíduos de digestão.....	10
2.2 – Materiais e métodos.....	12
2.2.1 – Reagentes e soluções.....	12
2.2.2 – Instrumentação.....	13
2.2.3 – Amostras e materiais de referência certificados.....	13
2.3 – Procedimento Experimental.....	14
2.3.1 – Moagem de material foliar.....	14
2.3.2 – Digestão de material foliar assistida radiação microondas.....	15
2.3.3 – Determinação dos analitos de interesse em material foliar.....	16
2.3.4 – Titulação das soluções finais dos digeridos.....	17
2.3.5 – Determinação dos teores de carbono total nas amostras vegetais.....	18
2.3.6 – Análise de NMR nos resíduos dos digeridos.....	18
2.4 – Resultados e Discussão.....	19
2.4.1 – Digestão de material foliar assistida radiação microondas.....	19
2.4.2 – Titulação das soluções finais dos digeridos.....	21
2.4.3 – Análise de NMR nos resíduos dos digeridos.....	22
2.4.2 – Determinação dos analitos de interesse em material foliar.....	28
2.5 – Conclusões.....	30
CAPÍTULO 3 – ESTUDOS DE BIOSSORÇÃO EMPREGANDO MATERIAL RADICULAR DE PASPALUM NOTATUM.....	31
3.1 – Revisão bibliográfica.....	32
3.1.1 – Contextualização dos termos empregados no trabalho.....	32
3.1.2 – Descrição dos mecanismos de retenção em processos de sorção.....	34

3.1.3 – Uso de substratos biológicos para pré-concentração de elementos químicos.....	35
3.1.4 – Pré-concentração em sistemas radiculares.....	36
3.1.5 – Isotermas de sorção.....	39
3.2 – Materiais e métodos.....	44
3.2.1 – Reagentes e soluções.....	45
3.2.2 – Instrumentação.....	45
3.3 – Procedimento experimental.....	46
3.3.1 – Plantio e coleta de material radicular de <i>P. notatum</i> para estudos de biossorção.....	46
3.3.2 – Moagem do material radicular e das amostras empregados em estudos de biossorção.....	46
3.3.3 – Avaliação do material radicular de <i>P. notatum</i> como biossorvente.....	47
3.3.3.1 – Estudos para estabelecimento do procedimento adequado para lixiviação dos elementos presentes originalmente no material radicular.....	47
3.3.3.2 – Avaliação preliminar do emprego do material radicular para sorção em diferentes pHs em batelada.....	49
3.3.3.3 – Avaliação da cinética de sorção do material radicular.....	50
3.3.3.4 – Avaliação da capacidade de sorção de Cu^{2+} , Ni^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+} em sistema em fluxo.....	51
3.3.4 – Digestão do material radicular para análise por ICP OES.....	53
3.4 – Resultados e discussão.....	54
3.4.1 – Avaliação do material radicular de <i>P. notatum</i> como biossorvente.....	54
3.4.1.1 – Estudos para estabelecimento do procedimento adequado para lixiviação dos elementos presentes originalmente no material radicular.....	54
3.4.1.2 – Avaliação preliminar do emprego do material radicular para sorção em diferentes potenciais hidrogeniônicos em batelada.....	63
3.4.1.3 – Avaliação da cinética de sorção do material radicular.....	71
3.4.1.4 – Avaliação da capacidade de sorção de Al^{3+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} e Cu^{2+} em sistema em fluxo.....	72
3.4.1.4.1 – Influência da lixiviação ácida na sorção de íons metálicos em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$	73
A) Estudos para Cu^{2+}	73

B) Estudos para Ni ²⁺	76
C) Estudos para Al ³⁺	78
D) Estudos para Fe ³⁺	82
3.4.1.4.2 – Investigação da influência de diferentes meios na sorção de Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Al ³⁺ e Fe ³⁺	86
A) Estudos para Cu ²⁺	87
B) Estudos para Ni ²⁺	88
C) Estudos para Al ³⁺	90
D) Estudos para Fe ³⁺	92
3.4.1.4.3 – Efeito do uso de solução multielementar contendo íons Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Al ³⁺ e Fe ³⁺ na sorção desses íons.....	94
3.4.1.4.4 – Dessorção de Cu, Ni, Al e Fe nos diferentes meios estudados.....	96
3.5 – Conclusões.....	98
CAPÍTULO 4 – INVESTIGAÇÃO DE CONSTITUINTES DA PAREDE CELULAR DO MATERIAL RADICULAR.....	99
4.1 – Revisão bibliográfica.....	100
4.1.1 – Características do sistema radicular de plantas da família das Poaceae.....	100
4.1.2 – Absorção de nutrientes inorgânicos.....	102
4.1.3 – A parede celular das raízes.....	105
4.2 – Materiais e métodos.....	111
4.2.1 – Reagentes e soluções.....	111
4.2.1.1 – Cultivo do material radicular jovem de <i>P. notatum</i>	111
4.2.1.2 – Titulação potenciométrica dos sítios de sorção do material radicular....	112
4.2.1.3 – Isolamento e extração seqüencial dos componentes da parede celular.....	112
4.2.1.4 – Determinação de Cu, Ni, Al e Fe nos sobrenadantes e resíduos do procedimento de extração seqüencial dos componentes da parede celular.....	112
4.2.1.5 – Determinação de aminoácidos.....	113
4.2.1.6 – Determinação de açúcares.....	113
4.2.2 – Instrumentação.....	114
4.3 – Procedimento experimental.....	117
4.3.1 – Análise de tamanho de partícula e de área superficial do material	

radicular cominuído.....	117
4.3.2 – Micrografias de varredura eletrônica do material radicular cominuído.....	117
4.3.3 – Análises de NMR do material radicular lixiviado e não lixiviado.....	117
4.3.4 – Titulação potenciométrica dos sítios de sorção do material radicular.....	118
4.3.5 – Investigação dos componentes da parede celular de material radicular jovem (coleta com 21 dias) e maduro (coleta com 120 dias).....	118
4.3.5.1 – Cultivo e coleta do material radicular jovem.....	118
4.3.5.2 – Isolamento da parede celular.....	119
4.3.5.3 – Extração seqüencial dos componentes da parede celular.....	120
4.3.5.4 – Determinação de Cu, Ni, Al e Fe nos sobrenadantes do procedimento de extração seqüencial dos componentes da parede celular.....	122
4.3.5.5 – Determinação de Cu, Ni, Al e Fe nos resíduos do procedimento de extração seqüencial dos componentes da parede celular.....	122
4.3.5.6 – Determinação de aminoácidos nas frações da parede celular.....	125
4.3.5.7 – Determinação de açúcares nas frações da parede celular.....	126
4.4 - Resultados e discussão.....	129
4.4.1 – Análise de tamanho de partícula e de área superficial do material radicular moído.....	129
4.4.2 – Micrografias de varredura eletrônica do material radicular cominuído.....	130
4.4.3 – Análises de NMR do material radicular lixiviado e não lixiviado.....	132
4.4.4 – Titulação potenciométrica dos sítios de sorção do material radicular.....	134
4.4.5 – Investigação dos componentes da parede celular de material radicular jovem (coleta com 21 dias) e maduro (coleta com 120 dias).....	138
4.4.5.1 – Isolamento da parede celular.....	138
4.4.5.2 – Determinação de Cu, Ni, Al e Fe nos resíduos do procedimento de extração seqüencial dos componentes da parede celular.....	138
4.4.5.3 – Correlação dos aminoácidos presentes nas frações do procedimento de extração seqüencial com Cu, Ni, Al e Fe.....	143
4.4.5.4 – Correlação dos açúcares presentes nas frações do procedimento de extração seqüencial com Cu, Ni, Al e Fe.....	155
4.4.5.5 – Aplicação da teoria de Pearson para inferir possíveis concordâncias sobre a correlações obtidas.....	158
4.5 – Conclusões.....	160

CAPÍTULO 5.....	162
5.1 – Referências bibliográficas.....	163

Capítulo 1

Introdução

1.1– Introdução

Espécies do gênero *Paspalum* catalogadas são em torno de 400 e seu *habitat* natural está em regiões de climas quentes, sendo abundantes na América do Sul. Apenas 110 das 220 espécies estimadas no Brasil estão catalogadas no banco de germoplasma da EMBRAPA (ROCHA & NETO, 2000)

Apresentam importância econômica e vêm sendo empregadas e estudadas como forragem nativa para alimentação animal, possuindo grande potencialidade para uso como forrageiras naturais do Brasil, reduzindo, assim, a introdução de espécies invasoras em nosso território. São eficazes na fixação de dunas no litoral e contenção da erosão nas encostas de rodovias, além de serem responsáveis pela alimentação de diversas espécies migratórias de aves (BATISTA & GODOY, 2000; CHASE, 1929; BARRETO & KAPPEL, 1967). Suas raízes são profundas e bastante fasciculadas, como pode ser observado na FIGURA 1.1, raízes de *Paspalum notatum*, podendo chegar a 1 m de profundidade.



FIGURA 1.1 – Visualização do sistema radicular fasciculado da espécie *P. notatum*.

Trata-se de uma planta característica de climas tropicais e subtropicais, como pode ser visualizado na distribuição de *Paspalum* no mapa apresentado na FIGURA 1.2, sendo resistente a geadas (HAKER *et al.*, 1974).



FIGURA 1.2 – Distribuição mundial de *Paspalum*

As espécies do gênero *Paspalum* possuem características específicas que as diferenciam dos demais gêneros de forrageiras. Um exemplo é a forma de suas sementes, planas na parte exterior, como pode ser visto na FIGURA 1.3.



FIGURA 1.3 – Visão das sementes de uma inflorescência de *Paspalum*.

O estado de São Paulo possui grande número das espécies catalogadas de *Paspalum* no Brasil. Porém, diversas espécies ocorrentes ainda não foram registradas, seja por deficiência de coletas específicas ou do estabelecimento de condições básicas para a utilização sustentável dessa biodiversidade, devido à escassez de informações biológicas e químicas sobre este gênero vegetal.

A grande variabilidade genética favorece o melhoramento de seus potenciais em laboratório para implementação, como alimentação, em fazendas de criação de gado, contando com a sua grande adaptabilidade a diferentes tipos de solos.

Frente as possíveis aplicações na pecuária, torna-se necessário o conhecimento dos nutrientes disponíveis nestas espécies. A análise inorgânica é importante para a caracterização deste gênero sendo que, a possibilidade de digestão da amostra com ácidos diluídos apresenta uma série de vantagens econômicas e ambientais.

O trabalho aqui exposto pode ser dividido em três etapas diferenciadas. A primeira trata da avaliação da digestão da parte foliar de diferentes espécies de *Paspalum* com diferentes concentrações ácidas assistida por energia microondas em forno com cavidade.

Devido ao *P. notatum*, conhecido popularmente como grama batatais, adaptar-se a solos extremamente pobres surgiu a hipótese desta espécie apresentar sítios de sorção capazes de pré-concentrar metais presentes no solo, o que caracteriza a segunda etapa do trabalho. Desta forma, estudou-se a sua aplicação como biossorvente para a pré-concentração de metais que estivessem presentes em baixos teores nas amostras digeridas com ácidos diluídos. A terceira e última etapa está relacionada com o fato dos processos de sorção envolverem a disponibilidade de sítios orgânicos. Assim, buscou-se investigar as substâncias presentes na parede celular do material radicular de *P. notatum*.

1.2 – Objetivos

Este trabalho de pesquisa teve como objetivo investigar o preparo de amostras vegetais e as potencialidades químicas do *P. notatum* como biossorvente para aplicação na pré-concentração de analitos. Para tanto, pode-se esmiuçar os objetivos da seguinte forma:

- otimização de procedimentos para preparo de amostras de forrageiras empregando forno de microondas com cavidade, considerando aspectos como massa de amostra, periculosidade, eficiência de decomposição, velocidade do processo e avaliação da utilização de diferentes composições de misturas oxidantes;
- emprego de material biológico como biossorvente na pré-concentração de elementos químicos de interesse presentes em baixas concentrações;
- investigação de sítios orgânicos possivelmente envolvidos na sorção de metais.

Capítulo 2

Preparo de amostras vegetais com ácidos diluídos

2.1 – Revisão bibliográfica

2.1.1 - Preparo de amostras vegetais

Frascos fechados têm sido empregados freqüentemente para o preparo de amostras e um grande número de publicações descreve procedimentos experimentais, sendo na maioria empíricos.

Contudo, são vários os parâmetros relevantes para o preparo de amostras em frascos fechados assistidos por microondas: massa de amostra, diferentes ácidos, volume dos reagentes, concentração das soluções oxidantes envolvidas, temperatura, pressão e tempo de aquecimento. Recentemente, muitos desses parâmetros têm sido avaliados e estudados em tentativas de otimizar e compreender mais profundamente os processos de digestão.

Em relação ao emprego de diferentes ácidos para digestão de amostra, HNO₃ é freqüentemente empregado devido à simplicidade de manipulação, facilidade de purificação e sua eficiência na oxidação de compostos orgânicos de amostras biológicas (WÜRFELS & JACKWERTH, 1985 e 1989-A; STOEPLER & BACKHAUS, 1978; KUBRAKOVA *et al.*, 1999)

KOTZ *et al.* (1972 e 1979) e STOEPLER *et al.* (1979) recomendam o uso de 0,4 a 2,0 ml de HNO₃ para digestão de 200 mg de amostras. WÜRFELS & JACKWERTH, 1985 e JACKWERTH *et al.* (1989) empregaram eficientemente um volume de 2,0 ml de HNO₃ para a digestão de 100 mg de amostras de padrões de compostos orgânicos, controlando somente a temperatura. Soluções diluídas de HNO₃ tem sido empregadas com sucesso na digestão de plantas em procedimentos assistidos por aquecimento microondas, obtendo baixos valores de branco e desvios padrão (WÜRFELS & JACKWERTH, 1985; ZHOU *et al.*, 1996).

MYAZAWA *et al.* (1984-A) empregaram soluções de HNO₃, HCl, HClO₄ e H₂SO₄ em diferentes concentrações (0,5; 1 e 2 mol L⁻¹) para a extração de Ca, Mg, K, P, Mn, Zn, Cu e Fe de amostras de folhas de café, soja e *Panicum maximum* com determinação por FAAS. Neste estudo, as soluções de HCl e HNO₃ 1 mol L⁻¹ apresentaram-se eficientes para procedimentos de extração com objetivo de determinar os elementos analisados, eliminando riscos de explosão e problemas com a precipitação de KClO₄, que pode ocorrer quando HClO₄ é empregado. As exceções foram Fe e P, devido à natureza química destes elementos, que em

plantas estão normalmente associados a silicatos, o que dificulta suas recuperações totais. Para esses dois elementos, os autores sugerem a necessidade de experimentos de calibração ou a aplicação de fatores de correção, estudos estes apresentados por MYAZAWA *et al.* (1984-B) onde propuseram a substituição da mistura digestora nitro-perclórica por HCl 1 mol L⁻¹ no preparo de amostras de folhas de café, girassol, milho, soja e das forrageiras *Panicum maximum*, *Brachiaria decumbens* para a determinação de Ca, Mg, K, Cu, Mn e Zn por FAAS. Os autores destacam a simplificação e a redução dos custos e riscos no preparo da amostra com a possibilidade de recuperação de total para Ca, Mg, K, Mn, Cu e Zn e de 50 % para Fe e 69 % para P.

CHAO *et al.* (1996) estudaram o uso de ácidos diluídos associados à energia microondas para a extração de metais traços de amostras biológicas e determinação por GF AAS. Nesse trabalho, cerca de 300 mg de material de referência certificado (CRM) de folha de maçã (NIST 1515) foram submetidas a 5 mL de HNO₃ diluído sob a ação de microondas. Foram avaliados os efeitos da concentração ácida, da pressão, do tempo de extração e da massa da amostra. Soluções 10 e 14 % v v⁻¹ (1,96 e 1,4 mol L⁻¹, respectivamente) de HNO₃ apresentaram recuperações acima de 95 % dos analitos estudados (Mn, Fe, Mg, Cu) com a aplicação de 100 % da potência nominal do equipamento e pressões em torno de 160 psi.

CHOW *et al.* (1995) utilizaram ácidos diluídos para a extração de Cu, Pb e Hg em amostras vegetais medicinais e material de referência certificado. Cerca de 3 g de amostras foram digeridas com 20 mL de HNO₃ 10 % v v⁻¹, com auxílio de um banho-maria com temperatura fixada em 100 °C por 3 h. Os analitos foram determinados com espectrometria de absorção atômica com chama. Segundo os autores o método se mostrou eficiente e simples, com pouca geração de gases e resultando em soluções finais com acidez inferior a 4 % v v⁻¹, o que minimiza a interferência da solução nas análises e reduz a corrosão do queimador do equipamento.

DUGENEST *et al.* (1998) compararam métodos convencionais para digestão ácida de resíduos de incineração com a digestão com ácidos diluídos em microondas. Os métodos convencionais avaliados foram: 1) fusão e digestão com H₂SO₄/HNO₃/KMNO₄ onde 100 mg de amostra foi fundida em cadinho de platina-ouro-ródio com uma mistura de metaborato de lítio e ácido bórico a 1080 °C por 3 h.

A digestão ácida foi usada para a recuperação de Hg; 2) digestão com HF/HClO₄/HNO₃/H₂O₂, onde 50 ou 100 mg de amostra foram introduzidas em recipiente de PTFE e submetidas a aquecimento em chapa. O método com microondas empregou um equipamento focalizado onde 1 ou 2 g de amostra foram digeridas com HCl ou HNO₃ 2 mol L⁻¹. O programa de aquecimento foi de 15 min com uma potencia de 40 W sendo o volume final ajustado para 50 mL. Os elementos de interesse foram determinados por ICP OES ou espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos e atomização eletrotérmica em forno de grafite (HG-GFAAS). Em suas conclusões relataram que nenhuma técnica foi eficiente para a total solubilização das amostras e que o método empregando microondas apresentou-se rápido, simples, econômico e eficaz para a análise de Zn, Pb, As, Ca, Na e K.

Procedimentos empregando pequenos volumes de ácidos ou ácidos diluídos freqüentemente requerem o emprego de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) como agente oxidante auxiliar. A adição de H₂O₂ em procedimento para digestão de amostras foi investigada por WU *et al.* (1997), que observaram um decréscimo dos teores de carbono residual e da quantidade de resíduos orgânicos remanescentes, quando o volume de H₂O₂ foi elevado. Segundo VESCHETTI *et al.* (2000), o uso de quantidades maiores de H₂O₂ proporcionam um aumento da pressão interna em sistemas fechados e uma maior eficiência de oxidação da matéria orgânica a baixas temperaturas. Contudo, para volumes maiores que 5,0 mL, os teores de carbono residual e de resíduos sólidos permanecem constantes, mostrando que um volume maior não é imprescindível para uma digestão eficiente (WU *et al.*, 1997; VESCHETTI *et al.*, 2000).

Alguns procedimentos recomendam misturas oxidantes na proporção 4:1 v v⁻¹ de HNO₃ (65 %) e H₂O₂ (30 % v v⁻¹); outros mostram que misturas de 2,0 mL de HNO₃ concentrado combinados com 1,0 mL de H₂O₂ são suficientes para digerir 300 mg de amostras biológicas (CARRILHO *et al.*, 2001; DOMBOVARI *et al.*, 2001; EILOLA & PERAMAKI., 2001; LEVINE *et al.* 1999; RODUSHKIN *et al.* 1999).

A possibilidade de redução dos volumes de reagentes é atrativa devido à de minimização da quantidade de resíduos gerados, redução nos custos, obtenção de menores valores de branco e obtenção de digeridos mais apropriados para introdução por nebulizadores em equipamentos de análise.

A eficiente digestão com uso de soluções de ácidos diluídos e a redução dos volumes de H_2O_2 são fatores possibilitados pelo uso de altas pressões e temperaturas em digestão de amostras em sistemas fechados, que proporcionam uma destruição mais completa da matriz da amostra, melhorando a confiança nos resultados (GOUVEIA *et al.*, 2001).

Contudo, o emprego de ácidos diluídos para o preparo de amostras tem se limitado a procedimentos de extração. Assim, nos trabalhos desenvolvidos e apresentados neste trabalho, amostras de diferentes espécies de *Paspalum*, folha de cítrus e de manga e materiais de referencia certificados (CRM) foram submetidas a digestão ácida assistida por microondas em frascos fechados, sendo empregadas diferentes concentrações de HNO_3 e H_2O_2 .

2.1.1.1 – Considerações sobre HNO_3 e H_2O_2

Os reagentes mais freqüentemente utilizados para o preparo de amostras vegetais são o HNO_3 e o H_2O_2 . O HNO_3 é comercializado em soluções concentradas variando entre 65 a 69 % m/v e tem ponto de ebulição em torno de 122 °C. Alguns dos motivos para ampla aplicação do HNO_3 como agente oxidante no preparo de amostras são a pureza com que é encontrado comercialmente, sua fácil purificação, seu poder oxidante e a solubilidade dos nitratos em água (TCSHÖPEL *et al.*, 1980; COTTON & WILKINSON, 1988; KNAPP, 1998; KRUG, 1998).

O HNO_3 concentrado sofre decomposição térmica, podendo gerar diferentes óxidos, sendo todos solúveis em água e com características oxidantes reconhecidas. Porém, sua forma de ação durante a solubilização de uma amostra é pouco conhecida. CODDINGTON *et al.* (1999) realizaram um estudo cinético da decomposição do HNO_3 variando o pH do meio, avaliado entre 6,8 a 9 e identificaram algumas espécies. Outras são descritas por COTTON & WILKINSON (1988), são elas: NO, NO_2 , NO_3^- , N_2O , N_2O_3 , N_2O_4 , N_2O_5 , N_2O_6 , HNO, HNO_2 .

A ação das microondas sobre o HNO_3 acelera a formação desses óxidos, uma vez que o campo eletromagnético gerado promove o aquecimento mais acelerado por interação com as moléculas do HNO_3 . Em um vapor a 100 °C, 90 % está na forma de NO_2 (COTTON & WILKINSON, 1988; KRUG, 1998). Segundo WÜRFELS *et al.* (1987), uma menor concentração de NO_2 na fase líquida diminui a

eficiência de decomposição de amostras orgânicas. O poder oxidante do HNO_3 pode ser aumentado quando combinado com um agente oxidante auxiliar como o H_2O_2 , também disponível comercialmente com pureza relativamente elevada para análise de traços. Segundo KRUG (1998), o peróxido de hidrogênio possui a característica de remover produtos coloridos de soluções de matrizes orgânicas com a vantagem de ter como produto final de decomposição a água.

A quantidade de H_2O_2 a ser empregada no preparo de amostra para eficiente solubilização irá depender da natureza da amostra, massa, temperatura e concentração do peróxido utilizado. MATUSIEWICZ & BARNES (1985) realizaram estudos utilizando H_2O_2 associado a diferentes ácidos, HNO_3 , HF, H_2SO_4 e HClO_4 , no preparo de amostras de celulose em recipientes fechados. A partir dos estudos realizados, recomendaram o uso de H_2O_2 , 30 ou 50 % v/v, para o preparo de amostras e atribuem a redução do tempo ao emprego do peróxido. Obtiveram baixos valores de branco, sendo que a solução resultante pode ser aplicada para análise multielementar.

2.1.2 – Investigação de resíduos de digestão

Em um estudo composto de três partes WÜRFELS & JACKWERTH (1989-A) procederam um estudo sistemático da digestão de padrões de aminoácidos, peptídeos, aminoácidos N-metilados, carboidratos, ácidos graxos e bases nitrogenadas por HNO_3 em sistemas fechado a 200 °C e 25 bar. Foram empregados 2 mL de HNO_3 concentrado a 180 °C por 3 h. Após digestão os teores de carbono residual foram determinados colorimetricamente como CO_2 . Na segunda parte de seu estudo WÜRFELS & JACKWERTH (1989-B) investigaram a composição dos resíduos da digestão dos padrões avaliados empregando as técnicas de infra-vermelho (IR), e ressonância magnética de ^1H e ^{13}C . Em suas discussões a respeito dos possíveis mecanismos de digestão concluem que hidrocarbonetos saturados e mono-insaturados e a maior parte dos aminoácidos que compunham os padrões originais são decompostos com o procedimento de digestão aplicado. Outra conclusão é que ácidos carboxílicos aromáticos são resistentes ao ataque das espécies NO_x^y até 180 °C e associam este fato à impossibilidade de um ataque destes compostos por NO_2^+ nestas condições.

No presente trabalho buscou-se comparar os espectros de NMR dos resíduos de digestões de material foliar de *P. notatum* e associar os deslocamentos químicos com as possíveis classes de compostos presentes.

2.2 – Materiais e métodos

2.2.1 – Reagentes e soluções

Todos os frascos, ponteiras e vidrarias utilizados foram previamente descontaminados em banhos contendo 10 % (v/v) de HNO₃ por 24 horas.

Todos os reagentes utilizados neste estudo foram de grau analítico.

Para preparo das soluções ácidas empregadas na digestão em microondas com cavidade, foi utilizado HNO₃ concentrado (Mallinckrodt, Alemanha) preparado por destilação abaixo do ponto de ebulição com aparato de quartzo, e água destilada-desionizada purificada em sistema Mili-Q[®] (18 MΩ cm, Millipore, EUA). Este mesmo ácido foi utilizado nas decomposições de amostras com ácido concentrado, associado ao uso de H₂O₂ 30 % v v⁻¹ (Mallinckrodt, Alemanha).

Os padrões para construção das curvas analíticas e as soluções de calibração necessárias para análise dos elementos químicos de interesse por ICP OES foram preparados a partir de diluições apropriadas de soluções estoque 1000 mg L⁻¹ (Titrisol[®], Merck, Alemanha).

Uma solução contendo aproximadamente 0,1 mol L⁻¹ de NaOH foi padronizada com hidrogenoftalato de potássio 99,97 % m m⁻¹, pesando-se em triplicata 0,8 g deste sal, dissolvidos individualmente em 25 mL de água. As alíquotas de hidrogenoftalato de potássio foram tituladas e a concentração da solução de NaOH determinada. Após padronizada, a solução de NaOH foi empregada para titulação das amostras submetidas a digestão em microondas com cavidade, com o objetivo de determinar a acidez residual das amostras, após implementação do programa de aquecimento estabelecido.

Para a extração dos resíduos orgânicos restantes nos digeridos foram empregados como extratores éter etílico e clorofórmio (Merck, Alemanha).

A aquisição dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (NMR) de H¹ e C¹³ dos resíduos orgânicos dos digeridos foi realizada empregando-se CD₃OD (metanol deuterado, Aldrich, EUA) com adição de tetrametilsilano (TMS, Aldrich, EUA). Como referência interna para integração dos espectros foi empregado pentafluorbenzaldeído (Aldrich, EUA).

2.2.2 – Instrumentação

Para cominuição das amostras de material foliar foram utilizados moinho de facas TE 048 (Marconi, Brasil), para primeira moagem, e criogênico 6750 Freezer/Mill (Spex CertiPrep, EUA), para redução do tamanho de partícula.

Os procedimentos de digestão de amostras pelas misturas oxidantes foram realizados em forno de microondas modelo ETHOS 1600 (Milestone, Itália), equipado com sensores de pressão e de fibra ótica para monitoramento da temperatura interna dos frascos fechados, manufaturados em PTFE (politetrafluoretileno) modificado.

Para determinação dos analitos de interesse e dos teores de carbono residual em amostras digeridas de material foliar foi empregado ICP OES com visão axial (Vista-AX, Varian, Austrália), sendo determinados os limites de detecção e determinação.

A determinação do carbono original total nas amostras foi realizada em analisador elementar EA 1108 CHNS-O (Fisons Instruments, Itália).

Potenciômetro digital (modelo 355, Metler - Toledo, Inglaterra), equipado com um eletrodo combinado Ag/AgCl, KCl (referência) e vidro (indicador) foi usado para determinação do ponto de equivalência durante as titulações ácido-base dos digeridos.

Análises por ressonância magnética nuclear (NMR) de ^1H e ^{13}C foram realizadas respectivamente nos equipamentos DRX-400, 9.4T e ARX-200, 4.7 T (Bruker, Alemanha).

Todas as medidas e procedimentos foram realizados em triplicata.

2.2.3 – Amostras e materiais de referência certificados

As amostras submetidas a digestão e análise elementar foram: *P. notatum*, *P. regneli*, *P. guenoarum*, *P. glaucensces*, folhas de cítrus e folhas de manga. As duas últimas amostras foram empregadas para investigação do emprego das condições de digestão para diferentes amostras vegetais.

Para avaliação da exatidão foram empregados materiais de referência certificados de farelo de milho e de folha de espinafre (NIST 8433 e NIST 1570a, National Institute of Standards and Technology, EUA).

2.3 – Procedimento Experimental

2.3.1 – Moagem de material foliar

Cerca de 1 g de cada amostra, pré-moída em moinho de facas (com exceção dos materiais de referência certificados), foi moída com resfriamento criogênico para cominuição do tamanho de partícula. A FIGURA 2.1 apresenta esquematicamente o conjunto de moagem onde as amostras foram introduzidas para proceder a cominuição. Após moagem, as amostras foram homogeneizadas e reservadas para os estudos posteriores. A TABELA 2.1 apresenta o programa para moagem criogênica de amostras de material foliar, onde a etapa de moagem foi repetida 3 vezes, alternando-se com uma etapa de resfriamento, totalizando 10 min para cada amostra.

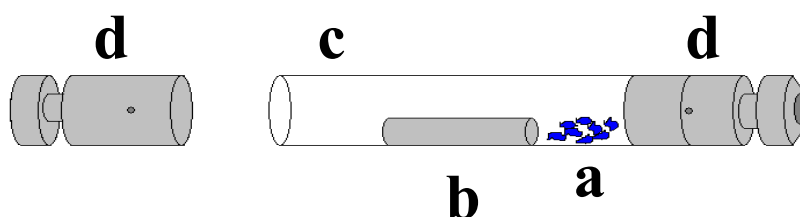


FIGURA 2.1 – Conjunto de moagem do moinho criogênico (a) amostra, (b) barra de impacto de aço inoxidável, (c) tubo de policarbonato e (d) tampas de aço inoxidável.

TABELA 2.1 – Programa utilizado para cominuição das amostras por moagem criogênica.

Etapa	Função	Tempo (min)
1	Pré-congelamento	2
2	Moagem	2
3	Resfriamento	1

2.3.2 – Digestão de material foliar assistida radiação microondas

O programa de microondas para digestão de amostras vegetais foi desenvolvido empregando-se cerca de 250 mg de material foliar, 2 mL de HNO₃ 14 mol L⁻¹ e 1 mL de H₂O₂ 30 % v v⁻¹, a partir da variação da temperatura e da potência de acordo com as combinações apresentadas na TABELA 2.2.

TABELA 2.2 – Variações de temperatura e potência para estabelecimento do programa de aquecimento para digestão de material foliar.

Experimento	Temperatura (°C)	Potência (W)
P1	160/0/240/240/240	250/0/550/650/750
P2	160/0/240/240/240	250/0/350/450/550
P3	100/0/160/200/230	250/0/350/650/750
P4	100/0/160/200/230	250/0/350/450/550
Intermediário (P5)	100, 0, 200, 200, 230	250/0/450/550 /650

A FIGURA 2.2 apresenta os perfis das curvas de temperatura e pressão para os diferentes níveis testados.

Pelos perfis das curvas pôde-se estabelecer como melhor programa de aquecimento a combinação apresentada na TABELA 2.3, onde o sistema de digestão atingiu maiores temperatura e pressão, o que favorece a destruição da matéria orgânica (DANIEL *et al.*, 1998).

TABELA 2.3 – Programa (P1) de aquecimento para digestão das amostras estudadas em microondas com frascos fechados, (programa desenvolvido para 10 amostras).

Etapa	Potência (W)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	250	2	120
2	0	2	120
3	550	4	180
4	650	4	180
5	750	5	240
Ventilação	0	5	

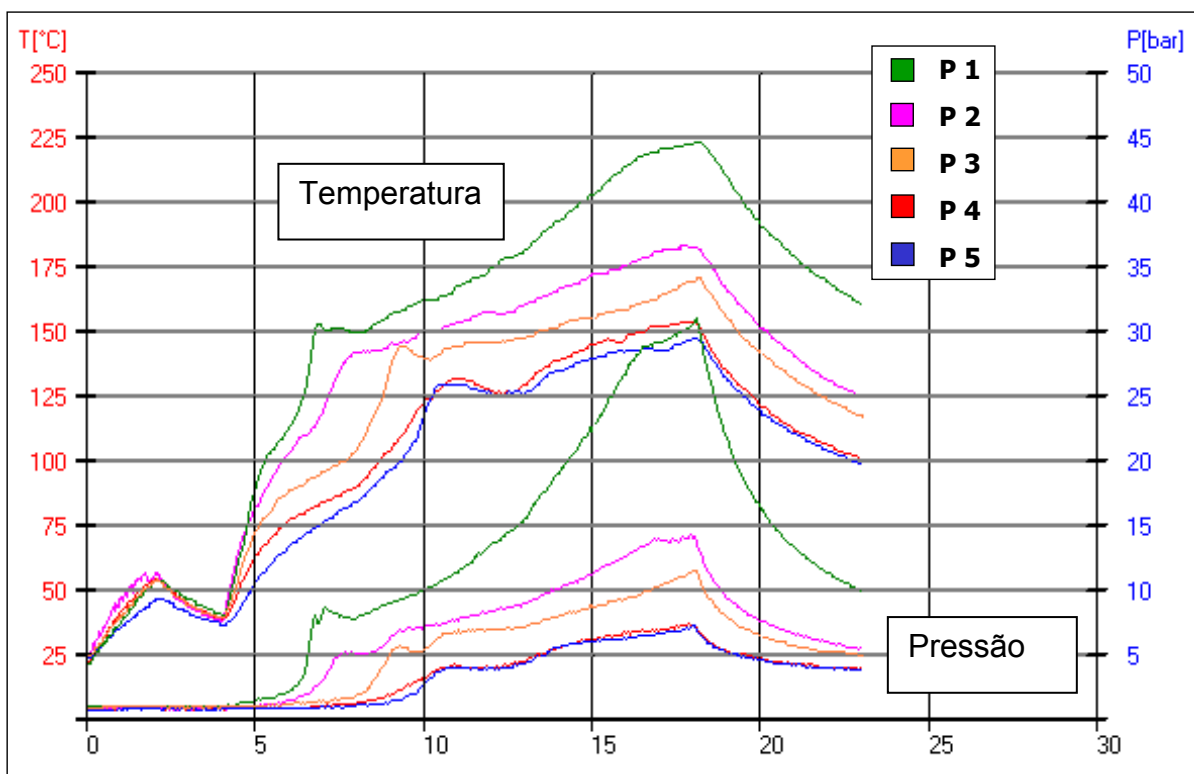


FIGURA 2.2 – Perfis das curvas de temperatura e pressão monitoradas no estudo para estabelecimento do programa de digestão de amostras de material foliar. Potências: P1 e P3 = 250, 0, 550, 650 e 750 W; P2 e P4 = 250, 0, 350, 450 e 550 W; e P5 = 250, 0, 450, 550, 650 W.

Temperaturas: P1 e P2 = 160, 0, 240, 240 e 240 °C e P3 e P4 = 100, 0, 160, 200 e 230; e P5 = 100, 0, 200, 200, 230 °C.

Após o estabelecimento deste programa, cerca de 250 mg de amostras vegetais foram digeridas no forno com radiação microondas e frascos fechados, com auxílio de misturas oxidantes diferentes, contendo 2 mL de HNO_3 14 mol L^{-1} ou das soluções de HNO_3 7,0 mol L^{-1} ; 5,0 mol L^{-1} ; 4,0 mol L^{-1} ; 3,0 mol L^{-1} ou 2,0 mol L^{-1} combinados com 1,0 mL de H_2O_2 30 % v v⁻¹. As amostras resfriadas, tiveram seus volumes elevados para 10 mL com água destilada e desionizada.

2.3.3 – Determinação dos analitos de interesse em material foliar

Os parâmetros operacionais do ICP OES utilizado para determinação dos analitos de interesse estão apresentados na TABELA 2.4.

TABELA 2.4 – Parâmetros operacionais empregados para determinação elementar em ICP OES com visão axial para amostras de material foliar.

Parâmetros instrumentais	ICP OES
Sistema óptico	Echelle
Detector	Sólido CCD (167-785 nm)
Potência (kW)	1,3
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15,0
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,5
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,9
Câmara de nebulização	Ciclone
Nebulizador	Concêntrico
Fluxo de aspiração da amostra (L min ⁻¹)	0,8
Linhas de emissão (nm):	
Ba (II)	455,409
Ca (II)	396,847
Cu (I)	327,396
Fe (II)	238,203
K (I)	766,501
Mg (II)	279,550
Mn (II)	275,611
P (I)	213,618
S (II)	181,972
Zn (II)	202,551
C (I)	193,025

I e II: linhas de emissão atômica e iônicas, respectivamente.

2.3.4 – Titulação das soluções finais dos digeridos

Após digestão e elevação dos volumes das amostras para 10 mL, alíquotas de 1 mL de cada solução final foi retirada e titulada com solução de NaOH 0,1023 mol L⁻¹, previamente padronizada. Para facilitar o procedimento foram acrescentados 10 mL de água às alíquotas tituladas sendo que, uma porção dessa mesma água foi titulada como branco analítico. Empregou-se um potenciômetro

digital com eletrodo combinado de prata/cloreto de prata e eletrodo de vidro como referência para determinação do ponto de equivalência.

2.3.5 – Determinação dos teores de carbono total nas amostras vegetais

A determinação de carbono total foi realizada nas amostras através de análise elementar para posteriormente verificar a eficiência de eliminação da matéria orgânica pela digestão com as diferentes misturas oxidantes.

2.3.6 – Análise de NMR nos resíduos dos digeridos

As soluções resultantes das digestões de amostras de material foliar de *P. notatum* com diferentes concentrações ácidas foram submetidas a extração com solvente para isolamento das substâncias orgânicas solubilizadas. Para tanto, empregou-se uma mistura de 2,5 mL de éter etílico e 2,5 mL de clorofórmio. Após a extração, a fase orgânica isolada foi evaporada em estufa com passagem forçada de ar à temperatura de 40 °C.

Os resíduos sólidos, após secagem, foram recuperados em 0,6 mL de CD₃OD (metanol deuterado) com adição de TMS (tetrametilsilano) como padrão interno.

Todos os espectros de NMR de ¹H foram adquiridos sob as mesmas condições: largura espectral 5910 Hz; 10,5 μs com pulso de 90°; tempo de aquisição 5,5 s; tempo de relaxação 2,0 s; 64 scans. A temperatura foi mantida a 25 °C. Um volume de 0,3 μL pentafluorbenzaldeído foi adicionado a todos os digeridos com a função de referência interna, sendo as áreas dos espectros integradas automaticamente. Todos os espectros de ¹H foram processados usando multiplicação exponencial (LB=1,0 Hz) e zero *filling*.

Os espectros de NMR para ¹³C foram obtidos usando seqüência de pulso PENDANT (HOMER *et al.*, 1994), largura espectral 13513 Hz, tempo de aquisição 1,5 s, tempo de relaxação 1,5 s e 25000 scans.

2.4 – Resultados e Discussão

2.4.1 – Digestão de material foliar assistida por radiação microondas

Reduções nas massas e nos volumes de reagentes empregados no preparo de amostra tem sido experimentados com eficiência (RODUSHKIN, *et al.*, 1999 e ARAÚJO, *et al.*, 2000), contribuindo também para a redução do consumo de reagentes e da geração de resíduos.

O uso de ácidos diluídos auxilia ainda na conservação de componentes de algumas técnicas instrumentais como tubos de grafite pirolítico, nebulizadores, câmaras de nebulização e tochas de ICP OES. Este último componente, por exemplo, quando em configuração axial, dependendo da razão do fluxo de gás do plasma, pode ser rapidamente degradado por cristalização devido à deposição de sais formados por introdução de amostras contendo elevados teores de sólidos dissolvidos. Assim, o preparo de amostra deve se ajustar aos requerimentos da técnica analítica empregada para medida, e soluções ácidas diluídas são uma alternativa atrativa para realizar a digestão de amostras.

Além destes fatos, a água é um solvente extremamente eficiente na conversão de energia microondas em calor. Consequentemente, o emprego de soluções diluídas pode favorecer uma digestão mais completa da amostra (KINGSTON & HASWELL, 1997).

O emprego do mesmo programa de aquecimento e diferentes concentrações de HNO₃ com adição de H₂O₂ para a digestão de amostras de material foliar de *P. notatum* apresentou curvas de temperatura e pressão similares, apresentadas na FIGURA 2.3.

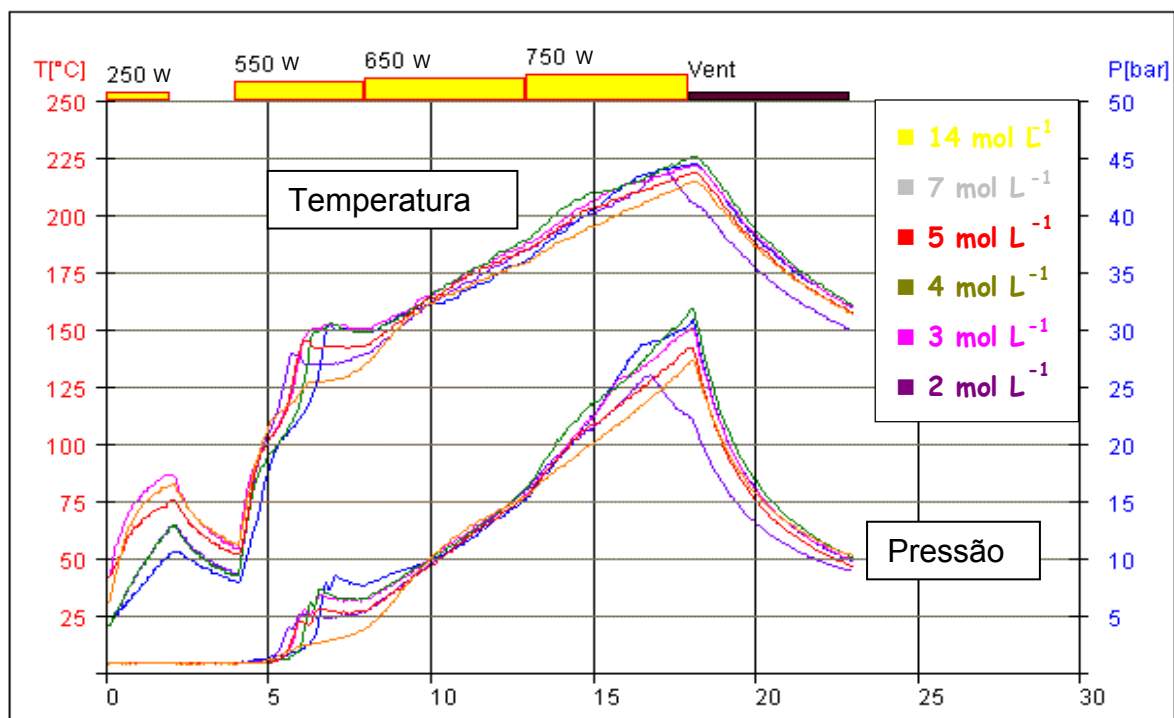


FIGURA 2.3 – Perfil da variação da pressão e da temperatura durante o procedimento de digestão de material foliar de *Paspalum* com as diferentes misturas oxidantes.

O perfil similar das curvas de pressão e temperatura para todas as misturas oxidantes testadas sugerem que as amostras estariam submetidas às mesmas condições de digestão e, conseqüentemente, deveriam apresentar teores de carbono residual e recuperação dos analitos iguais em todos os digeridos. Para checar essa hipótese foram determinados os teores de carbono residual. A TABELA 2.5 apresenta os teores de carbono residual obtidos para as amostras digeridas em cada uma das condições estudadas.

TABELA 2.5 – Teores de carbono residual em amostras de *P. notatum* digeridas com 2 mL de soluções de HNO₃ com adição de 1 mL de H₂O₂. Valores médios para amostras digeridas com as diferentes misturas oxidantes estudadas (n = 3).

Concentração ácida (mol L ⁻¹)	Carbono residual (%)
14	6,9 ± 2,2
7	10,3 ± 1,9
5	10,7 ± 2,0
4	10,5 ± 2,0
3	11,3 ± 2,0
2	11,3 ± 1,9

Os valores de carbono residual foram calculados em relação ao teor de carbono total da amostra que foi de 43 %. De acordo com os teores de carbono residual determinados, o uso de soluções de HNO₃ mais concentradas resultaram em uma oxidação um pouco mais eficiente da matéria orgânica, mostrando que a quantidade de ácido influencia o processo de oxidação (KUBRAKOVA, *et al.*, 1999).

2.4.2 – Titulação das soluções finais dos digeridos

Como os teores de carbono residual apresentaram-se diferentes para as amostras preparadas com ácido concentrado e ácidos diluídos decidiu-se investigar o consumo do ácido durante a digestão. Para tanto, os teores de acidez residual em cada digerido foram determinados por titulação ácido-base e estão apresentados na FIGURA 2.4.

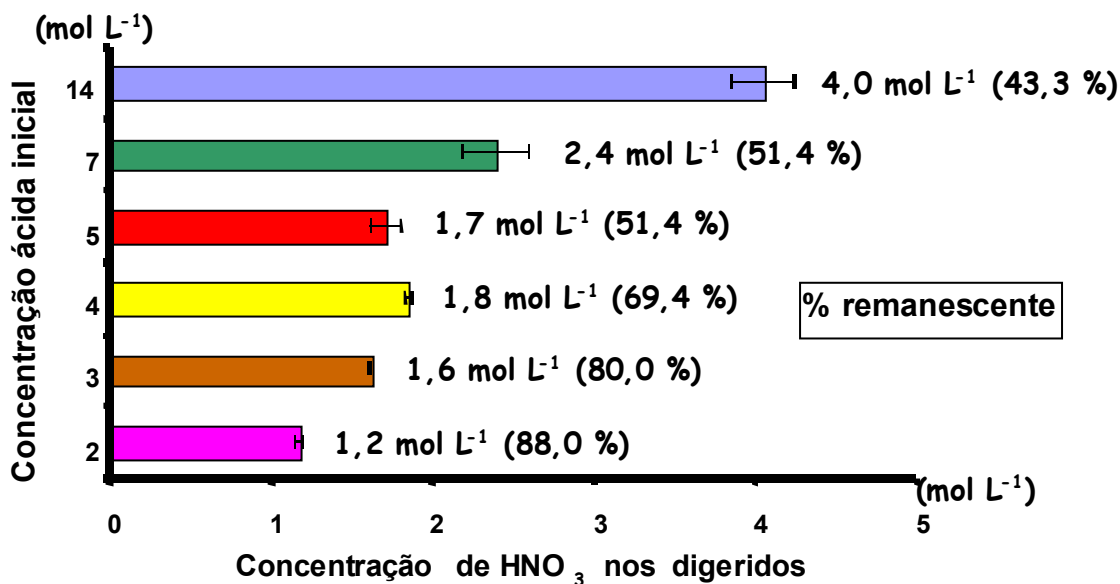


FIGURA 2.4 – Teores residuais de HNO₃ nas amostras de *P. notatum* digeridas com soluções de diferentes concentrações, (n=3).

O consumo de ácido durante o processo de digestão variou de 56,7 até 12,0 % para as misturas oxidantes que empregaram HNO₃ 14 e 2 mol L⁻¹, respectivamente. O maior consumo de ácido, quando soluções mais concentradas do que 5 mol L⁻¹ HNO₃ foram empregadas, pode ser parcialmente explicado pela pequena diminuição dos teores de carbono residual para essas soluções (TABELA 2.5). Contudo, a diferença de carbono residual não é tão pronunciada e outros processos podem estar ocorrendo simultaneamente.

Também deve ser mencionado que todos os frascos de digestão foram resfriados em água corrente por 30 min até temperatura ambiente após o procedimento de digestão. Para as amostras digeridas com soluções mais concentradas foi observada uma intensa evolução de óxidos de nitrogênio após a etapa de resfriamento. Isso pode explicar, em parte, o maior consumo de HNO₃ quando soluções mais concentradas foram empregadas.

2.4.3 – Análise de NMR nos resíduos dos digeridos

Para investigar o consumo de HNO₃ mais pronunciado quando empregou-se ácidos mais concentrados, procedeu-se a aquisição de espectros de NMR dos resíduos dos digeridos de material foliar após sua extração com solventes

orgânicos. Os espectros de NMR de ^1H obtidos para os digeridos mostram que os compostos orgânicos remanescentes gerados durante a digestão são comparativamente mais complexos quando soluções mais concentradas foram utilizadas. A FIGURA 2.5 apresenta espectros completos de resíduos de amostras digeridas com HNO_3 2 e 14 mol L^{-1} , com as indicações das regiões a serem observadas e dos deslocamentos importantes para referência. Um forte sinal a δ 5,86 ppm está presente em intensidade similar para todos os espectros de NMR de ^1H dos digeridos, mas não pode ser identificado.

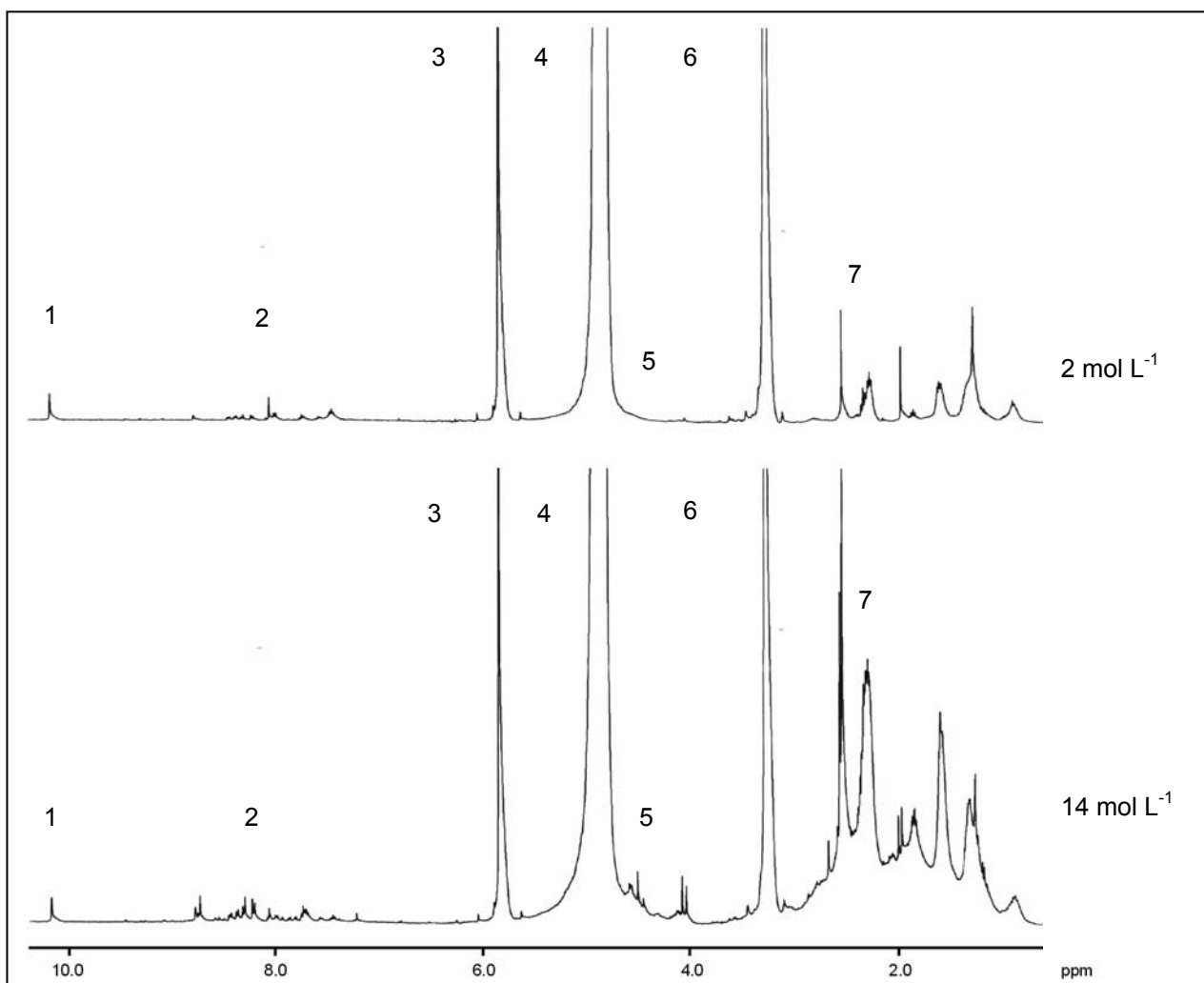


FIGURA 2.5 – Visão total dos espectros de NMR de ^1H para os resíduos de material foliar de *P. notatum* digeridos com solução 2 e 14 mol L^{-1} de HNO_3 . 1) Sinal do pentafluorbenzaldeído; 2) região correspondente aromáticos; 3) Sinal intenso presente em todos os espectros, provavelmente referente a nitro-compostos alifáticos; 4) sinal da água não pré-saturado; 5) região de hidrogênios carbinólicos; 6) sinal do solvente (CD_3OD); 7) região alifática.

