

# Mestrado Integrado em Engenharia Química

## Deteção de subprodutos resultantes da degradação do pesticida paraquato por oxidação química

### Tese de mestrado

de

Ruben Lopes Casal Ribeiro

Desenvolvida no âmbito da disciplina de Dissertação

Realizado em

Laboratório de Engenharia do Processo, Ambiente e Energia

Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto



Orientador na FEUP: Professora Arminda Alves

Professor Miguel Madeira



Departamento de Engenharia Química

Julho de 2012

---







## Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer aos Professores Arminda Alves e Miguel Madeira por toda a orientação, ajuda e disponibilidade prestada durante a realização desta tese.

Agradecer também à aluna de doutoramento Mónica Santos, por todos os conselhos, ajuda, paciência, simpatia e por todos os “sermões”.

A todos os investigadores do laboratório E201, por tão bem me terem recebido e integrado e por toda a boa disposição criada.

À Vera Teixeira e à Carina Carvalho, companheiras na “aventura” que foi realizar a tese de mestrado no laboratório E201, um muito obrigado e também toda a sorte do mundo para o trabalho que ainda têm pela frente.

À Joana Pimenta, por ter estado sempre do meu lado. Nos bons momentos, nos maus momentos, nos momentos de maior alegria e de maior tristeza, de maior dúvida e de maior certeza. Por nunca ter deixado de acreditar em mim e por nunca ter permitido que eu deixasse de acreditar que era capaz.

À Ana Soares, por toda a amizade, por toda a confiança, por todas as palavras de apoio sempre que foram precisas.

Ao Daniel Domingues, por ao longo dos últimos 6 anos ter sido padrinho, amigo, irmão, por ter sempre dito o que precisava de ouvir apesar de muitas vezes não ser o que eu gostava de ouvir.

A todas os amigos que ao longo destes 6 anos foram aparecendo e que marcaram este percurso que com esta tese se conclui: Sílvio Monteiro, Vítor Oliveira, Paulo Nunes, Ricardo Silva, Tiago Correia, Ana Tavares, Ana Cardoso, Cátia Sousa, Pedro Magalhães, Filipe Direito, Ricardo Teixeira, Sofia Cardoso, Ana Margarida Sousa, André Leal, Carlos Costa, Eduardo Fernandes, Gisela Oliveira, Vasco Benigno. Hélder Sousa, Diana Valdoleiros, João Bessa, Filipa Coelho, Sara Rodrigues, Mariana Barbosa, Catarina Araújo, Ana Sofia Campos, Gisela Lima, Flávia Figueiredo, Ana Pontvianne, Joana Pereira, Catarina Moreira, Ana Rocha, Mariana Rebelo, Fábio Pinto, Miguel Silva, Carla Santos e a todos os outros que mesmo não estando aqui referidos sabem que têm um lugar marcado nesta etapa da minha vida.

Também aos amigos de sempre, André Oliveira, José Oliveira, Carlos Camboa, Nuno Claro, André Ferreira, grupo de amigos que se manteve sempre junto e que sempre me apoiou. Também à Juliana Loureiro, por toda a amizade.

Queria também agradecer a toda a minha família, por sempre ter acreditado em mim, por nunca terem perdido a fé, por terem ajudado a que este sonho se tornasse possível.

---

Por fim, queria agradecer aos meus pais, as pessoas mais importantes, que mais se sacrificaram e esforçaram para me darem tudo o que sempre precisei, e todos os meios para que este meu sonho, que é o nosso, se concretizasse. Que tudo fizeram para que este momento chegasse.

---

## Resumo

O paraquato é um composto quaternário de amónio cuja utilização foi proibida na Europa devido ao seu elevado perigo para a saúde pública ( $DL_{50}$  por via oral em humanos de 35 mg/kg). Porém, foi largamente utilizado sob a forma de pesticida durante muitos anos, o que conduziu à sua acumulação no meio ambiente, sendo ainda utilizado nalgumas partes do mundo. Dadas as suas propriedades, é urgente encontrar soluções tecnológicas que permitam tratar águas que o contêm, mas que não originem compostos porventura ainda mais nocivos.

O objetivo deste trabalho é detetar e identificar os produtos de degradação do paraquato por oxidação com reagente de Fenton, utilizando as metodologias analíticas de HPLC-DAD e LC-MS e se possível quantificar os produtos de degradação identificados. A metodologia experimental envolveu a seleção de possíveis produtos de degradação com base em pesquisa bibliográfica, a implementação de um método analítico para a sua deteção e a identificação destes em ensaios de degradação de paraquato com reagente de Fenton.

Através da degradação de uma solução aquosa contendo  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de paraquato por oxidação com reagente de Fenton (condições de oxidação:  $[\text{Fe}^{2+}]_0 = 5,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 1,6 \times 10^{-2} \text{ M}$ ;  $T_0 = 30^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH}_0 = 3$ ) identificaram-se três compostos de degradação: ácido oxálico, ácido isonicotínico e ião 4-carboxi-1-metilpiridino. Com o intuito de calcular a importância relativa de cada um dos produtos de degradação identificados foi estimada a conversão de paraquato em cada um deles ao fim de 4 horas de reação, sendo o seu valor de 11% para o ácido oxálico, de 13% para o ião 4-carboxi-1-metilpiridino e de 3% para o ácido isonicotínico. Concluiu-se ainda que os produtos identificados e quantificados ao fim de 4 horas de reação representam 68% do carbono orgânico remanescente, que por sua vez corresponde ao carbono orgânico restante de uma mineralização de 60% de paraquato. A análise por LC-MS permitiu detetar mais 5 compostos cuja razão  $m/z$  é: 201, 265, 267, 283 e 291, provavelmente responsáveis pelos restantes 32% do carbono orgânico ao fim do mesmo tempo de reação.

**Palavras-chave (Tema):**

**Paraquato; *Liquid-Chromatography - Mass Spectrometry; High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector; Oxidação de Fenton; Produtos de degradação***

---

## Abstract

Paraquat is a quaternary ammonium compound whose use was forbidden in Europe due to its high risk for human health. However in many countries it is still been largely used as pesticide, leading to the accumulation of paraquat in the environment. It thus become urgent to find ways that allow an efficient removal of paraquat in contaminated waters. It's also important to assure that degradation products formed during the removal of paraquat are less dangerous than the parent compound itself.

The objective of the proposed work is to detect and identify the degradation products that result from the degradation of paraquat by Fenton's reagent, using HPLC-DAD and LC-MS and if possible to quantify the degradation products identified. The experimental methodology involved the selection of possible degradation products based on bibliographic research, the implementation of an analytical method for their detection and the identification of these substances in the degradation of paraquat with Fenton's reagent.

By degradation of an aqueous solution containing  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  of paraquat by oxidation with Fenton's reagent (oxidation conditions:  $[\text{Fe}^{2+}]_0 = 5,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 1,6 \times 10^{-2} \text{ M}$ ;  $T_0 = 30^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH}_0 = 3$ ) three compounds were identified as degradation products oxalic acid, isonicotinic acid and 4-carboxy-1-methylpyridinium ion. To calculate the relative importance of each of the degradation products identified, it was estimated the conversion of paraquat into each one of them after 4 hours of reaction. The conversion values estimated are: 11% to oxalic acid, 13% do 4-carboxy-1-methylpyridinium ion and 3% to isonicotinic acid. The degradation products identified represent 68% of the organic carbon remaining after 4 hours of reaction converted into the three degradation products identified. The organic carbon remaining after 4 hours of reaction, which, in turn, representes is 40% of the initial paraquat (60% of paraquat mineralization was reached after 4 hours).

Five other compounds were detected by LC-MS analysis, whose molecular ion presented  $m/z$  201,  $m/z$  265,  $m/z$  267,  $m/z$  283 and  $m/z$  291, probably responsible for the remaining 32% of the organic carbon not identified at the end of 4 hours of reaction.

---

## **Declaração**

Declara, sob compromisso de honra, que este trabalho é original e que todas as contribuições não originais foram devidamente referenciadas com identificação da fonte

30 De Julho de 2012

---

# Índice

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b><i>Enquadramento e Apresentação do Projecto.....</i></b>	<b>1</b>
1.1.1	Paraquato .....	1
1.1.2	Processos de oxidação avançados para a degradação de compostos orgânicos .....	3
1.1.3	Métodos Analíticos para a deteção dos produtos de degradação do paraquato .....	4
<b>1.2</b>	<b><i>Contributos do Trabalho .....</i></b>	<b>10</b>
<b>1.3</b>	<b><i>Organização da Tese.....</i></b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>Estado da Arte.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1</b>	<b><i>Degradação do paraquato com reagente de Fenton.....</i></b>	<b>11</b>
<b>2.2</b>	<b><i>Processos de oxidação avançados para degradação do paraquato e produtos de degradação identificados.....</i></b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>Descrição Técnica .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b><i>Reagentes .....</i></b>	<b>17</b>
<b>3.2</b>	<b><i>Preparação de padrões .....</i></b>	<b>17</b>
<b>3.3</b>	<b><i>Métodos Analíticos .....</i></b>	<b>18</b>
3.3.1	HPLC-DAD para identificação e quantificação do paraquato e do ácido oxálico.....	18
3.3.2	LC-MS para identificação do paraquato e identificação e quantificação do ácido isonicotínico e do ião 4-carboxi-1-metipiridino .....	18
<b>3.4</b>	<b><i>Condições experimentais da reação de Fenton .....</i></b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>Discussão de Resultados.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1</b>	<b><i>Identificação do Paraquato.....</i></b>	<b>20</b>
4.1.1	Identificação por HPLC-DAD.....	20
4.1.2	Identificação em LC-MS .....	22
<b>4.2</b>	<b><i>Quantificação do Paraquato .....</i></b>	<b>25</b>
<b>4.3</b>	<b><i>Análise do Paraquato ao longo de uma Reação de Fenton .....</i></b>	<b>26</b>
<b>4.4</b>	<b><i>Identificação dos Produtos de Degradação do Paraquato .....</i></b>	<b>28</b>
4.4.1	Seleção dos possíveis produtos de degradação a estudar .....	30

4.4.2	Identificação dos produtos de degradação do paraquato adquiridos comercialmente em HPLC-DAD .....	30
4.4.3	Identificação dos produtos de degradação do paraquato adquiridos comercialmente em LC-MS .....	32
<b>4.5</b>	<b><i>Estimativa da Quantificação dos produtos de degradação identificados</i></b> .....	<b>33</b>
4.5.1	Quantificação do ácido oxálico por HPLC-DAD .....	34
4.5.2	Quantificação do ácido isonicotínico por LC-MS .....	37
4.5.3	Quantificação do ião 4-carboxi-1-metilpiridino por LC-MS.....	40
<b>4.6</b>	<b><i>Avaliação da evolução de outros produtos de degradação detetados ao longo da reação de Fenton em LC-MS</i></b> .....	<b>42</b>
4.6.1	Evolução da área cromatográfica dos restantes produtos de degradação detetados em LC-MS .....	43
4.6.2	Possíveis estruturas moleculares dos restantes compostos identificados por LC-MS.....	43
<b>5</b>	<b>Conclusões</b> .....	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>Avaliação do trabalho realizado</b> .....	<b>47</b>
<b>6.1</b>	<b><i>Objetivos Realizados</i></b> .....	<b>47</b>
<b>6.2</b>	<b><i>Outros Trabalhos realizados</i></b> .....	<b>47</b>
<b>6.3</b>	<b><i>Limitações e Trabalho Futuro</i></b> .....	<b>47</b>
<b>6.4</b>	<b><i>Apreciação final</i></b> .....	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>Referências</b> .....	<b>48</b>
<b>Anexo 1</b>	<b>: Processos oxidativos avançados para degradação do paraquato</b> .....	<b>50</b>
<b>Anexo 2</b>	<b>: Identificação dos produtos de degradação do paraquato</b> .....	<b>54</b>
<b>2.1</b>	<b><i>Identificação dos produtos de degradação do paraquato por HPLC-DAD</i></b> .....	<b>54</b>
<b>2.2</b>	<b><i>Identificação dos produtos de degradação por LC-MS</i></b> .....	<b>58</b>
<b>Anexo 3</b>	<b>: Cálculo da conversão de paraquato nos produtos de degradação identificados</b> ....	<b>62</b>
<b>3.1</b>	<b><i>Cálculo da conversão de paraquato em ácido oxálico</i></b> .....	<b>62</b>
<b>3.2</b>	<b><i>Cálculo da conversão do paraquato em ácido isonicotínico</i></b> .....	<b>63</b>
<b>3.3</b>	<b><i>Cálculo da conversão de paraquato no ião 1-carboxi-4-metilpiridino</i></b> .....	<b>64</b>

## Notação e Glossário

$E^0$	Potencial de redução padrão	V
CV	Coeficiente de variação	%
f	Fator de resposta	UA.(mg.L <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup>
M	Massa molar	g.mol <sup>-1</sup>
m/z	Razão carga-massa	
$n_{experimental}$	Quantidade de produto de degradação ao longo da reação de Fenton	mol
$n_{paraquato\ inicial}$	Quantidade de paraquato no início da reação de Fenton	mol
R <sup>2</sup>	Coeficiente de correlação	M
T	Temperatura	°C

### Lista de Siglas

ACN	Acetonitrilo
APCI	Ionização química à pressão atmosférica
API	Ionização à pressão atmosférica
CV	Coeficiente de Variação
DAD	Detetor de díodos
DL <sub>50</sub>	Dose letal mediana
ESI	Ionização em <i>electrospray</i>
GC	Cromatografia gasosa
HFBA	Ácido Heptafluorobutirico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ICI	<i>Imperial Chemical Industries</i>
LEPAE	Laboratório de Engenharia de Processos, Ambiente e Energia
LC	Cromatografia líquida
MS	Espetroscopia de massa
QqQ	Triplo quadrupolo
PQ	Paraquato
RF	Corrente variável
RP	Fase Reversa
TLC	Cromatografia de placa plana
ToF	<i>Time-of-Flight</i>
UV	Ultravioleta
WFD	<i>Water Framework Directive</i>

## Índice de Figuras

Figura 1.1: Esquema de um DAD [13] .....	5
Figura 1.2 Módulos de um sistema de LC-MS [14] .....	6
Figura 1.3: Diagrama de fonte de ionização por electrospray (ESI) <sup>[14]</sup> .....	7
Figura 1.4: Esquema de um analisador ion-trap (adaptado de <a href="http://www.shimadzu.com">www.shimadzu.com</a> ) .....	9
Figura 1.5: Exemplo de Espectro de massa (adaptado de <a href="http://www.scielo.br">www.scielo.br</a> ) .....	9
Figura 2.1: Evolução dos produtos intermediários da degradação do paraquato através da oxidação de Fenton. Condições da oxidação de Fenton: pH = 3.0, [Paraquato] <sub>0</sub> = 20mg.L <sup>-1</sup> , [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] <sub>0</sub> = 20 mM e [Fe <sup>2+</sup> ] <sub>0</sub> = 2 mM. (Adaptado do artigo “Degradation of Paraquat herbicide by electrochemical advanced oxidation methods”[19]) .....	11
Figura 2.2: Evolução ao longo do tempo dos ácidos carboxílicos produzidos durante a degradação do paraquato através da reação de Fenton clássico (Ácido oxálico a preto, ácido fórmico a vermelho, ácido acético a verde e ácido succínico a azul). Condições da oxidação de Fenton: pH = 3.0, [Paraquato] <sub>0</sub> = 20mg.L <sup>-2</sup> , [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] <sub>0</sub> = 20 mM e [Fe <sup>2+</sup> ] <sub>0</sub> = 2 mM. (Adaptado do artigo “Degradation of Paraquat herbicide by electrochemical advanced oxidation methods”[19]).....	12
Figura 2.3: Possível caminho de degradação do paraquato (adaptado do artigo “UV-ozonation of paraquato”[20]).....	13
Figura 2.4: Estruturas molecular de 4,4'-bipiridil a) e do 4-metil-piridino b). (adaptado do artigo “Removal of Paraquat in aqueous suspension of TiO <sub>2</sub> in an immersed UV photoreactor-” [22]).....	15
Figura 4.1: Cromatograma de um padrão de 100 mg.L <sup>-1</sup> de paraquato em água. Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de acetonitrilo; 1 mL.min <sup>-1</sup> ; volume de injeção de 99 µL.....	20
Figura 4.2: Espectro de um padrão de 100 mg.L <sup>-1</sup> de paraquato em água. Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de acetonitrilo; 1 mL.min <sup>-1</sup> ; volume de injeção de 99 µL.....	21
Figura 4.3: Cromatograma de uma amostra de paraquato aos 30 minutos da reação de Fenton. Condições de oxidação: [Paraquato] = 100 mg.L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>2+</sup> ] = 5,0 × 10 <sup>-4</sup> M; [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] = 1,6 × 10 <sup>-2</sup> M; T = 30°C; pH = 3. Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de acetonitrilo; 1 mL.min <sup>-1</sup> ; volume de injeção de 99 µL.....	21
Figura 4.4: Espectro de uma amostra de paraquato retirada aos 30 minutos de reação de Fenton no tempo de retenção 6,71 minutos. Condições de oxidação: [Paraquato] = 100 mg.L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>2+</sup> ] = 5,0 × 10 <sup>-4</sup> M; [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] = 1,6 × 10 <sup>-2</sup> M; T = 30°C; pH = 3). Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de acetonitrilo; 1 mL.min <sup>-1</sup> ; volume de injeção de 99 µL.....	22
Figura 4.5: Cromatograma de uma solução padrão de 100 mg.L <sup>-1</sup> paraquato em água, em modo full scan (figura de cima) e cromatograma obtido após seleção do ião com razão m/z de 185 (figura de baixo). Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 5 mM e 20% de metanol; 1 mL.min <sup>-1</sup> ; volume de injeção de 99 µL. ....	23

Figura 4.6: Espectro de massa da solução de concentração 100 mg.L <sup>-1</sup> de paraquato em água.....	23
Figura 4.7: Cromatograma de amostra da reação de Fenton no modo full scan (figura de cima) e cromatograma obtido após seleção do íão com razão m/z de 185 (figura de baixo). Condições de oxidação: [PQ] = 100 mg.L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>2+</sup> ] = 5,0 × 10 <sup>-4</sup> M; [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] = 1,6 × 10 <sup>-2</sup> M; T = 30°C; pH = 3. Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 5 mM e 20% de metanol; 1 mL.min <sup>-1</sup> ; volume de injeção de 99 µL. ....	24
Figura 4.8: Espectro de massa da amostra de paraquato na reação de Fenton no minuto 30.....	24
Figura 4.9: Comparação de um cromatograma de uma amostra da reação de Fenton com adição de sulfito ([Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ] = 9,6 × 10 <sup>-2</sup> M) (a) e um sem adição de sulfito (b) . Fase móvel utilizada: 80 % de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de Acetonitrilo. Condições da reação de Fenton: [PQ] = 100 mg.L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>2+</sup> ] = 5,0 × 10 <sup>-4</sup> M; [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] = 1,6 × 10 <sup>-2</sup> M; T = 30°C; pH = 3. ....	26
Figura 4.10: Comparação da remoção de paraquato através de reação de Fenton, com adição de sulfito de sódio e sem adição de sulfito de sódio. ....	27
Figura 4.11: Comparação das curvas degradação de paraquato em água por oxidação com reagente de Fenton obtidas em dois dias diferentes. Condições da reação de Fenton: [Paraquato] = 100 mg.L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>2+</sup> ] = 5,0 × 10 <sup>-4</sup> M; [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] = 1,6 × 10 <sup>-2</sup> M; T = 30°C; pH = 3.....	28
Figura 4.12: Comparação de dois cromatogramas correspondentes à injeção de uma amostra de Fenton ao fim de 180 minutos de reação, no dia 29-02-2012 (a azul) e no dia 23-02-2012 (a verde). Fase móvel utilizada: 80 % de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de Acetonitrilo, 1 mL.min <sup>-1</sup> , 99 µL de volume de injeção. Condições da reação de Fenton: [PQ] = 500 mg.L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>2+</sup> ] = 5 × 10 <sup>-4</sup> M; [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] = 1,6 × 10 <sup>-2</sup> M; T = 30°C; pH = 3. ....	29
Figura 4.13: Cromatograma da injeção de um padrão de paraquato de 500 mg.L <sup>-1</sup> em água. Fase móvel utilizada: 80 % de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de Acetonitrilo, 1 mL.min <sup>-1</sup> , 99 µL de volume de injeção. ....	29
Figura 4.14: Estruturas moleculares: a) íão 4-carboxi-1-metilpiridínio e b) íão 1-Etil-4-metoxicarbonilpiridínio ...	30
Figura 4.15: Comparação de cromatogramas obtidos a partir da injeção de uma amostra da reação de Fenton (a azul) e da injeção de uma amostra da reação de Fenton a que se adicionou 0,5 mL de uma solução de 50 mg.L <sup>-1</sup> de ácido oxálico.....	31
Figura 4.16: Comparação do espectro de massa do íão1-etil-4-metoxicarbonilpiridino (imagem da esquerda) com o espectro de massa do 4-carboxi-1-metilpiridino formado na reação de Fenton (imagem da direita). ....	33
Figura 4.17: Variação da concentração de ácido oxálico obtido da injeção de amostras da reação de Fenton retiradas ao longo do tempo. Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de acetonitrilo; 1 mL.min <sup>-1</sup> ; volume de injeção de 99 µL. Condições da reação de Fenton: [PQ] = 100 mg.L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>2+</sup> ] = 5,0 × 10 <sup>-4</sup> M; [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] = 1,6 <sup>-2</sup> M; T = 30°C; pH = 3. ....	36
Figura 4.18: Variação da concentração de ácido isonicotínico em função do tempo da reação de Fenton. Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 5 mM e 20% de metanol; 0,2 mL.min <sup>-1</sup> ; volume de injeção de 99 µL. Condições da reação de Fenton: [PQ] = 100 mg.L <sup>-1</sup> ; [Fe <sup>2+</sup> ] = 5,0 × 10 <sup>-4</sup> M; [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] = 1,6 <sup>-2</sup> M; T = 30°C; pH = 3. ....	39

- Figura 4.19:** Variação da concentração do ião 4-carboxi-1-metilpiridino em função do tempo da reação de Fenton. Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 5 mM e 20% de metanol; 0,2 mL.min<sup>-1</sup>; volume de injeção de 99 µL. Condições da reação de Fenton: [PQ] = 100 mg.L<sup>-1</sup>; [Fe<sup>2+</sup>] = 5,0 × 10<sup>-4</sup> M; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 1,6<sup>-2</sup> M; T = 30°C; pH = 3. ....41
- Figura 4.20:** Variação da área cromatográfica dos restantes iões moleculares detetados em LC-MS em função do tempo da reação de Fenton. Fase móvel utilizada: 80 % de água acidificada com HFBA 5 mM e 20% de Metanol. Condições da reação de Fenton: [PQ] = 100 mg.L<sup>-1</sup>; [Fe<sup>2+</sup>] = 5 × 10<sup>-4</sup> M; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 1,6<sup>-2</sup> M; T = 30°C; pH = 3. ....43
- Figura 4.21:** Estrutura molecular para a monopiridona .....44
- Figura 4.22:** Estrutura molecular possível para o composto com ião molecular identificado em LC-MS de 283 ....44

## Índice de Tabelas

Tabela 1.1: Propriedades Físico-Químicas do Paraquato [4] .....	2
Tabela 1.2: Adutos mais comuns em ESI <sup>[16]</sup> (M = composto a analisar, x = coeficiente estequiométrico, n = carga do ião gerado, z = carga do composto) .....	8
Tabela 2.1: Possíveis produtos de degradação do paraquato .....	16
Tabela 4.1: Comparação entre os valores de tempo de retenção e máximo de absorvância obtidos através da injeção de um padrão de paraquato de 100 mg.L <sup>-1</sup> em água e de uma amostra da reação de Fenton em HPLC-DAD. ....	22
Tabela 4.2: Comparação entre os valores de tempo de retenção e ião molecular obtidos através da injeção de padrões de paraquato de 100 mg.L <sup>-1</sup> em água e de amostras de paraquato na reação de Fenton em LC-MS .....	25
Tabela 4.3: Parâmetros calculados para a validação do método (Santos, M. (dados não publicados)) .....	26
Tabela 4.4: Tempos de retenção e máximos de absorção dos padrões dos possíveis produtos de degradação adquiridos comercialmente .....	31
Tabela 4.5: Tempo de retenção e razão m/z para os compostos de degradação injetados em LC-MS .....	32
Tabela 4.6: Incerteza associada ao método de quantificação de ácido oxálico em HPLC-DAD .....	34
Tabela 4.7: Análise da Interferência do Fe (II) e peróxido de hidrogénio na quantificação do ácido oxálico em HPLC-DAD. ....	35
Tabela 4.8: Conversão do paraquato em ácido oxálico ao longo da reação de Fenton .....	36
Tabela 4.9: Comparação da toxicidade do ácido oxálico e do paraquato .....	37
Tabela 4.10: Incerteza associada ao método de quantificação de ácido isonicotínico em LC-MS.....	37
Tabela 4.11: Análise da Interferência dos elementos da Reação de Fenton na quantificação de ácido isonicotínico em LC-MS.....	38
Tabela 4.12: Conversão de paraquato em ácido isonicotínico ao longo da reação de Fenton .....	39
Tabela 4.13: Comparação dos valores de toxicidade do paraquato e do ácido isonicotínico. ....	40
Tabela 4.14: Incerteza associada ao método de quantificação do ião 4-carboxi-1-metilpiridino em LC-MS.....	40
Tabela 4.15: Análise da Interferência do Fe (II) e peróxido de hidrogénio na quantificação do ião 1-etil-4-metoxycarbonilpiridino em LC-MS.....	41
Tabela 4.16: Conversão do paraquato no ião 4-carboxi-1-metilpiridino .....	42
Tabela A1.6.1: Processos avançados de oxidação para degradação do Paraquato (adaptado de "Paraquat removal from water by oxidation with Fenton's reagent"[18]) .....	51



# 1 Introdução

## 1.1 Enquadramento e Apresentação do Projecto

A água é um bem essencial para a manutenção da vida de todos os seres vivos. Ela é responsável por diversas funções vitais para a sobrevivência dos seres humanos e é utilizada regularmente no nosso dia-a-dia. Assim sendo, torna-se cada vez mais relevante garantir que a qualidade da água disponível seja a mais elevada possível.

