



UTILIZAÇÃO DA ULTRAFILTRAÇÃO EM FLUXO TANGENCIAL COMO NOVA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE COMPLEXAÇÃO E CONSTANTES DE EQUILÍBRIO DE ÍONS Cu(II) COMPLEXADOS POR MATÉRIA ORGÂNICA NATURAL

Luciane Pimenta Cruz Romão

Tese apresentada ao Curso de Pós-
Graduação do Instituto de Química de
Araraquara para obtenção do Título de
Doutor em Química, área de
concentração Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Rocha

ARARAQUARA
2003

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Julio Cesar Rocha (orientador)
Instituto de Química/UNESP/Araraquara

Prof. Dr. Antonio Celso Spínola Costa
Instituto de Química/UFBA

Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto
Instituto de Química/UNESP/Araraquara

Prof. Dr. Homero Marques Gomes
Faculdade de Ciências e Tecnologia/UNESP/Presidente Prudente

Prof. Dr. Alexandre Gustavo Soares de Prado
Instituto de Química/UNB

DADOS CURRICULARES

Luciane Pimenta Cruz Romão

1. DADOS PESSOAIS

- 1.1. Nascimento: 27/09/1964
- 1.2. Nacionalidade: brasileira
- 1.3. Naturalidade: Ilhéus – BA
- 1.4. Estado Civil: Casada
- 1.5. Filiação. Pai: Gonçalo Bonfim da Cruz
Mãe: Bernadete Argolo Pimenta Cruz
- 1.6. Profissão: química
- 1.7. Documento de Identidade: RG. 1015164 SSP/SE
- 1.8. Cadastro de Pessoa Física: CPF: 266.835.715-20
- 1.9. Endereço: Rua Ademar de Ponte nº 557, Jardim Santa Mônica
– Araraquara - CEP. 14801-090 – SP

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1. Química Industrial

Curso de química industrial concluído em Agosto de 1986 no Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe – UFS

2.2. Licenciada em Química

Curso de licenciatura em Química concluído em Dezembro de 1990 no Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe – UFS

2.3. Mestre em Química

Curso de Pós-graduação em Química

Área de Concentração: Química Analítica, concluído em Agosto de 1996, no Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia – UFBA

2.4. Doutora em Química

Curso de Pós-graduação em Química

Área de concentração: Química Analítica, concluído em Agosto de 2003, no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista - UNESP

3. TRABALHOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS DURANTE O CURSO

ROMÃO, L. P. C.; CASTRO, G. R.; ROSA, A. H.; ROCJA, J. C.; PADILHA, P. M.; SILVA, H. C. Tangential flow ultrafiltration: an versatile methodology for determination of complexation parameters in refractory organic matter from Brazil water and soil samples. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 375, n. 8, p. 1097-110, 2003.

ALMEIDA, R. N. H. M.; MOZETO, A. A.; ZARA, L. F.; ROSA, A. H.; ROCHA, J. C.; ROMÃO, L. P. C.; SARGENTINI Jr., E. Extração de matéria orgânica aquática por abaixamento de temperatura: Uma metodologia alternativa para manter a identidade da amostra. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 208-212, 2003.

ROMÃO, L. P. C.; ARAÚJO, A. B.; ROCHA, J. C.; ROSA, A. H. Redução de crômio hexavalente por substâncias húmicas aquáticas imobilizadas em aminopropil sílica. **Eclética Química**, v. 27, p. 383-391, 2002.

ARAÚJO, A. B.; ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; ROMÃO, L. P. C. Distribuição e caracterização das constantes de troca entre espécies metálicas e frações húmicas de diferentes tamanhos moleculares. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1103-1107, 2002.

4. TRABALHOS COMPLETOS EM ANAIS DE EVENTOS

ROMÃO, L. P. C.; ROCHA, J. C.; ROSA, A. H. Determinação de parâmetros de complexação de cobre (II) por substâncias húmicas aquáticas e de solos: utilização de eletrodo íon seletivo. In: XIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2002, Araraquara. **XIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**. São Paulo: UNESP, 2002, v. único, p. 445-447.

5. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

BELLIN, I. C.; ROMÃO, L. P. C.; ROSA, A. H.; SANTOS, A.; ROCHA, J. C. Caracterização potenciométrica da capacidade de complexação de substâncias húmicas de diferentes solos da Bacia do Rio Negro-AM. In: 26^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2003, Poços de Caldas.

ROMÃO, L. P. C.; CASTRO, G. R.; ROSA, A. H.; MENDONÇA, A. G. R.; ARAÚJO, A. B.; ROCHA, J. C. Comparação entre os métodos de ultrafiltração e de eletrodo íon seletivo na determinação da capacidade de complexação de substâncias húmicas aquáticas por íons cobre (II). In: 25^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE , 2002, Poços de Caldas.

ROMÃO, L. P. C.; CASTRO, G. R.; ROSA, A. H.; R.; ROCHA, J. C.; PADILHA, P. M. Tangential-flow ultrafiltration: an alternative methodology for determination of complexation parameters in refractory organic matter from Brazilian water and soil samples. In: XII EUROANALYSIS, 2002, Dortmund, Germany.

ARAÚJO, A. B.; ROSA, A. H.; ROMÃO, L. P. C.; ROCHA, J. C. Caracterização da complexação de espécies metálicas por frações húmicas aquáticas de diferentes tamanhos moleculares. In: IV ENCONTRO NACIONAL DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 2001, Viçosa.

SANTOS, A.; ROMÃO, L. P. C.; ROSA, A. H.; SARGENTINI Jr, E.; ROCHA, J. C.; REZENDE, M. O. O. Competição de ligantes por espécies metálicas: substâncias húmicas x DTPA/EDTA. In: 24^a REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2001, Poços de Caldas.

ARAÚJO, A. B.; ROSA, A. H.; ROMÃO, L. P. C.; ROCHA, J. C. Redução de cromo hexavalente por substâncias húmicas aquáticas imobilizadas em aminopropil sílica. In: XIII ENCONTRO REGIONAL DE QUÍMICA, 2001, Araraquara.

Ao Prof. Dr. Julio Cesar Rocha, pela orientação, atenção e amizade
dispensadas a mim durante todo o curso;

Aos meus pais, **Gonçalo** e **Detinha**;

Aos tios, **Nicinha**, **Antônio** e **Oswaldo** (*in memoriam*);

Ao meu marido **Fred**;

Aos meus filhos, **Caio e Iuri**

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Pedro Padilha Magalhães**, sempre muito receptivo, tendo disponibilizado o equipamento de espectrometria atômica para as determinações dos metais;

Aos amigos **Ademir, Alexandre, André Gustavo, André Rosa, Cássia, Gisele, Gustavo, Iramaia, Luciana, Márcio, Rosana, Zara e Wander**, pela imensa ajuda e por terem me dado a chance de conhecê-los;

Aos amigos **Arnaldo e Bete, Nelson e Valnice** pela amizade e conversas informais nos encontros de finais de semana;

Aos amigos do Maranhão, **Adriana, Alan, Delba, Érika, Natilene e Ozelito** pela alegria e descontração;

A **Profa. Dra. Raquel Nogueira** e amigos **Alan, Daniela, Milady e Mirela**, pela utilização do analisador de carbono;

As técnicas de laboratório **Silvia** (RMN ^{13}C) e **Irene** (Infravermelho);

Ao casal de amigos **Márcio e Ruth**, pela fraternal acolhida em São Carlos, em Setembro de 1999.

As **funcionárias da Biblioteca** do IQ, em especial à **Marilda Santos, Priscila Vicentini e Valéria Novelli** pela condução competente dos serviços bibliográficos;

A **Profa. Dra Maysa Furlan**, Coordenadora da Pós-graduação em Química e Bioquímica, e as amáveis funcionárias, **Izolina, Sandra e Vilma**, da Seção de Pós graduação, pelo atendimento sempre amável e atencioso;

A **Universidade Federal de Sergipe** e a **CAPES/PICDT**, pelo apoio financeiro, imprescindível para a realização desse projeto.

Mais uma vez

*Se você quiser alguém em quem confiar,
confie em si mesmo.*

*Quem acredita sempre alcança
Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
acreditar no sonho que se tem
ou que seus planos nunca vão dar certo
ou que você nunca vai ser alguém.*

*Tem gente que machuca os outros
tem gente que não sabe amar.*

*Tem gente enganando a gente,
veja nossa vida como está
mas eu sei que um dia a gente aprende.*

Renato Russo e Flávio Venturini

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE ABREVIATURA.....	iii
1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - MATÉRIA ORGÂNICA NATURAL.....	2
1.1.1 - Definição.....	2
1.1.2 - Origem e natureza da MON.....	2
1.1.3 - Classificação da matéria orgânica aquática (MOA).....	3
1.2 - SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	4
1.2.1 - Substâncias húmicas de solo (SHS).....	5
1.2.2 - Substâncias húmicas aquáticas (SHA).....	5
1.3 – IMPORTÂNCIA AMBIENTAL DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS.....	6
1.3.1 - Ciclo do carbono.....	6
1.3.2 - Interações com espécies metálicas.....	7
1.4 - ESTUDO DO EQUILÍBRIO DE COMPLEXAÇÃO.....	8
1.4.1 - Considerações gerais.....	8
1.5 - TÉCNICAS EMPREGADAS NO ESTUDO DE COMPLEXAÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA NATURAL.....	12
1.5.1 - Características gerais.....	12
1.5.2 - Técnicas de não separação.....	13
1.5.3 - Técnicas de separação.....	15
1.6 – RELEVÂNCIA DO TRABALHO.....	18
1.7 – OBJETIVOS.....	20

2 – EXPERIMENTAL	22
2.1 – MATERIAIS.....	23
2.1.1 – Equipamentos.....	23
2.1.2 – Reagentes.....	24
2.1.3 – Soluções.....	25
2.2 – MÉTODOS.....	28
2.2.1 – Amostragem.....	29
2.2.2 – Extração das substâncias húmicas aquáticas com resina XAD 8.....	30
2.2.3 – Extração das substâncias húmicas de solo.....	32
2.2.4 – Diálise dos extratos.....	33
2.2.5 – Liofilização dos extratos.....	34
2.2.6 – Estudos de complexação para íons Cu(II).....	34
2.2.7 – Determinação dos metais.....	39
2.2.8 – Determinação dos teores de carbono orgânico.....	40
2.2.9 – Determinação da composição elementar.....	40
2.2.10 – Espectroscopia na região do infravermelho.....	40
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.1 – CARACTERIZAÇÕES.....	42
3.1.1 – Carbono orgânico total (COT).....	42
3.1.2 – Composição elementar.....	43
3.1.3 – Infravermelho.....	44
3.2 – DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE RETENÇÃO DA MEMBRANA DE 1 kDa.....	47
3.3 – COMPLEXAÇÃO DE Cu(II) POR MATÉRIA ORGÂNICA AQUÁTICA, SUBSTÂNCIAS HÚMICAS AQUÁTICAS E DE SOLOS.....	48

3.3.1 – Capacidade de complexação.....	48
3.3.2 – Constante de estabilidade condicional (K).....	50
3.4 – CORRELAÇÃO ENTRE A CAPACIDADE DE COMPLEXAÇÃO (CC) E CARBONO ORGÂNICO TOTAL (COT).....	59
3.5 – DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE TROCA POR ULTRAFILTRAÇÃO TANGENCIAL.....	61
4 – CONCLUSÕES	66
5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

RESUMO

Um procedimento de ultrafiltração com fluxo tangencial e membrana polietersulfônica de porosidade 1 kDa foi utilizado na determinação da capacidade de complexação (CC) e constantes de estabilidade condicional (K) do íon cobre(II) para amostras de matéria orgânica natural, substâncias húmicas aquáticas e substâncias húmicas de solo de diferentes regiões do Brasil. As substâncias húmicas de solos apresentaram maiores valores de CC em relação à matéria orgânica natural e substâncias húmicas aquáticas. Os valores das capacidades de complexação das amostras de matéria orgânica aquática ($1,25 \pm 0,07$, $1,18 \pm 0,05$ e $1,81 \pm 0,30$) e das amostras de substâncias húmicas aquáticas ($1,23 \pm 0,11$, $1,12 \pm 0,05$ e $1,44 \pm 0,04$) foram similares, indicando que o procedimento de extração utilizando resina acrílica XAD-8 não modificou significativamente as características complexantes originais das amostras. Os valores das capacidades de complexação da matéria orgânica natural (MON) determinados por ultrafiltração para Cu(II) variaram de 0,17 a 1,99 mmol Cu(II)g⁻¹ COT e os valores das constantes de estabilidade condicional variaram de 2,30 a 4,35 (log K₁) e 1,36 a 2,60 (log K₂). A validação da metodologia de ultrafiltração em fluxo tangencial foi feita comparando as médias das capacidades de complexação para cobre(II) determinadas por UF, e àquelas obtidas por eletrodo íon seletivo utilizando o teste de student *t*. Os resultados mostraram que não existem diferenças entre os valores das capacidades de complexação determinados por ambos os procedimentos. Resultados de experimentos de troca entre íons Cu(II) adicionados e espécies metálicas (Ni, Al e Fe) originalmente complexadas por substâncias húmicas, permitiram estabelecer a seguinte ordem decrescente de estabilidade relativa do complexo SH-metal: Fe < Al << Ni.

