

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

MESTRADO EM QUÍMICA ANALÍTICA

Aplicações a Processos e Bioquímicos

**ESTUDO DO DESTINO DE PESTICIDAS NO SOLO USANDO
RADIOTRAÇADORES**

MARIA DA CONCEIÇÃO FERNANDES

ÉVORA

1998

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

MESTRADO EM QUÍMICA ANALÍTICA

Aplicações a Processos e Bioquímicos

**ESTUDO DO DESTINO DE PESTICIDAS NO SOLO USANDO
RADIOTRAÇADORES**

MARIA DA CONCEIÇÃO FERNANDES



103 087

ÉVORA

1998

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**ESTUDO DO DESTINO DE PESTICIDAS NO SOLO USANDO
RADIOTRAÇADORES**

MARIA DA CONCEIÇÃO FERNANDES

Dissertação apresentada na Universidade de Évora para a
obtenção do grau de Mestre em Química Analítica, em
especialidade de Aplicações a Processos Bioquímicos.

ÉVORA

1998

À minha mãe e à memória do meu pai

ÍNDICE GERAL

	Pag.
Índice de tabelas	iv
Índice de figuras	v
Agradecimentos	vi
Resumo	viii
Abstract	ix
Abreviaturas e siglas	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. PESTICIDAS	4
2.1 INTRODUÇÃO	4
2.2 JUVENÓIDES	6
2.2.1 Síntese de juvenóide W328 radiomarcado com ¹⁴ C	8
2.3. EFEITOS ADVERSOS DOS PESTICIDAS	9
2.3.1 Modo de acção biológica dos pesticidas	10
2.3.2 Impacto sobre os microrganismos	10
2.3.3 Impacto nas plantas	11
2.3.4 Saúde humana	11
2.3.5 Contaminação de águas subterrâneas	12
2.4. DESTINO DOS PESTICIDAS NO SOLO	13
2.4.1 Degradação microbiológica de pesticidas	14
3. RADIOACTIVIDADE	16
3.1 PERSPECTIVA HISTÓRICA	16
3.2 LEI DO DECAIMENTO RADIOACTIVO	19
3.3 TRAÇADORES RADIOACTIVOS	21
3.4 INTERACÇÃO DAS PARTÍCULAS COM A MATÉRIA	24

3.5 CONDIÇÕES FUNDAMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE BAIXA RADIOACTIVIDADE	30
3.5.1 Eficiência de detecção	31
3.5.2 O Ruído de fundo	33
3.5.3 Detecção e espectrometria	33
3.5.4 Outros factores que determinam a medição de baixo nível de radioactividade	34
3.6 CONTADORES DE CINTILAÇÃO LÍQUIDA	35
3.6.1 Princípio de funcionamento dos detectores de cintilação	35
3.6.2 A influência dos processos da contagem por cintilação líquida na medição de baixos níveis de radiactividade	37
3.6.2.1 Quenching	41
3.6.2.1.1 Quenching de ionização	42
3.6.2.1.2 Quenching por diluição ou concentração	43
3.6.2.1.3 Quenching químico	43
3.6.2.1.4 Quenching por coloração	45
3.6.2.1.5 Quenching de fase	45
3.6.2.1.6 Quenching de fotão	46
3.6.2.1.7 Fenómenos que interferem na contagem de cintilação	46
3.6.3 Medição por contadores de cintilação líquida	47
3.6.3.1 Método do padrão interno (IS)	49
3.6.3.2 Método da razão de dois canais (SRC)	50
3.6.3.3 Método do padrão externo	50
3.6.3.4 Método do deslocamento da amplitude média dos impulsos (ESP)	51
3.6.3.5 Método do número-H (H)	51
3.6.4 Estatística e erros das medidas de taxa de contagem	52
4. MATERIAIS E MÉTODOS	56
4.1 ISOLAMENTO DE ESTIRPES MICROBIANAS DO SOLO	56

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES MICROBIANAS ISOLADAS	59
4.3 ESTUDO DA DEGRADAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO PESTICIDA W328	61
4.4 ESTUDO DA DEGRADAÇÃO POR UMA ESTIRPE BACTERIANA DO PESTICIDA W328 MARCADO RADIOISOTOPICAMENTE	64
4.5 ANÁLISE POR RADIOCROMATOGRÁFIA DA DEGRADAÇÃO POR UMA ESTIRPE BACTERIANA DO PESTICIDA MARCADO RADIOISOTOPICAMENTE	66
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
5.1 ISOLAMENTO DE ESTIRPES MICROBIANAS DO SOLO	69
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES MICROBIANAS ISOLADAS	71
5.3 ESTUDO DA DEGRADAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO PESTICIDA W328	76
5.5 ANÁLISE POR RADIOCROMATOGRÁFIA DA DEGRADAÇÃO DO PESTICIDA W328 MARCADO COM RADIOISÓTOPO	76
6. CONCLUSÕES	83
7. BIBLIOGRAFIA	85
8. ANEXOS	96
ANEXO 1	97
ANEXO 2	98

ÍNDICE DE TABELAS

	Pag.
Tabela 2.1 Categorias de pesticidas usados para controlar pestes indesejáveis.	5
Tabela 5.1 Valores de pH medido, a 25 °C para as amostras de solo estudadas.	69
Tabela 5.2 Biomassa observada para as diferentes concentrações de A1 e A3 em meio completo, após incubação a 37 °C por 48 h.	70
Tabela 5.3 Tipos de colónias observadas no meio completo (CA) após incubação a 37 °C por 48 h.	72
Tabela 5.4 Tipos de colónias observadas no meio extracto de malte (MA) e meio nutritivo (NA) após incubação a 28 e 37 °C, respectivamente, por 48 h.	73
Tabela 5.5 Observações microscópicas das diversas colónias de leveduras e bactérias observadas nos meios CA, MA e NA.	74
Tabela 5.6 Observação microscópica dos diferentes bolores existentes nos meios de cultura (CA, MA, NA).	75
Tabela 5.7 Crescimento observado das diferentes estirpes de bactéria e de bolores no meio mínimo com pesticida (MMP) e meio completo (CA) e no meio mínimo sem pesticida (MM).	77
Tabela 5.8 Resultados do cromatograma 1.	78
Tabela 5.9 Resultados do cromatograma 2.	79
Tabela 5.10 Resultados do cromatograma 3.	81
Tabela 5.11 Resultados do cromatograma 4.	81

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 2.1 Representação da reacção de síntese do juvenóide W 328.	8
Figura 2.2 Factores que influenciam o comportamento dos pesticidas no solo.	14
Figura 3.1 Fenómenos que ocorrem no processo de cintilação binária.	40
Figura 3.2 Esquema representativo dos blocos constituintes dos contadores de cintilação líquida.	47
Figura 5.1 Fotografia de uma das placas Petri com meio CA crescida a 37 °C.	75
Figura 5.2 Cromatograma da corrida 1 com detector de U.V. (cromatograma 1).	78
Figura 5.3 Cromatograma da corrida 1 com o detector de radioisótopos (cromatograma 2).	79
Figura 5.4 Cromatograma da corrida 2 com detector de U.V. (cromatograma 3).	80
Figura 5.5 Cromatograma da corrida 2 com detector de radioisótopos (cromatograma 4).	81

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar queria expressar o meu profundo agradecimento ao Professor Doutor Júlio Manuel da Cruz Morais, orientador desta dissertação, não só pela sua valiosa contribuição, mas também pelo seu estímulo constante e entusiasmo contagiante, permanente apoio e disponibilidade. Agradeço também, o seu contributo para a minha formação científica, profissional e pedagógica e também a oportunidade de poder trabalhar numa área onde o conhecimento científico pode contribuir para o bem estar da humanidade.

Ao Doutor Antonín Holý (D. Sc.) director do Instituto de Química Orgânica e Bioquímica (ÚOCHB) da Academia de Ciências da República Checa em Praga, agradeço por ter autorizado e apoiado financeiramente a minha estadia nesse instituto.

Ao Doutor Rychard Tykva (D. Sc.), responsável pelo Departamento de Radioisótopos do ÚOCHB, o meu profundo e sincero agradecimento por ter sido o mentor de todo o trabalho realizado. Pela forma interessada e amiga como me recebeu em Praga, bem como pelos valiosos conhecimentos científicos transmitidos, pela sua disponibilidade permanente e por todos os meios accionados que permitiram a realização do trabalho apresentado e desta tese.

Ao Eng. Tomáš Ruml (C. Sc.) da Faculdade de Química da Universidade Técnica de Praga, por ter concedido as instalações do laboratório, para a realização de todo o trabalho microbiológico. Ao Dr. Jarda Novak agradeço o tempo, o apoio e a disponibilidade durante o trabalho realizado na universidade, bem como durante a minha pesquisa bibliográfica.

À Doutora Vlasákova do Instituto de Microbiologia da Academia de Ciências da República Checa em Praga, agradeço por ter realizado comigo os tarefas relativas à

cromatografia e por me ter ajudado a compreender melhor os resultados obtidos nesta parte do trabalho.

Ao Doutor Kopeřtanský, e Sr^a Zizková, agradeço toda atenção, simpatia e ajuda que dispensarem durante a minha estadia em Praga. Ao Eng. Pavlu o meu agradecimento pelo apoio e disponibilidade nos trabalhos realizados com o contador de cintilação líquida. A todas outras pessoas que contribuíram para este trabalho e para a minha estadia na República Checa.

Ao Dr. Rui Ferreira e à Dr.^a Rosário Martins pelo entusiasmo e incentivo para a minha ida a Praga e por todo o apoio e conselhos que tão úteis foram para a escrita desta tese.

À Junta Nacional de Investigação Científica (JNICT), actualmente Fundação para a Ciência e Tecnologia por me ter concedido a bolsa de mestrado no âmbito do programa PRAXIS XXI.

À Professora Doutora Rosa Fernandes do Instituto Politécnico de Beja, pela amizade, apoio e incentivo para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas, Dr. Humberto Chaves, Dr.^a Fátima Carvalho e Dr. José Ferro, por toda a amizade, dedicação e apoio que prestaram e que permitiu a realização deste trabalho.

À Dr.^a Lucinda Neves por me ter concedido os apontamentos do 1º curso de Protecção Integrada realizada no I.S.A em Lisboa.

À Irene Lopes por toda a amizade e apoio durante a minha ausência de Portugal. Ao Agnelo Amaro agradeço a amizade e prestabilidade com assuntos referente à informática.

À minha família o meu obrigado muito especial, pelo apoio e carinho constante durante a realização deste trabalho e ao Domingos por tornar mais bela a minha estadia em Praga.

RESUMO

Este trabalho mostra que é possível através da tecnologia de radiotraçadores fazer um estudo da degradação do pesticida 2-(4-(2-(etoxicarbamatoetoxi) etoxi)benzil)-1-ciclohexanona etileno acetal – W328 (análogo da hormona juvenil) por uma estirpe bacteriana existente no solo.

De duas amostras de solo recolhidas a 8 km de Reguengos de Monsaraz foram isolados os microrganismos aeróbios através do cultivo em três meios diferentes: meio completo, meio de extracto de malte e meio nutritivo. Foram identificados 9 estirpes bacterianas, 2 leveduras e quatro estirpes de bolores.

O estudo da degradação microbiológica do pesticida W 328, mostrou que apenas 3 estirpes bacterianas e 3 de bolores utilizaram o pesticida como fonte de carbono. A estirpe seleccionada para o estudo da degradação pela metodologia de radiotraçadores foi uma bactéria gram +.

Após a incubação da bactéria com o pesticida radiomarcado durante 24 horas a 37 °C com agitação, realizaram-se duas corridas cromatográficas por HPLC. A detecção com U. V. não permitiu identificar nem o pesticida nem os produtos de degradação formados. A detecção por cintilação líquida permitiu seguir o destino do pesticida sem qualquer interferência. Foi identificado um pico correspondente ao pesticida, com tempo de retenção aproximado de 27,4 min., com a maior percentagem de área (95,569 e 99,356) e apenas um pico para um produto de degradação, com tempo de retenção de 25,5 min. e com percentagem de área de 4,431 e 0,644, respectivamente. Este produto foi identificado como sendo uma cetona.

ABSTRACT

This work show how is possible to follow the degradation of the pesticide 2-(4-2(ethoxycarbamato)ethoxy)benzyl)-1-cyclohexanone ethylene acetal – W 328 (hormone juvenil analog) by a bacteria from the soil through the radiotracer methodology.

Aerobic microorganism were isolated from 2 sample of soil colleted 8 km far from Reguengos de Monsaraz. For this purpose, three different media was used: complet medium, malt extract agar and nutritive agar. Nine bacterial strains, 4 strains of moulds and 2 yeast were identified

In the microbial degradation study of the pesticide W 328, was found 3 bacteria strains and 3 mould strains which used this pesticide as the carbon source. A bacteria gram + was chosen to make further studies by the radiotracer methodology.

After incubation of the bacteria with the radiolabelled pesticide during 24 h at 37 °C two runs in HPLC were made. In the U.V. detector results was not possible to find the peaks for neither the pesticide nor the degradation products. In the results with the liquid scintillation counter this evaluation was very clear. A peak with retention time about 27,7 min. and the largest % area (95,569 and 99,356) was identified as the pesticide peak and the only peak for the degradation product was found at retention time of 25,5 min wit % area of 4,431 and 0,644, respectively. This degradation product was identified as a ketone.

ABREVIATURAS E SIGLAS

% - percentagem

ex. - exemplo

fig. - figura

HJ – hormona juvenil

AHJ – análogos da hormona juvenil

W 328 - 2-(4-(2-(etoxicarbamatoetoxi) etoxi)benzil)-1-ciclohexanona etileno acetal

VMA – valor máximo admissível

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

Radio-HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência com detector de radioisótopos

$\mu\text{g l}^{-1}$ – micrograma por litro

Bq – Bequerel, unidade de actividade no S.I.

$t_{1/2}$ – tempo de meia vida ou período de um radioisótopo

^{14}C –isótopo de carbono radioactivo com número de massa 14

λ - constante de decaimento de uma radioactiva

eV – electrão-volt

s - segundo

ms – 10^{-3} s

μm – 10^{-6} metro

ns – 10^{-9} s

Ci – Curie, unidade de actividade

dps – desintegrações por segundo

cps – cintilações por segundo

cpm – cintilações por minuto

cph – cintilações por hora

ml – 10^{-3} litro

CA – meio completo

MA – meio de extracto de malte

NA – meio nutritivo

rpm – rotações por minuto
UFC – unidades formadoras de colónias
MMbac – meio mínimo para bactérias
MMbol – meio mínimo para bolores
km – 10^3 m
MMliq – meio mínimo líquido
PBS – solução tampão de fosfato
U. V. – radiação ultra violeta
nm – 10^{-9} metro
min. – minuto
°C – grau Celsius
K – grau Kelvin
mV.s – milivolt x s
AUFS - Absorbance Unit Full Screen

1. INTRODUÇÃO

Os pesticidas são largamente usados na agricultura para o controlo de pragas, doenças e infestante. Em Portugal foram homologados e são aceites em protecção integrada os insecticidas: fosadona no combate à traça da uva, e do teflubenzurão, no combate ao bichado da macieira e pereira (Amaro, 1995).

Devido à falta de especificidade dos insecticidas clássicos e da elevada toxicidade para os humanos e animais, foi desenvolvido através da síntese orgânica uma nova geração de insecticidas com baixa ecotoxicidade, maior segurança ambiental e com a mesma actividade biológica que os primeiros. Estes insecticidas são análogos da hormona juvenil (HJ) e são conhecidos como juvenóides ou análogos da hormona juvenil (AHJ) (Sláma *et al.*, 1974). Estes juvenóides mostraram que influenciam a reprodução e/ou desenvolvimento dos insectos, por exemplo, nos gafanhotos (Nemec *et al.*, 1997).

Os AHJ são compostos sintéticos com actividade biológica, que produzem efeitos morfológicos e fisiológicos semelhantes às das hormonas segregadas pelo *corpora allata* dos insectos. Parece que estes compostos podem causar distúrbios no desenvolvimento dos insectos, após o seu contacto com plantas tratadas e, como foi observado por Babu e Sláma (Babu e Sláma, 1972), certos juvenóides possuem propriedades de agentes sistémicos. O uso de juvenóides como potenciais pesticidas é baseado no facto de os distúrbios causados durante o desenvolvimento, pelos juvenóides, nas diferentes fases ontogénicas, poder levar à mortalidade da espécie afectada ou, pelo menos, poder evitar que os insectos se reproduzam.

Durante os últimos anos, no estudo ecotoxicológico de pesticidas, tem sido devotada uma especial atenção à contaminação do ambiente, especialmente no solo e água, após a sua aplicação. De facto, muitos pesticidas e seus produtos de degradação foram identificados como potenciais poluentes de água subterrâneas (Miles, 1992; Walls *et al.*,

1996). De acordo com a legislação em vigor na Comunidade Europeia, o valor máximo admitido (VMA) para um pesticida individual é de $0,1 \mu\text{g.l}^{-1}$ (Fielding *et al.*, 1992). Foram desenvolvidos diferentes técnicas para a análise de pesticidas e dos seus produtos de degradação em amostras aquosas. A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) é habitualmente a preferida para estes objectivos (Yoa *et al.*, 1991; Schlett, 1991; Moreno-Tovar *et al.*, 1996; Barcelo *et al.*, 1996, Lacorte *et al.*, 1996).

Para controlar e avaliar a poluição devida aos pesticidas, muitos grupos estudaram o destino dos pesticidas após a sua aplicação (Bintein e Devillers, 1996) incluindo a degradação abiótica e biótica em meios aquáticos (Mansour, 1996) e no solo (Davis *et al.*, 1993). Todos estes trabalhos demonstraram que o destino dos pesticidas depende das características físicas e químicas do solo e da microflora do solo (Tykva e Klotz, 1996; Roberts *et al.*, 1993).

A metodologia dos radiotraçadores pode ser usada para investigar o destino do pesticida após a sua aplicação (Tykva e Bennetová, 1993). Neste método um radionúclido é intencionalmente introduzido no sistema experimental como radiotraçador. Conhecendo-se a distribuição do radiotraçador no sistema, consegue-se saber qual o percurso do fenómeno estudado. No estudo da degradação de alguns pesticidas esta metodologia foi utilizada (Frederrick *et al.*, 1994; Karns *et al.*, 1986). A principal razão do uso deste método é a elevada sensibilidade de detecção que se obtém. Nos estudos de degradação do pesticida W-328 radiomarcado pela microflora do solo (Tykva *et al.*, 1995) esta vantagem é claramente demonstrada. A medição de radioactividade permitiu distinguir entre os compostos investigados (pesticida e os produtos de degradação) e a imensa quantidade de outros compostos orgânicos presentes no solo. Em estudos posteriores, foi demonstrado que a biodegradação integrada do mesmo pesticida, numa coluna de vidro preenchida com solo contendo a biomassa total, é a mesma que a soma da biodegradação diferencial das estirpes microbianas separadas deste solo (Tykva e Klotz, 1996). Associando a metodologia de radiotraçadores a arranjos experimentais para a medição de níveis de

radioactividade muito baixos, consegue-se um método extremamente sensível (Tykva e Sabol, 1995) para estudar o destino dos pesticidas.

No presente trabalho, duas amostras de solo da região de Reguengos de Monsaraz foram estudadas como modelos de degradação de pesticidas. Foram isolados microrganismos aeróbicos, usando três meios sólidos diferentes, e comparou-se as respectivas biomassas totais. Para ilustração, foi seleccionada uma das estirpes isoladas para verificar se degradava um juvenóide (W 328) marcado com radionúclido. A análise da radioactividade total foi realizada através da cintilação líquida, enquanto que a degradação do pesticida foi determinado do radio-HPLC.

2. PESTICIDAS

2.1. INTRODUÇÃO

Pesticidas são substâncias ou misturas de substâncias usadas para prevenir, destruir ou controlar qualquer peste, incluindo:

- vectores de doença humana ou animal,
- espécies animais ou vegetais indesejáveis, que causem mal ou que possam interferir com a produção, processamento, armazenagem, transporte, ou comercialização de alimentos, produtos agrícolas, madeira, produtos de madeira ou rações para animais.

Pesticidas são também as substâncias que são:

- administradas a animais para o controlo de insectos, ácaros/aranhiços ou outras pestes dentro ou por cima dos seus corpos,
- usadas como reguladores de crescimento de plantas, desfolhantes e secantes,
- capazes de actuar como agentes para reduzir a espessura da casca ou para prevenir a queda prematura de frutos,
- aplicadas a sementeiras, antes ou depois da colheita,
- usadas para proteger da deterioração, os produtos, durante o seu armazenamento e transporte (Holland, 1996).

A maioria dos pesticidas modernos são compostos químicos, sendo classificados, de modo abrangente, de acordo com a população alvo (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 Categorias de pesticidas usados para controlar pestes indesejáveis (Killham, 1994; Silva-Fernandes, 1995; Pierzynknski *et al.*, 1994).