As FIGURAS 2.6 e 2.7 apresentam os espectros de NMR obtidos para as regiões aromáticas (δ 7,0-10,5 ppm) e alifáticas (δ 0.5-3.0 ppm), respectivamente. Pode ser observado que o espectro obtido para o digerido preparado com HNO_3 14 mol l^{-1} apresentou maior variedade de compostos orgânicos, provavelmente sob a forma de nitro-derivados aromáticos, e uma quantidade mais significativa de compostos alifáticos.

Apesar dos teores similares de carbono residual determinados para as diversas condições de digestão estudadas, diferentes compostos orgânicos foram produzidos durante a digestão, conforme pode ser observado a partir dos resultados obtidos por NMR.

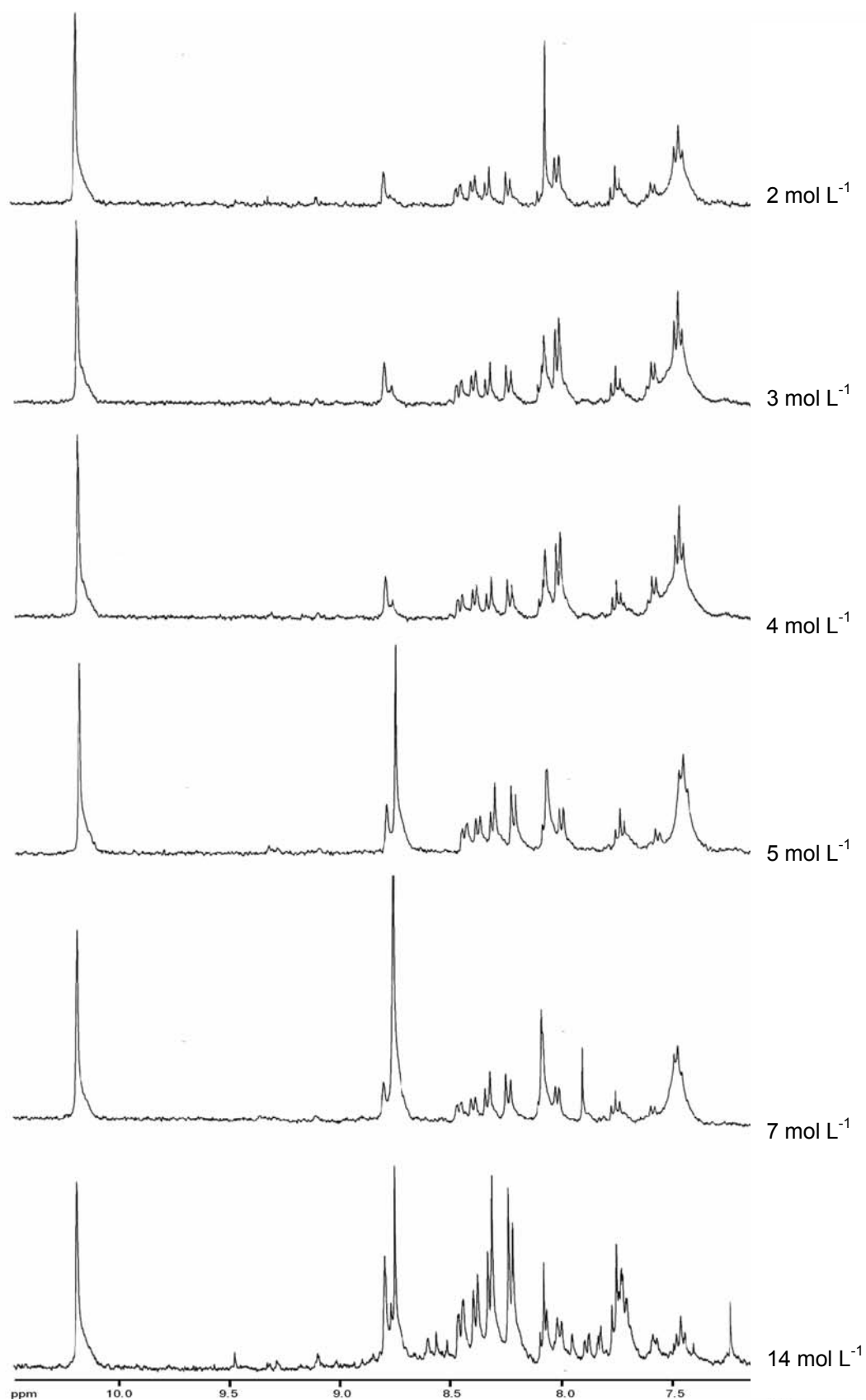


FIGURA 2.6 – Espectros de ^1H NMR dos resíduos de *P. notatum* digeridos com diferentes concentrações de HNO_3 para a região δ 7.0-10.5 ppm.

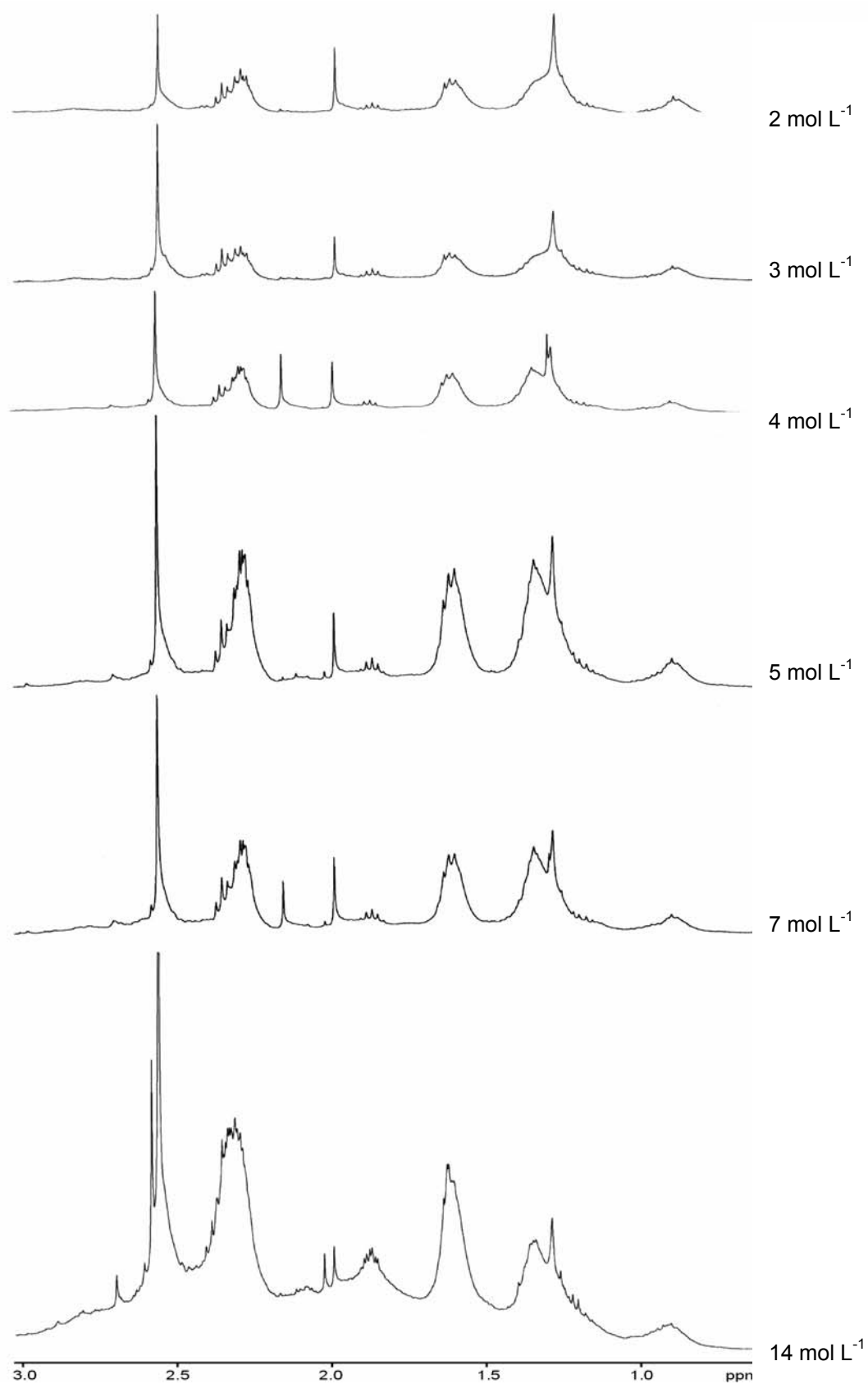


FIGURA 2.7 – Espectros de ^1H NMR dos resíduos de *P. notatum* digeridos com diferentes concentrações de HNO_3 para a região δ 0.5-3.0 ppm.

Pode-se observar, também, que a região alifática dos resíduos orgânicos é mais intensa que a região de compostos aromáticos, indicando que o processo oxidativo converte as moléculas orgânicas complexas da matriz em substâncias mais simples.

Na região dos espectros apresentada entre δ 4,0-4,7 ppm, provavelmente hidrogênios carbinólicos, pode-se observar uma redução na intensidade e na variedade dos sinais até praticamente desaparecer, quando solução 2,0 mol L⁻¹ de HNO₃ foi utilizada (FIGURA 2.8).

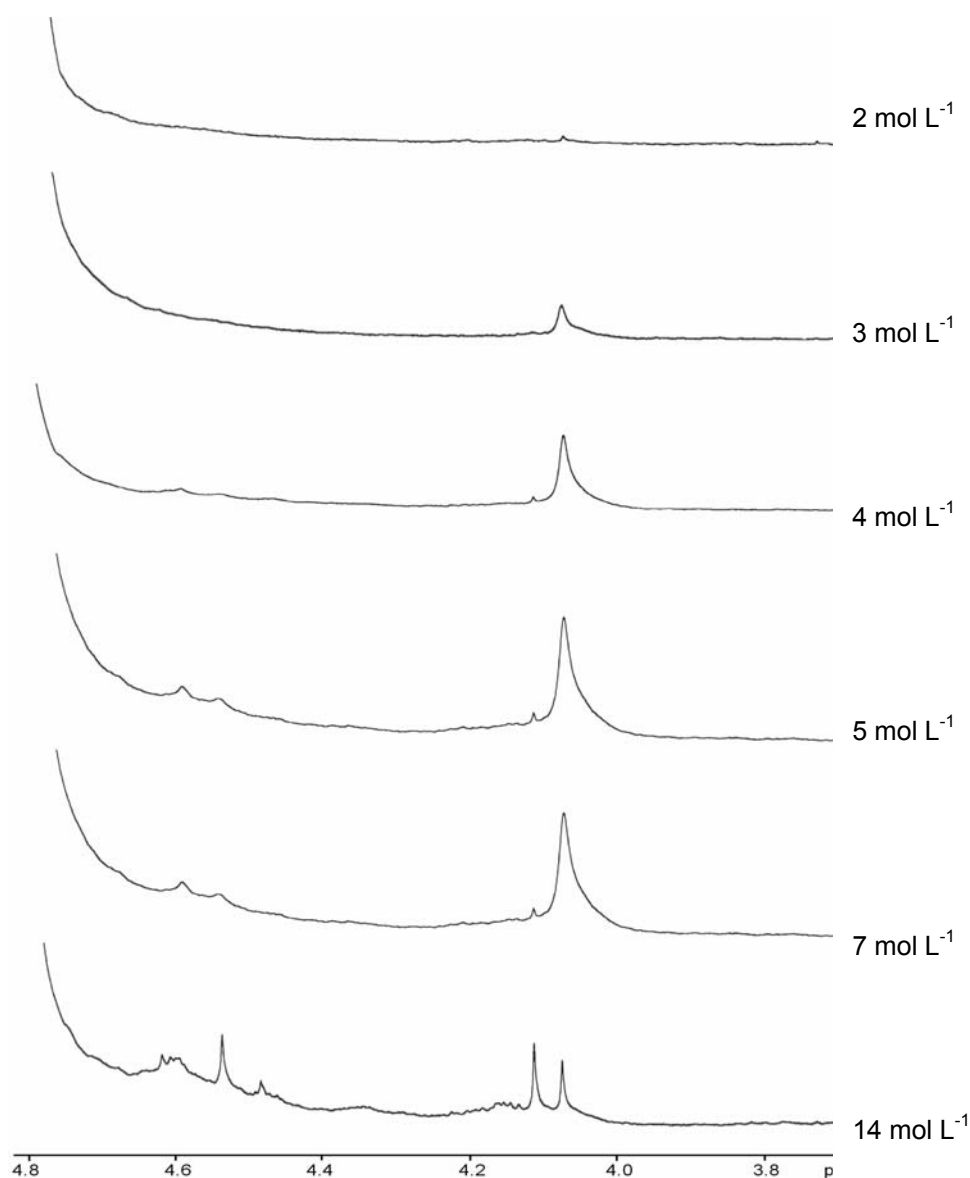


FIGURA 2.8 – Espectros de NMR ¹H dos resíduos de *P. notatum* digeridos com diferentes concentrações de HNO₃ para a região δ 4.0-4,7 ppm.

Uma possível explicação para a maior complexidade dos espectros empregando ácido 14 mol L^{-1} seria o fato do HNO_3 concentrado apresentar um poder oxidante intensificado a altas temperaturas, favorecendo quebras de ligações mais randômicas e a formação de uma variedade maior de compostos orgânicos. Por outro lado, soluções diluídas de HNO_3 não apresentam um forte poder oxidante, contudo, a altas temperaturas, pode ocorrer uma ação de destruição da matriz mais eficientemente, como observado.

No espectro NMR de ^{13}C pode-se observar um pico em $\delta 92,6 \text{ ppm}$ (CH), o que sugere uma grande quantidade de nitro-compostos alifáticos. Contudo, estudos mais detalhados são necessários para elucidação mais acurada das classes remanescentes nos digeridos.

Os dados obtidos por análises de NMR contribuem para uma melhor compreensão dos processos operacionais durante a digestão de amostras em frascos fechados assistida por microondas.

2.4.2 – Determinação dos analitos de interesse em material foliar

As diferenças nos teores de carbono residual observadas para as misturas oxidantes empregadas não interferiram na detecção e recuperação dos analitos de interesse, considerando a técnica analítica empregada (ICP OES).

Para verificar a exatidão do procedimento, materiais de referência certificados foram submetidos à decomposição com solução oxidante diluída, HNO_3 2 mol L^{-1} combinado a H_2O_2 , e, a seguir, os analitos foram determinados por ICP OES. A recuperação de analitos em material de referência certificado e nas amostras de diferentes espécies de *Paspalum*, folhas de cítrus e folhas de manga foi avaliada e está apresentada na TABELA 2.6. Foi encontrada concordância entre os valores certificados e os encontrados para os materiais de referência digeridos com a solução ácida mais diluída. Essa observação indica que soluções diluídas são eficientes para digestão de amostras vegetais para posterior determinação dos analitos por ICP OES sem que os maiores teores de carbono residual apresentassem interferências.

TABELA 2.6 – Teores de analitos de interesse (mg kg^{-1}) em amostras digeridas com 2 mL of HNO_3 2 mol L^{-1} e 1 mL of H_2O_2 30 % v v^{-1} , $n = 3$.

Amostra		Ba	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	P	Zn
Spinach leaves	Certificado	**	15270 \pm 410	12,2 \pm 0,6	**	29030 \pm 520	8900*	75,9 \pm 1,9	5180 \pm 11	82 \pm 3
(NIST 1570a)	Determinado	7,5 \pm 3,0	14938 \pm 579	11,8 \pm 1,0	32,0 \pm 4,2	28797 \pm 726	9883 \pm 185	72,1 \pm 2,5	5167 \pm 29	80,9 \pm 2,0
Corn bran	Certificado	2,40 \pm 0,52	420 \pm 38	2,47 \pm 0,40	14,8 \pm 1,8	566 \pm 75	818 \pm 59	2,55 \pm 0,29	171 \pm 11	18,6 \pm 2,2
(NIST 8433)	Determinado	2,35 \pm 0,40	489 \pm 44	1,95 \pm 0,20	15,8 \pm 0,6	493 \pm 59	837 \pm 55	2,63 \pm 0,11	169 \pm 13	19,6 \pm 2,7
Folha de manga		4278 \pm 163	17527 \pm 89	4,6 \pm 0,1	142 \pm 2	45940 \pm 126	1555 \pm 10	2376 \pm 10	1377 \pm 3	18,8 \pm 0,5
Folha de citrus		4613 \pm 94	39545 \pm 26	102 \pm 8	107 \pm 5	58108 \pm 239	4689 \pm 32	76 \pm 4	2051 \pm 15	51,5 \pm 5,0
<i>Paspalum regnellii</i>		30 \pm 1	4001 \pm 63	9,4 \pm 0,2	197 \pm 13	16873 \pm 207	4393 \pm 48	132 \pm 4	1935 \pm 7	15,6 \pm 1,7
<i>Paspalum guenoarum</i>		30,0 \pm 0,3	3921 \pm 4	9,2 \pm 0,1	188 \pm 8	16777 \pm 64	4335 \pm 10	127 \pm 1	1971 \pm 15	14,2 \pm 0,1
<i>Paspalum glaucescens</i>		65 \pm 2	2908 \pm 30	6,6 \pm 0,1	125 \pm 5	17677 \pm 168	3790 \pm 1	193 \pm 2	1874 \pm 21	18,8 \pm 0,1
<i>P. notatum</i>		107 \pm 1	4595 \pm 9	3,9 \pm 0,1	119 \pm 5	14876 \pm 157	4644 \pm 19	165 \pm 3	1813 \pm 19	16,2 \pm 0,4

* Elementos constituintes não certificados

** Valores certificados não disponíveis

2.5 – Conclusões

O emprego de ácidos diluídos para digestão de amostras vegetais assistida por microondas com cavidade mostrou ser uma alternativa viável e altamente recomendável. Apresenta vantagens tais como: redução no consumo de reagentes, maior compatibilidade com técnicas analíticas espectroscópicas, minimiza a possibilidade de introdução de contaminantes na amostra, além de gerar resíduos com menor variedade de nitrocompostos e mais facilmente neutralizáveis. Essas vantagens são obtidas sem que a eficiência da digestão seja afetada, uma vez que a temperatura, principal variável a ser controlada, não é alterada em função das diferentes concentrações ácidas avaliadas. O emprego de solução 2,0 mol L⁻¹ de HNO₃ proporcionou a recuperação de analitos e obtenção de carbono orgânico residual semelhantes aos obtidos em procedimentos empregando ácidos concentrados.

Capítulo 3

Estudos de biossorção empregando material radicular de *P. notatum*

3.1 – Revisão bibliográfica

3.1.1 – Contextualização dos termos empregados no trabalho

Existem diferentes termos empregados em relação aos mecanismos de retenção de íons metálicos por materiais biológicos, sendo comum o emprego de mais de um desses para descrever o mesmo fenômeno, seja físico ou químico. Por esse motivo, optou-se por fazer uma contextualização a respeito da utilização destes termos para facilitar a compreensão dos mesmos durante a leitura deste capítulo do trabalho.

MULLEN *et al.* (1992) empregam o termo *sorção* de forma geral, para qualquer mecanismo de retenção de íons metálicos e especifica o termo *adsorção* para os mecanismos que ocorrem em todos os processo de ligação superficial, incluindo troca iônica, complexação com grupos orgânicos funcionais e precipitação.

GADD (1993) subdivide os processos de retenção de íons metálicos sob o ponto de vista biotecnológico, em dependentes e não-dependentes do metabolismo do material biológico empregado. Os processos não-dependentes seriam todos classificados como *bioissorção*, incluindo-se a troca iônica, a *adsorção* (descrita como interação de íons metálicos com grupos orgânicos funcionais), a complexação, a precipitação e a cristalização.

MADRID & CÁMARA (1997) apresentam os termos *bioconcentração*, *bioacumulação* e *bioissorção* como sinônimos, ressaltando o uso mais freqüente do último, independentemente do emprego de materiais biológicos vivos ou mortos, e destacam como mecanismos de acumulação a *adsorção* de íons metálicos na superfície do material biológico através de interações com grupos orgânicos funcionais. A *bioissorção* não-dependente do metabolismo seria mais rápida, sem grandes influências com variações de temperaturas entre 4 e 30 °C e diretamente relacionada com o pH do meio. A velocidade de *bioissorção* em organismos vivos seria afetada pelo transporte através da parede celular e da membrana plasmática. Destacam também o fato dos mecanismos de *bioissorção* serem pouco conhecidos.

VEGLIO & BEOLCHINI (1997) definem *sorção* de uma forma mais abrangente, envolvendo a retenção de íons metálicos por materiais de origem biológica ou não, e como *bioissorção* todo o tipo de retenção de metais/íons metálicos com materiais biológicos. Ainda classificam os mecanismos de *bioissorção*

de acordo com a dependência do metabolismo (dependente e não-dependente) e, com a localização onde o metal removido do meio solúvel é encontrado (acumulação extra celular/precipitação, *adsorção* na superfície celular/precipitação e acumulação intracelular). O diagrama apresentado na FIGURA 3.1 apresenta os mecanismos de bioissorção.

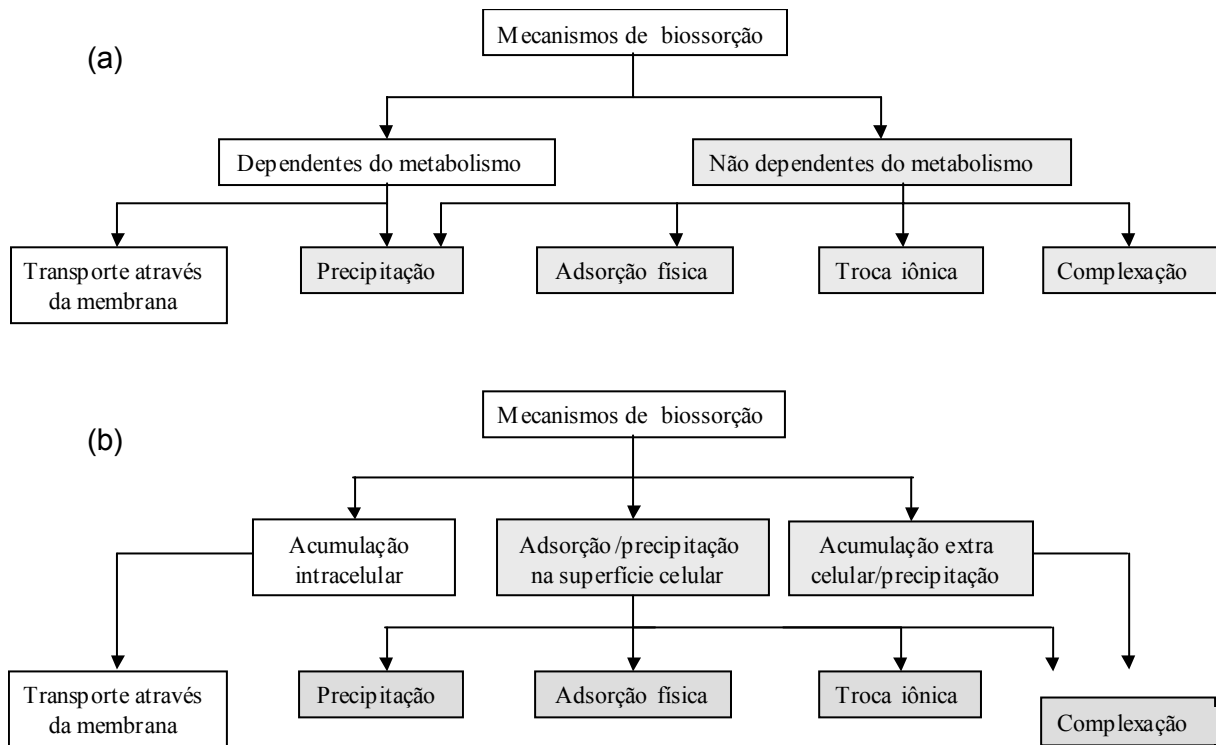


FIGURA 3.1 – Classificação dos mecanismos de bioissorção: (a) quanto à dependência do metabolismo celular, (b) quanto à localização do metal retido. Destaque em cinza para os mecanismos relacionados com bioissorção em materiais mortos (VEGLIO & BEOLCHINI, 1997).

Uma vez que encontram-se freqüentemente citados os termos *sorção*, *bioconcentração*, *bioacumulação*, *bioissorção*, *adsorção*, adotou-se neste trabalho os seguintes termos para descrição dos respectivos fenômenos:

Sorção: retenção de íons metálicos em materiais não-biológicos e biológicos, independente do conhecimento dos mecanismos de retenção envolvidos.

Bissorção: retenção de íons metálicos por materiais biológicos vivos ou mortos.

Bioissorvente: material biológico empregado para sorção de metais/íons metálicos.

Adsorção: sorção de íons metálicos através de processos físicos.

Pré-concentração: sorção de íons metálicos com o objetivo de concentrar os analitos em um volume menor de solução.

Biorremediação: sorção de íons metálicos com objetivo de recuperar sistemas contaminados.

Dessorção: eluição dos íons sorvidos em um bio sorvente. 

3.1.2 – Descrição dos mecanismos de retenção em processos de sorção

Os mecanismos de bio sorção estão brevemente descritos a seguir, segundo a classificação realizada por VEGLIO & BEOLCHINI (1997).

1) Transporte através da membrana: trata-se de um mecanismo pouco estudado, relacionado com o metabolismo, envolvendo a membrana celular. A passagem de metais pesados e seus íons através da membrana celular se dá por mecanismos associados ao transporte de íons essenciais ao metabolismo, confundindo o sistema biológico devido a semelhanças de cargas e raio iônico.

2) Adsorção física: está associada a interações eletrostáticas tais como forças de van der Waals' na superfície dos organismos, por interação com grupos orgânicos funcionais.

3) Troca iônica: as paredes celulares de bio sorventes contém cadeias orgânicas que possuem a propriedade natural de troca iônica e que têm sido estudadas detalhadamente para íons bivalentes (e.g. polissacarídeos)

4) Complexação: ocorrência de formação de complexos na superfície celular do bio sorvente após a interação com grupos orgânicos funcionais.

5) Precipitação: mecanismo de retenção que pode ou não ser dependente do metabolismo. No caso de dependência do metabolismo a sorção está sempre associada a sistemas de defesa do bio sorvente, que reagem na presença dos íons metálicos produzindo compostos que os precipitam. No caso de precipitação não-dependente, a ocorrência de precipitado pode ser consequência da interação com a superfície celular do bio sorvente.

3.1.3 – Uso de substratos biológicos para pré-concentração de elementos químicos

Uma alternativa que possibilita ampliar a sensibilidade de técnicas multielementares é a pré-concentração de analitos presentes na amostra a ser analisada. Dentre os diferentes materiais capazes de concentrar íons, os substratos biológicos têm se destacado devido à sua diversidade e características principais, que são descritas à seguir (MADRID & CÁMARA, 2000):

- Oferecem uma grande diversidade de sítios ativos para sorção de íons metálicos;
- Não requerem, necessariamente, que o material biológico esteja vivo;
- São altamente seletivos para íons metálicos e as suas diferentes formas químicas
- Sua capacidade de sorção é comparável com a de materiais sintéticos;
- São menos suscetíveis a interferência de metais alcalinos e alcalinos terrosos do que resinas de troca iônica;
- Podem ser empregados em batelada ou em sistemas em fluxo com colunas, imobilizados em diferentes tipos de suportes; e
- Muitos deles estão abundantemente disponíveis.

Existem três frentes conhecidas para a aplicação de substratos biológicos: analítica, tecnológica e ambiental. A aplicação analítica visa a pré-concentração de metais possibilitando, em alguns casos, a especiação. As aplicações tecnológicas concentram-se na recuperação de metais preciosos e na concentração de radionuclídeos. Em sistemas ambientais, o emprego de materiais biológicos visa recuperar ambientes degradados ou rejeitos industriais através da biorremediação, com organismos vivos ou mortos, podendo ser realizados por algas, plantas (fitorremediação) e outros. Na FIGURA 3.2 é apresentada uma visão geral do uso de substratos biológicos para sorção de íons metálicos.

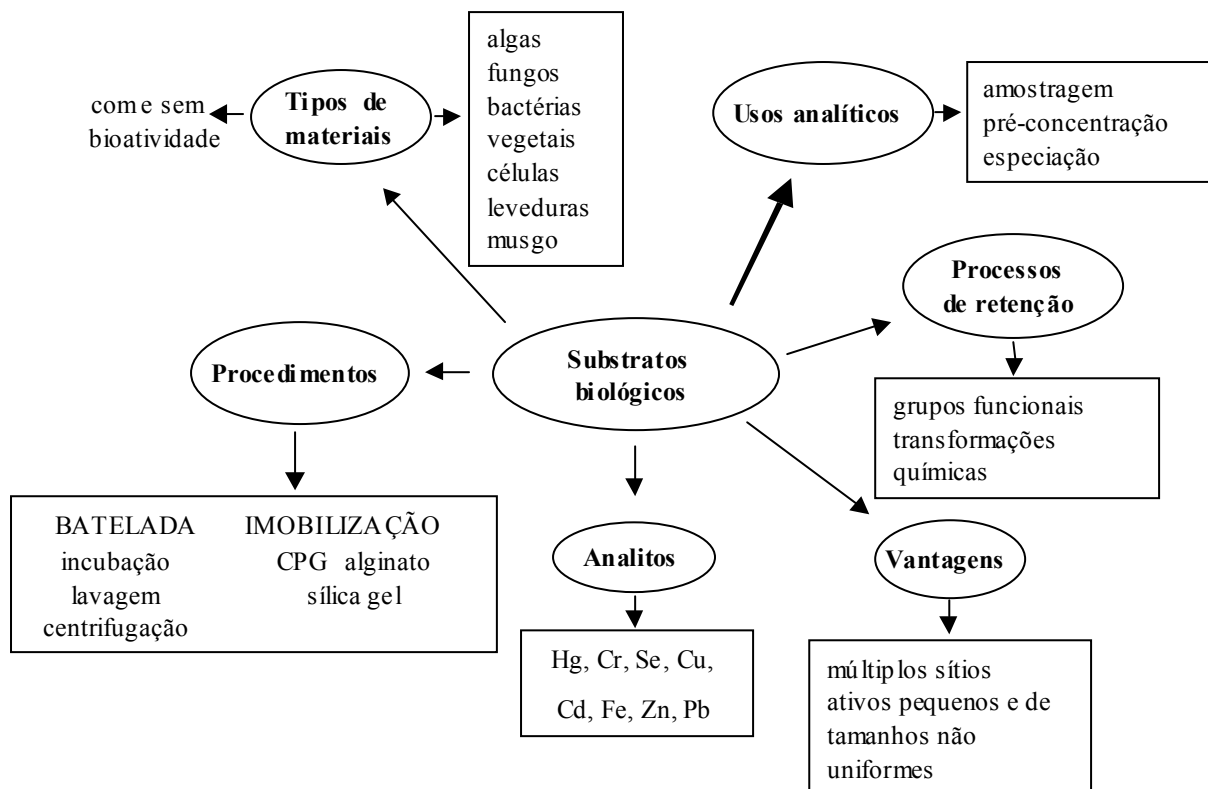


FIGURA 3.2 – Visão geral da aplicação de materiais biológicos e suas características na aplicação para sorção de elementos químicos (MADRID & CÁMARA, 1997).

Segundo MADRID & CÁMARA (1997), os mecanismos de sorção envolvidos na pré-concentração por bioissorventes estão intimamente relacionados ao uso do substrato biológico vivo ou morto. Para os organismos vivos ocorrem processos de adsorção e biológicos, sendo estes últimos dependentes de três fatores: capacidade de ligação com a membrana celular, de transporte dos íons através da membrana e de processos de metilação, redução e oxidação de cada elemento. Em organismos mortos, a sorção se dá através de grupos funcionais como: aminas, amidas, imidazol, tioéteres, fosfatos, carboxilatos, tiols, fenólicos e hidroxilas.

3.1.4 – Pré-concentração em sistemas radiculares

Raízes de plantas, vivas ou mortas, têm sido empregadas com sucesso para sorção de íons metálicos, seja para pré-concentração de íons metálicos ou biorremediação de sistemas contaminados.

Raízes de *Lycopersicon esculentum* (tomate) e de *Nicotiana tabacum* (tabaco) foram estudadas para pré-concentração de Sr por SCOTT (1992). As raízes trituradas foram lavadas, secas em estufa com passagem forçada de ar à temperatura ambiente, cominuídas em moinho de bolas para obtenção de partículas menores que 44 μm , secas por uma noite a 100 °C e estocadas a 4 °C. Soluções de Sr com concentrações variando entre 25-500 mg kg^{-1} foram submetidas ao contato com 0,1-0,2 g de biomassa por tempos variando entre 12-16 h. Foram investigados o equilíbrio de sorção e o volume de eluente no emprego das biomassas empacotadas.

LUJAN *et al.* (1994) realizaram um estudo da dependência do pH na pré-concentração de analitos em algas e tecidos de plantas. Em estudos em batelada, 250 mg de cada biomassa não viva (algas verdes e azuis; brotos, cascas, folhas, caules e raízes de plantas superiores), com tamanho de partícula de 100 μm , foram lavadas duas vezes com solução de HCl 0,01 mol L^{-1} para remoção de biomoléculas solúveis que poderiam interagir com os íons metálicos. Massas de 15 mg das biomassas tratadas com HCl foram suspensas em 3,0 mL de soluções contendo 0,1 mol L^{-1} de Cu^{2+} , Au^{3+} ou Al^{3+} com pH ajustados para diferentes condições de investigação. Após 1 h a solução foi centrifugada e os sobrenadantes analisados em um espectrômetro de absorção atômica com chama (FAAS) para determinação da diferença entre a concentração de cada analito antes e depois da sorção. O pH ideal para a sorção de Cu^{2+} foi 5,0 e os estudos sugeriram um rápida redução de Au^{3+} para Au^0 após a sorção.

A capacidade de sorção de Cu^{2+} por raízes de *Medicago sativa* (alfafa, diferentes cultivares) foi avaliada por GARDEA-TORRESDEY *et al.* (1996). Nesse estudo, 250 mg de biomassa com tamanho de partícula menor que 100 μm previamente secas a 90 °C foram empregadas para estudos em batelada em diferentes pHs e tempos de sorção variando entre 5 e 60 min. A capacidade de sorção de cobre e o emprego da biomassa imobilizada em polissilicatos com posterior determinação do analito por FAAS após dessorção com solução de HCl 0,1 mol L^{-1} também foram estudadas. O material bio sorvente apresentou resistência a 10 ciclos de sorção, com variada capacidade de retenção de Cu^{2+} de acordo com a cultivar empregada no experimento.

A comparação da capacidade de sorção de Ni por *Pinus roxburghii* (pinos) e *Cedrus deodara* (cedro) foi realizada por CHATTERJEE *et al.* (1996). Soluções contendo 10 a 150 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Ni^{2+} , Cd^{2+} ou Cu^{2+} foram mantidas em contato com 1 g de biosorvente por 30 min e a diferença entre as concentrações antes e depois da pré-concentração foram determinadas por FAAS. Nesse estudo os autores obtiveram uma remoção de 90 % do Ni, 79 % do Cd e 75 % do Cu presentes na solução inicial.

CHEN (1997) estudou o equilíbrio de sorção em batelada e em fluxo contínuo de Sr em raízes de uma planta comumente encontrada em regiões de clima tropical e subtropical (*Amaranthus spinosus*). As raízes foram secas a temperatura ambiente até peso constante, moídas em moinho de facas para obtenção de tamanhos de partícula variando entre 10,8 μm e 488,8 μm e estocadas a 4 °C. Foram avaliados diferentes pré-tratamentos da raiz (raiz não tratada, pré-tratamento alcalino e ácido), sendo variados a temperatura e o tempo de eluição, com solução de CaCl_2 , do Sr retido em raiz imobilizada em pérolas de alginato. As determinações do analito foram efetuadas em espectrofotômetro de absorção atômica. O material tratado com meio alcalino obteve maior eficiência de sorção, com capacidade máxima de sorção, calculada pelo modelo de Langmuir, de 12,89 mg g^{-1} .

A bioissorção de Hg^{2+} , Cd^{2+} e Cr^{3+} por *Mangifera indica* (manga) e *Azadirachta indica* foi estudada por TIWARI *et al.* (1999). Cascas dessas árvores foram quebradas, lavadas e secas à temperatura ambiente. Os íons de interesse analítico foram determinados no sobrenadante de soluções submetidas a pré-concentração em 0,1 g de biosorvente por um contador de radioatividade. Foram avaliados os efeitos da concentração dos íons nas soluções submetidas à sorção, o tempo de sorção, variação da temperatura, o efeito do pH, efeito de cátions e ânions concomitantes e o efeito da radiação γ sobre a capacidade de sorção dos biossorventes estudados. Não foi observada sorção significativa de Cd^{2+} e a sorção de Hg^{2+} foi afetada pela adição de W^+ , Ba^{2+} e Sr^{2+} para ambos os materiais estudados.

PRASAD *et al.* (2000) verificaram a remoção de metais tóxicos de soluções por folhas, caules e raiz de *Quercus ilex* (carvalho), uma planta que cresce em solos com altos teores de Ni da Europa (solos serpentínicos). A biomassa foi seca por uma noite a 55 °C e moída em almofariz com auxílio de nitrogênio líquido

para obtenção de partículas menores que 200 μm . A pré-concentração de Cu, Zn, Ni, Cd e Hg e a eficiência da biomassa reutilizada foram acompanhadas por espectrofotômetro de absorção atômica após sorção. Foi estudada a capacidade preferencial de sorção para os metais em cada parte da planta e analisada a distribuição de Ni no xilema, floema e folhas com o objetivo de verificar o transporte deste elemento através da planta. Com este estudo verificaram a acumulação de Ni nas folhas da planta em estudo.

Apesar de haverem descritos diferentes empregos de raízes para sorção de metais, não há relatos do uso de espécies do gênero *Poaceae* (gramíneas) para este fim. Este gênero possui comportamento e características que podem favorecer o seu uso como bioissorvente, entre os quais o desenvolvimento acelerado, com fácil adaptação a diferentes climas e solos. Em sua maioria, possuem sistemas radiculares com grande número de células destinadas a absorção de nutrientes. Desta forma, neste capítulo são apresentados os resultados e discussões dos estudos da avaliação do emprego de material radicular de *P. notatum* como bioissorvente para pré-concentração de íons metálicos.

3.1.5 – Isotermas de sorção

Isotermas buscam estabelecer uma relação entre a quantidade do analito sorvido e a sua concentração em equilíbrio na solução. Dependendo dos mecanismos, a sorção pode ser classificada como física ou química. A sorção física é não-específica, rápida e reversível, uma vez que a interação do analito com o bioissorvente se dá apenas por forças de Van der Waals (dipolo-dipolo, dipolo induzido) e a energia de sorção se restringe a alguns quilojoules. Quando há interação química com o bioissorvente o fenômeno é chamado sorção química e as energias de sorção possuem a mesma ordem de grandeza dos calores de reação química, variando de alguns quilojoules até 400 KJ. A sorção química forma apenas uma camada sobre a superfície do bioissorvente (CASTELLAN, 1994).

Vários modelos matemáticos têm sido desenvolvidos e propostos para descrever isotermas de sorção, a fim de representar os dados experimentais. Contudo, nenhum deles pode ser considerado universal. A seguir são apresentadas diversas equações de isotermas que tentam descrever comportamentos de sorção, sendo que, algumas possuem em comum parâmetros e constantes (obtidas a partir

dos dados experimentais). Os parâmetros são: q = quantidade de analito por massa de bioadsorvente no equilíbrio (mmol g^{-1}), C = a concentração do analito na fase aquosa no equilíbrio (mmol L^{-1}) e C_0 = concentração da solução inicial (mmol L^{-1}); e as constantes são: q^0 = relacionadas a capacidade de sorção (mmol g^{-1}), b = relacionada a energia de sorção (L mmol^{-1}) e β = relativa a intensidade de sorção que está associada ao grau de heterogeneidade da superfície do sorvente (AL-ASHEH *et al.*, 2000; KLUG *et al.*, 1998).

Isoterma de Langmuir: é a isoterma mais comumente usada para sorções de gases e líquidos. Trata-se de um modelo ideal e o mais simples para a descrição de um comportamento de sorção e foi desenvolvido baseado na cinética de condensação e evaporação de moléculas gasosas sobre uma unidade de superfície sólida (DANNY, 2002). Assume os seguintes princípios: 1) a sorção do analito ocorre em sítios definidos e localizados; 2) cada sítio de sorção pode reter somente uma molécula ou íon do sorvido; 3) todos os sítios ativos do bioadsorvente apresentam a mesma energia de sorção e estão homogeneamente distribuídos; e 4) a sorção em um sítio não afeta a energia nem a disponibilidade de sorção nos vizinhos e a atividade do analito é diretamente proporcional a sua concentração, não havendo interação entre os analitos sorvidos (DANNY, 2002; NELSON, 2001; ADMSON, 1990; CASTELAN, 1986; PONEC *et al.* 1974, KLUG *et al.* 1998 e ESPOSITO *et al.* 2001). A representação matemática é dada pela equação 1 (AL-ASHEH *et al.*, 2000).

$$q = \frac{q^0 b C}{1 + b C} \quad (1)$$

Quando o sistema possui mais de um analito a equação pode ser estendida e escrita como na equação 2 onde q_i , b_i e b_k são as constantes de Langmuir obtidas à partir de estudos monoelementares para o analito i e para os diferentes analitos k da solução, C_i é a concentração no equilíbrio do analito i no meio multielementar e C_k ($K = 1, 2, \dots; N$ é o número de componentes) é a concentração de cada componente no equilíbrio (AL-ASHEH *et al.*, 2000; HO & MCKAY, 2000).

$$q_i = \frac{q_i^0 b_i C_i}{1 + \sum_{k=1}^N b_k C_k} \quad (2)$$

Pode-se verificar se a sorção de um analito pode ser descrita pela isoterma de Langmuir através de uma simples linearização da equação, traçando-se um gráfico de C/q em função de C (TARLEY & ARRUDA, 2003). Contudo, segundo KLUG *et al.* (1989), esta forma de análise não revela desvios sistemáticos da isoterma ajustada, sendo os múltiplos parâmetros melhor ajustados através de regressões não lineares.

Isoterma de Freundlich: foi desenvolvida como uma expressão empírica para correlacionar dados de isotermas de equilíbrio. Assume os seguintes princípios: 1) o biossorvente tem uma distribuição de sítios de sorção heterogêneos, com diferentes afinidades pelo analito; 2) não há associação ou dissociação de moléculas após serem sorvidas na superfície; 3) não há quimiossorção, sendo um processo puramente físico (DANNY, 2002, ADMSON, 1990; RUDZINSKI, *et al.* 1997; CASTELAN, 1986 e PONEC *et al.* 1974). Esta isoterma é falha quando a concentração do analito é muito elevada. A equação 3 trata da descrição matemática da isoterma de Freundlich (AL-ASHEH *et al.*, 2000; KLUG *et al.* 1989 e ESPOSITO *et al.* 2001). Esta equação pode ser linearizada traçando-se o gráfico de $\log C \times \log q$ (JALALI *et al.*, 2002 e DIATTA *et al.*, 2003).

$$q = bC^\beta \quad (3)$$

A equação de Freundlich pode ser estendida para um estudo multielementar, sendo as constantes obtidas em investigações individuais de sorção aplicadas na equação 4 (equação para dois componentes), onde ΔF é um termo de relação entre os valores de b_1 e b_2 dos dois componentes.

$$q_1 = \frac{\beta(b_1 / \beta_1)^\beta C_1}{\left[(b_1 / \beta_1)^{\beta_1} C_1 + (b_2 / \beta_2)^{\beta_2} C_2 \right]^{-\beta}} + \Delta_{F2} \quad (4)$$

Modelo de Sips ou Langmuir-Freundlich: trata-se da combinação dos modelos de Langmuir e Freundlich. Neste caso, a sorção se dá em monocamada mas em um biossorvente heterogêneo. Para sistema monoelementar a equação pode ser descrita como a seguir:

$$q = \frac{q^0 (bC)^\beta}{1 + (bC)^\beta} \quad (5)$$

Nesta equação as constantes são as mesmas obtidas pelas equações de Langmuir e Freundlich. Como para as equações de Langmuir e Freundlich, esta também pode ser estendida para uma solução multielementar, sendo as constantes retiradas a partir dos dados obtidos para estudos monoelementares (AL-ASHEH *et al.*; RUDZINSKI, *et al.* 1997 e DANNY, 2002).

IAST (teoria da solução ideal sorvida): assume que não há interação entre as substâncias que compõem a solução. Este modelo tem sido aplicado com sucesso para descrever soluções multielementares onde há competição entre os analitos, empregando dados de somente um analito. Pode ser representado pela equação 6, onde N = número de componentes no sistema; β e b = constantes de Freundlich para o sistema monoelementar (AL-ASHEH *et al.*, 2000; RUDZINSKI, *et al.* 1997 e DANNY, 2002).

$$C_i = \frac{q_i}{\sum_{j=1}^N q_j} \left(\frac{\sum_{j=1}^N \beta_j q_j}{\beta_i b_i} \right)^{\beta_i} \quad (6)$$

Isoterma de Redlich-Peterson: aproxima a equação de Freundlich para soluções concentradas e descreve sorção que se processa em multicamadas (VOLESKY, 2003; REDLICH & PETERSON, 1959; KLUG *et al.*, 1989; JOAN, 2001; RUDZINSKI, *et al.* 1997; ESPOSITO *et al.* 2001 e DANNY, 2002).

$$q = \frac{q^0 b C}{1 + (q^0 C^\beta)} \quad (7)$$

Isoterma de Toth: pressupõe que a sorção é localizada, sem interações laterais entre o sorvido ou os sítios de sorção. Trata-se de um modelo para ser aplicado em sorventes sólidos heterogêneos. A equação 8 apresenta a representação matemática deste modelo (KLUG *et al.*, 1989; JOAN, 2001 e RUDZINSKI, *et al.* 1997).

$$q = \frac{q^0 b C}{1 + (q^0 C^b)^\beta} \quad (8)$$

Modelo BET (Brunauer, Emmet e Teller): Este modelo estende o modelo de Langmuir de sorção em mono camada para multicamada. Cada molécula sorvida na primeira camada proporciona uma nova alocação para a molécula subsequente; a sorção máxima corresponde à formação de uma monocamada sobre a superfície do sorvente sendo a energia de sorção constante (JOAN, 2001; RUDZINSKI, *et al.* 1997 e ADMSO, 1990). A representação matemática é dada na equação 9, onde C_0 é a concentração inicial da solução do analito (mmol L^{-1}).

$$q = \frac{q^0 b C}{(C_0 - C)[1 + (b - 1)(C / C_0)]} \quad (9)$$

3.2 – Materiais e métodos

3.2.1 – Reagentes e soluções

Todos os frascos, ponteiras e copos do amostrador automático utilizados foram previamente descontaminados em banhos contendo 10 % (v v⁻¹) de HNO₃ por 24 horas.

Os reagentes utilizados nos estudos deste trabalho foram de grau analítico e as soluções preparadas com água purificada em sistema Milli-Q® (18 MΩ.cm, Millipore, EUA).

No preparo das soluções ácidas utilizadas nos estudos de lixiviação do material radicular e de dessorção foram utilizados HNO₃ e HCl concentrados de alta pureza (Merck, Alemanha). Para digestão do material radicular em forno de microondas com cavidade foi empregado HNO₃ concentrado destilado abaixo do ponto de ebulição (Mallinckrodt, Alemanha) e H₂O₂ 30 % (v v⁻¹) (Merck, Alemanha).

Os padrões para construção das curvas de calibração utilizadas na análise dos elementos químicos de interesse por ICP OES, e das soluções mono e multielementares empregadas nos estudos de bioissorção foram preparados a partir de diluições apropriadas de soluções estoque 1000 mg L⁻¹ (Titrisol®, Merck, Alemanha) em cada um dos meios estudados (H₃CCOONH₄ e KNO₃ 0,5 mol L⁻¹) e HNO₃ 2,8 mol L⁻¹, para evitar problemas de introdução das amostras no plasma de forma diferente das curvas analíticas.

Para a determinação do pH ideal para a sorção de íons metálicos por batelada foi preparada solução multielementar contendo 200 µg mL⁻¹ dos cátions monovalentes Na⁺ e K⁺ e dos bivalentes Ca²⁺ e Mg²⁺ e 5 µg mL⁻¹ dos cátions Al³⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺ e Zn²⁺ em meio H₃CCOONH₄ 0,5 mol L⁻¹, sendo que, nestas condições não ocorreu precipitação de hidróxidos metálicos.

Nos estudos de sorção em sistema em fluxo empregaram-se soluções de Cu²⁺, Ni²⁺, Al³⁺ e Fe³⁺ (10, 5, 2 e 2 mg L⁻¹, respectivamente) preparadas em meio H₃CCOONH₄ e KNO₃ 0,5 mol L⁻¹. As concentrações de trabalho escolhidas levaram em consideração as constantes de solubilidade para os hidróxidos destes metais no pH de estudo. O meio acetato foi escolhido devido a experiência anterior de alunos do grupo (CARRILLHO & GILBERT, 2000).

Os pHs das soluções mono e multielementar foram ajustados, quando necessário, com soluções de diferentes concentrações de NH_4OH , KOH e HNO_3 (Merck, Alemanha).

Nos estudos de sorção em sistema em fluxo empregou-se bomba peristáltica IPC 8 (Ismatec, Suíça) e colunas confeccionadas em acrílico, vedadas com filtros de $90\ \mu\text{m}$ (MoBitec, Alemanha).

As filtrações das soluções, no estudo de cinética de sorção, foram realizadas empregando-se filtros Millipore com porosidade de $0,45\ \mu\text{m}$ (Millipore Corporation, EUA) e seringas graduadas descartáveis.

3.2.2 – Instrumentação

Para cominuição das raízes e das amostras foram utilizados moinhos de facas TE 048 (Marconi, Brasil) e criogênico 6750 Freezer/Mill (Spex CertiPrep, EUA).

Na secagem de material radicular, previamente moído e lavado com soluções ácidas e do material retirado das colunas após sorção foi empregado Liofilizador E-C Micromodulyo (Edwards, EUA), equipado com frascos de vidro com capacidade para 500 mL.

Forno de microondas Multiwave (Anton Paar, Áustria), equipado com frascos fechados de PTFE (politetrafluoretileno) modificado, foi empregado em substituição do equipamento ETHOS 1600 (Milestone, Itália) por questões de disponibilidade de uso.

Para determinação dos analitos de interesse e dos teores de carbono residual foi empregado ICP OES Vista-RD, (Varian, Austrália).

Um potenciômetro digital (Metler Toledo, model 355, Inglaterra) equipado com um eletrodo combinado foi usado para o ajuste dos pH das soluções empregadas nos estudos de bio sorção.

Para o estudo de isotermas de sorção empregou-se a versão demonstrativa do programa Sigma Plot 8.0[®] (Statistical Solutions, USA).

3.3 – Procedimento experimental

3.3.1 – Plantio e coleta de material radicular de *P. notatum* para estudos de bioissorção

Tentativa de coleta de material radicular de *P. notatum* diretamente do campo foi realizada. Contudo, mesmo com inúmeras lavagens, não foi possível eliminar completamente os resíduos argilosos impregnados no material. Uma alternativa para contornar o excesso de argila foi o plantio do *Paspalum* em um solo livre deste componente. Assim, mudas do *P. notatum* foram transplantadas para um canteiro de areia com dimensões 1 × 2 m e 30 cm de profundidade.

Como a solução utilizada na irrigação era rapidamente permeada pela areia, os nutrientes necessários à planta não eram retidos, dificultando a velocidade de desenvolvimento das mudas para preenchimento do canteiro com o material foliar. Por outro lado, uma das respostas das plantas a situações de solos pobres em nutrientes é o aumento da área superficial das raízes para intensificar a absorção de nutrientes do solo (RAVEN & EVERT, 1996). O material radicular para os estudos de bioissorção ficou disponível após 3 meses do plantio e foi coletado de forma a remover o máximo possível da areia para que as raízes de nutrição, que contém a maioria dos grupos funcionais responsáveis pela sorção de nutrientes, fossem também recolhidas.

Após lavagem em água corrente, o material radicular foi cortado com tesoura de aço inoxidável e levado à secagem em estufa com passagem forçada de ar a 60 °C, até peso constante.

3.3.2 – Moagem do material radicular e das amostras empregados em estudos de bioissorção

O material radicular coletado para estudos de bioissorção foi pré-moído em moinho de facas. Porções de aproximadamente 1 g foram submetidas à moagem com resfriamento criogênico, para cominuição do tamanho de partícula no conjunto apresentado na FIGURA 2.1. A TABELA 3.1 apresenta o programa para moagem criogênica empregado, onde a etapa de moagem foi repetida 3 vezes, alternando-se com uma etapa de resfriamento, totalizando 24 min. Após moagem, o material

radicular foi homogeneizado e armazenado em dessecador para os estudos posteriores.

TABELA 3.1 – Programa utilizado para cominuição do material radicular por moagem criogênica

Etapa	Função	Tempo (min)
1	pré-congelamento	2
2	moagem	4
3	resfriamento	3

3.3.3 – Avaliação do material radicular de *P. notatum* como bio sorvente

3.3.3.1 – Estudos para estabelecimento do procedimento adequado para lixiviação dos elementos presentes originalmente no material radicular

Os parâmetros avaliados para estabelecer as condições de lixiviação do material radicular para posteriores estudos de bio sorção foram: o tipo de ácido (HNO_3 ou HCl) e sua concentração, o tempo de contato, a temperatura, o volume e o número de alíquotas da solução empregada na lixiviação. Foram escolhidas três concentrações ácidas para o HNO_3 (0,014; 0,14 e 1,4 mol L^{-1}) e para o HCl (0,012; 0,12 e 1,2 mol L^{-1}).