ABSTRACT

An tangential-flow ultrafiltration (TF-UF) procedure a polyethersulfone membrane filter (cut-off 1 kDa) was used to determine the copper(II) complexation capacity (CC) and conditional stability constants (K) of the copper(II) ion from samples of aquatic organic matter, aquatic humic substances and soil humic substances (all from different regions of Brazil). The humic soil substances presented larger values of CC compared to the aquatic organic matter and aquatic humic substances. The complexation capacities from samples of aquatic organic matter ($1,25 \pm 0,07$, $1,18 \pm 0,05$ and $1,81 \pm 0,30$) and aquatic humic substances ($1,23 \pm 0,11$, $1,12 \pm 0,05$ and $1,44 \pm 0,04$) samples were similar, indicating that the extraction procedure using XAD-8 acrylic resin didn't, significantly, modify the original complexation characteristics of the samples. The values of complexation capacities of aquatic organic matter (AOM) by Cu(II) using ultrafiltration varied from 0,17 to 1,99 mmol Cu(II)g⁻¹ TOC and the values of the conditional stability constants varied from 2,30 to 4,35 (log K₁) and 1,36 to 2,60 (log K₂). The validation of the tangential-flow ultrafiltration (TF-UF) methodology was done comparing the averages of complexation capacities determined by TF-UF and those obtained by selective ion electrode using the student test *t*. The results showed that there aren't any differences between the values of complexation capacities for copper(II) determined by both the methods. Results of exchange experiments among Cu(II) ions added and metallic species (Ni, Al and Fe) originally complexed for humic substances allowed the establishment of the following decreasing order of relative stability of the compound HS-metal: Fe < Al << Ni.

LISTA DE ABREVIATURA

ATP - Adenosina trifosfato

CC - Capacidade de complexação

COD – Carbono orgânico dissolvido

COP – Carbono orgânico particulado

COT – Carbono orgânico total

EIS – Eletrodo íon seletivo

GFAAS – Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite

IHSS – Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas

MOA – Matéria orgânica aquática

MON – Matéria orgânica natural

MOP – Matéria orgânica particulada

SHA – Substâncias húmicas aquáticas

SHS – Substâncias húmicas de solo

UF-FT – Ultrafiltração em fluxo tangencial

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - MATÉRIA ORGÂNICA NATURAL

1.1.1 - Definição

A expressão matéria orgânica natural (MON) tem sido utilizada para designar toda matéria orgânica existente nos reservatórios ou ecossistemas naturais, sendo diferente da matéria orgânica viva e dos compostos de origem antrópica (BUFFLE, 1990).

Cerca de 20% da MON nos ecossistemas naturais consiste de compostos orgânicos com estrutura química definida, tais como carboidratos, aminoácidos e hidrocarbonetos. Os 80% restantes, correspondem a massas de matéria orgânica detríticas, pertencentes a um grupo de estrutura química indefinida, com tempo de residência mais longo no ambiente e relativamente resistente à degradação, denominadas matéria orgânica refratária (MOR) (BUFFLE, 1984; LEENHEER, 1994, ZIECHMANN *et al.*, 2000).

1.1.2 - Origem e natureza da MON

A matéria orgânica natural pode ser classificada de acordo com a origem das plantas, as quais serviram como material de partida para a formação desses compostos. A matéria orgânica natural de origem aquagênica (MOA), refere-se àquela formada na água, pela excreção e decomposição de plâncton e bactéria aquática, enquanto a matéria orgânica de origem pedogênica (MOP), refere-se a decomposição de plantas terrestres e microorganismos, incluindo material lixiviado dos solos para os sistemas aquáticos (MACALADY, 1998).

A MOP é formada pela degradação de lignina, carboidratos e proteínas, os quais levam a formação de compostos aromáticos (especialmente substâncias carboxílicas, fenólicas e benzênicas), e em menos extensão de compostos alifáticos. A matéria orgânica encontrada em lagos e rios pode ser classificada como sendo de origem pedogênica e a MO de origem aquagênica geralmente é encontrada em águas oceânicas (BUFFLE,1984).

1.1.3 - Classificação da matéria orgânica aquática (MOA)

Segundo THURMAN (1985a), existem cerca de treze termos para descrever a matéria orgânica aquática. Na Tabela 1 estão definidos os termos mais relevantes para o desenvolvimento deste trabalho.

Tabela 1- Termos comumente utilizados para descrever matéria orgânica presente em sistemas aquáticos

Termos	Símbolo	Definição
Carbono orgânico dissolvido	COD	Carbono orgânico que passa através um filtro 0,45 µm
Carbono orgânico particulado	COP	Carbono orgânico retido em filtro 0,45 µm
Carbono orgânico total	COT	Soma de COD e COP

1.2 - SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Substâncias húmicas (SH) são os principais constituintes da matéria orgânica natural (MON) globalmente distribuídos em ambientes terrestres e aquáticos. Estima-se que cerca de 50% do carbono orgânico dissolvido (COD) em águas superficiais e oceânicas consistem de matéria orgânica refratária do tipo SH (BURBA *et al.*, 1994; ROCHA *et al.*,1998).

As SH são formadas por processos microbiológicos, pela decomposição de resíduos de plantas e animais e consistem de uma grande variedade de sub-estruturas alifáticas e aromáticas. Diferente de qualquer outro grupo de produtos naturais, a análise estrutural das SH ainda é um assunto em estudo. De acordo com VANLOON (2000), a análise da composição elementar das SH fornece os seguintes intervalos percentuais C(45-60); O(25-45); H(4-7); N(2-5); cinzas(0,5-5).

Estudos recentes (PICCOLO *et al.*, 1996), baseados em cromatografia e utilizando eletroforese capilar têm sugerido um novo conceito a respeito das características estruturais das SH. Neste caso, as SH não possuiriam estrutura extremamente complexa e seriam formadas pela agregação de pequenas moléculas.

Como as substâncias húmicas fazem parte de um grupo complexo e diverso de moléculas orgânicas, são definidas operacionalmente de acordo com os procedimentos utilizados na extração (HAYES, 1998).

1.2.1 - Substâncias húmicas de solo (SHS)

As substâncias húmicas do solo representam a fração mais ativa do húmus (matéria orgânica do solo). Consistem de substâncias polieletrólíticas de coloração entre o amarelo e o preto, de elevada massa molecular e formadas por reações de síntese secundárias. Têm propriedades distintas daqueles biopolímeros provenientes de organismos vivos, incluindo a lignina de plantas superiores (STEVENSON & COLE, 1985).

O procedimento mais utilizado e recomendado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) para extração de SHS é a extração alcalina com NaOH 0,1 mol L⁻¹ por 4 horas, razão 1:10 solo/extrator sob atmosfera de N₂ (HAYES, 1985).

A padronização do procedimento de extração é importante para permitir a comparação dos resultados experimentais obtidos, visando à compreensão da química do húmus no ambiente (AIKEN, 1985; FRIMMEL & ABBT-BRAUN, 1991).

1.2.2 - Substâncias húmicas aquáticas (SHA)

A definição operacional de substâncias húmicas aquáticas (SHA) está baseada em métodos cromatográficos de extração. THURMAN & MALCOLM (1981) definiram SHA como a porção não específica, amorfa, constituída de (COD) em pH 2 e adsorvível em coluna de resina acrílica não aniônica (XAD 8) com altos valores de coeficiente de distribuição. As SHA

são constituídas em sua maior parte por ácidos hidrofóbicos (AIKEN *et al.*, 1979; MALCOLM, 1990).

A matéria orgânica retida na coluna pela resina XAD 8 é eluída com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ e o extrato alcalino denominado SHA (ALMEIDA, 2002; AIKEN, 1988; FRIMMEL, 1992).

1.3 - IMPORTÂNCIA AMBIENTAL DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

1.3.1 - Ciclo do carbono

A degradação de restos de plantas e animais no solo é um processo microbiológico fundamental para a recirculação de alguns elementos químicos tais como carbono(C), nitrogênio (N), fósforo (P), enxofre (S) e alguns micronutrientes. O ciclo global de carbono é um sistema com compartimentos terrestres, aquáticos e atmosféricos e a maior parte de carbono que passa pelo compartimento terrestre é preservado como matéria orgânica em sedimentos (STEVENSON & COLE, 1985).

A quantidade de carbono (C) presente na matéria orgânica (MO) em solos (30 a 50 10¹¹ t) é três a quatro vezes superior àquela presente na atmosfera (7 10¹¹ t) e cinco a seis vezes superior àquela presente na biomassa terrestre (4,8 10¹¹ t) (STEVENSON & COLE, 1985 ; DAVIES *et al.*, 2001).

1.3.2 - Interações com espécies metálicas

A interação com espécies metálicas no ambiente é uma importante propriedade das SH, a qual poderá resultar em reações de complexação e/ou redução. As reações de complexação de metais são mais conhecidas por influenciar na biodisponibilidade dessas espécies. Atuando como tampões metálicos em ambientes aquáticos, as SH têm a propriedade de reduzir a toxicidade de alguns metais (ex. Cu^{2+} e Al^{3+}) para organismos aquáticos, incluindo peixes (FRIMMEL, 1990; EINAX & KUNZE, 1996; ZHANG *et al.*, 1996).

A formação de complexos organometálicos em solos pode influenciar nos ciclos biogeoquímicos. As SH podem aumentar a disponibilidade de fosfatos minerais insolúveis através da complexação de Fe e Al em solos ácidos e Ca em solos calcários (STEVENSON, 1994).

As características redox das SH dependem das condições do meio. Podem reduzir o íon Hg^{2+} a Hg^0 sob condições de pH natural, atuando como agente mobilizador de Hg no ambiente (ROCHA, *et al.*, 2000a) e/ou reduzir espécies alterando a toxidez, como Cr^{6+} a Cr^{3+} (ROMÃO *et al.*, 2002).

Além da relevância ambiental, as características físico-químicas do húmus também podem causar alguns efeitos benéficos ao solo como retenção de água mantendo a umidade e evitando erosão; combinação com argilo minerais, permitindo troca de gases e aumentando a permeabilidade; mineralização, disponibilizando nutrientes para o crescimento das plantas (ROSA, 2001).

1.4 - ESTUDO DO EQUILÍBRIO DE COMPLEXAÇÃO

1.4.1 - Considerações gerais

Diferentemente dos complexantes ou ligantes simples (Cl^- , CO_3^{2-} , aminoácidos), as substâncias húmicas contém vários sítios complexantes por molécula, resultando alta estabilidade termodinâmica dos complexos formados, alterando sobremaneira a forma química (especiação) do metal em solução (NEUBECKER & ALLEN, 1983).

A capacidade de formar complexos com metais é devida principalmente, em função do alto teor de grupos funcionais contendo oxigênio, os quais incluem carboxílicos, fenólicos, enólicos e alcoólicos. As principais estruturas envolvidas no processo de complexação ou quelação são mostradas na Figura 1 (THURMAN, 1985b; VANLOON, 2000; STEVENSON, 1994).

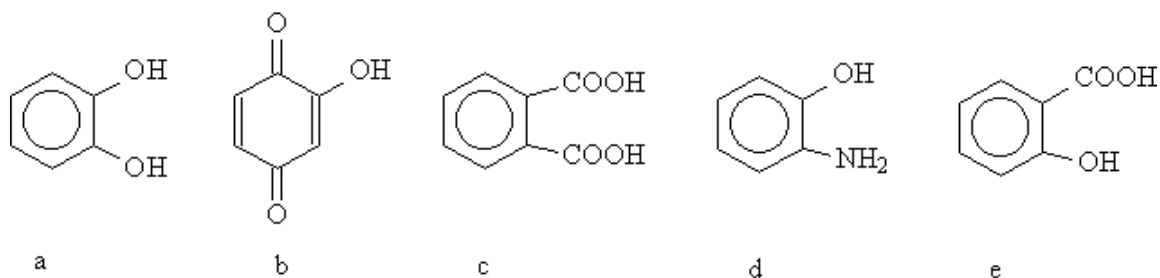


Figura 1 – Exemplos de grupos funcionais existentes nas substâncias húmicas e disponíveis para reações de complexação

Propriedades polifuncionais

A natureza polifuncional da MON resulta da sua diversidade de grupos complexantes. Na macromolécula, um determinado grupo pode estar ligado a diferentes ramificações da cadeia carbônica, podendo exercer diferentes efeitos eletrônicos e resultando em uma mistura de sítios complexantes (BUFLE, 1984).