Pesticida	Controlo
Herbicidas	Previne o crescimento de infestantes em culturas agrícolas, relvados, campos de golfe.
Fungicidas	Protege as plantas de doenças causadas por fungos.
Insecticidas	Controla ou mata insectos indesejáveis ou perigosos que vivem em plantas, animais ou habitações.
Acaricidas	Controla ácaros e aranhas que possam infestar ou danificar culturas agrícolas ou plantas ornamentais.
Nematodocidas	Protege as raízes das plantas jovens de vermes que infectam as plantas e alimentam-se a partir das suas raízes.
Bactericida	Controla bactérias que possam causar dano à fruta e desenvolver inchamento (protuberância) nas plantas.
Avicidas	Controla ou mata aves que possam causar dano a culturas, frutos e sementes.
Rodenticidas	Mata ratos, ratazanas que vivem no campo, ou em casas de habitação e outros edificios e previne a infestação ou a perda de produtos alimentícios armazenados.

Os pesticidas são, desde longa data, usados na agricultura, ou campos de aplicação da agricultura, como se depreende da definição. Em Portugal, são várias as aplicações encontradas. Por exemplo no tratamento do araniço vermelho das macieiras é usado o flufenoxurão (acaricida) e o teflubenzurão (insecticida) para o bichado, no combate ao oídio das videiras é usado o fungicida (propinebe, zineb, mancozebe).

A aplicação de insecticidas orgânicos na prática agrotécnica resultou num grande e inesperado progresso no controlo das pestes de insectos e teve um grande interesse económico em todo o mundo. Contudo, a aplicação generalizada destes agentes também foi (é) acompanhada de efeitos negativos. A principal desvantagem dos pesticidas clássicos

reside na sua falta de especificidade, os insectos úteis também são eliminados juntamente com os prejudiciais. Para além disso, a sua utilização em larga escala durante muitos anos, levou à formação de estirpes de insectos mais resistentes, requerendo o uso de doses de insecticidas cada vez mais elevadas. Os resíduos da maioria dos compostos clorados utilizados acumularam-se nos alimentos para animais e humanos, produzindo directa ou indirectamente efeitos nocivos no homem. Esta situação levou a que muitos países desenvolvidos restringissem o uso de alguns pesticidas clássicos.

Nestas circunstâncias é natural que novos caminhos fossem investigados para o controlo das pestes de insectos. Neste contexto, foi devotada uma atenção especial à endocrinologia e às hormonas que regulam o crescimento dos insectos desde da formação do ovo até à formação do insecto adulto, com a finalidade de produzir pesticidas mais específicos para as pragas em causa e com menores efeitos paralelos para o ambiente e para o homem (Sláma, Romanuk, Šorm, 1974).

2.2. JUVENÓIDES

Os compostos orgânicos análogos ou que imitam as hormonas juvenis são conhecidos como juvenóides. Nestes compostos estão incluídos maioritariamente os produtos sintéticos e apenas uma pequena parte de componentes naturais isolados de animais ou plantas. A principal característica dos juvenóides é a propriedade de produzir alguns efeitos morfológicos e fisiológicos semelhantes aos das hormonas segregadas pelo *corpora allata* dos insectos.

O interesse industrial pelos juvenóides esteve associado à descoberta da actividade da hormona juvenil existente no papel americano (“American paper”) por Sláma e Williams. Estes cientistas descreveram (na década de 1960) a incapacidade de certas

espécies de insectos de se reproduzirem em contacto com o juvenóide ou “factor de papel” presente em produtos derivados do papel americano.

Actualmente, o princípio geral de acção de juvenóides consiste em causar distúrbios nas diferentes etapas do desenvolvimento ontogénico do insecto que possam levar à mortalidade das espécies afectadas ou, pelo menos, prevenir a reprodução dessas espécies (Sláma, Romanuk, Šorm, 1974; Babu, Sláma, 1972).

Os efeitos dos juvenóides a nível do organismo do insecto são:

- efeitos nos ovos: se aplicado logo após a postura, a embriogenése é impedida; se mais tarde, não terá efeito ovicida mas haverá efeitos retardados durante a metamorfose (o 5º instar¹ dará lugar a um suplementar 6º instar).
- efeito nas larvas: quando o teor da hormona juvenil (HJ) é alto temos larva/larva; quando baixa resulta em pulpa; quando ausente dá lugar a adulto.

Se o último instar, for tratado com juvenóide dá-se uma pupação anormal também dita com efeitos morfogenéticos.

- efeitos nas pupas: tratamento destes com juvenóides dá lugar a uma segunda muda pupal.
- efeitos nos adultos: a HJ aumenta de novo nos adultos e induz a maturação e reprodução da fêmea.

Em certas espécies haverá esterilização das fêmeas se aplicado um juvenóide, noutros casos haverá intensificação da produção de feromonas.

Durante a diapausa não existe HJ. Com a adição de um juvenóide este estado cessa. (Silva-Fernandes, 1995a; Sehnal, 1993)

¹ A reprodução dos insectos é caracterizado pelas suas metamorfoses. Em espécies mais evoluídas existe mais do que uma fase larvar, aqui designado por instar, que são numerados por ordem crescente de aparecimento ao longo do tempo, até dar origem à pupa (fase da ninfa). Na última fase da metamorfose forma-se o insecto adulto.

2.2.1. Síntese de Juvenóide W 328 Radiomarcado com ^{14}C

O juvenóide 2-(4-(2-(etoxicarbamatoetoxi) etoxi)benzil)-1-ciclohexanona etileno acetal (W 328) foi marcado com ^{14}C com o objectivo de estudar o mecanismo de acção deste potencial pesticida em insectos (moscas). O composto já tinha sido marcado na posição do carbonilo do uretano com ^{14}C . Com base nos resultados preliminares houve necessidade de marcar o anel aromático da molécula de W 328 com ^{14}C ou ^3H . A síntese de (anel- ^{14}C)W 328 foi descrito por Elbert (Elbert *et al*, 1994).

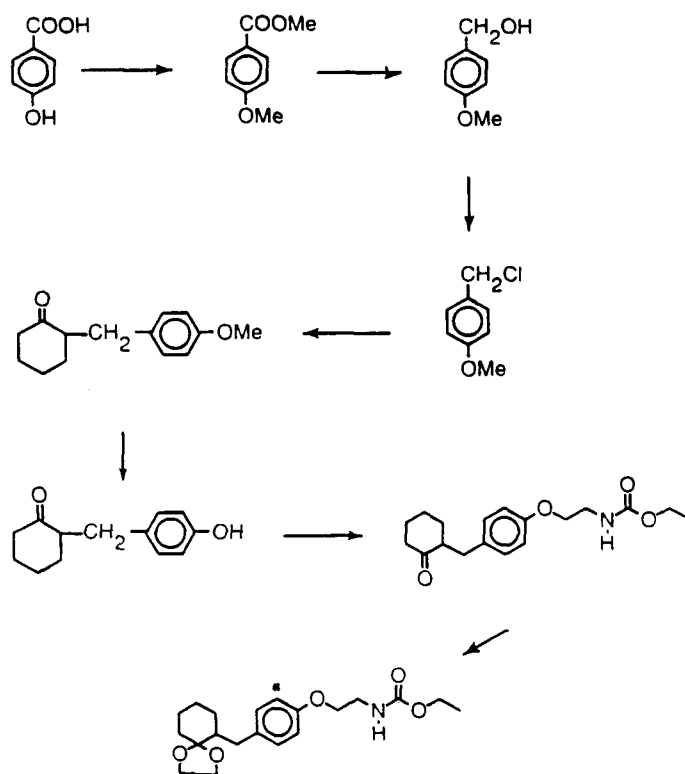


Figura 2.1 Representação da reacção de síntese do juvenóide W 328. Legenda: * corresponde à posição do carbono marcado (Elbert *et al*, 1994).

A aplicação tópica no abdómen, cabeça e tórax de moscas *Sarcophaga bullata* Parker com uma solução acetónica do juvenóide W 328 radiomarcado com ^{14}C e/ou ^3H em posições diferentes (Tykva e Bennettová, 1993) mostrou que:

- só uma parte do pesticida aplicado topicamente penetra dentro do insecto devido ao efeito barreira da cutícula;
- com a aplicação de doses crescentes de pesticida marcado, aumenta-se a radioactividade de determinados tecidos;
- a microdistribuição da radiactividade relativa e relativamente alta na cutícula torácica, observou-se uma acumulação nos oócitos;
- uma grande parte do pesticida aplicado fica na cutícula, sendo retirado com as lavagens. A excreção do pesticida é feita maioritariamente através dos excrementos, sendo uma pequena parte excretada sob a forma de CO₂.

Estudo semelhante efectuado no gafanhoto migratório africano, *Locusta migratoria migratoriodes* (R. et L.), (Nemec *et al*, 1997), mostrou que o principal meio de eliminação do juvenóide é feita através da excreção. Apesar da maior parte da radioactividade permanecer na cutícula, foi encontrada uma pequena parte da radioactividade noutros órgãos (cérebro, corpo gordo, músculos torácicos, intestinos, gónadas, hemolinfa).

2.3. EFEITOS ADVERSOS DOS PESTICIDAS

Foram detectados diversos exemplos dos efeitos adversos do pesticidas, quando usado inadequadamente. Muitos estudos citaram a presença de níveis residuais de pesticidas nos solos e sistemas aquáticos. Ensaio realizados com a cobra de água doce, *Bellamyia dissimilis*, mostrou que pesticidas específicos podem provocar alterações histopatológicas em tecido (Jonnalagadda e Rao, 1996). Também já se observaram resíduos de pesticidas em frutas e vegetais (Di Corcia *et al.*, 1996), no leite materno humano (Waliszewisk *et al.*, 1996) e em comida de bebé (Bicchi *et al.*, 1996). A bioacumulação também tem sido um tema de interesse uma vez que, concentrações baixas de pesticidas absorvidos ou ingeridos podem acumular-se e tornar-se tóxico para o próprio organismo ou para outros que estejam num nível trófico superior (Ferrando *et al.*, 1996).

2.3.1. MODO DE ACÇÃO BIOLÓGICA DOS PESTICIDAS

Entende-se por modo de acção de um pesticida o mecanismo pelo qual o mesmo mata ou interage com os organismos alvo. Baseado no seu modo de acção biológica, os pesticidas são classificados como de contacto ou sistémicos. Os pesticidas de contacto matam o organismo através do enfraquecimento ou da ruptura da membrana celular que, por sua vez, resulta na perda dos constituintes celulares. Se o pesticida de contacto tem uma reacção aguda com o organismo alvo, a morte pode ser extremamente rápida. Os pesticidas sistémicos têm que ser absorvidos ou ingeridos pelo organismo alvo para poder interferir com os processos fisiológicos (por exemplo, divisão celular, formação de clorofila, desenvolvimento dos tecidos) ou metabólicos (por ex., respiração, actividade enzimática, sistema hormonal, fotossíntese) do organismo. (Pierzynknski *et al.*, 1994).

2.3.2. IMPACTO SOBRE OS MICRORGANISMOS

Os pesticidas introduzidos no ambiente podem ter efeitos devastadores em certos organismos, que podem ou não ser alvo dos mesmos. Os solos e os ecossistemas aquáticos contêm uma grande variedade de microrganismos, muitos dos quais são benéficos. A contaminação desses ecossistemas pelos compostos orgânicos, tais como as elevadas concentrações de pesticidas que são usadas inadvertidamente ou quando se dá o transporte dos pesticidas, através da escorrência das superfícies tratadas, para as águas superficiais pode resultar numa redução da actividade microbiológica (Perucci e Scarponi, 1996, Novak *et al.*, 1995). Não obstante, em algumas situações poder ocorrer um aumento da actividade microbiológica. Nestes casos esses microrganismos podem ser utilizados para “remediar” solos contaminados (Tykva *et al.*, 1995; Gan *et al.*, 1996).

2.3.3. IMPACTO NAS PLANTAS

As plantas que são sensíveis a pesticidas podem mostrar sinais imediatos de crescimento irregular, perda de biomassa ou morte. Como foi descrito acima, as plantas também podem desenvolver resistência a certos pesticidas. Nesses casos será necessário aplicar uma dose superior para se ter o controlo sobre elas. Outros pesticidas que não os herbicidas, tais como insecticidas, podem também afectar plantas(Pierzynknski *et al.*, 1994).

Para o caso dos juvenóides, sabe-se que algumas plantas contêm substâncias secundárias sem valor nutricional. Estas substâncias podem influenciar várias funções fisiológicas e de desenvolvimento ou, podem ser patogénicas para alguns insecto fitofagos.

2.3.4. SAÚDE HUMANA

Os pesticidas são usados para beneficio da humanidade no controlo dos insectos vectores de doenças tais como a malária e a febre tifóide, na agricultura para se ter uma maior rentabilidade e, nas pragas de insectos. No entanto, elevadas doses de alguns pesticidas podem ser prejudiciais para o homem. Investigações laboratoriais mostraram que, quando doses elevadas de determinados pesticidas foram administrados a animais causavam cancro (OMS, 1986), mutagénese, toxicidade no sistema imunitário (Banerjee *et al.*, 1996) neuropatias e até mesmo mortes. Em geral as doses recomendadas pelos produtores está abaixo das concentrações que causam esses problemas. No entanto, em caso de acidente e na manipulação contínua com pesticidas, as concentrações em contacto com os humanos é bastante elevada podendo acarretar risco, daí quer todo o cuidado no manuseamento de pesticidas seja necessário.

2.3.5. CONTAMINAÇÃO DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS

Excluindo a camada mais superficial, a que é conhecida por solo agrícola (30-40 cm), normalmente muito contaminada pelos pesticidas aplicados, a concentração dos resíduos de pesticidas nas camadas mais profundas raramente atinge valores elevados. Foi demonstrado que abaixo dos 30 cm de profundidade a concentração dos compostos aplicados foram menores que 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ no solo tratado. No entanto, a acumulação continua dos resíduos de pesticidas na zona insaturada constitui, a longo prazo, um problema grave no que diz respeito à protecção da água presente na zona saturada. A lixiviação dos pesticidas das zonas superficiais para a zona saturada, permite de facto o transporte dos mesmos (Guzzella *et al.*, 1996). Em análises realizadas em água subterrâneas dos estados da antiga República Federal da Alemanha, detectaram-se trinta e uma substâncias activas ou os seus metabolitos, estando treze em concentrações superiores ao valor limite de 0,1 $\mu\text{g}/\text{l}$ (Skark e Obermann, 1995). No Reino Unido os pesticidas mais frequentemente detectados em análises de águas subterrâneas pertencem ao grupo das triazinas, nomeadamente a simazina e a atrazina, usados para eliminação do ervas indesejáveis por exemplo nas margens das estradas e dos carris (Walls *et al.*, 1996). Análises realizados a águas subterrâneas na zona oriental da Carolina do Norte (Estados Unidos) confirmam a presença de pesticidas ou dos seus metabolitos. Em 15 % das suas amostras foi encontrado pelo menos um dos quatro pesticidas: alaclor, metaclor, atrazina e trifluralina (Libra *et al.*, 1996).

Uma vez que grande parte da água de consumo é proveniente das águas subterrâneas é necessário assegurar que estas não sejam minimamente contaminadas. Dado o uso generalizado de pesticidas na agricultura, os governos (Sousa, 1995) estabeleceram limites admissíveis de pesticidas nas águas destinadas a consumo humano. Na Comunidade Europeia (CE) o valor máximo admissível (VMA) é de 0,1 $\mu\text{g}/\text{l}$ por pesticida individualizado e de 0,5 $\mu\text{g}/\text{l}$ para pesticidas totais (Directiva 80/778/CEE), tendo sido proposto o mesmo limite para o parâmetro individualizado na proposta da directiva do Conselho relativamente à qualidade destinada a consumo humano em 1995 (Proposta de

directiva, 1995). Em Portugal vigoram os mesmos VMA estabelecido pelo Decreto-Lei 74/90.

2.4. DESTINO DE PESTICIDAS NO SOLO

O destino dos resíduos de pesticidas depende da interacção complexa entre: a natureza química do pesticida e suas propriedades, a composição química do solo, a ligação física pesticida-solo (retenção do solo, mobilidade), das condições ambientais e das transformações abióticas e bióticas a que está sujeito (fig. 2.2.) .

Como já foi referido anteriormente, a contaminação de solos com elevadas concentrações de resíduos de pesticidas pode causar, em última análise, a contaminação de águas subterrâneas. Tendo em conta este facto, foram realizados numerosos estudos com pesticidas relativos a: mobilidade e adsorção (Petersen *et al*, 1996; Baskaran *et al*, 1996; Cox *et al*, 1995), transporte (Starrett *et al*, 1996; Rocio Estrella *et al.*, 1993) e a construção de modelos de lixiviação e sua validação (Armstrong *et al*, 1996; Walker *et al*, 1996).

Igualmente importante é o estudo do tempo de vida dos resíduos de pesticidas e em que produtos estes são convertidos durante a sua passagem no solo. Contribuem para a conversão ou desaparecimento dos resíduos as reacções de degradação abiótica onde estão incluídas as reacções químicas e as de fotodecomposição (Pirisi *et al*, 1996; Mathew e Khan, 1996) e em maior percentagem a degradação biótica levada a cabo pelos microrganismos presentes no solo (Fomsgaard, 1995; Skipper *et al.*, 1996).

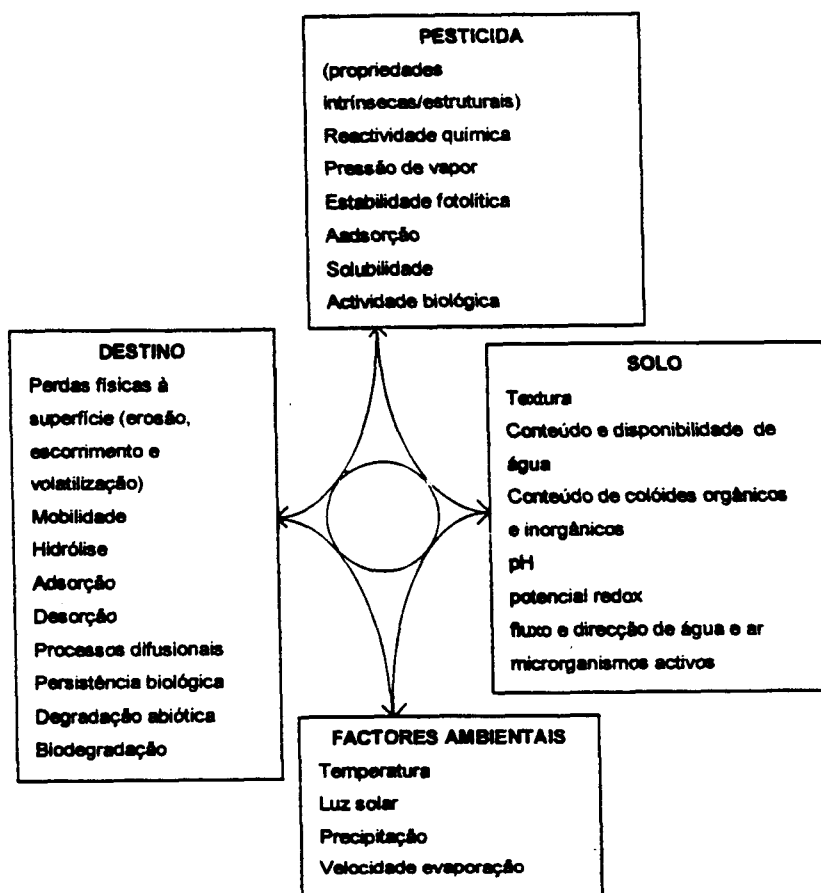


Figura 2.2 Factores que influenciam o comportamento dos pesticidas no solo (Arnold e Briggs, 1990, Martins, 1995).

2.4.1. DEGRADAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE PESTICIDAS

Quando se desenvolve um pesticida são realizados estudos laboratoriais de rotina com o objectivo de identificar os produtos da sua degradação e obter indicadores da velocidade a que esta ocorre. Os pesticidas marcados com radionúclidos são os mais utilizados neste testes (Blumhorst, 1996; Tal e Rubin, 1993; Lehr *et al.*, 1996; Roberts *et al.*, 1993) e os factores que afectam a degradação como: a temperatura do solo, o pH do solo, a matriz e textura do solo, a formulação do pesticida, a dose aplicada de pesticida e a

actividade microbiológica do solo, são as variáveis estudadas. A informação retirada destes ensaios permite prever a persistência de um pesticida no campo de aplicação e entanto, é preciso ter em mente, que os estudos laboratoriais podem apenas permitir prever a velocidade de degradação no campo. O principal objectivo dos estudos realizados no laboratório é identificar os produtos de degradação e obter informações acerca do mecanismo de degradação. Com particular interesse nesta área, são os chamados metabolitos terminais (uma vez que estes podem ser monitorizados) e de resíduos não extractáveis ou “resíduos-ligados” (estes só são detectáveis quando se usam pesticidas radiomarcados) (Roberts, 1990).