Vários contaminantes ou poluentes foram identificados como prejudiciais para os ecossistemas aquáticos existentes na união europeia. Na *European Water Framework Directive* (WFD) encontra-se a lista das 33 substâncias que são consideradas prioritárias [1]. Os poluentes podem ter origem química, biológica, radioativa ou natural. Dentro dos contaminantes químicos considerados como prejudiciais, esta tese focar-se-á num herbicida, mais especificamente o paraquato. Este composto tem gerado uma grande preocupação no que diz respeito à sua utilização excessiva, dado tratar-se de um herbicida extremamente tóxico para o meio ambiente e ser humano.

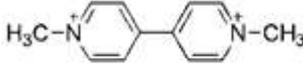
Neste contexto, o LEPAE (Laboratórios de Engenharia de Processos, Ambiente e Energia), onde foi realizada a presente tese, participa num projeto europeu (SECUREAU [2]) cujo objetivo é garantir uma resposta apropriada a uma contaminação deliberada da rede de água. Para tal pretendem-se desenvolver metodologias que permitam identificar novos contaminantes, modelar a distribuição de contaminantes ao longo da rede e identificar o ponto de origem da contaminação, adaptar e integrar vários sensores de um sistema de vigilância e desenvolver métodos para descontaminar a rede de água potável poluída (bem como instalações que incluam a neutralização de águas contaminadas e resíduos).

A presente tese encontra-se enquadrada nos objetivos do projeto SecurEau, que selecionou o paraquato como um dos contaminantes químicos modelo.

### 1.1.1 Paraquato

O paraquato ( $C_{12}H_{14}N_2$ ) é um composto quaternário de amónio cujo nome científico é 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto. A sua forma comercial mais conhecida é o Gramoxone estando disponível em soluções aquosas entre 24 a 36% em massa [3]. Na Tabela 1.1 estão identificadas algumas das suas propriedades físico-químicas mais importantes.

**Tabela 1.1: Propriedades Físico-Químicas do Paraquato [4]**

Propriedades Físico-Químicas	
Massa molecular, g/mol	186
Cor	Incolor
Estado físico	Sólido
Cheiro	Inodoro
Ponto de fusão, °C	175-180
Massa volúmica a 20 °C	1,24
Solubilidade em água a 20 °C, g/L	700
Solubilidade em outros solventes	Praticamente insolúvel em solventes orgânicos
Estrutura Química	

A principal aplicação do paraquato é como herbicida de contacto, usado em mais de 130 países essencialmente para controlo de ervas daninhas [5]. Foi sintetizado pela primeira vez em 1882, sendo que as suas propriedades de herbicida foram apenas descobertas em 1955. Em 1961, foi comercializado pela primeira vez nos laboratórios da ICI, *Imperial Chemical Industries* atualmente denominada de Zeneca [3].

Rapidamente se tornou num dos pesticidas mais utilizados, devido ao seu baixo preço e baixo impacto ambiental nos solos. Contudo, o uso do paraquato apresenta também desvantagens. Esta é uma substância tóxica para os seres humanos, tendo-se estimado que a dose letal (via oral) que mata 50% da população,  $DL_{50}$ , é 35 mg/kg [6]. Sempre que ingerido deve ser considerado como potencialmente grave para o organismo humano.

O seu uso exagerado aumenta o risco de contaminação das águas residuais, devido às águas de lixiviação dos processos agrícolas. Estas águas são previamente tratadas antes de serem novamente abastecidas às populações. Contudo, como ainda não existem técnicas eficazes de remoção do paraquato, este poderá ainda estar presente nas águas de abastecimento público. Para além disso, poderá também existir o perigo de contaminação deliberada das redes de água de fornecimento público.

Devido aos perigos inerentes ao seu uso, alguns países europeus proibiram a sua utilização, tendo essa iniciativa partido de alguns países da Escandinávia [7]. No entanto esta medida não foi globalmente incorporada, o que faz com que na atualidade o paraquato continue a ser um dos

pesticidas mais utilizados, conduzindo a um aumento da sua concentração nas águas residuais e consequente contaminação das mesmas.

### 1.1.2 Processos de oxidação avançados para a degradação de compostos orgânicos

Face os efeitos maléficos provocados pelo paraquato, torna-se necessário encontrar uma forma de minimizar a concentração deste poluente na água. Os processos mais convencionais de tratamento (processos biológicos ou físico-químicos) apresentam algumas limitações. Os processos biológicos não conseguem degradar eficazmente todos os poluentes, por serem muito lentos e por muitos dos poluentes serem tóxicos para os microrganismos. Por sua vez, os processos físico-químicos apenas removem parcialmente os contaminantes [1, 8], e quando o conseguem na totalidade apenas os transferem para outra fase, não os eliminando (ex.: adsorção, coagulação/floculação, etc.).

Como alternativa eficaz aos processos tradicionais de tratamento de águas apareceram os processos avançados de oxidação. Estes levam à formação dos radicais hidroxilo em quantidade suficiente que permita oxidar e remover a maioria dos compostos orgânicos e alguns compostos inorgânicos existentes num efluente [9].

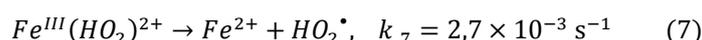
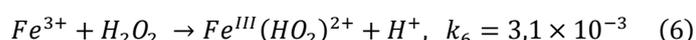
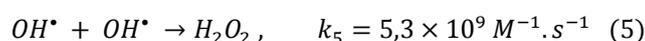
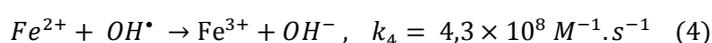
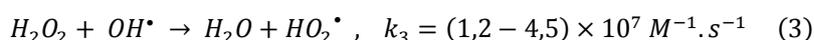
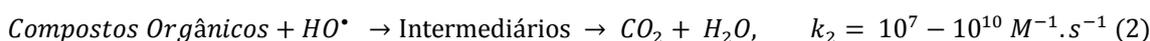
Os radicais hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ) são fortes agentes oxidantes com potencial eletroquímico  $E^0 = 2,3 V$  [10]. Os radicais hidroxilo são não-seletivos, tendo por isso capacidade para transformar uma grande variedade de compostos químicos (orgânicos ou não) em compostos intermediários, sendo que em caso de degradação completa, os compostos iniciais são degradados em  $CO_2$  e  $H_2O$ .

No âmbito da realização deste trabalho o processo oxidativo utilizado foi a oxidação com reagente de Fenton. O reagente de Fenton é a combinação do peróxido de hidrogénio com um ião de ferro (ferro II ou ferro III). A oxidação com reagente de Fenton foi descoberta em 1876 por H.J.H Fenton [10]. Este observou que uma solução de peróxido de hidrogénio e de iões  $Fe^{2+}$  conseguia oxidar um número considerável de moléculas orgânicas sem necessidade de recorrer a temperaturas e pressões elevadas ou a equipamento muito sofisticado.

De uma forma muito sucinta a reação de Fenton pode ser descrita pelo seguinte conjunto de reações principais [11, 12].

Em (1) está representada a reação do peróxido de hidrogénio com o ião  $Fe^{2+}$ . Nesta reação, o ferro (II) é oxidado a ferro (III) formando-se espécies com elevado poder oxidante, os radicais hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ). Na reação (2) está demonstrada a degradação dos compostos orgânicos por ação dos radicais hidroxilo. Numa primeira fase, o ataque dos radicais  $OH^{\bullet}$  leva à formação de alguns produtos de degradação intermediários. Estes são, por sua vez, degradados a compostos mais simples que poderão, em última instância, ser transformados em  $CO_2$  e  $H_2O$ . Nas reações (3) a (7) estão representadas

algumas reações paralelas ao processo da oxidação de Fenton. Em (3), (4) e (5) parte dos radicais hidroxilo são utilizados para formar outros radicais com um poder oxidativo menor. Essas reações são indesejadas e diminuem a eficiência do processo, pois consomem parte do peróxido de hidrogénio adicionado inicialmente. As Reações (6) e (7) dizem respeito à reação entre o ião  $Fe^{3+}$  formado e o peróxido de hidrogénio, onde se verifica a regeneração do catalisador.



Vários fatores condicionam a eficiência de um processo de oxidação baseado na reação de Fenton. Para além da natureza do composto de partida e da sua concentração em solução, também o pH, a concentração do ião  $Fe^{2+}$ , a concentração do peróxido utilizado e a temperatura influenciam a *performance* do processo na degradação de um dado composto orgânico ou de um efluente mais complexo [10].

### 1.1.3 Métodos Analíticos para a deteção dos produtos de degradação do paraquato

Um dos objetivos principais do trabalho realizado é a deteção dos produtos de degradação do paraquato. Para o conseguir, recorreu-se a cromatografia líquida, *high performance liquid chromatography* (HPLC) associada a dois tipos de detetor: *diode array detector* (HPLC-DAD) e de espectroscopia de massa (LC-MS). Por este facto, e tendo como base os princípios do método da cromatografia de alta eficiência (HPLC), já bem conhecidos, abordam-se apenas os princípios dos dois sistemas de deteção utilizados

#### 1.1.3.1 Diode Array Detector (DAD)

Num sistema de HPLC quando o detetor utilizado é um *Diode array detector* (DAD) o processo costuma-se designar por HPLC-DAD. Os DAD incluem-se nos detetores de absorvância da radiação UV/Visível de múltiplos comprimentos de onda. Existem dois tipos destes detetores: os detetores de

dispersão e os DAD. A principal diferença entre ambos encontra-se no facto de que os detetores de dispersão apenas analisam a amostra quando sai da coluna cromatográfica num comprimento de onda específico. Por sua vez os DAD fazem a análise da absorção da radiação UV/Vis numa gama alargada de comprimentos de onda [13].

O detetor de DAD é composto por uma fonte de radiação, uma célula por onde passa a amostra, um dispositivo de dispersão e um conjunto de díodos. Uma representação esquemática de um DAD está apresentada na Figura 1.1.

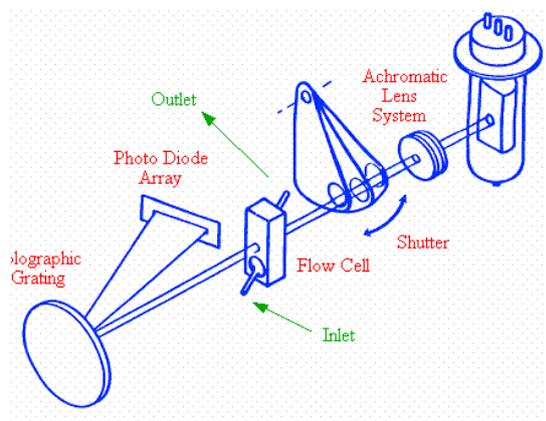


Figura 1.1: Esquema de um DAD [13]

A fonte de radiação tem como objetivo fornecer radiação com intensidade suficiente para abranger todas as gamas de comprimentos de onda da gama UV/Visível. Para tal acontecer normalmente utiliza-se como fonte de radiação uma lâmpada de deutério, para maior sensibilidade na gama de comprimentos de onda da radiação UV (190 a 380 nm) e uma lâmpada de tungsténio, para garantir os comprimentos de onda na gama da radiação Visível (380 a 700 nm) [13].

A radiação vai incidir na célula que contém a amostra. Essa célula tem uma entrada, para onde a amostra, após sair da coluna cromatográfica, é encaminhada. Aí a amostra vai ser sujeita a radiação com todos os comprimentos de onda gerados pela fonte de radiação, saindo depois da célula.

Depois de atravessar a amostra, a luz vai para um dispositivo de dispersão. Estes dispositivos inicialmente eram prismas de quartzo, sendo que atualmente utilizam-se maioritariamente redes de dispersão holográfica. Aí a luz é dispersa, sendo enviada para o arranjo de díodos.

Este arranjo de díodos pode conter várias centenas de díodos, sendo que cada um deles é responsável pela análise de uma pequena gama de comprimentos de onda que lhe são enviados. Depois de efetuada essa análise, o díodo envia um sinal para um computador onde esse mesmo sinal pode ser

analisado. Juntando o sinal de todos os díodos do arranjo, consegue-se obter o espectro da amostra, isto é, a curva que relaciona a absorção com o comprimento de onda [13].

### 1.1.3.2 Espectroscopia de Massa (MS)

Quando o detetor utilizado é um de espectroscopia de massa, convencionou-se que a técnica utilizada denomina-se LC-MS, apesar do processo cromatográfico continuar a ser em HPLC.

A LC-MS é uma técnica hifenada onde ao poder de separação em HPLC é acoplado um detector de espectroscopia de massa. Os elementos constituintes de um sistema de LC-MS e a sua sequência estão representados na Figura 1.2.

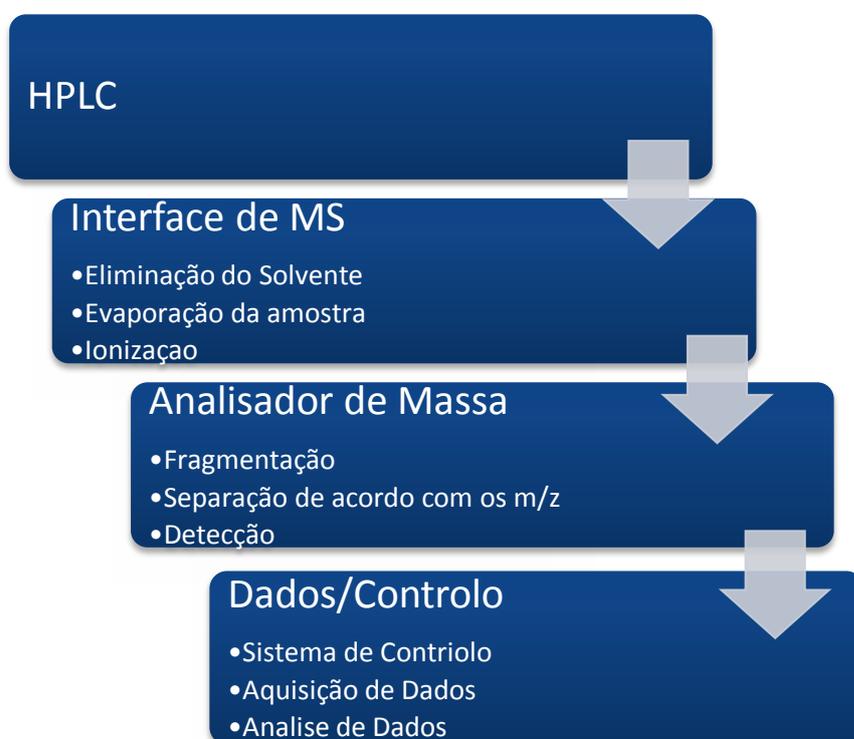
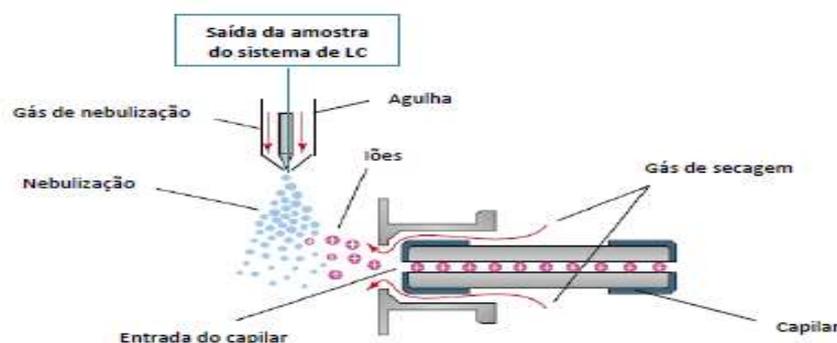


Figura 1.2 Módulos de um sistema de LC-MS [14]

#### 1.1.3.2.1 Interface do MS

A interface do MS é utilizada para promover a eliminação do solvente e gerar iões da amostra a analisar em fase gasosa, procedendo-se numa primeira fase à evaporação da amostra e em seguida à sua respetiva ionização, assegurando-se assim o nível de vácuo necessário para o funcionamento do MS. Para este processo são geralmente utilizadas fontes de ionização à pressão atmosférica (API) [14]. Dentro destas fontes de ionização destacam-se as fontes de ionização por *electrospray* (ESI) e por ionização química (APCI).

O esquema de funcionamento de uma fonte de ionização por *electrospray* (fonte utilizada no decorrer deste trabalho) encontra-se representado na Figura 1.3.



**Figura 1.3: Diagrama de fonte de ionização por electrospray (ESI)<sup>[14]</sup>**

A amostra proveniente da coluna de HPLC atravessa uma agulha que é rodeada pelo gás de nebulização. A amostra líquida vai sendo nebulizada, passando a pequenas gotículas, sendo posteriormente lançada na câmara de ionização. Aí essas gotículas vão diminuindo progressivamente de tamanho, devido à evaporação do solvente, aumentando assim o campo elétrico existente à superfície do analito. Este aumento do campo elétrico leva ao aumento das repulsões de Coulomb, que ultrapassam as tensões superficiais existentes nas gotículas, levando à separação e formação de microgotículas [14].

Por último, existe a passagem dos íões das microgotículas para a fase gasosa. A explicação sobre qual mecanismo leva a este fenómeno não é consensual. Uma das hipóteses possíveis diz que a passagem se deve à evaporação das microgotículas (modelo *charge-residue*), enquanto outra hipótese defende que tal sucede devido a dessorção dos íões para a fase gasosa devido à grande intensidade do campo elétrico (modelo *ion-evaporation*) [15].

Neste tipo de ionização realiza-se uma transferência iónica, isto é, ocorre a aceitação ou a doação de um protão por parte do analito. Poderá portanto ocorrer a formação de adutos que serão sempre identificados no espectro de massa. A formação dos adutos depende também do tipo de ionização: positiva ou negativa. Na Tabela 1.2 apresenta-se a lista dos adutos mais comuns em ESI.

**Tabela 1.2: Adutos mais comuns em ESI<sup>[16]</sup> (M = composto a analisar, x = coeficiente estequiométrico, n = carga do íon gerado, z = carga do composto)**

Modo Positivo		Modo Negativo	
Íon	m/z	Íon	m/z
$[M+H]^+$	M+1	$[M-H]^+$	M-1
$[M+nH]^{n+}$	(M+n)/n	$[M-nH]^{n-}$	(M-n)/n
$[M+NH_4]^+$	M+18		
$[M+Na]^+$	M+23		
$[M+K]^+$	M+39		
$M^{n+}+xCH_3CN$	(M+41x)/n		
$M^{n+}+xCH_3COOH$	(M+60x)/n		
$M^{n+}+xHCOOH$	(M+46x)/n		
$M^{n+}+xCH_3OH$	(M+32x)/n		

#### 1.1.3.2.2 Analisador de Massa

Os analisadores de massa têm como principal objetivo separar os íons produzidos na fonte de ESI de acordo com as suas relações massa/carga (m/z). Os analisadores mais comuns quando acoplados a uma coluna de HPLC são os quadrupolos, *ion-trap*, *time-of-flight* (ToF), e alguns analisadores que misturam os anteriores, como por exemplo os quadrupolos triplos (QqQ) [17]. No trabalho realizado utilizou-se um analisador de massa *ion-trap*.

O funcionamento dos analisadores *ion-trap* consiste em armazenar os íons provenientes do ESI num dispositivo formado por um eletrodo de anel e dois eletrodos *end-cap* (Figura 1.4). Os íons provenientes do analito vão sendo levados para a *trap* por ação de pulsos, existindo depois um voltagem RF que tem como objetivo a estabilização desses mesmo íons. Para o conseguir utiliza-se também um gás, normalmente o hélio. A colisão deste com os íons faz com que estes vão alterando as suas oscilações, até estabilizarem.

A variação da voltagem RF, ou então a aplicação de voltagens externas nos eletrodos *end-cap* leva a que uma variedade de análises possa ser efetuada. Essas análises são: a ejeção sucessiva de íons da *trap*; manter na *trap* apenas os íons com uma razão m/s desejada, eliminando todos os outros, e ejetá-los depois; manter apenas um íon m/z na *trap*, fragmentando-o as vezes que se desejar através de um processo de MS/MS<sup>n</sup> [14].

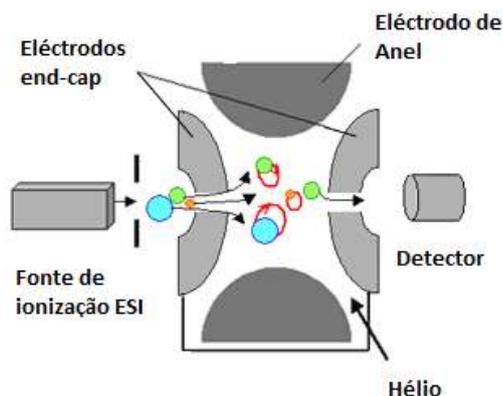


Figura 1.4: Esquema de um analisador ion-trap (adaptado de [www.shimadzu.com](http://www.shimadzu.com))

Os iões depois de serem separados pelos analisadores de massa vão para o detector propriamente dito. É aí que estes são identificados. Em LC-MS os detetores existentes podem ser electromultiplicadores, fotomultiplicadores e placas de microcanal [14].

Os electromultiplicadores, utilizados no âmbito do trabalho, convertem os iões provenientes do analisador em eletrões, sendo estes amplificados, produzindo assim corrente elétrica. Essa corrente elétrica permite a emissão de um sinal. Cada um dos iões dos analitos emite um sinal específico. O gráfico que relaciona a abundancia relativa desses iões com a razão  $m/z$  dos mesmos denomina-se espectro de massa (Figura 1.5).

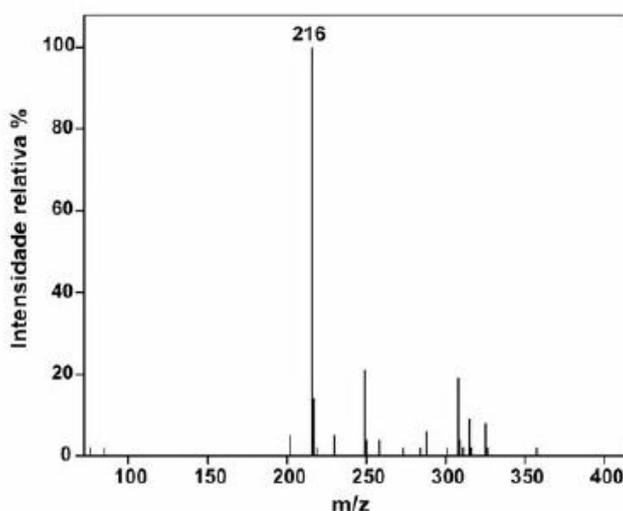


Figura 1.5: Exemplo de Espectro de massa (adaptado de [www.scielo.br](http://www.scielo.br))

## 1.2 Contributos do Trabalho

O trabalho realizado apresentou três vertentes: analítica, oxidação de Fenton, identificação dos produtos de degradação do paraquato.

Na vertente analítica foi necessário aprofundar conceitos e conhecimentos em HPLC-DAD e LC-MS. As metodologias analíticas utilizadas em HPLC-DAD e LC-MS já tinham sido previamente desenvolvidas no grupo de investigação para o paraquato, embora nunca tenham sido desenvolvidos para os produtos de degradação.