Num estudo preliminar, avaliou-se o comportamento das três concentrações ácidas em contato com o material radicular à temperatura ambiente e sob agitação por 20 min. As soluções 0,014 e 0,012 mol L^{-1} de HNO_3 e HCl , respectivamente, apresentaram remoção de íons metálicos inferior a 10 %.

Mantendo-se o material radicular em contato com as soluções ácidas avaliadas por um período superior a 1 hora, observou-se que as soluções 1,4 e 1,2 mol L^{-1} de HNO_3 e HCl promoveram uma degradação visível da matéria orgânica do material, o que impediria a reutilização do bio sorvente num procedimento de pré-concentração, uma vez que sítios ativos de sorção provavelmente seriam desnaturados. Assim, os estudos seguintes foram realizados empregando-se as soluções ácidas intermediárias 0,14 e 0,12 mol L^{-1} de HNO_3 e HCl , respectivamente.

Para um estudo conjunto dos parâmetros a serem avaliados, a massa do material radicular bem como os ácidos empregados e suas concentrações foram fixados, e combinados de acordo com a TABELA 3.2.

Parâmetros fixados:

- Massa de material radicular: 50 mg
- Ácido utilizado: HNO₃ ou HCl
- Concentração ácida: 0,14 mol L⁻¹ (HNO₃) e 0,12 mol L⁻¹ (HCl)

Parâmetros avaliados:

- Tempo: (-) 30 min e (+) 60 min
- Temperatura: (-) 25 °C e (+) 50 °C
- Alíquotas da solução ácida: (-) 1 de 30 mL e (+) 3 de 10 mL

TABELA 3.2 – Combinação dos parâmetros experimentais para estabelecimento do procedimento de lixiviação dos elementos presentes originalmente no material radicular.

Experimento	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Alíquotas (n°)
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	-	+
4	+	-	+
5	+	+	-
6	+	+	+
7	-	+	+
8	-	+	-

As massas pesadas foram transferidas para frascos com capacidade para 50 mL onde receberam alíquotas das soluções ácidas. Os frascos foram encaixados em bandejas e levados a banho-maria com temperatura controlada por termostato e com agitação dos frascos.

Nos experimentos com alíquota única de 30 mL as soluções ácidas foram adicionadas no início do experimento e, após 30 ou 60 min, recolhidas para análise após centrifugação e separação da parte sólida. Nos experimentos com 3 alíquotas, 10 mL foram adicionados no início e recolhidos, após 10 min ou 20 min

(para experimentos com 30 e 60 min de duração, respectivamente). O recolhimento das alíquotas foi realizado com auxílio de centrifugação. A seqüência do experimento foi repetida mais duas vezes, empregando-se a mesma massa de material radicular e nova alíquota de solução. A eficiência de limpeza do material pelas soluções ácidas foi avaliada pela determinação dos analitos extraídos por ICP OES.

3.3.3.2 – Avaliação preliminar do emprego do material radicular para sorção em diferentes pHs em batelada

Foi realizado experimento para avaliação conjunta da capacidade de sorção e do efeito do pH na sorção de metais. Pesaram-se triplicatas de cerca de 50 mg de material radicular previamente lixiviado com solução de HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$ para cada valor de pH avaliado (3,5; 4,5; 5,5; 6,5 e 7,5).

Às massas pesadas foram adicionadas alíquotas de 5 mL de solução multielementar sendo que, para cada porção da solução multielementar com pH ajustado, foi recolhida uma alíquota como branco analítico.

As suspensões do material radicular foram agitadas por 10 min a 200 rpm e centrifugadas por 2 min a 3000 rpm. Os sobrenadantes foram recolhidos e os materiais sedimentados receberam nova alíquota de 5 mL da solução multielementar, sendo novamente agitados e centrifugados. O procedimento foi repetido tendo-se, ao final do experimento, 10 alíquotas de sobrenadante recolhidas para cada massa de material radicular pesado inicialmente.

Os sobrenadantes foram analisados por ICP OES segundo os parâmetros apresentados na TABELA 3.3. A partir dos resultados obtidos foi possível avaliar os pHs ideais para estudos de bioissorção, bem como traçar curvas de tendência de saturação do material radicular para os elementos investigados em meio multielementar.

TABELA 3.3 – Parâmetros operacionais empregados para determinação elementar em ICP OES com visão radial para sobrenadantes do estudo de sorção em batelada e em sistema em fluxo.

Parâmetros instrumentais	ICP OES
Sistema óptico	Echelle
Detector	Sólido CCD (167-785 nm)
Potência (kW)	1,3
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15,0
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,5
Vazão do gás de nebulização L min ⁻¹)	0,6
Câmara de nebulização	Ciclone
Nebulizador	Concêntrico
Fluxo de aspiração da amostra (L min ⁻¹)	1,2
Altura de observação (mm)	8
Linhas de emissão (nm):	
Al (I)	237,312
Ca (II)	396,847
Cd (II)	214,413
Co (II)	230,784
Cu (I)	324,754
Fe (II)	234,350
K (I)	766,501
Mg (II)	279,550
Mn (II)	275,611
Na (I)	588,995
Ni (II)	216,555
Zn (II)	202,551

I e II linhas de emissão atômica e aniônicas, respectivamente.

3.3.3.3 – Avaliação da cinética de sorção do material radicular

Conhecendo-se o pH no qual obteve-se maior capacidade de sorção para os analitos que foram retidos, realizou-se estudos de cinética de sorção para

conhecer o tempo necessário para alcançar o equilíbrio (tempo necessário para troca das espécies iônicas cessar).

Para tanto, cerca de 150 mg de material radicular foi pesado e suspenso em 60 mL da solução multielementar com pH ajustado para 6,5, o que gerou uma suspensão de $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de bio sorvente. A suspensão foi mantida sob agitação e alíquotas de 3 mL foram recolhidas de 1 em 1 minuto nos primeiros 10 min, e de 5 em 5 minutos, até completar 30 min. As alíquotas foram recolhidas com seringas graduadas acopladas a sistema de filtração contendo filtros Millipore (porosidade = $0,45 \mu\text{m}$) para isolar a solução multielementar do material suspenso. As triplicatas das alíquotas recolhidas foram analisadas por ICP OES nas condições apresentadas na TABELA 3.3.

3.3.3.4 – Avaliação da capacidade de sorção de Cu^{2+} , Ni^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+} em sistema em fluxo

Os parâmetros avaliados no estudo de sorção em fluxo foram: emprego de material radicular lixiviado e não lixiviado, substituição do meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ por solução de KNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e a sorção em meio mono e multielementar.

A) Imobilização do material radicular

Com o objetivo de avaliar somente o material em estudo não foi empregado nenhum tipo de suporte para a imobilização do material radicular, evitando a perda de sítios de sorção para a fixação do bio sorvente e possíveis interferências de sítios de sorção dos suportes comumente empregados. Desta forma, a material radicular lixiviado e não lixiviado, cominuído em moinho criogênico, foi suspenso nos dois meios avaliados, com pH previamente ajustado para 6,5. As suspensões foram mantidas em agitação enquanto a bomba peristáltica propulsionava o material radicular para a coluna de acrílico a uma velocidade de $0,71 \text{ mL min}^{-1}$.

Quando empregou-se o meio KNO_3 foi necessário um condicionamento prévio do bio sorvente com adições de soluções de KOH até que o pH da suspensão atingisse o equilíbrio e permanecesse em 6,5. O material não lixiviado

teve de ser suspenso e decantado para a remoção de partículas muito finas que dificultavam o processo de empacotamento. Essas partículas não estavam presentes no material lixiviado porque, durante a lixiviação ácida, foram removidas juntamente com o sobrenadante.

B) Sorção e dessorção dos analitos

O procedimento de sorção foi iniciado passando-se através das colunas 1 mL do meio de suspensão ($\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ ou KNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$) com pH ajustado para 6,5, que foi tomado como branco analítico. Soluções mono ou multielementares de Ni^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+} , preparadas nos diferentes meios e com pH ajustado para 6,5, foram, então, carregadas através das colunas recolhendo-se alíquotas de volumes conhecidos como apresentado na TABELA 3.4.

TABELA 3.4 – Volumes recolhidos nos estudos de sorção em sistema em fluxo

Volume de solução recolhido (mL)		
Alíquotas	Cu^{2+}	Ni^{2+}
1-10		1
11-20		2
21-25		3
Total		45

Volume de solução recolhido (mL)	
Alíquotas	Fe^{3+} , Al^{3+} e multielementar
1-10	2
11-20	8
21-40	10
Total	300

Os volumes maiores recolhidos para os estudos com as soluções de Fe^{3+} , Al^{3+} isolados e multielementar foram necessários devido a impossibilidade de se preparar soluções concentradas destes dois analitos nas condições de estudo.

Finalizado o recolhimento de todas as alíquotas, esvaziou-se as colunas e passou-se através delas 1 mL do meio de suspensão em pH 6,5 para

eluição dos analitos não sorvidos pelo material radicular. As colunas foram novamente esvaziadas para eliminação de volume morto e passou-se através delas 1 mL de solução de HNO_3 $2,8 \text{ mol L}^{-1}$ para dessorção dos analitos retidos. Após a dessorção o material radicular empacotado foi retirado das colunas e transferido para recipientes previamente pesados que foram submetidos a liofilização para posterior pesagem e conhecimento das massas utilizadas nas colunas. Todas as alíquotas recolhidas foram submetidas a análise por ICP OES sob as condições apresentadas na TABELA 3.3.

3.3.4 – Digestão do material radicular para análise por ICP OES

Cerca de 100 mg de amostras de material radicular de *P. notatum*, lixiviadas ou não lixiviadas foram submetidas a digestão ácida com 2 mL de HNO_3 concentrado e 1 mL de H_2O_2 30 % v v⁻¹. Após digestão, as soluções resultantes tiveram seus volumes elevados para 10 mL com água. Brancos analíticos foram obtidos submetendo-se frascos contendo apenas a mistura oxidante ao programa de aquecimento utilizado para digestão, apresentado na TABELA 3.5. As soluções foram submetidas à análise dos elementos de interesse por ICP OES empregando as soluções descritas na TABELA 3.3

TABELA 3.5 – Programa de aquecimento para digestão de material radicular de *P. notatum* empregando forno de microondas Multiwave (Anton Paar), programa para 6 amostras.

Etapa	Potência (W)	Tempo (min)	Intensidade de Ventilação
1	250	2	1
2	0	2	1
3	750	4	1
4	850	4	2
5	1000	5	3
Ventilação		15	3

Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

3.4 – Resultados e discussão

3.4.1 – Avaliação do material radicular de *P. notatum* como bioissorvente

3.4.1.1 – Estudos para estabelecimento do procedimento adequado para lixiviação dos elementos presentes originalmente no material radicular

A lixiviação com soluções ácidas possibilita a substituição dos íons presentes no bioissorvente por íons H^+ , mais facilmente trocáveis (CHEN, 1997). Neste estudo foram utilizadas soluções de HCl e HNO_3 , ácidos comumente empregados para o pré-tratamento de bioissorventes e dessorção de analitos. Como a eficiência de sorção está relacionada com a temperatura e o tempo de contato, o estudo de lixiviação com alteração desses parâmetros poderia gerar informações sobre as melhores condições de pré-condicionamento do material radicular. A TABELA 3.6 apresenta os teores iniciais de diversos analitos no material radicular de *P. notatum*, após digestão ácida em forno microondas com cavidade.

TABELA 3.6 – Teores de elementos de interesse ($mg\ Kg^{-1}$) presentes na amostra de material radicular não lixiviado, n=3.

Elemento	Raiz não lixiviada
Al	1211 ± 7
Ca	3030 ± 9
Cd	< LQ
Co	< LQ
Cu	$21,7 \pm 0,1$
Fe	694 ± 7
K	4007 ± 28
Mg	2255 ± 9
Mn	$61,5 \pm 0,6$
Na	$160,2 \pm 0,6$
Ni	< LQ
Zn	26 ± 1

Observando-se os teores dos elementos de interesse lixiviados do material radicular e apresentados nas FIGURAS 3.3, 3.4 e 3.5, constatam-se desvios extremamente elevados para os tratamentos empregando apenas uma alíquota de solução ácida durante a lixiviação, sendo que o mesmo ocorreu para os demais analitos investigados. Uma das justificativas para este fato pode ser a agitação menos vigorosa observada para as soluções quando 30 mL foram adicionados, em relação aos procedimentos com adição de alíquotas de 10 mL. Algumas vezes foi observado que parte da raiz depositava-se no fundo dos frascos para a primeira situação, enquanto permanecia suspensa quando o volume da solução utilizada era menor.

Outra justificativa para os desvios altos observados para a determinação dos analitos seria a dificuldade de extração dos elementos em face das diferentes espécies iônicas presentes no material radicular.

Não foram observadas evidências de que o aumento de temperatura ou o tempo de contato elevado de 30 para 60 min favorecessem melhor lixiviação dos analitos presentes no material radicular, o que pode ser observado em todas as figuras a seguir. O mesmo comportamento foi observado para os demais analitos estudados.

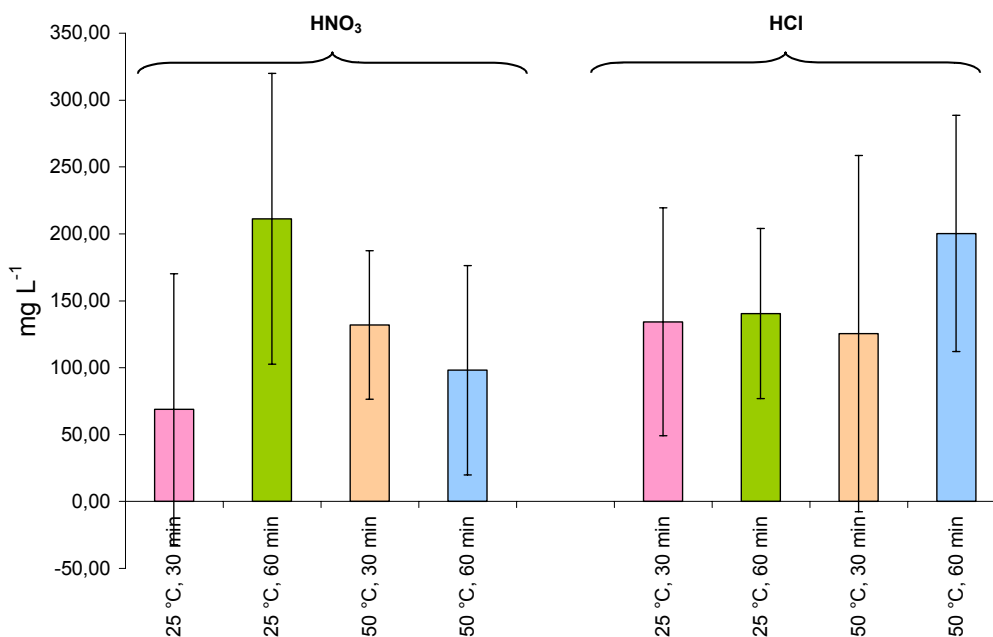


FIGURA 3.3 – Teores de Al lixiviados por soluções de HNO₃ 0,14 mol L⁻¹ e HCl 0,12 mol L⁻¹ nos experimentos com alíquota única, em diferentes temperaturas e tempos de exposição, n = 3.

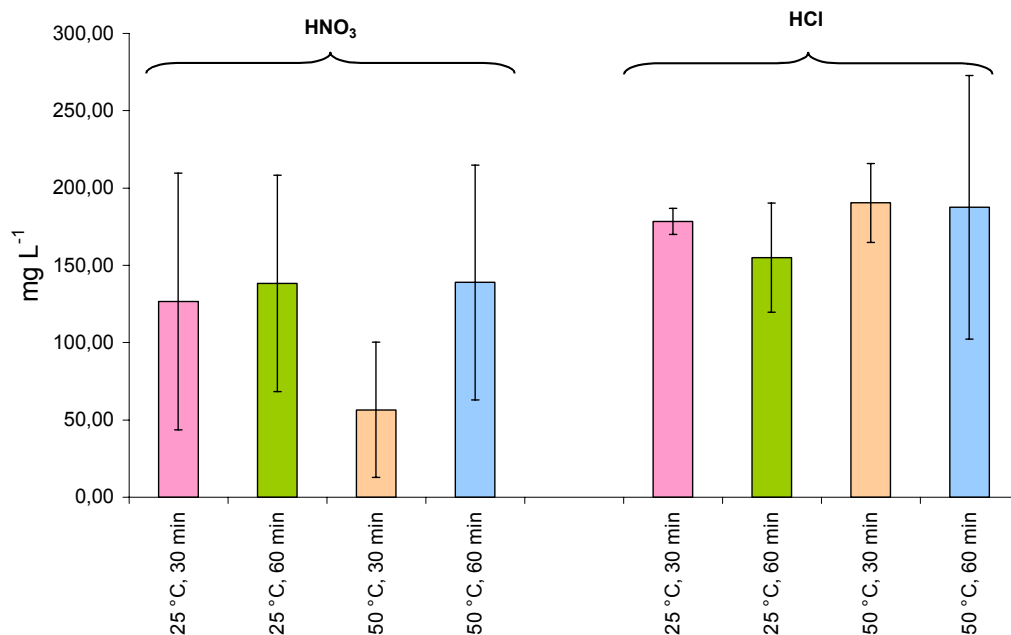


FIGURA 3.4 – Teores de Fe lixiviados por soluções de HNO₃ 0,14 mol L⁻¹ e HCl 0,12 mol L⁻¹ nos experimentos com alíquota única, em diferentes temperaturas e tempos de exposição, n = 3.

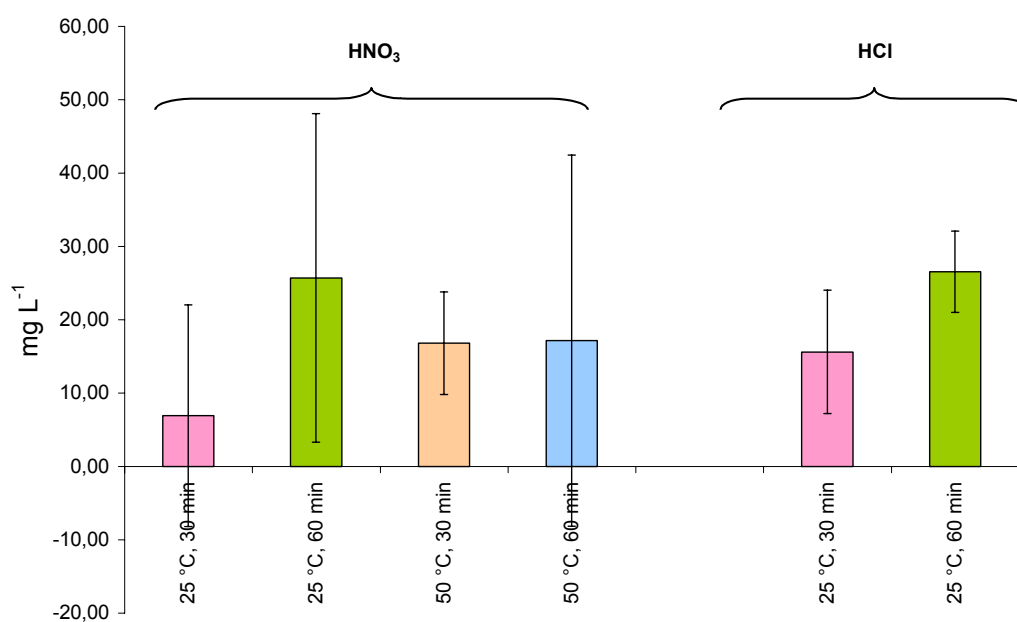


FIGURA 3.5 – Teores de Cu lixiviados por soluções de HNO₃ 0,14 mol L⁻¹ e HCl 0,12 mol L⁻¹ nos experimentos com alíquota única, em diferentes temperaturas e tempos de exposição, n = 3.

A extração de Cu empregando as condições de maior temperatura e HCl não proporcionaram extração deste elemento, não sendo apresentadas as barras referentes a estes experimentos na FIGURA 3.5.

Para a maioria dos elementos determinados, há um decréscimo das concentrações dos analitos nas alíquotas recolhidas no estudo com 3 adições sucessivas de solução ácida às raízes, sendo a primeira detentora de pelo menos 50 % do total extraído para todos os analitos estudados. As FIGURAS 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10 apresentam o perfil do comportamento para alguns dos analitos.

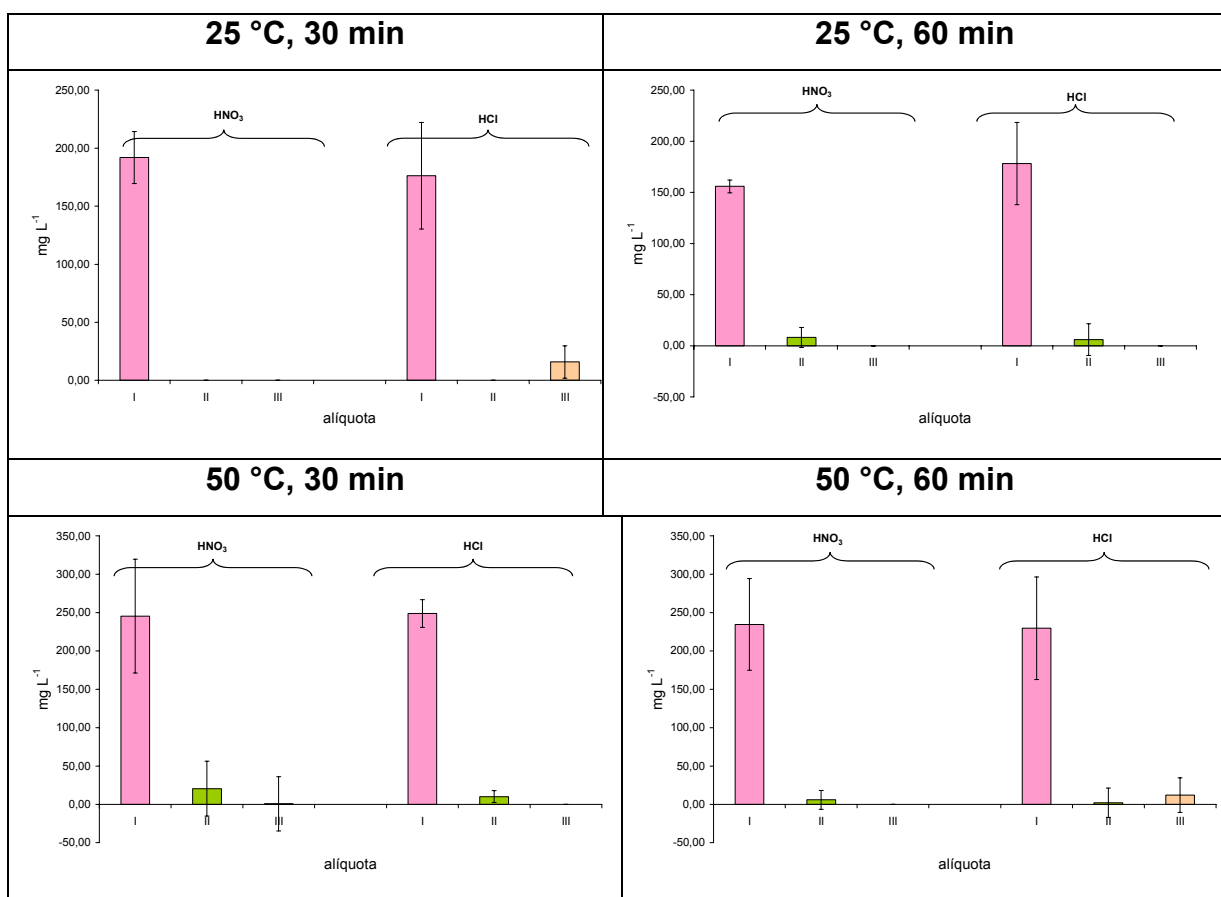


FIGURA 3.6 – Teores de Al lixiviados por soluções de HNO₃ 0,14 mol L⁻¹ e HCl 0,12 mol L⁻¹ nos experimentos com 3 alíquotas, em diferentes temperaturas e tempos de exposição, n = 3.

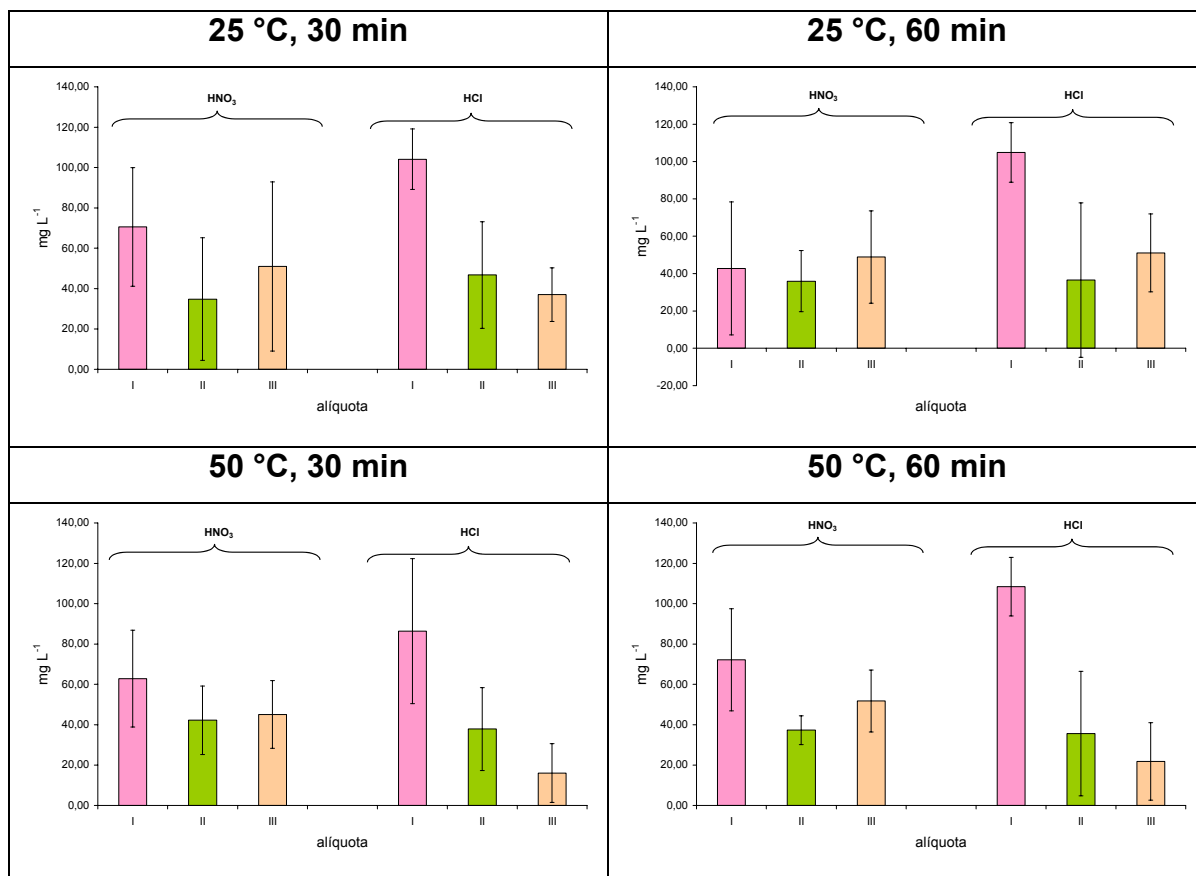


FIGURA 3.7 – Teores de Fe lixiviados por soluções de HNO₃ 0,14 mol L⁻¹ e HCl 0,12 mol L⁻¹ nos experimentos com 3 alíquotas, em diferentes temperaturas e tempos de exposição, n = 3.

Examinado os gráficos construídos com os resultados obtidos, pode-se constatar que não há diferenças consideráveis entre as capacidades de lixiviação das soluções de HNO₃ e HCl, à exceção do estudo realizado para Fe (FIGURAS 3.4 e 3.7), onde os teores extraídos com a solução de HCl foram superiores em todas as condições de temperatura, tempo de contato e número de alíquotas. Esse fato pode ser explicado pela ação complexante do HCl, que permite uma melhor extração deste elemento.

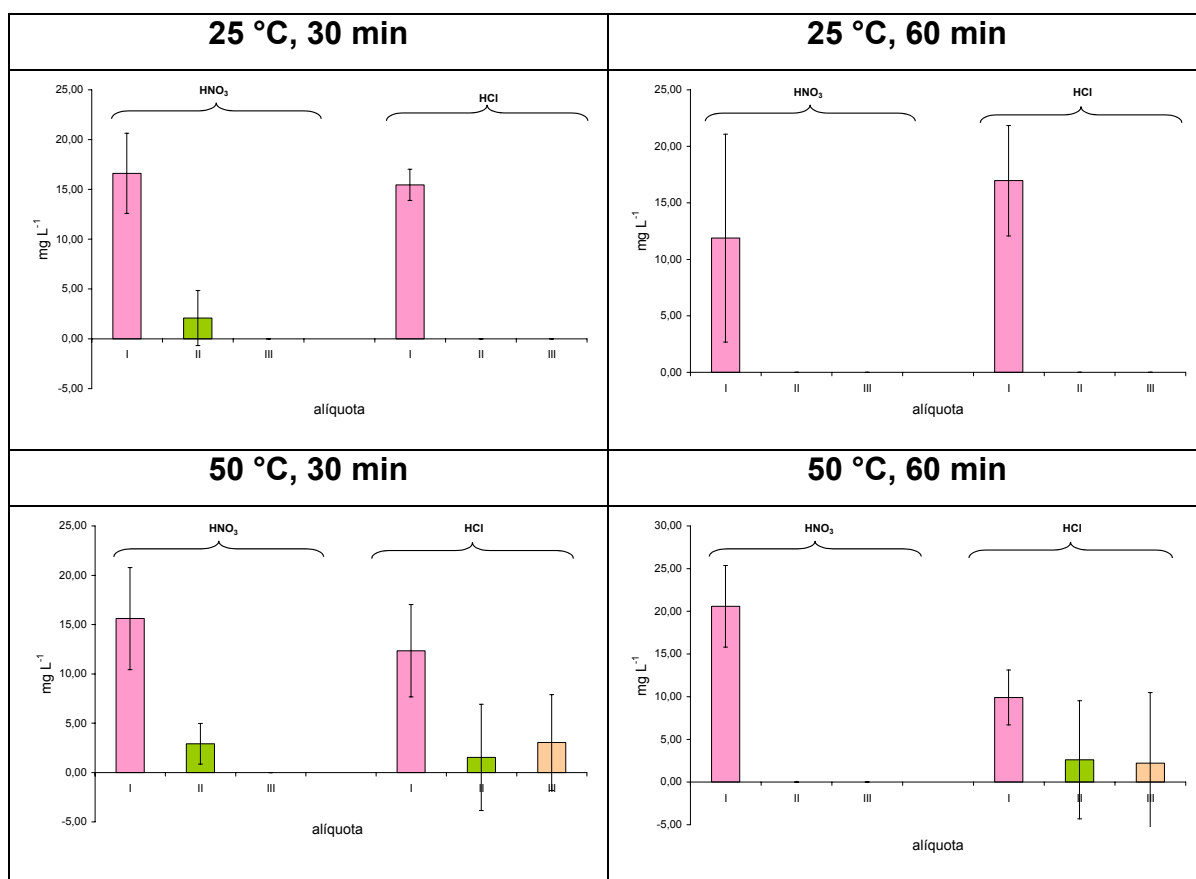


FIGURA 3.8 – Teores de Cu lixiviados por soluções de HNO₃ 0,14 mol L⁻¹ e HCl 0,12 mol L⁻¹ nos experimentos com 3 alíquotas, em diferentes temperaturas e tempos de exposição, n = 3.

É interessante destacar o fato de que, para as espécies iônicas de alcalinos e alcalinos terroso, a primeira alíquota de solução ácida foi sempre suficiente para lixiviação total dos íons trocáveis (FIGURAS 3.9, 3.10).

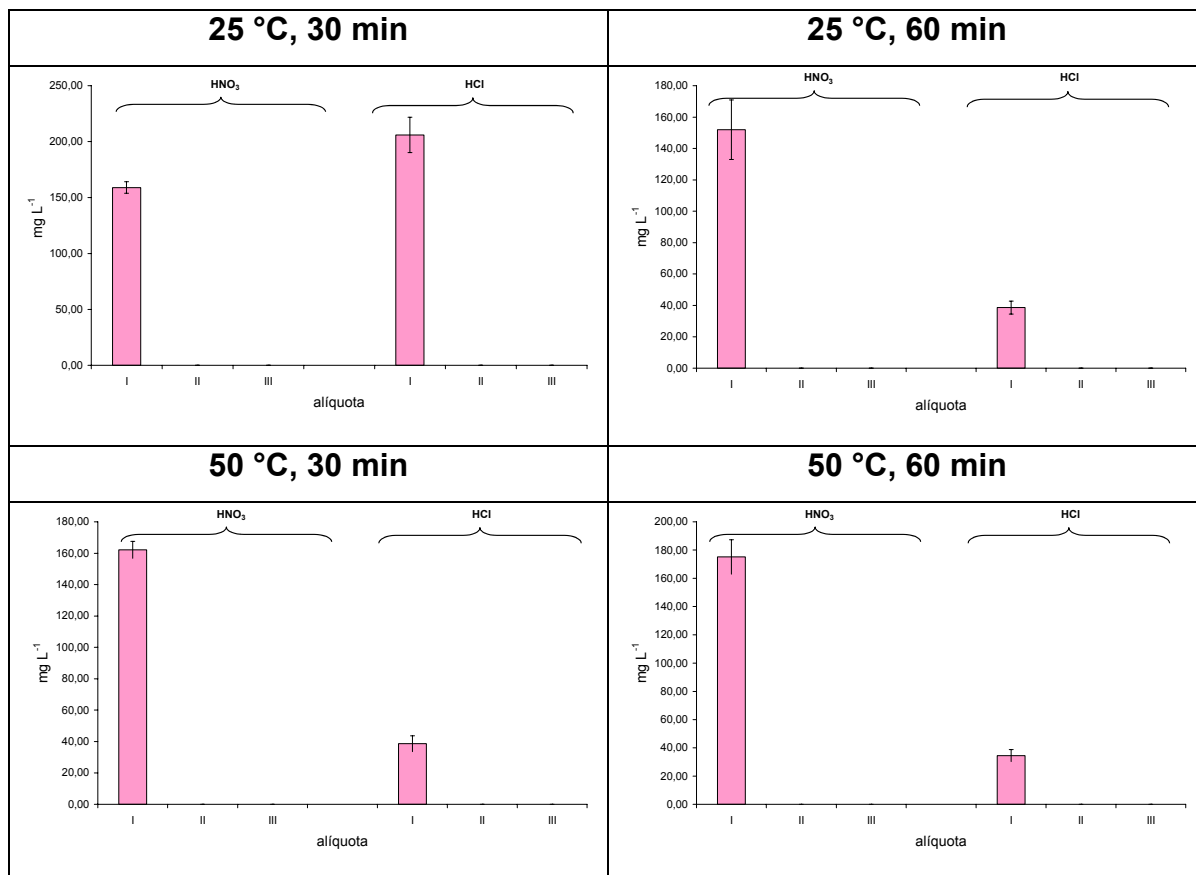


FIGURA 3.9 – Teores de Na lixiviados por soluções de HNO₃ 0,14 mol L⁻¹ e HCl 0,12 mol L⁻¹ nos experimentos com 3 alíquotas, em diferentes temperaturas e tempos de exposição, n = 3.

Baseando-se nas observações feitas a partir do estudo de limpeza do material radicular, optou-se por realizá-la à temperatura ambiente, o que simplificou o procedimento, empregando-se 5 alíquotas de 10 mL de solução de HNO₃ 0,14 mol L⁻¹ para cada 50 mg de material radicular de *P. notatum*. O emprego de um número maior de alíquotas poderia favorecer ainda mais a troca iônica dos íons presentes originalmente no material radicular por íons H⁺. Assim, para a lixiviação, uma bandeja com capacidade para 12 frascos de 50 mL foi adaptada a um agitador de tubos. Este sistema de agitação foi utilizado para todos os estudos em batelada. O procedimento foi estabelecido em 10 min de agitação a 200 rpm e 2 min de centrifugação a 3000 rpm para cada alíquota.

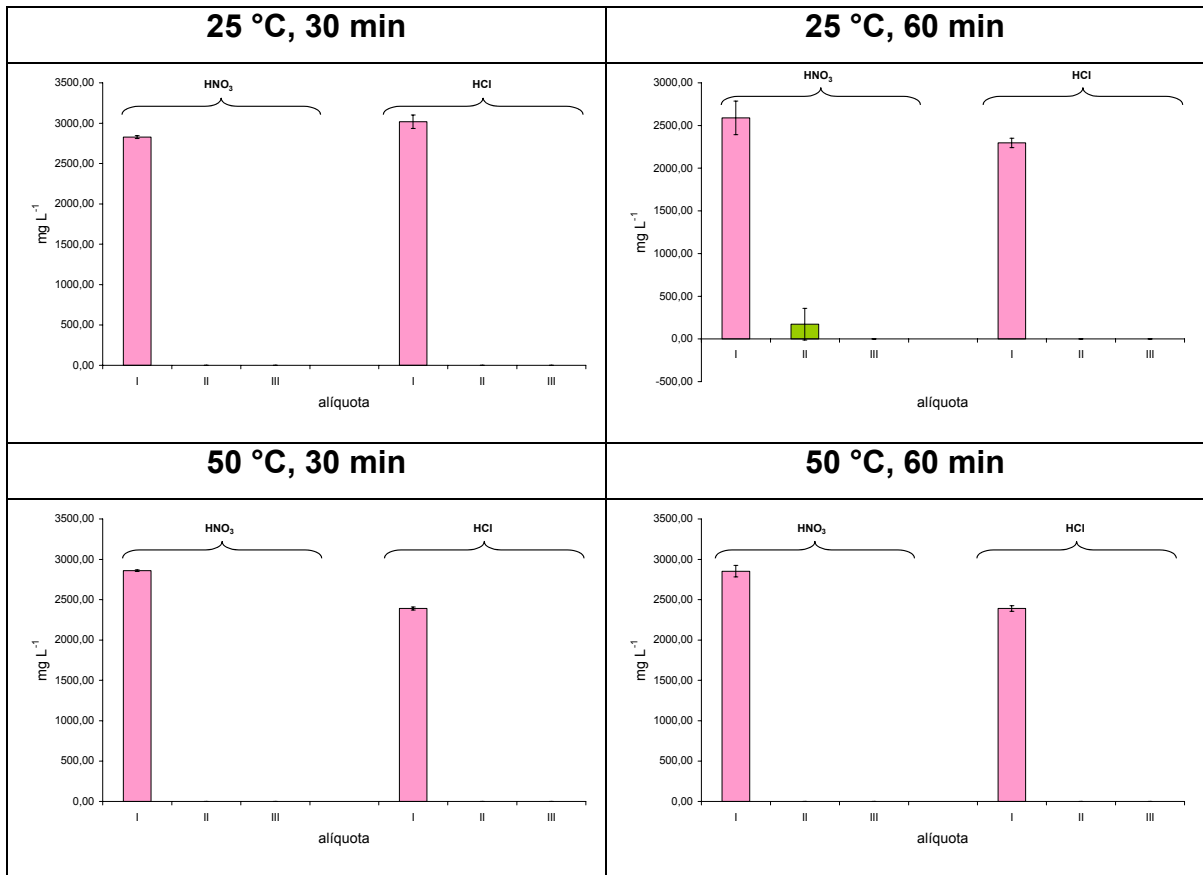


FIGURA 3.10 – Teores de Ca lixiviados por soluções de HNO₃ 0,14 mol L⁻¹ e HCl 0,12 mol L⁻¹ nos experimentos com 3 alíquotas, em diferentes temperaturas e tempos de exposição, n = 3.

Após a lixiviação ácida com 5 alíquotas o material radicular foi seco, pesado e submetido a digestão ácida. Comparando-se os teores dos elementos de interesse presentes no material não lixiviado, apresentados na TABELA 3.6, com os teores encontrados para o lixiviado e apresentados na TABELA 3.7, pode-se observar uma remoção completa de K e Zn promovidas pela lixiviação. Extrações consideráveis foram observadas para Ca, Mg e Mn.

TABELA 3.7 – Teores de elementos de interesse (mg Kg^{-1}) presentes na amostra de material radicular lixiviado com 5 alíquotas de 10 mL de solução de HNO_3 $0,14 \text{ mol L}^{-1}$, $n=3$.

Elemento	Raiz lixiviada
Al	710 ± 73
Ca	219 ± 24
Cd	< LQ
Co	< LQ
Cu	< LQ
Fe	491 ± 47
K	< LQ
Mg	46 ± 5
Mn	$2,4 \pm 0,7$
Na	40 ± 2
Ni	< LQ
Zn	< LQ

Para Al e Fe, a lixiviação com solução ácida possibilitou a remoção de 47,7 % e 36,7 % , respectivamente. Altos teores destes elementos eram esperados devido a abundância de compostos de Al e Fe nos minerais formadores do solo e à íntima interação da raiz com o mesmo. A dificuldade de extração de ambos está relacionada a associação com compostos de silício, presentes em abundância em forrageiras.

Observando-se os desvios dos resultados apresentados na TABELA 3.7 podemos afirmar que o procedimento de lixiviação estabelecido possibilitou uma maior repetibilidade dos teores extraídos, o que permite um material mais homogêneo, independentemente das porções tratadas.

A lixiviação com ácido mostra-se um procedimento adequado a remoção de íons metálicos do biosorvente, e tem sido freqüentemente utilizada como recurso para aumentar a capacidade de sorção uma vez que disponibiliza sítios de sorção (MAHAN & HOLCOMBE, 1992; SHENJUN & HOLCOMBE, 1990; SHENJUN & HOLCOMBE, 1991; MAHAN *et al.*, 1989 e CRIST *et al.*, 1988).

3.4.1.2 – Avaliação preliminar do emprego do material radicular para sorção em diferentes potenciais hidrogeniônicos em batelada

Para uma avaliação preliminar, trabalhou-se com solução multielementar, somente para verificar quais analitos seriam sorvidos pelo bio sorvente estudado, mesmo em situação de possível competição. As FIGURAS 3.11 a 3.23 apresentam os gráficos dos perfis das curvas de sorção para os elementos presentes na solução multielementar utilizada nos diferentes pHs avaliados.

Pode-se observar nas FIGURAS 3.11 a 3.15 que para as espécies iônicas de K^+ , Na^+ , Mg^{2+} não foi observada sorção e, para Ca^{2+} , a sorção não ultrapassou 10 %, o que era esperado, por se tratar de íons metálicos de metais alcalinos e alcalinos terrosos menos complexantes que íons de metais de transição.

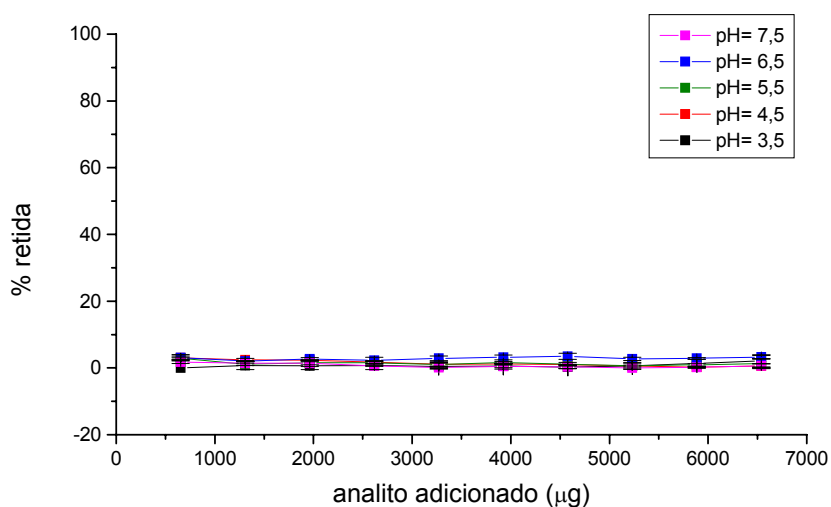


FIGURA 3.11 – Perfil das curvas de sorção K^+ em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$.

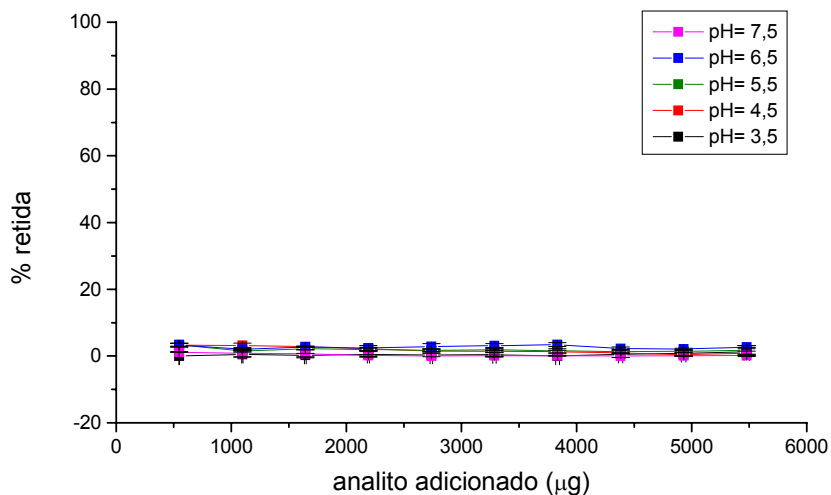


FIGURA 3.12 – Perfil das curvas de sorção Na^+ em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$

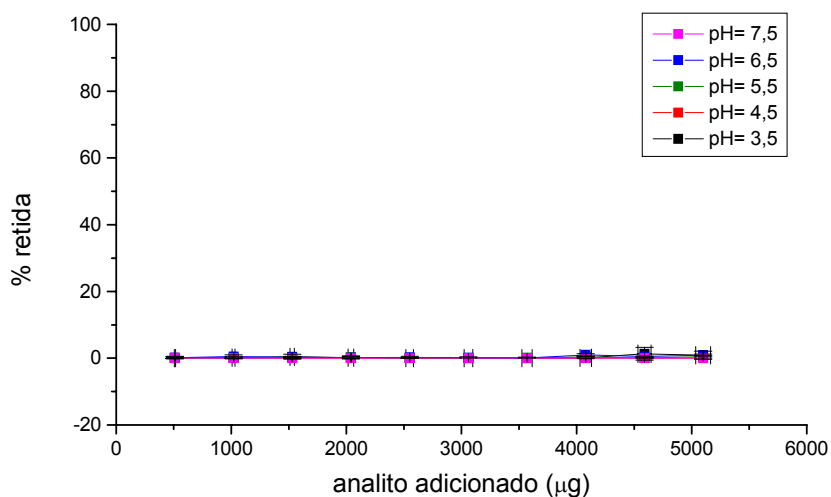


FIGURA 3.13 – Perfil das curvas de sorção Mg^{2+} em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$

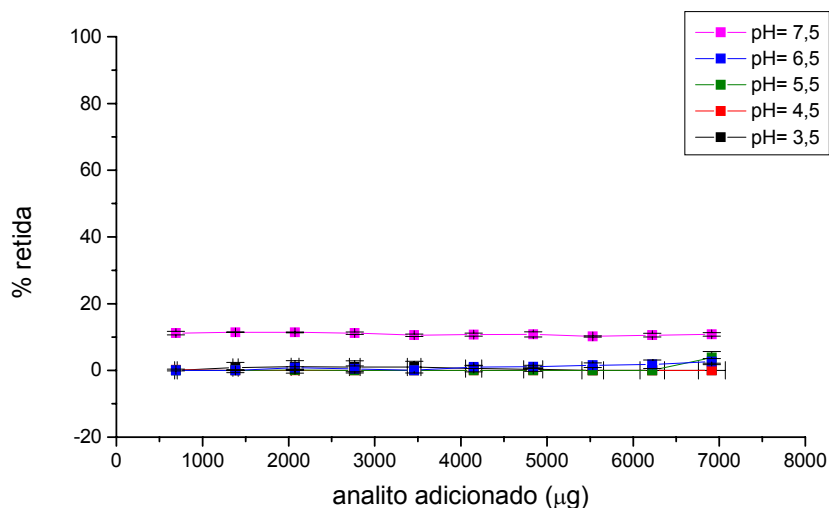


FIGURA 3.14 – Perfil das curvas de sorção Ca^{2+} em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$

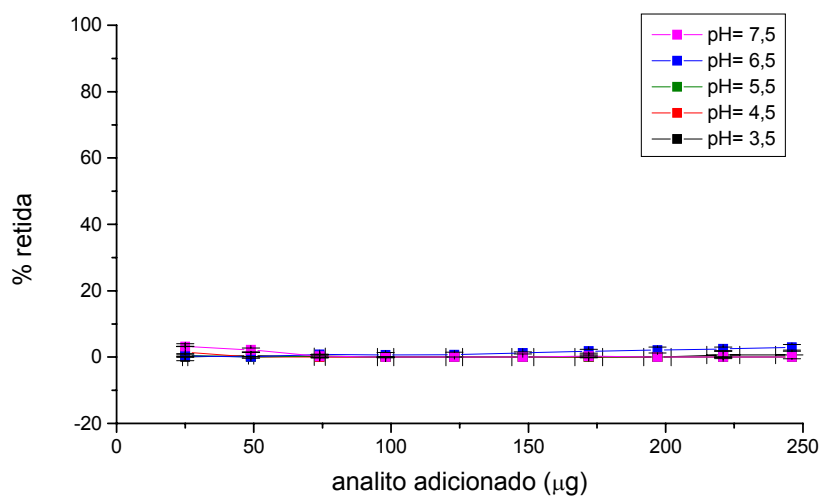


FIGURA 3.15 – Perfil das curvas de sorção Mn^{2+} em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$

O íon Mn^{2+} também não apresentou sorção sugerindo que o biossorvente não apresenta sítios disponíveis para esse analito.

Para os íons Cd^{2+} e Co^{2+} , a sorção observada foi em torno de 10 % para pH 6,5 (FIGURAS 3.16 e 3.17). A porcentagem retida para esses analitos não apresenta viabilidade para estudos de pré-concentração. Explicações levantadas

para a baixa sorção destes íons: 1) a ausência de número suficiente de grupos funcionais orgânicos que agem como sítios de sorção para estes íons, 2) competição entre os sítios de sorção e a formação de complexos com os íons presentes na solução (e.g. H_3CCOOH^-) e, 3) competição entre os analitos em solução pelos sítios de sorção.

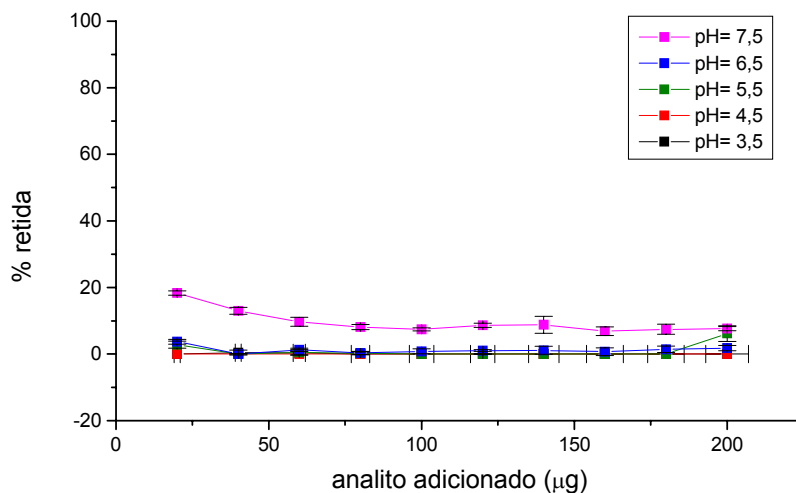


FIGURA 3.16 – Perfil das curvas de sorção Cd^{2+} em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$

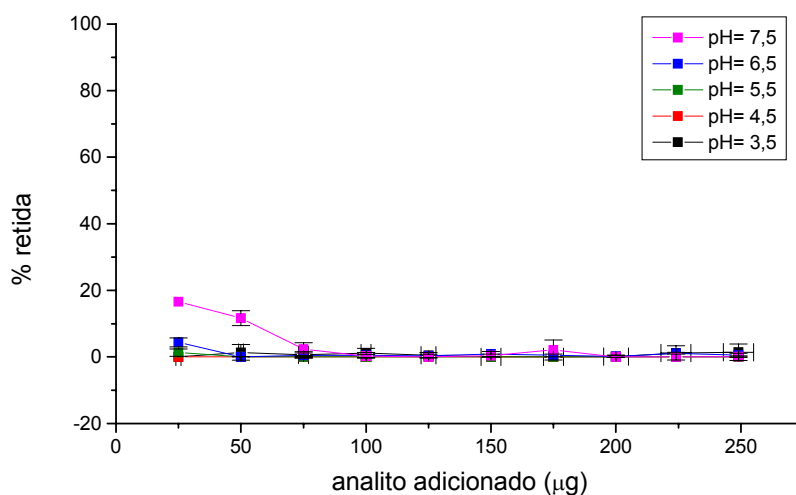


FIGURA 3.17 – Perfil das curvas de sorção Co^{2+} em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$

Para Ni^{2+} e Zn^{2+} , ambos íons de metais da mesma série de transição, observou-se sorção de cerca de 15 % para pH 6,5, como pode ser verificado nas FIGURAS 3.18 e 3.19.