3. RADIOACTIVIDADE

3.1. PERSPECTIVA HISTÓRICA

Por volta de 1853, durante o estudo experimental da condutibilidade eléctrica de gases rarefeitos, Röntgen observou, por acaso, uma radiação capaz de atravessar camadas de espessura apreciável de materiais opacos à luz - os raios X e de provocar fluorescência. (Sousa, 1977).

Em 1867, Niepce de Saint-Victor reparou que emulsões de cloreto de prata escureciam na presença de sais de urânio, mesmo quando existiam entre os dois folhas de papel. Este efeito foi atribuído a fenómenos de luminescência. (Rabinowitz e Chase, 1975).

Em princípios de 1896, Henri Becquerel pensou que o fenómeno de flourescência estivesse de algum modo relacionado com a emissão de raios X. Procurou investigar se alguma radiação, semelhante aos raios X, seria emitida pelas substâncias que se tornavam fluorescentes quando expostas à luz solar. Para este trabalho escolheu cristais de uranilo (sulfato duplo de urânio e potássio) e colocou-os sobre chapas fotográficas envolvendo-as previamente em folhas de alumínio, para as proteger da acção dos raios solares. Expôs os cristais à radiação do Sol e, quando revelou a chapa, verificou que se encontrava impressionada. (Sousa, 1977)

Becquerel foi assim levado a concluir que o cristal de uranilo tinha emitido uma radiação que, analogamente aos raios X, era capaz de atravessar corpos opacos como a folha de alumínio e impressionar a chapa fotográfica, situada por debaixo dela. Por outro lado, também observou que a chapa fotográfica ficou escurecida, mesmo quando o cristal de uranilo não se encontrava exposto à radiação solar. (Sousa, 1977)

Só depois de Marie Curie, no início de 1898, ter estudado a radiação emitida pelo urânio, tório e pelos elementos , polónio e rádio, recentemente por ela descobertos, se reconheceu a “radioactividade” como um fenómeno verdadeiramente novo, estritamente atómico e não molecular, dependendo a sua intensidade somente da quantidade de átomos do elemento radioactivo presente.(Rabinowitz e Chase, 1975).

Observou-se que a radiação emitida pelas substâncias radioactivas:

- não tinha sempre o mesmo poder de penetração através da matéria;
- não era igualmente deflectida por campos eléctricos e magnéticos.

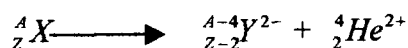
As primeiras observações que evidenciaram a presença de mais que um tipo de radiação foram feitas por Rutherford, em Cambridge, em 1898, através de experiências em que se utilizou o poder de ionização da radiação e a sua capacidade de atravessar meios materiais. As experiências mostraram que a radiação era formada, pelo menos, por dois tipos de radiações: uma capaz de penetrar através de algumas, poucas, folhas delgadas de alumínio e outra, muito penetrante, capaz de atravessar um número apreciável dessas mesmas folhas. Em 1899, Rutherford sugeriu que estas duas radiações fossem designadas, respectivamente, por **radiação α** e **radiação β** .

Mais tarde, em França, Villard e Pierre Curie observaram uma terceira componente da radiação, ainda mais penetrante, que denominaram de **radiação γ** .

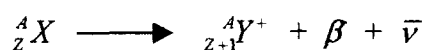
Em 1903, Rutherford e Soddy formularam a “teoria da transformação radioactiva” segundo a qual o fenómeno radioactivo está intimamente ligado ao interior do átomo o qual é profundamente afectado durante a transformação. Assim , após a emissão radioactiva, o átomo que resulta é diferente do átomo emissor original, durante a emissão radioactiva o átomo perde a sua identidade.

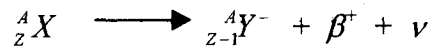
A **radiação α** consiste num fluxo de partículas alfa. Estas partículas são idênticas ao núcleo de hélio, ou seja, são partículas compostas por dois neutrões e dois protões,

movendo-se com velocidades da ordem de 0,1 da velocidade da luz. São desviadas pelos campos eléctricos e magnéticos, pois possuem uma carga positiva (+2); contudo são desviadas com certa dificuldade e só por acção de campos intensos, devido à grande inércia destas partículas. São muito pouco penetrantes, podendo ser absorvidas por uma folha de papel, pela pele ou por uma espessura de alguns centímetros de ar; o fraco poder de penetração desta radiação deriva da forte interacção que as partículas alfas experimentam com a matéria. Possuem um poder de ionização elevado e à medida que as partículas alfa perdem a sua energia atraem os electrões e transformam-se em átomos de hélio neutro. As partículas α têm energias discretas que dependem dos radioisótopos que as emitem. A partícula α pode ser originada pelo seguinte esquema de reacção.



A **radiação β** é um fluxo de electrões e podem ser de dois tipos, negativos ou positivos. Existem dois tipos de electrões idênticos em tudo excepto na carga, os negativos (-1) ou electrões, e os positivos (+1) ou positrões. Uma é a antipartícula da outra. Quando emitidas de um núcleo radioactivo são chamadas de partículas beta e são representadas por β^- e β^+ respectivamente, ou por e^- e e^+ . Estes electrões deslocam-se com velocidades elevadas, da ordem de grandeza de 10^8 ms^{-1} no ar. Como as partículas alfa, também são desviadas pelos campos eléctricos e magnéticos, apresentando no entanto um desvio mais acentuado. São medianamente penetrantes, estando o seu poder de penetração entre o da radiação α e o da radiação γ . Pelo facto da massa da partícula β ser muito mais pequena que a da partícula α , a radiação β interactua com a matéria muito menos intensamente, podendo assim atravessar vários metros de ar e mais de um milímetro de alumínio ou de outros metais leves. Esta última característica faz com que as partículas beta tenham um poder de ionização cem vezes inferior aos das partículas alfa. A radiação β pode ser representada pelos seguintes esquemas de reacção, onde ν e $\bar{\nu}$ representam o neutrino e o anti-neutrino, respectivamente.

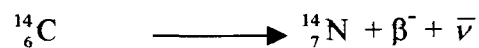




A energia libertada nestas emissões depende do radioisótopo e é partilhada entre a partícula β e o neutrino ou o anti-neutrino. Devido à partilha de energia e pelo facto do neutrino e de anti-neutrino não serem detectáveis, a partícula β apresenta um espectro muito largo.

A **radiação γ** é uma radiação electromagnética e, conseqüentemente, é basicamente diferente da radiação α e β , que são corpusculares. Os raios gama são mais penetrantes quer da radiação α , quer da β . Como todas as radiações electromagnéticas, a sua velocidade é de $3.0 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$. Esta radiação não é desviada por campos eléctricos nem magnéticos, e tem um poder de ionização cerca de 10 000 vezes menor que a radiação α .

O isótopo utilizado neste trabalho foi o ${}^{14}\text{C}$ que possui um decaimento β , que pode ser descrito pela equação:



onde β^- representa a partícula beta carregada negativamente e $\bar{\nu}$ o anti-neutrino.

3.2. LEI DO DECAIMENTO RADIOACTIVO

A principal quantidade usada na quantificação de fontes radioactivas é a **actividade** (A), que é definida como o quociente do número de transformações radioactivas num radionuclido, dN , e o intervalo de tempo, dt , em que a transformação ocorre (1).

$$A = \frac{dN}{dt} \quad (1)$$

A taxa de desintegração é dada pela lei do decaimento radioactivo (2)

$$\frac{dN}{dt} = -\lambda N \quad (2)$$

onde N representa o número de núcleos radioactivos instáveis e λ é a **constante de decaimento** característica de cada espécie radioactiva. Integrando a equação anterior, obtém-se

$$N = N_0 e^{-\lambda t} \quad (3)$$

onde N_0 representa o número de radionuclidos no instante inicial. Tendo em conta (1) e (2) então (3) poderá ser representado por

$$A(t) = A(0)e^{-\lambda t} \quad (4)$$

onde $A(0)$ é a actividade no instante inicial.

O **tempo de meia-vida** ou **período** ($t_{1/2}$) é outra grandeza muito usada na caracterização dos radioisótopos e é definido como o tempo necessário para a actividade decrescer para metade do seu valor inicial.

$$\frac{1}{2} = e^{-\lambda t_{1/2}} \quad (5)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda} = \frac{0,693}{\lambda} \quad (6)$$

A unidade utilizada no sistema internacional (S.I.) para a actividade é o Becquerel (Bq) correspondendo 1 Bq a uma transformação ou desintegração por segundo (dps). Em muitos livros, revistas e artigos de imprensa, mais antigos, é vulgar aparecer a actividade de uma substância radioactiva numa outra unidade, o Curie (Ci). Um Curie corresponde a $3,700 \times 10^{10}$ dps.

A **actividade específica**, ou seja, a actividade por unidade de quantidade de amostra radioactiva, exprime-se de diferentes formas: Becquerel (Bq) por unidade de peso ou volume.

3.3. TRAÇADORES RADIOACTIVOS

Como os isótopos radioactivos são quimicamente idênticos aos correspondentes isótopos estáveis, podem ser usados para “marcar” determinado composto, que pode, assim, ser seguido através de um dado esquema analítico, sistema industrial ou processo biológico. Esta metodologia é também conhecida por metodologia dos traçadores radioactivos ou radiotraçadores.

A introdução de determinado material radioactivo num sistema-amostra, ou a medida da radioactividade natural ou induzida de um sistema, constituem técnicas muito vantajosas de análise rápida e económica de elementos ou compostos. A diluição isotópica com traçadores radioactivos e o emprego de traçadores radioactivos como meio de análise têm actualmente grande aplicação em química analítica.

Uma das grandes vantagens do uso de traçadores radioactivos é a circunstância de eles poderem ser detectados com grande sensibilidade e, quando associados à análise de baixos níveis de radioactividade, a metodologia tornar-se extremamente sensível. Entende-se aqui por baixos níveis de radioactividade os casos em que existe efectivamente um número muito reduzido de radionuclidos ou os casos em que se utilizam núclidos radioactivos emissores α e β (puros), em particular as partículas β cuja energia máxima é baixa.

Nesta metodologia, tanto pode ser utilizado um radioisótopo do elemento investigado com um tempo de meia vida suficiente para ser usado como traçador (por ex.: metais pesados, ^{109}Cd , ^{203}Hg , etc.) como podem os compostos ser marcados com

radionuclidos. Durante a marcação radioquímica, os isótopos estáveis da substância marcada são trocados pelos isótopos radioactivo (ex.: o ^{14}C substitui o isótopo estável ^{12}C). Esta substituição pode ser feita por síntese química a partir de compostos básicos marcados (ex.: carbonato de bário marcado com ^{14}C), por biossíntese (cultivo em atmosfera com $^{14}\text{CO}_2$) ou por reacções de permuta catalítica (principalmente nas marcações com ^3H ou ^{125}I).

Se uma substância marcada com um radionuclido for usada numa experiência com traçadores, é importante que não contenha impurezas de outras substâncias ou de outros radionuclidos, seja estável nas condições de conservação (armazenamento) e nas condições experimentais (as ligações da molécula como um todo e o radionuclido incorporado devem ser estáveis) e possua uma actividade específica suficientemente alta para a detecção desse elemento. Conseguir esta última característica depende primeiramente do procedimento utilizado na preparação do composto marcado e, também, da localização requerida na marcação da molécula. Pode ser específica para uma determinada posição ou sem uma posição pré-definida.

O destino do mesmo traçador radioquímico numa determinada experiência pode ser bem diferente de acordo com a substância marcada e/ou as suas aplicações (Tykva *et al.*, 1987 a). Também a actividade específica do composto aplicado deve ser tido em conta porque normalmente é a quantidade total usada na experiência que decide o decurso do efeito investigado.

A marcação radioactiva deve ser sempre considerada tendo em conta os pontos de vista citados e de modo complexo. Assim, por exemplo, na marcação de um determinado composto com ^3H obtém-se níveis de actividade específica em média, três ordens de magnitude superior do que com ^{14}C . Por outro lado, as permutas catalisadas com ^3H são mais baratas quando comparadas com a marcação com ^{14}C , considerada normalmente mais difícil e consumidora de tempo nos diversos passos da síntese química. No entanto, contrastando com isto a marcação com ^{14}C possui uma maior estabilidade nas ligações

durante o armazenamento; para além de existir uma menor razão entre as massas de $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ do que em $^3\text{H}/^1\text{H}$ diminuindo as possíveis distorções na cinética das reacções analisadas pela técnica de radiotraçadores (efeito isotópico). Como consequência, as condições para medir baixos níveis de actividade são frequentemente determinadas pela limitação da acessibilidade da actividade específica do traçador radioquímico utilizado.

A possibilidade de medir baixos níveis de radioactividade alargou ainda mais o uso de traçadores radioquímicos., principalmente quando os próprios detectores estão dentro de monitores associados a computadores pessoais sofisticados e de aparelhos de avaliação, que são usados para criar imagens dos diferentes efeitos (Tykva *et al.*, 1988). Frequentemente, a determinação de baixos níveis de radioactividade está também associado a micrométodos de separação, por exemplo, a electroforese em gel (Tykva e Votruba, 1972), a cromatografia em camada fina (Tykva e Votruba, 1974), a cromatografia gasosa (Tykva e Šeda, 1975), ou à combinação da cromatografia e electroforese em duas-dimensões (Tykva e Franek, 1977). Todavia, a mediação de baixos níveis de actividade de radiotraçadores deve ser prudentemente interpretado tendo em conta o carácter experimental do sistema, por exemplo, no que respeita à variabilidade do material biológico. Muitas vezes a determinação de baixos valores de actividade do radioindicador por si só não é suficiente sem análises adicionais que caracterizam, de modo mais pormenorizado, a sua ligação química no composto activo.

Processos metodológicos úteis permitem uma multi-marcação, utilizando mais do que um traçador radioquímico simultaneamente no sistema experimental. Este facto torna possível:

- investigar na mesma experiência o destino de mais substâncias marcadas individualmente com diferentes traçadores radioquímicos (Tykva *et al.*, 1992).
- estudar a responsabilidade das partes individuais da molécula da substância investigada fazendo a marcação com diferentes traçadores radioquímicos (Tykva e Bennettová, 1993).

- seguir a dependência dos efeitos investigados com a quantidade usada da substância aplicada e/ou o modo de aplicação através do uso da substância apropriada marcada independentemente com mais traçadores. (Tykva, Sabol, 1995).

3.4. INTERACÇÃO DAS PARTÍCULAS COM A MATÉRIA

Todas as partículas carregadas perdem a energia quando atravessam qualquer material.

A partícula carregada rodeada pelo campo eléctrico do tipo coulombiano, vai interagir com o meio. Primeiramente com o seu campo eléctrico e a carga negativa das orbitais electrónicas dos átomos localizados no seu percurso.

A energia transferida representa uma diminuta fracção da energia cinética da partícula. É mais fácil pensar que a partícula carregada perde a sua energia gradualmente, como num processo de fricção conhecido por, aproximação de paragem contínua (do inglês continuous slowing-down approximation - CSDA). Os principais coeficientes de interacção, aplicados à interacção da partícula carregada com a matéria são: o poder de paragem (stopping power), a transferência de energia linear (linear energy transfer) e o percurso da partícula (path length ou range).

O poder de paragem linear (S_l) é definido por

$$S_l = \frac{dE}{dl} \quad (7)$$

onde, S_l vem em Jm^{-1} (unidades baseadas em $\text{eV-KeV}\mu\text{m}^{-1}$), dE representa a perda de energia experimentada pela partícula por unidade de percurso na distância, dl .

A perda de energia é devido a dois mecanismos principais:

- 1) perda por colisão (interacção) entre duas forças de Coulomb;
- 2) perda radiativa (durante a aceleração de uma partícula carregada, é emitida radiação de travagem). No caso de partículas de alta energia, pode ocorrer também reacções nucleares. Para partículas emitidas por radionuclidos a última pode ser ignorada.

O poder de paragem linear total ($S_{l,tot}$) pode ser expresso por

$$S_{l,tot} = \left(\frac{dE}{dl} \right)_{col} + \left(\frac{dE}{dl} \right)_{rad} \quad (8)$$

onde a primeira parcela corresponde ao poder de paragem linear devido à colisão e, a segunda corresponde ao poder de paragem linear devido à emissão radiativa.

Geralmente a energia gasta numa interacção por colisão resulta na ionização e excitação, enquanto que a energia gasta no processo radiativo origina a emissão de radiação de travagem também conhecido por “bremsstrahlung” dos fotões.

O quociente dE/dl é conhecido como *perda de energia específica* ou *velocidade de perda de energia*.

Na prática, em vez de poder de paragem linear, é mais utilizado o poder de paragem mássico. O poder de paragem mássico total (S_l/ρ) de um material com densidade ρ para partículas carregadas é dado por

$$\frac{S_l}{\rho} = \frac{1}{\rho} \frac{dE}{dl} \quad (9)$$

onde dE é a energia perdida pela partícula ao atravessar a distância dl no material difusor de densidade ρ e a sua unidade vem em $\text{Jm}^2\text{Kg}^{-1}$ ($\text{eVm}^2\text{Kg}^{-1}$).



À medida que a velocidade da partícula carregada é grande quando comparada com a velocidade dos electrões nas orbitais atómicas do material absorvente, o poder de paragem mássico devido à colisão pode ser expresso pela lei clássica de Bethe (10).

$$\frac{1}{\rho} \frac{dE}{dl} = \frac{4\pi e^4 z^2}{m_0 v^2} NB \quad (10)$$

onde

$$B = Z \left[\ln \frac{2m_0 v^2}{I} - \ln \left(1 - \frac{v^2}{c^2} \right) - \frac{v^2}{c^2} \right]$$

e - carga do electrão

z - número atómico da partícula

m_0 - massa do electrão em repouso

v - velocidade da partícula carregada considerada

c - velocidade da luz

N - densidade atómica do material difusor

Z - número atómico da substância

I - potencial médio de ionização e excitação do material difusor (referido a um átomo)

As partículas pesadas carregadas electricamente (α , prótons, deuterões) interagem essencialmente com electrões por difusão elástica e inelástica coulombiana, devido à grande diferença de massa entre a partícula carregada e o electrão, permanecendo o percurso da partícula carregada inalterado, que é mais ou menos rectilíneo. O poder de paragem por colisão, tende a aumentar significativamente com a diminuição da energia da partícula carregada. O aumento do poder de paragem que ocorre quando a energia da partícula (E) é praticamente nula é responsável pelo pico de Bragg observado próximo do fim do percurso da partícula.

No caso das *partículas leves carregadas electricamente* (β^- e β^+), o seu percurso não é linear, e há luz suficiente para gerar uma emissão de radiação de

travagem significativa, que depende do inverso do quadrado da massa para velocidades idênticas. A perda de energia radiativa para uma partícula β^- é grosseiramente proporcional à sua energia cinética. O poder de paragem mássico para o processo radiativo ($\text{MeVcm}^2\text{g}^{-1}$) para o e^- ou positrão é expresso por

$$\frac{1}{\rho} \frac{dE}{dl} = \sigma_0 \frac{N_A Z^2}{A} (E + m_0 c^2) B \quad (11)$$

onde

$\sigma_0 = 5,80 \times 10^{-28} \text{ cm}^2$ (por átomo)

N_A – constante de Avogadro ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)

A – massa molar (gmol^{-1})

E – energia cinética da partícula incidente (MeV)

B – varia lentamente em função de Z e E tendo valores de 16/3 para $E \ll 0,5 \text{ MeV}$, e grosseiramente de 6 para $E=1 \text{ MeV}$, 12 para $E=10 \text{ MeV}$ e 15 para $E=100 \text{ MeV}$.

Pode-se dizer que, para as partículas leves carregadas, o poder de paragem de colisão é proporcional à densidade electrónica ($\frac{N_A Z}{A}$) e o poder de paragem radiativa é proporcional a $\frac{N_A Z^2}{A}$ logo é válida a expressão:

$$\frac{\left(\frac{dE}{dl}\right)_{rad}}{\left(\frac{dE}{dl}\right)_{col}} = \frac{EZ}{m} \quad (12)$$

onde E é a energia cinética da partícula, Z o número atómico do material difusor e m varia entre 700 e 800 MeV.

Para medições radioactivas, o e^- de interesse, isto é, β^- ou e^- secundário resultante da interacção com radiação γ , têm energias menores que MeV (a perda pelo processo radiativo é sempre apenas uma fracção da perda por colisão). A

interacção da partícula carregada pode ser caracterizada pela transferência da energia linear ou poder de paragem linear restrito de colisão (L_{Δ}) definido por

$$L_{\Delta} = \left(\frac{dE}{dl} \right)_{\Delta} \quad (13)$$

onde dE representa a energia perdida ao atravessar a distância dl devido à colisão com um e^{-} em que a perda de energia é menor que Δ , Δ é a energia de paragem (cutoff energy) dada em eV e L_{Δ}^1 vem em Jm^{-1} ($KeV\mu m^{-1}$).