Na vertente de oxidação de Fenton, a otimização dos parâmetros da reação de Fenton e o estudo da interferência das espécies de Fenton na quantificação do paraquato por HPLC-DAD já estava desenvolvido no LEPAE, tendo sido publicado no artigo "*Paraquat removal from water by oxidation with Fenton's reagent*" [18]. Contudo não tinha sido ainda possível implementar os métodos analíticos e identificar os produtos de degradação por LC-MS.

Na vertente da identificação dos produtos de degradação, foi necessário efetuar uma pesquisa na literatura sobre quais os compostos já identificados como produtos intermediários/finais da degradação de paraquato, tal como realizar um aprofundar de conhecimentos de química orgânica e de reações entre compostos orgânicos.

O objetivo do trabalho foi a deteção e identificação de produtos de degradação do paraquato.

## 1.3 Organização da Tese

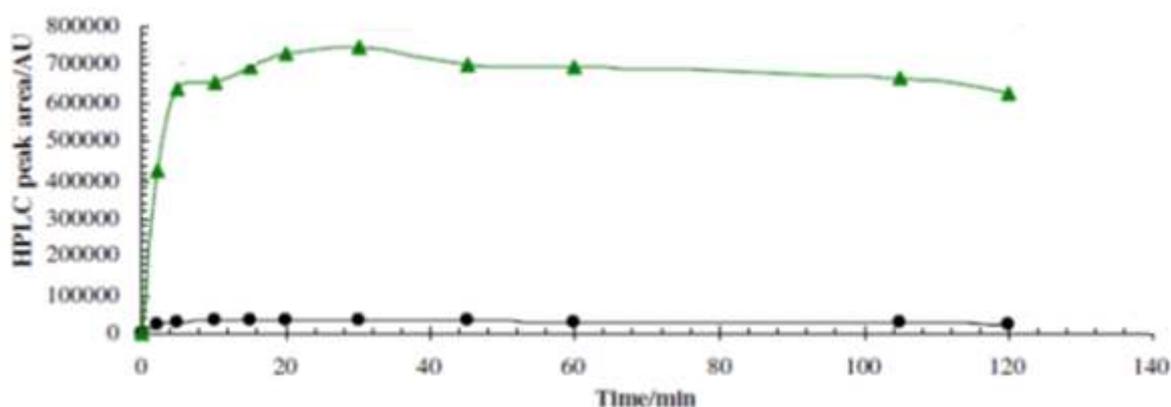
A presente tese dividiu-se em seis capítulos. No Capítulo 1, Introdução, foi feita uma breve descrição e apresentação do projeto desenvolvido. O Capítulo 2 diz respeito ao estado da arte, sendo mencionados estudos já realizados sobre a degradação do paraquato e deteção dos produtos resultantes dessa degradação. No Capítulo 3, é descrita a metodologia utilizada, tal como os materiais e equipamentos utilizados. No Capítulo 4, são descritos e discutidos todos os resultados obtidos. No Capítulo 5 são apresentadas as principais conclusões do projeto. Por último, no Capítulo 6 faz-se uma análise e avaliação de todo o trabalho realizado e apresentaram-se propostas de trabalho futuro.

## 2 Estado da Arte

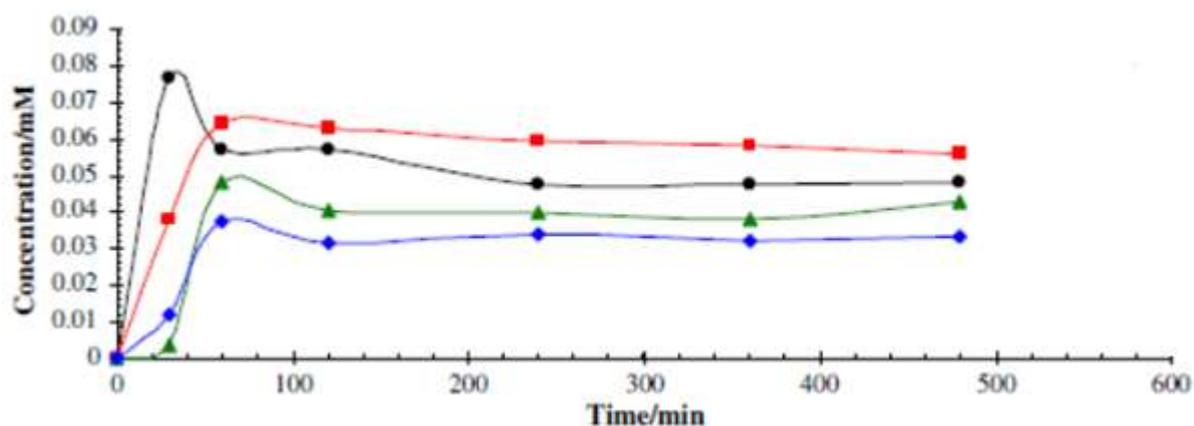
A deteção dos subprodutos da degradação do paraquato através do uso de reagente de Fenton é um tema que não tem sido estudado, não havendo por isso quase nenhum trabalho publicado. Contudo existem alguns estudos sobre a degradação do paraquato por outros processos avançados de oxidação e da respetiva deteção dos produtos intermediários/finais que essa degradação origina.

### 2.1 Degradação do paraquato com reagente de Fenton

Existem dois artigos que estudam a degradação do paraquato por ação do reagente de Fenton. Em 2009, Dhaouadi e Adhoum, fizeram um estudo em que comparavam a degradação do paraquato por 4 processos diferentes: Electro-Fenton, Fotoelectro-Fenton, Oxidação Anódica e Fenton Clássico [19]. Para o estudo do Fenton clássico as condições da reação de Fenton utilizadas foram: concentração inicial de paraquato de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$ , concentração de ião  $\text{Fe}^{2+}$  de  $1,8 \text{ mM}$ , concentração de peróxido de hidrogénio de  $20 \text{ mM}$  e pH inicial de  $3,0$ . A degradação do paraquato alcançada a foi inferior a  $76\%$  e só se obteve  $50\%$  de mineralização. Para além da degradação do paraquato também são comparados os produtos de degradação que são detetados por HPLC-DAD em cada um desses processos são comparados. Na oxidação do paraquato por Fenton clássico são detetados dois produtos intermediários cuja identificação não é feita (Figura 2.1). Como compostos finais da degradação, independentemente do processo oxidativo utilizado, Identificam-se 4 ácidos carboxílicos: Ácido oxálico, Ácido acético, Ácido fórmico e Ácido succínico (Figura 2.2).



**Figura 2.1:** Evolução dos produtos intermediários da degradação do paraquato através da oxidação de Fenton. Condições da oxidação de Fenton:  $\text{pH} = 3,0$ ,  $[\text{Paraquato}]_0 = 20 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 20 \text{ mM}$  e  $[\text{Fe}^{2+}]_0 = 2 \text{ mM}$ . (Adaptado do artigo "Degradation of Paraquat herbicide by electrochemical advanced oxidation methods"[19])



**Figura 2.2:** Evolução ao longo do tempo dos ácidos carboxílicos produzidos durante a degradação do paraquato através da reação de Fenton clássica (Ácido oxálico a preto, ácido fórmico a vermelho, ácido acético a verde e ácido succínico a azul). Condições da oxidação de Fenton:  $\text{pH} = 3,0$ ,  $[\text{Paraquato}]_0 = 20\text{mg.L}^{-2}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 20\text{ mM}$  e  $[\text{Fe}^{2+}]_0 = 2\text{ mM}$ . (Adaptado do artigo “Degradation of Paraquat herbicide by electrochemical advanced oxidation methods”[19])

Posteriormente, Santos *et al* ([18]) efetuaram um estudo paramétrico para otimizar as condições da reação de Fenton na degradação de uma solução de  $100\text{ mg.L}^{-1}$  de paraquato em água. Os valores considerados como “ótimos” foram:  $\text{pH} = 3,0$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 1,6 \times 10^{-2}\text{ M}$  e  $[\text{Fe}^{2+}]_0 = 5,0 \times 10^{-2}\text{ M}$ . Com estes valores foi obtida a degradação completa do paraquato ao fim de 4 horas e uma percentagem de mineralização de 60%. O valor da percentagem de mineralização permite identificar a presença de carbono orgânico no final da reação, ou seja, nem todo o paraquato inicial é convertido em  $\text{CO}_2$ , o que indica a existência de produtos de degradação na solução final.

## 2.2 Processos de oxidação avançados para degradação do paraquato e produtos de degradação identificados

Ao longo dos anos várias tecnologias foram estudadas de forma a melhorar e garantir uma remoção mais fácil do paraquato de soluções aquosas. Vários processos foram estudados no sentido de tentar encontrar a forma mais eficaz de degradação do paraquato cujos principais resultados encontram-se no Anexo 1. Entre esses artigos apenas em 4 deles se descreve a identificação de produtos de degradação do paraquato, sendo que apenas um destes apresenta um possível caminho da degradação do paraquato.

No estudo focado na degradação do paraquato em água através da combinação da radiação UV com o ozono apresentaram-se possíveis produtos de degradação do paraquato. Este artigo é o único dos analisados que apresenta um possível caminho para a degradação do mesmo (Figura 2.3) [20].

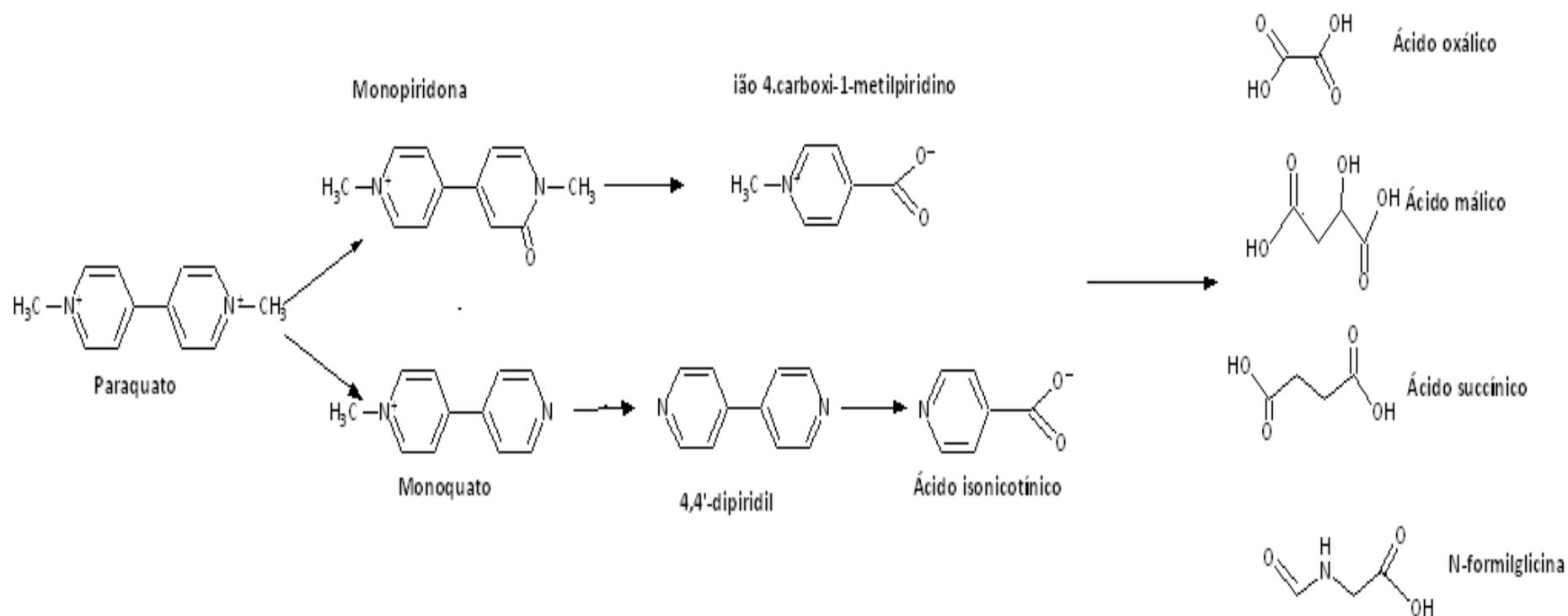


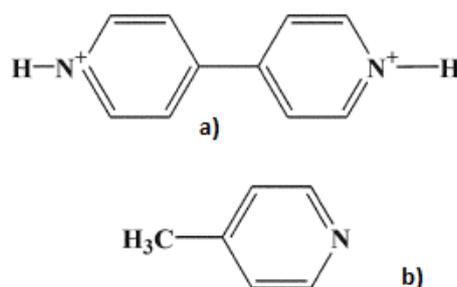
Figura 2.3: Possível caminho de degradação do paraquato (adaptado do artigo "UV-ozonation of paraquat"[20])



A identificação dos produtos de degradação do paraquato foi feita para duas concentrações: 1500 e 150 mg.L<sup>-1</sup> [20]. Para a concentração de 1500 mg.L<sup>-1</sup> de paraquato a identificação foi feita por HPLC-UV e TLC. Observou-se que o produto que se formava maioritariamente era o ião 4-carboxi-1-metilpiridino, encontrando-se também monoquato e monopiridona. Para a solução de 150 mg.L<sup>-1</sup>, usando GC-MS, foram encontrados os seguintes compostos: 4,4-dipiridil, ácido isonicotínico e o ácido hidroxí-isonicotínico. Posteriormente estes compostos são transformados em compostos mais pequenos por quebra do anel aromático: ácido oxálico, ácido málico, ácido sucínico e n-formilglicina.

Noutro estudo da degradação do paraquato por ozonização a partir de uma solução de concentração 8 mM (1500 mg.L<sup>-1</sup>) de Paraquato a pH igual a 8, os produtos de degradação encontrados foram o ácido n-metilisonicotínico, o ácido n-formiloxâmico e o ácido oxâmico. A identificação destes compostos foi efetuada por HPLC-UV, comparando os tempos de retenção e os espectros UV das amostras da reação com os compostos puros sintetizados [21].

Noutro estudo sobre a degradação do paraquato através da ação da radiação UV e na presença de dióxido de titânio são apresentados também dois produtos intermediários da degradação. Através de LC-MS, o 4,4-dipiridil e o 4-metilpiridino são identificados (Figura 2.4), apresentando uma razão m/z de 158 e 93 respetivamente [22].



**Figura 2.4: Estruturas molecular de 4,4'-bipiridil a) e do 4-metil-piridino b). (adaptado do artigo "Removal of Paraquat in aqueous suspension of TiO<sub>2</sub> in an immersed UV photoreactor-" [22])**

Noutro artigo que estuda a fotodegradação do paraquato através de radiação UV e na presença de um catalisador de dióxido de titânio [23], são apresentados alguns dos possíveis produtos intermediários da degradação do paraquato. A sua identificação foi obtida por MS/MS, e para além dos compostos já referidos anteriormente como é o caso do ião 4-carboxi-1metilpiridino e da monopiridona, aparece um novo composto, a dipiridona (cujas razões m/z são respetivamente 138, 202, 212). Para além destes três compostos, existem mais dois picos com alguma relevância (razão m/z 156 e 160, respetivamente) cuja identificação não foi possível, mas cujas fórmulas moleculares sugeridas são C<sub>6</sub>O<sub>5</sub>H<sub>8</sub> e C<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>H<sub>10</sub>.

Com base na pesquisa bibliográfica selecionaram-se os produtos de degradação do paraquato mais frequentemente citados (Tabela 2.1).

*Tabela 2.1: Possíveis produtos de degradação do paraquato*

**Possíveis produtos de degradação do paraquato**

lão 4-carboxi-1-metilpiridino  
4,4-dipiridil  
Monopiridona  
Ácido Isonicotínico  
Ácido hidróxi-Isonicotínico  
Ácido málico, ácido oxálico, ácido succínico

## 3 Descrição Técnica

### 3.1 Reagentes

O padrão de Paraquato dicloreto PESTANAL® com 99,2% de pureza foi comprado à Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). O peróxido de hidrogénio (30% v/v), o sulfato de ferro (II) heptahidratado (99,5%) e o sulfito de sódio anidro utilizados na reação de Fenton e também na análise das interferências das espécies de Fenton na quantificação do paraquato e dos produtos de degradação, foram comprados à Merck (Darmstad, Alemanha). Também foi utilizado ácido sulfúrico (96%) comprado à José M. Vaz Pereira, Lda. (Lisboa, Portugal) e hidróxido de sódio (98,7%) comprado à José Manuel Gomes dos Santos, Lda. (Odivelas, Portugal) para o acerto do pH da solução de paraquato antes do início da reação de Fenton.

O ácido heptafluorobutírico (HFBA) utilizado na preparação da fase móvel utilizado em LC-MS e HPLC-DAD foi comprado na Sigma Aldrich e o acetonitrilo Lichrosolv®, utilizado também na preparação de fase móvel do HPLC-DAD, foi adquirido à Prolabo. Por sua vez na preparação da fase móvel utilizada em LC-MS foi utilizado metanol e água para cromatografia Lichrosolv®.

Para a identificação dos produtos de degradação do paraquato, com base na Tabela 2.1, foram adquiridos os seguintes compostos: o ácido succínico com pureza de 99,0%, o ácido isonicotínico com pureza de 99,0%, o ácido málico com 98% de pureza e o 4,4'-dipiridil com 98% de pureza foram adquiridos à Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). O ácido oxálico com pureza de 98% foi adquirido à Merck (Darmstad, Alemanha). O iodeto de 1-etil-4-metoxicarbonilpiridino com 97,0% de pureza, utilizada como comparação com o ião 4-carboxi-1-metilpiridino, foi adquirido à Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). Os restantes compostos apresentados na Tabela 2.1 não foram adquiridos por não se encontrarem disponíveis comercialmente.

### 3.2 Preparação de padrões

Foram preparadas soluções-mãe de paraquato de 1 g/L por pesagem rigorosa do padrão adquirido de paraquato, dissolvendo-se em água destilada filtrada. As soluções-padrão de 100 mg.L<sup>-1</sup> de paraquato foram obtidas a partir desta solução por diluição em água. As soluções de 500 mg.L<sup>-1</sup> de paraquato utilizadas na reação de Fenton, eram preparadas por pesagem rigorosa do padrão adquirido, dissolvendo-se em água.

As soluções-padrão de todos os produtos de degradação estudados foram obtidas por pesagem rigorosa do padrão comercial adquirido e dissolução em água devidamente filtrada. No caso do 4,4-Dipiridil, como é muito pouco solúvel em água, a solução foi preparada em acetonitrilo.

### 3.3 Métodos Analíticos

Durante a reação foram recolhidas amostras com o objetivo de quantificar a degradação de paraquato e também para a deteção e posterior identificação dos subprodutos da degradação do paraquato. Os métodos analíticos utilizados foram: HPLC-DAD e LC-MS

#### 3.3.1 HPLC-DAD para identificação e quantificação do paraquato e do ácido oxálico

A análise cromatográfica foi realizada num HPLC Hitachi Elite LaChrom equipado com uma bomba L-2130, um injetor automático L-2200 e a detector DAD L-2245. A separação cromatográfica realizou-se numa coluna cromatográfica de fase reversa Purospher® RP-18 (240 mm×4 mm, 5 µm) comprada à VWR.

A quantificação de paraquato em água foi feita recorrendo-se a uma metodologia analítica, previamente desenvolvida no grupo de investigação onde este trabalho esteve inserido. A fase móvel utilizada era constituída por 80% (v/v) de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de acetonitrilo, em condições isocráticas, com um caudal de 1 mL.min<sup>-1</sup>. Os espectros foram registados num intervalo de comprimentos de onda, compreendido entre 220 e 400 nm, sendo que para a quantificação do paraquato o tempo de retenção obtido foi de 6,5 min e o comprimento de onda utilizado foi 259 nm. As análises cromatográficas foram efetuadas a 25°C, temperatura mantida constante pelo uso de um forno onde a coluna cromatográfica se encontrava.

#### 3.3.2 LC-MS para identificação do paraquato e identificação e quantificação do ácido isonicotínico e do ião 4-carboxi-1-metipiridino

Foi utilizado um sistema de LC-MS foi utilizado para identificar alguns dos produtos de degradação do paraquato através da reação de Fenton. O sistema de LC-MS é da marca Varian (Lake Forest, EUA) e é composto por um módulo de bombas ProStar, um espectrómetro de massa Ion Trap 500-MS com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) e um sistema de aquisição de dados Varion MS Workstation (versão 6.9). A coluna cromatográfica utilizada é uma coluna C18 Pursuit XRs Ultra (100 mm × 2 mm; 2,8 µm) em conjunto com uma pré-coluna C18 Pursuit® (10 mm × 2 mm; 5 µm) da marca Varian (Lake Forest, EUA).

Para a identificação do paraquato e dos seus produtos de degradação foi utilizada uma metodologia, também já desenvolvida no grupo de investigação. A fase móvel utilizada era composta por 80% de água acidificada com HFBA 5 mM e 20% de metanol a um caudal de 0,2 mL.min<sup>-1</sup> em sistema isocrático. As análises cromatográficas eram efetuadas à temperatura ambiente, injetando-se um volume de amostra de 10 µL. As condições de operação do espectrómetro de massa foram: modo positivo, voltagem do capilar de 87,2 V, voltagem do escudo de 600 V, Voltagem da agulha de 3839 V, *RF loading* de 77%, pressão do gás de secagem de 20 psi, temperatura do gás de secagem de 400°C, *multiplier offset* de 300 V e gama de varrimento de MS entre as razões m/z de 100 a 500. Os produtos identificados apresentam razões m/z de 185 para o paraquato, 124 para o ácido isonicotínico, 166 para o ião 1-etil-4-metoxycarbonilpiridino e 147 para o 4,4'-dipiridil.

### 3.4 Condições experimentais da reação de Fenton

Todas as reações de Fenton foram realizadas num reator *batch* com camisa de aquecimento com 300 mL de capacidade. As soluções de paraquato (100 mg.L<sup>-1</sup> e 500 mg.L<sup>-1</sup>) foram colocadas no reator e seguidamente procedeu-se ao acerto e estabilização da temperatura (30°C) através da utilização de um banho termostático Huber (Polystat unidade CC1). Depois da estabilização da temperatura, acertou-se o pH (pH = 3) utilizando soluções aquosas de hidróxido de sódio 1 M e de ácido sulfúrico 2 M. As medições de pH e temperatura foram conseguidas utilizando um elétrico de pH (WTW, SenTix 41 model) e um termopar, respetivamente. A oxidação foi iniciada adicionando-se o sulfato de ferro (II) (fornece os iões Fe<sup>2+</sup>) e o peróxido de hidrogénio à solução de paraquato. As condições de operação da reação de Fenton utilizadas foram: concentração de sulfato de ferro (II) de 5,0 × 10<sup>-4</sup> M, concentração de peróxido de hidrogénio de 1,6 × 10<sup>-2</sup> M, temperatura de 30°C e pH inicial de 3 conforme as condições consideradas como ótimas em Santos *et al* [18]. Fizeram-se reações de Fenton de 8 e de 24 horas.

Ao longo da reação retiram-se amostras para análise em HPLC-DAD e LC-MS. Essas amostras eram retiradas recorrendo-se a seringas, sendo depois filtradas com filtros de PTFE de 0,2 µm de diâmetro dos poros, compradas à VWR (West Chester, EUA). Uma vez que o sulfito habitualmente usado para parar a reação nos frascos de amostragem interfere na identificação dos produtos de degradação por HPLC-DAD as amostras eram imediatamente injetadas no HPLC-DAD.

## 4 Discussão de Resultados

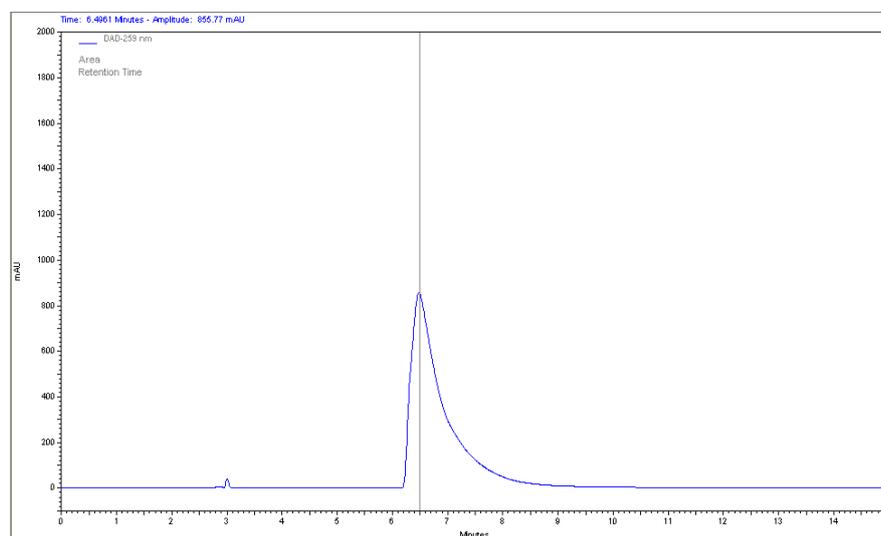
Apresentam-se neste capítulo os resultados da degradação do paraquato através da reação de Fenton e a detecção dos subprodutos da degradação. Utilizaram-se metodologias de HPLC-DAD (para a identificação e quantificação do paraquato e de um produto de degradação) e de LC-MS (para a identificação do paraquato e dos produtos de degradação).