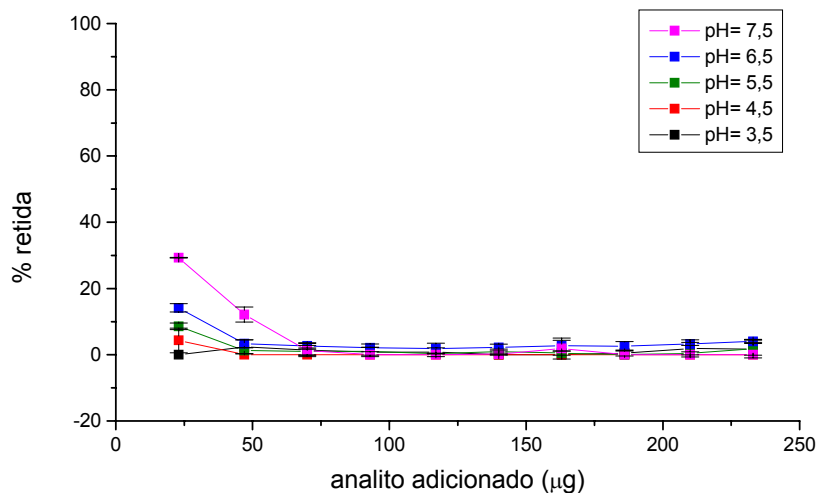


FIGURA 3.18 – Perfil das curvas de sorção Ni^{2+} em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$

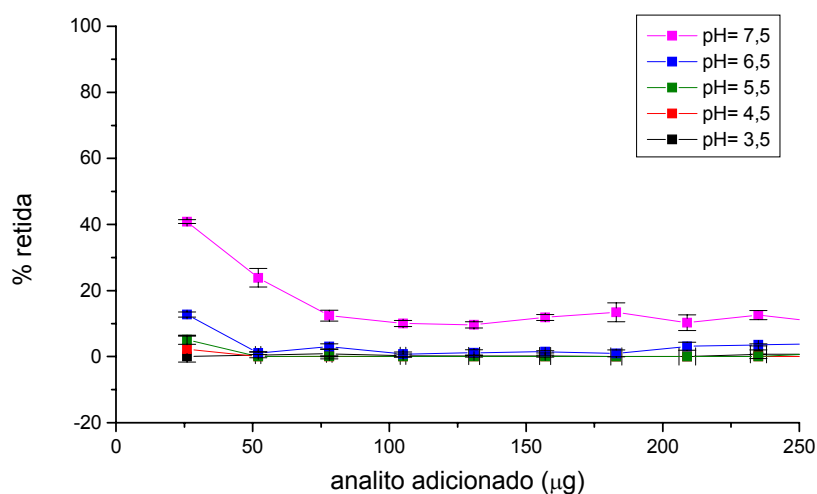


FIGURA 3.19 – Perfil das curvas de sorção Zn^{2+} em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$

Os íons que obtiveram porcentagens de retenção mais elevadas foram Cu^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+} . As FIGURAS 3.20, 3.21 e 3.22 apresentam os gráficos de porcentagem de retenção para os íons citados.

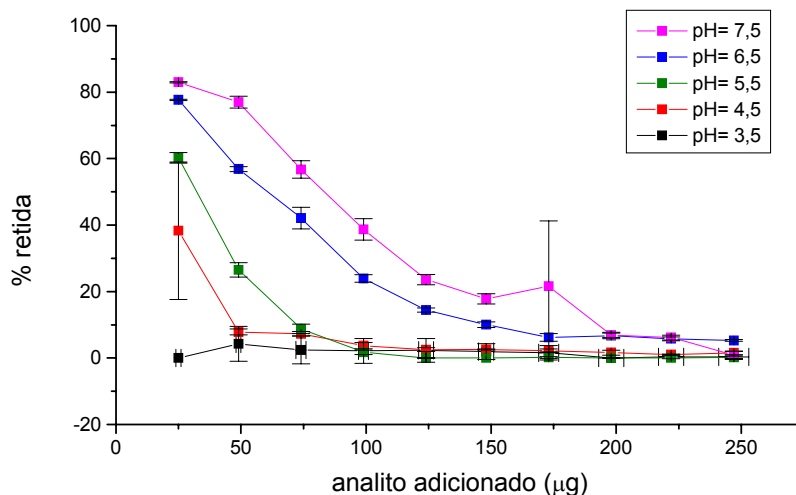


FIGURA 3.20 – Perfil das curvas de sorção Cu^{2+} em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$

Observando-se o perfil de sorção para Cu^{2+} , nota-se pequena diferença entre a eficiência de sorção para os pHs 7,5 e 6,5. Segundo BAES Jr. & MEMSMER (1976), as espécies iônicas predominantes no pH 6,5 são Cu^{2+} ($\cong 60\%$) e $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{2+}$ ($\cong 40\%$). A sorção de espécies iônicas de Cu pode se dar por interações químicas, principalmente em grupos contendo enxofre, além de interações eletrostáticas, como constatou CRIST *et al.* (1988) para sorção deste elemento por algas.

Nos pHs abaixo de 6,5, a concentração da espécie $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{2+}$ decai, enquanto a concentração de Cu^{2+} aumenta (BAES Jr. & MEMSMER, 1976), reduzindo a capacidade de sorção, uma vez que espécies na forma de hidróxidos são preferencialmente retidas por sítios de sorção. LEE *et al.* (1998) empregaram partes de plantas para sorção de Cu^{2+} e verificaram o aumento da eficiência de sorção deste elemento com o aumento do pH. O acréscimo na eficiência de sorção de Cu^{2+} por raízes de plantas com o aumento de pH é relatado por LUJAN *et al.* (1994) e GARDEA-TORRESDEY *et al.* (1996).

As diferenças de eficiência de sorção com a variação do pH podem parecer, a princípio, um aspecto negativo em procedimentos de sorção. Contudo, estas diferenças estão associadas a variação das espécies em solução, o que pode contribuir para estudos cujo objetivo é a especiação.

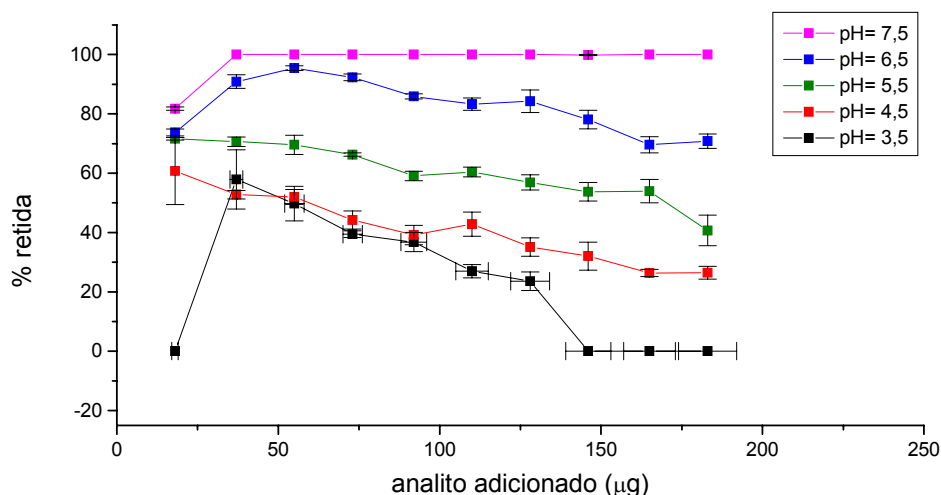


FIGURA 3.21 – Perfil das curvas de sorção Fe^{3+} em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$

Observando-se a FIGURA 3.21, verifica-se sorção acima de 80 % das espécies iônicas de Fe presentes na solução multielementar a pH 6,5. A hidrólise de Fe^{3+} ocorre muito mais prontamente do que a hidrólise de Fe^{2+} a partir de pH 1. A espécie dinuclear $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$ e as espécies monucleares FeOH^{2+} e $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ estão presentes em soluções ácidas e, a medida que o pH migra para regiões mais básicas as espécies $\text{Fe}(\text{OH})_3(\text{aq})$ e $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$ são formadas. Para concentrações de Fe $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, mais de 90 % deste elemento está na forma de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ a pH 7,5, o que não deve ser diferente para a solução multielementar. Contudo, segundo BAES Jr. & MEMSMER (1976), a precipitação do hidróxido de ferro ocorre pronunciadamente a partir de pH 8.

No pH 6,5, as espécies presentes em solução são $\text{Fe}(\text{OH})_3$, em maior quantidade, e $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$. Para o pH 5,5, as espécies que podem estar presentes em solução de concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de Fe^{3+} são $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, $\text{Fe}_3(\text{OH})_4^{5+}$ e $\text{Fe}(\text{OH})_3$.

No pH 4,5 as espécies predominantes são $\text{Fe}_3(\text{OH})_4^{5+}$, $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ e $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$ para soluções $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e, $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$ e FeOH^{2+} para soluções $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (BAES Jr. & MEMSMER, 1976).

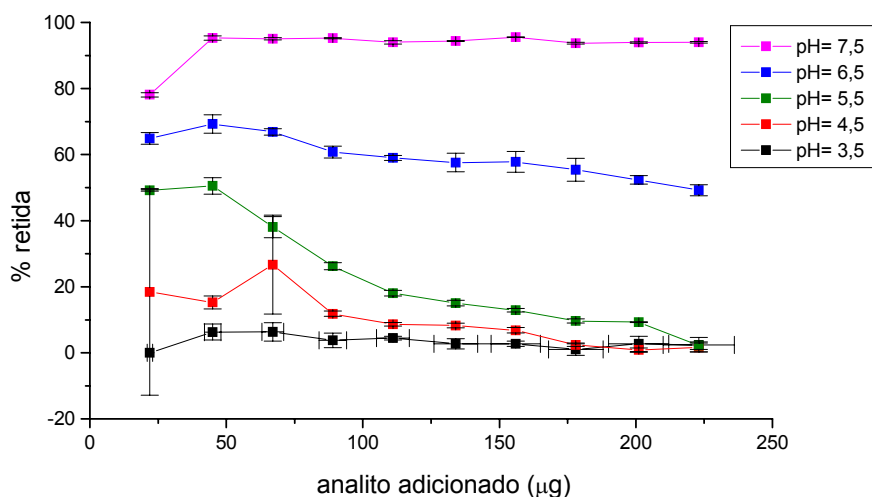


FIGURA 3.22 – Perfil das curvas de sorção Al^{3+} em diferentes valores de pH com adição seqüencial de alíquotas de 5 mL de solução multielementar contendo $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do analito em 50 mg de material radicular previamente lixiviado, $n = 3$

O Al^{3+} não é hidrolizável abaixo de pH 3, sendo menos sorvido. Contudo, o Al^{3+} apresenta uma diversidade de produtos de hidrólise, inclusive com formação de dímeros. Para soluções em torno de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ há a predominância do dímero $\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{24}^{7+}$ entre os pHs 4 e 8 e, para soluções com concentração em torno de $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, cerca de 80 % do Al está na forma de $\text{Al}(\text{OH})_3$, coexistindo também $\text{Al}(\text{OH})_2^+$, $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ e $\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{24}^{7+}$, em menor quantidade (BAES Jr. & MEMSMER, 1976),.

As espécies iônicas de cada elemento, presentes na solução, variam de acordo com o pH. Para assegurar que no pH 7,5, no qual foi observado o máximo de retenção para todos os metais, não ocorreu precipitação de hidróxidos, foram tomados 5 mL da solução multielementar que tiveram o pH ajustado para 7,5. A esses 5 mL de solução multielementar não foi adicionado material radicular e, após agitação e centrifugação, recolheu-se alíquotas de 3 mL com cuidado para que a ponteira da pipeta não chegasse ao fundo do recipiente. As alíquotas foram analisadas por ICP OES de acordo com o programa da TABELA 3.3 e as

concentrações determinadas foram as mesmas da solução multielementar original, indicando que não houve perdas por precipitação no pH 7,5. Contudo, para os estudos posteriores preferiu-se empregar os meios de sorção com pH ajustado para 6,5.

A sorção preferencial de íons trivalentes era esperada, uma vez que as espécies iônicas destes cátions apresentam maior afinidade por sítios orgânicos, ricos em elétrons e comuns em bio sorventes.

3.4.1.3 – Avaliação da cinética de sorção do material radicular

A importância de se avaliar a cinética de sorção está na possibilidade de prever o tempo necessário de contato da amostra com o bio sorvente para que ocorra uma maior sorção do analito de interesse.

A FIGURA 3.23 apresenta o perfil de cinética de sorção para 4 dos 13 íons investigados neste estudo. Pode-se observar que a eficiência de sorção ocorre já no primeiro minuto de contato do material radicular com a solução multielementar, o que é coerente com estudos apresentados na literatura, que afirmam que procedimentos empregando plantas como bio sorventes apresentam rápida sorção de íons metálicos, alcançando o equilíbrio antes dos primeiros 10 min (MALAMAS *et al.*, 1984; RUETER & MOREL, 1981). Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que a sorção ocorre instantaneamente, com o bio sorvente estudado.

Contudo, deve-se considerar que no procedimento adotado para avaliação da cinética de sorção cada alíquota retirada afetava a concentração da solução uma vez que alterava a relação material suspenso:solução. Desta forma, sugere-se experimentos onde a raiz seja colocada em contato com diferentes alíquotas da solução, que seriam recolhidas por filtração após os tempos estabelecidos de contato.

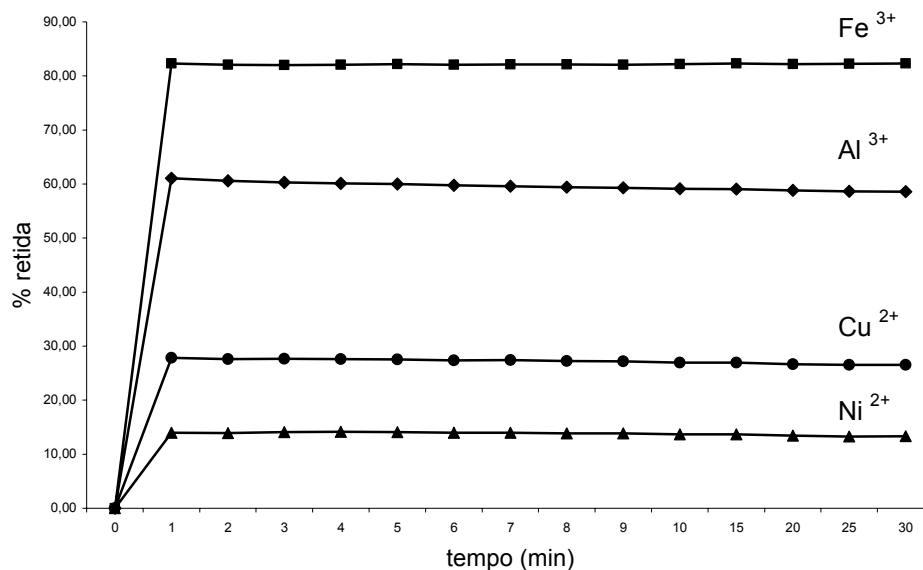


FIGURA 3.23 – Cinética de sorção para espécies iônica de Al^{3+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} em suspensão de material radicular de *P. notatum* lixiviado $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ em solução multielementar a pH 6,5; $n = 3$.

Deve-se considerar que o procedimento para avaliação da cinética de sorção foi conduzido com uma proporção de $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de material radicular em relação à solução multielementar, enquanto os estudos de capacidade de sorção e pH foram realizados com uma proporção de 10 mg mL^{-1} do bio sorvente. A menor proporção de massa/solução multielementar está diretamente relacionada com a disponibilidade de sítios de sorção. Sendo que, um aumento na massa do bio sorvente proporciona um acréscimo proporcional na sorção.

3.4.1.4 – Avaliação da capacidade de sorção de Al^{3+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} e Cu^{2+} em sistema em fluxo

A capacidade de sorção de um material é definida pelo número máximo de moles de um determinado elemento retido por massa de sorvente. Esse valor é encontrado quando a concentração do sobrenadante é igual à concentração inicial da solução empregada nos estudos de sorção. Esse estado é mais facilmente alcançado em estudos em fluxo do que em batelada, pela praticidade do procedimento.

Dentre os analitos estudados haviam íons que apresentavam número de oxidação 3+ e 2+. Para avaliar analitos de diferentes números de oxidação escolheu-se, dos elementos que apresentaram sorção nos estudos em batelada com solução multielementar, Al^{3+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} . Os íons Al^{3+} e Fe^{3+} foram escolhidos pela elevada sorção apresentada, quando comparados aos outros analitos; Cu^{2+} , devido ao perfil de saturação pronunciado e já visualizado no estudo em batelada e Ni^{2+} , por se tratar de um elemento tóxico à plantas, apesar de não ter apresentado sorção pronunciada no procedimento multielementar realizado em batelada.

Assim, em sistema de fluxo, foram realizados estudos com soluções mono e multielementar em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ e KNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 6,5. Este valor de pH foi escolhido para minimizar problemas com a precipitação dos analitos na forma de hidróxidos, o que ocorreu para Fe^{3+} e Al^{3+} nas soluções monoelementares e na solução multielementar contendo apenas os 4 elementos em estudo, a pH 7,5.

À partir dos dados obtidos da determinação dos analitos nas alíquotas de solução que passaram através das colunas, construiu-se gráficos de isotermas de sorção. Estas isotermas foram estudadas na tentativa de identificar qual modelo matemático descreveria melhor o comportamento de sorção de cada analito com o material lixiviado e não lixiviado, com os diferentes meios empregados e em experimentos mono e multielementar.

3.4.1.4.1 – Influência da lixiviação ácida na sorção de íons metálicos em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$

A) Estudos para Cu^{2+}

A TABELA 3.8 apresenta os valores de r^2 , q^0 (constante relacionada a capacidade de sorção), b (constante relacionada a energia de sorção) e β (constante relacionada ao grau de heterogeneidade da superfície do sorvente) para os modelos aplicados no estudo de sorção de Cu^{2+} em material radicular lixiviado e não lixiviado.

TABELA 3.8 – Parâmetros teóricos obtidos através da aplicação de modelos de isotermas sobre os dados experimentais para a sorção de Cu^{2+} em material radicular lixiviado e não lixiviado a pH 6,5 e meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ 0,5 mol L^{-1} .

Material radicular	Modelo	q^0 (mmol g^{-1})	b (L mmol $^{-1}$)	β	r^2
lixiviado	Langmuir	0,064 ± 0,002	4,0 ± 0,6	-	0,9569
	Freundlich	-	0,0477 ± 0,0003	0,280 ± 0,009	0,9927
	Sips	0,17 ± 0,07	0,1 ± 0,2	0,38 ± 0,06	0,9936
	BET	0,0465 ± 0,005	91 ± 8	-	0,9897
	Redlich-Peterson	0,049 ± 0,001	33 ± 17	0,76 ± 0,02	0,9942
	Toth	0,030 ± 0,004	43 ± 22	0,87 ± 0,01	0,9943
não lixiviado	Langmuir	0,039 ± 0,002	3,7 ± 0,7	-	0,9242
	Freundlich	-	0,0290 ± 0,0002	0,288 ± 0,009	0,9931
	Sips	1 ± 10	0 ± 1	0,29 ± 0,06	0,9928
	BET	0,0284 ± 0,0004	92 ± 11	-	0,9836
	Redlich-Peterson	42 ± 303	0,001 ± 0,003	8 ± 7	0,2963
	Toth	0,01 ± 0,03	1928 ± 35138	0,84 ± 0,01	0,9930

Observando-se somente os valores de r^2 apresentados na TABELA 3.8 poder-se-ia concluir que, à exceção de Langmuir e Redlich-Peterson (para material não lixiviado), todos os modelos poderiam descrever os dados experimentais obtidos. Contudo, considerando-se os desvios padrão das constantes fornecidas pelos modelos a partir dos dados experimentais (maiores que 10 %), o modelo de Freundlich apresentou-se o mais aceitável para ambos os casos. Para confirmar essa hipótese traçou-se o gráfico da linearização desta isoterma, $\log C \times \log q$ (FIGURA 3.24), obtendo-se valores de r^2 significativos.

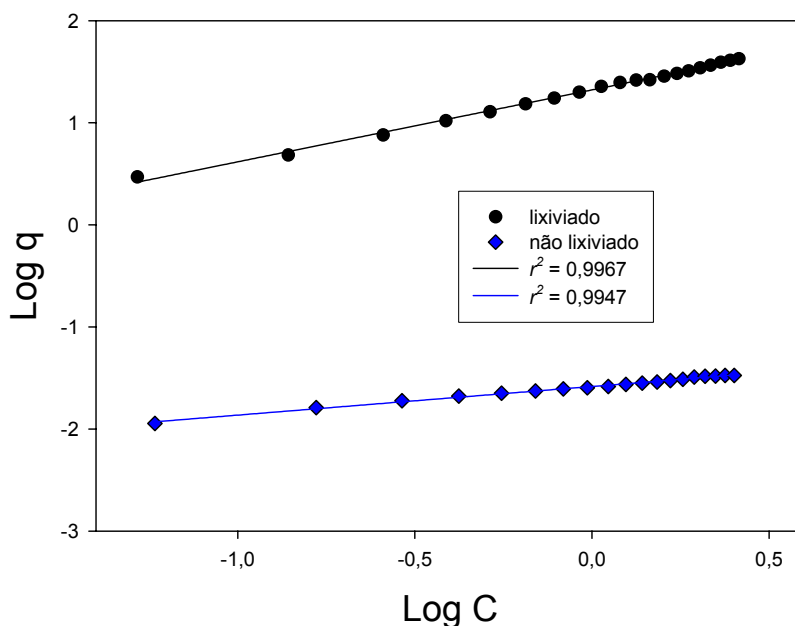


FIGURA 3.24 – Linearização, segundo o modelo de Freundlich, para sorção de Cu^{2+} em material radicular lixiviado e não lixiviado em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

O valor de b para o material lixiviado é praticamente o dobro do que o encontrado para o material não lixiviado, o que permite concluir que a afinidade de sorção é maior para o biossorvente tratado com ácido. Já o parâmetro β não se alterou, mostrando que, apesar da lixiviação ácida, o grau de heterogeneidade do sistema não foi afetado para sorção de Cu^{2+} .

O modelo de Freundlich não fornece o parâmetro relacionado à capacidade de sorção (q^0). Contudo, pelos gráficos apresentados na FIGURA 3.25, observa-se que a sorção foi maior quando se empregou material radicular lixiviado. Este fato confirma a idéia de que a lixiviação ácida favorece a sorção, provavelmente pela disponibilização de sítios através da substituição de íons metálicos por H^+ . Como o experimento foi realizado até que a concentração da solução que passava através da coluna se igualasse a concentração da solução inicial pode-se saturar o biossorvente, possibilitando o cálculo da capacidade de sorção. Assim, a capacidade de sorção para Cu^{2+} por massa de material radicular, já descontado o não sorvido e eluído pelo 1 mL do meio de sorção (branco analítico), foi $0,062 \pm 0,002 \text{ mmol g}^{-1}$ para material lixiviado e $0,036 \pm 0,003 \text{ mmol g}^{-1}$ para material não lixiviado.

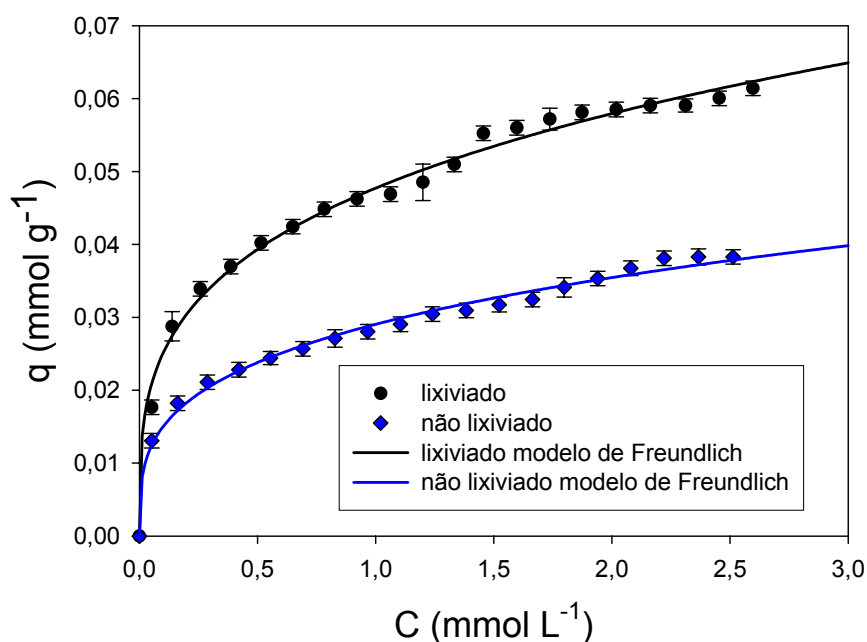


FIGURA 3.25 – Isotermas e modelos teóricos de melhor ajuste para a sorção de Cu^{2+} em material radicular lixiviado e não lixiviado, empregando solução monoelementar a pH 6,5 e meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

B) Estudos para Ni^{2+}

Nos estudos de sorção de Ni^{2+} em material radicular lixiviado e não lixiviado obtiveram-se as constantes apresentadas na TABELA 3.9. Pode-se observar que todos os modelos apresentaram valor de r^2 com alta correlação para os dois materiais investigados. Contudo, à exceção dos modelos de Langmuir e de Freundlich, todos os outros apresentaram pelo menos uma constante com desvio superior a 10 %, sendo assim descartados. Para avaliar a possibilidade da sorção de Ni^{2+} , em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$, ser explicada pelo modelo de Langmuir traçou-se um gráfico de linearização desta isoterma ($C \times C/q$), apresentado na FIGURA 3.26, que apresentou índice de correlação próximo a 1, satisfazendo as condições para a descrição dos dados experimentais por este modelo. A linearização pelo modelo de Freundlich também foi traçada obtendo coeficientes de correlação (r^2) 0,9741 e 0,9540 para material lixiviado e não lixiviado, respectivamente.

TABELA 3.9 – Parâmetros teóricos obtidos através da aplicação de modelos de isotermas sobre os dados experimentais para a sorção de Ni^{2+} em material radicular lixiviado e não lixiviado a pH 6,5 e meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ 0,5 mol L^{-1} .

Material radicular	Modelo	q^0 (mmol g^{-1})	b (L mmol $^{-1}$)	β	r^2
lixiviado	Langmuir	$0,0109 \pm 0,0002$	$14,7 \pm 0,9$	-	0,9984
	Freundlich	-	$0,0120 \pm 0,0003$	$0,28 \pm 0,02$	0,9936
	Sips	$0,0121 \pm 0,0006$	12 ± 2	$0,78 \pm 0,07$	0,9994
	BET	$0,0095 \pm 0,0001$	96 ± 4	-	0,9994
	Redlich-Peterson	$0,0113 \pm 0,0002$	19 ± 2	$0,91 \pm 0,03$	0,9994
	Toth	$0,0097 \pm 0,0004$	21 ± 3	$0,95 \pm 0,02$	0,9994
não lixiviado	Langmuir	$0,0063 \pm 0,0001$	19 ± 1	-	0,9971
	Freundlich	-	$0,0066 \pm 0,0002$	$0,21 \pm 0,02$	0,9918
	Sips	$0,0068 \pm 0,0004$	18 ± 3	$0,8 \pm 0,1$	0,9978
	BET	$0,0055 \pm 0,0001$	139 ± 15	-	0,9962
	Redlich-Peterson	$0,0064 \pm 0,0001$	24 ± 5	$0,95 \pm 0,04$	0,9977
	Toth	$0,0058 \pm 0,0004$	25 ± 7	$0,97 \pm 0,02$	0,9977

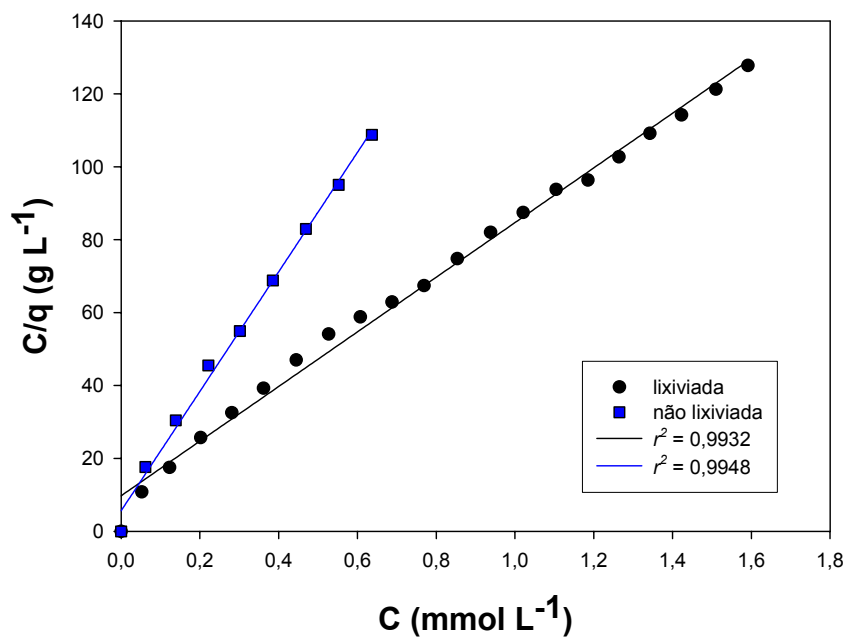


FIGURA 3.26 – Linearização, segundo o modelo de Langmuir, para sorção de Ni^{2+} em material radicular lixiviado e não lixiviado em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ 0,5 mol L^{-1} .

As constantes relacionadas à capacidade de sorção (q^0) obtidas para o material lixiviado e não lixiviado foram, respectivamente, $0,0109 \pm 0,0002$ mmol g^{-1} e $0,0063 \pm 0,0001$ mmol g^{-1} . Estes valores foram condizentes com os obtidos

experimentalmente, $0,0103 \pm 0,005 \text{ mmol g}^{-1}$ (material lixiviado) e $0,0064 \pm 0,0006 \text{ mmol g}^{-1}$ (material não lixiviado). A FIGURA 3.27 apresenta as isotermas de sorção para Ni^{2+} com a predição do modelo de Langmuir.

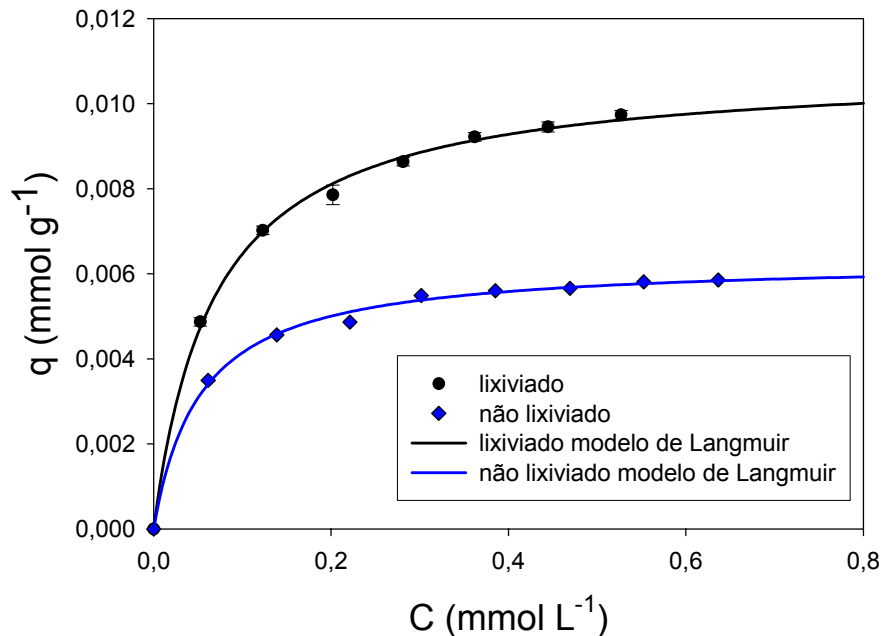


FIGURA 3.27 – Isotermas e modelos teóricos de melhor ajuste para a sorção de Ni^{2+} em material radicular lixiviado e não lixiviado, empregando solução monoelétrica a pH 6,5 e meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

C) Estudos para Al^{3+}

Para os estudos de sorção de Al^{3+} , os valores de r^2 e das constantes fornecidas pelos modelos de isotermas testados estão apresentados na TABELA 3.10. Pode-se observar que os valores de r^2 para os modelos de Langmuir e Freundlich para material lixiviado são muito próximos e os desvios não são pronunciados de forma a influenciar na indicação de um deles para descrever os dados experimentais.

TABELA 3.10 – Parâmetros teóricos obtidos através da aplicação de modelos de isotermas sobre os dados experimentais para a sorção de Al^{3+} em material radicular lixiviado e não lixiviado a pH 6,5 e meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ 0,5 mol L^{-1} .

Material radicular	Modelo	q^0 (mmol g^{-1})	b (L mmol $^{-1}$)	β	r^2
lixiviado	Langmuir	0,67 ± 0,01	1,41 ± 0,07	-	0,9936
	Freundlich	-	0,381 ± 0,002	0,535 ± 0,009	0,9937
	Sips	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,75 ± 0,03	0,9969
	Redlich-Peterson	0,50 ± 0,02	3,3 ± 0,6	0,68 ± 0,04	0,9957
	Toth	0,34 ± 0,04	4 ± 1	0,80 ± 0,03	0,9955
não lixiviado	Langmuir	0,120 ± 0,007	3,9 ± 0,5	-	0,9778
	Freundlich	-	0,124 ± 0,002	0,56 ± 0,01	0,9943
	Sips	1 ± 2	0,1 ± 0,2	0,59 ± 0,07	0,9939
	Redlich-Peterson	0,124 ± 0,004	4894 ± 149998	0,44 ± 0,06	0,9943
	Toth	0,02 ± 0,04	270 ± 1291	0,67 ± 0,03	0,9941

Contudo, observando-se a FIGURA 3.28, verifica-se que, apesar do modelo de Langmuir se ajustar perfeitamente à maioria dos dados experimentais, os primeiros pontos da curva não se ajustam, sendo estes os mais representativos do perfil de sorção de um analito. O modelo de Freundlich ajusta-se perfeitamente a esses pontos da curva experimental, tendo a parte onde não ocorre ajuste (parte intermediária da curva de dados experimentais) apresentado maiores desvios. Esses fatos contribuem para atribuir ao modelo de Freundlich a explicação dos dados experimentais. Não foi obtida conversão do modelo BET para esse estudo.

Para eliminar a dúvida sobre o modelo a ser atribuído, realizou-se uma tentativa de linearização segundo o modelo de Langmuir, traçando-se um gráfico de $C \times C/q$, apresentado na FIGURA 3.29.

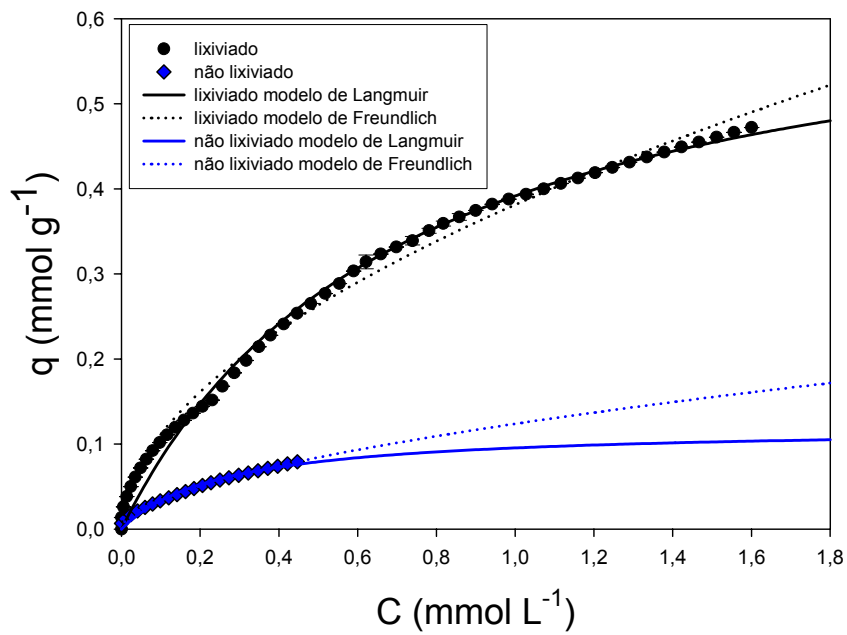


FIGURA 3.28 – Isotermas e modelos teóricos de melhor ajuste para a sorção de Al^{3+} em material radicular lixiviado e não lixiviado, empregando solução monoelementar a pH 6,5 e meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

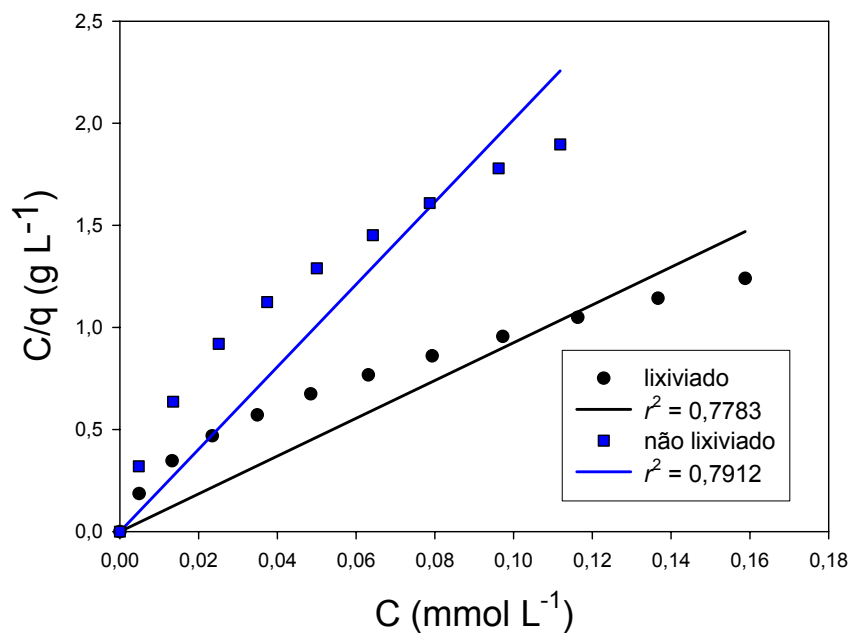


FIGURA 3.29 – Linearização, segundo o modelo de Langmuir, para sorção de Al^{3+} em material radicular lixiviado e não lixiviado em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Pelo próprio gráfico apresentado na linearização da isoterma (FIGURA 3.29) pode-se concluir que os dados experimentais não obedecem a Langmuir, o que é reafirmado pelos valores de r^2 obtidos para o material lixiviado e não lixiviado, 0,7783 e 0,7912, respectivamente. Para confirmar e representatividade do modelo de Freundlich, procedeu-se a linearização desta isoterma, apresentada na FIGURA 3.29 com valores de r^2 considerados significativos para a descrição dos dados experimentais para ambos os materiais estudados.

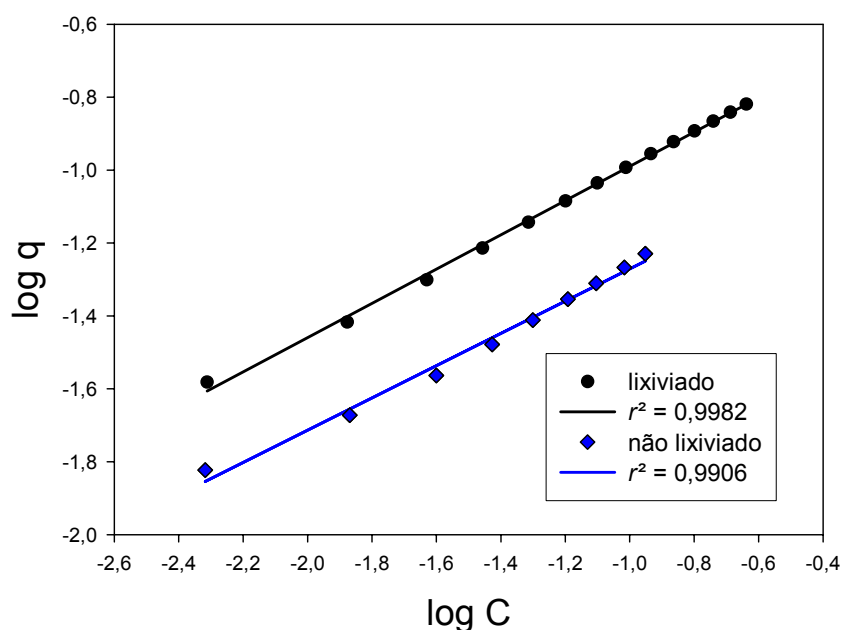


FIGURA 3.30 – Linearização, segundo o modelo de Freundlich, para sorção de Al^{3+} em material radicular lixiviado e não lixiviado em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

A capacidade de sorção, obtida através de dados experimentais da saturação do bioissorvente, para o Al^{3+} em material lixiviado, foi de $0,472 \pm 0,003 \text{ mmol g}^{-1}$ e para material não lixiviado de $0,249 \pm 0,004 \text{ mmol g}^{-1}$. A sorção mais elevada para os experimentos empregando material radicular lixiviado também pode ser visualizada nos gráficos de isotermas apresentados na FIGURA 3.28. Assim como nos estudos para Cu^{2+} , os valores da constante β não apresentaram grande variação, enquanto o valor de b para o material lixiviado é cerca de 150 % maior que o obtido para material não lixiviado, indicando uma maior afinidade de sorção entre o íon e os sítios disponíveis no bioissorvente.

D) Estudos para Fe³⁺

Os estudos de sorção realizados para Fe³⁺ apresentaram, como para os resultados dos três íons anteriormente discutidos, uma maior capacidade de sorção para o material lixiviado ($0,116 \pm 0,004 \text{ mmol g}^{-1}$) do que para o material não lixiviado, cuja sorção máxima obtida foi $0,050 \pm 0,002 \text{ mmol g}^{-1}$, condizente com o valor das constantes relacionadas a capacidade de sorção (q^0) de $0,055 \pm 0,002 \text{ mmol g}^{-1}$ obtida pelo modelo Sips e, $0,0534 \pm 0,0007 \text{ mmol g}^{-1}$ para o modelo de Langmuir, apresentados na TABELA 3.11, juntamente com as outras constantes dos modelo teóricos de isoterma aplicados ao sistema.

TABELA 3.11 – Parâmetros teóricos obtidos através da aplicação de modelos de isotermas sobre os dados experimentais para a sorção de Fe³⁺ em material radicular lixiviado e não lixiviado a pH 6,5 e meio H₃CCOONH₄ 0,5 mol L⁻¹.

Material radicular	Modelo	q^0 (mmol g ⁻¹)	b (L mmol ⁻¹)	β	r^2
Lixiviado	Langmuir	$0,137 \pm 0,006$	19 ± 2	-	0,9831
	Freundlich	-	$0,246 \pm 0,006$	$0,45 \pm 0,01$	0,9966
	Sips	$0,4 \pm 0,1$	1 ± 1	$0,56 \pm 0,04$	0,9979
	BET	$0,111 \pm 0,003$	37 ± 4	-	0,9873
	Redlich-Peterson	$0,50 \pm 0,02$	$3,3 \pm 0,6$	$0,68 \pm 0,04$	0,9957
	Toth	$0,34 \pm 0,04$	4 ± 1	$0,80 \pm 0,03$	0,9955
não lixiviado	Langmuir	$0,0534 \pm 0,0007$	64 ± 3	-	0,9980
	Freundlich	-	$0,12 \pm 0,01$	$0,37 \pm 0,03$	0,9714
	Sips	$0,055 \pm 0,002$	61 ± 7	$0,94 \pm 0,05$	0,9982
	BET	$0,0491 \pm 0,0006$	107 ± 5	-	0,9978
	Redlich-Peterson	$0,057 \pm 0,005$	65 ± 3	$0,97 \pm 0,04$	0,9981
	Toth	$0,0533 \pm 0,0008$	70 ± 6	$0,98 \pm 0,02$	0,9981

Para o material radicular lixiviado sugere-se o modelo de Freundlich por apresentar uma maior proximidade com os dados experimentais, uma vez que o valor de r^2 é próximo de 1, os desvios para as constantes calculadas são menores e a linearização segundo este modelo apresentou-se satisfatória, FIGURA 3.31.

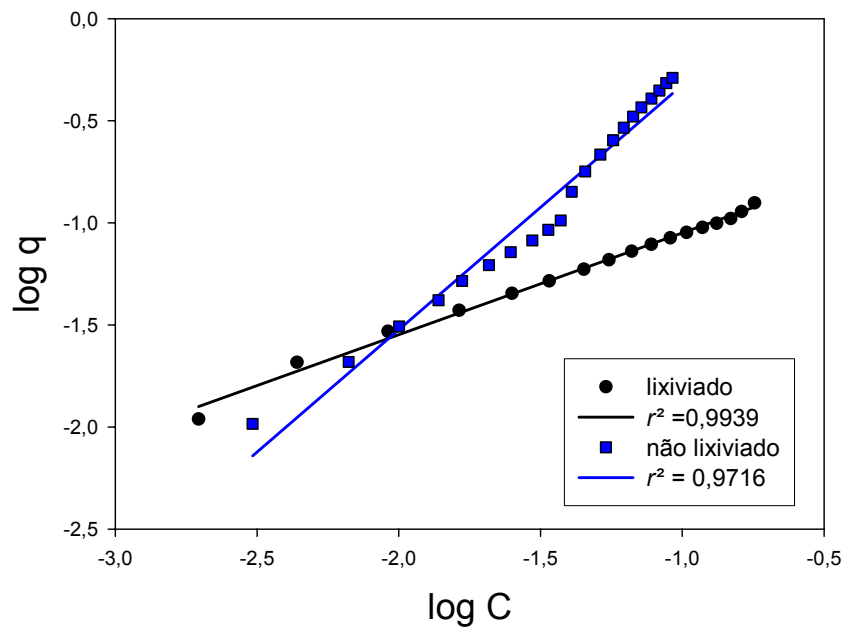


FIGURA 3.31 – Linearização, segundo o modelo de Freundlich, para sorção de Fe^{3+} em material radicular lixiviado e não lixiviado em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Para o material não lixiviado, à exceção do modelo de Freundlich, todos se ajustaram, com variações dos desvios das constantes calculadas praticamente desprezíveis. Para verificar a obediência a Langmuir procedeu-se a linearização dos dados experimentais, apresentados na FIGURA 3.32, sobre os quais não determinou-se o valor de r^2 pelas condições das curvas traçadas. Devido ao material lixiviado apresentar características mais próximas ao modelo de Freundlich, sugere-se o modelo Sips para descrever o sistema com material não lixiviado, por ser mais simples que os demais que obtiveram correlação e por combinar as isotermas de Freundlich e Langmuir.

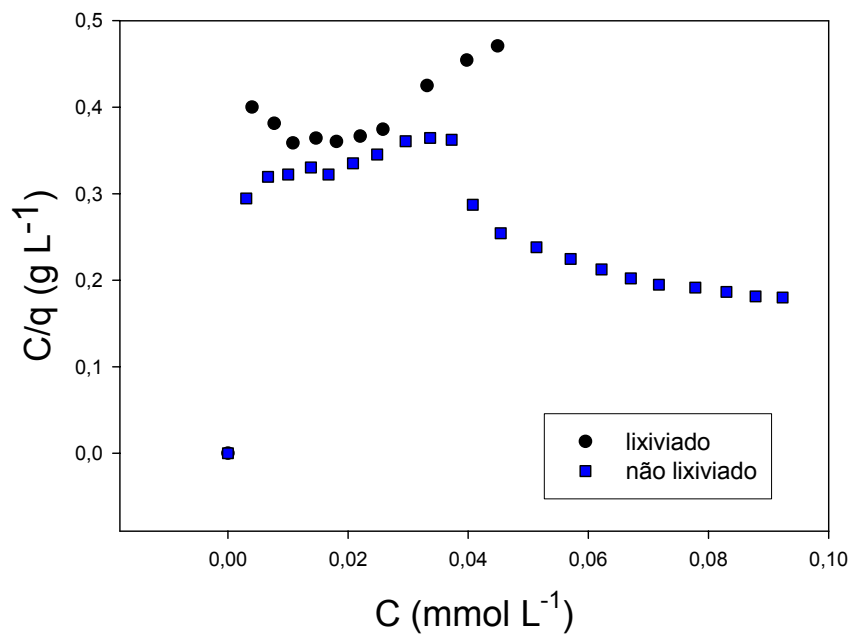


FIGURA 3.32 – Linearização, segundo o modelo de Langmuir, para sorção de Fe^{3+} em material radicular lixiviado e não lixiviado em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

É possível que a lixiviação ácida interfira nos sítios de sorção que conferem a característica de monocamada para a sorção de Fe^{3+} em material não lixiviado. Os efeitos do tratamento de lixiviação sobre o material estão discutidos no Capítulo 4, que trata da investigação de constituintes da parede celular de material radicular de *P. notatum*. A FIGURA 3.33 apresenta as isotermas de sorção para Fe^{3+} em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para material radicular lixiviado e não lixiviado.

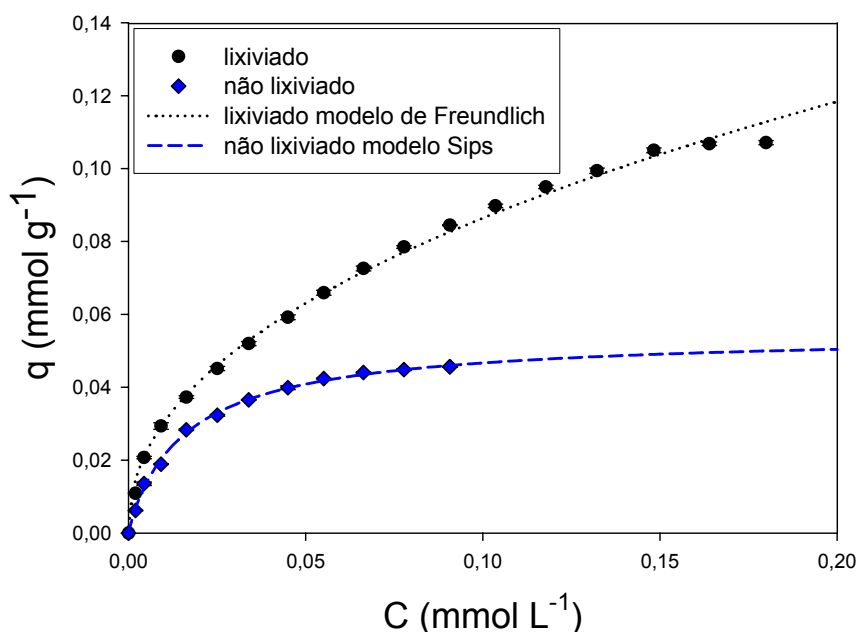


FIGURA 3.33 – Isotermas e modelos teóricos de melhor ajuste para a sorção de Fe^{3+} em material radicular lixiviado e não lixiviado, empregando solução monoelementar a pH 6,5 e meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

As capacidades de sorção do material radicular sempre se apresentaram maiores quando este foi tratado com lixiviação ácida. Assim, nos estudos posteriores todo o material radicular de *P. notatum* foi previamente lixiviado com ácido segundo às condições já estabelecidas.

Para a sorção dos analitos estudados em material radicular lixiviado o modelo que se ajustou mais perfeitamente foi o de Freundlich (exceção para Ni^{2+} que foi descrito pelo modelo de Langmuir). Seguir esta isoterma implica que, para os íons avaliados o bioadsorvente apresenta sítios de sorção heterogêneos, com diferentes afinidades pelos analitos, sendo os mecanismos de sorção estritamente físicos. Segundo a classificação de mecanismos de sorção apresentadas na TABELA 3.1, pode-se estabelecer que a sorção dos íons estudados ocorre por adsorção física, ou troca iônica com os sítios disponíveis no material radicular de *P. notatum*. Para o Ni^{2+} , seguir o modelo de Langmuir implica que o bioadsorvente se comporta homogeneamente frente esse íons, possibilitando uma sorção em monocamada.

Observando-se os valores da constante b para material lixiviado em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$, pode-se sugerir a seguinte ordem de afinidade entre o

bio sorvente e os analitos estudados: Al^{3+} ($b = 0,381 \pm 0,002 \text{ L mmol}^{-1}$) > Fe^{3+} ($b = 0,246 \pm 0,006 \text{ L mmol}^{-1}$) > Cu^{2+} ($b = 0,0477 \pm 0,0003 \text{ L mmol}^{-1}$) > Ni^{2+} , cujo valor de b não pode ser comparado, uma vez que é representado por um modelo de isoterma diferente dos demais íons estudados. Contudo, pode ser considerado o de menor afinidade avaliando-se os dados de capacidade de sorção obtidos para material lixiviado: $\text{Al}^{3+} = 0,472 \pm 0,003 \text{ mmol g}^{-1}$, $\text{Fe}^{3+} = 0,116 \pm 0,004 \text{ mmol g}^{-1}$, $\text{Cu}^{2+} = 0,062 \pm 0,002 \text{ mmol g}^{-1}$ e $\text{Ni}^{2+} = 0,012 \pm 0,001 \text{ mmol g}^{-1}$)

3.4.1.4.2 – Investigação da influência de diferentes meios na sorção de Cu^{2+} , Ni^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+}

Para investigar se haveria influência do meio utilizado na sorção dos analitos estudados substituiu-se o meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pelo meio KNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, de mesma força iônica. A preocupação da manutenção da mesma força iônica na solução se deve ao fato de variações neste parâmetro influenciarem a capacidade de sorção, o que poderia resultar em avaliação errônea sobre o efeito dos íons presentes na solução. O efeito da variação da força iônica foi estudado por LEE *et al.*, 1998, que avaliou a sorção de Cu^{2+} e Pb^{2+} em resíduos de maçã, originários da produção de suco, sob diferentes forças iônicas sendo que, com aumento da força iônica, a sorção destes íons decrescia. A explicação dada para esta observação foi a possível dificuldade de acesso dos íons metálicos ao bio sorvente por este estar recoberto pelo eletrólito.