Propriedades polieletrólíticas

Nos intervalos de pH de águas naturais (5-9) os principais sítios complexantes estão ionizados. Esta ionização cria um campo elétrico o qual influencia a estabilidade do complexo metal-MON. Desta forma, o valor do pH influirá na extensão da ionização dos grupos ligantes, além de influenciar em reações de hidrólise levando a formação de diversas espécies metálicas (BUFFLE, 1984).

Para muitos elementos traço a hidrólise ocorre em pH acima de 4,5. Por exemplo, acima de pH 6,0 as reações de hidrólise do íon Cu(II) se tornam mais importantes com a formação das espécies $\text{Cu}(\text{OH})^+$ e $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^+$ (ANTONELLI *et al.*, 2001).

Mudanças conformacionais

As propriedades conformacionais ou de agregação da MON dependem das condições químicas do meio, tais como força iônica, pH e concentração de MON. Em altas concentrações, pH baixos ou em força

iônica elevada resultam numa formação estrutural mais condensada. Por outro lado, uma estrutura mais expandida é esperada em baixas concentrações de MON, pH mais altos ou em força iônica menor. Conseqüentemente, a classificação por tamanho da molécula é mais utilizada em procedimentos de filtração de MON ou SH (SWIFT, 1996; BURBA *et al.*, 1998; KILDUFF & WEBER, 1992).

A importância relativa dessas propriedades varia com o grau de ocupação dos sítios ligantes. Isto constitui uma grande diferença comparada às propriedades dos ligantes simples, tornando mais difícil o entendimento dos estudos de complexação da MON ou SH.

Modelos de interpretação

Para o estudo de reações de complexação de MON tem sido utilizados modelos matemáticos, os quais estão ligados às propriedades físicas da MON. Todos os modelos de complexação de metal por MON são empíricos haja vista a complexidade do sistema. Logo, um modelo deve descrever a interação do metal em função da concentração de SH ou MON, do pH e força iônica (PERDUE, 1998).

A expressão de equilíbrio que descreve uma reação de complexação de M por um sítio de ligação simples de um ligante L é



$$K = \frac{a_{ML}}{a_M a_L}$$

Onde os termos a_M , a_L e a_{ML} representam as atividades iônicas do íon metálico livre, ligante e do complexo, respectivamente. Considerando que concentrações e não atividades iônicas são analiticamente mensuráveis, a expressão de equilíbrio é definida como

$$K = \frac{[ML]}{[M][L]}$$

E os termos $[M]$, $[L]$ e $[ML]$ representam as concentrações do íon metálico livre, ligante e do complexo, respectivamente

Muitos dados de complexação encontrados na literatura foram obtidos tratando os sítios complexantes como ligantes dissolvidos em uma solução, não existindo interações entre os sítios e negligenciando a influência da carga elétrica da molécula na reação de complexação (ANTONELLI *et al.*, 2001; SOARES & VASCONCELOS *et al.*, 1994; TOWN & POWELL *et al.*, 1993; ABATE & MASINI, *et al.*, 1999).

Alguns métodos gráficos, os quais utilizam modelos de ligantes discretos, são utilizados para avaliar e modelar sistemas aquáticos e determinar o valor de K e $[L]$ para os complexos formados entre metais e diversos ligantes. Dentre estes, os mais discutidos na literatura são os de Scatchard (1957) e Ruzic (1980).

1.5 - TÉCNICAS EMPREGADAS NO ESTUDO DE COMPLEXAÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA NATURAL

1.5.1 - Características gerais

Qualquer modelo completo de especiação química deverá ser capaz de distinguir as formas do íon metálico livre das formas complexadas. Na maioria dos casos, a concentração do íon metálico livre é determinada e em seguida é estimada a concentração do metal complexado (PERDUE,1998).

A escolha de um método para especiação química influencia os resultados encontrados, pois os vários métodos medem aspectos diferentes do sistema e operam sob condições diferentes. Na Tabela 2 estão listados alguns fatores que influenciam as determinações de parâmetros de complexação de metal-SH (SAAR & WEBER,1982).

Diversas técnicas têm sido utilizadas no estudo de complexação de metais por MON, dentre as quais pode-se citar a voltametria (PARDO *et al.*, 1990; NURNBERG, 1982, FLORENCE, 1986); potenciometria (BUFFLE, *et al.*, 1977; ABATE & MASINI, 1999; TOWN & POWELL, 1993); ultrafiltração (MATHUTHU & EPHRAIM, 1993; BUFFLE & STAUB, 1984; e cromatografia (BUFFLE, 1990). Todas essas técnicas possuem vantagens e limitações (BUFFLE *et al.*, 1980; NIFANTEVA *et al.*, 1999; TUSCHALL & BREZONIK, 1983; THURMAN, 1985a).

Tabela 2 – Fatores que influenciam as determinações de parâmetros de complexação de SH-Metal

Origem das substâncias húmicas
Método de extração
Concentração das SH
Força iônica
Temperatura
pH (influi tanto nas características das SH como nas do metal)
Método de análise
Metodologia de manipulação dos dados e cálculo de K

1.5.2 - Técnicas de não separação

As principais técnicas de não separação são as eletroanalíticas, destacando-se as potenciométricas e voltamétricas. Nas voltamétricas é medida a corrente gerada na interface eletrodo/solução, enquanto nas potenciométricas a corrente é aproximadamente zero (BUFFLE, 1990).

A técnica potenciométrica, a qual utiliza eletrodos de membrana conhecidos como eletrodos íon seletivos (EIS), é a mais empregada na determinação da capacidade complexante de SH. É simples, rápida e de fácil operação, além de determinar a atividade dos íons em solução, não existe ambigüidade na medida da concentração das espécies (NEUBECKER & ALLEN, 1983; NIFANTEVA *et al.*, 1999).

A grande limitação da potenciometria é a falta de sensibilidade. Geralmente o limite de detecção é maior que a concentração do íon metálico livre presente em sistemas naturais. Também, existem poucos eletrodos seletivos disponíveis comercialmente (ex. Cu, Cd, Pb, Ca) (THURMAN, 1985a; MATHUTHU & EPHRAIM, 1993).

A interferência de agentes oxidantes na resposta dos eletrodos de cobre, cádmio e chumbo, pela oxidação da superfície da membrana, reduz a sensibilidade da membrana dos EIS. Os experimentos precisam ser feitos na ausência de oxigênio, e íons cloreto são interferentes potenciais, pois aumentam a capacidade complexante do meio (TANI *et al.*, 1999).

Problemas de adsorção de compostos orgânicos nos EIS são menores que nos eletrodos voltamétricos. De acordo com BUFFLE (1990), a interferência é pequena para compostos fúlvicos aquáticos em concentrações menores que 100 mg L^{-1} . Segundo ABATE & MASINI (1999), efeitos de adsorção e de “memória” causam flutuações nos valores de E (termo de potencial que engloba o potencial padrão do par redox, o potencial do eletrodo de referência, o potencial de junção líquida, o coeficiente de atividade do íon M^{n+}) e S (constante da equação de Nernst).

A voltametria de pulso diferencial anódica é geralmente a técnica voltamétrica mais empregada nos estudos de especiação de metais em amostras aquáticas (SAAR & WEBER, 1982). Tem a vantagem de detectar baixas concentrações de metal com limites de detecção cerca de $10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ (BOND, 1980).

Da mesma forma que os EIS, os experimentos na voltametria precisam de eletrólito suporte e poucos metais podem ser determinados (Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} e Zn^{2+}) (NIFANTEVA *et al.*, 1999; THURMAN, 1985a).

Contudo, as principais limitações dos métodos voltamétricos na determinação de parâmetros de complexação são a formação de uma corrente cinética, pela dissociação dos complexos metálicos; adsorção da matéria orgânica na superfície do eletrodo, a qual leva a formação de complexos estáveis adsorvidos e, conseqüente diminuição da corrente difusional quando da utilização do eletrodo de mercúrio como eletrodo de trabalho (FLORENCE, 1986; BUFFLE, 1990).

1.5.3 - Técnicas de separação

A ultrafiltração (UF) é um dos métodos citados na literatura para extrair e concentrar substâncias húmicas aquáticas (AIKEN, 1985). Este procedimento também tem sido empregado para fracionar a matéria orgânica em diferentes tamanhos moleculares. Os solutos dissolvidos são separados por membranas de acordo com o tamanho molecular (BURBA *et al.*, 1995; ASTER *et al.*, 1996; ROCHA *et al.*, 1999, 2000b). É um procedimento barato, versátil, não destrutivo e sem adição de reagentes, minimizando a possibilidade de alterações na amostra original (KILDUFF & WEBER, 1992).

TUSCHALL & BREZONIK (1983), utilizaram a técnica de ultrafiltração na determinação de propriedades de complexação (ex. constantes de equilíbrio) de íons $Cu(II)$ por ligantes macromoleculares. Esse procedimento consistia de um reservatório fechado e pressurizado, contendo a solução do

ligante e conectado à célula de ultrafiltração. Contudo, problemas de polarização e entupimento das membranas devido ao aumento da concentração do soluto na superfície da membrana constituíram-se grandes limitações desse procedimento.

BURBA *et al.* (2001), desenvolveram um procedimento de ultrafiltração em fluxo tangencial e simples estágio (UF-FT) capaz de discriminar a concentração do metal livre (Figura 3). O sistema UF-FT comparado com o UF convencional apresenta vantagens como trabalhar com sistemas abertos, redução de efeitos da polarização e/ou entupimento das membranas; menor volume do filtrado diminuindo o tempo de filtração e minimizando deslocamentos no equilíbrio da solução, além da maior rapidez na filtração (cerca de 2 mL min^{-1}).

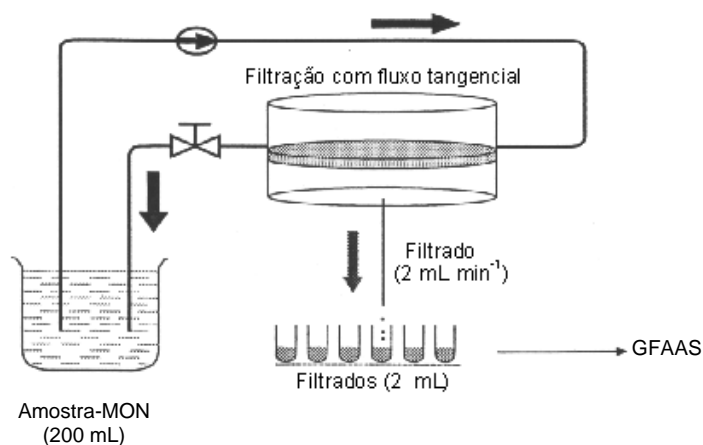


Figura 2 - Esquema do procedimento analítico utilizado para estudo de complexação entre Cu(II) e matéria orgânica aquática, substâncias húmicas aquáticas e substâncias húmicas de solos. Condições: sistema de ultrafiltração (Sartorius Ultrasart X), equipado com membrana de porosidade 1 kDa e 47 mm de diâmetro (polietersulfônica, Gelman Pall-Filtron)

Esse procedimento de ultrafiltração em fluxo tangencial é capaz de fornecer informações termodinâmicas ou cinéticas, as quais caracterizam as espécies metálicas ligadas à matéria orgânica pela utilização de reações de troca de ligante e/ou de metal, de acordo com o esquema da Figura 3.