A capacidade de penetração das partículas carregadas (R) que é definido por

$$R = \int_0^{E_0} \frac{dE}{\left(\frac{dE}{dx} \right)} \quad (14)$$

onde E_0 é a energia cinética inicial da partícula no ponto de incidência de um dado material difusor e R tem como unidade o m (μm , mm). Desde que o poder de paragem linear, dE/dx , seja constante no percurso da partícula, então a equação anterior fica

$$R = \frac{E}{S_f} \quad (15)$$

onde R pode ser referido como o percurso da aproximação de paragem contínua ou percurso de CSDA. Isto é: a distância que determinada partícula com uma dada energia percorre, num determinado material, até à perda total da sua energia e permanência em repouso.

Se na expressão anterior usarmos o poder de paragem mássica o percurso passa a ser a espessura mássica ou extensão de densidade em vez de distância.

¹ L_{100} corresponde à transferência de energia linear para uma energia de paragem de 100 eV:

Apesar das partículas pesadas carregadas (α) possuírem um percurso relativamente específico, existe sempre uma certa flutuação do percurso (a flutuação do valor real de cada partícula que possui a mesma energia). No caso das partículas α , a flutuação pode chegar até atingir uma percentagem considerável do valor médio do percurso.

O percurso de projecção (R_p) é o valor máximo de penetração da partícula, na sua direcção inicial, no material difusor.

Para partículas pesadas, o percurso de CSDA e R_p é o mesmo, para os e^- este percurso pode diferir significativamente. O percurso de projecção do e^- é aproximadamente o do percurso de CSDA.

A sensibilidade da maioria das técnicas de detecção depende do número de pares iónicos produzidos pela partícula carregada num volume sensível de um determinado detector. Deste facto resulta um parâmetro importante, a energia média gasta por produção de par iónico (W_i)

$$W_i = \frac{E_0}{N} \quad (16)$$

onde E_0 é a energia cinética inicial da partícula carregada e N é o número médio de pares iónicos formados quando a energia é totalmente depositada no material de difusão.

Para os e^- , onde a elevada energia da partícula pode ser perdida por processos radiativos, os iões formados pelo “bremsstrahlung” são incluídos no valor de N (Tykva e Sabol, 1995).

3.5. CONDIÇÕES FUNDAMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE BAIXA RADIOACTIVIDADE

A medição e monitorização de radionuclidos com um nível de actividade muito baixa é uma tarefa especial onde é necessário em conta factores tais como: a radiação de fundo (ruído), a limitação da detecção e técnicas de instrumentação (ex.: eficiência, estabilidade, selectividade, ruído, interferências das condições da vizinhança, a natureza estatística do decaimento radioactivo, interferências de outros radionuclidos, que não o medido, e muitos outros efeitos).

A medição da radioactividade é baseada na medição do número de registos de decaimentos por unidade de tempo, isto é, a velocidade de contagem (cps). A contagem é feita através do detector onde as partículas emitidas pela fonte medida interage com o material que compõe o detector. Os detectores são divididos de acordo com o tipo de interacções que ocorrem, num volume efectivo apropriado.

Consoante o tipo de estudo que se faz, obtêm-se para a mesma fonte diferentes valores de radioactividade de baixo nível (ex.: a contagem cronológica e o seguimento de um traçador). Por isso, os equipamentos e os métodos utilizados podem diferir muito, nomeadamente na sensibilidade de detecção necessária (um valor que é plenamente suficiente para a determinação da baixa actividade do ^{14}C como radiotraçador, pode ser insuficiente em radiocronologia).

A condição de sucesso para a determinação de um radionuclido de baixa actividade é então a obtenção da correspondente sensibilidade de detecção. Para isso, é usada o “número de mérito” T (do inglês figure of merit) que é dado pela expressão

$$T = E^2 \times B^{-1} \quad (17)$$

onde E é a eficiência de detecção e B é o ruído de fundo (background).

Tendo em conta a dependência quadrática de T , o factor decisivo para medir uma actividade baixa é, primeiramente, a eficiência de detecção da radiação emitida pelo radionuclido. No entanto, também é importante diminuir o ruído de fundo. A eficiência de detecção depende do detector e da geometria do detector em relação à amostra. O ruído de fundo varia com: a localização, o equipamento e o regime de trabalho do laboratório.

Normalmente são realizadas medições relativas da actividade que representam a determinação relativamente à actividade de uma fonte padronizada do mesmo radionuclido. Neste caso, a eficiência de contagem é dada pela medição da velocidade de contagem da fonte normalizada com um decaimento conhecido. A determinação absoluta da actividade é usada excepcionalmente para baixos níveis de radioactividade. Pelo contrário, para amostras com condições de contagem idênticas, são apenas realizadas comparações das velocidades de contagem sem medição de qualquer actividade.

3.5.1. EFICIÊNCIA DE DETECÇÃO

A eficiência de detecção E , num dado intervalo de tempo, é dada em percentagem pela expressão

$$E = \frac{\text{n}^\circ \text{ de contagens realizadas}}{\text{n}^\circ \text{ de decaimentos da fonte}} \times 100\% \quad (18)$$

Para se ter uma elevada eficiência de detecção é indispensável assegurar a entrada do maior número possível de partículas emitidas no volume efectivo do detector. Isto pode ser conseguido:

- pela escolha da maior geometria de medição possível, isto é, a maior entrada de todas as partículas no volume de detecção efectivo;

- pela exclusão ou limitação das perdas da energia cinética das partículas detectadas entre a amostra e o volume eficiente do detector (por ex., durante a passagem para dentro do substrato do detector que não contribuem para a geração de resposta – normalmente conhecido por janela).

Para se conseguir uma alta eficiência na interacção da partícula detectada dentro do volume efectivo do detector é preciso:

- assegurar que as partículas geradas na interacção da partícula detectada com o meio eficiente do detector tomem parte na formação da resposta correspondente;
- assegurar, na parte activa do detector, a produção duma resposta que exceda o ruído de fundo equivalente no detector, isto é, garantir que as unidades em que é expresso o resultado da interacção primária da partícula detectada seja da mesma ordem de grandeza que a do ruído do detector;
- conectar o detector a um aparelho electrónico adequado, de modo a assegurar a transmissão da resposta gerada no detector, para seu posterior processamento e gravação.

A realização dos requisitos acima descritos dependerá:

- do radionuclido de baixa actividade que será determinado, especialmente do tipo e da energia das partículas emitidas;
- do tipo de amostras, por exemplo, estados agregados ou a presença de misturas;
- do que se pretende obter nos resultados da medição, por exemplo, a exactidão requerida na medição ou a resolução espectrométrica na análise de mistura de radionuclidos.

3.5.2. O RUÍDO DE FUNDO

As medições de níveis muito baixos de radioactividade são expressas em contagens por minuto (cpm) ou por hora (cph). Para a redução do ruído de fundo é necessário efectuar os seguintes passos:

- “screening” do detector de modo a suprimir a gravação de radiação de partículas cósmicas do meio que rodeia o detector;
- limitar as fontes de radiação na vizinhança do detector, por ex., no material de rastreio, no material de construção do laboratório, na atmosfera do laboratório, no solo geológico local e outras fontes radioactivas;
- selecção do material de construção do próprio detector tendo uma alta pureza de radionuclidos e montagem do detector de modo a prevenir qualquer contaminação do meio de montagem;
- selecção de um canal de contagem óptimo. A selecção do canal tem que ser feita de modo a ter-se um bom valor de T .

Uma fonte importante de ruído de fundo pode ser também a contaminação do detector pela amostra medida. Esta contaminação deve ser excluída na contagem de baixo nível de radioactividade.

3.5.3. DETECÇÃO E ESPECTROMETRIA

Para medir a actividade de um único radionuclido ou a actividade total de uma mistura de radionuclidos, é apenas necessário um detector apropriado e electrónica simples. Para a medição de vários núclidos simultaneamente, não só é necessário uma outra electrónica como, também, algumas vezes, é necessário um outro detector.

Os baixos níveis de misturas de emissores α ou γ , são frequentemente analisadas com detectores diferentes, com a resposta proporcional à energia cinética das partículas e da electrónica, incluindo o analisador de amplitude multicanal.

A resolução de emissores β é mais complicada porque o espectro destes emissores é contínuo e daí não ser possível separar em canais individuais. Existem três possibilidades de resolver o espectro: (1) através da absorção dos emissores de baixa energia; (2) medindo diferentes janelas de bandas de canais de um analisador de amplitude ou (3) por separação química antes da medição. A mais utilizada é a análise de amplitude.

A análise espectrométrica é mais complicado do que a detecção, pois usa apenas uma parte da actividade total da amostra nas contagens. Para ter uma melhor resolução, quando existem vários radionuclidos, são aplicados diversos tratamentos de amostra.

3.5.4. OUTROS FACTORES QUE DETERMINAM A MEDIÇÃO DE BAIXO NÍVEL DE RADIOACTIVIDADE

Os requisitos ou as alterações para as medições aumentam com a diminuição da actividade específica. Esta dependência resulta primeiramente do facto de o volume do detector aumentar com o aumento da quantidade de amostra medida, e conseqüentemente, o ruído. Os problemas causados por este factor resolvem-se fazendo uma preparação cuidadosa das amostras antes da medição. Deste modo a actividade específica da amostra aumenta, isto é, a concentração do radionuclido pretendido aumenta.

Os distúrbios que possam originar falsas contagens no “arranjo” da detecção devem também ser eliminados para se conseguir efectuar a medição de baixos níveis de radioactividade (Tykva, 1995).

3.6. CONTADORES DE CINTILAÇÃO LÍQUIDA

A contagem por cintilação líquida é um dos sistemas mais usados na medição de baixos níveis de actividade, juntamente com a espectrometria com germânio. É usado especialmente nas medições de amostras biológicas, porque tem uma alta eficiência de detecção para emissores beta de baixa energia.

3.6.1. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DOS DETECTORES DE CINTILAÇÃO

Os detectores de cintilação são baseados na emissão de fotões produzidos no cintilador após a sua interacção com a radiação detectada. É, a seguir à autoradiografia, a técnica mais antiga.

Se uma radiação ionizante transmite parte da sua energia total (ou toda a sua energia) ao cintilador durante a sua passagem através dele, ele emite fotões de cintilações. Esta emissão de fotões é uma propriedade intramolecular que tem a sua origem na estrutura electrónica das moléculas cintiladoras. Através da excitação dos seus electrões e o seu subsequente regresso ao estado electrónico fundamental, dá-se a emissão de fotões com características espectrais, isto é, luminescência.

As operações num detector de cintilação podem ser divididas em quatro etapas:

- (1) – Absorção da radiação incidente pelo cintilador.
- (2) – Processo de cintilação, isto é, transferência da energia perdida pelas partículas detectadas no cintilador para os fótons emitidos pelo cintilador.
- (3) – Transferência dos fótons emitidos pelo cintilador para o cátodo da radiação fotosensitiva (fotomultiplicador ou fotodiodo).
- (4) – Absorção dos fótons de cintilação pelo cátodo e emissão de fotoelectrões.

Quando são usados fotomultiplicadores a etapa (4) pode ser dividida em (4a) colheita dos fotoelectrões no primeiro dínodo e (4b) processo de multiplicação no fotomultiplicador.

A resposta à luz gerada pelo cintilador durante a interacção é, assim, registada pelo fotomultiplicador de saída, cuja resposta em voltagem é conduzida através de um amplificador para um analisador de amplitude multicanal.

A linearidade da transferência entre a energia perdida pelas partículas registadas no cintilador e a amplitude da resposta (voltagem) na saída do fotomultiplicador é posta em risco pela absorção dos fótons pelo próprio cintilador, como consequência das suas reflexões nas interfaces e pela dispersão. Para medições de actividades baixas estes factores são muito importantes.

Para a mera detecção não é necessário a linearidade, mas a auto-absorção pode ser tão elevada que diminui significativamente a eficiência e impede a medição de actividades baixas. Para além dos cintiladores não-activados orgânicos e inorgânicos (ex.: antraceno ou iodeto de sódio) cujo uso é limitado a pequenas

espessuras apenas, esta auto-absorção manifesta-se na cintilação líquida, onde é chamada “quenching” (desaparecimento).

3.6.2. A INFLUÊNCIA DOS PROCESSOS DA CONTAGEM POR CINTILAÇÃO LÍQUIDA NA MEDIÇÃO DE BAIXOS NÍVEIS DE RADIOACTIVIDADE

O meio de cintilação mais simples deve conter pelo menos um solvente orgânico primário e o componente de cintilação. O papel do solvente orgânico é primeiramente o de dissolver o componente de cintilação, aceitar a energia das partículas detectadas e transmiti-la ao componente de cintilação. Tendo em conta a natureza das amostras medidas, existem dois tipos de solventes:

- o dioxano principalmente para soluções polares (aquosas);
- o tolueno principalmente para amostras não polares.

Para se conseguir uma melhor solubilidade da amostra na solução de cintilação, algumas vezes é adicionado um segundo solvente, como o metanol, etanol ou dimetoximetano. Mas são mais utilizados misturas comerciais conhecidas por “cocktail de cintilação”, desenvolvidos para alguns tipos de amostras biológicas ou sais inorgânicos, que são insolúveis em solventes orgânicos vulgarmente usados.

Uma vez que o ponto de solidificação de alguns solventes primários (dioxano 285 K, *p*-xileno 286 K) estão na gama de temperatura em que as amostras são medidas no espectrómetro de cintilação líquida, muitas vezes é adicionado um anti-congelante, mais frequentemente o etilenoglicol.

Nas moléculas do solvente primário existem electrões π (semelhantes aos componentes de cintilação), que formam as ligações interatómicas externas, e os electrões σ , que formam as ligações no átomo. Os electrões π são os que se

encontram menos fortemente ligados nas ligações, sendo mais móveis, são responsáveis pelas propriedades de fluorescência destas moléculas.

A energia perdida pelas partículas ionizantes no solvente, uma parte produz ionização e excitação das moléculas, que corresponde à proporção relativa de electrões π entre todos os electrões das moléculas do solvente (por ex. para o benzeno esta parte é aproximadamente 14%). A parte residual da energia é consumida para a excitação e ionização dos electrões σ e é dispersa por processos não radiativos.

As moléculas com electrões π excitados são formadas directamente por excitação ou, mais frequentemente, por recombinação de moléculas ionizadas com electrões lentos.

Os electrões π dos níveis mais elevados são rapidamente transformados para o primeiro estado singlete S_{1X} , por processos de conversão não radiativos (100 fs). O número de moléculas do solvente primário que estão no estado excitado S_{1X} após a absorção da partícula ionizante com energia cinética W será igual a

$$A = sW \quad (19)$$

onde s representa o factor de conversão do solvente primário e A a actividade.

As moléculas do solvente primário não têm as propriedades do cintilador. Elas têm um rendimento quântico pequeno e existe uma pequena possibilidade de se libertarem da energia em excesso ($S_{1X}-S_{0X}$) pela emissão de fotões, mesmo que o tempo de vida no estado excitado seja relativamente longo (30 ns). Antes que a irradiação se dê, o excesso de energia é transmitida entre as moléculas de solvente primário por difusão térmica (movimento browniano molecular do solvente e o componente de cintilação) e migração de excitação (formação rápida gradual e extinção de dímeros-excímeros excitados entre moléculas adjacentes excitada e não

excitada) até chegar à molécula do solvente que se encontra ao lado da molécula do componente de cintilação (Y).

A ressonância dipolo-dipolo provoca a transferência de energia da molécula X para a molécula Y. A diferença de energia $S_{1X}-S_{1Y}$ é convertida em calor. O número moléculas do componente de cintilação primário (B) que estão no estado excitado π singleto S_{1Y} é dado por

$$B = fA = fsW \quad (20)$$

onde f é a eficiência quântica da energia transferida entre as moléculas do solvente primário e as moléculas do componente de cintilação (depende do tipo de solvente usado e da concentração do componente de cintilação primário).

Durante a persistência da fluorescência ($\tau_Y \approx 1,5$ ns) as moléculas do componente de cintilação primário regressarão ao estado fundamental S_{0Y} , após a emissão de P fótons.

$$P = aB = asfW \quad (21)$$

a – eficiência quântica de fluorescência do componente de cintilação primário que é praticamente independente das propriedades do solvente.

O processo de cintilação numa solução de cintilação binária pode ser representado pela figura 3.1.

Nos sistemas terciários é necessário também considerar a transferência de energia entre as moléculas do componente de cintilação primário e secundário (caracterizado pela eficiência quântica de transferência de energia entre as suas moléculas) e a emissão de fótons de fluorescência pelo componente de cintilação secundário (caracterizada pela eficiência quântica de fluorescência a').

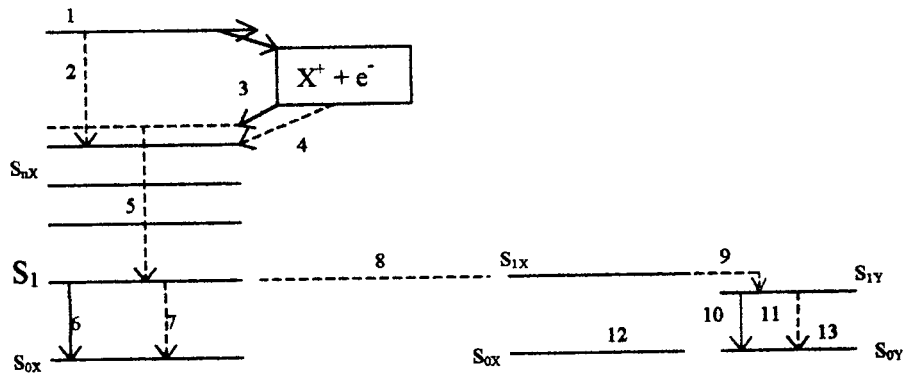


Figura 3.1 Fenômenos que ocorrem no processo de cintilação binária. **Legenda:**

- | | |
|--|---|
| 1- partículas ionizantes | 2- excitação do solvente |
| 3- ionização do solvente | 4- recombinação |
| 5- conversão interna | 6- fluorescência do solvente |
| 7- "quenching" interno do solvente | 8- migração da energia de excitação |
| 9- excitação das moléculas do componente de cintilação | 10- fluorescência dos componentes de cintilação |
| 11- "quenching" interno do componente de cintilação | 12- moléculas de solvente |
| 13- moléculas do componente de cintilação | |
- (Tykva e Sabol, 1995)

A solução de cintilação líquida é caracterizado como um todo, principalmente, pelo espectro de cintilação, pela eficiência de cintilação absoluta (S) e pela resposta de cintilação (L).

Nos sistemas binários, é usado o espectro de cintilação do componente de cintilação (ou, nos sistemas terciários o espectro de emissão do componente de cintilação secundário).

A eficiência de cintilação absoluta S , é definida como a fração de toda a energia de partículas incidentes que é convertida em energia dos fótons gerados. Num sistema binário, aplica-se a S a seguinte relação

$$S = s f f' a' E_j \quad (22)$$

E_j – Energia média dos fótons emitidos pelo componente de cintilação secundário

A resposta de cintilação L é a energia irradiada pelos fotões fosforescentes após a absorção de partículas ionizantes com energia W no cintilador.

A principal vantagem das medições do líquido de cintilação são as medições com geometria 4π e a exclusão de perdas da energia cinética das partículas por absorção na própria amostra ou no percurso entre a amostra e o meio de detecção - “quenching”. No entanto, tem aspectos negativos, porque diminui a eficiência da transferência da energia de excitação e também, da eficiência da transferência de fotões fosforescentes pelo meio de cintilação.

3.6.2.1. “Quenching”

O “quenching” surge como um decréscimo na velocidade de contagem medidos em amostras “quenched” quando comparadas com as amostras não “quenched”. O “quenching” tem um papel muito importante nas medições de radioactividade de baixo nível, que deve ser sempre considerado. São conhecidos os seguintes tipos de “quenching”:

- “quenching” de ionização;
- “quenching” por diluição e concentração,
- “quenching” químico,
- “quenching” por coloração,
- “quenching” de fases,
- “quenching” de fotões.

Os primeiros cinco tipos aparecem nas soluções de cintilação. O “quenching” de fotões inclui acontecimentos que diminuem o número de fotões no percurso entre a solução de cintilação e o fotocátodo do fotomultiplicador.

3.6.2.1.1. “Quenching” de ionização

No “quenching” de ionização e para electrões com energia cinética de $W > 150$ KeV aplica-se uma relação linear entre a resposta de cintilação L e a energia do electrão.

$$L = SW \quad (6.5)$$

Mas, para energias mais baixas, esta relação deixa de ser linear. Este facto é explicado pelo “quenching” de ionização, isto é, pelas interacções das moléculas excitadas e iões do solvente primário com outras moléculas excitadas e ionizadas, levando a um decréscimo do número de moléculas excitadas do solvente primário. O “quenching” de ionização depende da densidade de moléculas ionizadas e excitadas do solvente, que é expresso pela relação

$$\frac{dL}{dr} = S \frac{\frac{dW}{dr}}{1 + kB \frac{dW}{dr}} \quad (23)$$

S - eficiência de cintilação absoluta dos electrões com maior energia do solvente

$B \frac{dW}{dr}$ - densidade de moléculas ionizadas e excitadas

k - parâmetro de “quenching”

O “quenching” de ionização é principalmente importante para partículas com grau de poder de paragem linear (α , protões ou electrões de baixa energia). Para electrões com 5 KeV de energia a eficiência de cintilação pode ser diminuída cerca de 40%.