### 4.1 Identificação do Paraquato

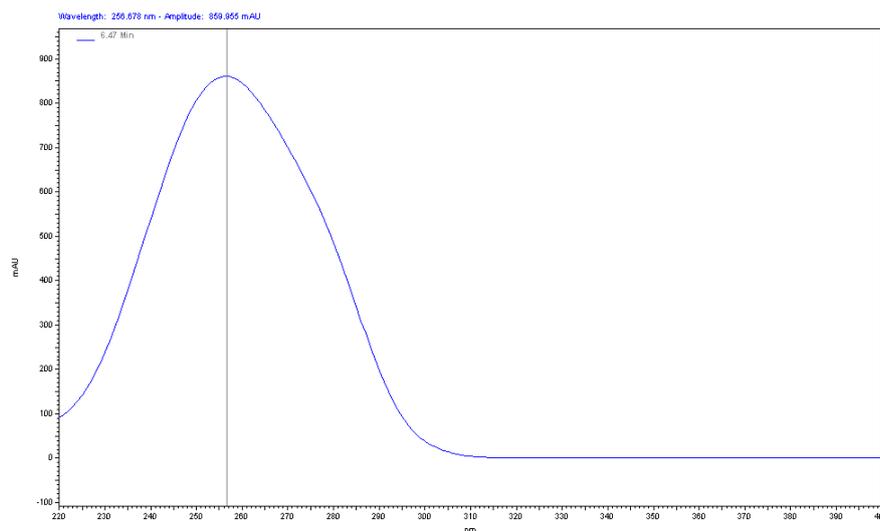
Para a identificação do paraquato recorreram-se a dois métodos cromatográficos, HPLC-DAD e o LC-MS.

#### 4.1.1 Identificação por HPLC-DAD

A identificação do tempo de retenção e respetivo espectro do paraquato foi alcançada através da injeção direta de um padrão de paraquato no HPLC-DAD. Na Figura 4.1 está representado o cromatograma de um padrão de paraquato, onde se pode observar o tempo de retenção associado ao paraquato (6,470 min) e na Figura 4.2 o seu espectro, onde se observa o máximo de absorção (258 nm).

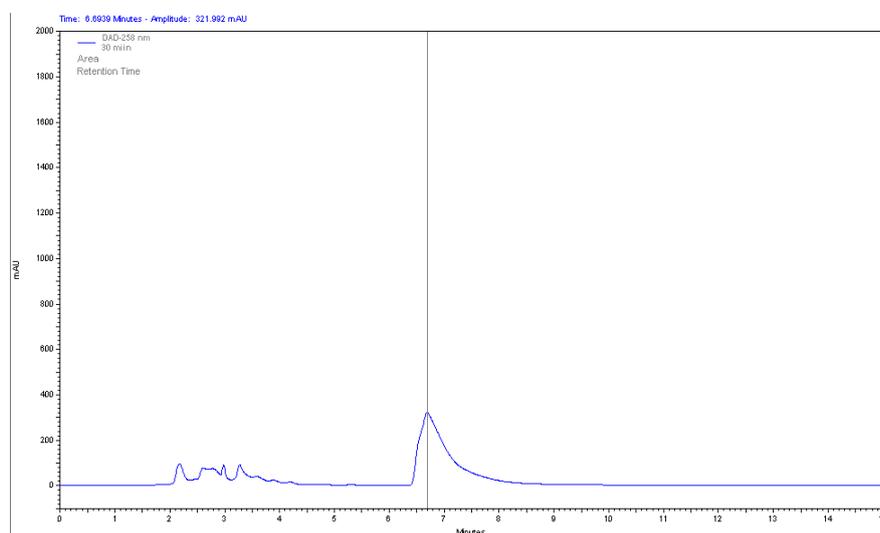


**Figura 4.1:** Cromatograma de um padrão de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de paraquato em água em HPL-DAD. Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de acetonitrilo;  $1 \text{ mL.min}^{-1}$ ; volume de injeção de 99  $\mu\text{L}$ .

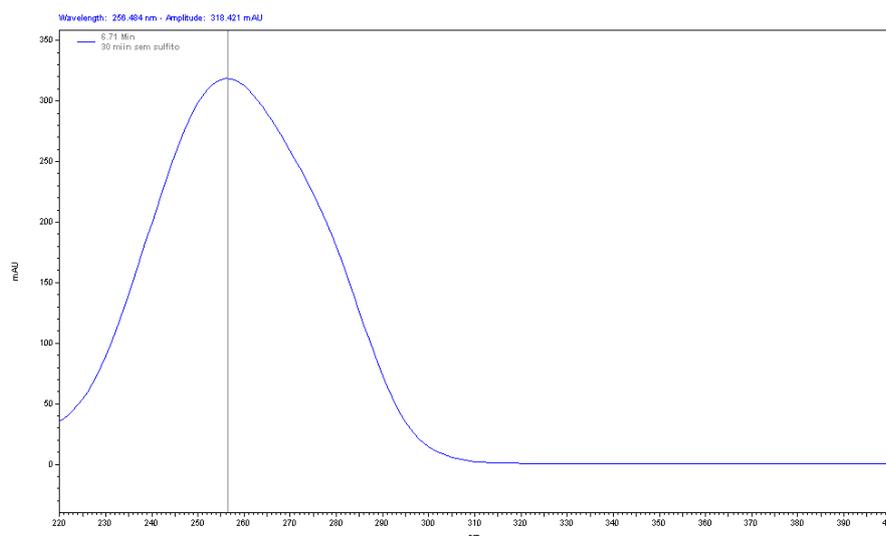


**Figura 4.2:** Espectro de um padrão de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de paraquato em água em HPLC-DAD. Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de acetonitrilo;  $1 \text{ mL.min}^{-1}$ ; volume de injeção de  $99 \mu\text{L}$ .

Para a identificação do paraquato nas amostras retiradas da reação de Fenton, estas foram injetadas em HPLC-DAD e analisaram-se os cromatogramas e espectros obtidos. Nas Figuras 4.3 e 4.4 estão representados exemplos de um cromatograma e de um espectro de absorção para uma amostra após reação com reagente de Fenton, respetivamente.



**Figura 4.3:** Cromatograma de uma amostra de paraquato aos 30 minutos da reação de Fenton em HPLC-DAD. Condições de oxidação:  $[\text{Paraquato}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $[\text{Fe}^{2+}] = 5,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,6 \times 10^{-2} \text{ M}$ ;  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 3$ . Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de acetonitrilo;  $1 \text{ mL.min}^{-1}$ ; volume de injeção de  $99 \mu\text{L}$ .



**Figura 4.4:** Espectro de uma amostra de paraquato retirada aos 30 minutos de reação de Fenton no tempo de retenção 6,71 minutos em HPLC-DAD. Condições de oxidação:  $[\text{Paraquato}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $[\text{Fe}^{2+}] = 5,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,6 \times 10^{-2} \text{ M}$ ;  $T = 30^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 3$ ). Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de acetonitrilo;  $1 \text{ mL.min}^{-1}$ ; volume de injeção de  $99 \mu\text{L}$ .

A identificação da presença de paraquato nas amostras da reação de Fenton é pelo tempo de retenção e pelo espectro (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1:** Comparação entre os valores de tempo de retenção e máximo de absorvância obtidos através da injeção de um padrão de paraquato de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  em água e de uma amostra da reação de Fenton em HPLC-DAD.

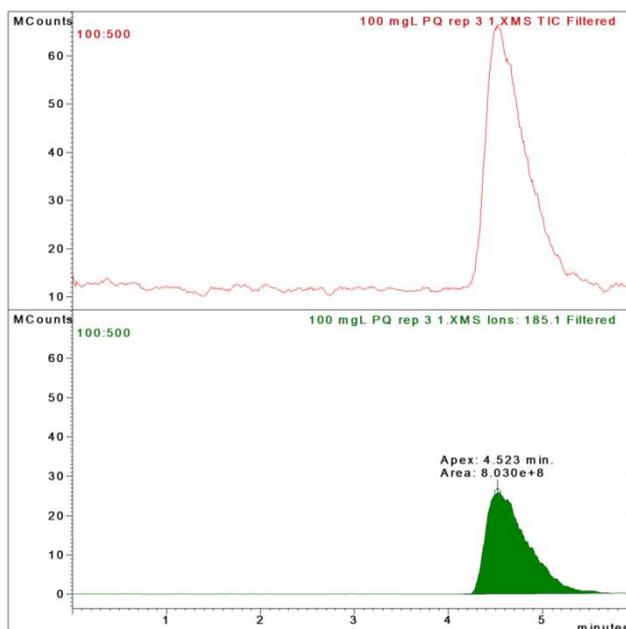
Amostra	Tempo de retenção, minutos	Máximo de absorção (nm)
Padrão de $100 \text{ mg.L}^{-1}$ de paraquato em água	$6,47 \pm 0,04$	258
Amostra de paraquato da reação de Fenton	$6,71 \pm 0,10$	258

Para os valores de tempo de retenção, existe uma diferença significativa. Isso poderá dever-se a presença das espécies de Fenton na amostra (iões de ferro, peróxido de hidrogénio ou mesmo outros produtos de oxidação), que poderão influenciar o tempo de retenção do paraquato.

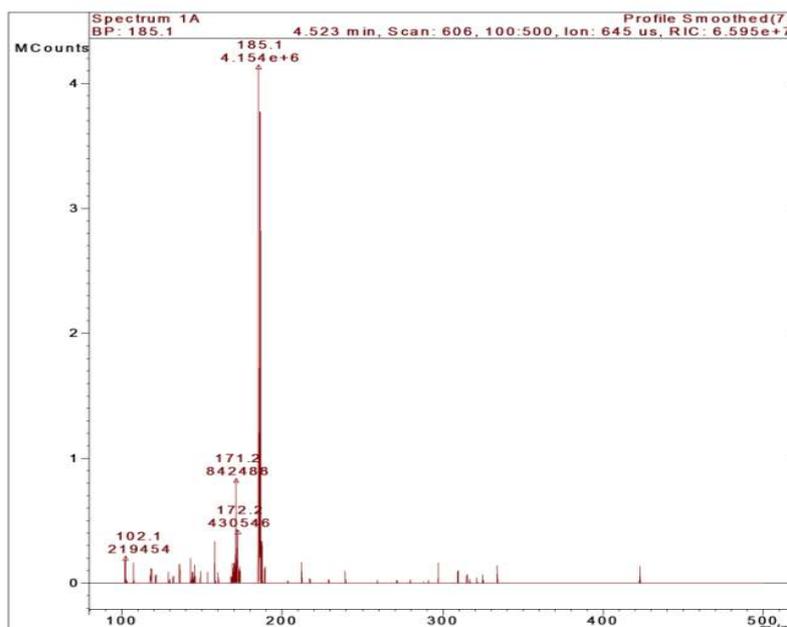
#### 4.1.2 Identificação em LC-MS

Para além do uso de HPLC-DAD, também o LC-MS foi utilizado para a confirmação da identificação do paraquato, através da identificação do seu ião molecular por injeção de uma solução-padrão e determinação da existência do mesmo ião molecular nas amostras retiradas da reação de Fenton.

A injeção de um padrão de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de paraquato em água no LC-MS permitiu obter o cromatograma correspondente ao paraquato, tal como o seu respetivo espetro de massa, representados nas Figuras 4.5 e 4.6, respetivamente.

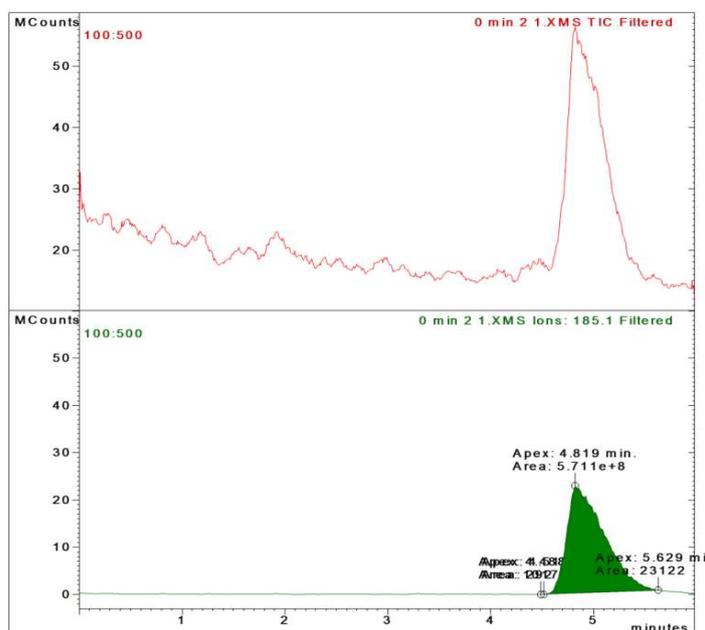


**Figura 4.5:** Cromatograma de uma solução padrão de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  paraquato em água, em modo full scan (figura de cima) e cromatograma obtido após seleção do ião com razão  $m/z$  de 185 (figura de baixo), em LC-MS. Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 5 mM e 20% de metanol;  $1 \text{ mL.min}^{-1}$ ; volume de injeção de  $99 \mu\text{L}$ .

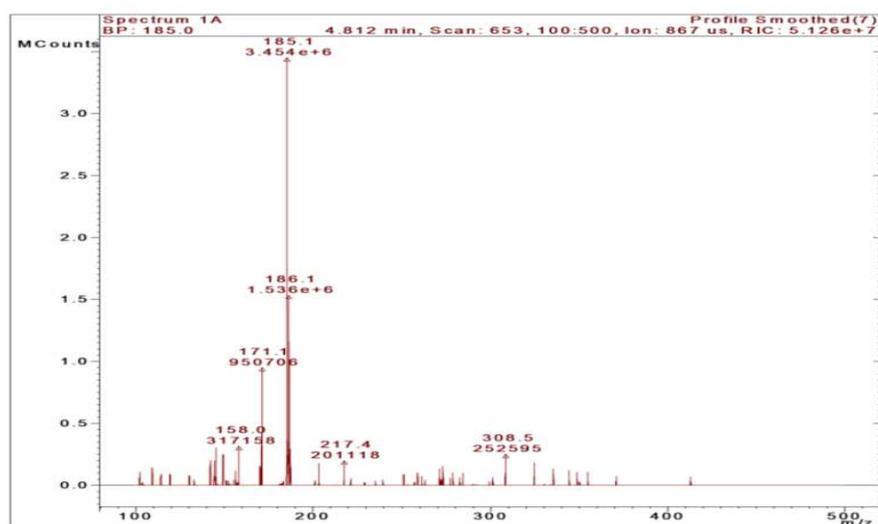


**Figura 4.6:** Espectro de massa da solução de concentração  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de paraquato em água.

Com o intuito de confirmar a existência de paraquato nas amostras retiradas durante a reação de Fenton, injetaram-se estas amostras (retiradas aos 30 min) no LC-MS (Figura 4.7 e Figura 4.8).



**Figura 4.7:** Cromatograma de amostra da reação de Fenton no modo full scan (figura de cima) e cromatograma obtido após seleção do íon com razão  $m/z$  de 185 (figura de baixo), em LC-MS. Condições de oxidação:  $[PQ] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $[Fe^{2+}] = 5,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $[H_2O_2] = 1,6 \times 10^{-2} \text{ M}$ ;  $T = 30^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 3$ . Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 5 mM e 20% de metanol;  $1 \text{ mL.min}^{-1}$ ; volume de injeção de 99  $\mu\text{L}$ .



**Figura 4.8:** Espectro de massa da amostra de paraquato na reação de Fenton no minuto 30

Por análise e comparação dos cromatogramas e espectros de massa obtidos para as injeções da solução-padrão e da amostra da reação de Fenton, pode-se identificar qual o íon molecular (razão  $m/z$ ) predominante do paraquato, e confirmar a sua presença na amostra de Fenton. Também se identificou

o tempo de retenção correspondente ao pico do ião molecular de paraquato e verificou-se a sua presença na amostra de Fenton. Na Tabela 4.2 estão representados esses valores do ião molecular predominante e tempo de retenção do paraquato nas duas injeções. Analisando os valores, conclui-se que a identificação do paraquato por LC-MS é conseguida.

**Tabela 4.2:** Comparação entre os valores de tempo de retenção e ião molecular obtidos através da injeção de padrões de paraquato de 100 mg.L<sup>-1</sup> em água e de amostras de paraquato na reação de Fenton em LC-MS

Amostra	Tempo de Retenção, min	Ião molecular (m/z)
Padrão de paraquato 100 mg.L <sup>-1</sup> em água	4,67 ± 0,09	185
Amostra da reação de Fenton	4,66 ± 0,06	185

## 4.2 Quantificação do Paraquato

A quantificação do paraquato ao longo da reação de Fenton foi conseguida utilizando HPLC-DAD.

Os parâmetros de validação do método utilizado foram previamente obtidos por Santos, M. (dados não publicados). Na Tabela 4.3 estão apresentados os valores da validação do método analítico utilizado. Os valores dos parâmetros para a precisão, exatidão e da incerteza global, estão apresentados em termos de coeficiente de variação (CV).

Para além da validação o método, também o estudo da interferência das espécies de Fenton (ião Fe (II), peróxido de hidrogénio e sulfito de sódio), na quantificação de Paraquato já tinha sido previamente efetuado. Neste estudo verificou-se que o ferro e o peróxido não interferem na quantificação do paraquato e verificou-se a interferência do sulfito de sódio para concentrações altas ( $1,9 \times 10^{-1}$  e  $3,2 \times 10^{-1}$  M). Contudo para a concentração de sulfito utilizada neste estudo ( $9,6 \times 10^{-2}$  M) concluiu-se que não havia interferência.

No decorrer do trabalho optou-se por não efetuar a adição de sulfito às amostras retiradas do reator, mas sim pela injeção direta das amostras. A presença de sulfito nas amostras injetadas em HPLC-DAD levava ao aparecimento de um pico no cromatograma na zona de tempos de retenção que coincidia com os tempos de retenção dos picos dos produtos de degradação de paraquato, cuja deteção é o objetivo do trabalho, como se pode verificar na Figura 4.9.

Tabela 4.3: Parâmetros calculados para a validação do método (Santos, M. (dados não publicados))

Linearidade (mg.L <sup>-1</sup> )		0,1-80,0	
Coeficiente de correlação (R <sup>2</sup> )		0,9996	
Limite de deteção (mg.L <sup>-1</sup> ) (Razão entre sinal e ruído de 3)		0,01	
Limite de quantificação (mg.L <sup>-1</sup> ) (Razão entre sinal e ruído de 10)		0,03	
Precisão (Valores do CV em %)	Repetibilidade	0,1 mg.L <sup>-1</sup>	53,5
	(3 níveis de concentração)	30,0 mg.L <sup>-1</sup>	0,2
		80,0 mg.L <sup>-1</sup>	0,2
		Precisão intermédia	0,1 mg.L <sup>-1</sup>
	(3 níveis de concentração)	30,0 mg.L <sup>-1</sup>	2
		80,0 mg.L <sup>-1</sup>	2
Recuperação (valores do CV em %)		30,0 mg.L <sup>-1</sup>	101,73 ± 0,05
	80,0 mg.L <sup>-1</sup>	100,15 ± 0,04	
	Incerteza global (Valores do CV em %)	1,0 mg.L <sup>-1</sup>	51,2
30,0 mg.L <sup>-1</sup>		7,2	
80,0 mg.L <sup>-1</sup>		7,1	

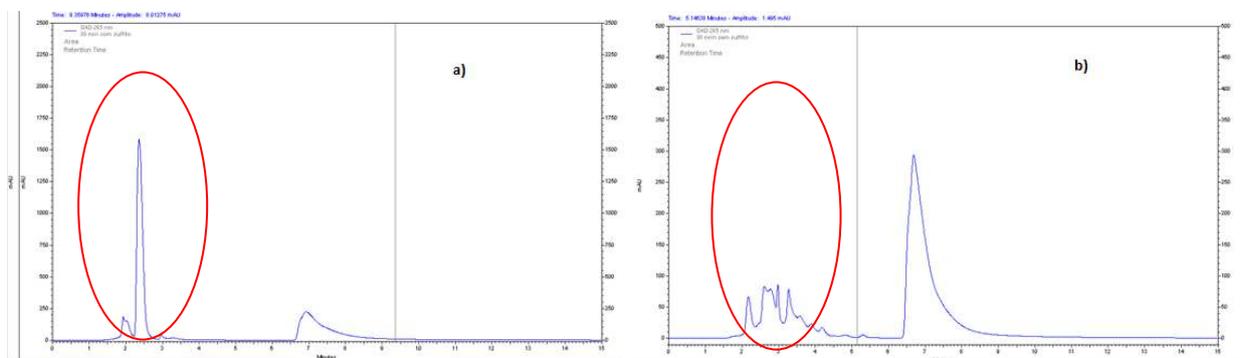


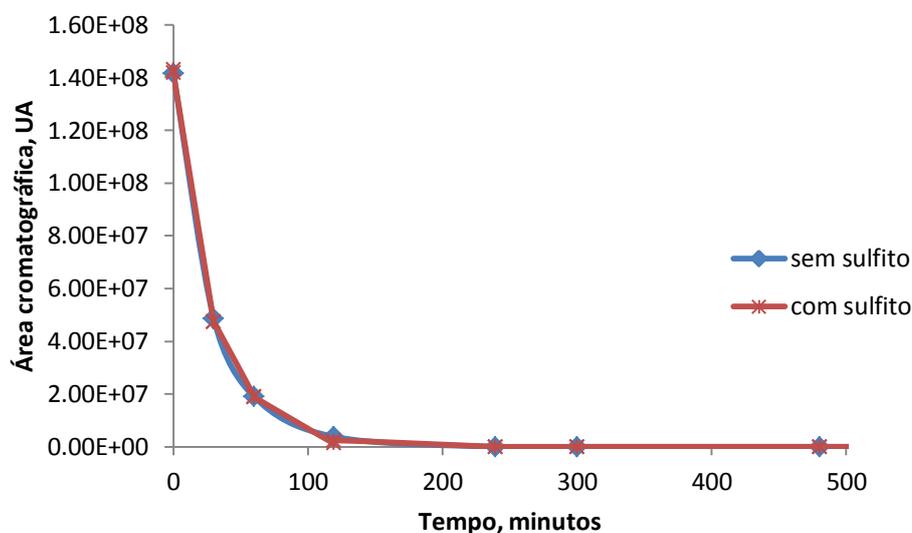
Figura 4.9: Comparação de um cromatograma de uma amostra da reação de Fenton com adição de sulfito ( $[Na_2SO_3] = 9,6 \times 10^{-2} M$ ) (a) e um sem adição de sulfito (b), em HPLC-DAD. Fase móvel utilizada: 80 % de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de Acetonitrilo. Condições da reação de Fenton:  $[PQ] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $[Fe^{2+}] = 5,0 \times 10^{-4} M$ ;  $[H_2O_2] = 1,6 \times 10^{-2} M$ ;  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $pH = 3$ .

#### 4.3 Análise do Paraquato ao longo de uma Reação de Fenton

O objetivo desta dissertação é identificar subprodutos da degradação do paraquato após oxidação com reagente de Fenton. Com este objetivo começou-se por realizar ensaios de Fenton nas seguintes condições:  $[Paraquato] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $[Fe^{2+}] = 5,0 \times 10^{-4} M$ ;  $[H_2O_2] = 1,6 \times 10^{-2} M$ ;  $T = 30^\circ\text{C}$ ;  $pH = 3$ . A escolha teve por base um estudo paramétrico para a degradação do paraquato em água por

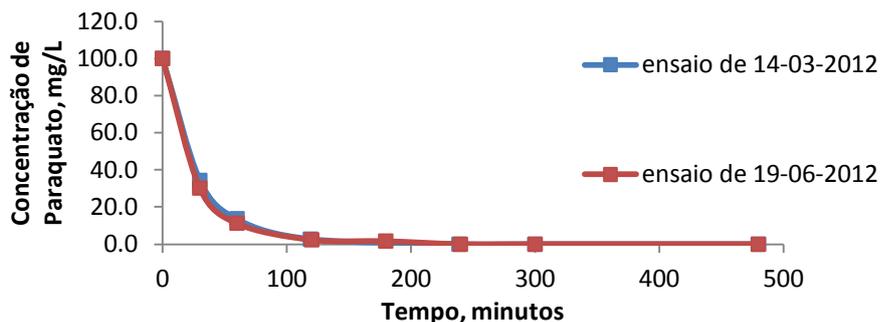
oxidação com reagente de Fenton, no qual se demonstra que nestas condições o paraquato é totalmente degradado ao fim de quatro horas [18]. Devido as interferências do sulfito na deteção dos produtos de degradação a avaliação da degradação do paraquato foi efetuada sem parar a reação.