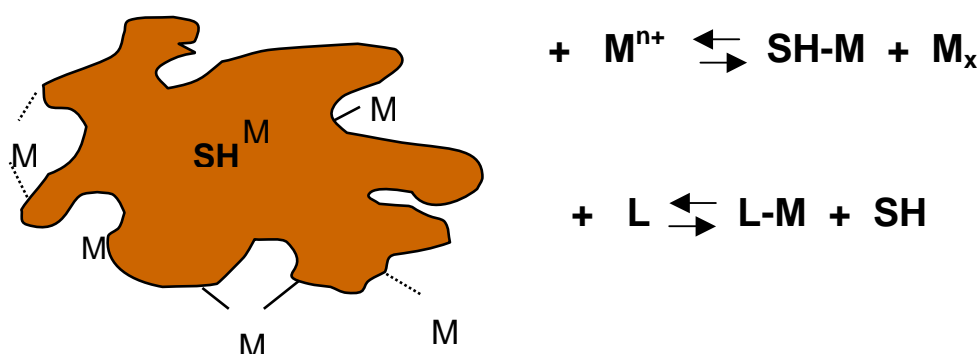


Figura 3 – Caracterização da estabilidade das espécies SH-M por estudos de troca de ligante e/ou de metal

Os coeficientes de retenção R_X ($X = M, L$ ou ML) são parâmetros importantes na utilização da ultrafiltração para determinar a capacidade de complexação e constantes de estabilidade condicional de íons metálicos por ligantes naturais. A retenção do ligante e complexo pela membrana deve ser completa ($R_L=1$ e $R_{ML}=1$), enquanto o íon metálico deverá passar através da membrana ($R_M=0$). Assim, a concentração do metal livre será igual a $[M]$ determinada no filtrado e $[ML]$ será obtida pela diferença entre $[M]_{total}$ e $[M]$ (STAUB *et al.*, 1984; NIFANTEVA *et al.*, 1999).

Entretanto, a retenção de 100% de L e ML dificilmente é obtida, provavelmente devido à dimensão dos poros da membrana e do tamanho molecular da matéria orgânica. Pois, o tamanho varia com a configuração e

carga, os quais por sua vez dependem do pH, força iônica e outras condições da solução (STAUB *et al.*, 1984).

Da mesma forma, tem-se encontrado valores de R_M maiores que zero. Contudo, os valores de $R_M > 0$ podem ser devidos a formação de hidroxocomplexos de metais, seguida do processo de adsorção dessas espécies na membrana. Entretanto, na presença de ligantes orgânicos espera-se competição entre as reações de complexação e o decréscimo da importância do processo de adsorção e assim, o decréscimo real dos valores de R_M (NIFANTEVA *et al.*, 1999).

A principal vantagem da ultrafiltração é não possuir limitação nem quanto à natureza do íon metálico, nem do ligante (BUFFLE & STAUB, 1984). Além disso, os limites de detecção para os metais são limitados às sensibilidades técnicas empregadas na determinação dos mesmos (ex. espectrometria atômica) (VAN Den BERGH *et al.*, 2001). Comparada a outras técnicas de separação, uma vantagem da UF é de não ser demorada como a diálise e nem perturbar o equilíbrio de complexação como a cromatografia de troca iônica (NIFANTEVA *et al.*, 1999).

1.6 - RELEVÂNCIA DO TRABALHO

O desenvolvimento econômico da sociedade moderna tem levado a crescente demanda de diversos tipos de matéria-prima, os quais têm sido importantes em diversos setores, tais como agricultura, indústria, transporte e doméstico. A utilização desses materiais tem contribuído para elevar o padrão de vida das populações, mas tem aumentado a ocorrência de substâncias naturais e/ou antrópicas, incluindo gases, metais, compostos

orgânicos voláteis, compostos orgânicos solúveis, sólidos suspensos, no ar, água e ambientes terrestres (HOLT, 2000).

Quando presentes em ambientes naturais, essas substâncias estão sujeitas a várias combinações e reações, as quais podem influir no seu comportamento e destino. Os efeitos desses processos na concentração das espécies no ambiente dependerá das suas propriedades físico-químicas e condições ambientais. No caso específico de íons metálicos, evidências mostram que as formas iônicas são mais tóxicas para a biota aquática e reações de complexação com a matéria orgânica em águas naturais parecem dominar a especiação de metais traço, controlando/reduzindo a toxicidade e influenciando na biodisponibilidade dessas espécies (HART, 1981; SUFFET & MacCARTHY, 1989; LUND *et al.*, 1990; LU & ALLEN, 2002).

Os sinais de que a concentração dos metais na biota é excedida, ou de sua toxicidade, ocorrem na interação dessas espécies com proteínas e enzimas nos compartimentos intracelulares, causando danos aos constituintes citoplasmáticos, tais como, redução na taxa de divisão celular, respiração e produção de ATP (MORRISON, 2000).

No Brasil ainda existem regiões relativamente preservadas, tanto do ponto de vista da exploração dos recursos vegetais quanto minerais sendo possível encontrar corpos aquáticos com predominância de águas naturais de coloração escura, com alta concentração de matéria orgânica. No Estado de São Paulo existem reservas naturais de proteção ambiental como o Parque Estadual da Serra do Mar, localizada na Baixada Santista próximo da cidade de Cubatão, uma das maiores áreas de remanescentes contínuos de Mata Atlântica. A atividade industrial desta região tem provocado sérios

problemas ambientais e, do ponto de vista ambiental, representa ameaça à região (ROCHA *et al.*, 1999).

No Estado do Amazonas, destaca-se a bacia do Rio Negro. O Rio Negro é um dos maiores tributários do rio Amazonas e a sua bacia ocupa uma área de 690.000 km², de um total de 5.500.000 de km² da Amazônia Legal. Além disso, a bacia do Rio Negro representa aproximadamente 10% da área do território nacional e seus recursos naturais são importantes diante da demanda mundial por água, biodiversidade e minérios (BISINOTI, 2002).

A utilização de procedimentos simples e aplicáveis a vários íons metálicos como é o caso do sistema de Ultrafiltração em fluxo tangencial, é importante na obtenção de informações, tanto termodinâmicas como cinéticas das espécies, constituindo-se em metodologia alternativa para a compreensão da interação entre matéria orgânica natural e metais (BURBA *et al.*, 2001).

1.7 - OBJETIVOS

- Caracterizar substâncias húmicas extraídas de amostras de água e de solo de diferentes regiões brasileiras por composição elementar e espectroscopia na região do infravermelho;

- Baseado em procedimento de ultrafiltração com fluxo tangencial, propor uma nova metodologia para determinação da capacidade de complexação e de constantes de estabilidade condicional de íons cobre(II) complexados com matéria orgânica natural;

- Utilizar o procedimento proposto para determinar constantes de troca entre metais originalmente complexados por substâncias húmicas e íons cobre(II) adicionados.

2 - EXPERIMENTAL

2.1. - MATERIAIS

2.1.1 – Equipamentos

- ❖ Agitador magnético;
- ❖ Analisador de carbono SHIMADZU, modelo TOC-5000A;
- ❖ Analisador elementar CHNSO-CE instruments, PERKIN ELMER modelo EA 1110;
- ❖ Balança analítica METTLER, modelo H 10, precisão 0,1 mg;
- ❖ Bomba peristáltica GILSON, modelo Minipuls 3 ;
- ❖ Centrífuga Tomy, modelo IC-15SN, com capacidade de até 3500 rpm;
- ❖ Eletrodo combinado de pH ORION;
- ❖ Eletrodo de referência de dupla junção ORION, modelo 90-02;
- ❖ Eletrodo íon seletivo de Cu(II) ORION, modelo 94-29;
- ❖ Espectrofotômetro HITACHI, modelo U-2000;
- ❖ Espectrômetro de absorção atômica SHIMADZU modelo AA-6800, com forno de grafite modelo GFA-EX7;
- ❖ Espectrômetro de infravermelho NICOLET, modelo Impact 400 (400 a 4000 cm^{-1});
- ❖ Estufa com renovação de ar da Soc. Fabbe Ltda;
- ❖ Filtro de membrana com porosidade 1 kDa e 47 mm de diâmetro (polietersulfônica, German Pall-Filtron OMEGA);
- ❖ Liofilizador SAVANT, modelo EC Modulyo;
- ❖ Membranas de diálise SEAMLESS CELL 16 x 100 CLEAR;
- ❖ Micro bureta RADELKIS, modelo OP 936;

- ❖ Micro pipetas EPPENDORF e LABSYSTEMS, diversos tamanhos;
- ❖ Potenciômetro portátil ORION, modelo 250A;
- ❖ Potenciômetro TECNAL, modelo Tec-2;
- ❖ Resinas de base acrílica XAD 8;
- ❖ Sistema de ultrafiltração SARTORIUS Ultrasart X;
- ❖ Sistema purificador de água MILLIPORE, modelo Milli-Q plus;
- ❖ Vidraria comum a um laboratório de química analítica.

2.1.2 – Reagentes

- ❖ Ácido clorídrico (Merck), HCl, densidade_{25°}= 1,19 g cm⁻³, título= 37% (m/m), M= 36,46 g mol⁻¹;
- ❖ Ácido nítrico (Merck), HNO₃, densidade_{25°}= 1,40 g cm⁻³, título= 65% (m/m), M= 63,01 g mol⁻¹;
- ❖ Carbonato ácido de sódio (Mallinckrodt), (bicarbonato de sódio), NaHCO₃, M= 84,01 g mol⁻¹;
- ❖ Carbonato de sódio (Mallinckrodt), Na₂CO₃, M= 105,99 g mol⁻¹;
- ❖ EDTA dissódico (Merck), C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈·H₂O, M= 372,24 g mol⁻¹;
- ❖ Ftalato ácido de potássio (Mallinckrodt), (biftalato de potássio), HK(C₈H₄O₄), M= 204,22 g mol⁻¹;
- ❖ Hidróxido de sódio (Merck), NaOH, M= 40,00 g mol⁻¹;
- ❖ Brometo de potássio (Merck), KBr, M= 119,00 g mol⁻¹;
- ❖ Metanol (Synth), CH₃OH, M= 32,04 g mol⁻¹;
- ❖ Nitrato de sódio (Mallinckrodt), NaNO₃, M= 84,99 g mol⁻¹;

❖ Dihidrogenofosfato de potássio (Mallinckrodt), KH_2PO_4 , $M= 136,09 \text{ g mol}^{-1}$;

❖ Monohidrogenofosfato de sódio (Mallinckrodt), Na_2HPO_4 , $M= 141,96 \text{ g mol}^{-1}$.

2.1.3 - Soluções

As soluções foram preparadas por dissoluções e/ou diluições de reagentes com alto grau de pureza e as soluções ácidas diluídas foram preparadas diluindo ácido clorídrico 30% e ácido nítrico (p.a. MERCK AG, pré-purificados por destilação) com água desionizada (Sistema Milli-Q, MILLIPORE). A mesma água também foi utilizada para preparar a solução de hidróxido de sódio NaOH (suprapur MERCK AG). Os ajustes de pH foram feitos com soluções de hidróxido de sódio e/ou ácido clorídrico ambas $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

Solução estoque de hidróxido de sódio 10 mol L^{-1}

Sob banho de gelo dissolveram-se 400 g de hidróxido de sódio em béquer de 2L. Completou-se o volume e foi estocada em frasco de polietileno. Desta solução, por diluição, obteve-se soluções diluídas de 1,0, 0,1 e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

Solução tampão pH 4,0 a 25°C

Dissolveram-se 10,2110 g de ftalato ácido de potássio (seco em estufa a 120°C por 2 h), transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL, adicionou-se 1 mL de clorofórmio e completou-se o volume. Esta solução foi

estocada em frasco âmbar, mantida em refrigerador e desprezada quando observado desenvolvimento de microorganismos.

Solução tampão pH 6,9 a 25 °C

Dissolveram-se 3,4022 g de dihidrogenofosfato de potássio, 3,5490 g de monohidrogeno fosfato de sódio (ambos secos em estufa a 120 °C por 2 h), transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL, adicionou-se 1 mL de clorofórmio e completou-se o volume. Esta solução foi estocada em frasco âmbar, mantida em refrigerador e desprezada quando observado desenvolvimento de microorganismos.

Solução de carbonato ácido de potássio 2% (m/v)

Dissolveram-se cerca de 20 g de carbonato ácido de potássio em água desionizada em béquer de 500 mL e completou-se o volume.

Solução de substâncias húmicas 100 mg L⁻¹

No experimento do eletrodo íon seletivo, dissolveram-se 5 mg de substâncias húmicas em água, transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume.

No experimento de ultrafiltração, dissolveram-se 20 mg de substâncias húmicas em água, transferiu-se para balão volumétrico de 200 mL e completou-se o volume.

Solução de etilenodiaminotetracético de sódio (EDTA) 0,01 mol L⁻¹

Dissolveram-se 3,7224 g de etilenodiaminotetracético de sódio dihidratado (seco em estufa a 60-70 °C por 8 h), transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL, completou-se o volume e estocou-se em frasco de polietileno.

Soluções estoques

Solução estoque de cobre 1000 mg L⁻¹

Dissolveram-se 1,000 g de fios de cobre (98,81%) em HNO₃ (MERCK AG), transferiu-se para balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume. Em seguida, padronizou-se a solução com solução de EDTA 0,0100 mol L⁻¹, utilizando murexida 1% com NaCl.