3.6.2.1.2. “Quenching” por diluição ou concentração

O “quenching” por diluição ou concentração aparece quando a solução de cintilação é diluída com a amostra ou o solvente secundário e uma parte da energia das partículas ionizantes pode ser adsorvida pelo diluente, que não contribui para a formação de cintilação.

A diluição diminui a migração de cintilação no solvente primário e a probabilidade de transferência da energia de excitação da molécula do solvente primário para a molécula do componente de cintilação primário.

Um aumento da concentração do componente de cintilação primário na solução de cintilação aumenta a eficiência de cintilação, no início, até um valor máximo. Os aumentos de concentração seguintes não provocam outras alterações na eficiência de cintilação, no caso de alguns componentes de cintilação primários, por exemplo, para o 2-(4'-*t*-butilfenil)-5-(4'-bifenil)-1,3,4-oxadiazol (butil-PBD), mas noutros casos, por exemplo, o 2,5-difeniloxazol (PPO), dá-se uma diminuição. Este fenómeno é conhecido como “auto-quenching” ou “quenching” por concentração. Maiores quantidades de componente de cintilação secundário também podem causar o “quenching” por concentração.

3.6.2.1.3. “Quenching” químico

O “quenching” químico resulta da absorção do excesso de energia das moléculas do solvente primário por parte das amostras orgânicas, competindo assim com as moléculas do cintilador primário. É caracterizado pelo factor de “quenching” relativo, g .

Sabendo que

absorção de energia:



Velocidade = 1

emissão de um fóton:



Velocidade = $k_1[M^*]$

“quenching”:



Velocidade = $k_2 [M^*][Q]$

onde M é a molécula do componente de cintilação primário no estado fundamental, M* no estado excitado, Q molécula de “quencher”, [M*],[Q] concentrações moleculares, k_1 , k_2 velocidades relativas das reacções. O número de fluorescência possível é

$$S_0 = k_1[M^*] + k_2[M^*][Q] \quad (27)$$

e o número de fluorescência da solução “quenched” será:

$$S = k_1[M^*] \quad (28)$$

Então o factor “quenching” relativo será

$$g = \frac{S}{S_0} = \frac{1}{1 + \frac{k_2}{k_1}[Q]} \quad (29)$$

g é independente da energia da partícula de ionização. Por exemplo, o O₂ é um “quencher” forte. Para alguns materiais orgânicos, é útil oxidar a amostra para eliminar este efeito e utilizar o produto de oxidação obtido (¹⁴CO₂ ou ³H₂O) para o meio de cintilação.

3.6.2.1.4. “Quenching” por coloração

O “quenching” por coloração diminui o número de fótons de cintilação formados durante a sua passagem através do material de absorção na mistura solução de cintilação-amostra. O efeito do “quenching” pode ser avaliado com base na lei de Beer.

$$I = I_0 e^{-alc} \quad (30)$$

- I_0 – número de fótons gerados pelo fenómeno de cintilação
- I – número de fótons após a passagem pelo cintilador
- a – coeficiente de absorção
- l – distância percorrida pelos fótons
- c – concentração do “quencher” de cor

Em comparação com o “quencher” químico, o “quencher” de cor depende do sítio onde são formados os fótons de cintilação. Como consequência, o pulso de espectro de duas amostras com igual grau de “quenching” é mais alto e estreito no “quenching” químico do que no espectro do “quenching” por coloração. Se possível, é desejável eliminar com reprodutibilidade o “quenching” por coloração, por exemplo, por descoloração da amostra com peróxido de hidrogénio.

3.6.2.1.5. “Quenching” de fase

O “quenching” de fase é utilizado para indicar que a mistura amostra-componente de cintilação-solvente não é homogéneo e que parte da energia das partículas ionizantes não é transmitida à solução de cintilação. Nos frascos de cintilação com uma distribuição homogénea de radionuclídeos, uma parte dos radionuclídeos está sempre próxima da parede do contentor. Daí que uma percentagem das partículas emitidas por elas caíam na parede antes de perder a sua energia total na solução de cintilação.

3.6.2.1.6. “Quenching” de fóton

O “quenching” de fóton é a perda de fótons de cintilação entre a solução de cintilação e o fotocátodo do fotomultiplicador. O fenómeno é afectado pela diferença da espessura da parede e da transmitância da luz através das paredes, pela formação de destruições ópticas, pelas impurezas dos frascos ou da condensação na sua superfície, pelas mudanças no volume de cintilação relativamente à sensibilidade espectral do fotocátodo completo, pelas mudanças da junção óptica, pela idade e pelas alterações nos índices de refração.

3.6.2.1.7. Fenómenos que interferem na contagem de cintilação

Pode ocorrer fosforescência (de ms a alguns dias até emissão de fóton) com algumas moléculas do meio de cintilação (principalmente os baseados em dioxano) ou tipos de contentores de medição através da interacção com luz solar ou outro tipo de luz. Para diminuir a fosforescência, evita-se o acesso de luz para a amostra, antes da medição.

A quimioluminescência é a emissão de fótons levada a cabo por reacções químicas que ocorrem na mistura amostra-solução de cintilação. É frequente observar, por exemplo, soluções com base no solvente ou quando o peróxido de hidrogénio é usado para suprimir o “quenching” devido à cor. A duração da quimioluminescência depende da velocidade da reacção química e do tempo de vida das moléculas no estado excitado. A bioluminescência é um caso especial da quimioluminescência. O fóton é provocado por bactéria, fungos ou reacções exotérmicas catalisadas por proteínas, enzimas. Na espectrometria moderna estes fenómenos são automaticamente controláveis.

Alguns tipos de contentores de medição (por ex. os de plástico) podem estar carregados com electricidade estática durante o transporte para a medição. As faíscas de luz que resultam das descargas eléctricas podem aumentar o ruído de fundo.

Os efeitos que formam um único fotão (fosforescência, quimioluminescência, bioluminescência, efeitos electrostáticos) são chamados acontecimentos de um-fotão. Interessa eliminar tais efeitos na contagem por cintilação líquida de níveis baixos de radioactividade.

3.6.3. MEDIÇÕES POR CONTADORES DE CINTILAÇÃO LÍQUIDA

O instrumento básico para a contagem de cintilação líquida é constituído pelos blocos indicados na figura 3.2.

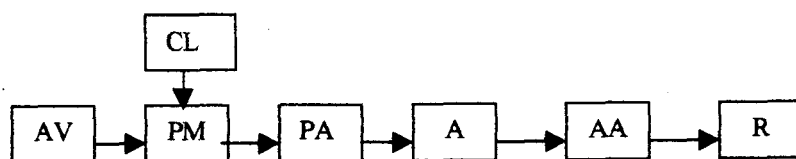


Figura 3.2 Esquema representativo dos blocos constituintes dos contadores de cintilação líquida. Legenda: AV- fonte de alta voltagem, CL- cintilador líquido PM- fotomultiplicador, PA- pré-amplificador, A- amplificador, AA- analisador de amplitude, R- aparelho de gravação.

Os fotões de cintilação formados na solução de cintilação líquida são “apanhados” pelo fotomultiplicador e convertidos em impulsos de corrente, o qual produz um impulso de tensão à entrada do pré-amplificador. A resposta de voltagem é amplificada e avaliada num analisador multicanal.

O número de fotões da solução de cintilação que vão para o fotocátodo depende do “quenching” óptico. O número de fotoelectrões emitido do fotocátodo depende da sensibilidade espectral do fotomultiplicador. Uma vez que o ruído de

fundo do fotomultiplicador pode ser reduzido por arrefecimento, a maioria dos espectrómetros produzidos no passado possuíam um sistema de arrefecimento. Usando-se um fotomultiplicador de baixo ruído, o arrefecimento deixa de ser crucial, mas é importante manter a temperatura constante para a estabilidade do aparelho durante as medições.

O uso de dois fotomultiplicadores em coincidência, reduz consideravelmente o ruído do fotomultiplicador e de acontecimentos de um-fotão.

Para a análise usuais é pré-determinado um intervalo de energia, chamado de, janela, para um radionuclido. A discriminação mais baixa (nível de energia mais baixo) corresponde, quer ao nível onde se dá o “cut off” dos impulsos de ruído, quer para mais do que um emissor de partículas β ao nível que exclui os impulsos provocados por radionuclidos de baixa energia. A largura do intervalo, isto é, o nível de discriminação superior é determinado pelo intervalo de energia das partículas detectadas. Algumas vezes é feito também uma análise multicanal, especialmente para um espectro α simples.

A eficiência de detecção, que se altera de acordo com os “quenching” das amostras individuais, pode ser determinada de vários modos, sendo os principais:

- método do padrão-interno
- método de razão de dois canais
- método do padrão-externo
- método do deslocamento da amplitude média
- método do número-H

3.6.3.1. Método do Padrão-interno (IS)

É o processo de determinação de eficiência mais antigo. Primeiro, mede-se a amostra depois de adicionar uma quantidade de padrão radioactivo com actividade conhecida (os padrões internos mais comuns são: ^3H e ^{14}C em tolueno ou em *n*-hexano), mede-se novamente a actividade da mistura. Durante as medições deve manter-se as mesmas condições antes e depois da adição do padrão, para não se alterar as condições, por exemplo, por “quenching”.

A eficiência de detecção é determinada com base no aumento de actividade observada devido à presença do padrão-interno e da sua actividade. A grande desvantagem deste método são os erros cometidos durante a pipetagem do padrão e a determinação do volume do padrão-interno. Pode ainda ser necessário um tempo maior para a preparação e medição de amostras, e as medições após a adição do padrão-interno pode não ser possível. É o único método em que a eficiência de detecção não é determinada por uma curva de calibração, mas directamente por computação.

A actividade é calculada pela expressão (31).

$$A_u = A_s \frac{R_u}{R_s} = \frac{A_s R_u}{R_t - R_u} \quad (31)$$

A_u – actividade absoluta da amostra
 A_s – velocidade de decaimento do padrão
 R_u – actividade da amostra
 R_s – actividade do padrão
 $R_t = R_u + R_s$

3.6.3.2. Método da razão de dois canais (SRC)

Neste método são pré-estabelecidas duas janelas de medições no aparelho, que contém determinada parte do espectro originado pela partícula β medida.

A razão da velocidade de contagem nestes dois canais depende do grau de “quenching” (o espectro da partícula é deslocado para energias mais baixas com crescentes quantidades de agente “quenching”). Com base nisso é construído uma curva de calibração com várias amostras de referência, que têm a mesma actividade mas diferentes graus de “quenching” que é fornecido pelo fornecedor do aparelho. Este método é apropriado só para a medição de um radionuclido.

3.6.3.3. Método do padrão-externo

Neste método após a medição da radioactividade da amostra, coloca-se um emissor γ (mais frequentemente ^{226}Ra , ^{137}Cs ou ^{133}Ba), guardado num contentor suficientemente escudado, próximo do contentor de medição com a amostra. Os electrões Compton originados pela irradiação da amostra com o padrão-externo aumentam a velocidade de contagem. Com base nisto, a eficiência de detecção é determinada a partir de uma curva de calibração, determinada de modo idêntico ao método anterior.

A desvantagem do método reside no facto de o número de contagens da fonte externa também depender do volume e do método para a determinação da razão entre o “quenching” químico e o “quenching” de coloração. Não é apropriado para amostras heterogéneas mas é muito bom para amostras com mais do que um radionuclido.

3.6.3.4. Método do deslocamento da amplitude média dos impulsos (ESP)

É um método que tem em conta o deslocamento da amplitude dos impulsos resultantes de uma fonte externa do radionuclido ^{133}Ba . A eficiência de detecção é dado pela expressão:

$$ESP = \frac{Pr - P}{Ps - P} \quad (32)$$

onde: Pr – amplitude média dos impulsos do padrão
 Ps – amplitude média dos impulsos da amostra
 P – amplitude média dos impulsos com “quenching” infinito

Como já foi indicado nos processos anteriores, faz-se uma curva de calibração que permite medir a contagem das amostras com “quenching”. É um bom método para amostras com “quenchers” fortes.

3.6.3.5. Método do número-H (H)

Usa o deslocamento do ponto de inflexão do limite de Compton do radionuclido padrão externo ^{137}Cs . O H é definido por

$$H = P_0 - P_a \quad (33)$$

P_0 – amplitude do impulso no ponto de inflexão para o padrão
 P_a – amplitude do impulso no ponto de inflexão para a amostra

Comparando os dois últimos métodos o número-H é menos preciso porque usa partes localizadas do espectro do padrão externo, enquanto que o ESP usa todo o espectro. A relação que existe entre ESP e H é dada por:

$$H = 226,5 \log ESP - 5,1 \quad (34)$$

3.6.4. Estatística e Erros das Medidas de Taxa de Contagem

O decaimento radioactivo é um processo estocástico. Os átomos (núcleos) sofrem, desintegrações que ocorrem com uma certa probabilidade que depende da constante de decaimento do radionuclido considerado.

No $t=0$ existem N_0 átomos radioactivos, devido ao decaimento reduzir-se-á a $N(t)$ no tempo t pela equação:

$$N(t) = N_0 e^{-\lambda t} \quad (35)$$

onde $N(t)$ e N_0 são os valores expectáveis (ou verdadeiros) dos parâmetros relevantes.

Os átomos que decaíram são $N_0 - N(t)$. A probabilidade dos átomos que não decaíram após o tempo t é dada por (36).

$$\frac{N(t)}{N_0} = e^{-\lambda t} \quad (36)$$

A probabilidade de decaimento de um átomo ao longo do tempo t é:

$$p = \frac{N_0 - N(t)}{N_0} = 1 - e^{-\lambda t} \quad (37)$$

desde que o tempo de meia vida do radionuclido seja suficientemente longo (muito maior do que o intervalo observado t), o número de átomos decaídos $M = N_0 - N(t)$ será muito pequeno em comparação com o número N_0 . Nestas condições, a probabilidade $P(M)$ de observar M átomos (exactamente) a decair no tempo t pode ser expressa pela distribuição binomial (38).

$$P(M) = \frac{N_0!}{M!(N_0 - M)!} p^M (1-p)^{N_0-M} \quad (38)$$

Como N_0 é normalmente um número grande ($\cong 10^{15}$ ou mais), a distribuição binomial, nas aplicações de taxas de contagens nucleares, é aproximada à distribuição de Poisson ou a distribuição normal.

A distribuição de Poisson é descrita pela expressão

$$P(M) = \frac{(pN_0)^M}{M!} e^{-pN_0} \quad (39)$$

$P(M)$ – probabilidade de observar (medir)
 M – decaimentos no intervalo t
 pN_0 – decaimento esperado no intervalo t

ou de outro modo

$$P(M) = \frac{(nt)^M}{M!} e^{-nt} \quad (40)$$

n – valor médio esperado por unidade de tempo

A distribuição normal ou Gaussiana é usada para aproximar a distribuição de Poisson sob a condição que $p \ll 1$.

$$P(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma}} \exp\left[-\frac{(x-\bar{x})^2}{2\sigma^2}\right] \quad (41)$$

x - variável contínua (na distribuição de Poisson é inteiro)
 \bar{x} - valor médio (verdadeiro)
 σ - desvio padrão relacionado com a distribuição de Poisson por
 $\sigma^2 = pN_0 = nt$

A probabilidade de obter o valor x entre o intervalo (x_1, x_2) é

$$P(x_1, x_2) = \int_{x_1}^{x_2} P(x) dx \quad (42)$$

em intervalos infinitos ficamos com a condição

$$P(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} P(x) dx = 1 \quad (43)$$

o valor médio, \bar{x} , a variância, $V(x)$, o desvio padrão, σ , e a largura da curva a meia altura, $FWHM$ (full width at half maximum), são dados pelas seguintes expressões (Tykva, Sobol, 1995)

$$\bar{x} = \int_{-\infty}^{+\infty} xP(x) dx \quad (44)$$

$$V(x) = \int (x - \bar{x})^2 P(x) dx = \sigma^2 \quad (45)$$

$$\sigma = \sqrt{V(x)} \quad (46)$$

$$FWHM = (2\sqrt{2\ln 2})\sigma = 2,35\sigma \quad (47)$$

Os resultados das taxas de contagem exprimem-se, geralmente, em termos de impulsos por unidade de tempo e os seu valores são proporcionais às actividades absolutas das fontes radioactivas correspondentes.

Assim, se o resultado duma medição efectuada durante o intervalo de tempo t for de N impulsos, o número de impulsos por unidade de tempo, A , e o respectivo desvio padrão, $s(A)$, serão dados por:

$$A = \frac{N}{t} \quad (48)$$

$$s(A) = \frac{\sqrt{N}}{t} = \sqrt{\frac{A}{t}} \quad (49)$$

Esse desvio será tanto menor quanto maior for o tempo de observação (Cabral, 1973).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. 1. ISOLAMENTO DE ESTIRPES MICROBIANAS DO SOLO

4.1.1. MATERIAL

Aparelhos

Autoclave

Agitador

Centrífuga de bancada (Eppendorf Centrifuge 5415C)

Balança técnica e balança analítica

Medidor de pH

Câmara de fluxo laminar (Downflow, Clean Air; Holanda)

Frigorífico

Estufa a 28 e 37 °C

Material de laboratório

20 caixas de Petri (15 ml)

5 balões de 250 ml com respectivas rolhas

2 balões de 100 ml

4 microtubos de 1,5 ml

Bico de Bunsen

Varetas de vidro dobradas em l

Copo de 100 ml

Micropipetas de 20 e 100 µl com as respectivas pontas

Meios de cultura e reagentes

Água estéril

Etanol

Meio Completo (CA)

extracto de levedura ¹ (BBI, Becton Dickinson)	5 g
peptona	3 g
caseína hidrolisada	5 g
glucose	10 g
agar técnico (Oxoid, agar nº 3)	20 g
água destilada	1 l

Esterilizar o meio a 1 atm (120 °C) durante 20 min.

Meio de Extracto de Malte (MA)

agar de extracto de malte (Imuna)	53 g
agar técnico	5 g
água destilada	1 l

Agar de extracto de malte (Imuna)

malte cervejeiro dissecado	35 g
peptona para bacteriologia	5 g
agar em pó	13 g

Na preparação deste meio é adicionado 2 ml de ácido láctico a 10 % que confere um pH final de 3,5. No entanto, não foi adicionado o mesmo na feitura do meio.

Esterilizar o meio a 1 atm (120 °C) durante 15 min.

¹ extracto de células de leveduras autolisadas

Meio Nutritivo (NA)

agar nutritivo (Imuna)	40 g
agar técnico	30 g
água destilada	1 l

Agar nutritivo (Imuna)

extracto de carne	10 g
peptona para bacteriologia	10 g
agar em pó	15 g
cloreto de sódio	5 g
o pH final é de $7,2 \pm 0,2$	

Esterilizar o meio a 1 atm (115 °C) durante 20 min.

4.1.2. PROCEDIMENTO

Nota: o material a utilizar deve estar sempre esterilizado e todo o trabalho deve ser realizado em ambiente estéril.

1. Para cada amostra de solo a estudar, preparar 3 placas de Petri com meio completo (CA), 1 placa com meio de extracto de malte (MA) e 1 placa com meio nutritivo (NA).
2. Num balão de 250 ml colocar 5 g de solo e 45 ml de água esterilizada. Preparar duplicados para cada solo.
3. Incubar 1 hora a 28 °C, com agitação vigorosa.
4. Retirar de cada balões uma alíquota de 1,5 ml para microtubos estéreis. Centrifugar a 2000 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos, a temperatura ambiente.
5. Utilizar o sobrenadante para inocular os três meios preparados. Inocular com 20 µl a placa de Petri que contém o meio MA e o meio NA. Para as placas com CA preparar 3 diluições diferentes. Inocular a placa identificada com CA a, CA b e CA c com 10, 20 e 40 µl de sobrenadante, respectivamente. Na placa de Petri identificada com CA, antes de colocar os 10 µl de sobrenadante, adicionar 10 µl de água esterilizada.