No entanto, foi preciso comprovar numa primeira fase que a degradação do paraquato, calculada a partir da injeção imediata das amostras de Fenton sem parar a reação, conduzia a resultados estatisticamente iguais aos obtidos quando a reação é interrompida. No caso em que a reação era interrompida utilizou-se uma concentração de sulfito de sódio de  $9,6 \times 10^{-2}$  M. Os valores estão apresentados na Figura 4.10.



**Figura 4.10:** Comparação da remoção de paraquato através de reação de Fenton, com adição de sulfito de sódio e sem adição de sulfito de sódio.

Pela análise da Figura 4.10 conclui-se que o facto de a reação não ser interrompida não conduz a erros significativos. No entanto, para garantir que seria possível obter reprodutibilidade nos resultados optou-se por repetir a experiência nas mesmas condições (isto é, sem adição de sulfito). A comparação das duas curvas de degradação de paraquato por reagente de Fenton é feita na Figura 4.11.



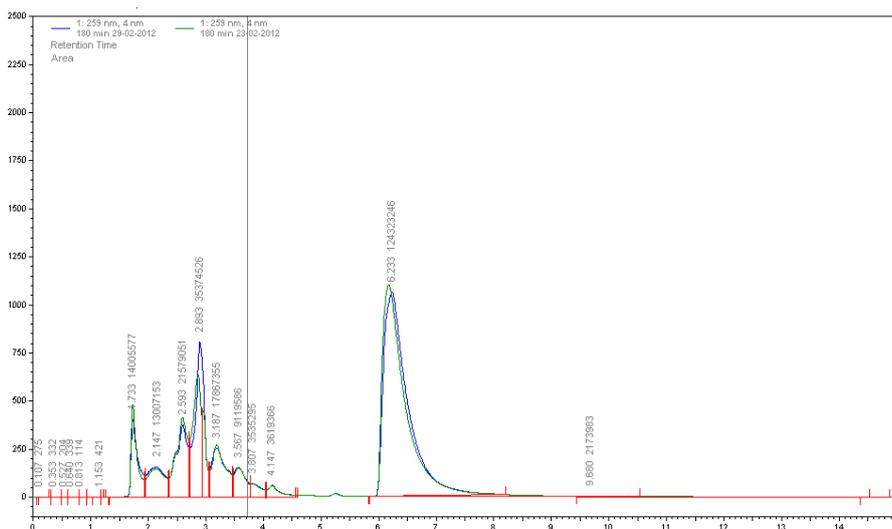
**Figura 4.11:** Comparação das curvas degradação de paraquato em água por oxidação com reagente de Fenton obtidas em dois dias diferentes. Condições da reação de Fenton:  $[Paraquato] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $[Fe^{2+}] = 5,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $[H_2O_2] = 1,6 \times 10^{-2} \text{ M}$ ;  $T = 30^\circ\text{C}$ ;  $pH = 3$ .

Como se pode verificar através da Figura 4.11 as diferenças obtidas nas duas curvas estão dentro da incerteza analítica. Assim, conclui-se que, para efeitos de quantificação do paraquato e identificação dos produtos de degradação, é possível analisar as amostras sem parar a reação desde que estas sejam injetadas imediatamente.

#### 4.4 Identificação dos Produtos de Degradação do Paraquato

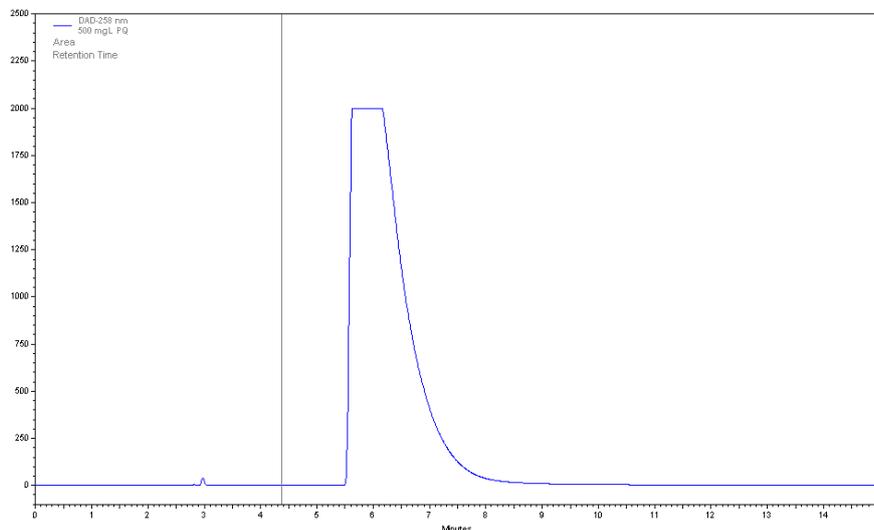
Através da Figura 4.9 verifica-se que a resposta instrumental obtida para os produtos de degradação é muito baixa. Isto pode dever-se ao facto das condições de análise não terem sido otimizadas para estes compostos (usaram-se as condições de análise do paraquato). Com o intuito de obter picos mais significativos decidiu-se aumentar a concentração inicial de paraquato. Assim, realizaram-se dois ensaios partindo de uma concentração de paraquato de  $500 \text{ mg.L}^{-1}$ . Na Figura 4.12 apresentam-se os cromatogramas de HPLC-DAD obtidos para uma amostra Fenton após 180 min de reação.

Comparando os dois cromatogramas, observa-se que tanto num ensaio como no outro os picos existentes entre os tempos de retenção 1,5 e 5 minutos são praticamente sobreponíveis, o que significa que ambos os ensaios conduziram aos mesmos subprodutos de degradação.



**Figura 4.12:** Comparação de dois cromatogramas correspondentes à injeção de uma amostra de Fenton ao fim de 180 minutos de reação, no dia 29-02-2012 (a azul) e no dia 23-02-2012 (a verde) em HPLC-DAD. Fase móvel utilizada: 80 % de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de Acetonitrilo, 1 mL.min<sup>-1</sup>, 99 µL de volume de injeção. Condições da reação de Fenton: [PQ] = 500 mg.L<sup>-1</sup>; [Fe<sup>2+</sup>] = 5 × 10<sup>-4</sup> M; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 1,6 × 10<sup>-2</sup> M; T = 30 °C; pH = 3.

Para a concentração de 500 mg.L<sup>-1</sup> de paraquato em água não se procedeu à quantificação do paraquato, pois nestas condições ocorre saturação do detetor para a amostra inicial (t = 0) (Figura 4.13).



**Figura 4.13:** Cromatograma da injeção de um padrão de paraquato de 500 mg.L<sup>-1</sup> em água em HPLC-DAD. Fase móvel utilizada: 80 % de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de Acetonitrilo, 1 mL.min<sup>-1</sup>, 99 µL de volume de injeção.

Comprovando-se a existência de picos provavelmente correspondentes a produtos de degradação do paraquato, tornou-se necessário identificar os compostos que poderiam corresponder aos picos identificados.

#### 4.4.1 Seleção dos possíveis produtos de degradação a estudar

Partindo dos produtos indicados na Tabela 2.1, tentou-se adquirir os padrões comerciais dos mesmos. Desses compostos só foi possível adquirir padrões de 4,4-dipiridil, ácido isonicotínico, ácido málico, ácido oxálico, ácido sucínico, pois os restantes não se encontravam disponíveis comercialmente.

Apesar do ião 4-carboxi-1-metilpiridínio não ser comercializado, encontrou-se um composto químico comercial semelhante e que poderia ser uma aproximação razoável a este em termos de identificação e possível quantificação. Esse composto foi o iodeto de 1-Etil-4-metoxycarbonilpiridínio. Na Figura 4.14 apresentam-se as estruturas destes dois compostos, da qual se depreende que a diferença entre eles prende-se na existência de mais dois grupos metilo no ião aqui usado.

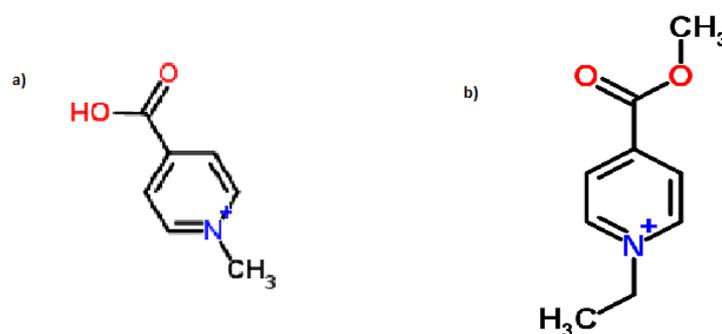


Figura 4.14: Estruturas moleculares: a) ião 4-carboxi-1-metilpiridínio e b) ião 1-Etil-4-metoxycarbonilpiridínio

#### 4.4.2 Identificação dos produtos de degradação do paraquato adquiridos comercialmente em HPLC-DAD

Adquiridos os padrões, começou-se por avaliar o tempo de retenção de cada composto nas condições usadas para analisar o paraquato bem como, o espectro de absorção. Através da injeção direta de soluções aquosas de 100 mg.L<sup>-1</sup> de cada composto, obtiveram-se os respetivos cromatogramas e espectros (Anexo I). No caso do 4,4-Dipiridil, como é muito pouco solúvel em água, a solução foi preparada em acetonitrilo.

As condições de análise utilizadas para a identificação dos tempos de retenção e dos espectros para os possíveis produtos de degradação foram as mesmas que se utilizaram para a quantificação do paraquato em reação de Fenton.

Os padrões de ácido málico e ácido sucínico não apresentaram nenhum pico significativo, indicando que não seriam identificados em HPLC-DAD nas condições do método analítico utilizadas. Como tal abandonou-se a pesquisa destes nas reações de Fenton.

Na Tabela 4.4 estão identificados os tempos de retenção e máximos de absorção dos produtos de degradação adquiridos comercialmente.

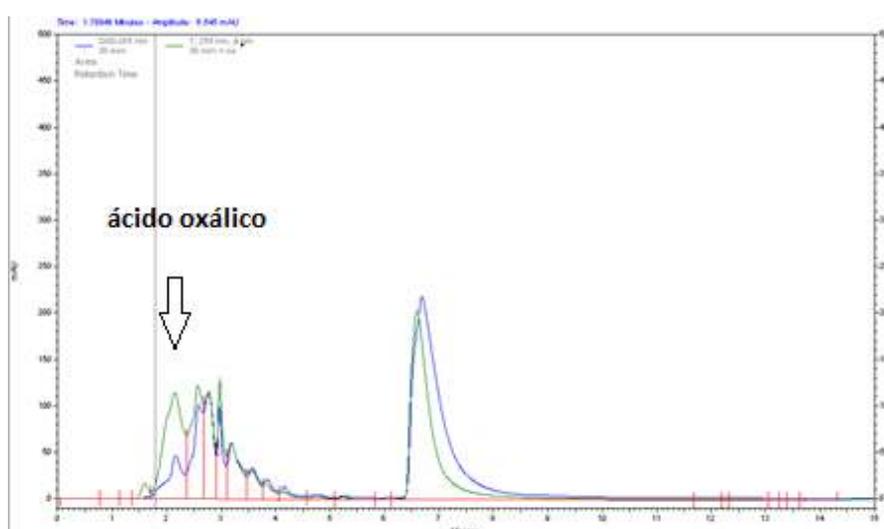
**Tabela 4.4: Tempos de retenção e máximos de absorção dos padrões dos possíveis produtos de degradação adquiridos comercialmente**

Composto	Tempo de retenção (min)	Máximo de absorção (nm)
4,4-Dipiridil	2,220	246
Ácido Isonicotínico	2,953	264
Iodeto de 1-Etil-4-metoxicarbonilpiridino	2,697 e 5,007	266 e 274
Ácido Oxálico	1,727	220

Comparando estes valores de tempo de retenção e de máximo de absorção com os obtidos através da injeção de as amostra de paraquato retiradas ao longa da reação de Fenton não foi possível associar inequivocamente os compostos adquiridos aos picos cromatográficos obtidos (Figura 4.12).

Perante este cenário, realizou-se novamente uma experiência de Fenton nas mesmas condições mas, em vez de retirar apenas uma amostra nos vários intervalos de tempo da reação, foram retiradas duas. Numa das amostras foi adicionado um volume conhecido de um padrão de um dos produtos de degradação adquiridos antes de injetar.

O intuito deste teste foi verificar se a adição de um determinado padrão levava ao aumento do sinal de algum dos picos detetados. Este teste só permitiu a identificação de um composto, o ácido oxálico, como se pode verificar na Figura 4.15 e também por comparação do espectro do pico respetivo e do espectro do ácido oxálico. Nos restantes compostos a adição do padrão levou ao aumento do sinal de mais de um pico cromatográfico.



**Figura 4.15: Comparação de cromatogramas obtidos a partir da injeção de uma amostra da reação de Fenton (a azul) e da injeção de uma amostra da reação de Fenton a que se adicionou 0,5 mL de uma solução de 50 mg.L<sup>-1</sup> de ácido oxálico, em HPLC-DAD.**

#### 4.4.3 Identificação dos produtos de degradação do paraquato adquiridos comercialmente em LC-MS

Para a identificação dos restantes produtos de degradação do paraquato, recorreu-se ao LC-MS. Numa primeira fase procedeu-se à obtenção dos tempos de retenção e da razão  $m/z$  dos possíveis produtos de degradação adquiridos, através da injeção de soluções aquosas de cada um deles ( $50 \text{ mg.L}^{-1}$ ), à exceção do 4,4-dipiridil que foi preparado em acetonitrilo, pelas razões já referidas anteriormente. As condições de análise utilizadas na injeção das referidas amostras foram as mesmas que as usadas na identificação/quantificação do paraquato por LC-MS.

Também em LC-MS o ácido succínico e o ácido málico não foram detetados, sendo que desta vez a deteção do ácido oxálico não foi conseguida.

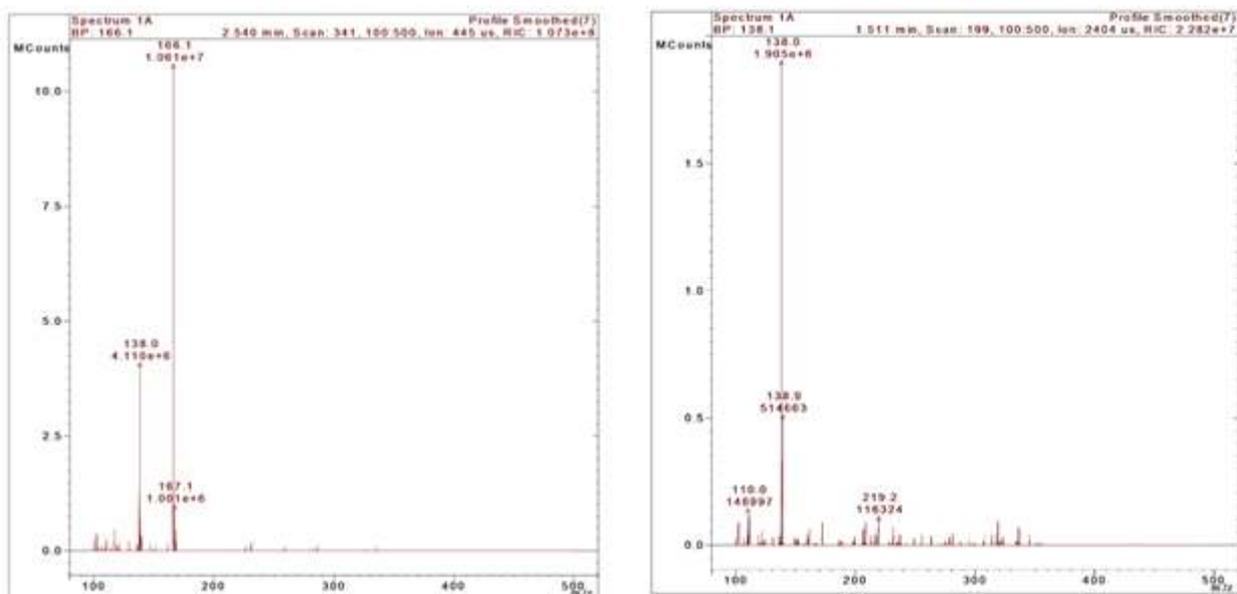
A injeção de soluções padrão em água (do ácido isonicotínico e 1-etil-4-metoxycarbonilpiridínio) e em acetonitrilo (do 4,4-dipiridil) permitiu obter os tempos de retenção e os iões moleculares (razão  $m/z$ ) dos compostos adquiridos (Tabela 4.5). Os cromatogramas e espetros de massa de cada um dos compostos estão representados no Anexo 2.

*Tabela 4.5: Tempo de retenção e razão  $m/z$  para os compostos de degradação injetados em LC-MS*

Composto	Razão $m/z$	Tempo de retenção (min)
<b>4,4-Dipiridil</b>	157	3,336
<b>Ácido Isonicotínico</b>	124	1,487
<b>1-etil-4-metoxycarbonilpiridínio</b>	166	2,540

Quanto ao composto 1-etil-4-metoxycarbonilpiridino, este apresenta um ião molecular maioritário ( $m/z$  166) que é diferente daquele que se obteria para o possível subproduto de degradação do paraquato (4-carboxi-1-metilpiridino;  $m/z$  138), uma vez que o primeiro tem mais dois grupos metilo.

Contudo, nos espetros de massa do 1-etil-4-metoxycarbonilpiridino, composto adquirido, aparece também o ião molecular 138 embora em menor abundância. Na Figura 4.16 compara-se os espetros de massa da injeção do padrão do 1-etil-4-metoxycarbonilpiridino e do composto 4-carboxi-1-metilpiridino que se julga estar presente nas amostras de paraquato retiradas da reação de Fenton.



**Figura 4.16:** Comparação do espectro de massa do *1-etil-4-metoxicarbonilpiridino* (imagem da esquerda) com o espectro de massa do *4-carboxi-1-metilpiridino* formado na reação de Fenton (imagem da direita).

Para proceder à verificação da existência de algum destes compostos como produtos da degradação do paraquato por reagente de Fenton, injetaram-se amostras retiradas ao longo da reação de degradação (Condições da reação de Fenton: [Paraquato] = 100 mg.L<sup>-1</sup>; [Fe<sup>2+</sup>] = 5 × 10<sup>-4</sup> M; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 1,6 × 10<sup>-2</sup> M; T = 30°C; pH = 3.). Analisando os cromatogramas e espectros de massa correspondentes verificou-se a presença do íon molecular m/z 124, correspondente ao ácido isonicotínico e do íon molecular m/z 138 correspondente ao 4-carboxi-1-metilpiridino.

Quanto ao 4,4'-dipiridil, o seu íon molecular (m/z 157), não foi identificado em nenhuma das amostras injetadas da reação de Fenton, o que indica que nas condições utilizadas para a degradação do paraquato este parece não se formar.

#### 4.5 Estimativa da Quantificação dos produtos de degradação identificados

Dos produtos de degradação adquiridos, os que foram identificados ao longo da reação de degradação do paraquato por reagente de Fenton foram o ácido oxálico, ácido isonicotínico e o íon 4-carboxi-1-metilpiridino.

Após identificação, tornou-se necessário avaliar a variação da sua concentração ao longo do tempo tal como a conversão de paraquato em cada um deles. Uma vez que, por falta de tempo, não foi possível traçar uma reta de calibração para cada um dos produtos de degradação identificados, tentou estimar-se a quantidade de cada um deles ao longo da reação, no sentido de avaliar a sua importância relativa no processo de degradação.

Para a aproximação recorreu-se a um fator de resposta,  $f$ , que resulta da razão entre a resposta instrumental para uma solução aquosa de um determinado composto ( $A_{padrão}$ ) e a concentração desse composto na referida solução ( $C_{padrão}$ ) – Equação (1) e Equação (2).

$$C_{produto\ de\ degradação} = \frac{A_{produto\ de\ degradação}}{f} \quad (1) \quad \text{Em que } f = \frac{A_{padrão}}{C_{padrão}} \quad (2)$$

#### 4.5.1 Quantificação do ácido oxálico por HPLC-DAD

O ácido oxálico foi o único composto identificado e quantificado por HPLC-DAD. Porém antes de se proceder à quantificação, estimou-se a incerteza associada ao método utilizado e analisou-se a interferência das espécies de Fenton nessa quantificação.

##### 4.5.1.1 Estimativa da incerteza associada à quantificação do ácido oxálico

A estimativa da incerteza associada ao método utilizado baseou-se no desvio padrão relativo das áreas cromatográficas obtidas e está representada na Tabela 4.6.

*Tabela 4.6: Incerteza associada ao método de quantificação de ácido oxálico em HPLC-DAD*

Concentração, mg.L <sup>-1</sup>	Área padrão, UA	Incerteza %
50	$(7 \pm 4) \times 10^6$	52

Analisando a incerteza aproximada associada ao método, verifica-se que é um valor muito elevado. Contudo devido à impossibilidade de obter uma reta de calibração para quantificar o ácido oxálico, optou-se por prosseguir com a quantificação. É de salientar, que estes resultados devem ser encarados como estimativas que precisam de ser confirmados posteriormente, procedendo-se à quantificação adequada de cada um dos compostos.

##### 4.5.1.2 Análise da interferência das espécies de Fenton na quantificação de ácido oxálico

No estudo das interferências das espécies de Fenton na quantificação do ácido oxálico estudou-se o efeito da presença do ião ferro II e do peróxido de hidrogénio. O efeito do sulfito não foi estudado, pois as amostras foram injetadas diretamente, não se procedendo à interrupção da reação por adição de sulfito de sódio.

Para tal, foram injetadas 3 amostras de ácido oxálico em HPLC-DAD. Uma das amostras correspondia a uma solução padrão de 50 mg.L<sup>-1</sup> em água, a segunda amostra era uma solução de 50 mg.L<sup>-1</sup> na presença do ião ferro II ( $5,0 \times 10^{-4}$  M) a pH 3 e a terceira amostra era uma solução de 50 mg.L<sup>-1</sup> na presença do peróxido de hidrogénio ( $1,6 \times 10^{-2}$  M) também a pH 3.

A avaliação das interferências foi feita com base no erro relativo associado às áreas cromatográficas obtidas na injeção das amostras em HPLC-DAD (Equação 3). Na Tabela 4.7 apresentam-se os resultados obtidos nos ensaios de interferência.

**Tabela 4.7: Análise da Interferência do Fe (II) e peróxido de hidrogénio na quantificação do ácido oxálico em HPLC-DAD.**

	Padrão de 50 mg.L <sup>-1</sup>	Solução com [Fe <sup>2+</sup> ] = 5,0 × 10 <sup>-4</sup> M	Solução com [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] = 1,6 × 10 <sup>-2</sup> M
Áreas (mUA)	3,4 × 10 <sup>6</sup>	4,17 × 10 <sup>6</sup>	2,07 × 10 <sup>6</sup>
Erro Relativo (%)	-	23	39

O erro relativo é calculado pela Equação (3)

$$Erro\ relativo\ (\%) = \frac{(A_{Padr\tilde{a}o} - A_{Padr\tilde{a}o + interfe-rente})}{A_{Padr\tilde{a}o}} \quad \text{Equa\c{c}\~{a}o\ (3)}$$

onde  $A_{Padr\tilde{a}o}$  é a área cromatográfica obtida a partir da injeção de um padrão de um dos produtos de degradação e  $A_{Padr\tilde{a}o + interfe-rente}$  é a área cromatográfica obtida a partir da injeção de um padrão de um dos produtos de degradação com a adição do interferente em estudo.

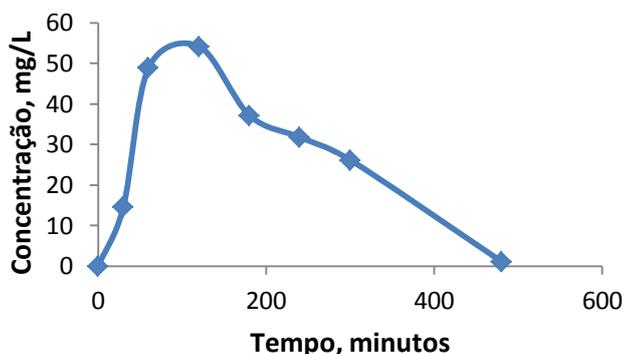
Comparando o erro relativo associado à presença de cada uma das espécies de Fenton, com o valor calculado para a incerteza aproximada do método (52%), verifica-se que ambos os erros relativos são inferiores. Assim, pode supor que, tendo em conta a aproximação efetuada, as espécies de Fenton não interferem na estimativa de quantificação de ácido oxálico efetuada.