Solução estoque de carbono total 1000 mg L⁻¹

Dissolveram-se 0,53 g de ftalato ácido de potássio (seco em estufa a 120 °C por 2 h), transferiu-se para balão volumétrico de 250 mL e completou-se o volume. Esta solução foi estocada em frasco âmbar e mantida em refrigerador.

Solução estoque de carbono inorgânico 1000 mg L⁻¹

Dissolveram-se 0,88 g de carbonato ácido de sódio, 1,10 g de carbonato de sódio (ambos secos em estufa a 285 °C por 1 h), transferiu-se para balão volumétrico de 250 mL e completou-se o volume.

Soluções padrão

Solução padrão de cobre $9,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

Preparou-se solução padrão de cobre $9,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a partir de diluição da solução estoque de cobre 1000 mg L^{-1} .

Soluções padrão mistas dos metais

Prepararam-se soluções padrão mistas dos metais em diferentes concentrações, a partir de diluição das soluções estoque Titrisol MERCK.

Soluções padrão de carbono total e inorgânico

Prepararam-se soluções padrão de carbono total e inorgânico em diferentes concentrações, a partir de diluição das soluções estoques. As curvas analíticas foram feitas com base nas concentrações de carbono estimadas nas soluções de substâncias húmicas e amostras de matéria orgânica aquática.

2.2. - MÉTODOS

Toda água utilizada foi previamente destilada e purificada em sistema desionizador de água, até apresentar resistividade $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

A limpeza da vidraria foi feita com vapor de ácido nítrico concentrado, segundo procedimento proposto por TSCHOPEL *et al.* (1980). Neste caso, a vidraria é colocada com o fundo para cima em um suporte de vidro acoplado dentro de um béquer de 5 litros contendo cerca de 300 mL de ácido nítrico concentrado e tampado com vidro de relógio. O béquer é colocado em chapa de aquecimento e deixado em refluxo por, no mínimo,

duas horas. Em seguida, os frascos são exaustivamente enxaguados com água desionizada. Alternativamente, a vidraria é lavada duas ou três vezes com água desionizada para tirar o excesso de ácido e repete-se o procedimento de refluxo substituindo-se o ácido nítrico por água desionizada. O ácido nítrico pode ser reutilizado duas a três vezes e, então, descartado.

2.2.1 - Amostragem

As amostras foram coletadas em diferentes regiões do Brasil.

Amostras de água

As amostras de água foram coletadas no Rio Itapitanguí, município de Iguape, (IS e IS-XAD 8) e Rio Itapanhaú, município de Bertioga (IR e IR-XAD 8), ambas pertencentes ao Parque Estadual da Serra do Mar (SP); Rio Negro-AM (RN e RN-XAD 8), Rio São Francisco-MG (RF) e Rio Cuiabá-MT (RC).

Parte das amostras de água dos Rios Itapitanguí e Itapanhaú foi acidificada a pH 2,0 com solução de HCl concentrado para posterior procedimento de extração com resina XAD 8. O restante das amostras aquáticas não recebeu reagente, sendo mantida sob refrigeração a cerca de 4 °C.

Amostras de solo

As amostras de solo foram coletadas da Bacia do Médio Rio Negro (AM). Foram utilizadas duas amostras de solo, divididas em solo não alagável de Carvoeiro 1(RNS-1) e solo não alagável de Araçá 1(RNS-2).

2.2.2 - Extração das substâncias húmicas aquáticas com resina XAD 8

Utilizou-se a resina macroporosa Amberlite XAD 8 tratada previamente com 200 mL de metanol, permanecendo sob agitação por 24 horas para a retirada de possíveis grupos hidrofílicos retidos e, posteriormente a resina foi exaustivamente lavada com água desionizada (THURMAN & MALCOLM, 1981).

Antes da extração, a amostra foi filtrada em papel qualitativo para remoção de sólidos e partículas suspensas. Em seguida, foi montado um sistema para a extração da matéria orgânica aquática (MOA) por cromatografia em coluna com fluxo descendente por gravidade, conforme ilustrado na Figura 3. A resina XAD 8 foi suspensa em água desionizada e acondicionada em coluna de vidro, formando um leito trocador de 16 cm de altura e 2 cm de diâmetro interno.

Inicialmente a resina foi tratada com 200 mL de solução de HCl 0,1 mol L⁻¹, em seguida foi lavada com água desionizada até pH neutro e a amostra foi percolada pela coluna com vazão de 3,0 mL min⁻¹. O líquido efluente, em pH 2,0, foi monitorado por leituras de absorvância a 250 nm com o objetivo de estimar a saturação da resina (LARA & THOMAS, 1994). Com o valor da absorvância do efluente apresentando, aproximadamente, metade do valor da absorvância da amostra bruta, o processo de extração foi interrompido.

Após saturação com MON, percolou-se pela resina 50 mL de solução de HCl 0,01 mol L⁻¹ com vazão de 4,0 mL min⁻¹ para remover eventuais impurezas inorgânicas. Posteriormente foi feita eluição com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ (pH= 13), com vazão de 1,0 mL min⁻¹. O eluato foi recolhido na base da coluna, o pH ajustado em 5,0 e o extrato foi armazenado em frasco de polietileno e mantido sob refrigeração a 4 °C.

Após a eluição, a resina foi regenerada em processo de batelada com 100 mL de solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ e exaustivas lavagens com água desionizada. A resina foi então acidificada, com 200 mL de solução de HCl 0,1 mol L⁻¹.

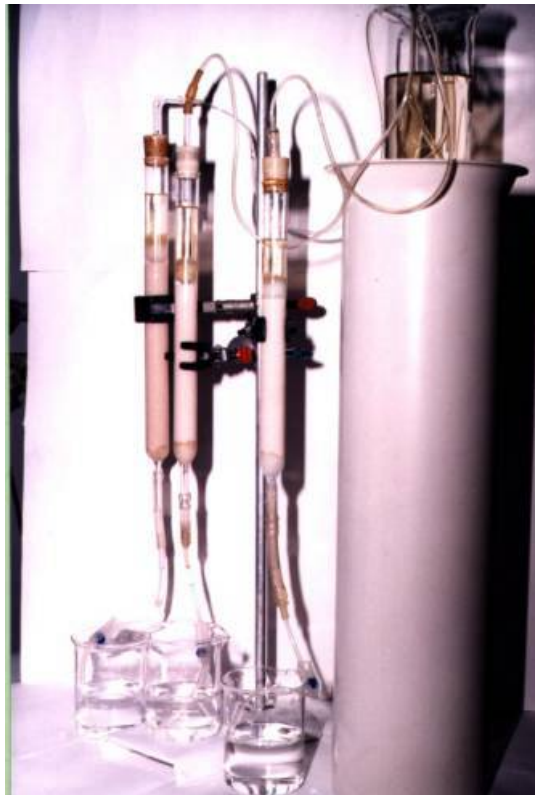


FIGURA 4- Sistema extrator utilizado para isolar substâncias húmicas aquáticas

2.2.3 - Extração das substâncias húmicas de solo

Tomaram-se 5,0 g da amostra, adicionaram-se 50 mL de solução 0,1 mol L⁻¹ HCl e ajustou-se o pH da solução em 1,5 com solução 1,0 mol L⁻¹ HCl. Deixou-se a mistura HCl/solo sob agitação por 1 hora e em seguida fez-se a centrifugação a 1478g por 10 minutos separando-se o sobrenadante do resíduo. Ajustou-se o pH do resíduo em 7,0 com solução 0,1 mol L⁻¹ NaOH e adicionou-se 50 mL de solução 0,1 mol L⁻¹ NaOH. Deixou-se a mistura sob agitação mecânica por 4 horas sob atmosfera de nitrogênio em sistema ilustrado na Figura 4 . A seguir, centrifugou-se a mistura em 1478 g por 10 minutos, separando-se o sobrenadante (SH) do resíduo (humina). A humina (material orgânico/ inorgânico não extraível) foi descartada e o sobrenadante (SH) acidificado até pH 2,0 com solução 6,0 mol L⁻¹ HCl.



FIGURA 5– Sistema extrator utilizado na extração das substâncias húmicas de solo por procedimento em batelada

2.2.4 - Diálise dos extratos

O preparo dos tubos de diálise foi feito segundo o procedimento descrito por TOWN & POWELL (1992). A limpeza dos tubos foi feita tratando-os por 10 min com soluções de NaHCO_3 2% (m/v) e Na_2EDTA 0,01 mol L^{-1} , em seguida os tubos foram lavados com água desionizada a 65 °C. Os tubos limpos foram armazenados em água desionizada a 6 °C.

Após limpeza, os tubos foram cheios com os extratos e submersos em água desionizada sob agitação magnética até a condutividade da água apresentar valor próximo da condutividade da água desionizada (cerca de

1,3 $\mu\text{S cm}^{-1}$). O procedimento de diálise é feito para eliminação do excesso de sais dissolvidos nos extratos produzidos pelo processo de extração.

2.2.5 - Liofilização dos extratos

Os extratos aquosos das amostras de SHA e SHS, após diálise, foram congelados em banho de nitrogênio líquido e liofilizados a uma temperatura de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão de 10^{-1} torr em Liofilizador SAVANT. Um volume de 50 mL da amostra é liofilizada em cada frasco em tempo de liofilização de aproximadamente 20h.

2.2.6 - Estudos de complexação para Cu(II)

Técnica de ultrafiltração tangencial (UF-FT)

Para o estudo de complexação entre o íon Cu(II) e matéria orgânica aquática, utilizou-se o procedimento analítico proposto por BURBA *et al.* (2001) ilustrado nas Figuras 2 e 5. Este procedimento baseia-se na utilização de um sistema de ultrafiltração tangencial (SARTORIUS Ultrasart X) equipado com membrana de polietersulfônica de 1 kDa (Gelman Pall-Filtron OMEGA), a qual impede a passagem das SH e dos complexos SH-M com tamanho molecular maior que 1 kDa. Logo, os íons metálicos livres não complexados às SH ou trocados por elas passam pela membrana (BURBA *et al.*, 2001).

Determinação da capacidade de complexação

As titulações foram feitas em volume de 200 mL de solução de SH 100 mg L^{-1} ou de água natural, ajustou-se o pH em 5,0 com solução de

NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e força iônica em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com NaNO_3 . Utilizou-se o sistema de ultrafiltração tangencial equipado com membrana de 1 kDa descrito no item anterior. Antes da adição da solução de cobre, deixou-se o sistema bombeando por cerca de cinco minutos para condicionamento da membrana. A seguir, filtrou-se a primeira alíquota (cerca de 2 mL), a qual é correspondente ao tempo zero, ou seja, antes da adição da solução de cobre. Essa alíquota contém uma pequena quantidade de cobre originalmente presente na matéria orgânica, correspondente à fração livre (não complexada a MON) mais aquela fração ligada a MON, com tamanho molecular menor que 1 kDa. Volumes de $100 \mu\text{L}$ a $5,0 \text{ mL}$ de solução padrão de Cu(II) $9,45 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionados à solução até concentração em Cu(II) de $4,47 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Depois de alcançado cada equilíbrio, em 10 min, e com agitação permanente, alíquotas (cerca de 2 mL) das frações da solução foram coletadas contendo íons Cu(II) isolados pelo procedimento de filtração. Os filtrados foram acidificados com solução diluída de HNO_3 e em seguida Cu(II) foi determinado por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) (ROCHA *et al.*, 2002).

Eletrodo combinado de pH foi utilizado para manter o pH 5,0 durante todo experimento, pela adição de soluções de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, para neutralização dos prótons liberados pela reação de complexação e por aqueles adicionados via solução padrão ácida de Cu(II) .

Determinação das constantes de troca entre íons Cu(II) e Ni, Al e Fe complexados às substâncias húmicas

Utilizou-se o procedimento de titulação descrito acima. Antes da adição da solução de cobre, deixou-se o sistema bombeando por cerca de cinco minutos para condicionamento da membrana. A seguir, filtrou-se a primeira alíquota (cerca de 2 mL), a qual é correspondente ao tempo zero, ou seja, antes da adição da solução de cobre. Essa alíquota contém uma pequena quantidade de cobre e dos metais níquel, alumínio e ferro, originalmente presentes na matéria orgânica, correspondente à fração livre (não complexada a MOA) mais aquela fração ligada a MON, com tamanho molecular menor que 1 kDa. Volumes de 100 μ L a 5,0 mL de solução padrão de Cu(II) $9,45 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionados à solução até concentração em Cu(II) de $4,47 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Depois de alcançado cada equilíbrio, em 10 min, e com agitação permanente, alíquotas (cerca de 2 mL) das frações da solução foram coletadas contendo íons cobre isolados pelo procedimento de filtração mais os metais níquel, alumínio e ferro, correspondentes as frações dos metais não complexadas e trocadas pelos íons Cu(II). Os filtrados foram acidificados com solução diluída de HNO₃ e em seguida os metais determinados por GFAAS (ROCHA *et al.*, 2002).