Como as espécies provenientes da dissociação do $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ podem formar complexos em solução, a substituição do meio de sorção por um não complexante possibilitaria observar se ocorreu a formação de complexos, e como interferiram na capacidade de sorção dos analito e no perfil das isotermas de sorção. A TABELA 3.12 apresenta as constantes de formação de alguns complexos provenientes das espécies do meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ e os íons metálicos estudados. Os íons Cu^{2+} , Ni^{2+} e Fe^{3+} formam complexos com $\text{H}_3\text{COOH}^-_{(\text{aq})}$.

TABELA 3.12 – Constantes termodinâmicas de formação para complexos formados à partir dos íons Cu^{2+} , Ni^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , H_3CCOO^- . Dados apresentados para a temperatura de 25°C (<http://ctdp.ensmp.fr/species>).

Espécie	Constante de formação (log K_1)
$\text{CuCH}_3\text{COO}_{(\text{aq})}$	-4,4274
$\text{CuCH}_3\text{COO}^+$	-2,5252
$\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_{2(\text{aq})}$	-7,1908
$\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_3^-$	-11,3543
$\text{NiCH}_3\text{COO}^+$	-3,3278
$\text{FeCH}_3\text{COO}^{2+}$	3,88*

* a 20 °C

A) Estudos para Cu^{2+}

Comparando os valores das constantes obtidas teoricamente para sorção de Cu^{2+} em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ apresentadas na TABELA 3.8 com as encontradas para o meio KNO_3 , expostas na TABELA 3.13, observa-se que, apesar de ambos os casos serem melhor representados pelo modelo de Freundlich, os valores das constantes diferem consideravelmente. Pode-se constatar que: 1) a afinidade de sorção do biossorvente pelo íon metálico é cerca de 10 vezes superior em meio KNO_3 do que em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$; 2) o biossorvente apresenta sítios mais heterogêneos quando se trata da sorção do íon metálico (relação com a constante β). A afinidade de sorção pode ser confirmada pelos gráficos das isotermas apresentados na FIGURA 3.34 e pela determinação da capacidade de sorção do material através dos dados experimentais, $0,52 \pm 0,03 \text{ mmol g}^{-1}$ e $0,062 \pm 0,002 \text{ mmol g}^{-1}$ de Cu^{2+} para os meios KNO_3 e $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$, respectivamente. Na linearização da isoterma de Freundlich para o meio KNO_3 obteve-se valor de r^2 0,9968, confirmando a sua representatividade.

A menor sorção de Cu^{2+} na presença do íon H_3CCOOH^- pode estar relacionada com uma possível competição entre a formação de complexos com este íon e a sorção nos sítios disponíveis para biossorção de Cu^{2+} , o que reduziria a presença de íons metálicos disponíveis para a sorção, aliada a não disponibilidade de sítios na superfície do material radicular para sorção de complexos como $\text{CuCH}_3\text{COO}_{(\text{aq})}$ e $\text{CuCH}_3\text{COO}^+$.

TABELA 3.13 – Parâmetros teóricos obtidos através da aplicação de modelos de isotermas sobre os dados experimentais para a sorção de Cu^{2+} a pH 6,5 em meio KNO_3 0,5 mol L^{-1} .

Modelo	q^0 (mmol g^{-1})	b (L mmol $^{-1}$)	β	r^2
Langmuir	$2,7 \pm 0,3$	$0,008 \pm 0,01$	-	0,9955
Freundlich	-	$0,402 \pm 0,003$	$0,88 \pm 0,02$	0,9947
Sips	$2,3 \pm 0,9$	$0,10 \pm 0,06$	$1,0 \pm 0,07$	0,9956
BET	$0,55 \pm 0,02$	$4,3 \pm 0,3$	-	0,9930
Redlich-Peterson	6 ± 5	$0,04 \pm 0,04$	$1,5 \pm 0,7$	0,9959
Toth	4 ± 5	$0,07 \pm 0,09$	$1,1 \pm 0,5$	0,9956

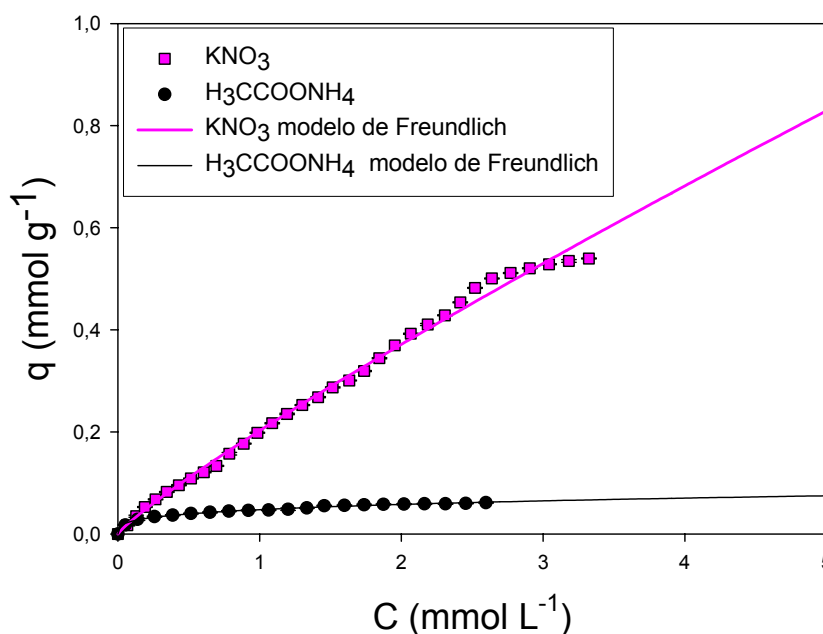


FIGURA 3.34 – Isotermas e modelos teóricos de melhor ajuste para a sorção de Cu^{2+} a pH 6,5 nos meios KNO_3 0,5 mol L^{-1} e $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ 0,5 mol L^{-1} .

B) Estudos para Ni^{2+}

Para os estudos de sorção de Ni^{2+} no meio KNO_3 obteve-se valores de r^2 próximos a 1 para todos os modelos, com exceção de Freundlich. Tomou-se como parâmetro para descartar alguns dos modelos os desvios maiores que 10 % para as constantes calculadas e apresentadas na TABELA 3.14. Assim, restaram apenas os modelos de Langmuir e BET. Como forma de verificar se o modelo de Langmuir se ajustava mais adequadamente aos valores experimentais realizou-se a linearização

da isoterma (FIGURA 3.35) que apresentou valor de r^2 0,8743, descartando-o para descrição dos dados experimentais.

TABELA 3.14 – Parâmetros teóricos obtidos através da aplicação de modelos de isotermas sobre os dados experimentais para a sorção de Ni^{2+} a pH 6,5 em meio KNO_3 0,5 mol L^{-1} .

Modelo	q^0 (mmol g^{-1})	b (L mmol^{-1})	β	r^2
Langmuir	$0,0141 \pm 0,0003$	$4,6 \pm 0,3$	-	0,9975
Freundlich	-	$0,0129 \pm 0,0004$	$0,42 \pm 0,03$	0,9883
Sips	$0,015 \pm 0,001$	$4,0 \pm 0,9$	$0,9 \pm 0,1$	0,9977
BET	$0,0111 \pm 0,0002$	34 ± 3	-	0,9961
Redlich-Peterson	$0,0141 \pm 0,0003$	$4,8 \pm 0,7$	$0,97 \pm 0,09$	0,9975
Toth	$0,014 \pm 0,001$	5 ± 1	$0,98 \pm 0,05$	0,9975

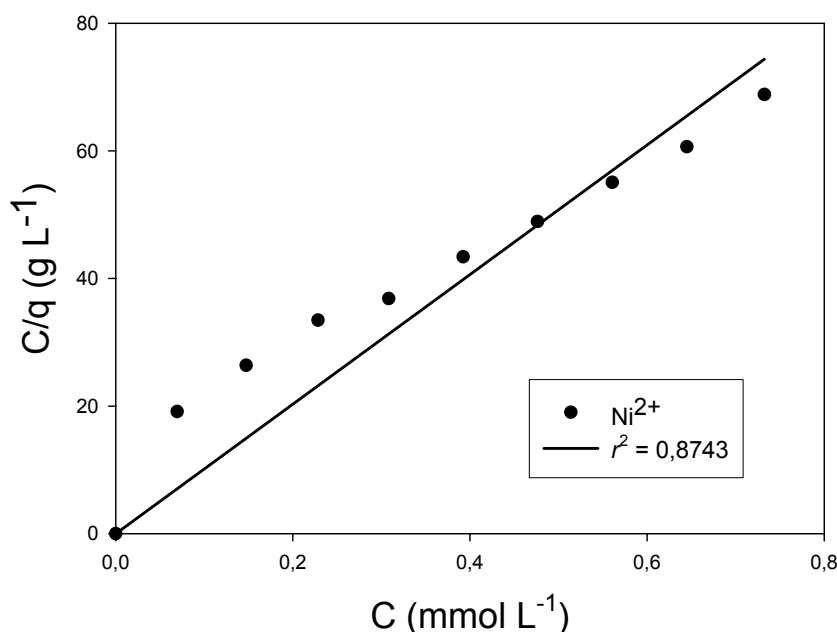


FIGURA 3.35 – Linearização, segundo o modelo de Langmuir, para sorção de Ni^{2+} em material radicular lixiviado em meio KNO_3 0,5 mol L^{-1} .

Os valores de capacidade de sorção de Ni^{2+} nos dois meios avaliados foram $0,011 \pm 0,002$ mmol g^{-1} e $0,012 \pm 0,001$ mmol g^{-1} para os meios KNO_3 e $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$, respectivamente, sendo que o valor obtido experimentalmente para o primeiro meio é condizente com q^0 calculado $0,0111 \pm 0,0002$ mmol g^{-1} empregando o modelo que melhor se ajustou, BET.

Apesar dos valores de capacidade de sorção serem semelhantes, os modelos que melhor descreveram os dados experimentais dos dois meios estudados foram diferentes. Para o meio KNO_3 o modelo mais adequado foi o BET, que estende o de Langmuir para sorção em multicamadas, enquanto para o meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ o melhor ajuste foi o de Langmuir, com sorção em monocamada em sítios de sorção homogêneos. A FIGURA 3.36 apresenta as isotermas de sorção de Ni^{2+} para os dois meios estudados.

À partir das discussões apresentadas, pode-se considerar que a presença do íon H_3CCOOH^- não reduz a capacidade de sorção de Ni^{2+} , mas interfere na forma de interação entre o íon e o biossorvente, provavelmente pela formação dos complexos apresentados na TABELA 3.12.

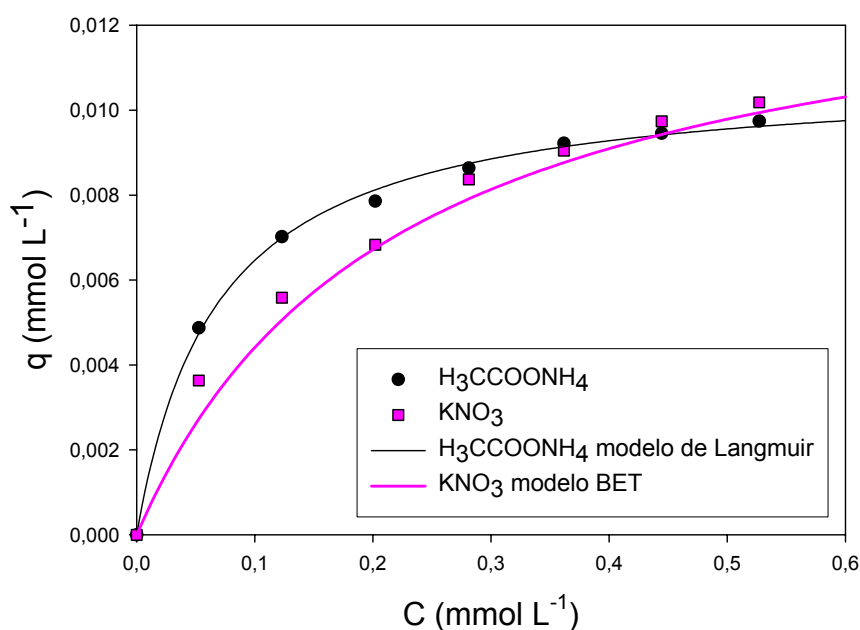


FIGURA 3.36 – Isotermas e modelos teóricos de melhor ajuste para a sorção de Ni^{2+} a pH 6,5 nos meios KNO_3 0,5 mol L⁻¹ e $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ 0,5 mol L⁻¹.

C) Estudos para Al^{3+}

Nos estudos para investigação da influência do meio empregado sobre a sorção de Al^{3+} , os valores obtidos para as constantes b e β , apresentados na TABELA 3.15, para KNO_3 , não diferiram dos obtidos para o estudo em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ (TABELA 3.10).

Todos os valores de r^2 apresentados na TABELA 3.15 tiveram uma boa correlação com a curva de dados experimentais. Contudo, somente os modelos de Langmuir e Freundlich forneceram constantes com desvios inferiores a 10 %. Para eliminar a dúvida sobre qual modelo era mais adequado para descrição dos dados experimentais, traçou-se o gráfico de linearização da isoterma e o valor de r^2 obtido para Langmuir foi 0,7383, descartando a possibilidade de atribuição do modelo. O gráfico de linearização pela isoterma de Freundlich foi então traçado, confirmando a descrição dos dados experimentais por esse modelo (FIGURA 3.37).

TABELA 3.15 – Parâmetros teóricos obtidos através da aplicação de modelos de isotermas sobre os dados experimentais para a sorção de Al^{3+} a pH 6,5 em meio KNO_3 0,5 mol L^{-1} .

Modelo	q^0 (mmol g^{-1})	b (L mmol^{-1})	β	r^2
Langmuir	0,38 ± 0,02	3,4 ± 0,3	-	0,9916
Freundlich	-	0,39 ± 0,01	0,60 ± 0,03	0,9917
Sips	0,34 ± 0,04	4 ± 1	1,1 ± 0,1	0,9920
BET	0,150 ± 0,005	12 ± 2	-	0,9737
Redlich-Peterson	0,32 ± 0,04	3,5 ± 0,3	1,3 ± 0,2	0,9927
Toth	0,46 ± 0,04	2,4 ± 0,4	1,2 ± 0,1	0,9927

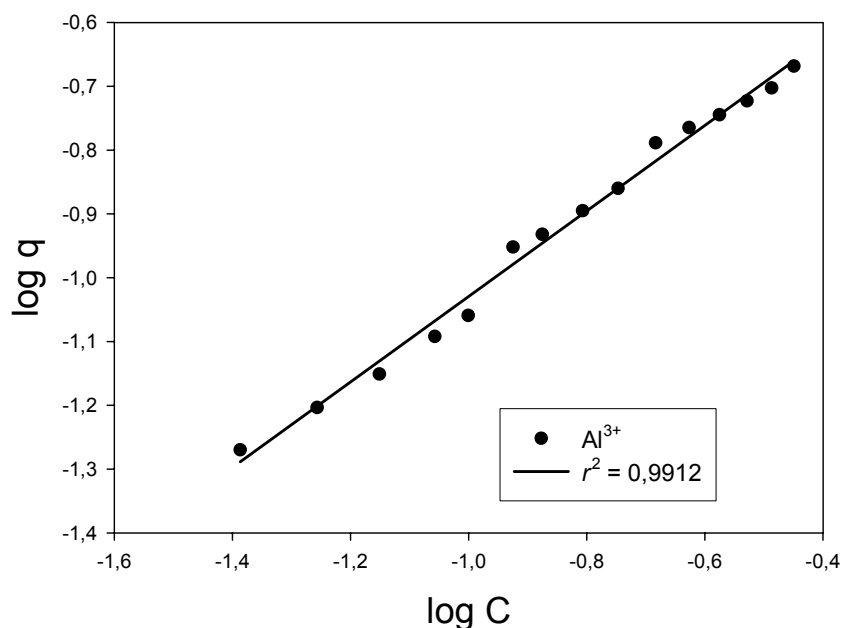


FIGURA 3.37 – Linearização, segundo o modelo de Freundlich, para sorção de Al^{3+} em material radicular lixiviado em meio KNO_3 0,5 mol L^{-1} .

A FIGURA 3.38 apresenta as isotermas para os dois meios estudados, evidenciando o perfil semelhante das mesmas sendo que, as capacidades de sorção determinadas experimentalmente foram: $0,472 \pm 0,003 \text{ mmol g}^{-1}$ ($\text{H}_3\text{CCOONH}_4$) e $0,44 \pm 0,02 \text{ mmol g}^{-1}$ (KNO_3). O menor valor e o maior desvio para o meio KNO_3 é justificado pela dificuldade de manter o pH 6,5 da solução e pela precipitação parcial do Al^{3+} na forma de $\text{Al}(\text{OH})_3$, ao longo do procedimento que tinha duração de 1 dia.

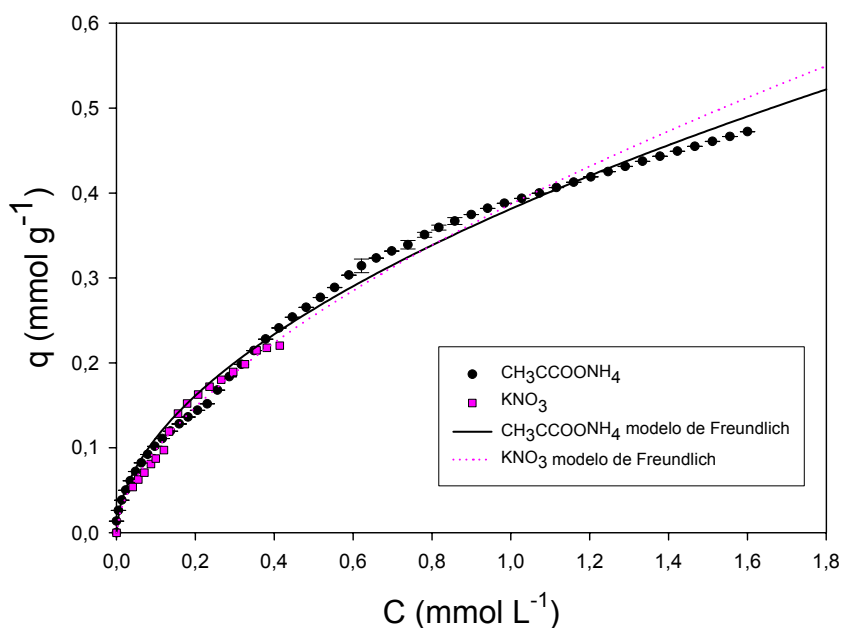


FIGURA 3.38 – Isotermas e modelos teóricos de melhor ajuste para a sorção de Al^{3+} a pH 6,5 nos meios KNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

D) Estudos para Fe^{3+}

Nos estudos para Fe^{3+} , o modelo de Freundlich não apresentou boa correlação com os dados experimentais (TABELA 3.16) e, para o modelo de Langmuir, a tentativa de linearização da isoterma produziu um valor negativo para r^2 (-0,9921), o que leva a constatar que o modelo também não se ajusta aos dados experimentais. Buscou-se, então, dentre os modelos apresentados na TABELA 3.16, qual apresentou menores desvios para os valores das constantes calculadas. O modelo Sips apresentou os menores desvios, sendo sugerido como representativo dos dados experimentais. Infelizmente, não é possível confirmar essa hipótese através de linearizações deste modelo. Contudo, o valor de capacidade de sorção

experimental encontrado foi $1,354 \pm 0,006 \text{ mmol g}^{-1}$ de Fe^{3+} , correspondente ao valor de q^0 fornecido pela equação Sips, $1,35 \pm 0,01 \text{ mmol g}^{-1}$. Este valor foi consideravelmente superior à capacidade de sorção obtida para o meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$, $0,116 \pm 0,004 \text{ mmol g}^{-1}$.

Além deste fato, através das isotermas apresentadas da FIGURA 3.39, é possível afirmar que o perfil de sorção é diferente para os dois meios estudados, o que pode ocorrer pela formação do complexo $\text{FeCH}_3\text{COO}^{2+}$, que possui constante termodinâmica de formação relativamente alta ($\log K_1 = 3,88$, a 20°C).

TABELA 3.16 – Parâmetros teóricos obtidos através da aplicação de modelos de isotermas sobre os dados experimentais para a sorção de Fe^{3+} a pH 6,5 em meio KNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Modelo	q^0 (mmol g^{-1})	b (L mmol^{-1})	β	r^2
Langmuir	$0,27 \pm 0,03$	12 ± 2	-	0,9956
Freundlich	-	1 ± 1	$0,79 \pm 0,04$	0,9896
Sips	$1,35 \pm 0,01$	34 ± 4	$0,15 \pm 0,01$	0,9990
BET	$0,21 \pm 0,02$	13 ± 2	-	0,9959
Redlich-Peterson	$0,3 \pm 1$	7 ± 39	17 ± 349733	0,9911
Toth	$0,5 \pm 2$	5 ± 26	26 ± 349733	0,9911

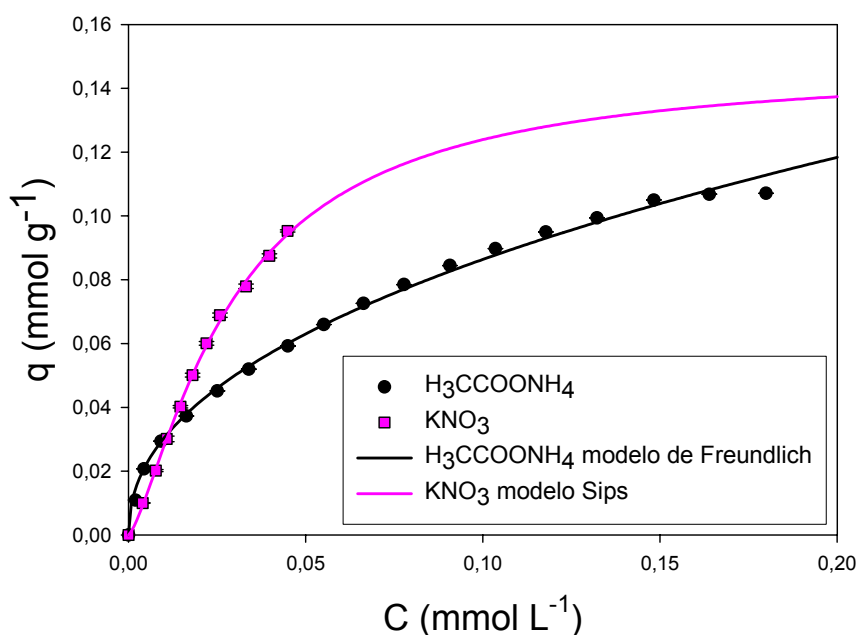


FIGURA 3.39 – Isotermas e modelos teóricos de melhor ajuste para a sorção de Fe^{3+} a pH 6,5 nos meios KNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

A ordem de sorção para o meio KNO_3 apresentou inversão em relação ao meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$, sendo a seguinte: $\text{Fe}^{3+} > \text{Al}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$. Sendo este fato confirmado pelos valores de **b** apresentados nas TABELAS 3.13 a 3.16. A inversão pode estar relacionada a ausência de competição entre os sítios de sorção e os íons complexantes, inexistentes no meio KNO_3 .

3.4.1.4.3 – Efeito do uso de solução multielementar contendo íons Cu^{2+} , Ni^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+} na sorção desses íons

Comparando-se os valores das capacidades de sorção para os analitos estudados no meio KNO_3 em soluções mono e multielementares apresentados na TABELA 3.17 pode-se afirmar que a sorção decresce para todos os íons, sugerindo a competição entre os íons. Para os íons Cu^{2+} , Ni^{2+} e Al^{3+} a redução da capacidade de sorção ficou entre 38 e 57 % enquanto para Fe^{3+} a redução foi de 98 %. Os resultados observados sugerem a competição entre os íons presentes. As isotermas comparativas entre soluções mono e multielementar e meio KNO_3 estão apresentadas na FIGURA 4.40.

TABELA 3.17 – Capacidades máximas de sorção em mmol g^{-1} para os analitos estudados, em diferentes meios e soluções mono e multielementares.

Íon	Meio KNO_3		Meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$	
	monoelementar	multielementar	monoelementar	multielementar
Cu^{2+}	$0,52 \pm 0,03$	$0,273 \pm 0,002$	$0,062 \pm 0,002$	$0,043 \pm 0,004$
Ni^{2+}	$0,011 \pm 0,002$	$0,007 \pm 0,001$	$0,012 \pm 0,001$	$0,0032 \pm 0,002$
Al^{3+}	$0,44 \pm 0,02$	$0,189 \pm 0,002$	$0,472 \pm 0,003$	$0,78 \pm 0,01$
Fe^{3+}	$1,354 \pm 0,006$	$0,020 \pm 0,001$	$0,116 \pm 0,004$	$0,212 \pm 0,001$

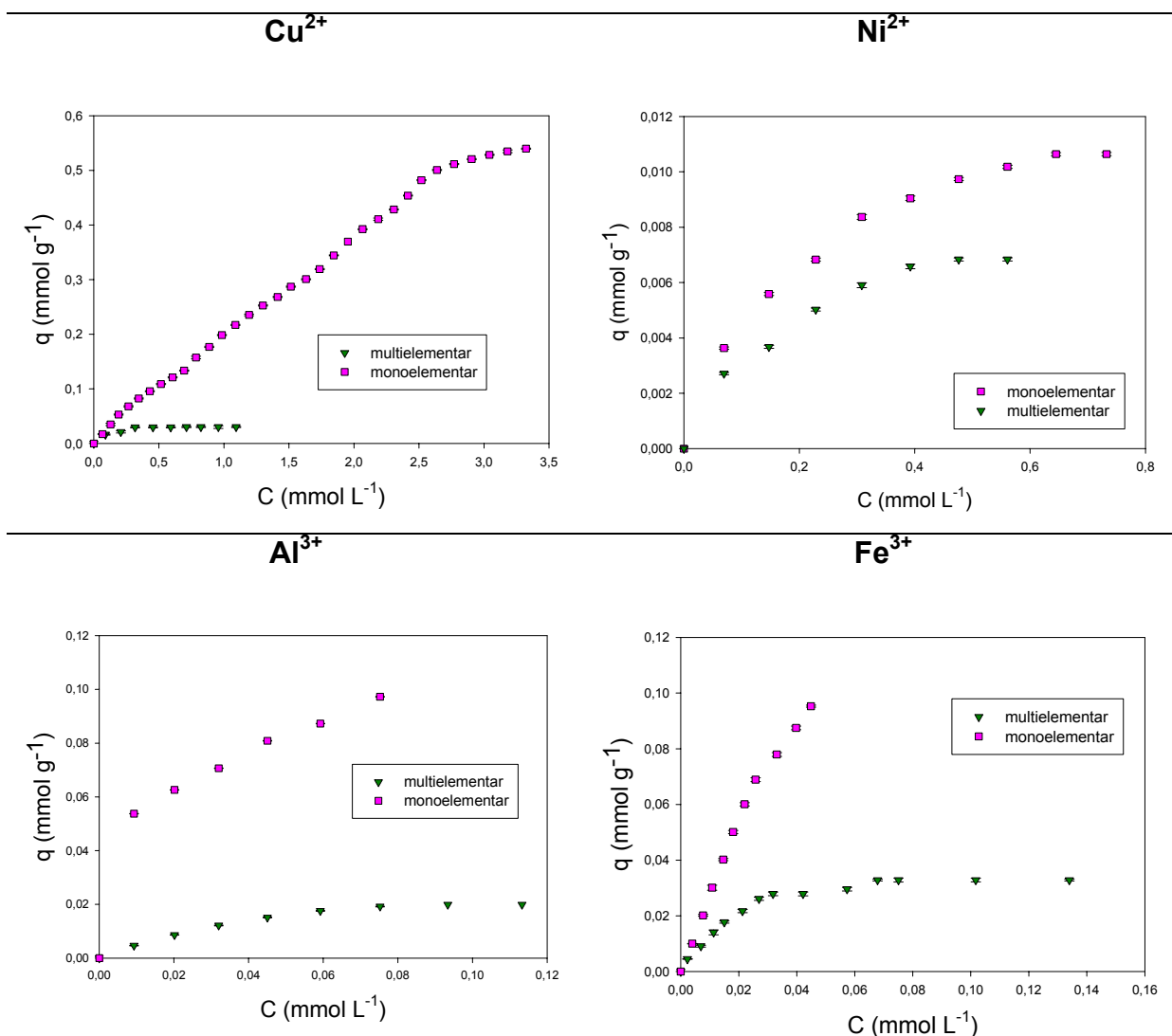


FIGURA 4.40 – Perfis comparativos para isotermas de sorção obtidas com soluções mono e multielementar em meio KNO₃ 0,5 mol L⁻¹, n = 3.

Para o meio H₃CCOONH₄ observa-se redução da capacidade de sorção para Ni²⁺ e Cu²⁺ no estudo multielementar. Em contrapartida, a sorção para Fe³⁺ e para Al³⁺ é aumentada consideravelmente. Uma explicação para o acréscimo na sorção desses íons em meio multielementar pode estar relacionada a possível ocorrência de sorção em multicamadas, ou ainda interações laterais com o bio sorvente ou com os outros analitos sorvidos, o que explicaria o perfil das isotermas apresentadas na FIGURA 4.41. Este perfil é mencionado por BRAGA (2001) para situações onde há uma interação lateral atrativa.

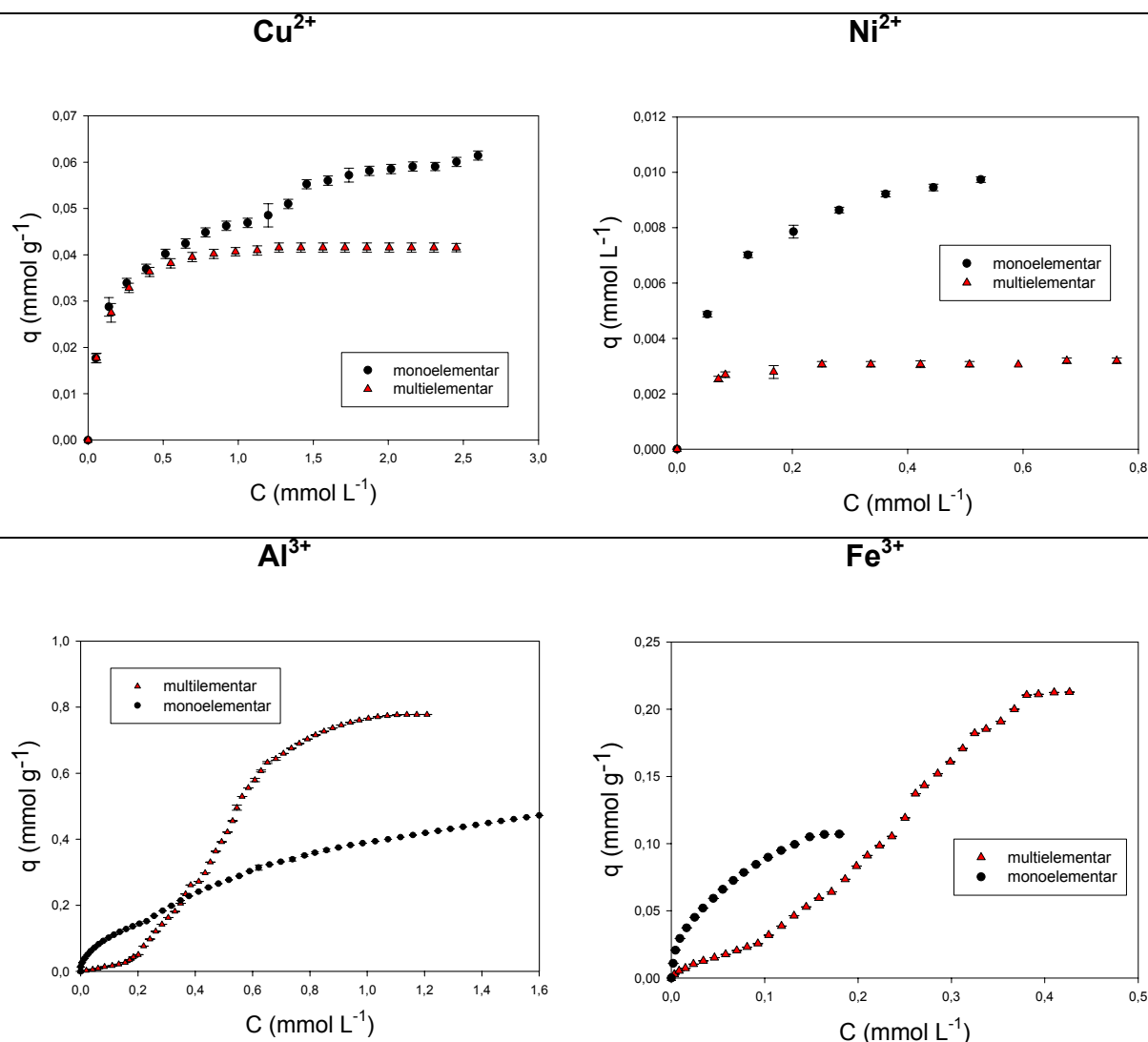


FIGURA 4.41 – Perfis comparativos para isotermas de sorção obtidas com soluções mono e multielementar em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, $n = 3$.

Foram realizadas tentativas de explicação dos dados experimentais obtidos para os experimentos multielementares através do emprego dos modelos das isotermas de Langmuir e Sips estendidas. Contudo, ambos os modelos foram ineficazes para representar os perfis das isotermas obtidas a partir dos resultados experimentais.

3.4.1.4.4 – Dessorção de Cu, Ni, Al e Fe nos diferentes meios estudados

Os resultados apresentados na TABELA 3.18 indicam diferentes comportamentos para a dessorção dos elementos nos meios estudados. Nos estudos mono-elementares, maior eficiência de dessorção foi observada para todos analitos

em meio KNO_3 quando comparado ao meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$. Em estudos multielementares, observou-se comportamento inverso. Pelos baixos desvios observados, esse comportamento se repetiu para todas as replicatas e aparentemente estaria relacionado às diferentes capacidades de sorção apresentadas para cada meio.

TABELA 3.18 – Teores (%) de Cu, Ni, Al e Fe desorvidos para os diferentes meios em relação aos teores sorvidos, n=3.

	Al	Fe	Cu	Ni
Monoelementar KNO_3	108 ± 3	105 ± 19	27,1 ± 0,9	1,62 ± 0,09
Monoelementar $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$	14 ± 1	27 ± 7	6,2 ± 0,2	1,2 ± 0,2
Multielementar KNO_3	12 ± 0,1	13 ± 2	0,41 ± 0,03	0,4 ± 0,2
Multielementar $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$	91 ± 3	61 ± 1	16 ± 2	2,8 ± 0,2

As dificuldades de desorção de Al e Fe para o meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ monoelementar pode estar associada a forma de sorção, representada pelo modelo de Freundlich, que assume que não há associação ou dissociação de moléculas ou íons após serem sorvidos.

Pode-se observar que a desorção de Cu e Ni mostrou-se ineficiente para todos os meios e soluções sugerindo que o material poderia ser utilizado para o tratamento de efluentes sem o retorno desses analitos para a solução, mesmo com a acidificação do meio.

3.5 – Conclusões

Nos estudos do emprego do material radicular de *P. notatum* como bioissorvente observou-se que o material previamente lixiviado com ácido apresentou melhor eficiência na sorção dos íons metálicos em comparação ao material não lixiviado. O emprego de meios com características diferentes, ou seja, complexante, $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$, e não complexante, KNO_3 , permitiu a observação da influência do meio na sorção de íons metálicos. Em estudos monoelementares, para o meio acetato, Cu^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+} obedeceram o modelo proposto por Freundlich, que considera sorção puramente física em sítios heterogêneos. Já Ni^{2+} obedeceu ao modelo proposto por Langmuir, que indica uma sorção em monocamadas em sítios homogêneos. A seqüência de afinidade de sorção para esse meio foi: $\text{Al}^{3+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$. Em meio nitrato a ordem de sorção foi alterada, $\text{Fe}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Al}^{3+} > \text{Ni}^{2+}$, sendo possível observar a influência da ausência do íon H_3CCOO^- , fato que permitiu o aumento da capacidade de sorção de Cu^{2+} e Fe^{3+} . O modelo proposto por Freundlich permaneceu como predominante para a descrição dos dados experimentais, sendo que os íons Cu^{2+} e Al^{3+} obedeceram a esse modelo no meio citado.

Nos estudos multielementares, a capacidade de sorção em meio KNO_3 decresceu para todos os analitos, sugerindo uma competição pelos sítios de sorção. Por outro lado, em meio $\text{H}_3\text{CCOONH}_4$ observou-se acréscimo da ordem de 2 vezes na capacidade de sorção dos íons Al^{3+} e Fe^{3+} , evidenciado pelas suas isotermas, cujo perfil sugere possíveis interações laterais.

O objetivo de empregar o material radicular de *P. notatum* para pré-concentrar os metais presentes em baixas concentrações na solução digerida de seu material foliar não foi alcançado, pois, de uma maneira geral, o material radicular não possui as características específicas de um bom bioissorvente, que teriam a capacidade de sorção elevada, da ordem de mg g^{-1} e a preferência por metais presentes em baixas concentrações na solução, assim como uma eficiente dessorção, possibilitando a regeneração do material.

Capítulo 4

***Investigação de constituintes da
parede celular do material radicular***

4.1 – Revisão bibliográfica

4.1.1 – Características do sistema radicular de plantas da família das *Poaceae*

As raízes das plantas são na verdade um sistema complexo de absorção, dessorção e transporte de água e íons. São três sistemas de tecidos presentes nas raízes que podem ser facilmente distinguidos: a epiderme ou sistema dérmico, o córtex ou sistema fundamental e os tecidos vasculares ou sistema vascular. A epiderme das raízes novas ou de nutrição é responsável pela absorção de água e sais minerais. Essas raízes se espalham nas camadas mais superficiais do solo, com maior disponibilidade de nutrientes, sendo sua extirpação fator limitante na sobrevivência das plantas (RAVEN *et al*, 1996).

Nas plantas monocotiledôneas como as espécies do gênero *Paspalum*, a raiz primária tem vida curta e o sistema radicular é formado por raízes adventícias que se originam do caule. As raízes adventícias, com suas raízes laterais, dão origem a um sistema radicular fasciculado, onde nenhuma raiz é proeminente. A FIGURA 4.1 apresenta esquematicamente uma raiz primária com suas estruturas.

A presença de pêlos radiculares ou raízes de nutrição, que são extensões de células epidérmicas, contribui com o aumento da área superficial de contato entre a raiz e a solução do solo. Numa planta de centeio de quatro meses de idade estimam-se 14 bilhões de pêlos radiculares, o que corresponde a uma área superficial disponível para absorção de 401 m². A FIGURA 4.2 apresenta um diagrama de distribuição das raízes de uma planta com sistema radicular do tipo fasciculado, onde as raízes estão envolvidas primariamente com a fixação e absorção de nutrientes. Esse sistema é correspondente ao existente nas plantas do gênero *Paspalum*.

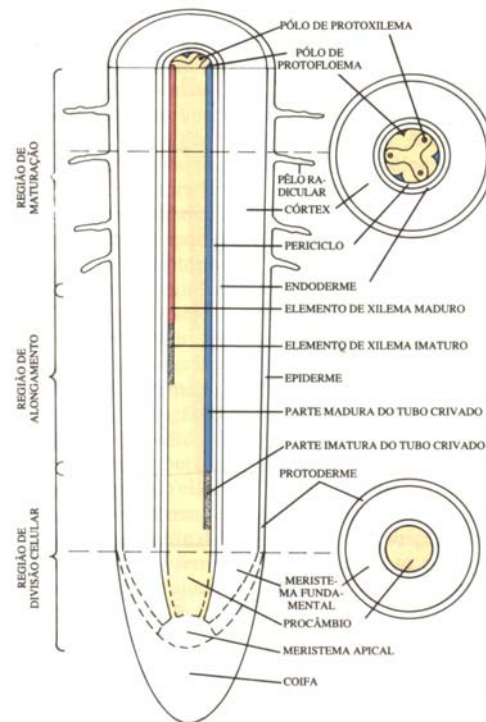


FIGURA 4.1 – Diagrama ilustrando uma raiz primária e suas estruturas. (RAVEN *et al*, 1996).

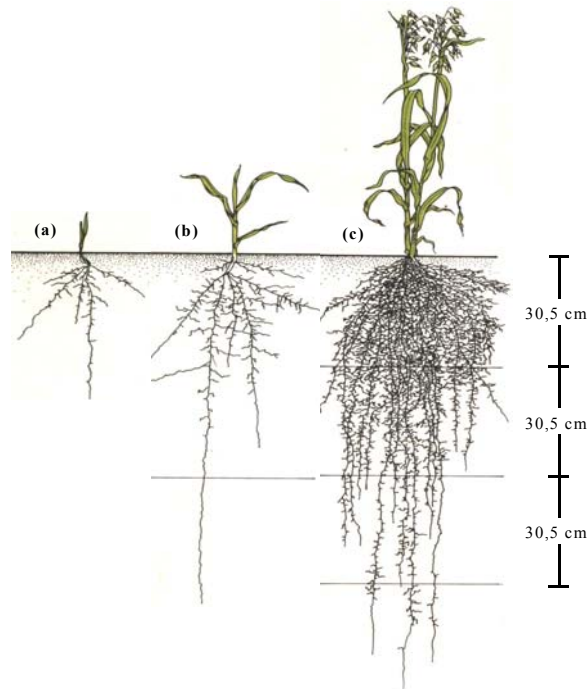


FIGURA 4.2 – Diagrama apresentando o desenvolvimento relativo do sistema radicular de plantas de aveia (*Avena sativa*), (a) 31, (b) 45 e (c) 80 dias após o plantio.

4.1.2 – Absorção de nutrientes inorgânicos

A absorção de minerais pelas raízes se dá através da passagem de íons pela membrana plasmática das células epidérmicas, onde ocorre o mecanismo de seleção dos minerais de interesse para o desenvolvimento das plantas. As células epidérmicas são recobertas por uma substância mucilaginosa capaz de estabelecer uma interação íntima com as partículas do solo, influenciando na disponibilidade de íons para manutenção da planta. A rizosfera, região formada pela camada de solo presa à raiz pela mucilagem, é rica em micorrizas (fungos micorrízicos que se associam aos sistemas radiculares das plantas), que são bactérias benéficas às plantas. A FIGURA 4.3 mostra micorrizas em associação com as raízes, sendo mais adequado a referência ao “sistema radicular” das plantas e não somente “raízes”.

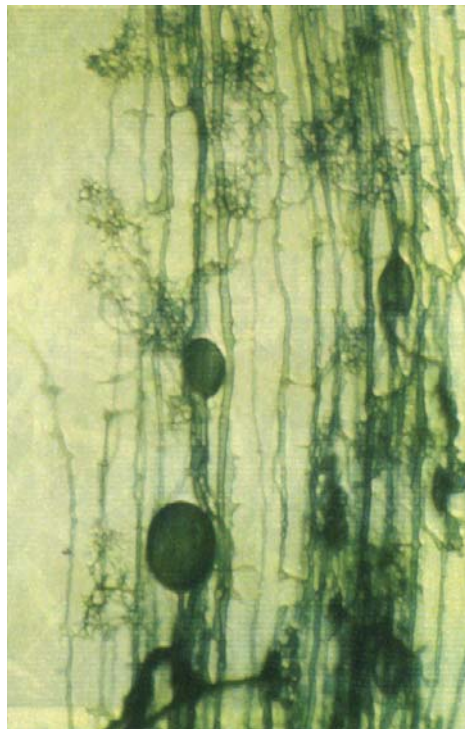


FIGURA 4.3 – Micrografia da presença de endomicorrizas *Glomus versiforme* (estruturas ovais, escuras) em associação com as raízes de alho porró (*Allium porrum*), (RAVEN *et al*, 1996).

Assim, o mecanismo de absorção de nutrientes não se dá apenas pelo contato da raiz com a solução do solo, mas também é bastante favorecido pelas

micorrizas, cujas redes de hifas se estendem por vários centímetros além das raízes colonizadas e que são especialmente importantes na absorção e transferência de fósforo e no aumento da absorção de zinco, magnésio e cobre, que são nutrientes relativamente imóveis no solo e que se esgotam rapidamente nas regiões próximas aos pêlos radiculares (RAVEN *et al*, 1996). Desta forma, pode-se chamar este ambiente simbiótico de sistema radicular.

Devido aos nutrientes inorgânicos estarem associados às necessidades básicas das plantas, sua deficiência pode ser definitiva para sua sobrevivência. A TABELA 4.1 Apresenta um resumo com alguns nutrientes inorgânicos e suas funções em plantas.

TABELA 4.1 – Funções de alguns nutrientes inorgânicos em plantas (RAVEN *et al*, 1996).

Elemento	Principal forma em que é absorvido	Concentração usual em plantas saudias em matéria seca	Funções importantes
Macronutrientes			
C	CO ₂	≈44 %	Composição de aminoácidos, proteínas, nucleotídeos, ácidos nucléicos, clorofilas e coenzimas.
O	H ₂ O ou O ₂	≈44 %	
H	H ₂ O	≈6 %	
N	NO ₃ ⁻ ou NH ₄ ⁺	1-4 %	
K	K ⁺	0,5-6 %	Osmose, balanço iônico, abertura e fechamento de estômatos, ativador de enzimas.
Ca	Ca ²⁺	0,2-3,5 %	Parede celular, cofator de enzimas, permeabilidade da membrana celular, atividades enzimáticas
P	H ₂ PO ₄ ⁻ ou HPO ₄ ²⁻	0,1-0,8 %	Composição do ATP e ADP, fosfolipídeos, ácidos nucléicos, coenzimas essenciais.
Mg	Mg ²⁺	0,1-0,8 %	Parte da clorofila, ativador de enzimas.
S	SO ₄ ²⁻	0,05-1 %	Componente de aminoácidos e proteínas e da coenzima A.

Micronutrientes			
Fe	Fe ²⁺ ou Fe ³⁺	25-300 ppm	Síntese da clorofila, compõe citocromos e a nitrogenase.
Cl	Cl ⁻	100-10000 ppm	Envolvido na osmose e balanço de íons, relação com a produção de O ₂ .
Cu	Cu ²⁺	4-30 ppm	Ativador e componente de enzimas
Mn	Mn ²⁺	15-800 ppm	Ativador de enzimas, necessário na membrana do cloroplasto e na liberação do O ₂ produzido.
Zn	Zn ²⁺	15-100 ppm	Ativador e componente de enzimas.
Mo	MoO ₄ ²⁻	0,1-0,5 ppm	Fixação de nitrogênio e redução do nitrato.
B	B(OH) ₃ ou (OH) ₄	5-75 ppm	Influencia o uso do Ca ²⁺ , síntese de ácidos nucleicos e integridade da membrana.
Essenciais para algumas plantas e organismos			
Na	Na ⁺	Traços	Balanço osmótico e iônico, pode não ser essencial para muitas plantas, necessário para plantas de desertos e mangues.
Co	Co ⁺	Traços	Necessário aos microorganismos simbióticos fixadores de nitrogênio.

A composição inorgânica das células das raízes é diferente do meio no qual a planta se desenvolve. Segundo RAVEN *et al.* (1996), células de raiz de ervilha apresentaram concentração de K⁺ cerca de 75 vezes maior que a solução nutritiva empregada para seu desenvolvimento. Este fato sugere que os nutrientes inorgânicos são absorvidos pelas raízes através de transporte ativo e não por um simples escoamento de íons, podendo ser secretados pelas plantas quando não forem de sua utilidade. Torna-se, assim, evidente a presença de sítios ativos destinados a absorção de nutrientes nas raízes das plantas que, quando vivas, podem exercer seleção e controle dos nutrientes necessários ao seu

desenvolvimento. Contudo, este controle não é pleno, uma vez que esses sítios podem permitir a introdução de elementos nocivos às plantas (RAVEN *et al.*, 1996).

4.1.3 – A parede celular das raízes

Segundo CARPITA (1996) e CARPITA & GIBEAUT (1993), as paredes celulares de angiospermas dicotiledôneas e monocotiledôneas diferem na sua constituição química. Para as primeiras, a parede celular é definida como tipo I, formada de porções iguais de celulose e xiloglucans (XyGs) com contribuições menores de arabinoxilanos glucomanas e galacto-glucomanas. Estruturalmente essas paredes são repetições de uma unidade hepta-sacarídica. A diferença das paredes celulares das monocotiledôneas (tipo II) está no fato de polímeros denominados glucuronoarabinoxilanos (GAXs) serem os principais componentes entre as microfibras de celulose. Estes polímeros se ligam à parede de celulose através de ligação de hidrogênio.

A parede celular é subdividida em primária (30 % de celulose, 30 % de hemicelulose, 30 % de pectina e 10 % proteínas) e parede secundária (50-80 % de celulose, 5-30 % de hemicelulose e 15-35 % de lignina (<http://atlasveg.ib.usp.br/Indice/pace.html>, 2004).

As substâncias pécticas são ricas em ácido galacturônico, ramnose, arabinose e galactose. São consideradas pectinas substâncias poliméricas, onde o ácido galacturônico encontra-se metil-esterificado e polissacarídeos neutros, que não possuem ácido galacturônico em suas cadeias mas encontram-se associados às pectinas como as arabinanas, galactanas e arabinogalactanas (DEY *et al.*, 1997).

Segundo REID (1997) e DEY, *et al.* (1997), as pectinas podem ser extraídas com água quente, agentes quelantes (*e.g.* EDTA, CDTA) ou ácidos fracos (*e.g.* oxalato de amônio), capazes de complexar Ca^{2+} ou outros íons metálicos divalentes.

Hemiceluloses são mais dificilmente removidas, requerendo o emprego de soluções fortemente concentradas de hidróxidos de sódio ou potássio. A necessidade do emprego de soluções alcalinas está relacionada com as fortes ligações de hidrogênio entre as hemiceluloses e as microfibras de celulose (DEY *et al.*, 1997).

O resíduo após a extração das pectinas e hemiceluloses é rico em celulose, constituída por uma seqüência linear de D-glucose.

As paredes secundárias das células vegetais são altamente lignificadas, compostos as ligninas compostos de difícil extração, devendo ser tratadas com HCl ou H₂SO₄ para a oxidação dos anéis fenólicos, o que converte a lignina em um derivado solúvel em água. A TABELA 4.2 apresenta os principais componentes de cada uma das frações formadoras das paredes primária e secundária de células vegetais e a FIGURA 4.4 mostra uma representação esquemática da parede celular primária e dos polissacarídeos constituintes.

TABELA 4.2 – Principais componentes das paredes primária e secundária de células vegetais (REID, 1997 e DEY *et al.*, 1997).

Componente	Constituição
Proteínas	Extensina, proteínas ricas em arabinogalactanas e enzimas
Celulose	Celulose (ligação β 1,4)
Pectinas	Polissacarídeos ramificados (precursores: ramnogalacturonanas I, arabinanas, galactanas, arabinogalactanas, homogalacturanas e ramnogalacturonanas II)
Hemicelulose	Polissacarídeos ramificados (precursores: xilanas, glucomanas, galactomanas, glucronomanas, xiloglucanas, calose (β -(1 \rightarrow 3) glucana); β -(1 \rightarrow 3), β -(1 \rightarrow 4) glucanas, arabinogalactanas II)
Lignina	Polímero fenólico (precursores: coumaril, coniferil e sinaptil)

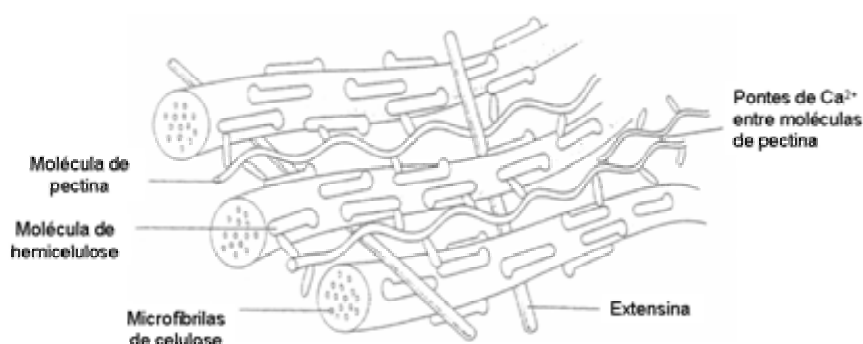


FIGURA 4.4 – Representação da estrutura dos polissacarídeos constituintes da parede celular e localização desses constituintes na parede celular primária (DEY *et al.*, 1997).

Os constituintes citados na TABELA 4.2 são formados por unidades monoméricas de açúcares. A TABELA 4.3 apresenta alguns nucleotídeos de açúcares que estão relacionados com a biossíntese de pectinas e hemiceluloses.