#### 4.5.1.3 Quantificação do ácido oxálico ao longo de uma reação de Fenton e avaliação da sua toxicidade

Para o estudo da variação do ácido oxálico ao longo de uma reação com reagente de Fenton injetaram-se no HPLC-DAD várias amostras retiradas do reator onde decorria a reação de oxidação. Na Figura 4.17 está representada a variação da concentração de ácido oxálico ao longo do tempo de reação. Note-se que as concentrações foram calculadas através da Equação (1) recorrendo-se à resposta instrumental obtida para cada amostra.

Comparando a variação da concentração obtida de ácido oxálico ao longo do tempo (Figura 4.17) com a que é representa na Figura 2.2, referente ao estudo de Dhaouadi e Adhoum (2009, [19]), observa-se que os gráficos apresentam um valor máximo de concentração no início da reação (180 minutos na Figura 4.17 e cerca de 40 minutos na Figura 2.2), sendo esse valor é mais cedo na Figura 2.2. No final da reação a Figura 2.2 apresenta uma concentração de ácido oxálico constante, enquanto na

Figura 4.17 a concentração de ácido oxálico vai sempre diminuindo até ser praticamente nula. Essa diferença de comportamentos poderá ser explicada com a possível reação entre o ácido oxálico e os radicais hidroxilo que depois de degradarem todo o paraquato existente no meio reacional, vão degradar o ácido oxálico em CO<sub>2</sub>. De realçar que a concentração se apresenta em mM na Figura 2.2 e em mg.L<sup>-1</sup> na Figura 4.17.



**Figura 4.17:** Variação da concentração de ácido oxálico obtido da injeção de amostras da reação de Fenton retiradas ao longo do tempo em HPLC-DAD. Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de acetonitrilo; 1 mL.min<sup>-1</sup>; volume de injeção de 99 µL. Condições da reação de Fenton: [PQ] = 100 mg.L<sup>-1</sup>; [Fe<sup>2+</sup>] = 5,0 × 10<sup>-4</sup> M; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 1,6<sup>-2</sup> M; T = 30 °C; pH = 3.

É importante também referir que o ácido oxálico, tal como outros ácidos carboxílicos são apresentados como produtos finais da degradação de vários compostos orgânicos [24].

Com o intuito de analisar a importância relativa do ácido oxálico como produto de degradação do paraquato, estimou-se a conversão de paraquato neste composto ao longo da reação de Fenton, cujos valores estão apresentados na Tabela 4.8. A metodologia de cálculo da conversão está apresentada no Anexo 3.

**Tabela 4.8:** Conversão do paraquato em ácido oxálico ao longo da reação de Fenton

Tempo de reação (minutos)	Conversão (%)
0	0,0
30	5,0
60	17,0
120	19,0
180	13,0
240	11,0
300	9,0
480	0,4

No estudo paramétrico da degradação do paraquato em que este trabalho se baseou, ao fim de 4 horas de reação não é detetado paraquato no meio reacional, ou seja todo ele foi degradado. Obtém-se também uma percentagem de mineralização de 60%, ou seja a quantidade de CO<sub>2</sub> existente no efluente resultante da degradação da solução de paraquato é 60 % da quantidade inicial de carbono orgânico existente no paraquato inicial [18]. Assim só 40% da quantidade de paraquato inicial se converte em produtos de degradação ( $5,38 \times 10^{-5}$  mol). Da quantidade inicial de paraquato, 11% converte-se em ácido oxálico ao fim de 4 horas como se pode verificar na Tabela 4.8, o que significa que 27,5% da quantidade de paraquato que não se converteu em CO<sub>2</sub> ao fim de 4 horas se converteu em ácido oxálico.

Estimada a conversão de paraquato em ácido oxálico, tornou-se pertinente avaliar a toxicidade do mesmo, para provar que este composto é menos tóxico e perigoso que o paraquato (Tabela 4.9)

**Tabela 4.9: Comparação da toxicidade do ácido oxálico e do paraquato**

Toxicidade	Paraquato [25]	Ácido oxálico [26]
DL <sub>50</sub> oral em ratos (mg/kg)	57	375

Por comparação dos dois valores, confirma-se a menor toxicidade do ácido oxálico em relação ao paraquato.

#### 4.5.2 Quantificação do ácido isonicotínico por LC-MS

O estudo efetuado para o ácido oxálico foi igualmente feito para o ácido isonicotínico, mas desta vez a quantificação foi efetuada em LC-MS. Os cálculos da incerteza aproximada e da interferência das espécies de Fenton na quantificação foram também efetuados.

##### 4.5.2.1 Estimativa da incerteza associada à quantificação do ácido isonicotínico

O cálculo da incerteza aproximada ao método de quantificação do ácido isonicotínico, foi feito com base na resposta instrumental para um padrão de ácido isonicotínico em água. Os valores para a incerteza aproximada do método utilizado encontram-se na Tabela 4.10.

**Tabela 4.10: Incerteza associada ao método de quantificação de ácido isonicotínico em LC-MS**

Concentração, mg.L <sup>-1</sup>	Área padrão, UA	Incerteza aproximada, %
50,0	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^8$	6,0

Neste caso, e mesmo não existindo uma reta de calibração para a quantificação do ácido isonicotínico, a incerteza aproximada é de 6%. No entanto, este valor não passa de uma aproximação que padece de confirmação posterior, através de estudos para a quantificação exata do ácido isonicotínico.

#### 4.5.2.2 *Análise da interferência das espécies de Fenton na quantificação do ácido isonicotínico*

Foi analisada a interferência da presença do ião ferro II e do peróxido de hidrogénio na quantificação do ácido isonicotínico.

A avaliação das interferências seguiu a mesma metodologia da utilizada para o ácido oxálico, avaliando o erro relativo das áreas cromatográficas através da Equação (3).

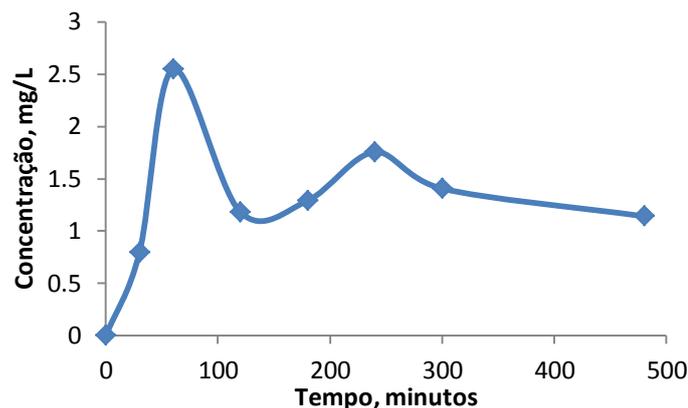
**Tabela 4.11: Análise da Interferência dos elementos da Reação de Fenton na quantificação de ácido isonicotínico em LC-MS.**

	Padrão de 50 mg.L <sup>-1</sup>	Solução com [Fe <sup>2+</sup> ] = 5 × 10 <sup>-4</sup> M	Solução com [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] = 1,6 × 10 <sup>-2</sup> M
Área Cromatográfica, UA	2.18 × 10 <sup>8</sup>	2.08 × 10 <sup>8</sup>	8,74 × 10 <sup>7</sup>
Erro Relativo (%)	-	4,0	60,0

Comparando os valores dos erros relativos apresentados na Tabela 4.11, com o valor calculado para a incerteza aproximada (6%) conclui-se que a presença do ião ferro (II) não interfere na quantificação do ácido isonicotínico, pois o seu erro relativo é menor que o valor da incerteza aproximada. No entanto, a presença de peróxido de hidrogénio leva a um erro relativo muito superior à incerteza aproximada. Por esta razão, para o cálculo do fator de resposta  $f$ , considerou-se a resposta instrumental obtida para a solução de 50 mg/L de ácido isonicotínico na presença do peróxido.

#### 4.5.2.2.1 *Quantificação do ácido isonicotínico ao longo de uma reação de Fenton e avaliação da sua toxicidade*

A presença do ácido isonicotínico ao longo do processo foi avaliada a partir da injeção de amostras correspondentes a vários tempos de reação. Com o valor da área cromatográfica obtida recorreu-se à Equação (1) para calcular a concentração de ácido isonicotínico ao longo da reação de Fenton. Na Figura 4.18 está representada a variação da concentração de ácido isonicotínico ao longo da reação de degradação do paraquato por reagente de Fenton.



**Figura 4.18:** Variação da concentração de ácido isonicotínico em função do tempo da reação de Fenton em LC-MS. Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 5 mM e 20% de metanol; 0,2 mL.min<sup>-1</sup>; volume de injeção de 99 µL. Condições da reação de Fenton: [PQ] = 100 mg.L<sup>-1</sup>; [Fe<sup>2+</sup>] = 5,0 × 10<sup>-4</sup> M; [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 1,6<sup>-2</sup> M; T = 30 °C; pH = 3.

Para verificar a importância relativa do ácido isonicotínico nos produtos de degradação do paraquato, estimou-se a conversão de paraquato no mesmo (Tabela 4.12). A metodologia de cálculo da conversão está apresentada no Anexo 3.

Como foi referido anteriormente, a quantidade de paraquato que ao fim de 4 horas de reação não se converteu em CO<sub>2</sub> é de 40%. Ao fim das mesmas 4 horas a conversão de paraquato em ácido isonicotínico é de 3%, o que significa que a importância relativa do ácido isonicotínico como produto de degradação do paraquato é de 8%. Comparando este valor com a conversão obtida para os outros compostos, concluiu-se que o estudo deste composto em trabalhos futuros não deverá merecer grande relevância.

**Tabela 4.12:** Conversão de paraquato em ácido isonicotínico ao longo da reação de Fenton

Tempo de reação (minutos)	Conversão (%)
0	0
30	1
60	5
120	2
180	2
240	3
300	3
480	2

Tal como para o ácido oxálico foi avaliada a toxicidade do ácido isonicotínico (Tabela 4.13). O ácido isonicotínico apresenta valores de toxicidade muito menores que o paraquato (para o critério de

comparação usado), sendo portanto potencialmente menos perigoso para a saúde humana. Apresenta também valores bastante inferiores de toxicidade que o ácido oxálico.

**Tabela 4.13: Comparação dos valores de toxicidade do paraquato e do ácido isonicotínico.**

Toxicidade	Paraquato [25]	Ácido Isonicotínico [27]
DL <sub>50</sub> oral em ratos (mg/kg)	57	5000

#### 4.5.3 Quantificação do ião 4-carboxi-1-metilpiridino por LC-MS

Tal como para os outros dois compostos, foi também feita a estimativa da variação da concentração do ião 4-carboxi-1-metilpiridino ao longo do tempo da reação de Fenton assim como a conversão de paraquato neste composto. Procedeu-se também ao cálculo da incerteza aproximada do método utilizado para a quantificação deste composto e ao estudo de interferência das espécies Fenton na quantificação.

Neste caso o erro da estimativa efetuada na quantificação é mais significativo uma vez que o composto adquirido é diferente do subproduto de degradação identificado (ião 4-carboxi-1-metilpiridino) (Figura 4.14).

##### 4.5.3.1 Estimativa da incerteza associada à quantificação do ião 4-carboxi-1-metilpiridino

Avaliou-se a incerteza aproximada do método de quantificação utilizado. Na Tabela 4.14 estão os valores para a incerteza do método utilizado.

**Tabela 4.14: Incerteza associada ao método de quantificação do ião 4-carboxi-1-metilpiridino em LC-MS**

Concentração, mg.L <sup>-1</sup>	Área padrão, UA	Incerteza aproximada, %
50,0	$(3,0 \pm 0.8) \times 10^8$	25,0

Para a quantificação do ião 4-carboxi-1-metilpiridino a incerteza aproximada é de 25 %, o que leva a dizer que o método utilizado permite uma aproximação considerável, mas que no entanto, estará sempre passível de ser confirmada.

##### 4.5.3.2 Análise da interferência das espécies de Fenton na quantificação do ião 4-carboxi-1-metilpiridino

Foi também testada a interferência das espécies de Fenton na quantificação do ião 1-etil-4-metoxicarbonilpiridino.

Tal como para os outros dois produtos de degradação comparou-se a área obtida através da injeção de três amostras diferentes do ião 1-etil-4-metoxicarbonilpiridino de concentração  $50 \text{ mg.L}^{-1}$ . A comparação foi feita através do erro relativo associado as áreas obtidas (Equação (3)) e os valores obtidos estão representados na Tabela 4.15.

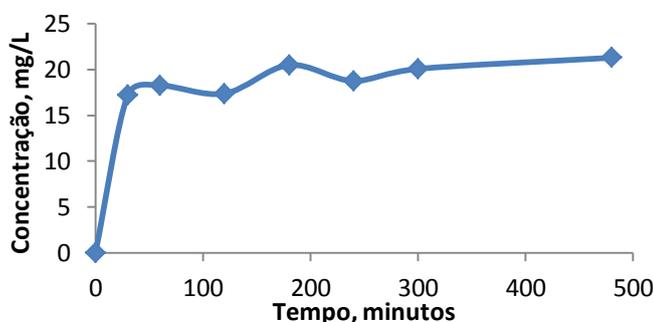
**Tabela 4.15: Análise da Interferência do Fe (II) e peróxido de hidrogénio na quantificação do ião 1-etil-4-metoxicarbonilpiridino em LC-MS**

	Padrão de $50 \text{ mg.L}^{-1}$	Solução com $[\text{Fe}^{2+}] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$	Solução com $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,6 \times 10^{-2} \text{ M}$
Áreas (mUA)	$3.6 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$4,0 \times 10^6$
Erro Relativo (%)	-	14	12

Comparando o valor dos erros relativos associados à presença de ferro (II) e do peróxido de hidrogénio com o valor da incerteza aproximada verifica-se que aqueles são inferiores. Assim, considerou-se que não existe interferência das espécies de Fenton na quantificação do ião 1-etil-4-metoxicarbonilpiridino.

#### 4.5.3.3 Quantificação do ião 4-carboxi-1-metilpiridino ao longo de uma reação de Fenton e avaliação da sua toxicidade

A presença do ião 4-carboxi-1-metilpiridino ao longo do processo foi avaliada a partir da injeção de amostras correspondentes a vários tempos de reação. Com o valor da área cromatográfica obtida recorreu-se à Equação (1) para calcular a concentração de ião 4-carboxi-1-metilpiridino ao longo da reação de Fenton. Na Figura 4.19 está representada a variação da concentração de ião 4-carboxi-1-metilpiridino ao longo da reação de degradação do paraquato por reagente de Fenton. De referir que para o calculo do valor de  $f$ , injetou-se um padrão de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  de ião 1-etil-4-metoxicarbonilpiridino.



**Figura 4.19: Variação da concentração do ião 4-carboxi-1-metilpiridino em função do tempo da reação de Fenton em LC-MS. Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 5 mM e 20% de metanol;  $0,2 \text{ mL.min}^{-1}$ ; volume de injeção de  $99 \mu\text{L}$ . Condições da reação de Fenton:  $[\text{PQ}] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $[\text{Fe}^{2+}] = 5,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1,6 \times 10^{-2} \text{ M}$ ;  $T = 30^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 3$ .**

Calculada a concentração do ião 4-carboxi-1-metilpiridino ao longo da reação de Fenton, foi estimada a conversão de paraquato neste composto e a importância relativa como produto de degradação do paraquato (Tabela 4.16). A metodologia de cálculo da conversão está apresentada no Anexo 3.

**Tabela 4.16: Conversão do paraquato no ião 4-carboxi-1-metilpiridino**

Tempo de reação (minutos)	Conversão 4-carboxi-1-metilpiridino (%)
0	0
30	12
60	12
120	12
180	14
240	13
300	14
480	14

Ao fim de 4 horas o valor da conversão de paraquato no ião 4-carboxi-1-metilpiridino é de 13%. Sabendo que apenas 40% do paraquato inicial se converte em produtos de degradação, conclui-se que a importância relativa deste composto como produto de degradação é de 32,5%.

Contrariamente ao que foi feito para os outros dois compostos de degradação identificados, neste caso não foi possível comparar os valores de toxicidade com o do paraquato, pois não foram encontrados os valores de toxicidade para o ião 4-carboxi-1-metilpiridino.

#### **4.6 Avaliação da evolução de outros produtos de degradação detetados ao longo da reação de Fenton em LC-MS**

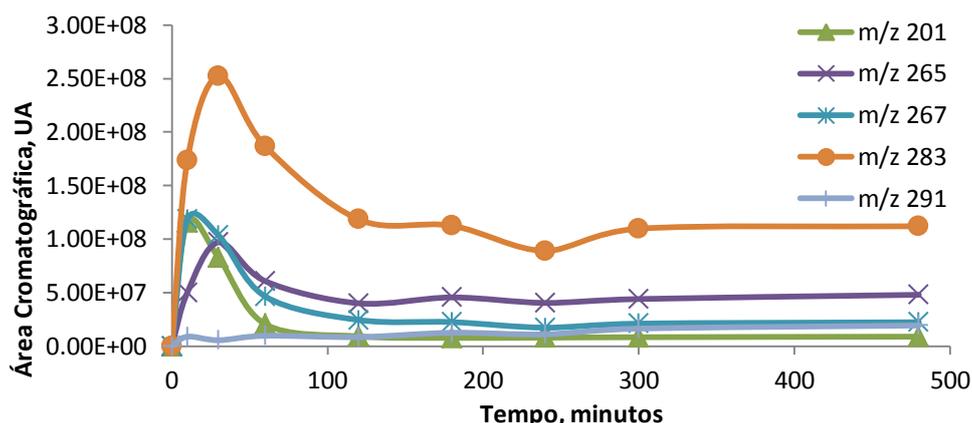
A injeção das amostras retiradas ao longo da reação em LC-MS e HPLC-DAD permitiu a quantificação e identificação nos produtos de degradação de três dos compostos adquiridos. Contudo, a análise das amostras da reação por LC-MS permitiu também a deteção de outros produtos de degradação, através do seu ião molecular. Apesar de a sua identificação não ter sido possível, foi efetuada a análise da variação da sua área cromatográfica ao longo do processo de degradação. Para além disso tentaram-se também encontrar possíveis estruturas moleculares que pudessem corresponder a esses respetivos valores de m/z.

#### 4.6.1 Evolução da área cromatográfica dos restantes produtos de degradação detetados em LC-MS

Para além dos compostos já identificados e quantificados em HPLC-DAD e LC-MS, apareceram outros na injeção das amostras retiradas da reação de Fenton. Analisando esses picos cromatográficos detetaram-se outros iões moleculares. Os mais predominantes foram os seguintes iões: 201, 265, 267, 283 e 291. Na Figura 4.20 está representada a variação da sua área cromatográfica ao longo do tempo da reação de Fenton.

Da análise da Figura 4.20 verifica-se que em termos de áreas cromatográficas, o composto com ião molecular 283 é o que apresenta a maior área cromatográfica ao longo de toda a reação de Fenton, contudo isso pode não implicar que seja o que se apresenta em maior importância relativo no meio.

De salientar também, que todos estes compostos apresentam um ião molecular maior que o do paraquato, o que leva a indicar que são formados a partir de reações de adição de radicais hidroxilo à molécula de paraquato, reações de hidrogenação ou possíveis rearranjos moleculares.

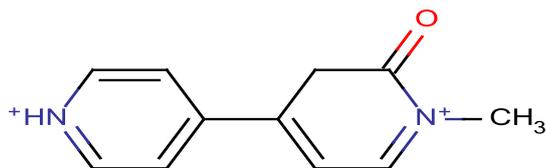


**Figura 4.20:** Variação da área cromatográfica dos restantes iões moleculares detetados em LC-MS em função do tempo da reação de Fenton. Fase móvel utilizada: 80 % de água acidificada com HFBA 5 mM e 20% de Metanol. Condições da reação de Fenton:  $[PQ] = 100 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $[Fe^{2+}] = 5 \times 10^{-4} \text{ M}$ ;  $[H_2O_2] = 1,6^2 \text{ M}$ ;  $T = 30^\circ\text{C}$ ;  $\text{pH} = 3$ .

#### 4.6.2 Possíveis estruturas moleculares dos restantes compostos identificados por LC-MS

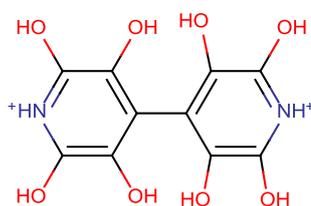
Dos compostos avaliados que não foram identificados tentaram-se encontrar possíveis estruturas ou compostos que correspondessem ao mesmo ião molecular.

Para o ião molecular 201, encontrou-se na literatura a referência de um composto, a monopyridona (Figura 4.21), que apresenta o mesmo ião molecular [23] e também é um dos compostos indicados como produto de degradação do paraquato (Tabela 2.1). Porém a sua aquisição não foi possível por não se encontrar disponível comercialmente.



**Figura 4.21:** Estrutura molecular para a monopiridona

Para os restantes compostos, não se encontrou na literatura, nenhum composto que apresente ião molecular semelhante. Contudo para o ião 285 apresenta-se uma estrutura molecular possível, a partir da hidrogenação da molécula de paraquato (Figura 4.22)



**Figura 4.22:** Estrutura molecular possível para o composto com ião molecular identificado em LC-MS de 283



## 5 Conclusões

A deteção dos subprodutos da degradação do paraquato por oxidação química com reagente de Fenton foi efetuada através de HPLC-DAD e LC-MS.

Inicialmente, foi garantido que a degradação do paraquato obtida por injeção das amostras sem paragem da reação era semelhante à degradação obtida por injeção das amostras parando a reação com a adição de sulfito de sódio (as diferenças observadas encontravam-se dentro da incerteza analítica).

A comparação dos cromatogramas obtidos das injeções das amostras sem paragem da reação e das amostras com paragem, comprova o aparecimento de um conjunto de picos nos tempos de retenção compreendidos entre 1,5 minutos e 5 minutos. Nas amostras em que se pára a reação com sulfito de sódio, este conjunto de picos não é identificado, pois o pico correspondente ao sulfito surge num tempo de retenção compreendido nesse mesmo intervalo de tempos de retenção.

Identificaram-se três produtos de degradação do paraquato: ácido oxálico, ácido isonicotínico e ião 4-carboxi-1-metilpiridino.

Estimou-se a quantificação dos produtos identificados, o que permitiu o cálculo da conversão ao longo do tempo da reação de paraquato em cada um deles. Ao fim de 4 horas, 60% do paraquato inicial encontra-se mineralizado, ou seja, foi transformado em dióxido de carbono, restando 40% do paraquato inicial ( $5,38 \times 10^{-5}$  mol de paraquato), que se converteu em produtos de degradação. Das  $5,38 \times 10^{-5}$  mol de paraquato que se converteram em produtos de degradação, 27,5% converteu-se em ácido oxálico, 8% em ácido isonicotínico e 32,5% no ião 4-carboxi-1-metilpiridino, o que representa que 68 % do paraquato não transformado em  $\text{CO}_2$  foi identificado.

Para o ácido oxálico e para o ácido isonicotínico, foram comparados os valores de toxicidade ( $\text{DL}_{50}$  por via oral em ratos igual a 375 mg/kg e 5000 mg/kg respetivamente) com o do paraquato (57 mg/kg) comprovando-se a menor toxicidade destes dois produtos de degradação identificados. Não se encontrou na literatura o valor de  $\text{DL}_{50}$  para o ião 4-carboxi-1-metilpiridino.

Por último a análise em LC-MS permitiu também identificar mais cinco iões moleculares ( $m/z = 201, 265, 267, 283, 291$ ) com área cromatográfica relevante ao longo da reação, cuja identificação não foi conseguida. Eventualmente estes 5 compostos representam os 39% de paraquato não mineralizado cuja identificação não foi conseguida. Para o ião molecular 201 e 283 são apresentadas possíveis estruturais moleculares.

## 6 Avaliação do trabalho realizado

### 6.1 Objetivos Realizados

O objetivo do trabalho era a deteção dos produtos de degradação do paraquato por oxidação com reagente de Fenton. Identificaram-se três produtos de degradação: ácido oxálico (por HPLC-DAD), ácido isonicotínico e ião 4-carboxi-1-metilpiridino (por LC-MS). Para estes três compostos foi feita uma aproximação de quantificação, estimando-se que ao fim de 4 horas, 68% do paraquato que não foi mineralizado se converteu nos produtos de degradação identificados.