FIGURA 6– Sistema de ultrafiltração em fluxo tangencial utilizado na determinação de parâmetros de complexação de Cu(II) por matéria orgânica aquática, substâncias húmicas extraídas de amostras de água e de solos de diferentes regiões brasileiras

Técnica do eletrodo íon seletivo (EIS)

Eletrodo íon seletivo de Cu(II) (ORION 94-29) e o eletrodo de referência de dupla junção foram utilizados na determinação da concentração de íons Cu(II) livres durante a titulação. O eletrodo de Ag/AgCl foi utilizado como referência, com câmara externa contendo solução de KNO_3 10% (m/v), isolado da amostra com material de referência interno, contendo solução saturada de AgCl. O pH foi monitorado durante a titulação utilizando um eletrodo combinado de pH conectado a um pHmetro ORION. Antes de cada experimento uma curva de calibração foi construída para testar a inclinação do eletrodo seletivo

(25 °C a inclinação foi de 29,6 mV). Os experimentos foram feitos sob condição de luz constante (TOWN & POWELL, 1993) e em volume de 50 mL de solução de SH 100 mg L⁻¹ ou de água natural, o pH foi ajustado em 5,0 com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ e força iônica em 0,1 mol L⁻¹ com NaNO₃. Todos os experimentos foram feitos a 25,0 ± 0,1 °C.

As titulações foram feitas em copos pyrex de 100 mL, cobertos com tampa de teflon contendo 5 orifícios para a inserção dos eletrodos, o borbulhador de nitrogênio e a microbureta. Uma microbureta de vidro RADELKIS OP 936, de 10 mL foi utilizada para adicionar a solução de íons Cu(II). O oxigênio dissolvido era previamente removido da solução, no início da titulação, borbulhando nitrogênio ultrapuro (99,99%) na solução por 15 minutos e essa atmosfera inerte era mantida acima da solução durante o experimento (ABATE & MASINI, 1999). A concentração de íons Cu(II) livres foi medida pela adição de alíquotas de 25 a 125 µL da solução padrão de Cu(II) 9,45 10⁻³ até concentração em Cu(II) de 1,5 10⁻⁴ mol L⁻¹. O pH foi mantido constante pela adição de solução 0,1 mol L⁻¹ e 0,01 mol L⁻¹ de NaOH, para neutralização dos prótons liberados pela reação de complexação e por aqueles adicionados via solução padrão ácida de Cu(II) (TOWN & POWELL, 1993; ANTONELLI *et al.*, 2001).

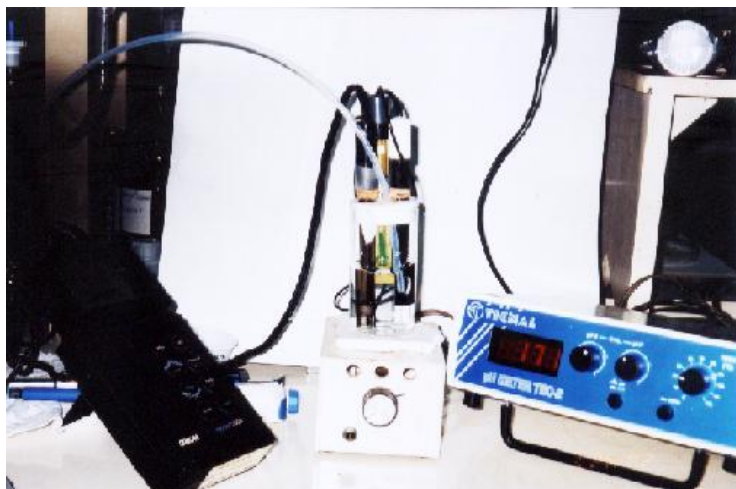


FIGURA 7– Sistema potenciométrico utilizando eletrodo íon seletivo de Cu(II) para a determinação de parâmetros de complexação de Cu(II) por matéria orgânica aquática, substâncias húmicas extraídas de amostras de água e de solo de diferentes regiões brasileiras

2.2.7 - Determinação dos metais

Cobre, alumínio, ferro e níquel foram determinados utilizando espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GFAAS) utilizando soluções padrão mistas Titrisol-MERCK de acordo com as recomendações do fabricante.

2.2.8 - Determinação dos teores de carbono orgânico

As concentrações de carbono foram determinadas pelo método de combustão catalítica sob atmosfera de oxigênio, utilizando analisador de carbono SHIMADZU, modelo TOC 5000A.

2.2.9 - Determinação da composição elementar

A composição elementar das amostras de SHA e SHS foi determinada em relação ao conteúdo de carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio em analisador elementar CHNSO-CE Instruments, PERKIN ELMER, modelo EA 1110.

2.2.10 - Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos de pastilhas preparadas da mistura de brometo de potássio seco a 120 °C com amostras de substâncias húmicas liofilizadas. As pastilhas foram obtidas submetendo-se essa mistura à pressão de 10t cm⁻² em pastilhador de 14 mm de diâmetro. As medidas foram feitas utilizando-se espectrômetro NICOLET, modelo Impact 400(região de 400 a 4000 cm⁻¹).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - CARACTERIZAÇÕES

3.1 1 - Carbono orgânico total (COT)

Os resultados de carbono orgânico total estão apresentados na Tabela 3 e foram encontrados teores de COT no intervalo de 2,8 a 46,1 mg C L⁻¹

Tabela 3 – Informações gerais e teores de carbono orgânico total de amostras de matéria orgânica aquática (MOA), substâncias húmicas aquáticas (SHA) e de solos (SHS) coletadas em diferentes regiões brasileiras

Denominação das amostras	Localização	Método de extração	COT(mg L ⁻¹)
IS	Rio Itapitanguí – Iguape (SP)	Amostra original	38,7 ± 1,2
IS-XAD 8		XAD-8	34,2 ± 0,7
IR	Rio Itapanhaú - Bertioga (SP)	Amostra original	41,6 ± 0,5
IR-XAD 8		XAD-8	36,1 ± 1,5
RN	Rio Negro (AM)	Amostra original	44,0 ± 0,8
RN-XAD 8		XAD-8	46,1 ± 0,7
RNS- 1(água preta)	Solo de Carvoeiro 1 Rio Negro (AM)	IHSS	20,9 ± 0,6
RNS- 2 (água branca)	Solo de Araçá 1 Rio Negro (AM)	IHSS	27,0 ± 0,8
RF	Rio São Francisco (MG)	Amostra original	5,1 ± 0,3
RC	Rio Cuiabá (MT)	Amostra original	2,8 ± 0,3

As amostras de MON (IS, IR e RN) e SHA (IS-XAD 8, IR-XAD 8 e RN-XAD 8) apresentaram maiores teores de carbono orgânico total. Enquanto as amostras de MON (RF e RC) apresentaram menores teores de carbono orgânico. De acordo com THURMAN (1985a), a distribuição de carbono orgânico varia em águas naturais. Nos rios, o carbono orgânico depende do tamanho do rio, clima, vegetação e estações do ano. Com concentração variando de 5 a 60 mg L⁻¹.

3.1.2 - Composição elementar

As razões atômicas H/C e C/N geralmente têm sido utilizadas para estimativa do grau de aromaticidade e de humificação de substâncias húmicas, respectivamente (FRIMMEL, 1990). A Tabela 4 lista os resultados da composição elementar e razões molares H/C e C/N para SH extraídas de amostras de água e de solos de diferentes regiões. Quanto menor a razão H/C, maior a aromaticidade e quanto maior a razão C/N, maior o estado de humificação do material. Existem similaridades entre os valores das razões H/C das diferentes amostras de SHA e SHS, os quais estão próximos aos valores disponíveis na literatura indicando elevada aromaticidade (STEVENSON, 1994). Dentre todas as amostras, devida à menor razão molar H/C, RN-XAD 8 pode ser caracterizada como mais aromática. As amostras IS-XAD 8 e IR-XAD 8 apresentaram elevadas razões molares C/N indicando serem as amostras mais humificadas.

Tabela 4 – Composição elementar (%), razões molares H/C e C/N de substâncias húmicas extraídas de amostras de águas (SHA) e de solos (SHS) coletadas em diferentes regiões brasileiras

Amostras	C	H	O	N	H/C	C/N
IS-XAD 8	39,2	5,1	45,1	0,9	1,6	52,7
IR-XAD 8	37,0	4,3	41,0	1,2	1,4	35,4
RN-XAD 8	46,9	4,3	41,1	3,0	1,1	18,4
RNS-1	20,5	3,0	38,4	1,4	1,8	16,8
RNS-2	23,5	3,3	31,9	2,3	1,7	12,0

As demais amostras apresentaram comportamento semelhante quanto ao grau de humificação e, quanto às amostras de solo, RNS-1 e RNS-2, não foram caracterizadas diferenças entre os valores de razão C/N.

3.1.3 - Infravermelho

A Figura 7 mostra os espectros na região do infravermelho para as substâncias húmicas aquáticas e de solo. Os espectros apresentam bandas largas, comuns nos espectros de substâncias húmicas, atribuídas à extensiva superposição de absorções individuais (POPPI & TALAMONI, 1992). As bandas largas de absorção na região de 3400 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento OH de fenóis e/ou ácidos carboxílicos e /ou estiramento NH de aminas. Bandas na região de 2900 cm^{-1} indicam a presença de estiramento CH de grupos alifáticos. As bandas nas regiões de 1630 e 1720 cm^{-1} são devidas a vibrações de carbonilas de grupos carboxilatos e/ou cetonas. Picos em torno de 1385 cm^{-1} e bandas na região

de 1035-1100 cm^{-1} estão associados a deformações do grupo carboxilato e estiramento CO de álcoois, respectivamente (ARAÚJO *et al.*, 2002).

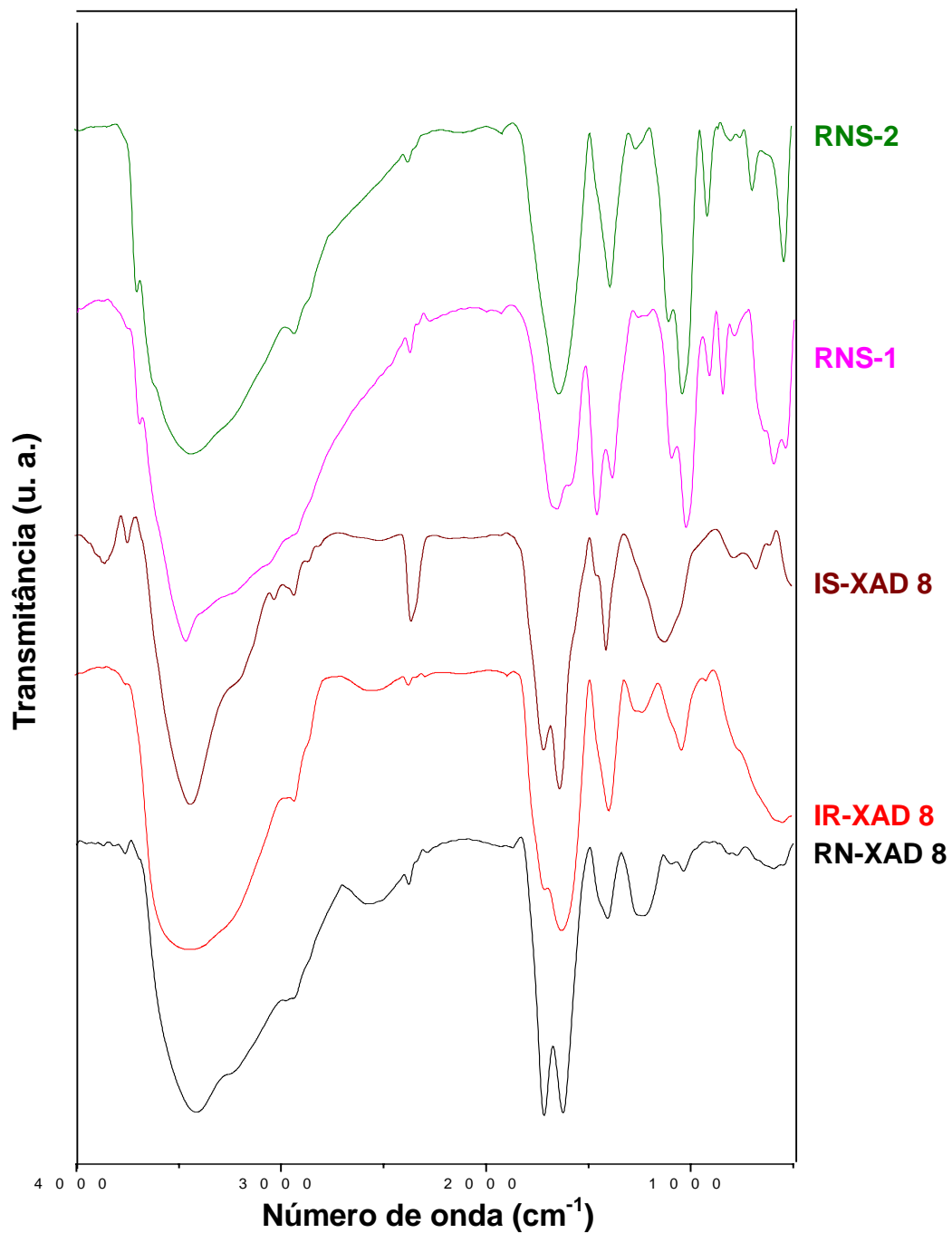


Figura 7– Espectros na região do infravermelho para as substâncias húmicas extraídas de amostras de água e de solos coletadas em diferentes regiões brasileiras

3.2 - DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE RETENÇÃO DA MEMBRANA DE 1 kDa

Nos estudos de complexação de metal pela matéria orgânica utilizando o procedimento de Ultrafiltração tangencial (UF) é preciso que a retenção do ligante e do complexo pela membrana seja máxima ($R_L = 1$) e a retenção do íon metálico, o qual passa pela membrana seja mínima ($R_M = 0$).