TABELA 4.3 – Unidades de nucleotídeos de açúcares formadores de pectinas e hemiceluloses (REID, 1997).

Nucleotídeo precursor	Produto polissacarídeo
GDP - Fucose	Xiloglucano
GDP - Manose	Glucomana, galactoglucomana
GDP - Glicose	Glucomana
UDP - Arabinose	Arabinoxilano
UDP - Galactose	Pectina, galactomana
UDP - Ácido galacturônico	Pectina
UDP - Glicose	$\beta(1\rightarrow3)(1\rightarrow4)$ glucano, calose, xiloglucano
UDP - Ácido galacturônico	Glucuronoxilano
UDP - Xilose	Xilanos, xiloglucano

Além das considerações a respeito da composição química das raízes, MARSCHNER (1986) discute a presença de poros na parede celular e nas diferentes camadas formadoras das raízes, a epiderme (rizoderma) e o córtex de plantas, que possuem diâmetros muito maiores do que os íons de potássio e cálcio hidratados. Esse poros poderiam ser responsáveis por facilitar a sorção de metais/íons metálicos por organismos vivos pela passagem livre através da parede celular, alcançando a membrana. Alguns diâmetros de poros estão apresentados na TABELA 4.4.

TABELA 4.4 – Diâmetros comparativos entre poros presentes nas raízes de milho e íons hidratados, (adaptado de MARSCHNER, 1986).

Localização dos poros	Diâmetro (nm)
Células da epiderme	500-3000
Células do córtex	100-200
Parede celular	< 5,0
K ⁺ hidratado	0,66
Ca ²⁺ hidratado	0,82

Considerando-se os mecanismos de sorção de metais/íons metálicos, pode-se dizer que todos estão relacionados com a composição da parede celular das raízes, seja pela presença ou pela ausência de sítios ativos tais como carboxilatos, hidroxissulfato, tioéteres, tiol, imidazóis, amino, amida, fosfatos e hidroxila (MADRID & CÁMARA, 1997). Desta forma, estudos do comportamento da parede celular de plantas, bem como de sua composição orgânica e inorgânica, têm sido alvo de interesse de diferentes áreas da ciência tais como botânica, farmácia e química, com objetivos diversos.

ZEIER & SCHREIBER (1997) investigaram a ocorrência e natureza dos polímeros formadores da lignina e suberina da parede celular da hipoderme, da endoderme (associadas a transporte de nutrientes para o interior das células) e de células de vasos de xilema isolados da raiz de uma gramínea monocotiledônea, *Clivia miniata*. As partes analisadas foram submetidas a oxidação alcalina e as unidades monoméricas foram identificadas: G (guaiacil), S (siringil), G + S total, razão G/S e p-hidroxifenil. Após tratamentos de derivatização empregando reagentes diversos, foram identificadas diferentes unidades dímeras formadoras da lignina e da suberina em cada uma das três partes estudadas da raiz. Os estudos constataram que a lignina e a suberina apresentam frações monoméricas e dímeras, diferentes de acordo com a função do tecido dos quais são formadoras. As análises qualitativas foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (GC-MS) e as determinações quantitativas foram efetuadas por cromatografia gasosa acoplada a detector com ionização por chama (GC-FID).

COIMBRA *et al.* (1996) realizaram o isolamento dos componentes da parede celular de polpa de olivas, através de extração seqüencial, para a análise de açúcares em cada uma das frações coletadas. Para a extração seqüencial foram empregadas soluções como SDS, CDTA, Na₂CO₃ e KOH. Os açúcares encontrados foram raminose, fucose, arabinose, xilose, manose, galactose, glucose e ácido urônico.

VESK *et al.* (1999) realizaram estudos em raízes de aguapé (*Eichhornia crassipes*) para localização de Cu, Zn, Pb e Fe. Para tanto submeteram indivíduos dessa planta a diferentes gradientes de concentração dos analitos de interesse. Segundo os autores, Cu, Zn e Pb foram encontrados principalmente no interior das células, em concordância com outros trabalhos descritos na literatura, sendo sempre associados a elementos aniônicos como P e S. O ferro foi localizado

na epiderme das raízes. Os autores destacam que a localização diferenciada dos metais nas raízes pode ser importante na determinação do quão bem um elemento pode se ligar e se liberar no metabolismo das plantas.

CHANG *et al.* (1999) cultivaram células de *Nicotiana tabacum* L. (tabaco) em meio com adição de Al e verificaram a acumulação deste elemento nos diferentes componentes da parede celular. Parte do material biológico sofreu digestão enzimática para obtenção de esferoplastos (células vegetais que sofreram digestão enzimática para romper) e tiveram os componentes da parede celular extraídos seqüencialmente. Comparações entre os teores de Al e açúcares contidos nas células intactas, nos esferoplastos e nos componentes polissacarídeos, extraídos quimicamente das paredes celulares, foram realizados a partir de resultados obtidos empregando-se GF AAS e cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), respectivamente. As análises constataram maiores concentrações de Al nas frações cujo componente principal era a pectina.

Além da majoritária presença de açúcares, ainda se encontram, em menores quantidades mas participando da estrutura da parede celular, aminoácidos formadores de peptídeos e proteínas (CASSAB & VARNER, 1988). Segundo CASSAB & VARNER (1988), os primeiros relatos da presença de proteínas na parede celular datam de 1924, seguidos de TRIP *et al.* (1951), que identificaram os aminoácidos serina, glicina e aspártico em paredes primárias de células de algodão. As funções dos aminoácidos nas paredes celulares ainda estão sendo investigadas. Porém, proteínas contendo hidroxiprolina são chamadas de extensinas por estarem associadas à capacidade de extensão. Os aminoácidos podem estar sob forma de glicopeptídeos, que podem ser removidos por hidrólise alcalina.

ZBLACKIS *et al.* (1995) caracterizaram os polissacarídeos da parede celular das folhas de *Arabidopsis thaliana*. Foram realizadas análises de aminoácidos no material de parede celular isolado, sendo detectada a presença predominante (acima de 7,7 mol %) de aspargina, glutamina, alanina, glicina e leucina.

DEGENHARDT & GIMMLER (2000) investigaram a adaptação da parede celular de raízes de milho a diferentes ambientes estressantes. Em seus estudos realizaram o isolamento da parede celular das raízes de milho para a análise de aminoácidos. Segundo os autores, a parede celular possui proteínas estruturais e enzimas, sendo que as monocotiledôneas são ricas em glicoproteínas

formadas por dímeros de treonina-hidroxiprolina e histidina-hidroxiprolina. Foi identificado que raízes cultivadas em meio a metais pesados apresentaram teores de *p*-hidroxiprolina 3 vezes maiores que as plantas-controle. Os teores dos aminoácidos treonina, prolina e histidina também aumentaram para as raízes de plantas cultivadas em meio a metais, sendo a soma de aminoácidos totais maior para essas amostras.

As discussões apresentadas neste capítulo estão relacionadas à caracterização do bioissorvente estudado, raízes de *P. notatum*, numa tentativa de identificar os grupos funcionais disponíveis no material através da análise de aminoácidos e açúcares presentes em diferentes frações da parede celular do material radicular. Para tanto foram investigados os aminoácidos e açúcares e determinados quantitativamente os teores de Al, Fe, Ni e Cu em cada fração isolada. Ainda com o objetivo de investigar o bioissorvente foram realizados estudos de RMN de ¹H e titulação potenciométrica para a identificação de alterações na composição do material radicular devido à lixiviação ácida e para a investigação de sítios de sorção ativos.

4.2 – Materiais e métodos

4.2.1 – Reagentes e soluções

Todos as vidrarias, ponteiras e copos do amostrador automático utilizados foram previamente desmineralizados em banhos de HNO₃ 10 % v v⁻¹ por 24 horas.

Todos os reagentes utilizados neste estudo foram de grau analítico e as soluções aquosas preparadas com água destilada-desionizada purificada em sistema Milli-Q[®] (18 MΩcm, Millipore, EUA).

4.2.1.1 – Cultivo do material radicular jovem de *P. notatum*

Para o cultivo de material radicular jovem (coletado com 21 dias de idade), foi preparada solução nutritiva contendo macro e micronutrientes essenciais nas proporções apresentadas na TABELA 4.5.

TABELA 4.5 – Solução nutriente para cultivo de *P. notatum* em canteiro de areia.

Macronutrientes	(mmol L ⁻¹)
KNO ₃	5
Ca(NO ₃) ₂	5
MgSO ₄ .7H ₂ O	2
KH ₂ PO ₄	1
FeNaEDTA	1
Micronutrientes	(mmol L ⁻¹)
H ₃ BO ₃	4,65 × 10 ⁻⁵
MnCl ₂ .4H ₂ O	5,96 × 10 ⁻⁶
CuSO ₄	3,20 × 10 ⁻⁷
ZnSO ₄ .7H ₂ O	7,65 × 10 ⁻⁷
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	5,37 × 10 ⁻⁷

4.2.1.2 – Titulação potenciométrica

Para titulação potenciométrica dos sítios de sorção do material radicular foram preparadas soluções de HNO₃ e KOH nas concentrações 0,01; 0,1 e 0,5 mol L⁻¹. As soluções de HNO₃ foram padronizadas com Na₂CO₃ previamente seco em estufa por 24 h e as soluções de KOH foram padronizadas com as soluções de HNO₃. A força iônica do meio foi fixada com solução de KNO₃ 0,5 mol L⁻¹.

4.2.1.3 – Isolamento e extração seqüencial dos componentes da parede celular

Para isolamento da parede celular foi empregada solução 0,05 mol L⁻¹ do tampão HEPES (N-[2-hidroxietil] pirazina-N'-[2-ácido etanosulfônico] (Sigma, Alemanha) a pH 7,0, contendo 2 mmol L⁻¹ de K₂S₂O₅ (Sigma, Alemanha). Essa solução foi empregada como meio de estabilização das células vegetais rompidas durante o procedimento (CHANG *et al.*, 1999). O pH da solução foi ajustado com KOH (Merck, Alemanha) em pastilhas. Para a lavagem e secagem do material de parede celular isolado, foram empregadas soluções de etanol:água (4:1 v v⁻¹), metanol:clorofórmico (1:1 v v⁻¹) e acetona.

Para a extração seqüencial dos componentes da parede celular foram empregadas as seguintes soluções: SDS (dodecil sulfato de sódio) 0,05 mol L⁻¹ (Sigma, Alemanha), CDTA (trans-1-2-diaminociclohexano-N,N,N'N'-ácido tetra acético) 0,05 mol L⁻¹ (Sigma-Aldrich, Alemanha) a pH 6,5, Na₂CO₃ 0,05 mol L⁻¹ (Merck, Alemanha) e KOH 1,0 e 4,0 mol L⁻¹ (Merck, Alemanha).

4.2.1.4 – Determinação de Cu, Ni, Al e Fe nos sobrenadantes e resíduos do procedimento de extração seqüencial dos componentes da parede celular

Os padrões para construção das curvas analíticas utilizadas para a análise dos elementos químicos de interesse por GF AAS (espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite) foram preparados a partir de diluições apropriadas de soluções estoque 1000 mg L⁻¹ (Titrisol[®], Merck, Alemanha).

Materiais de referência certificados folha de maçã e farelo de milho (Apple leaves 1515 e Corn bran 8433; NIST, EUA) foram empregados para

avaliação do procedimento estabelecido para a digestão dos resíduos obtidos a partir da extração seqüencial dos componentes da parede celular.

4.2.1.5 – Determinação de aminoácidos

Solução de HCl 6 mol L^{-1} foi utilizada para a hidrólise ácida dos resíduos do procedimento de extração seqüencial dos componentes da parede celular. Solução de borato de sódio foi utilizada pra a retomada das amostras.

Para a análise cromatográfica de aminoácidos foi empregado um sistema solvente ternário das soluções A (composição: 15 % de fosfato de sódio 250 mmol L^{-1} , 20 % de ácido propiônico 250 mmol L^{-1} , 7 % de acetonitrila, 3 % de dimetilsulfóxido de sódio e 55 % de água, pH 6,2), B (composição: 40 % de acetonitrila, 33 % de metanol, 7 % de dimetilsulfóxido de sódio e 20 % de água) e C (composição: 25 % de sulfato de sódio 250 mmol L^{-1} , 20 % de ácido propiônico 250 mmol L^{-1} , 7 % de acetonitrila, 3 % de dimetilsulfóxido e 45 % de água, pH 5,5).

Curvas analíticas foram construídas a partir de padrões de 22 aminoácidos: Alanina (Ala), Arginina (Arg), Aspargina (Asn), Citosina (Cit), Cisteína (Cys), Ácido gamma-aminobutírico (GABA), Glutamina (Gln), Glutamato (Glu), Glicina (Gly), Histidina (His), Isoleucina (Ileu), Leucina (Leu), Lisina (Lys), Metionina (Met), Ornitina (Orn), Fenilalanina (Phe), Serina (Ser), Treonina (Thr), Triptofano (Try), Tirosina (Tyr) e Valina (Val).

Metanol e acetonitrilo empregados como solventes foram Lichrosolv, padrões cromatográficos Merck (Alemanha) os demais reagentes Sigma (Alemanha).

4.2.1.6 – Determinação de açúcares

Para as hidrólises ácidas foram empregados HCl e H_2SO_4 concentrados (Merck, Alemanha) e solução de 100 g L^{-1} de ácido trifluoroacético (Aldrich, Alemanha). Nas hidrólises promovidas com H_2SO_4 foi utilizado BaCO_3 (Merck, Alemanha) para neutralização do ácido. As amostras hidrolisadas e secas foram retomadas em acetonitrilo (Aldrich, Alemanha).

Placas cromatográficas Kieselgur G, sílica gel e celulose (Merck, Alemanha), foram empregadas nos estudos preliminares de identificação dos açúcares presentes nas amostras hidrolisadas.

Os reagentes fosfato monossódico, butanol, acetona, etanol, isopropanol, H₂SO₄ concentrado, ácido acético, acetato de sódio, acetato de etilo, fosfato monossódico e aldeído anísico (Merck, Alemanha); metanol e ácido fitálico (Aldrich, Alemanha) e ácido amino-hipúrico (Sigma, Alemanha), foram empregados nos preparos das fases móveis e dos reveladores para as placas cromatográficas.

Foram utilizados nos estudos cromatográficos de açúcares os padrões: D (+) Glucose (Sigma, Alemanha), L(+) Raminose (Fluka, Alemanha), D(+) Manose (Fluka, Alemanha), D(-) Ribose (Merck, Alemanha), α -D(+) Glucose (Sigma, Alemanha), D(-) Arabinose (Sigma, Alemanha), D(+) Xilose (Sigma, Alemanha), α -L(-) Fucose (Sigma, Alemanha), D(+) Ácido galacturônico (Fluka, Alemanha), D(+) Galactose (Fluka, Alemanha), D(+) Glucose (Fluka, Alemanha), D(-) Frutose (Sigma, Alemanha) e 2-Desoxi-D-Ribose (Sigma, Alemanha).

4.2.2 – Instrumentação

Para cominuição do material radicular foram utilizados moinhos de facas TE 048 (Marconi, Brasil) e criogênico 6750 Freezer/Mill (Spex CertiPrep, EUA).

Análise de distribuição do tamanho de partícula do material radicular de *P. notatum* submetido a moagem criogênica foi realizada empregando um analisador de distribuição granulométrica CILAS 1064, com faixa de 0,04 μ m - 5000 μ m/100 classes (Cilas, França).

A determinação da área superficial foi realizada empregando-se equipamento ASAP 2000 V2.04 (Micromeritics Instrument Corporation, EUA).

Micrografias de varredura eletrônica do material radicular submetido ou não à lixiviação ácida foram adquiridas em equipamento DSM 960 (ZEISS, Alemanha).

Os espectros de ressonância magnética nuclear RMN de ¹H foram obtidos em um equipamento de 9.4 Tesla (400 MHz para frequência do hidrogênio) modelo AVANCE (BRUKER, Alemanha), equipado com uma sonda HR/MAS de 4 mm de diâmetro interno, girando a 4 KHz.

Um potenciômetro digital (Mettler Toledo, modelo 355, Inglaterra), equipado com um eletrodo combinado foi usado para titulações potenciométricas com o objetivo de investigar os sítios de sorção disponíveis no material radicular de *P. notatum*.

O cultivo do material radicular jovem foi realizado em casa de vegetação termostaticada com temperatura constante de 25 °C e período de 24 horas de luz.

Nos estudos do procedimento adequado para o isolamento da parede celular foram empregados banho ultra-som (Sonics & Materials, USA), *mixer* Politrón PT2000 (Kinematica GMBH, Suíça) e sonda ultra-som Vibracell VC-130 (Sonics & Materials, USA), além do supra citado moinho criogênico.

Durante o procedimento de lavagem do material de parede celular obtido foi utilizada centrífuga refrigerada Sorvall® RT 6000 B (GMI, USA).

Forno de microondas equipado com frascos fechados de PTFE (politetrafluoretileno) modificado Multiwave (Anton Paar, Áustria) foi empregado para a digestão dos resíduos provenientes do procedimento de extração seqüencial dos componentes da parede celular. Os teores de Al e Fe para amostras submetidas a essa digestão foram determinados por espectrômetro de emissão ótica (ICP OES) Vista-AX, com visão axial (Varian, Austrália). As determinações de Ni e Cu foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica (GF AAS) AA-800Z (Varian, Austrália), equipado com corretor de fundo com efeito Zeeman transversal, aquecimento longitudinal e tubos de grafite recobertos piroliticamente.

Tentativa de análise de Al, Fe, Cu e Ni nos sobrenadantes obtidos no procedimento de extração seqüencial dos componentes da parede celular foi realizada empregando-se espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GF AAS) AA100 (Perkin Elmer, EUA) equipado com amostrador automático AS-72 (Perkin Elmer, EUA) e tubos de grafite pirolítico com plataforma de L'vov.

No preparo das amostras para a investigação de aminoácidos e açúcares nos resíduos do estudo de extração seqüencial dos componentes da parede celular foram empregados estufa com passagem forçada de ar (Systec, Alemanha) evaporador rotativo R-200 (Mec Sens, Suíça) e autoclave 5075 ELV (Systec, Alemanha).

Para a separação cromatográfica dos aminoácidos foram empregados pré-coluna de derivatização com o-fitalaldeído/2-mercaptoetanol (OPA/MECE) e detector de fluorescência modelo 121 (Gilson, EUA) ajustado para a detecção das linhas de emissão e excitação 340 e 410 nm. As concentrações dos aminoácidos foram determinadas por determinação da área do pico.

A purificação prévia das amostras de açúcares foi realizada em coluna Chromabond C18, Ref.730 004 (Macherey-Nagel, EUA).

Para separação cromatográfica de açúcares foi empregado equipamento para HPLC com injeção manual equipado com coluna Carbohydrate Analysis 3,9 × 300 mm (Waters, Irlanda) e pré-coluna μ bondapak™ NH₂ Guard-Park™ (Waters, Irlanda) e detector de índice de refração modelo 131 (Gilson, EUA).

Para tratamento dos dados da titulação potenciométrica utilizou-se a versão demonstrativa do *software* SigmaPlot® e, para estudos de correlação entre açúcares, aminoácidos e metais empregou-se o *software* Statistica®.

4.3 – Procedimento experimental

4.3.1 – Análise de tamanho de partícula e de área superficial do material radicular cominuído

As análises de distribuição do tamanho de partícula do material radicular de *P. notatum* submetido a moagem criogênica foram realizadas em água, sem agente dispersante.

Análise de área superficial foi realizada pelo método de adsorção gasosa BET (Brauner, Emmet e Teller), empregando cerca de 0,3 g de amostra, nitrogênio (como gás de análise) e intervalo de equilíbrio de 5 s.

4.3.2 – Micrografias de varredura eletrônica do material radicular cominuído

Amostras de material radicular lixiviado e não lixiviado (utilizadas nos estudos de sorção, Capítulo 3), foram submetidas à aquisição de imagens por micrografia de varredura eletrônica para verificar possíveis alterações após os diferentes tratamentos. Nesse procedimento, as amostras receberam recobrimento com ouro para a análise física dos materiais e de grafite para a análise semi-qualitativa de metais.

4.3.3 – Análises de RMN do material radicular lixiviado e não lixiviado

Segundo DARNALL *et al.* (1986), os processos de lixiviação ácida empregados no condicionamento do biossorvente para favorecer a pré-concentração também extraem compostos orgânicos e biomoléculas com capacidade de sorção. Com o objetivo de investigar essa extração, efetuou-se análises de RMN do material radicular não lixiviado e lixiviado.

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos à temperatura de 298K e utilizando-se $\text{D}_2\text{O}/\text{TSPA-d}_4$ como solvente e referência interna, respectivamente. Para o material não lixiviado foram obtidos 512 FIDs com uma janela espectral de 7062 Hz, tempo de aquisição de 2,32 s e um tempo de pré-saturação do sinal do HDO de 1.8 s. Os FIDs foram processados utilizando-se zero-filling e $\text{lb}=0,3$. Para o

material lixiviado os mesmos valores foram fixados à exceção do nº de FIDs, que foi de 64.

4.3.4 – Titulação potenciométrica dos sítios de sorção do material radicular

Para a titulação potenciométrica foram preparadas suspensões de cerca de 25 mg de material radicular de *P. notatum*, lixiviado e não lixiviado em força iônica fixada com KNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (50 mL de solução). As suspensões foram mantidas sob agitação constante e registrou-se o valor de pH inicial. As amostras foram tituladas com soluções previamente padronizadas de HNO_3 com concentrações em torno de 0,01, 0,05 e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ até pH. Titulou-se também o material, sob mesma força iônica, com soluções padronizadas de KOH (concentrações aproximadas de 0,01, 0,05 e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) até pH 12.

É importante salientar que o pH de equilíbrio deve ser alcançado para que não ocorram erros na reprodução da curva. Para tanto, deve-se estipular um tempo mínimo entre a adição do titulante e a medida do pH sendo, no procedimento realizado, de 5 minutos. Para a obtenção dos dados de titulação consistentes, certificou-se que a mudança de pH depois de cada adição do titulante não excedesse 0,3 unidades.

4.3.5 – Investigação dos componentes da parede celular de material radicular jovem (coleta com 21 dias) e maduro (coleta com 120 dias)

4.3.5.1 – Cultivo e coleta do material radicular jovem

Para obtenção de material de parede celular a partir de raízes jovens, doze indivíduos de *P. notatum* foram cultivados em um canteiro de areia lavada, recebendo solução nutritiva contendo macro e micronutrientes nas proporções apresentadas na TABELA 4.5. A solução nutritiva foi ministrada uma vez por semana, sendo distribuídos 25 mL para cada 1,5 kg de areia. O cultivo foi realizado em estufa com temperatura controlada (25°C).

O material radicular foi coletado para estudo após 21 dias de cultivo, sendo podadas todas as raízes jovens. Após a poda, o material radicular foi lavado em água corrente, água destilada e água destilada-desionizada. O material foi então

enxuto em papel toalha. A pesagem do material radicular (peso jovem) foi realizada após 20 min da coleta, para que a água absorvida durante as lavagens não influenciasse no peso final. Depois da determinação do peso jovem, o material radicular foi cortado em partes inferiores a 0,5 cm, suspenso em solução tampão HEPES 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,0), contendo 2 mmol L⁻¹ de K₂S₂O₅, e congelado.

4.3.5.2 – Isolamento da parede celular

Foram testados quatro procedimentos para rompimento das células e isolamento da parede celular do material radicular jovem do *P. notatum*, sendo o acompanhamento do rompimento efetuado com auxílio de microscópio.

Procedimento 1: foi baseado no descrito por CHANG *et al.* (1999) para rompimento de parede celular de material radicular de *Nicotiana tabacum* L. O material suspenso em tampão HEPES 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,0) contendo 2 mmol L⁻¹ de K₂S₂O₅ foi congelado e descongelado. O material foi submetido a ultra-som com potência nominal de 35 W, em banho de gelo a 4 °C (35 ciclos de 6 min cada).

Procedimento 2: a suspensão do material radicular congelado, descongelado e mantido em banho de gelo a 4 °C foi submetida a sonda de ultra-som com potência nominal de 100 W (15 ciclos de 2 s cada com amplitude de 60 GHz).

Procedimento 3: a amostra do material radicular foi congelada, descongelada e mantida resfriada a 4 °C. A seguir, foi submetida à ação de um triturador (Politron) para homogeneização/rompimento da parede celular (3 ciclos de 10 s a rotação de 4000 rpm).

Procedimento 4: o material radicular foi previamente congelado, descongelado e submetido a moagem criogênica segundo o programa apresentado na TABELA 4.6.

TABELA 4.6 – Programa utilizado para rompimento da parede celular do material radicular jovem por moagem criogênica.

Etapa	Função	Tempo (min)
1	Pré-congelamento	2
2	Moagem	4
3	Resfriamento	3

Após os procedimentos testados para rompimento da parede celular, as suspensões foram centrifugadas a 2200 rpm por 10 min a 4 °C, o sobrenadante contendo o conteúdo celular foi descartado, e o resíduo ressuspenso em água destilada-desionizada gelada. O procedimento de centrifugação e descarte do sobrenadante foi repetido 3 vezes e o material de parede celular foi então lavado seqüencialmente com etanol:água (4:1 v v⁻¹), metanol:clorofórmio (1:1 v v⁻¹) e acetona. As lavagens foram procedidas com adição de 4 alíquotas de 10 mL de cada solução, com etapas de centrifugação a 2200 rpm por 5 min entre cada lavagem. As lavagens com solventes têm o objetivo de auxiliar a secagem do material promovida com a passagem de ar. Após secagem, o material radicular foi pesado para cálculo do rendimento da produção de parede celular.

Segundo CHANG *et al.* (1999), somente amostras de material radicular jovem apresentariam êxito no estudo de extração seqüencial dos componentes da parede celular. Contudo, nos estudos de sorção de íons metálicos foi empregado material radicular coletado com 120 dias, sendo assim importante conhecer a composição de aminoácidos e açúcares, bem como a localização dos analitos que apresentaram sorção na parede celular desse material. Desta forma, optou-se por executar o procedimento de extração seqüencial também para o material lixiviado e não lixiviado empregados na sorção de íons metálicos. Para esses materiais, os procedimentos de rompimento da parede celular não foram testados, uma vez que já se encontravam moídos em moinho criogênico, segundo o procedimento descrito no item 3.3.2, e liofilizados. Esses materiais foram suspensos em tampão HEPES 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,0) contendo 2 mmol L⁻¹ de K₂S₂O₅, congelados, descongelados, ressuspenso em água, e secos com os solventes orgânicos de acordo com o descrito para o material radicular jovem.

4.3.5.3 – Extração seqüencial dos componentes da parede celular

A extração seqüencial dos componentes da parede celular contou com 6 etapas que empregaram soluções e temperaturas diferentes. As etapas estão descritas na TABELA 4.7.

TABELA 4.7 – Etapas de extração seqüencial dos componentes da parede celular e os principais componentes extraídos (CHANG *et al.*, 1999).

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Componente extraído
Rompimento da parede			Conteúdo celular
SDS 0,5 mol L ⁻¹	22	2	Proteína e compostos intracelulares
CDTA 0,5 mol L ⁻¹	22	6	Pectina (ligante solúvel)
Na ₂ CO ₃ 0,5 mol L ⁻¹	1	12	Pectina
Na ₂ CO ₃ 0,5 mol L ⁻¹	20	3	Pectina
KOH 1 mol L ⁻¹	20	2	Pectina e hemicelulose
KOH 4 mol L ⁻¹	20	2	Hemicelulose
Resíduo			Pectina, hemicelulose e celulose

Devido ao interesse de analisar Al, Fe, Ni e Cu, aminoácidos e açúcares em cada fração, realizou-se todo o procedimento três vezes e em triplicata. Para estudos cujo objetivo era a análise de aminoácidos e açúcares, foram empregados 500 µg de material de parede celular, 60 µL de cada uma das soluções extratoras e 40 µL de água destilada deionizada. Reservou-se para análise os resíduos finais de cada etapa e, para aminoácidos, também foram separados os sobrenadantes. No procedimento cujo objetivo final era a determinação de metais, as proporções entre massa e volume foram mantidas e empregou-se 1500 µg de material de parede celular, 180 µL das soluções extratoras e 120 µL de água, reservando-se o sobrenadantes e os resíduos de cada etapa. O fluxograma apresentado na FIGURA 4.5 apresenta o procedimento para extração seqüencial dos componentes da parede celular que foi repetido 3 vezes para obtenção de amostras para a análise de açúcares, aminoácidos e metais.

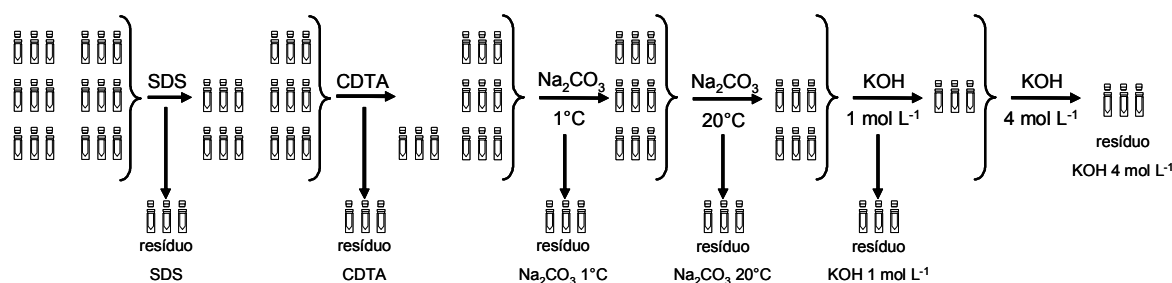


FIGURA 4.5 – Fluxograma apresentando o número de amostras empregado para a extração seqüencial dos componentes da parede celular e a seqüência de reagentes extratores.

4.3.5.4 – Determinação de Cu, Ni, Al e Fe nos sobrenadantes do procedimento de extração seqüencial dos componentes da parede celular

Foram escolhidos para serem monitorados 4 analitos que apresentaram sorção no emprego de material radicular de *P. notatum* como bioissorvente, Cu, Ni, Al e Fe. Seguindo-se o procedimento descrito por CHANG *et al.* (1999), a primeira tentativa de determinação de metais por GF AAS empregou os sobrenadantes provenientes da extração seqüencial. Para tanto, as curvas de pirólise e atomização foram construídas empregando-se as temperaturas obtidas a partir de estudos realizados com injeção de 15 µL de soluções padrão 5, 10 e 20 µg L⁻¹ dos elementos Cu, Ni, Al e Fe, preparadas em cada um dos meios extratores. As soluções preparadas em meio Na₂CO₃ foram acidificadas para evitar precipitação dos analitos de interesse.

A repetibilidade das medidas foi afetada para os meios SDS e Na₂CO₃, provavelmente devido a dificuldade de amostragem para a primeira solução e à elevada concentração salina do segundo meio.

Para os meios KOH 1 e 4 mol L⁻¹, não foi possível preparar as soluções analíticas para levantamento das curvas de pirólise e atomização. Neutralização prévia da solução foi realizada como tentativa de inibir a precipitação dos analitos na forma de hidróxido. Assim, as soluções de hidróxido foram preparadas através de titulações com HNO₃ concentrado para evitar diluições que promovessem diferentes concentrações entre os padrões e a as amostras extraídas. Contudo, as soluções resultantes apresentaram-se altamente destrutivas ao forno de grafite, sendo estes praticamente inutilizados após cerca de 50 queimas. Este fato levou à inviabilidade da determinação dos analitos neste meio. Como alternativa as determinações foram realizadas nos resíduos, sendo os teores nos sobrenadantes removidos do material radicular pelas soluções extratoras em estudo determinados por diferença. Para tanto foi necessário realizar a digestão dos resíduos.

4.3.5.5 – Determinação de Cu, Ni, Al e Fe nos resíduos do procedimento de extração seqüencial dos componentes da parede celular

Os resíduos obtidos à partir dos tratamentos com as diferentes soluções extratoras, por se apresentarem em massas relativamente pequenas

($\leq 1500 \mu\text{g}$), foram digeridos em recipientes em PTFE, FIGURA 4.6. Para avaliar a melhor condição de digestão para as amostras foram testadas 5 combinações de misturas oxidantes empregando HNO_3 concentrado e H_2O_2 30 % v v⁻¹: A) 100 μL de HNO_3 ; B) 200 μL de HNO_3 ; C) 100 μL de HNO_3 +50 μL de H_2O_2 ; D) 75 μL de HNO_3 + 75 μL de H_2O_2 e E) 200 μL de HNO_3 +50 μL de H_2O_2 .

Os procedimentos D e E apresentaram-se eficientes, resultando em soluções límpidas. Como havia a necessidade de se evitar maiores diluições das amostras por desconhecimento dos teores dos analitos de interesse, optou-se por empregar o procedimento D. A transferência do material para os recipientes de PTFE foi realizada com os próprios reagentes oxidantes. Material de referência certificado foi digerido sob as mesmas condições dos resíduos de material de parede celular, para verificar a eficiência do procedimento.

Após a transferência, os recipientes foram introduzidos nos frascos de PTFE do microondas com cavidade que continha 2 mL de água destilada desionizada. Como em sistemas de digestão fechados não há ebulição devido as altas pressões geradas no interior dos frascos, os 2 mL de água foram adicionados para a absorção de energia microondas excedente, não entrando em contato com o interior dos recipientes que continham as amostras. A FIGURA 4.6 apresenta as dimensões do recipiente utilizado e o programa de aquecimento utilizado para a digestão dos resíduos está descrito na TABELA 4.8.

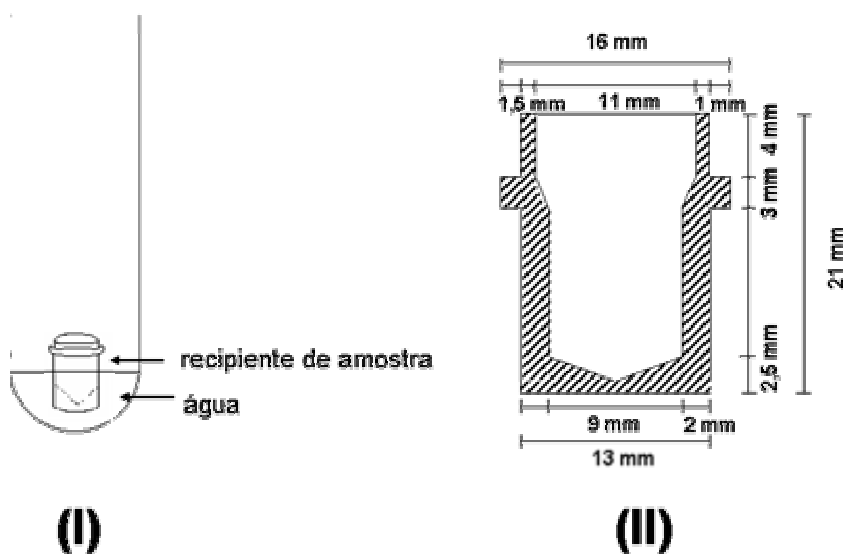


FIGURA 4.6 – (I) esquema do recipiente de amostras dentro do frasco do forno microondas com cavidade, (II) corte transversal do recipiente de amostras.

TABELA 4.8 – Programa de aquecimento para digestão de resíduos do procedimento de extração seqüencial de componentes da parede celular empregando forno de microondas Multiwave (Anton Paar), programa para 6 amostras.

Etapa	Potência (W)	Tempo (min)	Intensidade de Ventilação
1	250	3	1
2	0	2	1
3	400	4	1
4	650	10	2
Ventilação		15	3

Após digestão, as amostras foram transferidas para frascos tipo “ependorff”, previamente pesados, sendo os volumes ajustados com água destilada desionizada para aproximadamente 1 g de solução.

Dos elementos de interesse, Cu e Ni foram determinados por GF AAS, sendo levantadas curvas de pirólise e atomização introduzindo-se 15 µL de solução padrão de cada elemento nas concentrações 21 µg L⁻¹ e 30 µg L⁻¹ e linhas de emissão 324,8 e 232,0 nm, respectivamente. Os programas estabelecidos para esses elementos estão descritos da TABELA 4.9.

TABELA 4.9 – Programas de aquecimento estabelecidos para determinação de Cu e Ni por GF AAS em meio ácido (HNO₃ 0,14 mol L⁻¹) sem uso de modificador químico. Volume de solução: 15 µL.

Etapa	Temperatura °C	Tempo (s)	Fluxo de gás (L min ⁻¹)	Leitura
Secagem	85	5,0	3,0	Não
Secagem	90	40,0	3,0	Não
Secagem	120	10,0	3,0	Não
Pirólise	1100 (Cu) 800 (Ni)	8,0	3,0	Não
Atomização	2400 (Cu) 2500 (Ni)	3,1	0	Sim
Limpeza	2500	2,0	3,0	Não

Alumínio e ferro foram determinados por ICP OES AX, operando em condições robustas, sendo os parâmetros operacionais apresentados na TABELA 4.10.

TABELA 4.10 - Parâmetros operacionais empregados para determinação de Al e Fe por ICP OES com visão axial.

Parâmetros instrumentais	ICP-OES
Visão	Axial
Sistema Óptico	Echelle
Detector	CCD (167-785 nm)
Potência (kW)	1,3
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15,0
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,5
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,7
Câmara de nebulização	Sturman-Masters
Nebulizador	V-groove
Vazão do fluxo da amostra (L min ⁻¹)	0,80
Linhas de emissão (nm):	Al (I) 396,152 Fe (II) 238,202

I e II, linhas de emissão atômica e iônica, respectivamente.

4.3.5.6 – Determinação de aminoácidos nas frações da parede celular

A determinação de aminoácidos foi realizada nos sobrenadantes e resíduos recolhidos do procedimento de extração seqüencial dos componentes da parede celular para o material radicular lixiviado, não lixiviado e jovem.

Para as amostras de resíduos foi necessária uma hidrólise ácida do material com 1 mL de HCl 6 mol L⁻¹ sob atmosfera de argônio. Para tanto, as amostras de resíduos foram transferidas para ampolas de vidro, empregando-se a própria solução de HCl, e argônio foi borbulhado através da solução por 3 min. As ampolas foram imediatamente seladas em bico de Bunsen e submetidas a uma temperatura de 130 °C por 24 h. Após resfriamento, as ampolas foram abertas e as amostras transferidas para balões de fundo redondo e a solução evaporada em evaporador rotativo operando a 40 °C para evitar desnaturação dos componentes

das amostras. Foram realizadas adições seqüenciais de água às amostras até que todo o ácido fosse evaporado. As amostras foram retomadas em 200 μL de tampão borato de sódio, pH 2,2.

A separação cromatográfica foi realizada através da introdução das amostras na coluna cromatográfica, após microfiltração, sob um fluxo de 2,5 mL min^{-1} durante 45 min, empregando o sistema de solvente ternário, citado no item 4.2.1.5, como fase móvel.

As análises dos aminoácidos foram realizadas em detector de fluorescência sob as linhas de excitação e emissão 340 e 410 nm, após a derivatização das amostras em uma pré-coluna com o-fitalaldeído/2-mercaptoetanol (OPA/MCE), FIORINO *et al.*, 1989. As determinações qualitativas e quantitativas dos aminoácidos foram efetuadas por comparação com as áreas de pico e tempos de retenção de curva analítica preparada com os 22 aminoácidos seguintes: Ala, Arg, Asn, Asp, Cit, Cys, GABA, Gln, Glu, Gly, His, Ileu, Leu, Lys, Met, Orn, Phe, Ser, Thr, Try, Tyr, Val.

4.3.5.7 – Determinação de açúcares nas frações da parede celular

As amostras de parede celular de material radicular lixiviado, não lixiviado e jovem foram submetidas a hidrólise em 3 diferentes meios.

Hidrólise 1: O procedimento foi adaptado do descrito na Farmacopéia Portuguesa VII (2002) para goma arábica. Cerca de 6,7 mg das amostras foram hidrolisados em estufa por 22 h a 120 °C, com 450 μL de uma solução de 100 g L^{-1} de ácido trifluoroacético e atmosfera inerte (Ar) em ampola de vidro selada em chama.

Hidrólise 2: Testou-se procedimento descrito por DEGENHARD & GIMMIER (2000) para aminoácidos, empregando HCl 6 mol L^{-1} . Cerca de 6,7 mg de amostra foram submetidas à hidrólise a 130 °C por 24 h com 1 mL da solução ácida, em ampolas de vidro seladas em chama e atmosfera de Ar.

Após as hidrólises com HCl e ácido trifluoroacético, as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes levados à secagem em evaporador rotativo, a 40 °C, em balões de fundo redondo. Após cada secagem, adicionou-se água destilada deionizada às amostras, que foram novamente secas. O processo se repetiu até que todo o ácido fosse eliminado, sendo monitorado com papel indicador de pH.

Hidrólise 3: Um procedimento empregando H_2SO_4 concentrado, descrito por HATFIELD *et al.* (1994) foi também testado para a hidrólise de açúcares. As amostras, cerca de 6,7 g, foram solubilizadas com H_2SO_4 concentrado a $30\text{ }^\circ\text{C}$ por 60 min em atmosfera inerte de Ar. As amostras foram então diluídas com água destilada desionizada para obtenção de concentração final $0,4\text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 e levadas à hidrólise secundária em autoclave a $121\text{ }^\circ\text{C}$ por 60 min. Após a hidrólise, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante neutralizado com BaCO_3 . As amostras foram então centrifugadas para remoção do precipitado de BaSO_4 formado e o sobrenadante foi levado a evaporador rotativo até *secura*.

Antes da separação cromatográfica foi necessária a purificação em coluna Chromabond. A ativação do Chromabond foi realizada através de passagem de 5 mL de água (desgaseificada e microfiltrada) e 5 mL de acetonitrilo através da coluna. Após a ativação, as amostras hidrolisadas e livres de solução ácida foram solubilizadas em 2 mL de água e 2 mL de acetonitrilo e percoladas através do sistema. O eluato foi recolhido após sucessivas lavagens do balão da amostra com as seguintes misturas: A) 2 mL água + 2 mL acetonitrilo; B) 0,5 mL água + 0,5 mL acetonitrilo e C) 0,5 mL água + 0,5 mL acetonitrilo. Após recolhimento de todas as frações passou-se através da coluna 2 mL de solução acetonitrilo a 50 %, que foi acrescentado aos eluatos anteriores, perfazendo 12 mL de solução de amostra. Essa solução foi concentrada em evaporador rotativo até eliminação dos solventes e o resíduo foi retomado em 100 μL de solução de acetonitrilo a 50%, microfiltrado e analisado por cromatografia líquida em camada delgada (TLC) e HPLC.

Para avaliação preliminar dos açúcares presentes nas amostras hidrolisadas, prepararam-se 4 placas cromatográficas para TLC com diferentes fases estacionárias.

- 1) Kieselgur G: Primeiramente a placa de Kieselgur foi impregnada com solução de fosfato monossódico 16 g L^{-1} em uma câmara de impregnação. A placa foi seca, as amostras e padrões aplicados e o desenvolvimento realizado em uma câmara previamente impregnada com solução de 16 g L^{-1} de fosfato monossódico, butanol e acetona (1:4:5 v v⁻¹), que atuou como fase móvel. A fase móvel foi desenvolvida por 10 cm, a placa foi seca com passagem de ar quente e novo desenvolvimento foi realizado pelo percurso de 15 cm. Como revelador foi pulverizada a solução de ácido amino-hipúrico preparada dissolvendo-se 3 g ácido fitálico e 0,3 g de ácido amino-hipúrico em álcool,

- sendo o volume final completado com o mesmo solvente para 100 mL. A placa foi aquecida a 110 °C por 5 min para revelação.
- 2) Kieselgur G tampão acetato: A placa de Kieselgur G foi impregnada com solução 0,02 mol L⁻¹ de acetato de sódio. Após impregnação a placa foi seca por 30 min a 100 °C para eliminação da água usada no preparo da solução de acetato de sódio. As amostras e padrões foram aplicados e o desenvolvimento realizado em uma câmara previamente saturada com solução fase móvel preparada com 65 mL de acetato de etilo + 35 mL de uma mistura de isopropanol e água destilada (2:1) A fase móvel foi desenvolvida por 10 cm. Para revelação foi pulverizada solução preparada com 9 mL de etanol + 0,5 mL de aldeído anísico + 0,5 mL de H₂SO₄ concentrado e aquecida a 100 °C por 5 min para revelação (RANDERATH, 1971).
 - 3) Celulose: Como fase móvel foi preparada solução adicionando-se na ordem de escrita butanol-ácido acético-água (4:1:5). Após o preparo, a solução foi deixada descansando até separação das fases imiscíveis. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica mantida para uso como fase móvel. Como solução reveladora foi empregada solução preparada dissolvendo-se 9,2 mL de anilina com 16g de ácido fitálico em 490 mL de butanol, 490 mL de etanol e 20 mL de água. A solução reveladora foi pulverizada e a placa levada a aquecimento a 90 °C (HARBORNE, 1998).
 - 4) Sílica gel: O procedimento para preparo desta placa foi baseado no descrito na Farmacopéia Portuguesa (2002). Como fase móvel foi utilizada uma mistura preparada a partir de solução de 16 g L⁻¹ de fosfato monossódico, butanol e acetona (1:4:5 v v⁻¹). A placa foi desenvolvida até 10 cm, seca em corrente de ar quente e desenvolvida novamente na mesma fase móvel até 15 cm. A placa cromatográfica foi seca ao ar, pulverizada com a solução reveladora e aquecida a 110 °C por 10 min. A solução reveladora foi preparada misturando-se os reagentes na seguinte ordem: 0,5 mL de aldeído anísico com 10 mL de ácido acético, 85 mL de metanol e 5 mL de H₂SO₄ concentrado.

A injeção de replicatas de 20 µL das amostras foi finalmente realizada na coluna cromatográfica e os açúcares analisados a partir da comparação dos tempos de retenção e das área dos picos integradas obtidos para as amostras e padrões cromatográficos.

4.4 - Resultados e discussão

4.4.1 – Análise de tamanho de partícula e de área superficial do material radicular moído

O tamanho de partícula é um parâmetro a ser conhecido em estudos de pré-concentração, pois está diretamente relacionado com a área superficial disponível para a sorção de analitos. O material radicular de *P. notatum* foi moído uma ou duas vezes, com a utilização do programa de moagem apresentado na TABELA 3.1.

Após uma moagem, 90 % das partículas apresentaram tamanho médio menor que 202 μm e 50 % menores que 53 μm . Para o material submetido a duas moagem, 90 % das partículas apresentaram diâmetro menor que 182 μm e 50 % menor que 46 μm , o que configura redução de 10 % a 13 % no tamanho das partículas em relação à primeira moagem. Para os estudos de sorção foi empregado somente material moído duas vezes. A FIGURA 4.7 apresenta a distribuição granulométrica para o material radicular moído duas vezes, que foi empregado no estudos de capacidade de sorção e de investigação de constituintes da parede celular do material radicular.

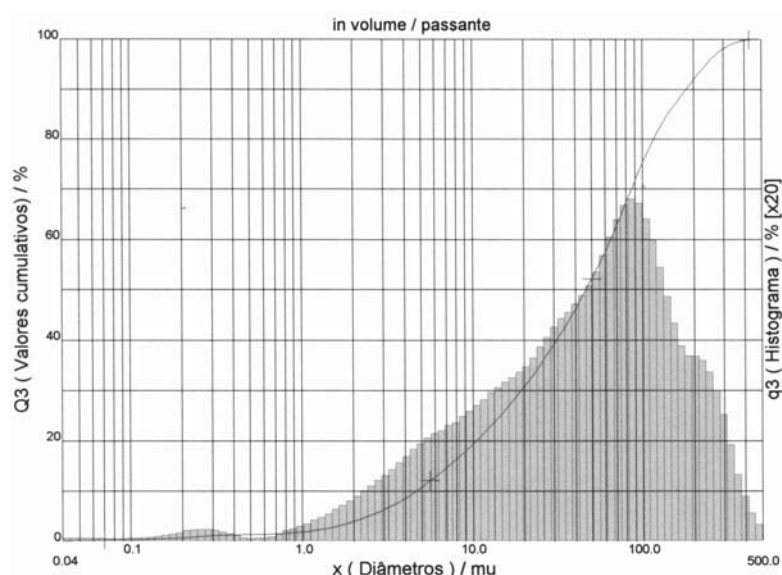


FIGURA 4.7 – Distribuição de tamanho de partículas para material radicular de *P. notatum* moído duas vezes em moinho criogênico.

4.4.2 – Micrografias de varredura eletrônica do material radicular cominuído

As FIGURAS 4.8 a 4.11 apresentam micrografias de varredura eletrônica (MEV) para amostras de material radicular de *P. notatum*. Não houve diferença visual entre as amostras lixiviada e não lixiviada com ácido, por isso optou-se por apresentar somente uma das amostras.

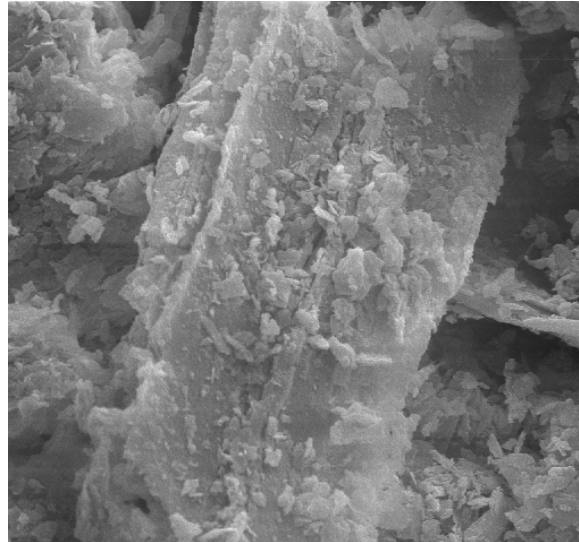


FIGURA 4.8 – Micrografia de varredura eletrônica de material radicular de *P. notatum* moída duas vezes, aumento de 1000 vezes.

Um outro fragmento apresenta a estrutura das paredes celulares expostas, FIGURA 4.9, o que proporciona uma disponibilidade de sítios de sorção característicos de substâncias internas à raiz. Tratam-se de canais de condução de seiva bruta ou elaborada, que não são bem distinguidos em raízes de gramíneas.

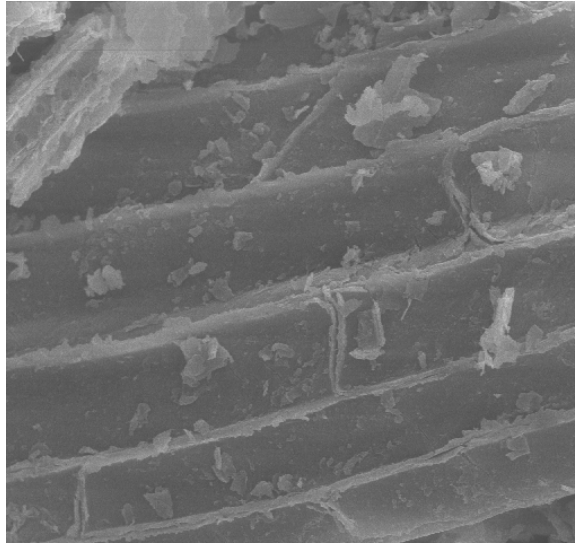


FIGURA 4.9 – Micrografia de varredura eletrônica com visão das paredes celulares das células vegetais, aumento de 1000 vezes.

A FIGURA 4.10 apresenta a ampliação da parede celular apresentada na FIGURA 4.9, onde se visualiza microcanais de conexão entre os canais de condução de seiva.

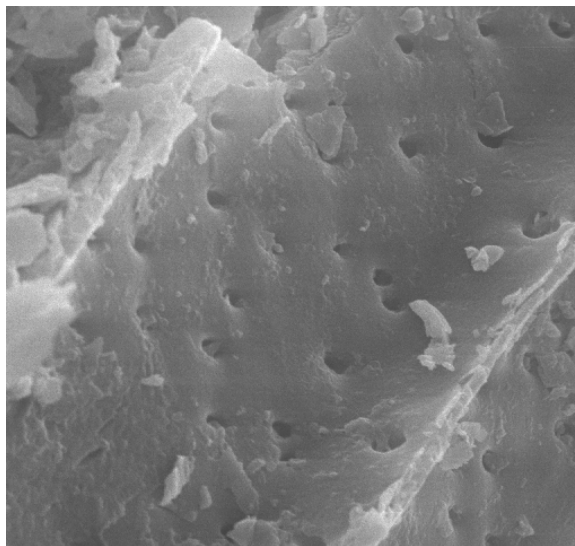


FIGURA 4.10 – Micrografia de varredura eletrônica da parede celular ampliada com visão de poros de comunicação, aumento de 3000 vezes.

A FIGURA 4.11 apresenta estrutura intacta, diferente da raiz, que provavelmente se trata de microorganismo convivente na raiz do *P. notatum*. A presença de microorganismos sugere que além dos sítios de sorção disponibilizados pela raiz, podem estar disponibilizados sítios de sorção presentes na estrutura

celular de microorganismos. Com isso, a partir desta observação, sugere-se referir-se a raiz como material radicular.