Também foram detetados, em LC-MS, mais 5 compostos cuja identificação não foi possível, apenas a determinação do seu ião molecular (razão  $m/z$ ).

### 6.2 Outros Trabalhos realizados

No decorrer do trabalho foi efetuado um estudo para a tentativa da redução da interferência das espécies de Fenton na quantificação dos produtos de degradação. Esse estudo baseou-se na subida do pH das amostras injetadas de 3 para 10. Contudo este estudo não levou a resultados conclusivos, necessitando de novos desenvolvimentos.

### 6.3 Limitações e Trabalho Futuro

Em primeiro lugar, a curta duração da tese limitou o trabalho que seria expectável realizar, como por exemplo, a obtenção de retas de calibração que permitissem a quantificação mais precisa dos produtos de degradação.

Quanto ao trabalho desenvolvido as grandes limitações prenderam-se com a inexistência, comercialmente, de padrões de todos os compostos identificados como possíveis produtos de degradação do paraquato. A inexistência de um *autosampler* para o LC-MS levava a que todas as injeções tivessem de ser feitas manualmente.

Como futuro trabalho, a confirmação das estimativas apresentadas para a quantificação dos produtos de degradação deve ser efetuada, através da obtenção de retas de calibração para cada um deles, tanto para soluções em água, como para soluções na presença das espécies de Fenton.

### 6.4 Apreciação final

A realização deste trabalho representou para o autor um desafio aliciante, e um teste para as suas capacidades. Serviu para aprofundar e adquirir conhecimentos em química analítica, mais especificamente, nas metodologias de LC-MS e de HPLC-DAD.

## 7 Referências

1. Maldonado, M.I., Passarinho, P. C., Oller, I., Gernjak, W., Fernández, P., Blanco, J., Malato, S., *Photocatalytic degradation of EU priority substances: A comparison between TiO<sub>2</sub> and Fenton plus photo-Fenton in a solar pilot plant*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2007. **185**(2-3): p. 354-363.
2. SecurEau, *State-of-art report about decontamination of deliberately contaminated drinking water networks with CBRN agents and disposal of decontaminated wastes*. 2011: p. 1-72.
3. UK, P., *Fact sheet - paraquat*. Pesticides News, 1996. **32**: p. 20-21.
4. Network, T.E.T. *Paraquat*. 1996 22 de Maio de 2012]; Available from: <http://extoxnet.orst.edu/pips/paraquat.htm>.
5. Richa Jaiswal, M.A.K., Javed Musarrat, *Photosensitized paraquat-induced structural alterations and free radical mediated fragmentation of serum albumin*. Journal of Photochemistry and Photobiology, 2002. **67**(163-170).
6. P. Tantriratna, W.W., S. Neramittagapong, K.Wantala & N. Grisdanurak, *Optimization for UV-photocatalytic degradation of paraquat over titanium dioxide supported on rice husk silica using Box-Behnken design*. Indian Journal Of Chemical Technology, 2011. **18**(363-371).
7. Communities, K.o.S.a.C.o.t.E., *The Court of First Instance Annuls The Directive Authorising Paraquat as an Active Plant Protection Substance*, 2007.
8. Abdessalem, A.K., Bellakhal, Nizar, Oturan, Nihal, Dachraoui, Mohamed, Oturan, Mehmet A., *Treatment of a mixture of three pesticides by photo- and electro-Fenton processes*. Desalination, 2010. **250**(1): p. 450-455.
9. Gogate, P.R., Pandit, Aniruddha B., *A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions*. Advances in Environmental Research, 2004. **8**(3-4): p. 501-551.
10. Castro, J.P., Faria, P. *Oxidação Química com Reagente de Fenton*. 2001 23 Maio de 2012]; Available from: [http://paginas.fe.up.pt/~pea01028/Pl.htm#\\_Toc521147760](http://paginas.fe.up.pt/~pea01028/Pl.htm#_Toc521147760).
11. Sun, J.H., Sun, S. P., Fan, M. H., Guo, H. Q., Qiao, L. P., Sun, R. X., *A kinetic study on the degradation of p-nitroaniline by Fenton oxidation process*. J Hazard Mater, 2007. **148**(1-2): p. 172-7.
12. Jiang, C., Pang, S., Ouyang, F., Ma, J., Jiang, J., *A new insight into Fenton and Fenton-like processes for water treatment*. J Hazard Mater, 2010. **174**(1-3): p. 813-7.
13. Scott, R.P.W. *Analytical Spectroscopy*. Available from: <http://www.analyticalspectroscopy.net/ap1-6.htm>.
14. Homem, V., *Tecnologias Alternativas de Remoção de Antibióticos de Águas Contaminadas*, 2011, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto. p. 346.
15. Niessen, W.M.A., *State-of-art in liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography, 1999: p. 179-197.
16. Sheehan, T., Baars, B., *Atmospheric Pressure Ionization*. 2007.
17. Dong, M.W., *Modern HPLC for Practicing Scientists*2006.
18. Santos, M.S.F., Alves, A., Madeira, Luis M., *Paraquat removal from water by oxidation with Fenton's reagent*. Chemical Engineering Journal, 2011. **175**: p. 279-290.

19. Dhaouadi, A., Adhoum, Nafaâ, *Degradation of paraquat herbicide by electrochemical advanced oxidation methods*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2009. **637**(1-2): p. 33-42.
20. P.C. Kearney, J.M.R., Q. Zeng, P. Mazzocchi,, *UV-ozonation of paraquat*. J Agric Food Chem, 1985. **33**: p. 953-957.
21. R. Andreozzi, A.I., V. Caprio, M.G. D'Amore, *Ozonation of 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride (paraquat) in aqueous solution*. Environ. Technol., 1993. **14**: p. 695-700.
22. Joon-Chul Lee, M.-S.K., Chul Kyung Kim, Chan-Hwa Chung, Sung M. Cho, Gui Young Han, Ki June Yoon and Byung-Woo Kim, *Removal of Paraquat in aqueous suspension of TiO<sub>2</sub> in an immersed UV photoreactor*. Korean J. Chem. Eng., 2003. **20**( 5)): p. 862-868.
23. Florencio, M.H., Pires, E., Castro, A. L., Nunes, M. R., Borges, C., Costa, F. M., *Photodegradation of Diquat and Paraquat in aqueous solutions by titanium dioxide: evolution of degradation reactions and characterisation of intermediates*. Chemosphere, 2004. **55**(3): p. 345-55.
24. Loreto Lunar, D.S., Soledad Rubio, Dolores Pérez-Bendito, Ulrich Nickel, *Identificatoin of metol degradation produtctos under Fenton's reagent treatment using liquid chromatography-mass spectrometry*  
Wat. Res. , 2000. **34**: p. 3400-3412.
25. Sigma-Aldrich, *Ficha de Dados de Segurança do Paraquato*, 2012.
26. Merck, *Safety Data Sheet of oxalic acid*, 2012.
27. Sigma-Aldrich, *Ficha de dados de segurança do ácido isonicotínico*, 2012.
28. K. Tennakone, I.R.M.K., *Photocatalytic mineralization of paraquat dissolved in water by TiO<sub>2</sub> supported on polythene and polypropylene films*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 1996. **93**: p. 79-83.
29. E. Moctezuma, E.L., E. Monreal, N. Villegas, D. Infante, *Photocatalytic degradation of the herbicide "paraquat"*. Chemosphere, 1999. **29**(511-517).
30. M.Kang, *Preparation of TiO<sub>2</sub> photocatalyst film and its catalytic performance for 1,1 - dimethyl-4,4 -bipyidium dichloride decomposition*. Applied Catalysis B: Environmental, 2002. **37**: p. 862-868.
31. Cantavenera, M.J., Catanzaro, Irene, Loddo, Vittorio, Palmisano, Leonardo, Sciandrello, Giulia, *Photocatalytic degradation of paraquat and genotoxicity of its intermediate products*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2007. **185**(2-3): p. 277-282.
32. Kanchanatip, E., Grisdanurak, Nurak, Thongruang, Raumporn, Neramittagapong, Arthit, *Degradation of paraquat under visible light over fullerene modified V-TiO<sub>2</sub>*. Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis, 2011. **103**(1): p. 227-237.
33. Dhaouadi, A., Adhoum, Nafaâ, *Heterogeneous catalytic wet peroxide oxidation of paraquat in the presence of modified activated carbon*. Applied Catalysis B: Environmental, 2010. **97**(1-2): p. 227-235.

## **Anexo 1 : Processos oxidativos avançados para degradação do paraquato**

Nas Tabela A1.7.1, estão apresentados os processos oxidativos avançados utilizados para a degradação do paraquato, tal como os seus resultados mais relevantes.

**Tabela A1.7.1: Processos avançados de oxidação para degradação do Paraquato (adaptado de “Paraquat removal from water by oxidation with Fenton's reagent”[18])**

Processo de Oxidação	Condições de Operação	Método Analítico para controlo da degradação do PQ	Resultados mais relevantes	Produtos de degradação identificados
Luz UV sobre filmes revestidos de TiO <sub>2</sub> de polietileno ou polipropileno [28]	<ul style="list-style-type: none"> <li>[PQ]<sub>0</sub> = 50 mg.L<sup>-1</sup>;</li> <li>T = 26 °C;</li> <li>15 mL O<sub>2</sub>/min;</li> <li>8,8 × 10<sup>-5</sup> g TiO<sub>2</sub>/cm<sup>2</sup> de polietileno e 3,1 × 10<sup>-5</sup> g TiO<sub>2</sub>/cm<sup>2</sup> de polipropileno.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Espectrofotómetro UV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Completa degradação a CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, HCl e pequenas quantidades de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; 6 horas de reação</li> </ul>	
Luz UV sobre TiO <sub>2</sub> comercial [29]	<ul style="list-style-type: none"> <li>[PQ]<sub>0</sub> = 10, 20, 40 mg.L<sup>-1</sup></li> <li>UV (365 nm)</li> <li>50 mL O<sub>2</sub>/min</li> <li>200 mg TiO<sub>2</sub>/L</li> <li>pH = 4; 6,6; 7 e 9</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>HPLC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>O paraquato é degradado lentamente por fotólise direta na presença de oxigénio dissolvido ([PQ]<sub>0</sub> = 20 e 40 mg.L<sup>-1</sup>, pH<sub>0</sub> = 6,6);</li> <li>Fotólise direta com luz UV destrói 60% do paraquato em menos de 3 horas de reação ([PQ]<sub>0</sub> = 10 mg.L<sup>-1</sup>, pH<sub>0</sub> = 6,6);</li> <li>Na presença de TiO<sub>2</sub> todas as espécies são consumidas ao fim de 3 horas de reação.</li> </ul>	
Luz UV sobre TiO <sub>2</sub> [30]	<ul style="list-style-type: none"> <li>[PQ]<sub>0</sub> = 1000 mg.L<sup>-1</sup></li> <li>0,5 L ar/min</li> <li>Filme de TiO<sub>2</sub> (triplamente revestido)</li> <li>Intensidade da luz UV = 36 W/m<sup>2</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Método Actinométrico com oxalato-férrico de potássio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>O paraquato é todo degradado após de 15 horas de reação</li> </ul>	

Tabela A1.7.1: Processos avançados de oxidação para degradação do Paraquato (continuação) (adaptado de "Paraquat removal from water by oxidation with Fenton's reagent"[18])

Processo de Oxidação	Condições de Operação	Método Analítico para controlo da degradação do PQ	Resultados mais relevantes	Produtos de degradação identificados
Luz UV e /ou borbulhamento de ar sobre TiO <sub>2</sub> [22]	<ul style="list-style-type: none"> <li>[PQ]<sub>0</sub> = 100 mg.L<sup>-1</sup></li> <li>1 L ar/min</li> <li>0,1 g TiO<sub>2</sub>/L</li> <li>Intensidade da luz UV utilizada: 4,8,12,24 e 36 W/m<sup>2</sup>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Espectrofotómetro UV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Remoção de paraquato com uma taxa de 0,54 mg.L<sup>-1</sup>/h só com borbulhamento de ar;</li> <li>Na presença da luz UV, a remoção com borbulhamento de ar ao fim de 24 horas é 50 % mais eficiente do que sem borbulhamento;</li> <li>Na presença de TiO<sub>2</sub>, as taxas de remoção ao fim de 40 horas são de 1.4, 1.6 e 2.2 mg.L<sup>-1</sup>/h com intensidades de luz UV de 4, 8 e 12 W/m<sup>2</sup> respetivamente;</li> <li>Na presença de TiO<sub>2</sub> com borbulhamento de ar o tempo necessário para remoção de 90% de paraquato é 18, 12 e 3 horas para intensidades de luz UV de 12, 24 e 36 W/m<sup>2</sup> respetivamente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ácido clorídrico</li> <li>Amónia</li> <li>4,4-dipiridil</li> <li>4-metilpiridina</li> </ul>
Luz UV sobre TiO <sub>2</sub> comercial [23]	<ul style="list-style-type: none"> <li>[PQ]<sub>0</sub> = 20 mg.L<sup>-1</sup></li> <li>0.04 e 0.4 g TiO<sub>2</sub>/L</li> <li>Intensidade de luz UV utilizada = 140 W/m<sup>2</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Espectroscopia de UV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mineralização quase completa de paraquato ao fim de 3 horas de irradiação na presença de 0,4 g/L de catalisador e com ph de aproximadamente 6.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>lão 4-carboxi-1-metilpiridínio</li> <li>Monopiridona</li> <li>Dipiridona</li> </ul>
Luz UV sobre TiO <sub>2</sub> (preparação comercial e "domestica") [31]	<ul style="list-style-type: none"> <li>[PQ]<sub>0</sub> = 7,5 mg.L<sup>-1</sup></li> <li>200 mg TiO<sub>2</sub>/L</li> <li>pH = 4, 7 ou 9</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Espectroscopia de UV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Em meio alcalino, degradação do paraquato é completa ao fim de 30 minutos;</li> </ul>	
Lampa de Xénon com 1 C <sub>60</sub> /1V-Ti O <sub>2</sub> [32]	<ul style="list-style-type: none"> <li>[PQ]<sub>0</sub> = 15-50 mg.L<sup>-1</sup></li> <li>1 g de catalisador/L</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Espectrofotómetro UV-Visível</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>70% de degradação ao fim de 4 horas</li> </ul>	

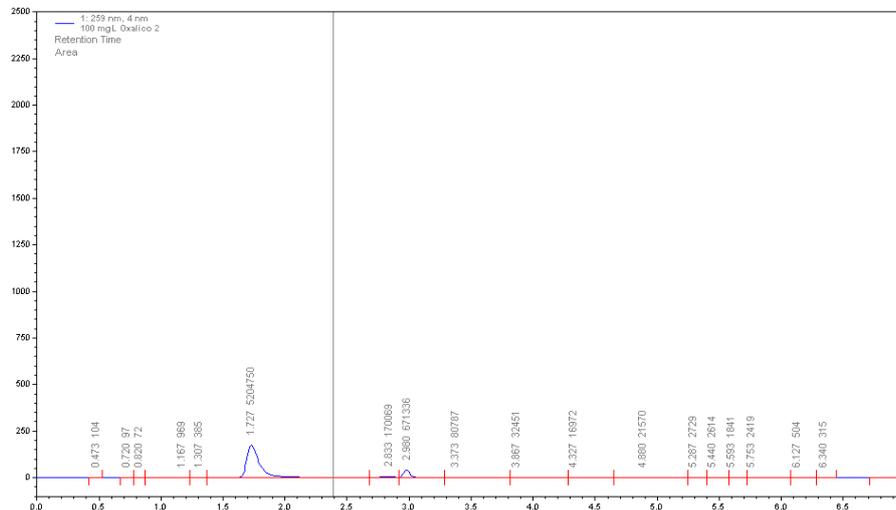
**Tabela A1.7.1: Processos avançados de oxidação para degradação do Paraquato (continuação) (adaptado de "Paraquat removal from water by oxidation with Fenton's reagent"[18])**

Processo de Oxidação	Condições de Operação	Método Analítico para controlo da degradação do PQ	Resultados mais relevantes	Produtos de degradação identificados
Luz UV na presença de O <sub>2</sub> ou O <sub>3</sub> [20]	<ul style="list-style-type: none"> <li>[PQ]<sub>0</sub> = 1500 mg.L<sup>-1</sup></li> <li>32 g O<sub>3</sub>/h</li> <li>66 Lâmpadas de baixa pressão de mercúrio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>GC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Na presença de oxigénio o paraquato não se degradada de forma significativa ao fim de 7 horas;</li> <li>Com ozono 32,8 % de paraquato é degradado nas mesmas 7 horas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>lão 4-carboxi-1-metilpiridínio</li> <li>Monoquato</li> <li>Monopiridona</li> <li>Ácido isonicotínico</li> <li>Ácido sucínico</li> <li>N-formilglicina</li> <li>Ácido málico e oxálico</li> <li>4,4-dipiridil</li> </ul>
O <sub>3</sub> [21]	<ul style="list-style-type: none"> <li>[PQ]<sub>0</sub> = 231-2057 mg.L<sup>-1</sup></li> <li>38,6 L O<sub>3</sub>/h</li> <li>pH = 4,2-8.0</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>HPLC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ao fim de 2 horas o paraquato é degradado, num meio reacional a pH 8</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ácido n-metilisonicotínico</li> <li>Ácido n-formiloxâmico</li> <li>Ácido Oxâmico</li> </ul>
Fenton Heterogéneo [33]	<ul style="list-style-type: none"> <li>[PQ]<sub>0</sub> = 20 mg.L<sup>-1</sup></li> <li>1 g de catalisador/L</li> <li>T= 70 °C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>HPLC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Redução da carência química de oxigénio em 71,4%</li> </ul>	
Oxidação Anódica, Electro-Fenton e Fotoelectro-Fenton [19]	<ul style="list-style-type: none"> <li>[PQ]<sub>0</sub> = 10-50 mg.L<sup>-1</sup></li> <li>T =25 °C</li> <li>pH =3</li> <li>[Fe<sup>2+</sup>]<sub>0</sub> = 1,0 × 10<sup>-4</sup> até 5,0 × 10<sup>-4</sup> M</li> <li>[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>0</sub> = 20 mM</li> <li>Intensidade da corrente eléctrica usada: 50, 100 e 200 mA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>HPLC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>A técnica mais eficiente é o fotoelectro-Fenton;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Três picos de produtos intermediários presentes, não identificados</li> <li>Produtos finais da degradação: Ácido oxálico, Ácido acético, Ácido fórmico e Ácido sucínico</li> </ul>
Fenton Clássico [18]	<ul style="list-style-type: none"> <li>[PQ]<sub>0</sub> = 50–200 mg.L<sup>-1</sup>.</li> <li>T = 10–70 °C.</li> <li>pH = 2–5.</li> <li>[Fe<sup>2+</sup>]<sub>0</sub> = 1,0 × 10<sup>-4</sup> até 5,0 × 10<sup>-4</sup> M</li> <li>[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>0</sub> = 1.6 × 10<sup>-3</sup> até 5.7 × 10<sup>-2</sup> M</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>HPLC</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Para as condições de T = 30.0 °C, [Fe<sup>2+</sup>]<sub>0</sub> = 5,0 × 10<sup>-4</sup> M, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>0</sub> = 3.4 × 10<sup>-2</sup> M</li> </ul>	

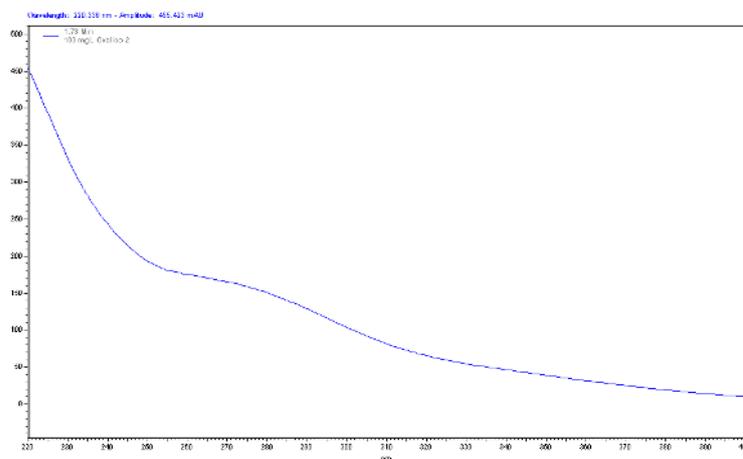
# Anexo 2 : Identificação dos produtos de degradação do paraquato

## 2.1 Identificação dos produtos de degradação do paraquato por HPLC-DAD

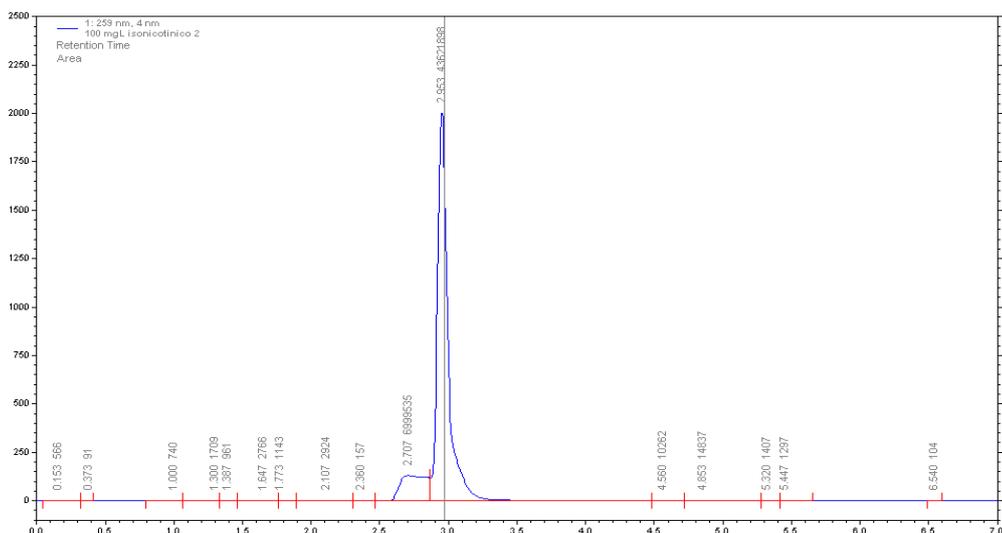
A partir da injeção de padrões de compostos identificados como possíveis produtos de degradação do paraquato obtiveram-se os cromatogramas e espectros de absorção correspondentes (Figuras A2. 1 até a Figura A2. 8). Todos os padrões injetados apresentavam concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup> em água, com exceção do padrão de 4,4'-dipiridil que foi preparado em acetonitrilo.