6. Inocular colocando o volume de sobrenadante indicado para cada meio e espalhar com a vareta de vidro dobrada em l, na placa até se encontrar completamente distribuído.
7. Medir o valor de pH de cada balão com o solo a estudar.
8. Incubar durante 48 horas as caixas de Petri CA e NA a 37 °C e a caixa MA a 28 °C.
9. Observar e contar as unidades formadoras de colónias (UFC) que cresceram em cada meio.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES MICROBIANAS ISOLADAS

4.2.1. MATERIAL

Aparelhos

Microscópio

Frigorífico

Material de laboratório

Copo de precipitação de 50 ml

Bico de Bunsen

Varetas de vidro

Lâminas e lamelas para observação ao microscópio

Ansa

Pinça

Reagentes e Soluções

Água estéril

Mistura etanol-acetona

Solução de lugol

Acetona

Solução de violeta de cristal

Solução de safranina

Óleo de imersão para microscópio

4.2.2. PROCEDIMENTO

1. Contar o número de colónias formadas em cada placa Petri com meio CA para calcular a biomassa total.
2. Observar as colónias de cada placa, tendo em conta a cor, tamanho e as características da superfície de cada colónia.
3. Fazer preparações frescas para observar ao microscópio, colocando uma gota de água estéril numa lâmina de vidro e com a ansa, em condições de assépsia, retirar uma pequena parte de colónias e misturar com a água. Colocar a lamela e observar ao microscópio.
4. Na observação ao microscópio ter em conta o tamanho e forma das células, para as bactérias e as leveduras. Para os bolores, ter atenção à forma dos esporos e observar se existe alguma estrutura especial.
5. Para as bactérias realizar o teste gram:
 - 5.1. Colocar uma pequena gota de água numa lâmina.
 - 5.2. Recolher uma pequena parte da colónia de bactéria e espalhar na lâmina com a água.
 - 5.3. Deixar o esfregaço secar. Se necessário, passar muito levemente sobre a chama do bico de Bunsen.
 - 5.4. Quando não houver água, passar a superfície da lâmina que contém as células secas sobre a chama, para fixá-las.
 - 5.5. Colocar algumas gotas da solução de violeta de cristal sobre o esfregaço e deixar actuar por 20-30 segundos.
 - 5.6. Colocar seguidamente a solução de lugol, sem lavar previamente. Deixar actuar por 30 segundos.
 - 5.7. Lavar muito rapidamente com acetona.
 - 5.8. Colocar algumas gotas de solução de safranina e deixar reagir durante 30 segundos.

5.9. Finalmente lavar a preparação com água e deixar secar antes de colocar o óleo de imersão directamente sobre esta.

5.10. Observar a cor da bactéria no microscópio. Se for violeta ou azul, trata-se de uma bactéria Gram+. Se for vermelha, é uma bactéria Gram-.

4.3. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO PESTICIDA W328

4.3.1. MATERIAL

Aparelhos

Autoclave

Agitador

Vortex

Balança técnica e balança analítica

Câmara de fluxo laminar (Downflow, Clean Air; Holanda)

Frigorífico

Estufa a 28 e 37 °C

Centrífuga com rotor de cabeça oscilante

Material de laboratório

3 caixas de Petri (15 ml)

4 caixas de Petri pequenas (5 ml)

4 balões de 250 ml com respectivas rolhas

2 balões de 100 ml

1 microtubo de 1,5 ml

Bico de Bunsen

Palitos estéreis

Pinça

Micropipetas de 20, 200 e 1000 µl com as respectivas pontas

Meios de cultura e Reagentes

Água estéril

Etanol

Pesticida W328 não marcado

Solução Etanólica de pesticida W328

Para um microtubo pesar 0,0885 g de pesticida e dissolver em 150 µl de etanol.

Meio Mínimo para Bactérias (MMbac)

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,25 g
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	2,05 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,025g
Ca(NO ₃) ₂	0,000125 g *
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0000625 g *
H ₂ O	250 ml
Agar técnico	4,0 g

* Preparar soluções concentradas e diluir para obter estas quantidades

Esterilizar a 1 atm (120 °C) durante 20 min.

Meio Mínimo para Bolores (MMbol)

“Yeast Nitrogen Base Without Aminoacids” (Difco)	1,765 g
Água	250 ml
Agar técnico	5,5 g

Esterilizar a 1 atm (120 °C) durante 20 min.

Meio completo (CA)

Preparar como foi descrito no ponto 4.1.

4.3.2. PROCEDIMENTO

Nota: Trabalhar sempre em ambiente estéril.

1. Preparar 100 ml de meio MMbac, de meio MMbol e de CA.
2. Na câmara de fluxo laminar preparar as caixas de Petri pequenas que conterão o meio mínimo com o pesticida em estudo. Para isso, deitar numa caixa o meio MMbac ainda quente e, sem deixar arrefecer, adicionar 70 µl da solução etanólica que contém o pesticida. Tapar a caixa e agitar, rapidamente, para dispersar o pesticida no meio. Deixar arrefecer.
3. Repetir o mesmo procedimento para o meio MMbol.
4. Preparar 3 placas normais com meio CA e mais duas placas pequenas com meio MMbac e meio MMbol, respectivamente, sem adicionar qualquer pesticida.
5. Palitar para a caixa de Petri com meio MMbac e pesticida as bactérias e leveduras que cresceram no estudo efectuado no ponto 1 (identificar os pontos de inoculação - numerar antecipadamente os pontos de inoculação para posterior identificação). Incubar durante 48 horas a 37 °C.
6. Palitar para a caixa de Petri com meio MMbol e pesticida os bolores observados durante as experiências realizadas em 1 (numerar antecipadamente os pontos de inoculação para posterior identificação). Incubar durante 48 horas a 28 °C.
7. Repicar as bactérias e leveduras da placa com MMbac e pesticida, para uma placa com meio CA e incubar a 37 °C por 24 horas.
8. Repetir o ponto 7. para os bolores da placa com MMbol e pesticida.
9. Verificar se todas as repicagem tiveram crescimento (verificação se houve inoculação e se as características das colónias são as mesmas).
10. Repicar todas as colónias de bactérias e leveduras, em estudo, formadas na placa com CA para a placa de Petri com meio MMbac sem pesticida. Incubar durante 24 horas a 37 °C. Esta placa serve para confirmar se o crescimento observado corresponde à utilização de pesticida como fonte de carbono.
11. Repicar todas as colónias de bolores formadas na placa com CA para placa de Petri com meio MMbol sem pesticida. Incubar durante 24 horas a 37 °C.

4.4. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO POR UMA ESTIRPE BACTERIANA DO PESTICIDA W328 MARCADO RADIOISOTOPICAMENTE

4.4.1. MATERIAL

Aparelhos

Autoclave

Agitador e estufa a 37 °C

Vortex

Balança técnica e balança analítica

Câmara de fluxo laminar (Downflow, Clean Air, Holanda)

Frigorífico

Banho de água com agitação a 37°C

Centrífuga com rotor de cabeça oscilante (Sorval TC6, Dupont)

Material de laboratório

3 balões de 250 ml com respectivas rolhas

1 balão de 100 ml

1 microtubos de 1,5 ml

Tubos de centrífuga descartáveis de 50 ml

Bico de Bunsen

Palitos estéreis

Pinça

Ansa

Micropipetas de 20, 200 e 1000 µl com as respectivas pontas

Meios de cultura e Reagentes

Água estéril

Etanol

Pesticida W328 marcado radioisotopicamente com ¹⁴C.

Solução Etanólica de pesticida W328

O pesticida marcado radioisotopicamente estava numa solução de tolueno que foi evaporado e posteriormente dissolvido em etanol.

Tampão Fosfato 0,21 M pH 7,5 (PBS)

NaH ₂ PO ₄ (0,23 M)	16,0 ml
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O (0,20 M)	84,0 ml
Perfazer o volume para 100 ml adicionando água destilada	

Meio Mínimo Líquido (MMliq)

Num balão de 250 ml preparar:

Meio MMbac líquido (preparado como em 3.1 mas sem o agar)	24 ml
Solução de aminoácidos a 20% em água destilada	4,5 ml
Solução de glucose a 20% em água destilada	1,5 ml

A preparação deste meio é feito no fluxo laminar utilizando o meio e soluções esterilizadas a 1 atm (120 °C) durante 25 minutos.

4.4.2. PROCEDIMENTO

Nota: Trabalhar em ambiente estéril

1. Inocular com a estirpe bacteriana escolhida, o balão com o meio MMliq . Incubar 24 h a 37°C com agitação.
2. Observar se há crescimento. Em dois tubos de centrifuga descartáveis colocar 12 ml de meio com bactérias.
3. Centrifugar a 4000 rpm durante 10 min.
4. Retirar o meio de crescimento com a ajuda de uma micropipeta. Lavar as células adicionando cerca de 6 ml de tampão fosfato. Dispersar as células com a ajuda da micropipeta e centrifugar a 4000 rpm durante 10 min.

5. Repetir a lavagem das células com tampão fosfato.
6. Ressuspender o sedimento em 6 ml de tampão fosfato.
7. Utilizar 2 ml da suspensão anterior e colocar num tubo de ensaio para efectuar o estudo da degradação com o pesticida marcado.
8. Preparar um branco contendo 2 ml de tampão fosfato.
9. Adicionar ao tubo com as bactérias 5 µl de solução etanólica com pesticida marcado com 6 µCi de actividade.
10. Incubar durante 24 h num banho de água a 37 °C com agitação.
11. Utilizar a solução com as bactérias para a análise em HPLC.

4.5. ANÁLISE POR RADIOCROMATOGRRAFIA DA DEGRADAÇÃO POR UMA ESTIRPE BACTERIANA DO PESTICIDA W328 MARCADO RADIOISOTOPICAMENTE

5.1. MATERIAL

Aparelhos

As análises foram efectuadas num aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com módulo de programação, bomba e gradiente (modelo Water 600, Multisolvant Delivery System da Millipore), com “loop” de 20 µl, seguido de coluna cromatográfica. O eluído atravessa primeiro o detector ultravioleta (U.V) (modelo Water 490 E da Millipore), passando pelo módulo de mistura do “cocktail de cintilação”/efluente da coluna de HPLC (modelo 110B da Beckman) antes de atingir o detector de radioisótopos (modelo 171 da Beckman). Os resultados são imprimidos directamente para uma impressora ou integrados num computador com software adequado.

Condições Operacionais:

FASE ESTACIONÁRIA:

- Coluna cromatográfica analítica de aço inoxidável “stainless steel” com partículas de 5µm de diâmetro e com 15 cm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno (Lichrospher 100 RP-18 da Merck), antecedida por uma pré-coluna (4 mm de comprimento e mesmo diâmetro) com o mesmo enchimento.
- Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente.

FASE MÓVEL:

- eluição foi realizada em 35 min. com o seguinte gradiente:

Tempo (min.)	%metanol	%água
10	30	70
20	80	20
20	80	20

- fluxo da amostra: 0,8ml / min.
- fluxo do cocktail de cintilação: 2,00 ml/min.
- razão de mistura efluente/cocktail de cintilação de 2,5:1
- tempo de residência: 0,357 min.
- pressão de trabalho: 1242 Psi
- detector de UV com lâmpada de xenon a um comprimento de onda de 230 nm, e com sensibilidade de 0,050 AUFS (Absorbance Unit Full Screen) para 1000 mV²; escala de absorvância de 0,0000 a 0,0400.
- detector de radioisótopos programado para detecção de ¹⁴C, com escala de 10,000 a 3000,0 cpm, e sensibilidade de 9 (1200 cpm correspondem a 1000 mV³).

² este valor é importante para a conversão de das unidades de absorvância medida para mV, na integração dos resultados experimentais no computador.

Material de laboratório

Reservatórios de solvente do HPLC

2 balões um para o cocktail de cintilação e outro para desperdícios

Seringa Hamilton de ponta romba de 25 μ l

Soluções e Reagentes

Etanol para HPLC

Metanol para HPLC

Água para HPLC

Cocktail de cintilação Ready flow III (liquid scintillations cocktail for radionuclides of effluent with high salt concentration, organic modified buffers) da Beckman

Linha de hélio

5.2. PROCEDIMENTO

1. Ligar o aparelho para estabilizar, pelo menos 30 min. antes da corrida.
2. Programar a corrida cromatográfica, o detector U.V. e o detector de radioisótopos.
3. Borbulhar os solventes com hélio para desgaseificar.
4. Injectar a amostra e iniciar a corrida. Ter o cuidado de lavar, várias vezes, com etanol a seringa Hamilton antes de colocar a amostra
5. No fim da corrida lavar a coluna, fazendo passar durante alguns minutos metanol 100%.
6. Aguardar 10 a 15 min., após a lavagem, para recomeçar a corrida.

³ este valor é importante na conversão das unidades de cpm para mV, na integração dos resultados experimentais no computador.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ISOLAMENTO DE ESTIRPES MICROBIANAS DO SOLO

As amostras de solo usadas nesta experiência foram colhidas em duas vinhas vizinhas situadas a 8 Km a noroeste de Reguengos de Monsaraz. A distância aproximada das duas amostras, A1 e A3 é de 20 m. Ambas as amostras foram retiradas da camada de solo situada entre 5-25 cm.

Tabela 5.1 Valores de pH medido, a 25 °C para as amostras de solo estudadas

Amostra de solo	Replicados	pH
A1	A11	7,15
	A12	7,22
A3	A31	7,35
	A32	7,33

Os valores de pH encontrados para os replicados de cada amostra de solo podem ser considerados idênticos: 7,2 para a amostra A1 e 7,4 para a amostra A3. Os valores de ambas as amostras também são muito semelhantes, podendo dizer-se que ambas têm um pH neutro. Os microrganismos do solo mais tolerantes a este pH são as bactérias, sendo os fungos mais tolerantes a pH ácido e os actinomicetas a pH básico (Killham, 1994).

O número de colónias obtido em cada diluição difere bastante para os duplicados. Isto, mostra que não se conseguiu fazer boas réplicas. Tal facto pode dever-se:

- à dificuldade de medir-se exactamente os volumes de amostra indicados, principalmente para os valores mais pequenos (10 e 20 µl);

- à não homogeneidade da amostra retirada, recorde-se que as amostras foram retiradas em tempos diferentes após uma centrifugação. Ao longo do tempo os microrganismos mais pesados poderiam sedimentar-se mais rapidamente;
- à dificuldade de se controlar o crescimento microbiano, isto é, para se conseguir resultados no mínimo concordantes, é necessário realizar um grande número de ensaios.

Tabela 5.2 Biomassa observada para as diferentes concentrações de A1 e A3 em meio completo, após incubação a 37 °C por 48 h. Legenda: 1, 2 - réplicas; Inc.- incontáveis; *- metade da placa estava ocupada por um bolor; ⁽¹⁾ - ver anexo 1 para os cálculos.

Amostra	Volume Incubação (µl)	Número de colónias		Biomassa/g de solo ⁽¹⁾ (n° Col/g solo)		Mediana de biomass/g de solo (n° Col/g solo)
		1	2	1	2	
A1	10	154	41*	138 600	36 900	42 300
	20	204	94	91 800	42 300	
	40	Inc.	150	-	33 750	
A3	10	9	32	8 100	28 800	28 800
	20	65	120	29 250	54 000	
	40	233	Inc.	52 425	-	

Quanto à biomassa obtida por grama de solo, também se observa uma discordância entre os valores obtidos para cada duplicado. No que diz respeito aos valores que se obtiveram para cada ensaio, a amostra A1 réplica número 2 foi o que apresentou os resultados mais concordantes. Verifica-se ainda melhor em termos de biomassa o efeito da não homogeneidade da amostra retirada para os ensaios. Por exemplo, na amostra A1 réplica 1 há muito menos biomassa por grama de solo para o ensaio com 20 µl, do que para o ensaio com 10 µl.

A biomassa que foi possível obter-se para a primeira camada do solo varia entre os 28 800 e 91 800 por g de solo. O número estimado de biomassa de microrganismos por grama de solo na zona superficial varia de 10^8 - 10^9 para bactérias, 10^7 - 10^8 para actinomicetas e de 10^5 - 10^7 para os fungos (Brady, 1990). Os resultados obtidos nesta experiência, são mais baixos que os estimados. No entanto é de referir que os valores estimados no entanto é de lembrar que os microrganismos isolados são aeróbicos.

Tendo em conta o pH do solos estudados poderá verificar-se, na secção seguinte, que os microrganismos que existem em maior quantidade são as bactérias, estando neste ponto de acordo com a literatura.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES MICROBIANAS ISOLADAS

A figura 5.1 apresenta uma fotografia que mostra o aspecto das colónias obtidas para um dos ensaios realizados.

As tabelas 5.3 e 5.4 mostram a variedade de colónias obtidas em termos de cor, brilho e aspecto da superfície para os meios utilizados. Pode ver-se que foram muitos os tipos de colónias obtidos, existindo uma maior variedade no meio completo (CA) do que com extracto de malte (MA) e meio nutritivo (NA). Recorde-se que as colónias obtidas apenas se referem aos microrganismos aeróbios.

A tabela 5.5 mostra o tamanho e forma das bactérias e leveduras obtidas. Também se pode verificar que existem mais bactérias gram negativas do que positivas.

A tabela 5.6 mostra as estruturas observadas para os bolores encontrados nos três meios testados. Em comparação com as bactérias existem em menor quantidade e variedade.

Tabela 5.3 Tipos de colónias observadas no meio completo (CA) após incubação a 37 °C por 48 h. Legenda: + - presença; 1, 2 - replicados; volume de inoculação a, b, c são respectivamente 10, 20 e 40 µl.

CARACTERÍSTICAS DAS COLÓNIAS	A1						A3					
	1a	1b	1c	2a	2b	2c	1a	1b	1c	2a	2b	2c
Creme, superfície lisa e brilhante	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Branco, superfície lisa e brilhante	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amarelo escuro, superfície lisa e brilhante	+	+			+							
Amarelo claro, superfície lisa e brilhante	+		+	+		+						+
Cor de rosa, superfície lisa e brilhante	+	+				+			+			
Creme, superfície rugosa			+			+						
Amarelo escuro, superfície baça com protuberância no centro				+	+	+						
Creme, superfície lisa e brilhante com protuberância no centro	+					+					+	+
Branca, superfície direita e baça						+			+			
Bolor branco acinzentado	+					+						
Bolor cinzento esverdeado											+	
Bolor branco			+						+			

Tabela 5.4 Tipos de colónias observadas no meio extracto de malte (MA) e meio nutritivo (NA) após incubação a 28 e 37°C, respectivamente, por 48 h. Legenda: + - presença.

CARACTERÍSTICAS DAS COLÓNIAS	MA			NA		
	A11	A12	A32	A11	A12	A32
Creme, superfície lisa e brilhante	+					
Branca, superfície lisa e brilhante				+	+	+
Amarelo escuro, superfície lisa e brilhante	+				+	
Amarelo claro, superfície lisa e brilhante		+		+	+	
Cor de rosa, superfície rugosa e baça					+	
Creme, superfície rugosa e seca				+	+	+
Branco, com bordos saliente e branco (seco)					+	+
Bolor amarelo acastanhado com bordos branco		+				
Bolor verde acinzentado						+
Bolor branco			+		+	
Laranja escuro, muito pequenas					+	

Tabela 5.5 Observações microscópicas das diversas colónias de leveduras e bactérias observadas nos meios CA, MA e NA

CARACTERÍSTICAS DAS COLÓNIAS	CÉLULA		MICROORGANISMO	TESTE GRAM
	Forma	Tamanho		
Creme, superfície lisa e brilhante	bastonete	muito pequeno	bactéria	-
Branco, superfície lisa e brilhante	bastonete	muito pequeno	bactéria	+
Amarelo escuro, superfície lisa e brilhante	bastonete	muito pequeno	bactéria	-
Amarelo claro, superfície lisa e brilhante	bastonete	muito pequeno	bactéria	+
Cor de rosa, superfície rugosa e baça	bastonete	muito pequeno	bactéria	-
Creme, superfície rugosa e seca	bastonete	muito pequeno	bactéria	-
Branco, superfície direita e baça	bastonete	grande	levedura	
Branca com bordos salientes e branco	bastonete	grande	levedura	



Figura 5.1 Fotografia de uma das placas Petri com meio CA crescida a 37 °C.

Tabela 5.6 Observação microscópica dos diferentes bolores existentes nos meios de cultura (CA, MA, NA).

Características dos Bolores	Micélio	Forma do Esporo
Branco	septado e não septado	não tem
Amarelo acastanhado com bordos brancos	septado	redondo
Cinzento esverdeado	não septado	redondo
Branco acinzentado	não septado	redondo

5.3. ESTUDO DA DEGRADAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO PESTICIDA W328

Na tabela 5.7, estão indicadas as estirpes que foram usadas no estudo da degradação do pesticida. Aquelas que apresentaram crescimento no meio mínimo com pesticida, também cresceram no meio completo (CA). No entanto, as colónias creme e branca (bactérias) apresentaram um crescimento mais lento.

As que não apresentaram crescimento no meio mínimo com pesticida, também não cresceram no meio completo. Isto mostra que de facto não houve inóculo, para que se pudesse observar algum crescimento.

Todas as colónias que apresentaram crescimento no meio mínimo com pesticida e no meio completo, foram repicadas para os respectivos meios mínimos sem pesticida. Neste ensaio não cresceram as bactérias creme e branca, e o bolor branco. O que significa que o seu crescimento se deveu à presença de agar ou de alguma outra fonte de carbono, existente no meio mínimo.