O coeficiente de retenção (R) das espécies pode ser calculado utilizando a equação

$$R_x = \frac{[X]^s - [X]^f}{[X]^s}$$

onde $X = M, L, ML$ e os sobrescritos s e f referem-se as concentrações de X na solução e nos filtrados, respectivamente (STAUB *et al.*, 1984).

Os testes para determinação da capacidade de retenção do ligante foram feitos traçando curvas analíticas com amostras de SHA e SHS e lendo as absorbâncias nos filtrados e nas soluções originais por espectrofotometria de absorção molecular em 254 nm. Os valores de retenção do ligante pela membrana, das amostras analisadas a pH 5,0, foram superiores a 0,98.

Os testes para determinação da capacidade de retenção de cobre foram feitos por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite fazendo adições de concentração conhecida do metal em solução, nas mesmas condições experimentais, porém sem substâncias húmicas (“solução branco”). Em seguida, foi determinada a concentração de cobre

na “solução branco” e no filtrado. O coeficiente médio de retenção de cobre na membrana em pH 5,0, foi menor que 0,012.

VAN Den BERGH *et al.*, (2001) determinaram os coeficientes de retenção em membranas de 1 kDa para íons metálicos, em pH 4,0-4,8, menores que 0,02 e maiores que 0,95 para retenção das substâncias húmicas. Esses resultados corroboram com os deste trabalho, os quais mostram a eficiência do procedimento de ultrafiltração na diferenciação do metal complexado pela matéria orgânica (retido na membrana) do metal isolado no filtrado.

3.3 - COMPLEXAÇÃO DE ÍONS Cu(II) POR MATÉRIA ORGÂNICA AQUÁTICA, SUBSTÂNCIAS HÚMICAS AQUÁTICAS E DE SOLOS

Os parâmetros de complexação de íons Cu(II) por MOA, SHA e SHS foram determinados por Ultrafiltração em fluxo tangencial e único estágio (UF-FT) e os resultados comparados com o procedimento potenciométrico utilizando eletrodo íon seletivo (EIS) de Cu(II). Para fins de comparação, os experimentos foram feitos nas mesmas condições experimentais, como pH, força iônica e concentração do ligante.

3.3.1 - Capacidade de complexação (CC)

A CC é um importante parâmetro de qualidade de águas, correspondendo à concentração do íon metálico, o qual poderá ser adicionado a um corpo aquático sem que a espécie iônica seja predominante (FLORENCE, 1986) ou a concentração disponível de sítios ligantes (MORRISON & FLORENCE, 1989; NEUBECKER & ALLEN, 1983).

Na titulação com o íon metálico, ocorre primeiro a saturação dos sítios ligantes mais fortes e depois a saturação dos mais fracos. As Figuras 8 e 9 são curvas típicas obtidas a partir da titulação (em triplicata) de amostras de MOA, SHA e SHS com solução padrão de Cu(II) utilizando procedimento da Ultrafiltração em fluxo tangencial e potenciometria com eletrodo íon seletivo. A determinação da capacidade de complexação (CC), para ambos os métodos, foram obtidas curvas representando graficamente a concentração do metal livre (mmol L^{-1}) *versus* a concentração do metal total (mmol L^{-1}). A curva apresenta uma mudança de inclinação na parte final e a CC foi obtida pela interseção das duas seções lineares do gráfico (FLORENCE *et al.*, 1992; EINAX & KUNZE, 1996; NEUBECKER & ALLEN, 1983; TOWN & POWELL, 1993).

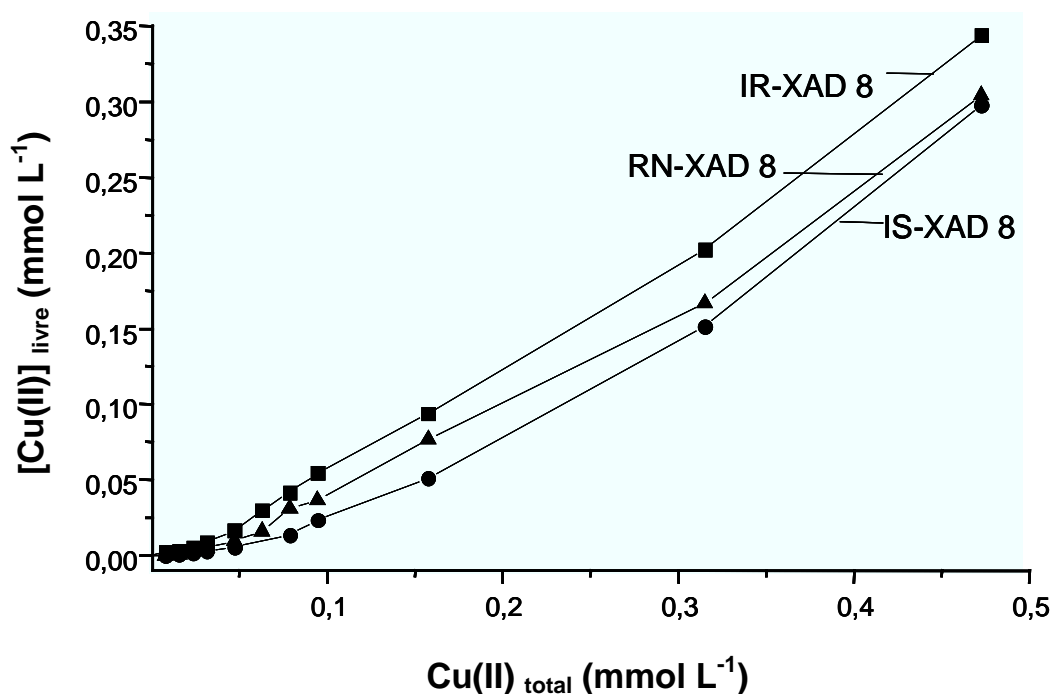


Figura 8 – Capacidade de complexação de substâncias húmicas aquáticas extraídas com resina XAD-8, de amostras de água do Rio Itapitanguí (Iguape-SP), Rio Itapanhaú (Bertioga-SP) e Rio Negro-AM para íons Cu(II), utilizando a técnica de ultrafiltração tangencial. Condições: 25 °C, SHA = 100 mg L^{-1} , pH 5,0 e I = 0,1 mol L^{-1} NaNO₃

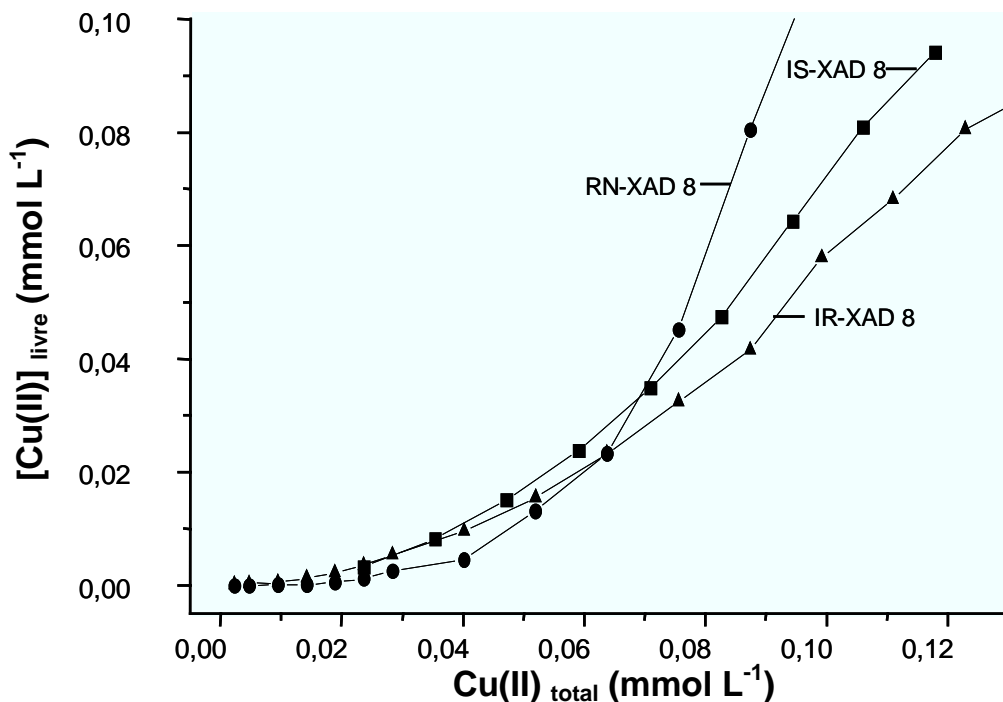


Figura 9 – Capacidade de complexação de substâncias húmicas aquáticas extraídas com resina XAD-8, de amostras de água do Rio Itapitanguí (Iguape-SP), Rio Itapanhaú (Bertioga-SP) e Rio Negro-AM para íons Cu(II), utilizando eletrodo íon seletivo de cobre. Condições: 25 °C, SHA = 100 mg L⁻¹, pH 5,0 e I = 0,1 mol L⁻¹ NaNO₃

3.3.2 - Constante de estabilidade condicional (K)

Para estimar a constante de estabilidade condicional (K) dos complexos Cu-MOA, Cu-SHA, Cu-SHS, os dados experimentais foram tratados matematicamente pelo método de Scatchard, como exemplificados nas Figuras 11 e 12. Esse método gráfico utiliza linearizações para o modelo de formação de complexo 1:1, considera um número finito de

diferentes sítios complexantes presentes na MON, com diferentes valores de constante de equilíbrio e inexistência de interações entre esses sítios (SILVA,1996; SOARES & VASCONCELOS, 1994; PARMEGGIANI & MASINI, 2003).

A concentração do metal complexado, $[ML]$, é calculada a partir do balanço de massa: $[ML] = [M]_{total} - [M]$ (1). A fração de sítios de ligação f_i é definida como

$$f_i = \frac{[ML]_i}{[L]_i} \quad (2)$$

onde $[L]_i$ é a concentração total dos sítios de complexação, expressa em mol L⁻¹. No caso de ligantes de ocorrência natural, como as SH, nos quais a massa molar não é definida por um único valor e a concentração total dos sítios de complexação não é conhecida *a priori*, expressa-se à fração de sítios ligantes como

$$f_i = \frac{[ML]}{\{P\}} = CC_i \quad (3)$$

onde $\{P\}$ é a concentração do ligante expressa em g L⁻¹ e CC_i é chamada capacidade complexante, a qual representa o número de mol de sítios de complexação da classe (*i*) por grama do ligante. A partir das equações (1), (2), a expressão para a constante de equilíbrio condicional K_i em pH e força iônica constante

$$K_i = \frac{[ML]_i}{[M][L]_i} \quad (4)$$

e a isoterma de adsorção de Langmuir $f_i = [ML]_i / \{P\} = \frac{CC_i K_i [M]}{(1 + K_i [M])}$ (5),

pode-se deduzir a seguinte expressão de acordo com a proposta de Scatchard (BUFFLE, 1990; ABATE & MASINI, 1999)

$$\frac{[ML]_i}{[M]} = K_i[L]_i - K_i[ML]_i \quad (6)$$

Este tratamento matemático é utilizado para interpretar curvas de titulação de ligantes por íons metálicos representando graficamente $\frac{[ML]}{[M]}$ em função de $[ML]$. Para complexos com apenas um tipo de sítio ligante é obtida uma função linear (Figura 10), K corresponde ao módulo do coeficiente angular e a interseção com o eixo das abcissas é igual ao produto de $[L]$ por K (SILVA, 1996).