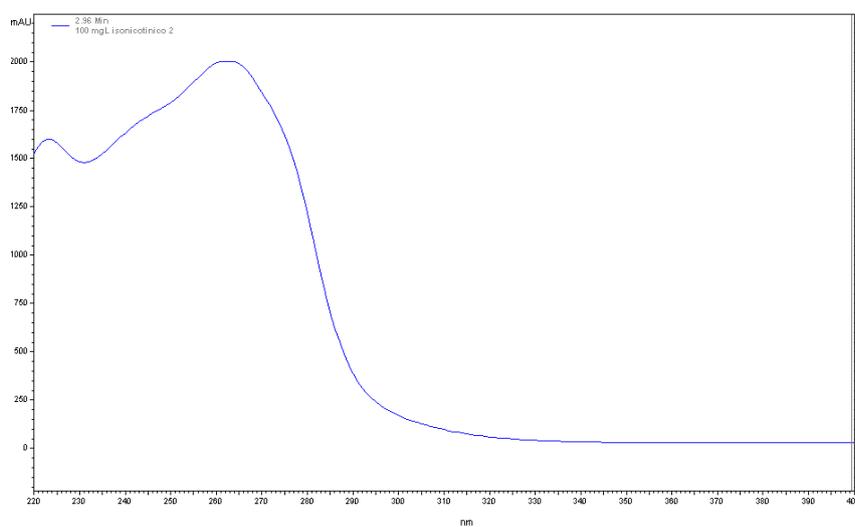
**Figura A2. 1:** Cromatograma de uma solução de 100 mg.L<sup>-1</sup> de ácido Oxálico em água. Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de acetonitrilo; 1 mL.min<sup>-1</sup>; volume de injeção de 99 µL



**Figura A2. 2:** Espectro de uma solução de 100 mg.L<sup>-1</sup> de ácido oxálico em água. Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de acetonitrilo; 1 mL.min<sup>-1</sup>; volume de injeção de 99 µL



**Figura A2. 3:** Cromatograma de uma solução de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido isonicotínico em água. Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de acetonitrilo;  $1 \text{ mL.min}^{-1}$ ; volume de injeção de  $99 \mu\text{L}$



**Figura A2. 4:** Espectro de uma solução de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido isonicotínico em água. Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de acetonitrilo;  $1 \text{ mL.min}^{-1}$ ; volume de injeção de  $99 \mu\text{L}$

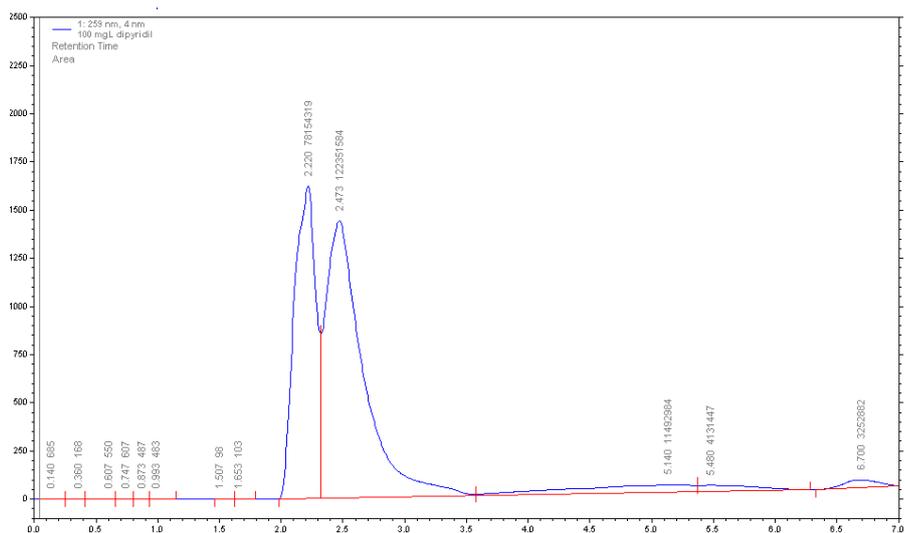


Figura A2. 5: Cromatograma de uma solução de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de 4,4-Dipiridil em acetonitrilo. Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de acetonitrilo;  $1 \text{ mL.min}^{-1}$ ; volume de injeção de  $99 \mu\text{L}$

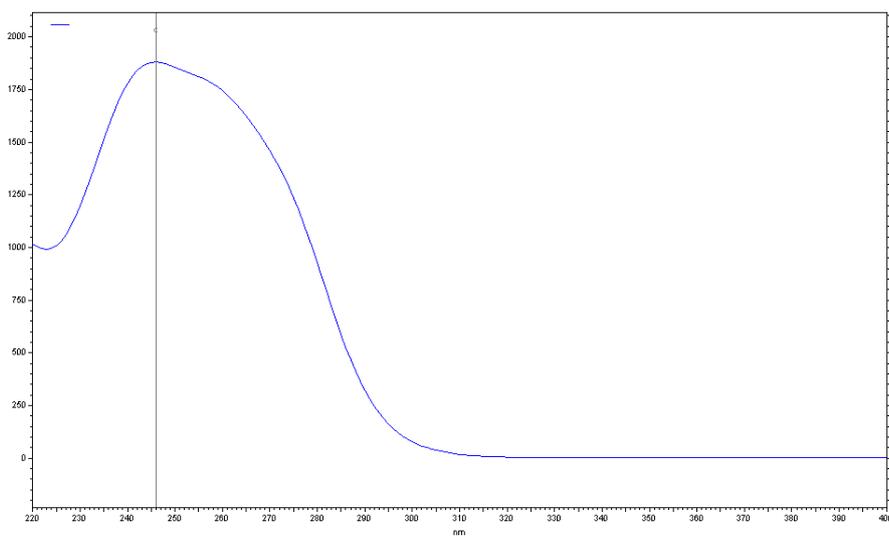
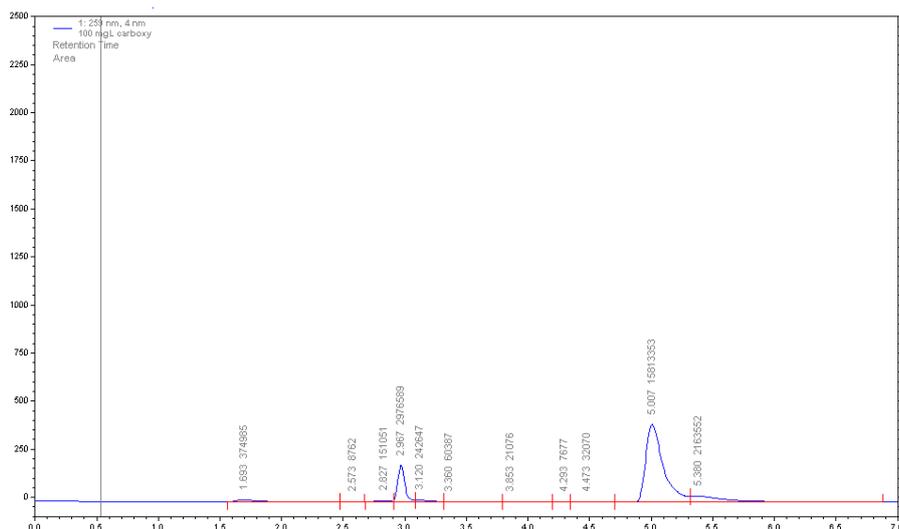
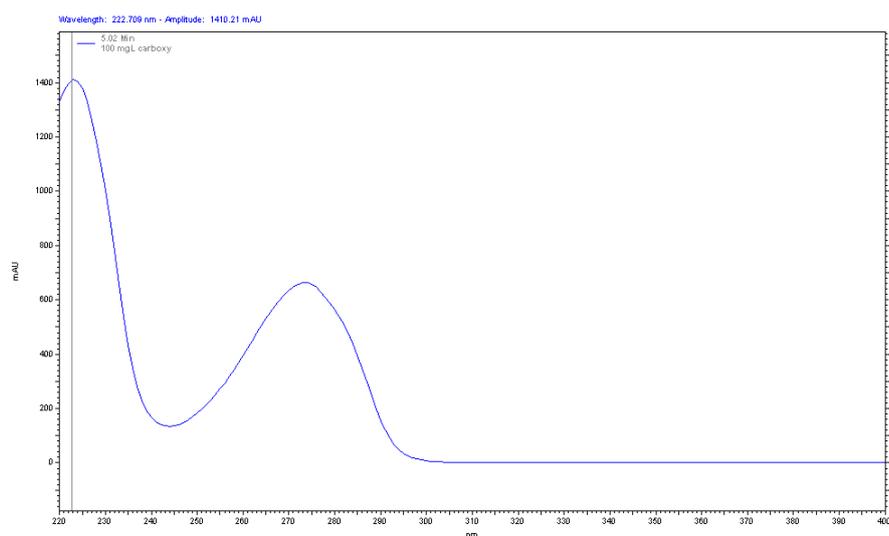


Figura A2. 6: Espectro de uma solução de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de 4,4-Dipiridil em acetonitrilo. Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de acetonitrilo;  $1 \text{ mL.min}^{-1}$ ; volume de injeção de  $99 \mu\text{L}$



**Figura A2. 7:** Cromatograma de uma solução de 1-etil-4-metoxicarbonilpiridino em água. Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de acetonitrilo; 1 mL.min<sup>-1</sup>; volume de injeção de 99 µL



**Figura A2. 8:** Espectro de uma solução de 100 mg.L<sup>-1</sup> de 1-etil-4-metoxicarbonilpiridino em água. Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 10 mM e 20% de acetonitrilo; 1 mL.min<sup>-1</sup>; volume de injeção de 99 µL

Na obtenção dos cromatogramas dos produtos de degradação do paraquato, o valor máximo do eixo dos y (área cromatográfica, UA) foi mantido constante para melhor comparação dos mesmos e comparação dos picos cromatográficos de cada um dos produtos de degradação.

Na Figura A2. 5, o cromatograma referente a injeção da solução de 4,4'-dipiridil apresenta dois picos consecutivos. Isto deve-se ao facto de o solvente utilizado para a preparação da solução ter sido acetonitrilo, em vez de água, levando à existência de relações de afinidade dentro da coluna cromatográfica diferentes; além disso, o método utilizado para a análise deste composto não foi desenvolvido, mas apenas para o paraquato.

## 2.2 Identificação dos produtos de degradação por LC-MS

Para a identificação dos produtos de degradação adquiridos em LC-MS, e determinação dos respetivos tempos de retenção e iões moleculares, injetaram-se padrões de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  de cada um dos compostos, preparados em água (Figura A2. 9 até á Figura A2. 14). A exceção foi outra vez o 4,4'-dipiridil cuja solução foi preparada em acetonitrilo.

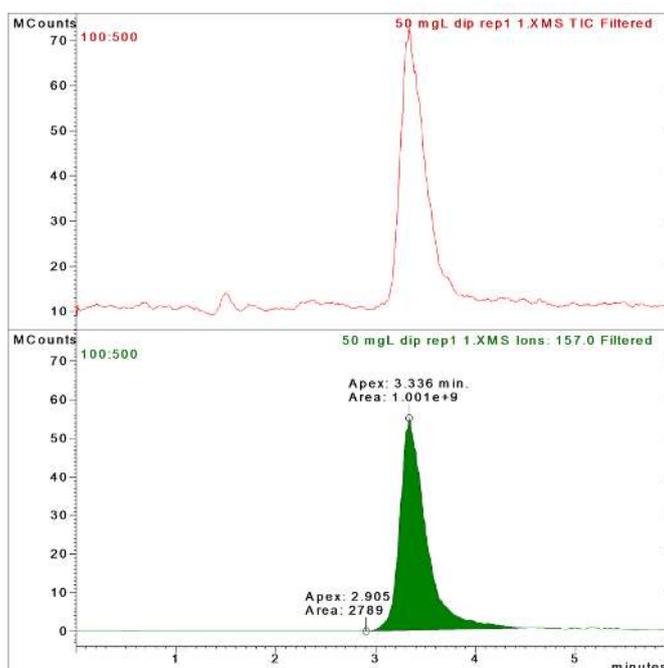


Figura A2. 9: Cromatograma de uma solução padrão de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  de 4,4-Dipiridil em ACN (em cima) e cromatograma obtido após seleção do ião com razão  $m/z$  de 157(em baixo). Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 5 mM e 20% de metanol;  $0,2 \text{ mL.min}^{-1}$ ; volume de injeção de  $99 \mu\text{L}$ .

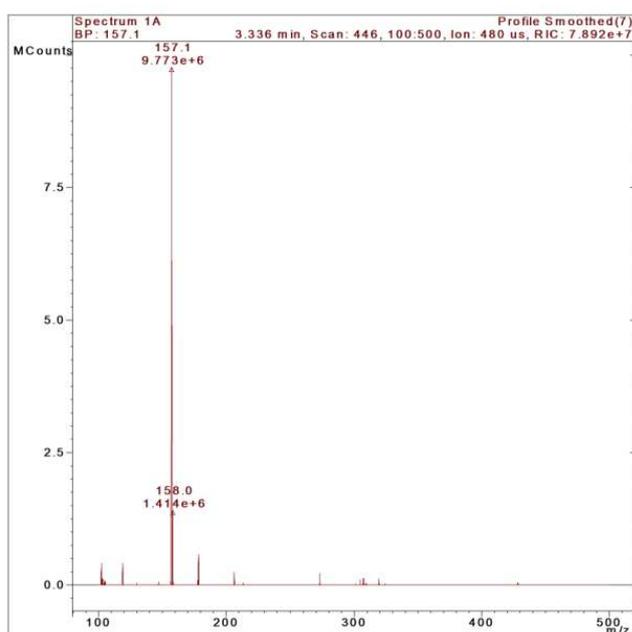
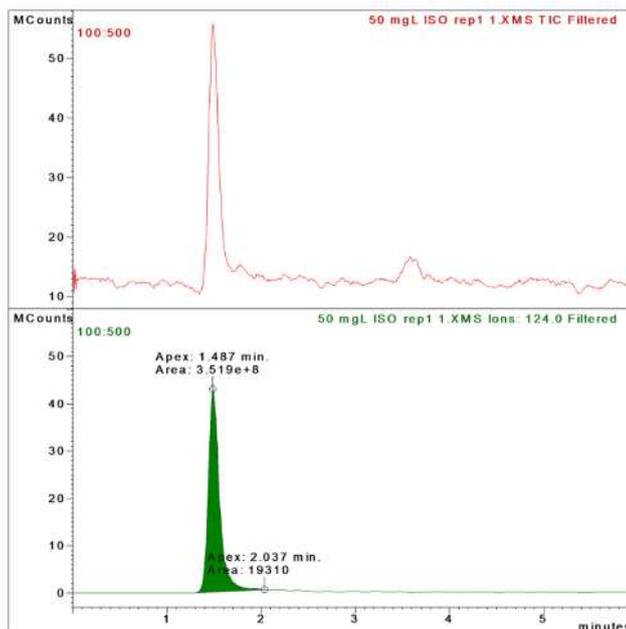
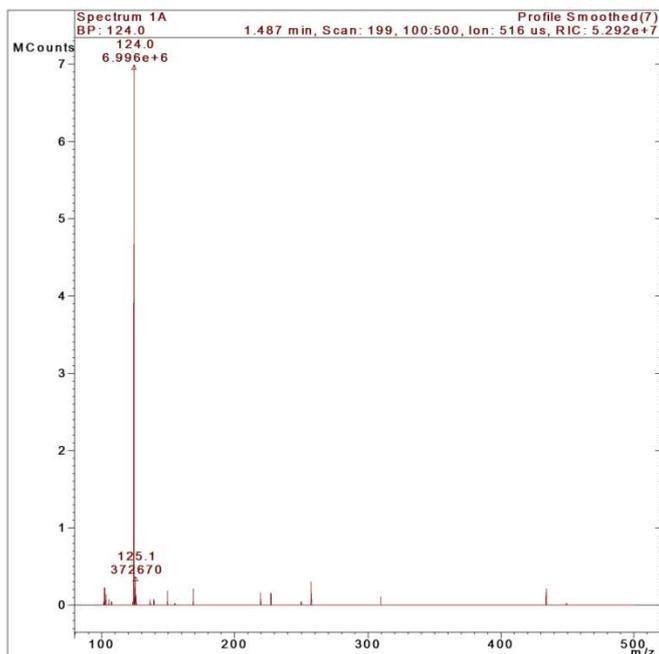


Figura A2. 10: Espectro de massa para uma amostra de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  de 4,4-Dipiridil em ACN no tempo de retenção de 3,336 min



**Figura A2. 11:** Cromatograma de uma solução de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido Isonicotínico em água no modo full scan (em cima) e cromatograma obtido após seleção do íon com razão  $m/z$  de 124(em baixo). Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 5 mM e 20% de metanol;  $0,2 \text{ mL.min}^{-1}$ ; volume de injeção de  $99 \mu\text{L}$ .



**Figura A2. 12:** Espectro de massa de uma amostra de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido Isonicotínico em água no tempo de retenção 1,487 min. (a) e cromatograma obtido após seleção do íon com razão  $m/z$  de 124.

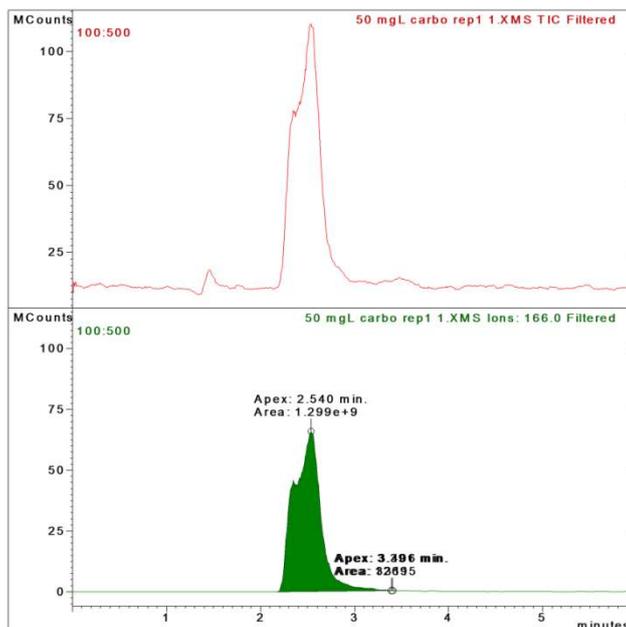


Figura A2. 13: Cromatograma de uma amostra de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  do iodeto de 1-etil-4-metoxicarbonilpiridino em água no modo full scan (em cima) e cromatograma obtido após seleção do ião com razão  $m/z$  de 138 (em baixo). Condições de análise: fase móvel composta por 80% de água acidificada com HFBA 5 mM e 20% de metanol;  $0,2 \text{ mL.min}^{-1}$ ; volume de injeção de  $99 \mu\text{L}$ .

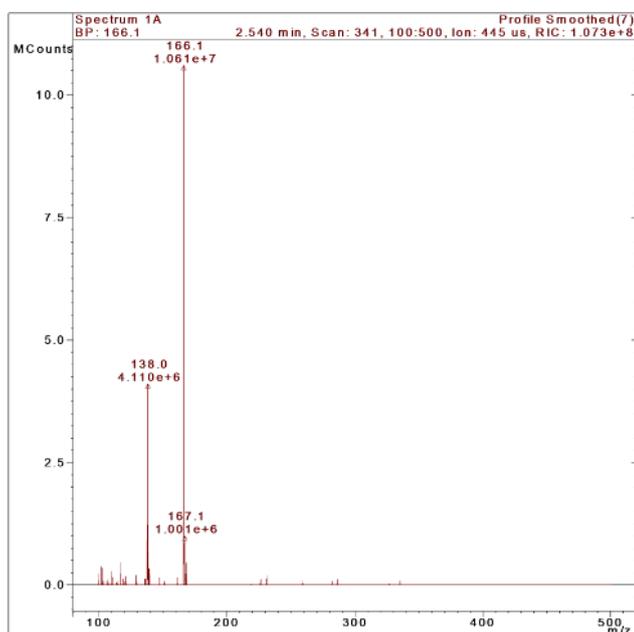


Figura A2. 14: Espectro de massa de uma amostra de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  do ião iodeto de 1-Etil-4-metoxicarbonilpiridino em água.



## Anexo 3 : Cálculo da conversão de paraquato nos produtos de degradação identificados

Para uma melhor percepção da quantificação dos produtos de degradação do paraquato calculou-se a conversão deste em cada um deles. Inicialmente, foi preciso calcular a quantidade de paraquato existente no início da reação,  $n_{\text{paraquato inicial}}$  em moles:

$$n_{\text{paraquato inicial}} = \frac{(C_{\text{paraquato inicial}} \times V_{\text{solução}})}{M_{\text{paraquato}}} \quad \text{Equação (A3.1)}$$

em que  $M_{\text{paraquato}}$  é a massa molar de paraquato em g/mol, cujo valor é 186 g/mol,  $V_{\text{solução}}$  é o volume de solução existente no reator ao longo da reação de Fenton e  $C_{\text{paraquato inicial}}$  é a concentração de paraquato no início da reação. O valor para o  $n_{\text{paraquato inicial}}$  foi de  $1,34 \times 10^{-4}$  mol.

### 3.1 Cálculo da conversão de paraquato em ácido oxálico.

A injeção das amostras da reação de Fenton do dia 19-06-2012 permitiu obter o valor da área cromatográfica de ácido oxálico ao longo do tempo. A injeção de um padrão de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  correspondeu a uma área cromatográfica de  $1,41 \times 10^7$  UA. Com estes valores obteve-se o valor do fator de cálculo,  $f$  através da Equação (2). O valor obtido foi de  $4,32 \times 10^4 \text{ UA. (mg.L}^{-1}\text{)}^{-1}$ . Com o valor de  $f$  e a partir da Equação 3 calcularam-se os valores da concentração ao longo do tempo da reação. Na Tabela A3. 1 estão representados os valores da área cromatográfica e de concentração de ácido oxálico ao longo do tempo.

Tabela A3. 1: Concentração de ácido oxálico ao longo da reação de Fenton

Tempo de reação, minutos	Área cromatográfica de ácido oxálico (UA)	Concentração de ácido oxálico (mg.L <sup>-1</sup> )
0	0	0
30	$4,12 \times 10^6$	14,60
60	$1,38 \times 10^7$	48,90
120	$1,53 \times 10^7$	54,18
180	$1,05 \times 10^7$	37,16
240	$8,97 \times 10^6$	31,77
300	$7,38 \times 10^6$	26,15
480	$3,11 \times 10^6$	1,10

A conversão do paraquato em ácido oxálico foi obtida a partir da equação (A3.2):

$$\text{Conversão} = \frac{n_{\text{experimental}}}{n_{\text{paraquato inicial}} \times y} \quad \text{Equação (A3.2)}$$

A partir dos valores da concentração de ácido oxálico calculou-se a quantidade do mesmo ao longo da reação,  $n_{\text{experimental}} = \frac{C_{\text{ác.oxálico}} \times V_{\text{solução}}}{M_{\text{ác.oxálico}}}$ , em que  $M_{\text{ác.oxálico}} = 90,0 \text{ g/mol}$ . O valor de  $y$  corresponde o coeficiente estequiométrico assumido para a relação entre o paraquato e cada um dos produtos de degradação. No caso do ácido oxálico foi assumido um coeficiente estequiométrico de 6, com base no número de carbonos de cada um.

Os valores para  $n_{\text{experimental}}$  e conversão de paraquato em ácido oxálico estão apresentados na Tabela A3. 2.

**Tabela A3. 2: Valores de  $n_{\text{experimental}}$  e da conversão de paraquato para o ácido oxálico**

Tempo de reação (minutos)	$n_{\text{experimental}}$ (mol)	Conversão (%)
0	0	0,0
30	$4,06 \times 10^{-5}$	5,0
60	$1,36 \times 10^{-4}$	17,0
120	$1,51 \times 10^{-4}$	19,0
180	$1,03 \times 10^{-4}$	13,0
240	$8,83 \times 10^{-5}$	11,0
300	$7,26 \times 10^{-5}$	9,0
480	$3,06 \times 10^{-6}$	0,4

### 3.2 Cálculo da conversão do paraquato em ácido isonicotínico

O cálculo da conversão do paraquato em ácido isonicotínico seguiu a mesma metodologia do cálculo da conversão em ácido oxálico. O valor de  $f$  obtido foi de  $2 \times 10^6 \text{ UA. (mg.L}^{-1}\text{)}^{-1}$ . O valor da massa molar de ácido isonicotínico,  $M_{\text{ác.isonicotínico}} = 124,0 \text{ g/mol}$ . Para o cálculo da conversão assumiu-se um coeficiente estequiométrico de 2, com base no número de carbonos do paraquato e do ácido isonicotínico.

Na Tabela A3. 3 estão apresentados os valores calculados para  $n_{\text{experimental}}$  e para conversão do paraquato em ácido isonicotínico.

**Tabela A3. 3: Valores de  $n_{experimental}$  e da conversão de paraquato em ácido isonicotínico**

Tempo de reação (minutos)	$n_{experimental}$ (mol)	Conversão (%)
0	0	0
30	$4,01 \times 10^{-6}$	1
60	$1,28 \times 10^{-6}$	5
120	$5,96 \times 10^{-6}$	2
180	$6,51 \times 10^{-6}$	2
240	$8,86 \times 10^{-6}$	3
300	$7,09 \times 10^{-6}$	3
480	$5,76 \times 10^{-6}$	2

### 3.3 Cálculo da conversão de paraquato no ião 1-carboxi-4-metilpiridino

O cálculo da conversão do ácido isonicotínico seguiu a mesma metodologia de cálculo. O valor de  $f$  obtido foi de  $7 \times 10^6 \text{ UA} \cdot (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})^{-1}$ . O valor da massa molar do ião 4-carboxi-1-metilpiridino é,  $M_{4\text{-carboxi-1-metilpiridino}} = 138,0 \text{ g/mol}$ . Para o cálculo da conversão de paraquato no ião 4-carboxi-1-metilpiridino foi admitido um coeficiente estequiométrico de 2, igual à utilizada para o ácido isonicotínico.

Na Tabela A3. 4 estão apresentados os valores calculados para  $n_{experimental}$  e para conversão do paraquato no ião 4-carboxi-1-metilpiridino.

**Tabela A3. 4: Valores de  $n_{experimental}$  e da conversão de paraquato para o ião 4-carboxi-1-metilpiridino**

Tempo de reação (minutos)	$n_{experimental}$ (mol)	Conversão (%)
0	0	0
30	$3,11 \times 10^{-5}$	12
60	$3,31 \times 10^{-5}$	12
120	$3,15 \times 10^{-5}$	12
180	$3,71 \times 10^{-5}$	14
240	$3,40 \times 10^{-5}$	13
300	$3,6 \times 10^{-5}$	14
480	$3,9 \times 10^{-5}$	14