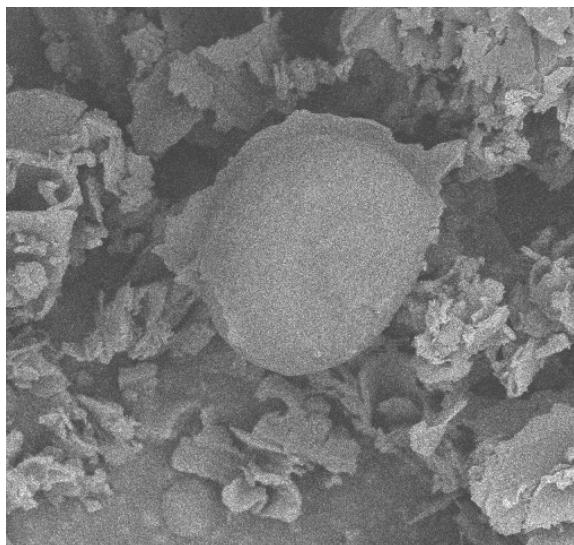


FIGURA 4.11 – Micrografia de varredura eletrônica apresentando microorganismo encontrado na amostra de raiz de *P. notatum*, aumento de 3000 vezes.

4.4.3 – Análises de RMN do material radicular lixiviado e não lixiviado

Nas análises de RMN do material radicular pode-se observar diferenças no espectro obtido para o material lixiviado e não lixiviado. A FIGURA 4.12 apresenta os espectros para as duas amostras.

O espectro para o material lixiviado apresentou melhor resolução do que o obtido para material não lixiviado. É certo que a razão sinal ruído para o segundo apresentou-se de menor qualidade, o que pode ter sido ocasionado pelos próprios componentes do material não lixiviado.

A melhor resolução para o material lixiviado pode estar associada a possível hidrólise dos açúcares da amostra ocasionada pela solução ácida de lavagem (região δ 4,5 e 2,5 ppm), que deixaria desprotegidos os hidogênios ligados a carbonos anoméricos, bem definidos nesse espectro entre e δ 5,5 e 4,5 ppm e confusos para o material não lixiviado. Um outro fator que pode estar colaborando com a melhor resolução seria uma possível remoção de compostos pela solução ácida o que permitira uma visualização menos “poluída” dos deslocamentos químicos.

Também é visível um pico na região de δ 2,5-2,0, mais intenso para o material não lixiviado, característico de CH_3 ligado a carbono insaturado, NH (bastante desprotegido) e CH_3 ligado a carbono com grupo cetona. Devido aos componentes conhecidamente presentes em raízes e devido ao processo de lixiviação minimizar o sinal do referido pico, sugere-se uma maior probabilidade deste ser proveniente ou de CH_3 ligado a carbono insaturado ou de NH, presente nos aminoácidos constituintes do conteúdo celular e que seriam eliminados pela junto com a solução ácida.

O que pode ser afirmado é que o material radicular sofre alteração em sua composição pela lavagem ácida, o que pode afetar a capacidade de sorção de íons metálicos.

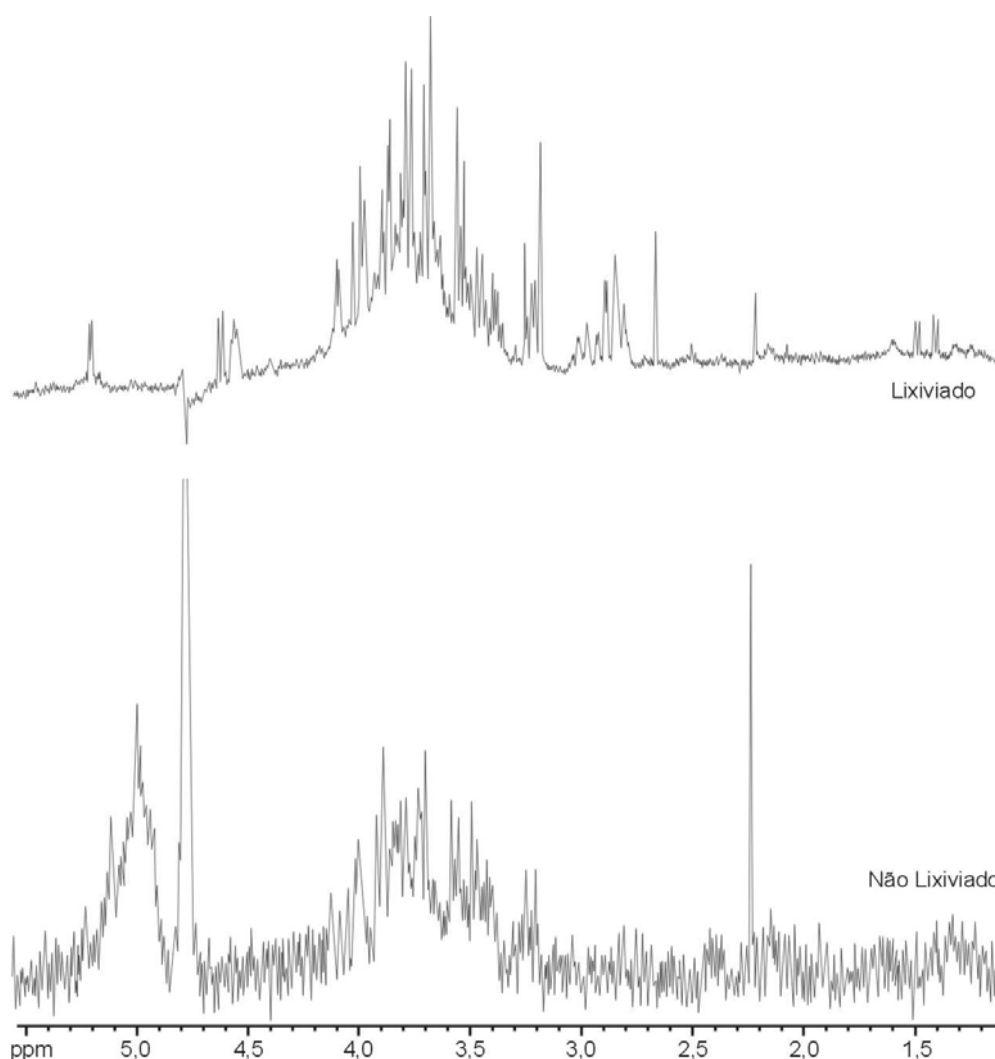


FIGURA 4.12 – Espectros Espectros de ^1H RMN do material radicular de *P. notatum* não lixiviado e lixiviado para a região δ 5,4-1,5 ppm.

4.4.4 – Titulação potenciométrica dos sítios de sorção do material radicular

A diversidade e a complexidade dos grupos funcionais orgânicos com potencial ligante em materiais bissorventes é significativamente maior que para os sítios ligantes em sólidos puros como óxidos metálicos e argilas. Devido a este fato, é enorme a dificuldade da caracterização dos ligantes nesses materiais. Titulações potenciométricas ácido-base tem sido empregadas para ilustrar a natureza das constantes de acidez (K_a). A partir dos dados da variação do pH a cada volume de titulante adicionado, pode-se inferir qualitativamente sobre o número de constantes de acidez e as características das mesmas.

Contudo, a heterogeneidade química dos materiais biológicos dificulta a interpretação das curvas de titulação, tornando impossível uma interpretação em termos de um único valor de pK_a (NEDERLOF *et al.*, 1993). Apesar de não serem determinados pK_a s bem definidos, faixas de acidez associadas a grupos funcionais (tais como o fenólico e carboxílico) podem ser diferenciadas.

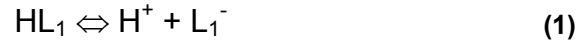
Pode-se buscar na literatura constantes encontradas no ajuste dos dados que possam ser interpretadas como constantes de acidez médias, representando classes de grupos funcionais. Tais faixas de acidez podem fornecer informações importantes sobre a magnitude e afinidade dos sítios de complexação em relação aos íons hidrogênio e metálicos (WESTALL *et al.*, 1995).

O modelo mais simples e menos satisfatório é o que trata o material biossorvente como uma mistura de ligantes simples. Apesar da variedade de modelos, a maioria deles pode representar o processo sob condições experimentais únicas. Embora existam dificuldades na representação, a consideração da ocorrência de sítios monopróticos discretos múltiplos na complexação é satisfatória (WESTALL *et al.*, 1995). Outras considerações como a distribuição gaussiana de sítios, ou outras de natureza contínua têm sido utilizadas, mas a quantidade de parâmetros requeridos geralmente é numerosa, o que dificulta uma aplicação prática (URE & DAVIDSON, 1995).

No presente trabalho, foi utilizada a otimização não linear dos dados experimentais baseada no método dos mínimos quadrados originalmente utilizado para a caracterização de substâncias húmicas aquáticas (LEMOS & TAKIYAMA, 1999). Foi levada em consideração a existência de sítios monopróticos discretos múltiplos para a complexação.

Determinação das Constantes de Acidez:

Considerando-se a dissociação de um grupo ácido do *Paspalum*, L_1 :



Onde HL_1 , H^+ e L_1^- representam o grupo ácido não dissociado, íon hidrogênio e grupo ácido dissociado. A constante de acidez do equilíbrio representado acima é dada por:

$$K_a = \frac{[H^+][L^-]}{[HL]} \quad (2)$$

Assumindo que o material contenha n sítios de ligação de íons metálicos principais, e tratando-se estes sítios como ácidos fracos monoproticos discretos, HL_n , o consumo de H^+ por estes sítios pode ser expresso através da equação a seguir (HUANG *et al.*, 1998):

$$\Delta V = \frac{V_0}{C} \left[\sum_{n=1}^n C_n \left(\frac{K_{an}}{[H^+] + K_{an}} - \frac{K_{an}}{[H^+]_0 + K_{an}} \right) + [OH^-] - [H^+] - [OH^-]_0 + [H^+]_0 \right] + C_c \left(\frac{10^{-16.6} - [H^+]^2}{[H^+]^2 + 10^{-6.3}[H^+] + 10^{-16.6}} - \frac{10^{-16.6} - [H^+]_0^2}{[H^+]_0^2 + 10^{-6.3}[H^+]_0 + 10^{-16.6}} \right) \quad (3)$$

onde:

ΔV = volume cumulativo de ácido/base adicionado (mL);

V_0 = volume inicial da solução de MOD (mL);

C = concentração de solução de ácido/base adicionada (mol L^{-1});

C_n = concentração do n -ésimo sítio ácido, $C_n = [HL_n] + [L_n^-]$ (mol L^{-1});

C_c = concentração total de carbonato (mol L^{-1});

K_{an} = constante de acidez de HL_n (mol L^{-1});

$[OH^-]_0$, $[H^+]_0$ = concentração inicial de hidroxilas e íons H^+ (mol L^{-1}), respectivamente;

$10^{-6.3}$ = primeira constante de acidez (K_{a1}) do H_2CO_3 ;

$10^{-16.6}$ = constante de acidez global ($K_{a1} \times K_{a2}$) do H_2CO_3 .

O primeiro termo dentro dos parênteses da equação 3 representa o consumo dos íons hidrogênio pelo material considerando-se n sítios de complexação; o segundo, o consumo provocado pela água; e o terceiro, o consumo

pelas espécies de carbonato. Sendo assim, tendo-se a variação de pH como única variável dependente da equação, procede-se uma regressão não-linear dos dados obtidos até o ajuste dos mesmos à equação retornando como resultados os valores das constantes de acidez e concentração dos sítios ligantes (LEMOS & TAKYAMA, 1999).

A partir das curvas de titulação ácido-base foram estimadas as constantes de acidez e a concentração dos sítios ácidos do material bioissorvente através de regressão não linear dos dados utilizando a equação 3. Na regressão, o programa de tratamento de dados empregado buscou encontrar os coeficientes (parâmetros) das variáveis independentes que melhor se ajustassem à equação 3 e aos dados, buscando os valores dos parâmetros que minimizam a soma das diferenças quadradas entre os valores observados e preditos da variável dependente. Esta condição é conhecida como convergência. Para efetuar o tratamento dos dados com os cálculos de regressão linear estipulou-se, inicialmente, que o material bioissorvente poderia apresentar até seis sítios monopróticos discretos (ZARA *et al.*, 1998).

Na FIGURA 4.13 estão apresentadas as curvas de titulação para o material radicular não lixiviado e lixiviado. Estão apresentadas somente duas replicatas pois uma delas foi descartada.

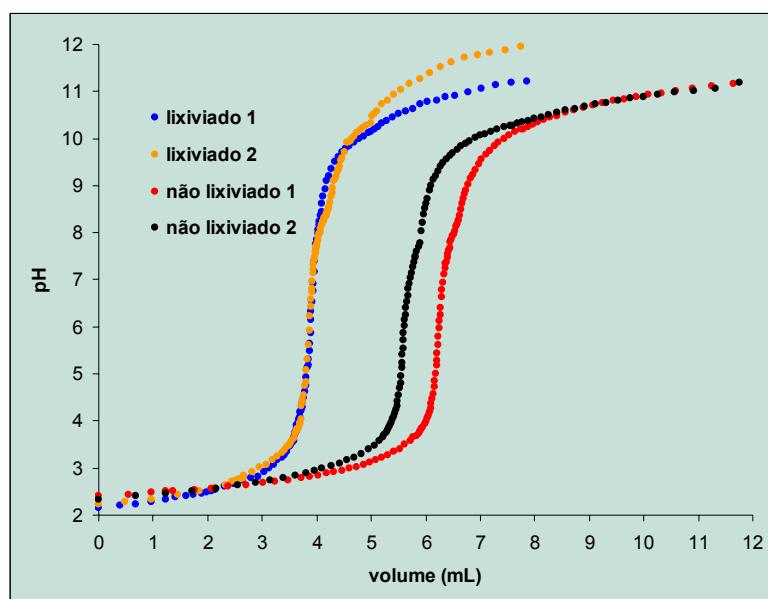


FIGURA 4.13 – Gráficos das titulações potenciométricas das suspensões do material radicular não lixiviado e lixiviado.

Na TABELA 4.11 estão apresentados os resultados obtidos com a titulação em triplicata do material radicular não lixiviado e lixiviado, suas constantes de acidez, os pKas, a concentração de cada sítio ácido e os desvios relacionados a cada medida. Como citado anteriormente, foi testada de início a existência de 6 sítios de ligação no material. Entretanto, os cálculos sempre apontaram para a presença de 2 sítios para material lixiviado, os quais podem ser caracterizados como um sítio fenólico (pKa 11,3) em maior proporção, seguido de um sítio amina (pKa 7,58).

Fica evidente, pelos resultados das titulações, que o tratamento de lixiviação ácida altera a composição do material radicular, confirmando o que foi indicado pelos espectros de ^1H RMN apresentados no item 4.4.3.

TABELA 4.11 – Resultados da caracterização dos sítios ácido-base do material radicular não lixiviado e lixiviado por titulação ácido-base.

Ka	pKa	Concentração de Sítios (mol L ⁻¹)	% de sítios	Tipo de sítio
Não lixiviado				
$5,96 \times 10^{-3}$	2,23	$1,48 \times 10^{-3}$	12,1	Carboxílico
$2,45 \times 10^{-3}$	2,61	$1,01 \times 10^{-3}$	8,3	Carboxílico
$5,45 \times 10^{-5}$	4,25	$8,58 \times 10^{-5}$	0,7	Carboxílico
$6,71 \times 10^{-8}$	7,17	$4,50 \times 10^{-4}$	3,7	Amina
$1,33 \times 10^{-9}$	8,88	$2,71 \times 10^{-5}$	0,2	Fenólico
$9,79 \times 10^{-12}$	11,01	$8,41 \times 10^{-3}$	68,6	Fenólico
Lixiviado				
$9,66 \times 10^{-9}$	8,01	$3,21 \times 10^{-4}$	40,7	Amina
$5,90 \times 10^{-10}$	9,23	$4,68 \times 10^{-4}$	59,3	Fenólico

Os sítios encontrados no estudo de titulação para material lixiviado, que apresentou sorções superiores ao material não lixiviado (vide Capítulo 3), foram amina e fonólico. Ambos os grupos funcionais são bases duras e estariam aptos a sorção dos analitos estudados.

A origem do grupo amina está associada à grande variedade de proteínas, glicoproteínas, também formadoras da parede celular, sendo que o aumento de sua proporção após a lixiviação ácida (TABELA 4.11) pode estar

relacionada a clivagem de ligações peptídicas pela solução de HNO₃ (OLIVEIRA, 2001).

A contribuição do grupo fenólico está associada à lignina. Algumas células diferenciadas possuem lignina em sua composição, que é um polímero fenólico depositado nas paredes celulares após a parada do crescimento da célula. Esse polímero tem a função de oferecer rigidez e resistência à parede celular, sendo, também, uma barreira eficaz contra a penetração de nutrientes e organismos patogênicos (OLIVEIRA, 2001). As células completamente lignificadas estão mortas, uma vez que a lignina, que é hidrofóbica, substitui a água na parede celular (RAVEN, 1999).

Pela porcentagem de grupos fenólicos presentes no material lixiviado e não lixiviado, pode-se concluir que realmente se tratam de raízes envelhecidas.

4.4.5 – Investigação dos componentes da parede celular de material radicular jovem (coleta com 21 dias) e maduro (coleta com 120 dias)

4.4.5.1 – Isolamento da parede celular

De todos os procedimentos de isolamento de parede celular o que apresentou mais eficiência, praticidade e menores possibilidades de perdas e contaminações foi o que empregou moagem criogênica. Os tratamentos com solvente para a secagem do material de parede celular podem acarretar em contaminações com metais. Assim sugere-se o emprego de liofilização para a secagem do material, o que não provoca a degradação de seus componentes. O rendimento de produção de material de parede celular a partir do material radicular de *P. notatum* foi de $5,7 \pm 0,2 \%$ (m m^{-1})

4.4.5.2 – Determinação de Cu, Ni, Al e Fe nos resíduos do procedimento de extração seqüencial dos componentes da parede celular

O procedimento proposto para a digestão dos resíduos da extração seqüencial foi considerado viável pela recuperação dos teores de materiais de referência certificados, apesar dos pequenos volumes de amostra envolvidos, devido a mínima diluição da amostra. Os resultados estão apresentados na TABELA 4.12.

TABELA 4.12 – Teores certificados recuperados para materiais de referência digeridos com o mesmo procedimento empregado para resíduos da extração seqüencial (mg g^{-1}), $n = 3$.

analito	Farelo de milho		Folha de maçã	
	Valor certificado	Valor encontrado	Valor certificado	Valor encontrado
Al	1,01 ± 0,55	0,89 ± 0,08	286 ± 9	265 ± 20
Fe	14,8 ± 1,8	13,9 ± 0,4	83 ± 5	79 ± 4
Cu	2,47 ± 0,40	2,50 ± 0,09	5,64 ± 0,24	5,8 ± 0,1
Ni	0,158 ± 0,054	0,16 ± 0,02	0,91 ± 0,12	1,02 ± 0,02

Os gráficos exibidos nas FIGURAS 4.14 a 4.17 apresentam os teores de Cu, Ni, Al e Fe extraídos em cada fração da extração seqüencial para os diferentes materiais radiculares (não lixiviado, lixiviado e jovem).

Observa-se, na FIGURA 4.14, que a fração com predominância de Cu é a do conteúdo celular. Isso pode ser justificado por esse elemento ser um micronutriente importante, que participa de várias ações enzimáticas, estando particularmente envolvido na síntese de proteínas (que ocorre no citoplasma), metabolismo de carboidratos e na fixação simbiótica de N pelas leguminosas. (<http://www.lancernet.com.br/devitte/dicas.htm>).

Para o material não lixiviado e para o material jovem, as frações associadas ao Cu são as mesmas: conteúdo celular, SDS, CDTA e, em menor quantidade, resíduo. Os teores de Cu não são consideravelmente diferentes para esses dois materiais e a pequena redução do elemento na fração conteúdo celular do material não lixiviado pode ser explicada pela idade do material (>120 dias), o que reduz o número de células vivas. Assim, para o material não lixiviado, o Cu determinado estaria associado ao conteúdo celular de células mortas que restou aprisionado dentro das paredes, exposto após o rompimento das membranas celulares.

A fração SDS foi a segunda com maior teor de Cu por estar relacionada com a remoção de proteínas e compostos intracelulares (CHANG *et al.*, 1999).

A ausência de Cu nas frações obtidas à partir do material lixiviado pode ser explicada pela remoção desse elemento durante a lixiviação ácida.

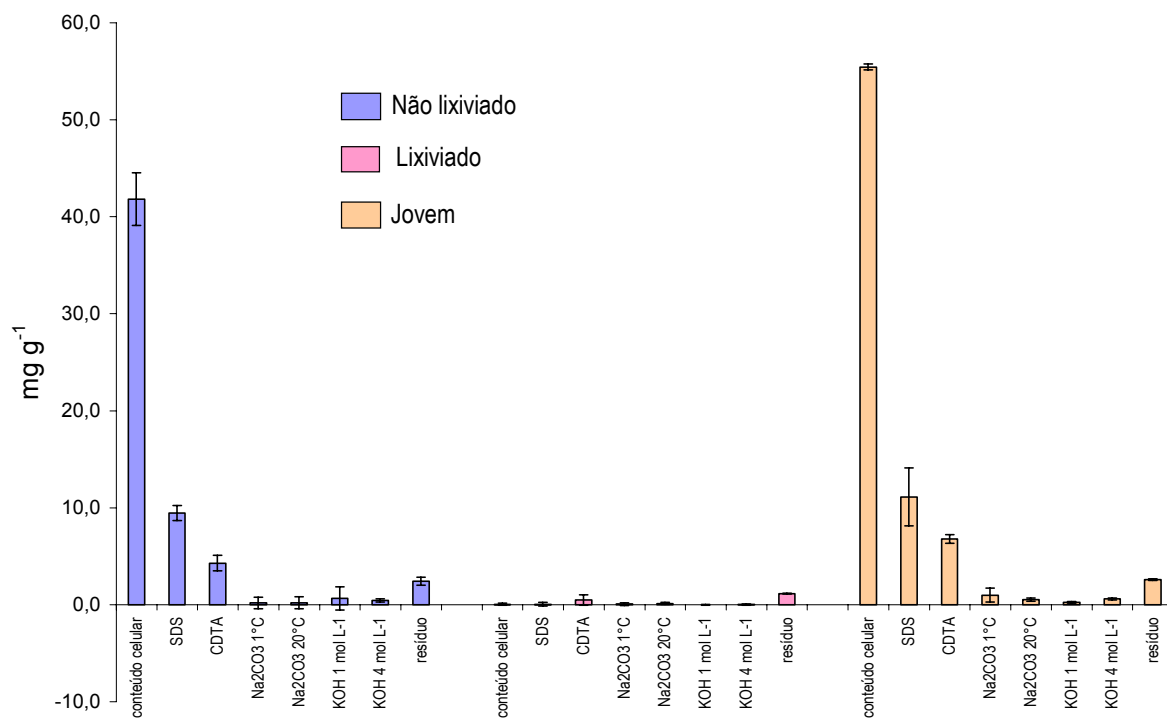


FIGURA 4.14 – Cobre nas diferentes frações da extração seqüencial dos componentes da parede celular de material radicular não lixiviado, lixiviado e jovem, n=3.

Para o Ni, os materiais não lixiviado e lixiviado apresentam teores muito baixos, quando comparados com o material jovem (21 dias), FIGURA 4.15. Observando-se as frações relacionadas com esse elemento para o material jovem constata-se que está presente em praticamente todas as frações, à exceção de KOH 1 mol L⁻¹ (relacionada à extração de alguns tipos de pectinas e hemicelulose), diferentemente do Cu, que também é um íon divalente.

Como a maior participação de Ni para o material jovem encontra-se no resíduo, formado principalmente de celulose, que tem função estrutural, e está ausente na mesma fração para os materiais colhidos com mais de 120 dias, pode-se sugerir que no processo de envelhecimento a planta elimina o Ni para o solo ou desloca esse analito para outras partes como folhas, caule, sementes ou estolão.

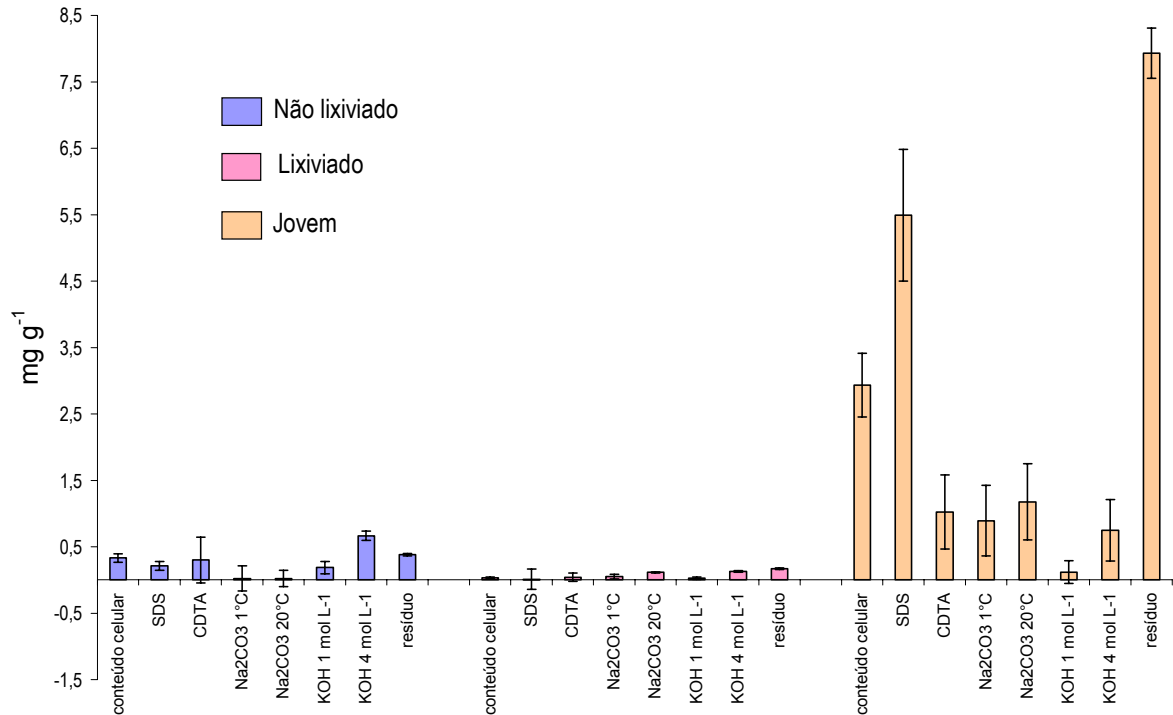


FIGURA 4.15 – Níquel nas diferentes frações da extração sequencial dos componentes da parede celular de material radicular não lixiviado, lixiviado e jovem, $n=3$.

Nas análises de Al, apresentadas na FIGURA 4.16, observa-se um perfil similar de distribuição do analito para o material não lixiviado e lixiviado, o que também se deve à esses materiais serem provenientes de plantas de mesma idade. Contudo, devido à lixiviação ácida, os teores de Al são reduzidos em todas as frações onde predomina.

É interessante destacar que, para o material jovem, assim como para os demais, a contribuição de Al na fração SDS é nula, contrariando os resultados da mesma fração para os demais materiais. Contudo, para esse material há a presença considerável de Al nas frações extraídas com Na_2CO_3 20 °C e KOH 4 mol L⁻¹, relacionadas à pectina e hemicelulose, respectivamente (CHANG *et al.*, 1999). Sugere-se que, assim como para o Ni, o Al seja realocado pela planta durante o processo de envelhecimento.

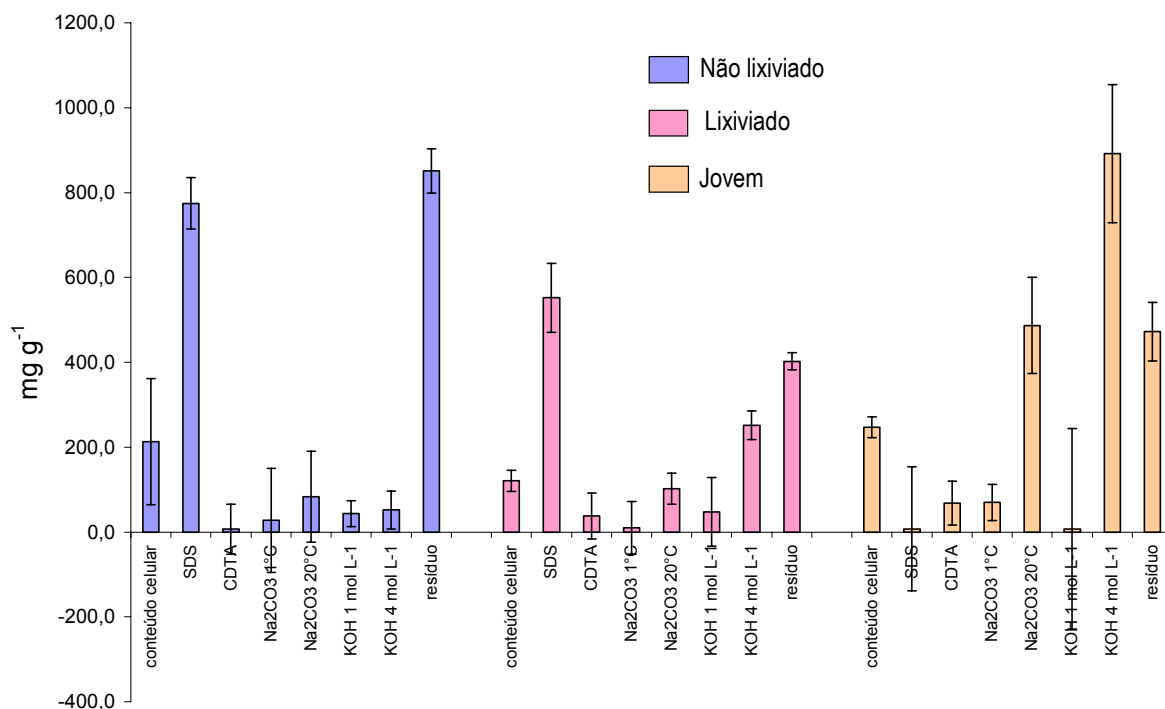


FIGURA 4.16 – Alumínio nas diferentes frações da extração seqüencial dos componentes da parede celular de material radicular não lixiviado, lixiviado e jovem, n=3.

Ferro apresentou relação com a fração SDS desprezível, quando comparada a Al, também íon trivalente, estando praticamente todo contido no resíduo final das extrações. A lixiviação ácida não promoveu uma remoção considerável de Fe, sendo perceptível apenas reduções do elemento nas frações conteúdo celular e SDS, FIGURA 4.17.

Contudo, para o material jovem, o Fe apresentou distribuição similar ao Al, sugerindo uma disposição da planta para a alocação desse analito nas mesma frações da parede celular, o que não acarreta em estarem associados aos mesmos sítios de sorção.

Os maiores desvios observados para Al e Fe, principalmente para as frações com menores teores, pode ser explicada pela difícil extração desses analitos que também podem estar associados à compostos silicatados em amostras vegetais (WIETESKA *et al.*, 1996; MALAVOLTA, 1980, MIYAZAWA *et al.*, 1992).

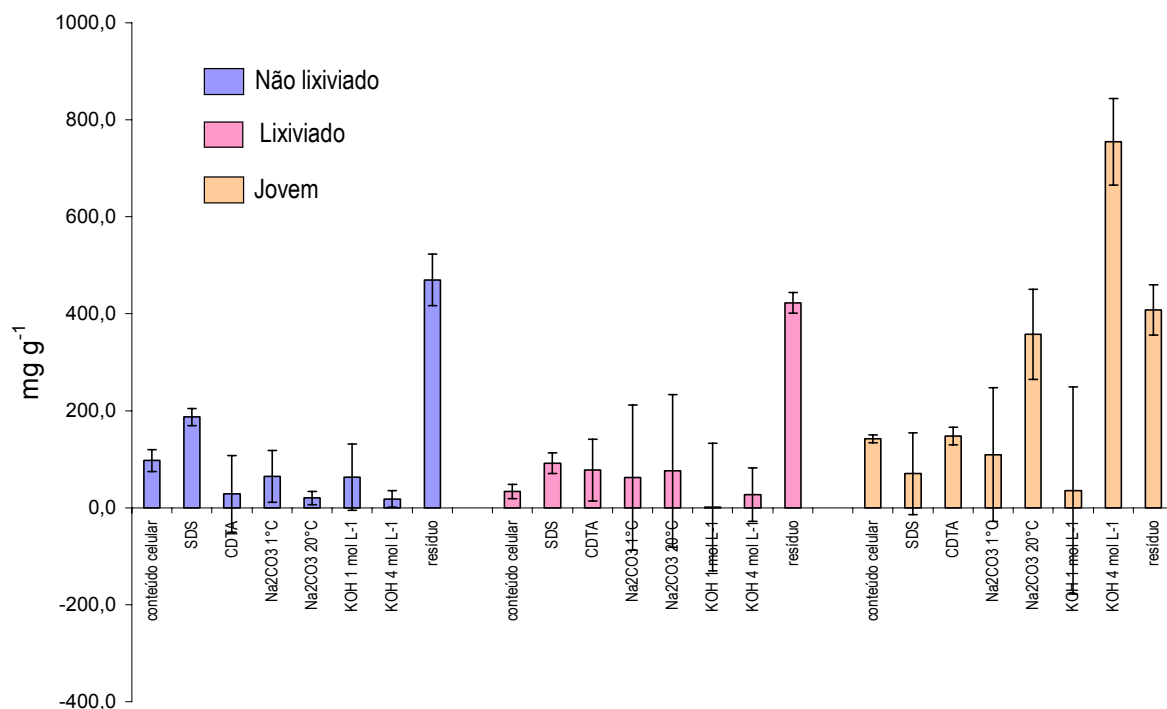
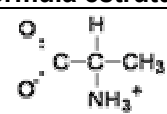
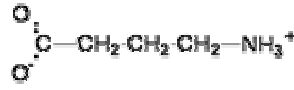
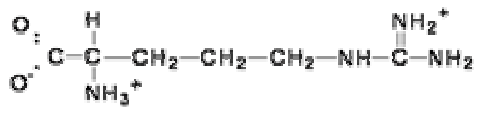
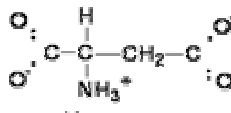
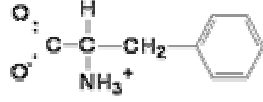
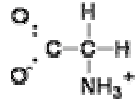
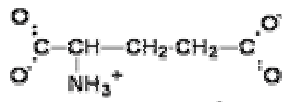
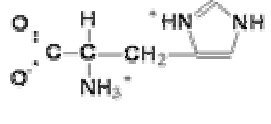
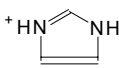
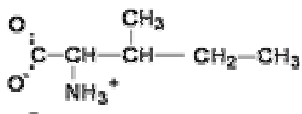
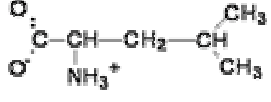
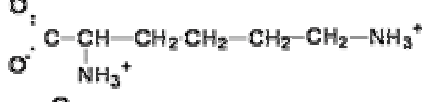
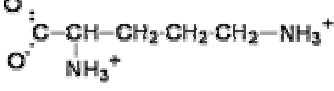
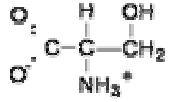
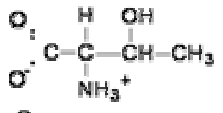
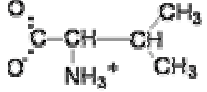


FIGURA 4.17 – Ferro nas diferentes frações da extração seqüencial dos componentes da parede celular de material radicular não lixiviado, lixiviado e jovem, n=3.

4.4.5.3 – Correlação dos aminoácidos presentes nas frações do procedimento de extração seqüencial com Cu, Ni, Al e Fe

Dos 22 aminoácidos analisados, 15 foram encontrados em pelo menos uma das amostras de material radicular de *P. notatum* e nas frações extraídas das paredes celulares. A TABELA 4.13 apresenta os aminoácidos encontrados, suas siglas, fórmulas estruturais e os grupos funcionais presentes.

TABELA 4.13 – Aminoácidos encontrados nas diferentes amostras de material radicular.

Nome	Sigla	Fórmula estrutural	Grupos funcionais
Alanina	Ala		R-NH ₃ ⁺ R-COO ⁻
Amino butírico	GABA		R-NH ₃ ⁺ R-COO ⁻
Arginina	Arg		R-NH ₃ ⁺ R-NH ₂ ⁺ R-NH ₂ R-COO ⁻
Aspártico	Asp		R-NH ₃ ⁺ R-COO ⁻
Fenilalanina	Phe		R-NH ₃ ⁺ R-COO ⁻ Fenólico
Glicina	Gly		Amina Carbonila
Glutâmico	Glu		R-NH ₃ ⁺ R-COO ⁻
Histidina	His		R-NH ₃ ⁺ R-COO ⁻ 
Isoleucina	Ile		R-NH ₃ ⁺ R-COO ⁻
Leucina	Leu		R-NH ₃ ⁺ R-COO ⁻
Lisina	Lys		R-NH ₃ ⁺ R-COO ⁻
Ornitina	Orn		R-NH ₃ ⁺ R-COO ⁻
Serina	Ser		R-NH ₃ ⁺ R-COO ⁻ R-OH
Treonina	Thr		R-NH ₃ ⁺ R-COO ⁻ R-OH
Valina	Val		R-NH ₃ ⁺ R-COO ⁻

Todos os aminoácidos apresentam o carbono, ao qual está ligado o grupo amino, assimétrico, o que possibilita a existência de enantiômeros, contudo em proteínas somente estão presentes L-aminoácidos. (RUSSEL, 1981).

Para investigar a correlação entre os metais e aminoácidos, determinados nas amostras do fracionamento dos componentes da parede celular, realizou-se estudos de correlação de Pearson (AYRES *et al.*, 2000). Determinou-se como amostras as diferentes frações obtidas na extração seqüencial (conteúdo celular, sobrenadantes SDS, CDTA, Na₂CO₃ 1 °C, Na₂CO₃ 20 °C, KOH 1 mol L⁻¹, KOH 4 mol L⁻¹ e resíduo) e como variáveis os resultados obtidos para metais e aminoácidos. As significâncias das correlações foram determinadas para valores $\alpha > 0,05$.

As FIGURAS 4.18 a 4.20 apresentam uma visão geral, qualitativa, da distribuição proporcional de metais e aminoácidos nas diferentes frações investigadas, para auxiliar na visualização da ausência ou da presença de um determinado aminoácido em uma fração específica. Dessa forma, utilizou-se das informações organizadas nessas figuras associadas aos dados de distribuição de metais (item 4.4.5.2) e às correlações apresentadas nas TABELA 4.14 a 4.16.

Pela FIGURA 4.18, para as amostras obtidas a partir do material radicular não lixiviado, observa-se que Al está presente em maiores quantidades nas frações conteúdo celular, SDS e resíduo. E, a partir dos resultados apresentados na TABELA 4.14, encontram-se os aminoácidos Arg e Val com correlação significativa com o Al (0,83 e 0,75, respectivamente). Retornando a FIGURA 4.18, constata-se que Arg está presente exatamente nas mesmas frações que apresentaram teores mais elevados de Al, assim como Val, que também foi encontrada na fração Na₂CO₃ 1 °C, a qual não apresentou o analito em questão.

Para Ni, os aminoácidos que apresentaram correlação significativa foram Asp (0,73), Glu (0,73) e Gly (0,77), TABELA 4.14. Entretanto, ao observar a FIGURA 4.18, nota-se que a relação entre as frações da parede celular que apresentara maiores teores de Ni e esses aminoácidos é estabelecida da seguinte forma: A) conteúdo celular-Asp e Glu; B) KOH 4 mol L⁻¹-Asp, Glu e Gly e C) resíduo-Asp, Glu e Gly, podendo-se afirmar que o Ni presente no conteúdo celular não está associado à Gly.

Ferro apresentou correlação com 11 aminoácidos: His, Thr, Arg, Ala, GABA, Val, Phe, Ile, Leu, Orn e Lys para as amostras preparadas a partir do material

não liofilizado (TABELA 4.14). Observando-se a FIGURA 4.18, nota-se que para as frações conteúdo celular e resíduos, todos esses aminoácidos estão presentes. Contudo, para a fração SDS encontram-se somente Arg, Ala e Val presentes e correlacionados com a presença de Fe.

É importante destacar que para todas as correlações discutidas os valores foram sempre positivos, o que significa que o aumento dos teores dos metais estão diretamente relacionados com o aumento dos teores dos aminoácidos com os quais estão correlacionados.

Cobre não apresentou nenhuma correlação significativa com os aminoácidos investigados, o que sugere que a sua presença no conteúdo celular não deve estar diretamente associada a proteínas e peptídeos.

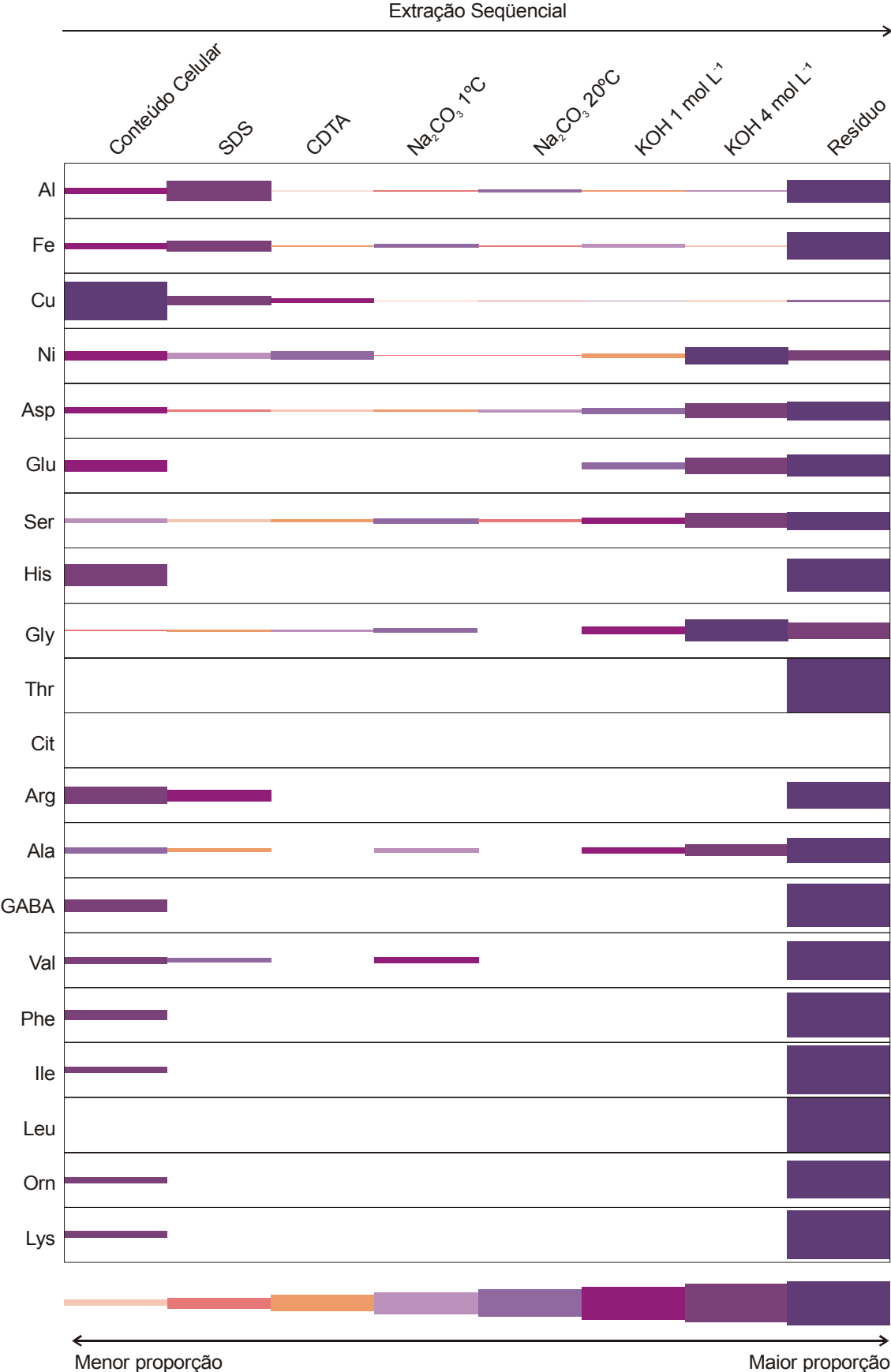


FIGURA 4.18 – Proporção e distribuição de aminoácidos e metais determinados em cada fração da parede celular de material radicular não lixiviado.

TABELA 4.14 – Correlação metais × aminoácidos para material não lixiviado. Em negrito as correlações significativas.

	Al	Fe	Cu	Ni	Asp	Glu	Ser	His	Gly	Thr	Arg	Ala	GABA	Val	Phe	Ile	Leu	Orn	Lys
Al	1,00																		
Fe	0,88	1,00																	
Cu	0,09	0,01	1,00																
Ni	0,12	0,15	0,13	1,00															
Asp	0,38	0,60	-0,10	0,73	1,00														
Glu	0,37	0,59	0,14	0,73	0,96	1,00													
Ser	0,37	0,61	-0,25	0,67	0,98	0,90	1,00												
His	0,58	0,79	0,46	0,28	0,62	0,74	0,55	1,00											
Gly	0,18	0,34	-0,36	0,77	0,90	0,80	0,93	0,25	1,00										
Thr	0,69	0,93	-0,14	0,22	0,73	0,69	0,76	0,80	0,49	1,00									
Arg	0,83	0,88	0,47	0,24	0,52	0,62	0,45	0,92	0,17	0,76	1,00								
Ala	0,57	0,81	-0,09	0,53	0,94	0,91	0,94	0,75	0,78	0,89	0,69	1,00							
GABA	0,67	0,92	0,13	0,26	0,72	0,75	0,70	0,94	0,40	0,96	0,88	0,87	1,00						
Val	0,75	0,96	0,00	0,17	0,67	0,67	0,69	0,86	0,40	0,98	0,85	0,86	0,97	1,00					
Phe	0,68	0,92	0,09	0,26	0,73	0,75	0,71	0,92	0,42	0,97	0,86	0,88	1,00	0,98	1,00				
Ile	0,69	0,93	-0,03	0,24	0,73	0,73	0,74	0,87	0,45	0,99	0,82	0,89	0,99	0,98	0,99	1,00			
Leu	0,69	0,93	-0,14	0,22	0,73	0,69	0,76	0,80	0,49	1,00	0,76	0,89	0,96	0,98	0,97	0,99	1,00		
Orn	0,64	0,87	0,29	0,27	0,68	0,76	0,64	0,98	0,33	0,90	0,91	0,83	0,99	0,94	0,98	0,95	0,90	1,00	
Lys	0,69	0,93	0,00	0,24	0,73	0,73	0,74	0,88	0,45	0,99	0,83	0,89	0,99	0,98	1,00	1,00	0,99	0,95	1,00

Nos estudos para as amostras obtidas a partir de material radicular lixiviado, resultados apresentados na FIGURA 4.19 e na TABELA 4.15, somente Fe e Cu apresentaram algum tipo de correlação com aminácidos.

Para o Fe as correlações de Arg, Ala e Val com a fração SDS deixaram de existir. Observa-se, ainda, correlação significativa apenas para His e Leu, presentes somente nas frações conteúdo celular e resíduo o que, comparado com os resultados do material não lixiviado, verifica-se a eliminação de 9 correlações, associadas ao conteúdo celular e ao resíduo.

Os teores de Fe nas frações derivadas de material lixiviado foram reduzidos, podendo-se inferir que, a solução ácida promoveu a remoção desse elemento associado aos aminoácidos, que apresentaram correlação para a mesma amostra antes do tratamento ácido, sugerindo que o Fe remanescente nessa fração estaria associado à outra classe de compostos, que não aminoácidos.

Para as frações conteúdo celular e resíduo a mesma justificativa é válida, restando correlação somente com His e Leu. Assim, o Fe lixiviado pela solução ácida nessas frações estaria associado principalmente aos aminoácidos que apresentaram correlação para a amostra não lixiviada. Nota-se na FIGURA 4.17 que a eliminação de Fe foi mais acentuada para a fração conteúdo celular, o que pode estar relacionado com a lixiviação do citoplasma das células vegetais pela solução ácida, finalmente eliminado com o tratamento SDS, o que justificaria a não correlação de Fe com os aminoácidos presentes nesse meio.

Observa-se na TABELA 4.15 a ocorrência de correlação significativa com aminoácidos para Cu para amostra lixiviada, a despeito da inexistência para amostra não lixiviada. Esse fato pode ser justificado pela amostra não lixiviada apresentar teores tão elevados de Cu na fração conteúdo celular que tornou não significante possíveis correlações desse elemento com os aminoácidos presentes em outras frações. Assim, com a lixiviação do Cu presente conteúdo celular, os teores remanescentes podem estar associados aos aminoácidos His e Leu, presentes, principalmente, no resíduo da extração seqüencial.

Para o Al e o Ni, pode-se sugerir que a ausência de correlação para o material lixiviado está no fato dos teores desses elementos relacionados aos aminácidos que apresentaram correlação para material não lixiviado terem sido extraídos pela solução ácida ou pelos reagentes empregados na extração seqüencial, por estarem mais disponíveis devido à ação do HNO₃.

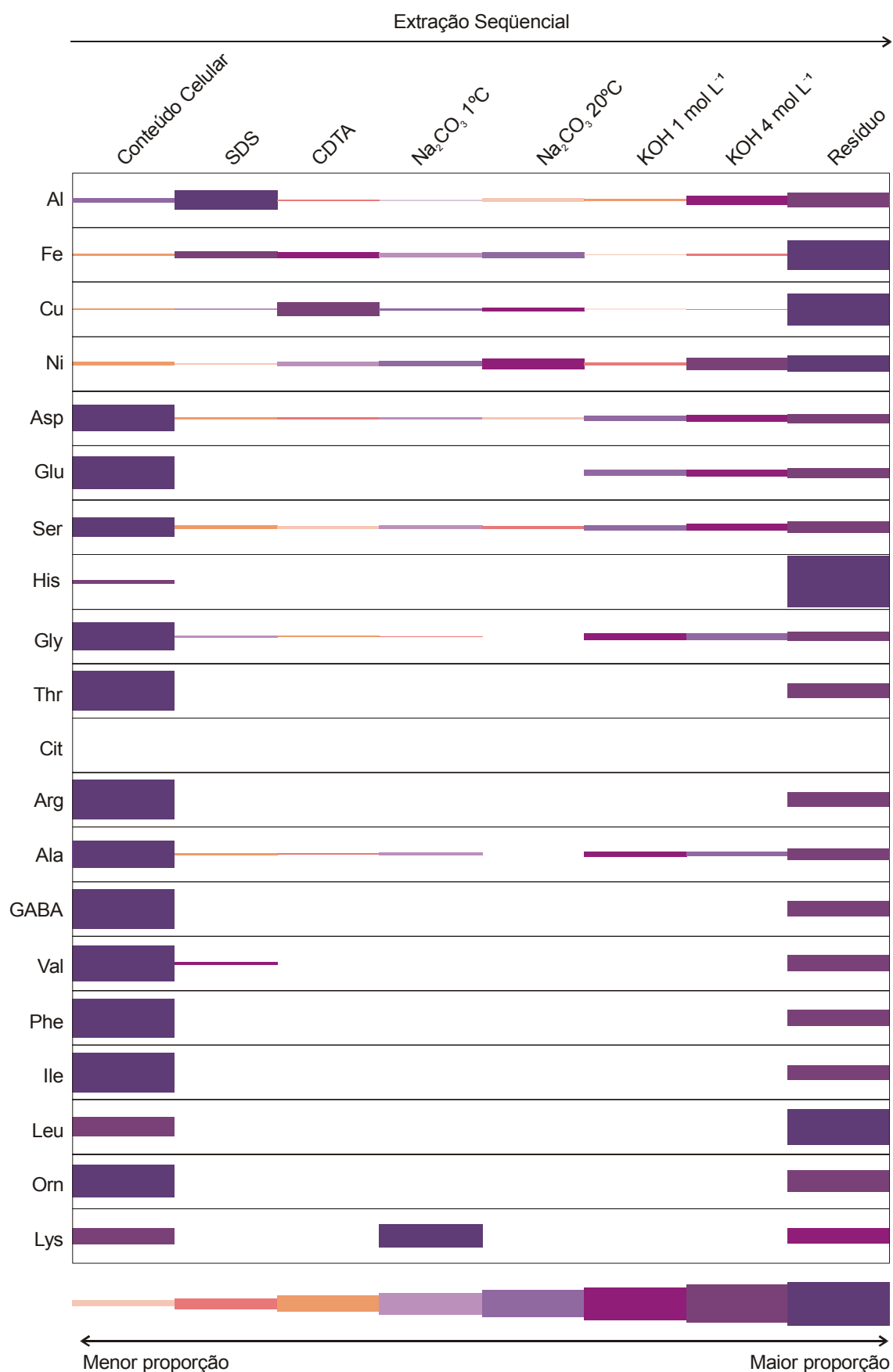


FIGURA 4.19 – Proporção e distribuição de aminoácidos e metais determinados em cada fração da parede celular de material radicular lixiviado.

TABELA 4.15 – Correlação metais × aminoácidos para material radicular lixiviado. Em negrito as correlações significativas.