Das colónias que cresceram foi escolhida uma estirpe para o ensaio de degradação com o pesticida radiomarcado. Os bolores não foram escolhido por ser mais difícil o seu crescimento em meio líquido. Assim, das bactérias foi escolhida a que era gram positiva (amarelo claro).

5.4. ANÁLISE POR RADIOCROMATOGRÁFIA DA DEGRADAÇÃO DO PESTICIDA W328 MARCADO COM RADIOISÓTOPO

Após a incubação da estirpe escolhida, durante 24 horas, em tampão fosfato com pesticida W 328 marcado com ^{14}C , foi feita uma cromatografia líquida de alta eficiência

Tabela 5.7 Crescimento observado das diferentes estirpes de bactéria e de bolor no meio mínimo com pesticida (MMP) e meio completo (CA) e no meio mínimo sem pesticida (MM). Legenda: + - estirpe que teve crescimento, - - não teve crescimento, espaço em branco não foi realizado o ensaio.

Características das Colônias	MMP	CA	MM
Creme, superfície lisa e brilhante	+	+	-
Branca, superfície lisa e brilhante	+	+	-
Amarelo escuro, superfície lisa e brilhante	+	+	+
Amarelo claro, superfície lisa e brilhante	+	+	+
Cor de rosa, superfície rugosa e baça	+	+	+
Creme, superfície rugosa e seca	+	+	-
Branco, superfície direita e baça	-	-	
Branca com bordos salientes e branco	-	-	
Bolor branco	+	+	-
Bolor amarelo acastanhado com bordos branco	+	+	+
Bolor cinzento esverdeado	+	+	+
Bolor branco acinzentado	+	+	+

(HPLC) tendo como meios de detecção o U. V. e o detector de radioisótopos. Foram realizadas duas corridas de cromatografia, corrida 1 e corrida 2, para o estudo em causa.

Nas figuras 5.2 e 5.3., estão representados os cromatogramas obtidos para a corrida 1 quando é feita a detecção com detector de U.V e de radioisótopos, respectivamente.

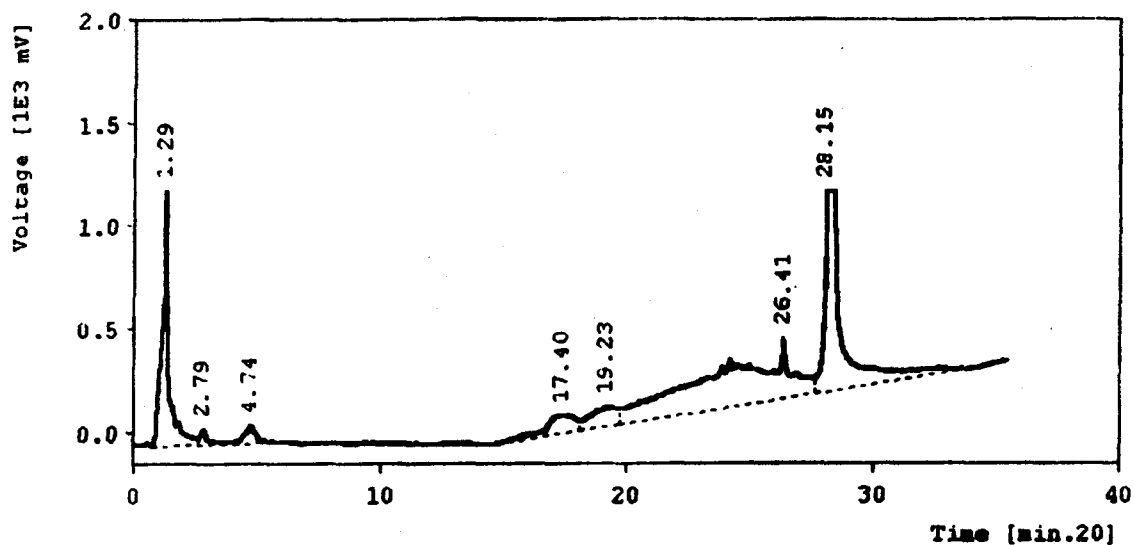


Figura 5.2 Cromatograma da corrida 1 com detector de U.V. (cromatograma 1).

Tabela 5.8 Resultados do cromatograma 1.

Número de pico	Tempo de retenção (min.)	Área (mV.s)	Área (%)
1	1,290	23104,4633	14,977
2	2,790	1483,6824	0,962
3	4,740	3047,1739	1,975
4	17,400	7232,6608	4,688
5	19,230	6932,5193	4,494
6	26,410	62106,1876	40,259
7	28,150	50360,1016	32,645

Por comparação com o cromatograma obtido para a corrida só com o pesticida marcado (anexo 2), o pico número 1 (tabela 5.8) deve-se à absorvância que o metanol apresenta no U.V.. Não é possível identificar a que compostos correspondem os restantes picos. A rampa que surge a partir dos 20 minutos de corrida, pode dever-se a impurezas do metanol ou da coluna.

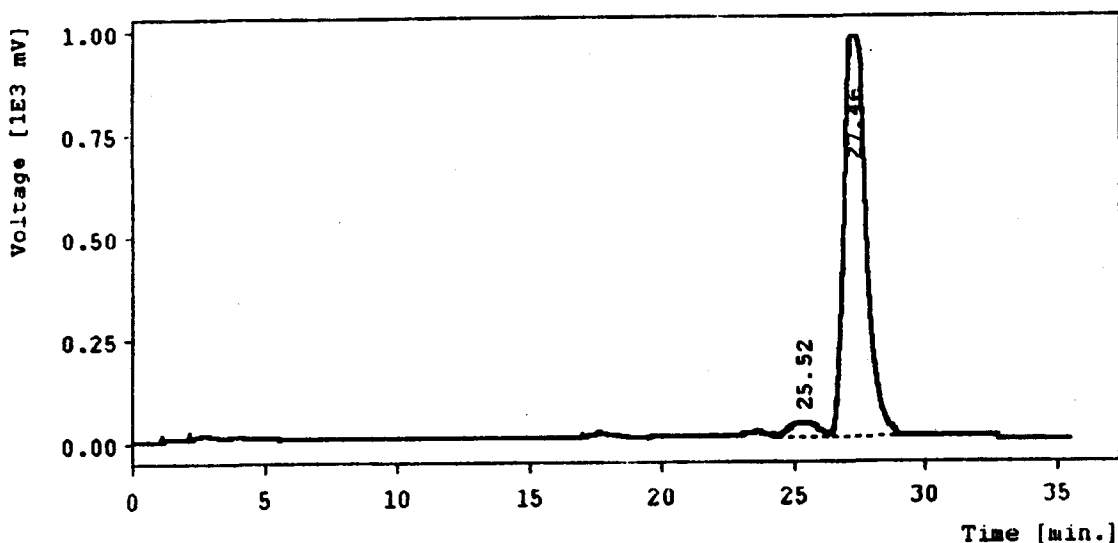


Figura 5.3 Cromatograma da corrida 1 com o detector de radioisótopos (cromatograma 2).

Tabela 5.9 Resultados do cromatograma 2.

Número de pico	Tempo de retenção (min.)	Área (mV.s)	Área (%)
1	25,520	2770,2106	4,431
2	27,460	59742,7700	95,569

Comparando os dois tipos de detecção efectuados, verifica-se que o cromatograma com detecção de U.V. apresenta muitos mais picos e um ruído de fundo muito superior do que o cromatograma com detecção de radioisótopos. O que permite confirmar que a detecção de radioisótopos consegue ser mais específica que a detecção por absorção no U.V.. Isto é, a detecção de radioisótopos permite distinguir os compostos que nos interessam daqueles que podem interferir na nossa análise (compostos orgânicos que

possam existir na amostra a analisar) quando se faz a detecção por absorção da radiação ultravioleta. Observa-se também que a largura dos picos obtidos com a detecção de radioisótopos é maior do que para os picos obtidos obtidos por U.V., tal deve-se ao facto de a célula de medição de radioisótopos ser muito maior do que a célula de medição por U.V..

Tendo em conta a detecção de radioisótopos pode inferir-se que os picos que poderão corresponder ao pesticida (W 328) e aos seus possíveis produtos de degradação apresentam um tempo de residência de 28,15 e 26,41 minutos. Por comparação com o cromatograma obtido com o mesmo detector para o ensaio com o pesticida marcado (anexo 2), o pico 2 corresponde ao pesticida não marcado, enquanto que o pico 1 poderá corresponder a um produto de degradação. Tendo em conta a percentagem da área que este pico apresenta, pode dizer-se que a degradação efectuada pela estirpe escolhida é bastante pequena. O produto de degradação será uma cetona, por comparação com os produtos de degradação obtidos em ensaios similares (Tykva, 1996).

Nas figuras 5.4 e 5.5. estão representados os cromatogramas obtidos para a corrida 2 quando é feita a detecção com detector de U.V e de radioisótopos, respectivamente.

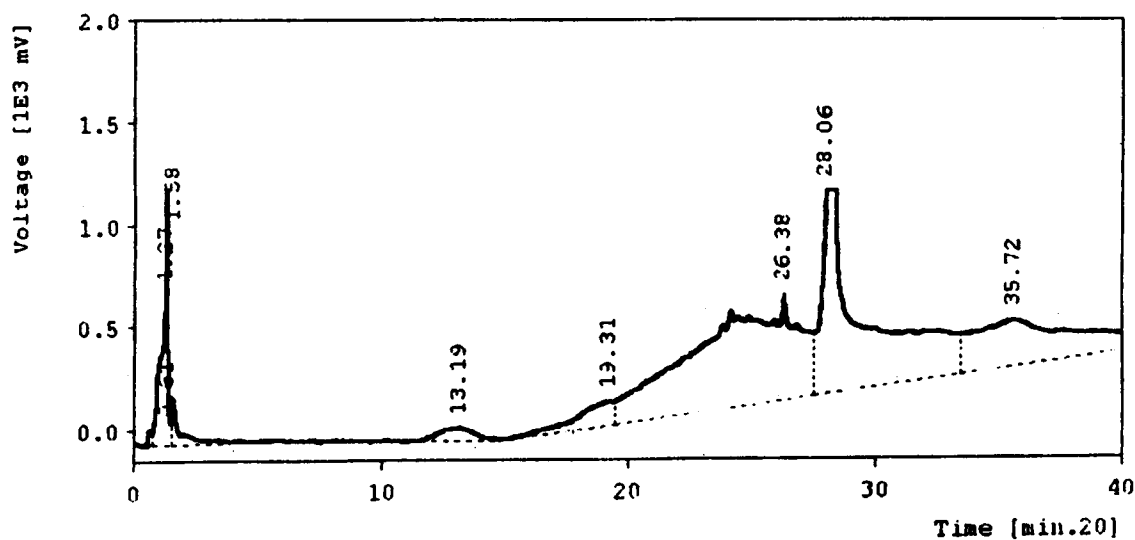


Figura 5.4 Cromatograma da corrida 2 com detector de U.V. (cromatograma 3).

Tabela 5.10 Resultados do cromatograma 3.

Número de pico	Tempo de retenção (min.)	Área (mV.s)	Área (%)
1	0,610	570,5844	0,149
2	1,270	18671,8152	4,878
3	1,580	5686,0789	1,485
4	13,190	6079,3683	1,599
5	19,310	12572,6254	3,284
6	26,380	145442,7402	37,995
7	28,060	120758,3003	31,547
8	35,720	73013,4556	19,074

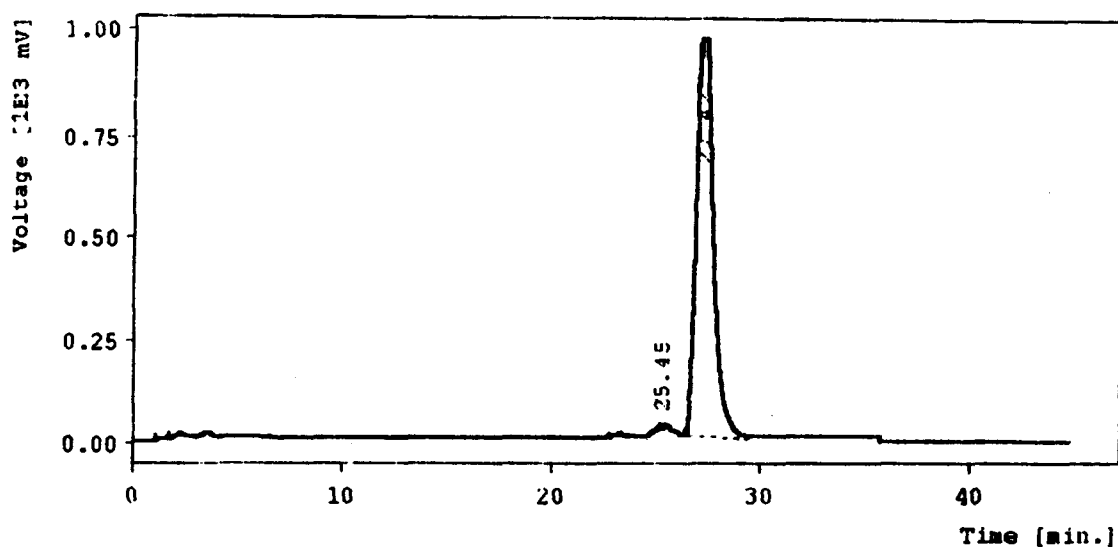


Figura 5.5 Cromatograma da corrida 2 com detector de radioisótopos (cromatograma 4).

Tabela 5.11 Resultados do cromatograma 4.

Número de pico	Tempo de retenção (min.)	Área (mV.s)	Área (%)
1	25,447	376,8802	0,644
2	27,420	581366,3047	99,356

Para a corrida 2 da amostra foram obtidos cromatogramas muito semelhantes ao da corrida 1. A diferença mais importante que se observa é a percentagem da área que se observa para o produto de degradação. Tratando-se de uma corrida em duplicado do mesmo ensaio tal não deveria acontecer. Uma das explicações é que em vez de se tratar de uma degradação biológica, poder-se-ia ter dado uma maior decomposição do pesticida, entre a realização do ensaio e a análise por HPLC da segunda corrida (24 horas), apesar de estar armazenado a 4 °C.

A actividade total medida para os 2 ml de meio com pesticida e estirpe bacteriana foi de 11 771 730 dpm. Recorde-se que a actividade de pesticida marcado adicionado ao meio de cultura mínimo foi de cerca de 6 μCi ($3,7 \times 10^6$ dpm). O valor medido é ligeiramente maior, o que pode ser explicado pelo erro de medição de volume do pesticida marcado ou da amostra a analisar.

6. CONCLUSÕES

O estudo realizado mostrou que é possível isolar microrganismos dos solos usados para agricultura. No entanto a reprodutibilidade dos resultados foi muito má devido à realização de um número muito pequeno de réplicas (ensaios). A biomassa por grama de solo variou entre 28 800 e 91 800.

Para as amostras em estudo, obteve-se um maior número de estirpes de bactérias do que de bolores e de leveduras. Este facto pode ser explicado pelo pH neutro (7,2 e 7,4) dos solos. O número de bactérias aeróbicas consideradas diferentes foram seis, enquanto os bolores foram quatro e apenas duas leveduras.

Foram capazes de degradar o pesticida W 328 três estirpes das bactérias isoladas e também três de bolores. Foi seleccionada uma estirpe bacteriana gram + para realizar os ensaios de degradação do pesticida W 328 marcado com ^{14}C no carbono uranilo.

Os cromatogramas obtidos com o detector de U.V. apresentaram um grande ruído de fundo e não foi possível identificar nem o pesticida nem os produtos de degradação.

Nos cromatogramas obtidos com detector de radioisótopos não se observou ruído de fundo e foi fácil a determinação do pesticida e dos produtos de degradação. Isto confirma que a metodologia de radiotraçadores permite realizar estudos de degradação de um modo muito mais simples e sensível do que a realização do mesmo estudo por métodos convencionais, neste caso, a detecção da radiação U.V..

Na análise por radio-HPLC foram detectados dois picos: o maior (% área: 95,569 e 99,356) com tempo de retenção de 27,4 min. correspondente ao pesticida e um mais

pequeno (% área: 4,431 e 0,644, respectivamente) com tempo de retenção de 25,5 min. correspondente à fracção de pesticida degradado.

O produto de degradação ficou identificado como sendo um composto cetónico.

A actividade total medida por cintilação líquida foi de 11 771 730 dpm.

7. BIBLIOGRAFIA

Amaro, P. (1995). Apontamentos de protecção integrada da vinha. 1º Curso ISA de Protecção Integrada, ISA, 25-30 Junho.

Armstrong, A. C., Portwood, A. M.; Leeds-Harrison, P. B.; Harris, G. L.; Catt, J. A. (1996). The Validation of Pesticide Leaching Models, *Pestic. Sci.*, **48**, 47-55.

Arnold, D.J. e Briggs, G. G., (1990). "Fate of Pesticides in Soil: Predictive and Practical Aspects" in *Progress in Pesticides Biochemistry and Toxicology*. Eds. Hutson, D. H. e Roberts, T. R., Vol. 7, John Wiley & Sons, New York, pg. 103.

Babu, T. H.; Sláma, K. (1972). Systemic Activity of a Juvenile Hormone Analog, *Science*, **175**, 78-79.

Banerjee, B. D.; Koner, B. C.; Ray, A. (1996). Immunotoxicity of Pesticides: Perspectives and Trends. *Indian J. of experimental Biology*, **34**, 723-733.

Barcelo, D.; Chiron, S.; Fernandez-Alba, A.; Valverde, A.; Alpendurada, M. F. (1996). Monitoring pesticides and metabolites in surface water and groundwater in Spain. *ACS Symp. Ser.*, **630** (*Herbicides Metabolites in Surface Water and Groundwater*), 237-253.

Baskaran, S.; Bolan, N. S.; Rahman, A.; Tillman, R. W. (1996). Non-equilibrium Sorption during the Movement of Pesticides in Soils, *Pestic. Sci.*, **46**, 333-343.

Bicchi, C.; Balbo, C.; Binrillo, A, D'Amato, A. (1996). HPLC-UV Determination of Pesticides residues at 0,01 ppm in Apple and Pear Pulp used for Baby Food. *J. High Resol. Chromatogr.*, **19**, 105-110.

Bintein, S.; Devillers, J. (1996). Evaluating the environmental fate of lindane in France. *Chemosphere*,**32**, 12: 2427-2440.

Blumhorsy, Micahel R. (1996). Experimental Parameters Used to Study Pesticide Degradation in Soil, *Weed Technoloy*, **10**, 169-173.

Brady, N. C. (1990). The Nature and Properties of soils, 10 Ed., Macmillan, Nova York, 1990.

Burns, Phillip D.; Steiner, Ron. (1991). Advanced Technology Guide for LS 6000 Series Scintillation Counters, , Donald L. Harrocks Nuclear Applications Laboratory, Beckman Instruments, Inc

Cabral, J. M. Peixoto, (1973). "Radioquímica Capítulo II – Detecção de Radiação e Medição de Taxas de Contagem", Laboratório de Física e Engenharia Nucleares

Cabral, J. M. Peixoto, (1974). "Radioquímica Capítulo VII – Radionúclidos em Química Analítica", Laboratório de Física e Engenharia Nucleares.

Cabral, J. M. Peixoto, (1974). "Radioquímica Capítulo III - Radioactividade Leis do Decaimento e do Crescimento Radioactivos", Laboratório de Física e Engenharia Nucleares.



Cox, L.; Hermosin, M. C., Cornejo, J. (1995). Adsorption and Desorption of the Herbicide Thiazafuron as a Function of Soil Properties, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **58**, 305-314.

Davis, R. F., Johnson, A. W., Wachope, R. D. (1993). Accelerated degradation of fenamiphos and its metabolites in soil previously treated with fenamiphos. *J. Nematol.*, **25**, 679-685.

Decreto-Lei 74/90, *Diário da República – I Série*, nº **55** (7-3-1990), 981-1024.

Di Corcia, A; Crescenzi, C.; Laganà, A. (1996). Evaluation of a Method Based on Liquid Chromatography/Electrospray/Mass Spectrometry for Analyzing Carbamate Insecticides in Fruits and Vegetables. *J. Agri. Food Chem.*, **44**, 1930-1938.

Directiva 80/778/CEE, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, nº **L 229** de 30.8.1980, pg.11-29.

Elbert, T.; Havlicek, L.; Wimmer, Z.; Bubner, M. (1994). Synthesis of the ¹⁴C-Labelled Juvenoid W 328. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, **XXXIV**, 4, 377-382.

Elbert, T.; Cerný, B.; Wimmer, Z.; Sergent, L. (1993). Regio- and Stereoselective Tritiation of the Juvenoid Analog W 328, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **58**, 1164-1168.

Elbert, T.; Rejzek, M.; Virelizier, H. (1996). Regioselective Tritiation of Carbamate Dicyclic Juvenoids, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **61**, 946-950.