	Al	Fe	Cu	Ni	Asp	Glu	Ser	His	Gly	Thr	Arg	Ala	GABA	Val	Phe	Ile	Leu	Orn	Lys
Al	1,00																		
Fe	0,50	1,00																	
Cu	0,30	0,94	1,00																
Ni	0,21	0,66	0,61	1,00															
Asp	-0,03	0,02	0,00	-0,05	1,00														
Glu	-0,03	0,03	0,02	-0,04	1,00	1,00													
Ser	0,08	0,22	0,18	0,11	0,98	0,98	1,00												
His	0,43	0,97	0,92	0,68	0,17	0,19	0,38	1,00											
Gly	-0,04	-0,04	-0,05	-0,12	0,99	0,99	0,96	0,12	1,00										
Thr	0,02	0,16	0,14	-0,03	0,97	0,97	0,97	0,27	0,95	1,00									
Arg	0,02	0,17	0,15	-0,02	0,97	0,97	0,97	0,29	0,95	1,00	1,00								
Ala	0,02	0,13	0,10	-0,03	0,99	0,99	0,99	0,28	0,98	0,98	0,98	1,00							
GABA	0,03	0,18	0,16	-0,02	0,97	0,97	0,97	0,30	0,95	1,00	1,00	0,98	1,00						
Val	0,10	0,23	0,19	-0,01	0,96	0,96	0,96	0,34	0,93	1,00	1,00	0,97	1,00	1,00					
Phe	0,04	0,20	0,18	0,00	0,97	0,97	0,97	0,32	0,94	1,00	1,00	0,98	1,00	1,00	1,00				
Ile	0,02	0,16	0,13	-0,03	0,97	0,97	0,97	0,27	0,95	1,00	1,00	0,98	1,00	1,00	1,00	1,00			
Leu	0,34	0,82	0,77	0,51	0,57	0,59	0,73	0,90	0,52	0,67	0,68	0,66	0,68	0,71	0,70	0,67	1,00		
Orn	0,13	0,40	0,37	0,15	0,91	0,92	0,96	0,52	0,88	0,97	0,97	0,95	0,97	0,98	0,98	0,97	0,84	1,00	
Lys	-0,16	0,33	0,24	0,09	0,40	0,40	0,47	0,37	0,35	0,49	0,49	0,49	0,50	0,49	0,50	0,49	0,51	0,54	1,00

Para o material radicular jovem deve-se ressaltar o fato que há a presença maciça de células vivas no início do procedimento de extração seqüencial, assim sua composição é significativamente diversa dos materiais não lixiviado e lixiviado.

Para o Cu observou-se correlação com His, TABELA 4.16, que está presente no conteúdo celular e no resíduo. Contudo, a maior concentração maciça de Cu na primeira fração denota a eliminação desse elemento no procedimento de isolamento da parede, sugerindo uma associação desse analito com os componentes citoplasmáticos da célula viva.

Quanto ao Ni, apresentam-se correlacionados aminoácidos diversos dos identificados para o estudo com material não lixiviado. Assim, pode-se sugerir que o material se relaciona de forma diferente com esse analito, enquanto há atuação do metabolismo. Pela FIGURA 4.20, os aminoácidos Arg, Val, Phe e Ile estariam relacionados ao Ni presente no conteúdo celular e ao resíduo, enquanto Cit se relacionaria somente a esse analito quando presente no resíduo.

É importante destacar que os aminoácidos que apresentaram correlação com os metais nos diversos materiais podem estar associados a cadeias protéicas, peptídeos e também a cadeias de glicossacarídeos e glicoproteínas (CASSAB & VARNER, 1988).

Todas as correlações significativas foram positivas, o que corresponde a dizer que o aumento nos teores de um componente, conseqüentemente, colabora para o acréscimo do outro.

As concentrações dos aminoácidos em cada fração das diferentes amostras de material radicular estão apresentadas no ANEXO 1.

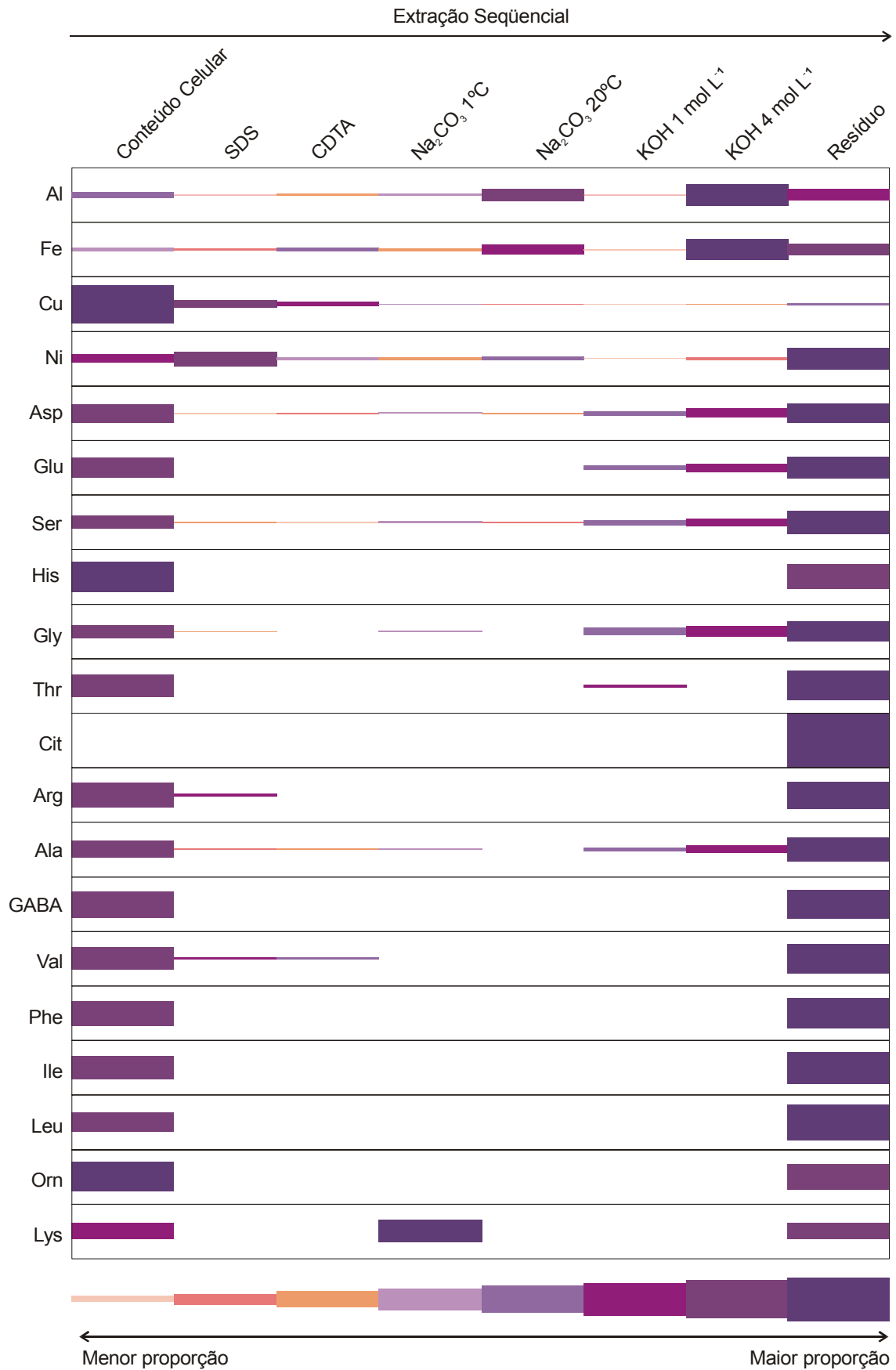


FIGURA 4.20 – Proporção e distribuição de aminoácidos e metais determinados em cada fração da parede celular de material radicular jovem.

TABELA 4.16 – Correlação metais × aminoácidos para material radicular jovem. Em negrito as correlações significativas.

	Al	Fe	Cu	Ni	Asp	Glu	Ser	His	Gly	Thr	Cit	Arg	Ala	GABA	Val	Phe	Ile	Leu	Orn	Lys
Al	1,00																			
Fe	0,98	1,00																		
Cu	-0,14	-0,26	1,00																	
Ni	0,03	0,03	0,15	1,00																
Asp	0,39	0,30	0,54	0,53	1,00															
Glu	0,36	0,28	0,54	0,55	1,00	1,00														
Ser	0,36	0,31	0,27	0,67	0,94	0,94	1,00													
His	0,13	0,02	0,72	0,58	0,93	0,93	0,85	1,00												
Gly	0,44	0,39	0,30	0,50	0,95	0,95	0,95	0,78	1,00											
Thr	0,15	0,07	0,50	0,69	0,93	0,94	0,94	0,96	0,86	1,00										
Cit	0,25	0,26	-0,15	0,79	0,62	0,64	0,85	0,56	0,70	0,76	1,00									
Arg	0,14	0,05	0,59	0,72	0,92	0,93	0,91	0,98	0,81	0,99	0,70	1,00								
Ala	0,35	0,28	0,41	0,66	0,97	0,98	0,99	0,91	0,95	0,96	0,78	0,94	1,00							
GABA	0,16	0,07	0,58	0,67	0,93	0,95	0,91	0,98	0,83	0,99	0,70	1,00	0,95	1,00						
Val	0,15	0,08	0,51	0,74	0,91	0,93	0,93	0,96	0,82	0,99	0,77	0,99	0,95	0,99	1,00					
Phe	0,17	0,09	0,54	0,70	0,93	0,94	0,93	0,97	0,84	1,00	0,74	1,00	0,96	1,00	1,00	1,00				
Ile	0,18	0,10	0,50	0,71	0,92	0,94	0,94	0,96	0,84	1,00	0,77	0,99	0,96	0,99	1,00	1,00	1,00			
Leu	0,21	0,15	0,35	0,77	0,89	0,90	0,96	0,90	0,84	0,98	0,87	0,96	0,96	0,96	0,98	0,98	0,98	1,00		
Orn	0,14	0,03	0,68	0,61	0,93	0,94	0,87	1,00	0,80	0,97	0,60	0,99	0,92	0,99	0,97	0,98	0,97	0,92	1,00	
Lys	-0,11	-0,16	0,33	0,30	0,48	0,48	0,49	0,58	0,39	0,56	0,38	0,57	0,50	0,59	0,56	0,58	0,58	0,55	0,58	1,00

4.4.5.4 – Correlação dos açúcares presentes nas frações do procedimento de extração seqüencial com Cu, Ni, Al e Fe

Dos procedimentos de hidrólise testados o que empregou ácido trifluoroacético apresentou-se mais eficiente para a clivagem das cadeias de polissacarídeos, o que foi observado pela separação dos açúcares das amostras tratadas com esse procedimento. Para as TLCs testadas, somente a que utilizou placa de Kieselgur G impregnada com solução de fosfato monossódico e solução de fosfato monossódico, butanol e acetona como fase móvel apresentou revelação adequada para uma identificação qualitativa dos açúcares. A FIGURA 4.21 apresenta uma fotografia da placa revelada com solução de ácido amino-hipúrico em meio alcoólico.

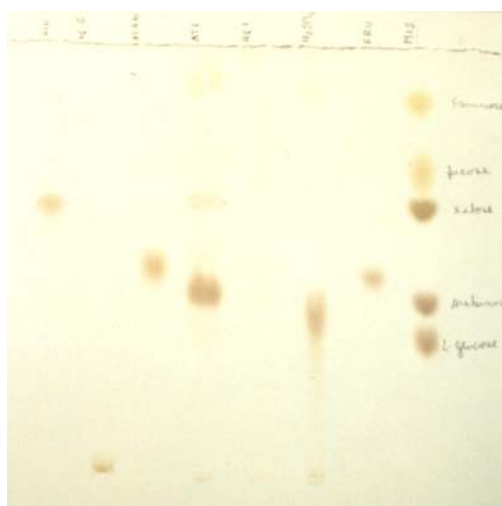


FIGURA 4.21 – Placa de Kieselgur G com aplicações de amostras de material radicular hidrolisadas e devidamente revelada.

Antes de discutir os resultados obtidos para açúcares é importante informar que as análises foram realizadas em somente uma replicata para cada fração obtida a partir das diferentes amostras de material radicular, o que explica a ausência de discussão sobre as concentrações nas diferentes frações.

De todos os açúcares analisados foram encontrados nas frações do procedimento de extração seqüencial xilose, frutose, manose, galactose, arabinose e glucose, sendo este último presente em todas as frações para os 3 materiais estudados e a frutose contida em todos os materiais.

A TABELA 4.17 apresenta as fórmulas estruturais dos açúcares encontrados nas amostras de material radicular, sendo que os grupos funcionais disponíveis nos monômeros são sempre os mesmos: hidroxila e oxigênio ligado ao carbono anomérico.

TABELA 4.17 – Açúcares encontrados nas diferentes amostras de material radicular.

Açúcar	Fórmula estrutural
D-Arabinose	$ \begin{array}{ccccccc} & \text{O} & \text{H} & \text{OH} & \text{OH} & & \\ & & & & & & \\ \text{C} & - & \text{C} & - & \text{C} & - & \text{C} & - & \text{CH}_2\text{OH} \\ & & & & & & & & \\ \text{H} & & \text{OH} & & \text{H} & & \text{H} & & \end{array} $
D-xilose	$ \begin{array}{ccccccc} & \text{O} & \text{OH} & \text{H} & \text{OH} & & \\ & & & & & & \\ \text{C} & - & \text{C} & - & \text{C} & - & \text{C} & - & \text{CH}_2\text{OH} \\ & & & & & & & & \\ \text{H} & & \text{H} & & \text{OH} & & \text{H} & & \end{array} $
D-Manose	$ \begin{array}{ccccccc} & \text{O} & \text{H} & \text{H} & \text{OH} & \text{OH} & & \\ & & & & & & & \\ \text{C} & - & \text{C} & - & \text{C} & - & \text{C} & - & \text{C} & - & \text{CH}_2\text{OH} \\ & & & & & & & & & & \\ \text{H} & & \text{OH} & & \text{OH} & & \text{H} & & & & \end{array} $
D-Frutose	$ \begin{array}{ccccccc} & & \text{O} & \text{H} & \text{OH} & \text{OH} & & \\ & & & & & & & \\ \text{OHH}_2\text{C} & - & \text{C} & - & \text{C} & - & \text{C} & - & \text{C} & - & \text{CH}_2\text{OH} \\ & & & & & & & & & & \\ & & & & \text{OH} & & \text{H} & & \text{H} & & \end{array} $
D-Galactose	$ \begin{array}{ccccccc} & \text{O} & \text{OH} & \text{H} & \text{H} & \text{OH} & & \\ & & & & & & & \\ \text{C} & - & \text{C} & - & \text{C} & - & \text{C} & - & \text{C} & - & \text{CH}_2\text{OH} \\ & & & & & & & & & & \\ \text{H} & & \text{H} & & \text{OH} & & \text{OH} & & \text{H} & & \end{array} $
D-Glucose	$ \begin{array}{ccccccc} & \text{O} & \text{OH} & \text{H} & \text{OH} & \text{OH} & & \\ & & & & & & & \\ \text{H} & - & \text{C} & - & \text{C} & - & \text{C} & - & \text{C} & - & \text{C} & - & \text{CH}_2\text{OH} \\ & & & & & & & & & & & & \\ & & \text{H} & & \text{OH} & & \text{H} & & \text{H} & & & & \end{array} $

Análises de correlação de Pearson (AYRES *et al.*, 2000) entre açúcares e metais foram realizadas, contudo somente foram observadas correlações para o material radicular não lixiviado e lixiviado (colhidos com mais de 120 dias). As TABELAS 4.18 e 4.20 apresentam as matrizes obtidas nesses estudos.

Para a amostra não lixiviada, somente Cu apresentou correlação significativa com a galactose. Para essa mesma amostra, Cu não apresentou correlação nos estudos com aminoácidos, o que sugere que esse elemento está associado, principalmente, a substâncias cujas frações monoméricas sejam açúcares.

TABELA 4.18 – Correlação metais × açúcares para material radicular não lixiviado. Em negrito as correlações significativas.

	Al	Fe	Cu	Ni	Xilose	Glucose	Frutose	Galactose
Al	1,00							
Fe	0,95	1,00						
Cu	0,69	0,81	1,00					
Ni	0,86	0,84	0,72	1,00				
Xilose	0,02	-0,12	-0,25	0,21	1,00			
Glucose	-0,13	-0,05	0,24	-0,17	0,29	1,00		
Frutose	0,45	0,59	0,23	0,16	-0,34	-0,07	1,00	
Galactose	0,45	0,46	-0,05	0,18	-0,37	-0,63	0,79	1,00

Para o material lixiviado, observa-se na TABELA 4.19, uma correlação negativa e significativa entre Al e frutose. Esse açúcar é formador do dissacarídeo sacarose (o mais comum), quando ligado a uma molécula de glicose (RUSSEL, 1981). A correlação negativa indica que um aumento nos teores de frutose reduz a concentração de Al no material. Assim, pode-se sugerir que a frutose não está diretamente relacionada ao Al presente no material.

TABELA 4.19 – Correlação metais × açúcares para material radicular lixiviado. Em negrito as correlações significativas.

	Al	Fe	Cu	Ni	Frutose	Glucose
Al	1,00					
Fe	0,81	1,00				
Cu	0,73	0,96	1,00			
Ni	0,91	0,93	0,87	1,00		
Frutose	-0,89	-0,49	-0,43	-0,65	1,0	
Glucose	-0,37	-0,39	-0,14	-0,31	0,3	1,0

Para amostras de material jovem tem-se correlações positivas e significativas de Cu e Ni com a arabinose. Comparando-se os resultados dessa amostra com os do material não-lixiviado, constata-se a ausência da galactose e presença de arabinose para o material jovem. Possivelmente o envelhecimento

celular, que está associado às mudanças de função das raízes ao longo de sua vida útil, pode alterar a composição dos açúcares presentes no material.

TABELA 4.20 – Correlação metais × açúcares para material radicular jovem. Em negrito as correlações significativas.

	Al	Fe	Cu	Ni	Frutose	Glucose	Arabinose
Al	1,00						
Fe	0,87	1,00					
Cu	0,62	0,76	1,00				
Ni	0,68	0,81	0,98	1,00			
Frutose	0,37	0,43	0,21	0,09	1,0		
Glucose	0,41	0,51	0,34	0,22	1,0	1,0	
Arabinose	0,42	0,54	0,91	0,93	-0,2	-0,1	1,0

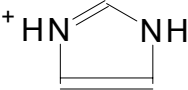
4.4.5.5 – Aplicação da teoria de Pearson para inferir possíveis concordâncias sobre a correlações obtidas

Para os estudos de correlação de açúcares e aminoácidos com metais apresentaram-se uma séria de compostos com grupos funcionais OH, oxigênio ligado a carbono anomérico, anel insaturado (His), amina e carbonila.

Assim, buscou-se utilizar a teoria de Pearson (COTTON & WILKINSON, 1988), para sugerir os grupos funcionais onde os íons metálicos estudados poderiam estar ligados. Note-se que aqui não se trata de uma discussão dos possíveis sítios de sorção envolvidos nos estudos de pré-concentração, uma vez que a correlação obtida entre aminoácidos e açúcares foi realizada com os teores dessas substâncias e dos analitos originalmente presentes no material radicular.

Segundo a teoria de Pearson, pode-se classificar os metais e grupos ligantes em ácidos ou bases duros e moles, existindo ainda aqueles que podem se comportar como um ou outro. Essa classificação é feita em termos de bases de Lewis (doadores de par de elétrons) e ácidos de Lewis (receptores de par de elétrons). Assim, ácido de Lewis + base Lewis = complexo. Para os analitos e grupos ligantes encontrados no material temos a classificação exibida na TABELA 4.21.

TABELA 4.21 – Classificação de Pearson para os analitos e grupos ligantes envolvidos nesse trabalho (COTTON & WILKINSON, 1988).

Analito ou grupo funcional	Classificação
Al^{3+}	Ácido duro
Fe^{3+}	Ácido duro
Cu^{2+}	Ácido intermediário
Ni^{2+}	Ácido intermediário
R-COO^-	Base dura
R-OH	Base dura
R-NH_3	Base dura
R-NH_2^+	Base dura
R-NH_2	Base dura
	Base intermediária

Observadas essas relações poder-se-ia sugerir os ligantes aos quais se complexariam cada analito. Assim, considerando-se somente os grupos funcionais presentes nos aminoácidos e açúcares que apresentaram correlação com os íons metálicos estudados pode-se dizer que todos estão aptos à ligação dos mesmos, que podem estar em forma de complexos e sais solúveis e não necessariamente com cátions.

Quanto aos sítios de sorção, disponíveis para os analitos investigados no CAPÍTULO 3 desse trabalho, pode-se dizer que todo grupo rico em elétrons presente no material apresenta potencialidade para a retenção para os íons metálicos, uma vez que o modelo de sorção que descreveu a maioria dos estudos foi o de Freundlich, que considera somente interações físicas entre o biossorvente e o analito. A relação mais próxima para prever os sítios de sorção disponíveis para biossorção dos analitos foi fornecida pelos estudos de titulação potenciométrica, discutidos no item 4.4.4.

4.5 - Conclusões

Nos estudos de investigação dos constituintes da parede celular do sistema radicular do *P. notatum* não foram observadas diferenças físicas para amostras provenientes de material não lixiviado e lixiviado. Contudo, diferenças químicas foram evidenciadas pelos estudos de ^1H RMN, metais, aminoácidos e açúcares.

O espectro de ^1H RMN para o material lixiviado apresentou-se mais definido, sugerindo a hidrólise de componentes da parede celular, tais como açúcares e aminoácidos. Já os estudos de titulação potenciométrica desse material apresentaram pKas relativos a dois sítios específicos de sorção, os grupos funcionais amina e fenólico, com contribuições de 40,7 e 59,3 %, respectivamente. Esses sítios foram atribuídos a compostos formadores de glicoproteínas e lignina, presentes na parede celular.

Os estudos de análise de metais nas amostras de fracionamento da parede celular constataram distribuição diferentes dos analitos investigados, Al, Fe, Cu e Ni, tanto nas amostras com diferentes características - 180 dias, lixiviada e não lixiviada e jovem, com 21 dias desde o plantio; quanto nas frações obtidas da extração seqüencial dos componentes da parede celular. Cobre se mostrou relacionado apenas ao conteúdo celular, para todos os materiais. O material lixiviado com ácido apresentou teores consideravelmente menores dos 4 analitos estudados, em todas as frações. Observou-se, para o material jovem, uma distribuição distinta dos analitos entre as frações, quando comparado ao material não lixiviado, sugerindo uma realocação dos analitos ao longo do processo de envelhecimento.

Estudos de correlação de Pearson (AYRES *et al.*, 2000) entre metais e aminoácidos e metais e açúcares presentes na parede celular apresentaram as seguintes correlações:

1. Material não lixiviado: A) Al com Arg e Val; B) Fe com His, Thr, Arg, Ala, GABA, Val, Phe, Ile, Leu, Orn e Lys; C) Cu com galactose e, D) Ni com Asp, Glu e Gly.
2. Material lixiviado: A) Al com frutose e, B) Fe com His e Leu
3. Material fresco: A) Cu com His e arabinose e, B) Ni com Arg, Val, Phe, Ile, Cit e arabinose.

As correlações obtidas estão coerentes com a classificação ácido-base de Pearson (COTTON & WILKINSON, 1988), uma vez que os grupos funcionais disponíveis nos aminoácidos e açúcares que apresentaram correlação positiva podem complexar os metais estudados.

Os estudos realizados permitem a obtenção de informações relevantes do ponto de vista da fisiologia do *P. notatum*, sendo consideradas a capacidade de sorção e translocação de nutrientes pela planta durante seu desenvolvimento.

Capítulo 5

Referências bibliográficas

5.1 – Referências bibliográficas

- ADMSO, A.W., Physical chemistry of surfaces. 5ed., New York, John Wiley & Sons, Inc., 1990.
- AL-ASHEH, S.; BANAT, F.; AL-OMARI, A. & DUVNJAK, Z. "Predictions of binary sorption isotherms for the sorption of heavy metals by pine bark using single isotherm data". *Chemosphere*, 41:659, 2000.
- AYRES, M.; AYRES Jr, M.; AYRES, D.L. & SANTOS A.S. "BioEstat 2.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas". Sociedade Civil Mamirauá/MCT-CNPq, 2000, p.51.
- ARAÚJO, G.C.L.; NOGUEIRA, A.R.A. & NÓBREGA, J.A. "Single vessel porcedure for acid-vapour partial digestion in a focused microwave: Fe and Co determination in biological samples by ETAAS". *Analyst*, 125:1861, 2000.
- BAES, C.F. & MEMSMER, R.E. The hidrolysis of cations. Nova Iorque A Wiley-Interscience Publication, 1976.
- BARRETO, I.L. & KAPPEL, A. "As principais espécies de gramíneas e leguminosas das pastagens naturais do Rio Grande do Sul" *Anais do Congresso da Sociedade de Botânica do Brasil*, Porto Alegre - RS, 1967. p.281-297.
- BATISTA, L.A.R. & GODOY, R. "Caracterização de germoplasma do gênero *Paspalum* na região central do estado de São Paulo, Brasil. I Características vegetativas. *Anais da Reunião Sabanas*, Brasília – DF, 1992, p.97-106.
- BRAGA, M. "Físico-Química de surfactantes e polímeros em solução". 2001, em <http://pcserver.iqm.unicamp.br/~wloh/cursos/qp433/seminarios/adsorcaosurf-melissa.pdf>
- CARPITA, N.C. & GIBEAUT, D.M. "Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth". *Plant Journal*, 3:1, 1993.
- CARPITA, N.C. "Structure and biogenesis of the cell walls of grasses". *Ann. Rev. Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 47:445, 1996.
- CARRILHO, E.N.V.M. & GILBERT, T.R. "Assessing metal sorption on the marine alga *Pilayella littoralis*". *J. Environ. Monit.*, 2:410, 2000.
- CARRILHO, E.N.V.M.; NOGUEIRA, A.R.A.; NÓBREGA, J.A. & SOUZA, G.B. "An attempt to correlate fat and protein content of biological samples with the residual

- carbon after microwave-assisted digestion". *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371:536, 2001.
- CASSAB, G. I. & VARNER, J. E. "Cell wall proteins". *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 39:321, 1988.
- CASTELAN, G.B. Fundamentos de físico química. 1ed., São Paulo, LTC - Livros Técnicos e Científicos, 1986, p.460-467.
- CHANG, Y.C.; YAMAMOTO, Y. & MATSUMOTO, H. "Accumulation of aluminium in the cell wall pectin in cultured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells treated with a combination of aluminium and iron". *Plant, Cell and Environment*, 22:1009, 1999.
- CHAO, Y.Z.; WONG, M.K.; KOH, L.L & WEE, Y.C. "Microwave-assisted diluted acid extraction of trace metals from biological samples for atomic absorption spectrometric determination". *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 11:585, 1996.
- CHASE, A. "The North American species of *Paspalum*". *United States National Herbarium*, 28:1, 1929.
- CHATTERJEE, S.; ASTHANA, R.K.; TRIPATHI, A.K. & SINGH, P. "Metal removal by selected sorbents". *Process Biochem.*, 5:457, 1996.
- CHEN, J-P, "Batch and continuous adsorption of strontium by plant root tissues". *Bioresource Technology*, 60:185, 1997.
- CHOW, P.Y.T.; CHUA, T.H. & OW, B.Y.." Diluted-acid digestion procedure for the determination of lead, copper and mercury in traditional Chinese medicines by atomic absorption". *Analyst*, 120:1221, 1995.
- CODDINGTON, W.; HURST, J.K. & LYMAR, S.V. " Hydroxyl radical formation during peroxy-nitrous acid decomposition". *J. of the Am. Chem. Soc.* 121:2438, 1999.
- COIMBRA, M.A.; DELGADILLO, I.; WALDRON, K.W. & SELVENDRAN, R.R. "Isolation and analysis of cell wall polymers from olive pulp". IN: *Modern methods of plant analysis*. LINSKENS, H.F. & JACKSON, J.F. (Eds). Berlin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996, p.19-44.
- COTTON, F.A. & WILKINSON, G. *Advanced Inorganic Chemistry*. 5ed. Nova York, Willey-Interscience, 1988. p.112-113, 320-329, 709, 724-725.
- CRIST, R.H.; OBERHOLSER, K.; SCHUWARTZ, D.; MARZOTT, J. ; RYDER, D. & CRIST, D.R., "Interaction of metals and protons with algae". *Environ. Sci. Technol.*, 22:755, 1988.

- DANIEL, M.M; BATCHELOUR, J.D. , RHOADES, JR.C.B. & JONES, B.T. “The effect of digestion temperature on matrix decomposition using a high pressure asher”. *Atom. Spectroscopy.*, 19:198, 1998.
- DANNY, K.C.K, de *Mass transfer Modeling for Fixed Bed Sorption of Metal Ions on Bone Char*. Hong Kong, Universidade de Ciências e Tecnologia de Hong Kong, 2002, Tese de doutorado, p.25-28.
- DARNALL, D.W.; GREENE, B.; HENZL, M.T.; HOSEA, J.M.; MCPHERSON, R.A.; SNEDDON, J. & ALEXANDER, M.D. “Selective recovery of gold and other metal-ions from an algal biomass”. *Environmental Science & Technology*, 20:206, 1986.
- DEGENHARDT, B. & GIMMLER, H. “Cell wall adaptations to multiple environmental stresses in maize roots”. *J. of Experimental Botany*, 51:595, 2000.
- DEY, P.M.; BROWNLEADER, M.D. & HARBORNE, J.B. “The plant, the cell and its molecular components”. IN: *Plant Biochemistry*. DEY, P.M. & HARBORNE, J.B. (Eds). Londres, Academic Press, 1997, p.6-9.
- DIATTA, J.B.; KOCIALKOWSKI, W.Z. & GRZEBIZ, W. “Lead and zinc partition coefficients of selected soils evaluated by Langmuir, Freundlich, and linear isotherms”. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 34:2419, 2003.
- DOMBOVARI, J.; VARGA, Z. ; BEKER, J.S.; MATYUS, J.; KAKUK, G. & PAPP, L. “ICP-MS determination of trace elements in serum samples of healthy subjects using different sample preparation methods”. *Atom. Spectrosc.*, 22:331, 2001.
- DUGENEST, S.; OLLE, M.; RIBES, A. & GRENIER-LOUSTALOT, M.F. “Chemical characterisation of municipal solid waste incineration residue. Dissolution of elements with microwave-diluted acids digestion technique compared to conventional methods”. *Analisis*, 26:256, 1998.
- EILOLA, K. & PERAMAKI, P. “Microwave heated vapour-phase digestion method for biological sample materials”. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 369:107-112, 2001.
- ESPOSITO, A.; PAGNANELLI, F.; LODI, A.; SOLISIO, C. & VEGLIÒ, F. “Biosorption of heavy metals by *Sphaerotilus natans*: an equilibrium study at different pH and biomass concentrations”. *Hydrometallurgy*, 60:129, 2001.
- FARMACOPÉIA PORTUGUESA, VII Edição Oficial, Lisboa, 2002, p.216-217 e 314.
- FIORINO, A.; FRIGO, G. & CUCCHETTI, E. “Liquid chromatographic analysis of amino and imino acids in protein hydrolysates by post-column derivatization with

- o-phthalaldehyde and 3-mercaptopropionic acid". *J. Chromatogr.* 476:83-92, 1989.
- GADD, G.M. "Interactions of fungi with toxic metals". *New Phytol.* 124:25, 1993.
- GARDEA-TORRESDEY J.L.; TIEMANN, K.J.; GONZALEZ, J.H.; HENNING, J.A. & TOWNSEND, M.S. "Ability of silica-immobilized *Medicago sativa* (alfafa) to remove copper ions from solution". *J. of Hazardous Materials*, 48:181, 1996.
- GOUVEIA, S.T.; SILVA, F.V.; COSTA, L.M.; NOGUEIRA, A.R.A. & NÓBREGA, J.A. "Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations". *Anal. Chim. Acta*, 445:269, 2001.
- HAKER J.B.; FORBE, B.J. & GOW, J.M. "Simulate frosting of tropical grasses". *Australian J. of Agric. Research*, 25:45, 1974.
- HARBORNE, J.B. "Phytochemical Methods - A guide to modern techniques of plant analysis". Londres, Academic Press, 1998, cap. 6 e 7.
- HATFIELD, R.D.; JUNG, H.J.G.; RALPH, J. BUXTON, D.R. & WEIMER, P.J. "A comparison of the soluble residues produced by the klason lignin and acid detergent lignin procedures". *J. Sci. Food Agric.*, 65:51, 1994.
- HO, Y.S. & McKAY, G. "Correlative biosorption equilibria model for a binary batch system". *Chem. Eng. Science*, 55:817, 2000.
- HOMER, J. & PERRY, M.C. "New Method for NMR Signal Enhancement by Polarization Transfer, and Attached Nucleus Testing". *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 373, 1994.
- <http://atlasveg.ib.usp.br/Indice/pace.html>
- <http://ctdp.ensmp.fr/species>
- <http://www.lancernet.com.br/devitte/dicas.htm>
- HUANG, C. P., WANG, J. & TAKIYAMA, L. R. "The equilibrium and rate of the heavy metal interaction with sludge particulates: final report". *Water Environment Foundation*, 1998.
- JACKWERTH, E; YANG, X.G. & XU, C. "Investigations on the adsorptive preconcentration of trace-elements on adsorption resins 3. sorption behavior of metalhalogeno-compounds and metalthiocyanato-compounds - stoichiometry of sorbed species". *Frezen. Z. Anal. Chem.*, 334: 514, 1989.

- JALALI, R.; GHAFOURIAN, H.; ASEF, Y.; DAVARPANAH, S.J. & SEPEHR, S. "Removal and recovery of lead using nonliving biomass of marine algae". *J. Of Hazardous Material*, B92:253-, 2002.
- JOAN, S.F.; "Adsorció d'or i zinc amb resines impregnades XAD-2. Superfície d'Equilibri, un nou concepte per a l'adsorció", Universidade de Gerona (UdG), IMA Informàtica i Matemàtica Aplicada, 2001 Tese de doutorado.
- KINGSTON, H.M. & HASWELL, S.J. (EDS.), *Microwave-Enhanced-Chemistry. Fundamentals, Sample Preparation and Applications*. American Chemical Society, Washington, 1997.
- KLUG, M.; SANCHES, M.N.M.; LARANJEIRA, M.C.M. & FÁVERE, V.T. "Análise das isotermas de adsorção de Cu(II), Sd(II), Ni(II) e Zn(II) pela N-(3,4-dihidroxivenzil) quitosana empregando o método da regressão não linear". *Química nova*, 21:410, 1989.
- KNAPP, G. *Decomposition of organic materials: fundamentals*. II Workshop sobre métodos de decomposição de amostras. Piracicaba, 1998.
- KOTZ, L.; HENZE, G.; KAISER, G.; PAHLKE, S.; VEBER, M. & TÖLG, G. "Wet mineralization of organic matrices in glassy-carbon vessel in a pressure bomb system for trace elements analysis". *Talanta*, 26:681, 1979.
- KOTZ, L.; TSCHÖPEL, P.; TÖLG, G. & KAISER, G. "Decomposition of biological materials for determination of extremely low contents of trace elements in limited amounts with nitric acid under pressure in a Teflon tube". *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 260:207, 1972.
- KRUG, F.J. *Pré-tratamento de amostras*. II Workshop sobre métodos de decomposição de amostras". Piracicaba, 1998.
- KUBRAKOVA, I.V.; FORMANOVSKII, A.A.; KUDINOVA, T.F. & KUZ'MIN, N.M. "Microwave oxidation of organic compounds by nitric acid". *J. Anal. Chem.*, 54:460, 1999.
- LEE, S.H.; JUNG, C.H.; CHUNG, H.; LEE, M.Y. & YANG, J-W. "Removal of heavy metals from aqueous solution by apple residues". *Process Biochemistry*, 33:205, 1998.
- LEMO, S. G. & TAKIYAMA, L. R. "Avaliação de um método alternativo para a caracterização das propriedades ácido-base de substâncias húmicas aquíáticas". *Cadernos de Pesquisa*, 10:22-35, 1999.

- LEVINE, K.E.; BATCHELOR, J.D.; RHOADES, C.B. & JONES, B.T. "Evaluation of high-pressure, high-temperature microwave digestion system". *J. Anal. At. Spectrom.*, 14:49, 1999.
- LUJAN, J.R.; DARNALL, D.W.; STARK, P.C.; RAYSON, G.D & GARDEA-TORRESDEY, J.L. "Metal ion binding by algae and higher plant tissues: A phenomenological study of solution pH dependence". *Solvent Extraction and ion exchangeal*, 12:803, 1994.
- MADRID, Y. & CÁMARA, C. "Biological substrates for metals preconcentration and speciation". *Trend in Anal. Chemistry*, 16:36, 1997.
- MADRID, Y. & CÁMARA, C. in: J.A. Caruso, K.L. Sutton & K.L. Ackley (Eds.), *Comprehensive Analytical Chemistri*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, 2000.
- MAHAN, C.A. & HOLCOMBE, J.A. "Preconcentration of trace metals using silica-immobilized algae cells in a chromatographic separation procedure". *Spectrochimica Acta*, 13:1483, 1992.
- MAHAN, C.A.; MAJIDI, V. & HOLCOMBE, J.A. "Evaluation of the metal uptake of several algae strains in a multicomponent matrix utilizing inductively coupled plasma emission spectrometry". *Anal. Chem.*, 61:624, 1989.
- MALAMAS, F.; BENGTSSON, M. & JOHANSSON, G. "On-line trace metal enrichment and matrix isolation in atomic absorption spectrometry by a column containing immobilized 8-quinolinol in a flow injection system". *Anal. Chim. Acta*, 160, 1984.
- MARSCHNER, H.; ROMHELD, V. HORST, W.J & MARTIN, P. "Root-induced changes in the rhizosphere-importance for mineral-nutrition of plants". *Zeitschrift fur pflanzenernahrung und Bodenkunde*, 149:441, 1986.
- MALAVOLTA, E. "Elementos de Nutrição Mineral de Plantas". São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1980. 182-187. p. 200, 205-206.
- MATUSIEWICZ, H. & BARNES, R.M. "Tree ring wood analysis after hydrogen peroxide pressure decomposition with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and electrothermal vaporization". *Anal. Chem.*, 57:406, 1985.
- MULLEN, M.D.; WOLF, D.C.; BEVERIDGE, T.J. & BAILEY, G.W. "Sorption of heavy metals by the soil fungi *Aspergillus niger* and *Mucor rouxii*". *Soil Biol Biochem.*, 2:129, 1992.

- MYAZAWA M.; PAVAN, M.A. & BLOCK, M.F. “Avaliação de métodos com e sem digestão para extração de elementos em tecidos de plantas”. *Ciência e Cultura*, 36:1953, 1984-B.
- MYAZAWA, M.; PAVAN, M.A. & BLOCK, M.F. “Determination of Ca, Mg, K, Mn, Cu, Zn, Fe and P in coffee, soybean, corn, sunflower, and pasture grass leaf tissues by a HCl extraction method”. *Commun. In Soil. Sci. Plant Anal*, 15:141, 1984-A.
- MIYAZAWA, M.; PAVAN, M.A.; BLOCH, M.F.; ARISTIDES, P.S.; SOUZA & G.B.; ESTEVES, S.N. “Determinação de cobalto em fezes de bovinos pelo método de extração HCl 1 M”. *Pesq. Agropec. Bras.*, 27(10):1415, 1992.
- NEDERLOF, M.M.; DEWIT, J.C.M.; VANRIEMSDIJK, W.H. & KOOPAL, L.K. “Determination of proton affinity distributions for humic substances”. *Environmental Science & Technology*, 27: 846, 1993.
- OLIVEIRA, H.C.C. de *Estudo bioquímico de videiras (Vitis vinifera L.) cultivadas in vitro em ambiente salino e infectadas com Phaeomoniella chlamydospora*, Aveiro, Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia, 2001, Tese de Doutorado, p.70-98.
- PONEC, V.; KNOR, Z. & CERNY, S. Adsorption on solids. 1ed. Londres, CRC Press, 1974, p.195-401, 600-607.
- PRASAD, M.N.V. & FREITAS, H. “Removal of toxic metals from solution by leaf, stem and root phytomass of *Quercus ilex* L. (holly oak)”. *Environmental Pollution*, 110:277, 2000.
- RANDERATH, K. “Chromatography sur couches minces” Paris, Gauthier-Villars Éditeur, 1971, p.238-239, 1971.
- RAVEN, P.H. & EVERT, R.F. “Biologia vegetal”. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A. 1996, p.201, 436-444, 553-556.
- REDLICH, O. & PETERSON, D.L. “A useful adsorption isotherm”. *J. Phys. Chem.-US*, 63:1024, 1959
- REID, J.S.G. “Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates”. IN: *Plant Biochemistry*. DEY, P.M. & HARBORNE, J.B. (Eds). Londres, Academic Press, 1997, p.206-234.
- ROCHA, L.A.R. & NETO, A.R., “Espécies do gênero *Paspalum* com potencial forrageiro”. *Documentos nº 27*, Embrapa Pecuária Sudeste, 2000.

- RODUSHKIN, I.; RUTH, T. & HUHTASAARI, A. "Comparison of two digestion methods for elemental determination in plan material by ICP techniques". *Anal. Chim. Acta*, 378:191,1999.
- RUDZINSKI, W.; CHARMAS, R. & PIASECKI, W. "On the nature of the energetic surface heterogeneity in ion adsorption at an electrolyte/oxide interface. Theoretical studies of the correlations between binding-to-surface energies of various surface complexes". *Adsorption Science & Technology*, 14:25, 1997.
- RUETER, G.J. & MOREL, M.M. "The interection between zinc deficiency and copper toxicity as it affects the silicic acid uptake mechamnism in *Thalassiosira weissflogii*". *Liminol. Oceanogr.* 26:67 (1996).
- RUSSEL, J.B, "Química geral". São Paulo, McGraw-Hill, 1981, p. 801-805.
- SCOTT, C.D. "Removal of dissolved metals by plant tissue". *Biotechnology and Bioengineering*, 39:1064, 1992.
- SHENJUN, M. & HOLCOMBE, J.A. "Preconcentration of copper on algae and determination by slurry graphite-furnace atomic-absorption spectrometry". *Anal. Chem.* 62: 1994, 1990.
- STOEPLER, M. & BACKHAUS, F. "Pretreatment studies with biological and environmental materials 1-systems for pressurized multisample decomposition". *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 291:116, 1978.
- STOEPPLER, M.; MÜLLER, K.P. & BACKHAUS, F. "Pretreatment studies with biological and environmental materials. 3. Pressure evaluation and carbon balance in pressurized decomposition with nitric-acid". *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 279:107, 1979.
- TARLEY, C.R.T. & ARRUDA, M.A.Z. "Adsorventes naturais: Potencialidades e aplicações da esponja natural (*Luffa cylindrica*) na remoção de chumbo em efluenetes de laboratório". *Revista Analytica*, 4:25, 2003.
- TCSHÖPEL, P.; KOTZ, L. & SCHULZ, W. "Causes and elimination of systematic-errors in the determination of elements in aqueous-solutions in the NG-ML and PG-ML range". *Fresen. Z. Anal. Chem.*, 302: 1, 1980.
- TIWARI, D.; MISHRA, S.P.; MISHRA, M. & DUBEY, R.S. "Biosorptive behaviour of Mango (*Mandifera indica*) and Neem (*Azadirachta indica*) bark for Hg²⁺, Cr³⁺ and Cd²⁺ toxic ions from aqueous solutions: a radiotracer study". *Applied Radiation and Isotopes*, 50:631, 1999.

- TRIPP, V.W.; MOORE, A.T. & ROLLINS, M.L. "Some observations on the constitution of the primary wall of the cotton fiber". *Text. Res. Journal*, 21:886, 1951.
- URE, A. M. & DAVIDSON, C. M. "Chemical speciation in the environment". Blackie Academic & Professional, 1995, Londres, Reino Unido.
- VEGLIO, F. & BEOLCHINI, F. "Removal of metals by biosorption: a review". *Hydrometallurgy*, 44:301, 1997.
- VESCHETTI, E.; MARESCA, D.; CUTILLI, D.; SANTARSIERO, A. & OTTAVIANI, M. "Optimization of H₂O₂ action in sewage-sludge microwave digestion using Δ pressure vs. temperature and pressure". *Microchem. J.*, 67:171, 2000.
- VESK, P.A.; NOICKOLDS, C.E. & ALLAWAY, W.G. "Metal localization in water hyacinth roots from an urban wetland". *Plant, Cell and Environment*, 22:149, 1999.
- VOLESKY, B. "Biosorption process simulation tools". *Hydrometallurgy*, 71:179, 2003.
- WESTALL, J.C.; JONES, J.D.; TURNER, G.D. & ZACHARA, J.M. "Models for association of metals-ions with heterogeneous environmental sorbents. 1. Complexation of Co (II) by leonardite humic-acid as a function of pH and NaClO₄ concentration". *Environmental Science & Technology*, 29: 951, 1995.
- WIETESKA, E.; ZIÓEK, A. & DRZEWINSKA, A. "Extraction as a method for preparation of vegetable samples for determination of trace metals by atomic absorption spectrometry". *Anal. Chim. Acta*, 330: 251, 1996.
- WU, S.L.; FENG, X.B. & WITTMEIER, A. "Microwave digestion of plant and grain reference materials in nitric acid or a mixture of nitric acid and hydrogen peroxide for the determination of multi-elements by inductively coupled mass spectrometry". *J. Anal. At. Spectrom.*, 12:797, 1997.
- WÜRFELS, M. & JACKWERTH, E. "Investigations on the carbon balance in decomposition of biological materials with nitric acid". *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 322:345, 1985.
- WÜRFELS, M. & JACKWERTH, E. "Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric-acid. 1. Carbon conversion during sample decomposition". *Anal. Chim. ACTA*, 226:1, 1989-A.
- WÜRFELS, M. & JACKWERTH, E. "Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric-acid. 2: Identification of reaction products". *Anal. Chim. ACTA*, 226:17, 1989-B.

- WÜRFELS, M., JACKWERTH, E. & STOEPLER, M. "About the problem of disturbances of inverse voltammetric trace analysis after pressure decomposition of biological samples". *Fresenius Z. Anal. Chem.* 329: 459, 1987.
- ZABLACKIS, E.; HUANG, J.; MÜLLER, B.; DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. "Characterization of the cell-wall polysaccharides of *Arabidopsis thaliana* leaves" *Plant Physiol.* 107:1129, 1995.
- ZARA, L.F.; ROSA, A.H.; JUNIOR, E.S; SANTOS, A. & ROCHA, J.C. "Estudo das propriedades ácido-base de ácido húmico aquático utilizando as funções de Gran modificadas". *Livro de Resumos da 21ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas – MG, 1998, p.AB-067.
- ZEIER, J. & SCHREIBER, S. "Chemical composition of hypodermal and endodermal cell walls and xylem vessels isolated from *Clivia miniata*". *Plant Physiol.*, 113:1223, 1997.
- ZHOU, C.Y.; WONG, M.K.; KOH, L.L. & WEE, C.C. "Microwave assisted diluted acid extraction of trace of metals from biological samples for atomic absorption spectrometric determination". *J. Anal. At. Spectrom.*, 11:585, 1996.

ANEXO 1

TABELA 1 – Teores de aminoácidos (mmol L⁻¹) para amostras do procedimento de extração seqüencial dos componentes da parede celular provenientes de material radicular não lixiviado, n = 3.

Aminoácido	Conteúdo celular	SDS	CDTA	Na₂CO₃ 1°C	Na₂CO₃ 20°C	KOH 1 mol L⁻¹	KOH 4 mol L⁻¹	resíduo
Asp	4,54 ± 0,01	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,76 ± 0,2	1,87 ± 0,2	4,4 ± 0,2	11 ± 1	13,3 ± 0,2
Glu	4,2 ± 0,2	-	-	-	-	2,6 ± 0,3	6,0 ± 0,8	8,1 ± 0,1
Ser	6,2 ± 0,3	3,4 ± 0,2	4,2 ± 0,2	8 ± 2	3,95 ± 0,8	9 ± 1	24 ± 1	30 ± 3
His	2,96 ± 0,09	-	-	-	-	-	-	4,3 ± 0,5
Gly	1,6 ± 0,1	4,3 ± 0,5	4,27 ± 0,08	8 ± 1	-	13,5 ± 0,2	40 ± 6	31 ± 1
Thr	-	-	-	-	-	-	-	10,1 ± 0,1
Arg	3,39 ± 0,02	2,26 ± 0,01	-	-	-	-	-	5,2 ± 0,2
Ala	5,35 ± 0,01	2,8 ± 0,5	-	3,6 ± 0,6	-	5,7 ± 0,7	11,0 ± 0,5	23,2 ± 0,8
GABA	1,86 ± 0,08	-	-	-	-	-	-	6,7 ± 0,1
Val	2,83 ± 0,05	2,13 ± 0,7	-	2,4 ± 0,1	-	-	-	16,4 ± 0,2
Phe	1,6 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	6,7 ± 0,1
Ile	1,25 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	10 ± 1
Leu	-	-	-	-	-	-	-	61 ± 4
Orn	2,23 ± 0,02	-	-	-	-	-	-	4,9 ± 0,1
Lys	1,5 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	10,1 ± 0,1

TABELA 2 – Teores de aminoácidos (mmol L⁻¹) para amostras do procedimento de extração seqüencial dos componentes da parede celular provenientes de material radicular lixiviado, n = 3.

Aminoácido	Conteúdo celular	SDS	CDTA	Na ₂ CO ₃		KOH		resíduo
				1°C	20°C	1 mol L ⁻¹	4 mol L ⁻¹	
Asp	26,5 ± 0,2	1,88 ± 0,09	1,7 ± 0,1	2,0 ± 0,1	1,6 ± 0,1	5,1 ± 0,3	6,6 ± 0,7	9,2 ± 0,3
Glu	22,7 ± 0,7	-	-	-	-	3,6 ± 0,6	4,2 ± 0,4	7,3 ± 0,2
Ser	29,8 ± 0,2	4,70 ± 0,07	3,7 ± 0,3	5,2 ± 0,3	4,1 ± 0,1	7,9 ± 0,2	10,1 ± 0,6	18 ± 1
His	0,15 ± 0,01	-	-	-	-	-	-	2,7 ± 0,1
Gly	65 ± 3	4,38 ± 0,03	3,9 ± 0,2	1,9 ± 0,2	-	16 ± 2	15 ± 2	20 ± 1
Thr	22 ± 1	-	-	-	-	-	-	8,1 ± 0,2
Arg	14 ± 1	-	-	-	-	-	-	5,3 ± 0,4
Ala	36,8 ± 0,5	2,81 ± 0,06	1,3 ± 0,2	3,7 ± 0,4	-	7,3 ± 0,6	6,3 ± 0,4	16 ± 1
GABA	10,3 ± 0,1	-	-	-	-	-	-	4,0 ± 0,2
Val	30,2 ± 0,6	2,3 ± 0,3	-	-	-	-	-	13,4 ± 0,6
Phe	12,9 ± 0,2	-	-	-	-	-	-	5,4 ± 0,2
Ile	23,0 ± 0,4	-	-	-	-	-	-	8,4 ± 0,4
Leu	34 ± 1	-	-	-	-	-	-	65 ± 4
Orn	8,1 ± 0,3	-	-	-	-	-	-	5,4 ± 0,7
Lys	11,7 ± 0,1	-	-	18 ± 1	-	-	-	11,2 ± 0,5

TABELA 3 – Teores de aminoácidos (mmol L⁻¹) para amostras do procedimento de extração seqüencial dos componentes da parede celular provenientes de material radicular jovem, n = 3,

Aminoácido	Conteúdo celular	SDS	CDTA	Na₂CO₃ 1°C	Na₂CO₃ 20°C	KOH 1 mol L⁻¹	KOH 4 mol L⁻¹	resíduo
Asp	32 ± 2	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,7	2,5 ± 0,2	1,6 ± 0,1	7,8 ± 0,6	16 ± 1	33 ± 3
Glu	22 ± 1	-	-	-	-	4,5 ± 0,4	9,1 ± 0,3	23,1 ± 0,6
Ser	42 ± 5	4,2 ± 0,2	3,9 ± 0,2	6,85 ± 0,08	4,2 ± 0,5	17 ± 2	23 ± 1	75 ± 6
His	12,0 ± 0,4	-	-	-	-	-	-	9,36 ± 0,08
Gly	53 ± 2	2,41 ± 0,06	-	6,3 ± 0,5	-	31 ± 1	42 ± 5	77 ± 5
Thr	23,6 ± 0,4	-	-	-	-	3,13 ± 0,08	-	30,5 ± 0,4
Cit	-	-	-	-	-	-	-	8,34 ± 0,02
Arg	17,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1	-	-	-	-	-	19 ± 1
Ala	45 ± 3	2,2 ± 0,4	2,33 ± 0,08	2,7 ± 0,2	-	10 ± 1	20 ± 2	65 ± 4
GABA	13,0 ± 0,2	-	-	-	-	-	-	14 ± 1
Val	32 ± 1	2,5 ± 0,3	2,5 ± 0,4	-	-	-	-	43 ± 2
Phe	14,2 ± 0,5	-	-	-	-	-	-	17,4 ± 0,7
Ile	23,8 ± 0,8	-	-	-	-	-	-	31,8 ± 0,9
Leu	50 ± 4	-	-	-	-	-	-	93 ± 7
Orn	4,88 ± 0,09	-	-	-	-	-	-	4,32 ± 0,03
Lys	11,1 ± 0,2	-	-	16 ± 2	-	-	-	11,2 ± 0,8