Ferrando, M. D.; Sancho, E.; Andreu-Moliner, E. (1996). Accumulation of Tetradifon in Algae (*Nannochloris oculata*) and the Cladoceran, *Daphnia magna*., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **57**, 139-145.

Ferreira, Rui Manuel Alves (1987). "Influência da idade e castração no Metabolismo Lipídico e do colesterol em Fígado de Rato". Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Fielding, M., Barceló, D., Helweg, A., Galassi, S., Torstensson, L., Van Zoonen, P., Wolter, R., Angeletti, G. (1992). Pesticides in groundwater and drinking water, *Water Pollution Research Report 27*. Commission of the European Communities, Brussels, 1-136.

Foomsgaard, I. S. (1995). Degradation of Pesticides in Subsurface Soils, Unsaturated Zone – A Review of Methods and Results, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **58**, 231-245.

Frederick, E. K., Bischoff, M., Throssell, C. S., Turco, R. F. (1994). Degradation of Chloroneb, Triadimefon, and Vinclozolin in soil, thatch, and grass clippings, *Bull Environ Contam Toxicol*, **53**, 536-542.

Gana, J.; Becker, R. L., Koskinen, W. C.; Buhler, D. D. (1996). Biodegradation and Bioremediation – Degradation of Atrazine in Two Soils as a Function of Concentration, *J. Environ. Qual.*, **25**, 1064-1072.

Guzzella, L.; De Paolis, A.; Bartone, C.; Pozzoni, F.; Giuliano, G. (1996). Migration of Pesticides Residues From Agricultural soil to Groundwater. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **65**, 261-275.

Holland, Patrick T. (1996). Glossary of terms relating to pesticides (IUPAC Recommendations 1996). *Pure & Appl. Chem.*, **68**, 5, 1167-1193.

Jonnalagadda, P. R.; Rao M., B. P. (1996). Histopathological Changes Induced by Specific Pesticides on Some Tissues of the Fresh Water Snail, *Bellamya dissimilis* Müller. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **57**, 648-654.

Karns, J. S., Mulbry, W. W., Nelson, J. O., Kearney, P. C. (1986). Metabolism of Carbofuran by a pure bacterial culture. *Pesticide Biochem Physiol*, **25**, 211-217.

Killham, Ken (1994). *Soil Ecology*, Cambridge University Press, pg. 27, 187.

Lacorte, Silvia; Barcelo, Damia (1996). Determination of Parts per Trillion Levels of Organophosphorus Pesticides in Grounwater by Automated on line Liquid-Solid Extraction Followed by Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectometry. *Anal. Chem.*, **68**, 15: 2464-2470.

Lehr, S.; Glaßgen, W. E.; Sandermann Jr. H.; Beese, F.; Scheunert, I. (1996). Metabolism of Isoproturon in Soils Originating From Different Agricultural Management Systems and in Cultures of Isolated Soil Bacteria, *Intern. J. Anal. Chem.*, **65**, 231-243.

Libra, J. A.; Ro, K. S.; Chung, K. H.; Chung, Y. C. (1996). Pesticides and Herbicides, *Water Environment Research*, **68**,4:564-568.

Lino, Celeste de Matos; Noronha da Silveira, M. Irene (1996). Pesticides versus the Environment I. *Rev. Port. Farm.*, **46**, 1: 16-23.

Martins, Maria do Rosário Caeiro (1995). Alguns Aspectos Ecotoxicológicos dos Herbicidas Tiocarbamatos, Universidade de Évora.

Mathew, R. e Khan, S. U. (1996). Photodegradation of Metolachlor in Water in the Presence of Soil Mineral and Organic Constituents, *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3996-4000.

Miles, Carl J. (1992). Determination of National Survey of Pesticides Analytes in Groundwater by Liquid Chromatography with Postcolumn Reaction Detection, *J. of Chromatography*, **592**, 283-290.

Mansour, Mohammed (1996). Abiotic degradation of pesticides and other organic chemicals in aquatic systems. *Pestic. Outlook*, **7**, 2: 9-10.

Moreno-Tovar, J.; Santos-Delgado, M. J. (1995). Solid-phase extraction and determination of carbamate pesticides in water samples by reverse-phase HPLC. *An. Quim.* **91**, 5-6: 365-373.

Námec, V.; Bennetová, B; Tykva, R.; Wimmer, Z.; Ryzek, M. (1997). Distribution and excretion of juvenoids in locust *Locusta migratoria migratorioides* (R. et L.), *J. Applied Entomology*, **121**, 353-356.

Novak, J. M.; Jayachandran, K.; Moorman, T. B.; Webber, J. B. (1995). Sorption and Binding of Organic Compounds in Soils and Their Relation to Bioavailability. *In Bioremediation: Science and Applications*. Soil Science Society of America (SSA) Publication, pg. 13-31.

O.M.S (1996). Directives de Qualité Pour L'Eau de Boisson Vol. 2 Critères D'hygiène et Documentation à L'appui, Geneva, pg. 192-223.

Perucci, P.; Scarponi, L. (1996). Organic Chemicals in the Environment – Side Effects of Rimsulfuron on the Microbial Biomass of a Clay-Loam Soil, *J. Environ. Qual.*, **25**, 610-613.

Petersen, L. W.; El-Farhan, Y. H.; Moldrup, P. Rolston, D. E.; Yamaguchi, T. (1996). Transient Diffusion, Adsorption, and Emission of Volatile Organic Vapors in Soils with Fluctuating Low Water Contents, *J. Environ. Qual.*, **25**, 1054-1063.

Pierzynski, G. M.; Sims, J. T.; Vance, G. F. (1994). Soils and Environmental Quality, Lewis Publishers, Boca Raton, 1994, pg.175-215.

Pirisi, F. M.; Cabras, P.; Garau, V. L.; Melis, M.; Secchi, E. (1996). Photodegradation of Pesticides. Photolysis Rates and Half-Life of Pirimicarb and Its Metabolites in Reactions in Water and in Solid Phase, *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 2417-2422.

Proposta de Directiva (1995). Proposta de Directiva do Conselho Relativa à Qualidade da Água Destinada ao Consumo Humano (95/C 131/03), *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, nº C 131 de 30.5.1995, pg.1-24.

Rabinowitz, J.G.; Chase, G. D. (1975). "Principles of Radioisotope Methodology", 3ª Ed. , Burgess Publishing Company Mineapolis

Roberts, T. R. (1990). "Environmental Fate of Pesticides: a Perspective" in *Progress in Pesticides Biochemistry and Toxicology*. Eds. Hutson, D. H. e Roberts, T. R., Vol. 7, John Wiley & Sons, New York, pg. 3-7.

Roberts, S. J.; Walker, A. Parekh, N. R.; Welch, S. J.; Waddington, M. J. (1993). Studies on a Mixed Bacterial Culture from Soil which Degrades the Herbicide Linuron, *Pestic. Sci.*, **39**, 71-78.

Rocio Estrella, M. ; Brusseau, M. L; Maier, R. S.; Pepper, I. L.; Wierenga, P. J.; Miller, R. M. (1993). Biodegradation, Sorption, and Transport of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Saturated and Unsaturated Soils, *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 12: 4266-4273.

Schlett, C. (1991). Multi-residue-analysis of pesticides by HPLC after solid phase extraction. *Fresenius J. Anal. Chem.* **339**, 344-347.

Sehnal, F. (1993). "Use of Juvenoids for Suppression of Insect Reproduction". In: *Management of Insect Pests: Nuclear and Related Molecular Genetic Techniques*, Int. Atom. Energy Agency, Viena 1993, pg. 537-545.

Silva-Fernandes, A M. (1995a). Apontamentos de Luta Biotécnica do 1º Curso ISA de Protecção Integrada, ISA, 25-30 Junho.

Silva-Fernandes, A M. (1995). Apontamentos de Luta Química do 1º Curso ISA de Protecção Integrada, ISA, 25-30 Junho.

Skark, C.; Obermann, P. (1995). Transport of Pesticides Under Aquifer Conditions, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **58**, 163-171.

Skipper, H. D.; Wollum, A. G.; Turco, R. F.; Wolf, D. C. (1996). Microbial Aspects of Environmental Fate Studies of Pesticides, *Weed Technolgy*, **10**, 174-190.

Tykva, R. e Franek, F. (1977), Nondestructive and quantitative Evaluation of Radioactive Spots of Two-Dimensional Peptide Maps by na automated Procedure, *Anal. Biochem.*, **78**, 572-576.

Tykva, R *et al.* (1987a) "Heavy Metal Binding to Proteins Extracted from Rats", in *Trace Element Analytical Chemistry in Medicin and Biology, Vol. 4*, P. Brätter and P. Schramel, eds., Berlin:Walter de Gruyter, pg. 521-525.

Tykva, R *et al.* (1988). "Radiomicroscopy as a Method of Biological Quantification of New Nontraditional Pesticide's Multicompartement Effect", in *Proc. XVIII Int. Congress of Entomology. Abstracts. Vancouver: International Entomological Society*,pg. 478.

Tykva, R. *et al* (1992). A Topographic Method for Studying Uptake, Translocation and Distribution of Inorganic Ions Using Two Radiotracers Simultaneously, *J. Exp. Bot.*, **43**, 1083-1087.

Tykva, R. and B. Bennetová (1993). "Quantitative Analysis of the Fate of a Pesticide After Its Application to Insects" *In Management of Insect Pests: Nuclear and Related Molecular and Genetic Techniques*. Vienna: International Atomic Energy Agency, pg. 529-536.

Tykva, Richard and Josef Sabol (1995). "Low-Level Environmental Radioactivity: Sources and Evaluation", Lancaster, Basel: Technomic Publishing Co. Inc., pg.: 94-102, 106-114, 125-130, 163-180,228-234.

Tykva R., Ruml T., Kloty D., Vlasaková V.(1995). "A radiotracer study of groundwater pollution and bioremediation by a pesticide passing through different soils" *In Internatinal Symposium Isotopes in Water Resources Management, Extended Synopses*, International Atomic Energy Agency, Vienna, pg. 341-342.

Tykva R., Klotz D. (1996). "Pestizidabbau im Untergrund durch mikrobiologische Stämme-ein Vergleich der differentialen und integralen Effekt" *In Freiberg Isotopenkolloquium 1996*, Proceedings, TU Bergakademie, Freiberg ,pg 261-271.

Tykva, Richard (1996). "Analysis of ground-water Remediation During a pesticide Application" *in Advances in Groundwater Pollution Control and Remediation*, M. M. Aral Ed., Kluwer Academic Publishers, Holanda, pg. 545-552.

Yoa, S., Meyer. A., Henze, G. (1991). Comparison of amperometric and U.V.-Spectrophotometric monitoring in the HPLC analysis of pesticides. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **339**, 207-211.

Waliszewski, S. M.; Pardio Sedas, V. T.; Chantiri P., J. N.; Infanzon R., R. M.; Rivera, J. (1996). Organochlorine Pesticide Residues in Human Breast Milk from Tropical Areas in Mexico, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **57**, 22-28.

Walker, A.; Welch, S. J.; Melacini, A.; Monn, Y. H. (1996). Evaluation of Three Pesticide Leaching Models With Experimental Data for Alachlor, Atrazine and Metribuzin, *Weed Research*, **36**, 37-47.

Walls, D.; Smith, P. G.; Mansell, M. G. (1996). Pesticides in Groundwater in Britian, *Intern. J. Environ. Health Research*, **6**, 55-62.

Willard, H.; Merrit Jr, L.; Dean, J., (1979). "Análise Instrumental", tradução de Maria Serpa dos Santos, 2ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

8. ANEXOS

ANEXO 1

CÁLCULO DE BIOMASSA TOTAL

Para o caso da diluição com 10 μ l

$$\begin{array}{l} 154 \text{ UFC} \quad \text{---} \quad 10 \mu\text{l} \\ x \text{ UFC} \quad \text{---} \quad 45\,000 \mu\text{l} \end{array}$$

$$x = \frac{45000}{10} \times 154 \quad \Leftrightarrow \quad x = 693000 \text{ colónias}$$

$$\begin{array}{l} 693000 \text{ col.} \quad 5\text{g solo} \\ y \quad 1 \text{ g solo} \end{array}$$

$$y = \frac{693000}{5} \quad \Leftrightarrow \quad y = 138600 \text{ colon./g solo}$$

ANEXO 2

CROMATOGRAMAS

Os cromatogramas apresentados na parte dos resultados são os que se obtiveram após o processamento dos resultados no PC associado à montagem. Uma vez que se pretende comparar dois tipos de detecção da mesma amostra não acarreta nenhum prejuízo para o estudo pretendido a utilização destes cromatogramas processados, em vez dos cromatogramas reais.

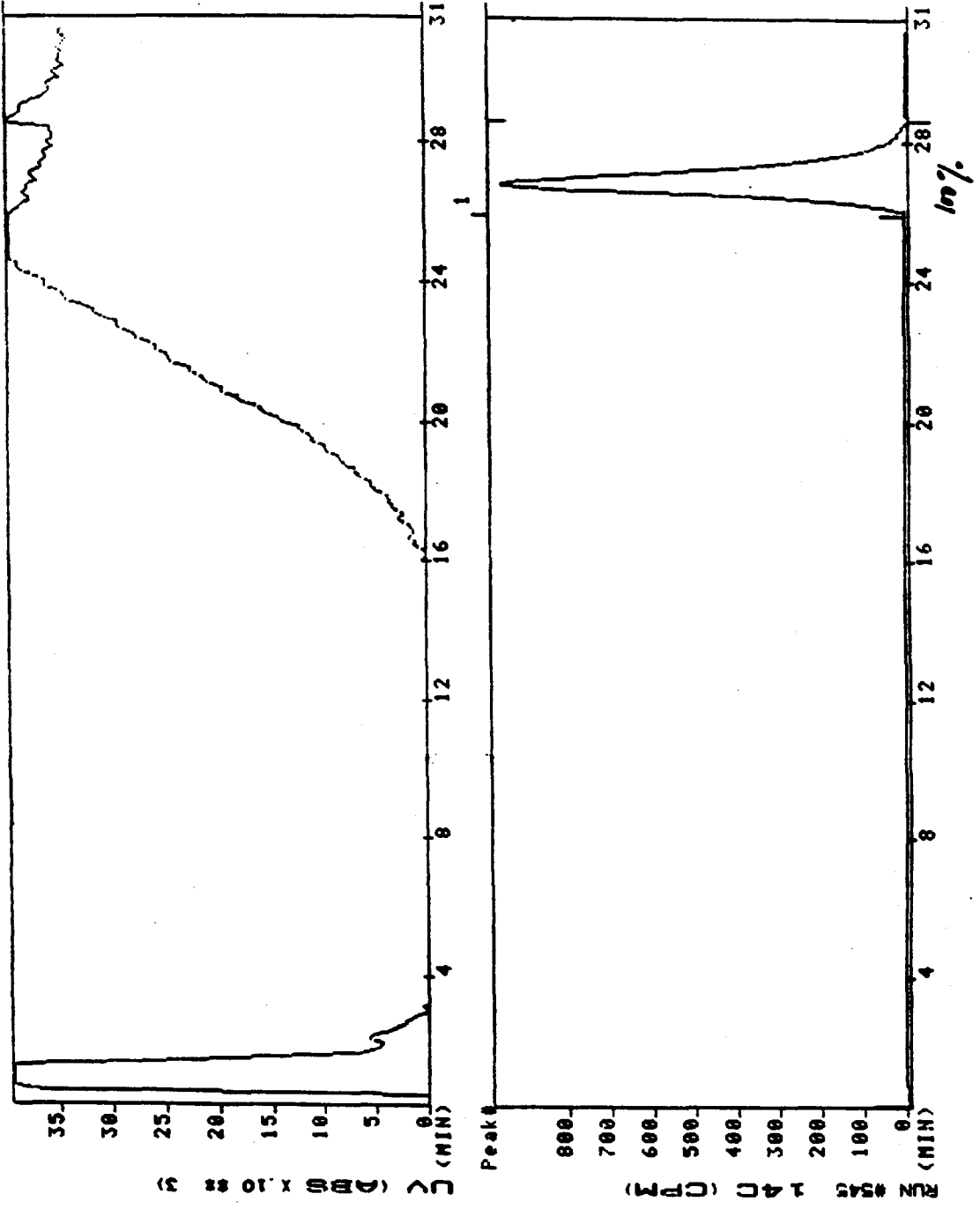
As diferenças que possam surgir entre os tempos de retenção observados para os cromatogramas para a detecção de radioisótopos, apresentados em anexo e os que foram apresentados nos resultados obtidos, são devido à distância que o efluente percorre desde que sai do detector de U.V. até atingir o detector de radioisótopos (110 cm), e que durante o processamento por computador esta diferença é anulada.

Vão ser apresentados os cromatogramas obtidos para as corridas 1 e 2 do ensaio de degradação do pesticida W328 e o cromatograma obtido da análise isolada do pesticida marcado.

CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA O PESTICIDA W328 MARCADO

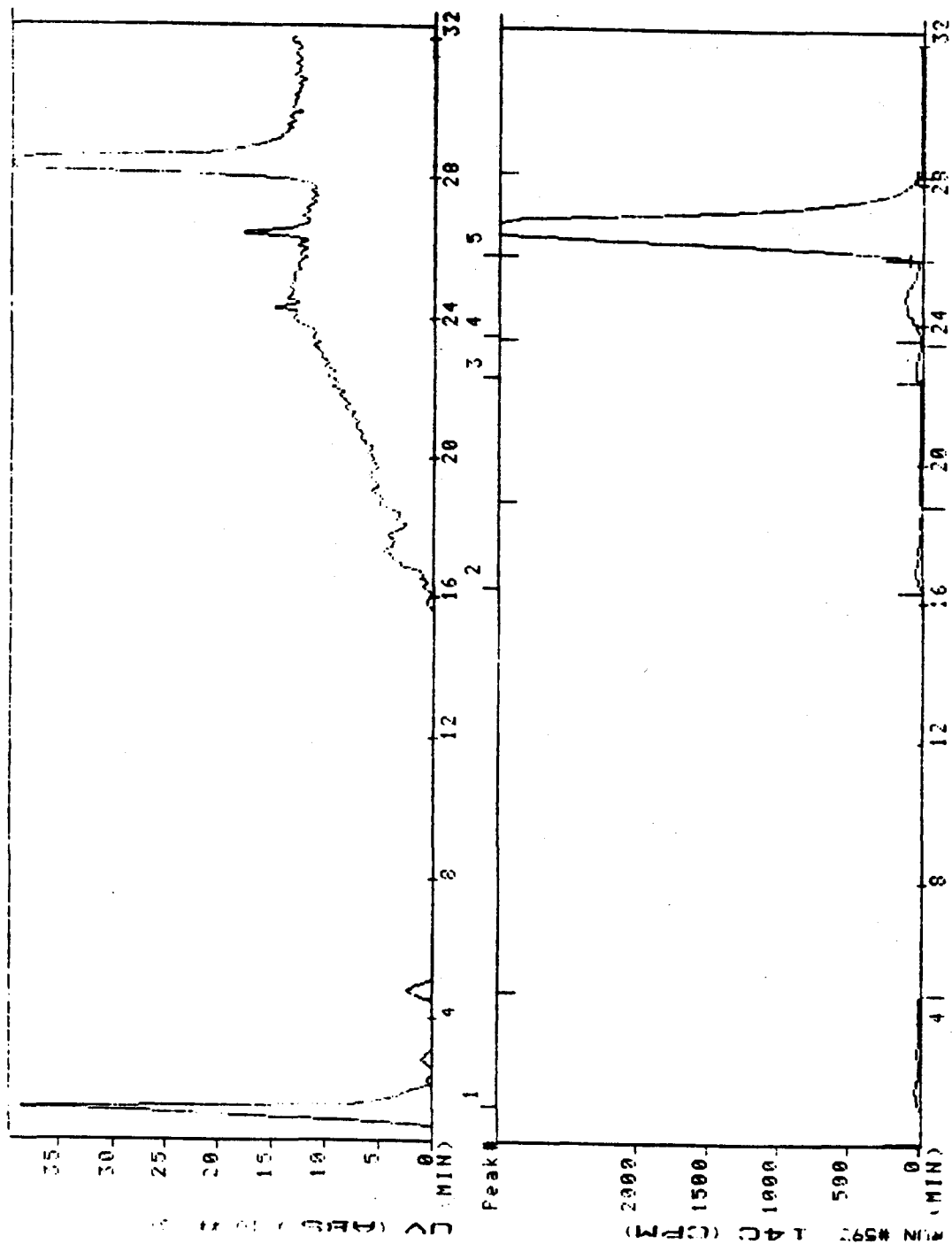
3-2-97 W-328

Ampl 3 (9x)



CROMATOGRAMA OBTIDA PARA A CORRIDA 1 DA DEGRADAÇÃO DE PESTICIDA RADIOMARCADO.

52-(52) FILE: PORTUG 21-2-97



CROMATOGRAMA OBTIDA PARA A CORRIDA 2 DA DEGRADAÇÃO DE PESTICIDA RADIOMARCADO.

FILE: PORTUG 2 71-2-97