Quando dois tipos de sítios significativamente distintos estão presentes, a curva obtida tem forma côncava e pode ser dividida em dois segmentos lineares (Figuras 11 e 12), onde os valores de K_1 e K_2 são estimados pelo módulo da inclinação das retas 1 e 2, respectivamente. Pela interseção da reta 1 com o eixo das abcissas e da reta 2 com o eixo das ordenadas, os valores de L_1 e L_2 são estimados (ABATE & MASINI, 1999; BUFFLE, 1984). A soma dos valores de L_1 e L_2 é próxima aos valores obtidos para CC (SOARES & VASCONCELOS, 1994).

Os resultados de CC, K_1 e K_2 obtidos por UF-FT e EIS estão apresentados na Tabela 5. Os valores de K_1 e K_2 determinados pelo procedimento de ultrafiltração e aqueles determinados por eletrodo íon seletivo, ambos em pH 5,0, foram relativamente menores que os citados na literatura, determinados em maiores valores de pH.

SILVA (1996), determinou por EIS e pelo modelo de Scatchard valores de $\log K_1$ 7,3 a 8,7 e $\log K_2$ 5,6 a 6,4 em amostras do Rio Atibaia

(SP) em pH 6,8 e força iônica $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com NaNO_3 . Valores de $\log K_1$ 7,1 a 7,8 e $\log K_2$ 5,5 a 6,0 em amostras de ácidos húmicos em pH 6,0 e força iônica de $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ com NaNO_3 foram determinados por ABATE & MASINI (1999). Enquanto resultados determinados por SPOSITO (1981) de $\log K_1$ 3,88 e $\log K_2$ 2,11 em pH 5,0 e força iônica $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com KClO_4 mostraram-se semelhantes aos determinados nesse trabalho. Essa variabilidade de valores das constantes de estabilidade condicional é uma constatação da importância do controle dos parâmetros, como pH e força iônica, os quais influenciam na disponibilidade dos sítios de ligação durante um experimento. Além disto, fica evidente que resultados são comparáveis quando obtidos nas mesmas condições experimentais.

A validação da metodologia de ultrafiltração em fluxo tangencial, proposta neste trabalho, foi feita comparando as médias das capacidades de complexação para cobre(II) determinadas por UF e àquelas obtidas por eletrodo íon seletivo utilizando o teste de student t , de acordo com a Tabela 6. Os resultados mostram que não existem diferenças entre os valores das capacidades de complexação determinados por ambos os procedimentos (MILLER & MILLER, 1989). Entretanto, de acordo com MATHUTHU & EPHRAIM (1993) pequenas diferenças nos resultados podem estar associadas às inerentes características experimentais de cada técnica aplicada. Ou seja, por EIS, embora a concentração do metal esteja próxima ao limite de detecção da técnica (cerca de $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) (Figura 13), a espécie Cu(II) é determinada *in situ*. Na ultrafiltração, a determinação das espécies metálicas depende dos limites de detecção das técnicas espectrométricas utilizadas.

Tabela 5- Capacidade de complexação (mmol Cu(II) g⁻¹ COT) e constante de estabilidade condicional de matéria orgânica aquática, substâncias húmicas aquáticas e de solos^a de amostras coletadas em diferentes regiões brasileiras

Amostras	Eletrodo íon seletivo (EIS)			Ultrafiltração (UF-FT)		
	CC ^b	log K ₁ ^c	log K ₂ ^c	CC ^b	log K ₁ ^c	log K ₂ ^c
IS	1,09±0,20	3,05	1,50	1,25±0,07	3,13	1,59
IS-XAD 8	1,12±0,18	3,80	1,92	1,23±0,11	4,10	2,13
IR	1,19±0,02	2,42	1,17	1,18±0,05	2,30	1,79
IR-XAD 8	1,21±0,04	3,45	1,85	1,12±0,05	4,20	1,36
RN	1,58±0,20	4,23	2,00	1,81±0,30	4,20	1,75
RN-XAD 8	1,27±0,04	4,22	2,15	1,44±0,04	4,21	1,38
RNS-1	1,50±0,30	4,37	2,16	1,99±0,18	4,35	2,60
RNS-2	1,44±0,25	4,13	2,53	1,52±0,24	3,00	1,49
RF	x	x	x	0,37±0,02	x	x
RC	x	x	x	0,17±0,01	x	x

^a Condições: 25°C, pH 5,0, I = 0,1 mol L⁻¹ NaNO₃;

^b Obtida pela interseção das duas seções lineares da curva [Cu]_{livre}=f([Cu]_{total})

^c Obtido pelo método de Scatchard [Cu]_{ligado}/[Cu]_{livre}=f([Cu]_{ligado}).

As substâncias húmicas extraídas de amostras de solos apresentaram maiores valores de CC em relação à matéria orgânica aquática e substâncias húmicas aquáticas. Do ponto de vista prático, para estudos ambientais, outra importante constatação experimental foram os valores da CC da matéria orgânica natural aquática e das SHA serem similares, indicando que o procedimento de extração utilizando resina acrílica XAD-8 não modificou significativamente as características complexantes originais das amostras.

Tabela 6 – Validação da metodologia de ultrafiltração tangencial (proposta) e eletrodo íon seletivo (referência) pela comparação das médias das capacidades de complexação (CC) de substâncias húmicas extraídas de amostras de água e de solos coletadas em diferentes regiões brasileiras

Amostras	Capacidade de complexação ^a		
	EIS	UF-FT	<i>t</i> ^b
IS	1,09±0,20	1,25±0,07	-1,31
IS-XAD 8	1,12±0,18	1,23±0,11	-0,90
IR	1,19±0,02	1,18±0,05	0,32
IR-XAD 8	1,21±0,04	1,12±0,05	2,44
RN	1,58±0,20	1,81±0,30	-1,11
RN-XAD 8	1,27±0,04	1,44±0,04	-5,21
RNS-1	1,50±0,30	1,99±0,18	-4,65
RNS-2	1,44±0,25	1,52±0,24	-0,40

^a Média e desvio padrão (determinações em triplicata);

^b Teste de student *t* para n=4, *t*_{crítico}=2,78 a 95%(Miller & Miller, 1989)

De acordo com STEVENSON (1994), a determinação das constantes de estabilidade condicional pelo método de Scatchard não é aplicável a baixas concentrações de Cu(II), pois K_1 depende de valores medidos no início da titulação, onde ocorre baixa saturação dos sítios ligantes. Foi verificado para amostras com baixas concentrações de carbono orgânico, $< 6 \text{ mg L}^{-1}$, como as amostras do Rio São Francisco-MG e do Rio Cuiabá-MT, larga dispersão dos valores experimentais. Devido a essa limitação, as respectivas constantes não foram determinadas. Semelhantes resultados foram encontrados por SOARES & VASCONCELOS (1994) para concentrações de ácidos fúlvicos no intervalo de $1\text{-}5 \text{ mg L}^{-1}$.

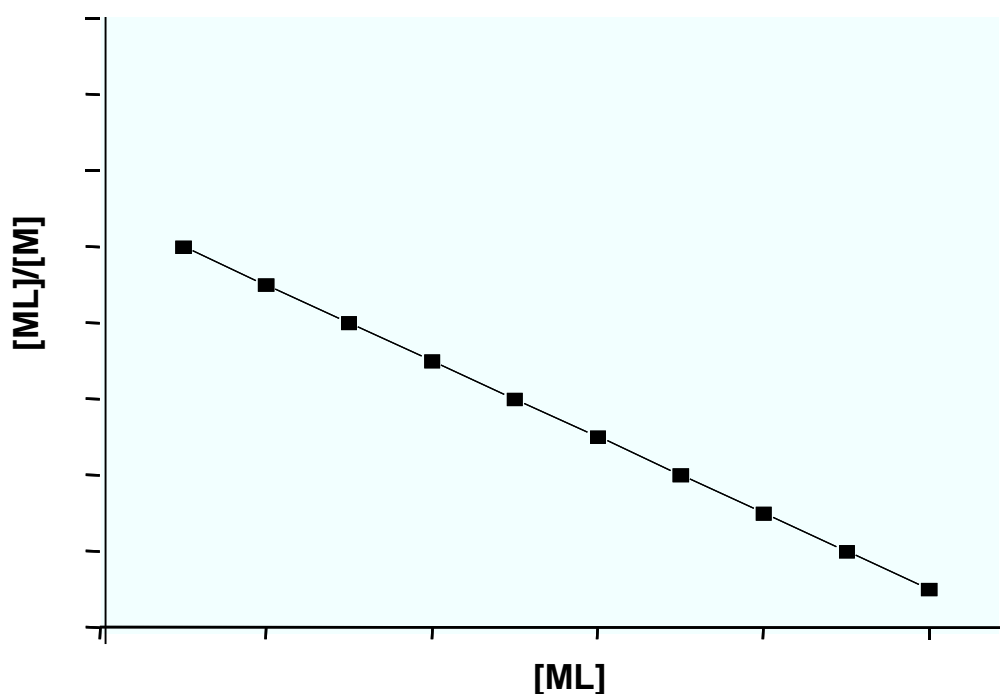


Figura 10 – Gráfico teórico do modelo de Scatchard com um sítio de ligação

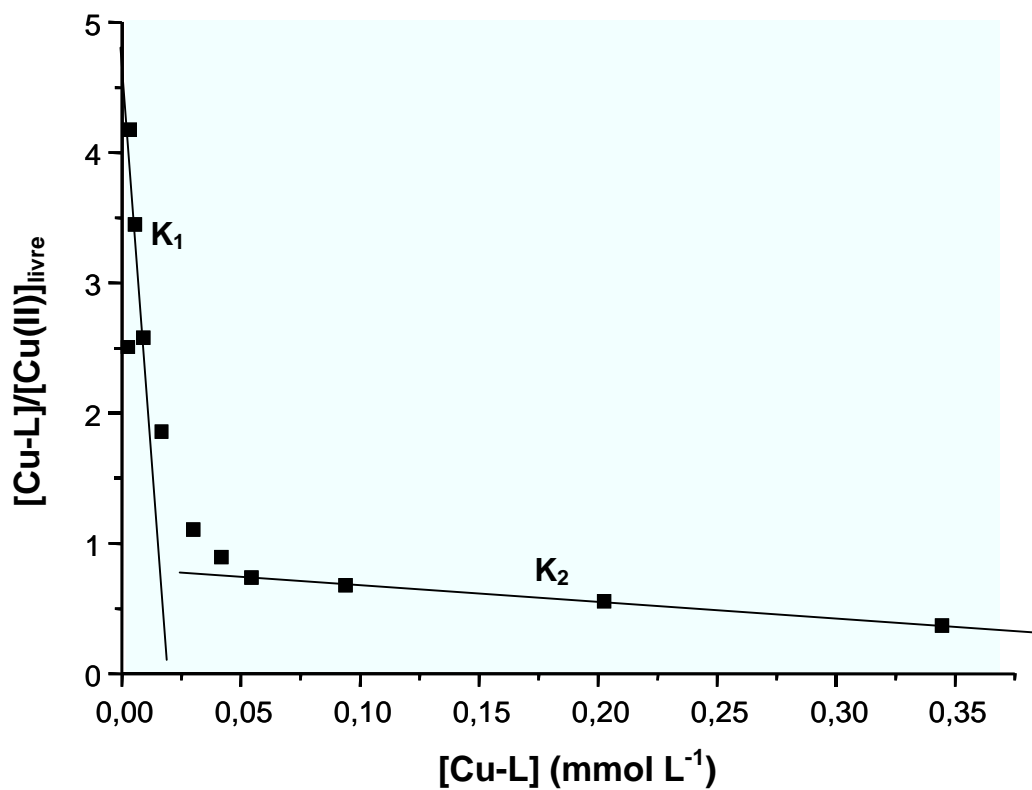


Figura 11 – Gráfico do modelo de Scatchard utilizando a técnica de Ultrafiltração para substâncias húmicas extraídas de amostras de água do Rio Itapanhaú (Bertioga-SP). Condições: 25°C, IR-XAD 8 = 100 mg L⁻¹, pH 5,0 e I = 0,1 mol L⁻¹ NaNO₃

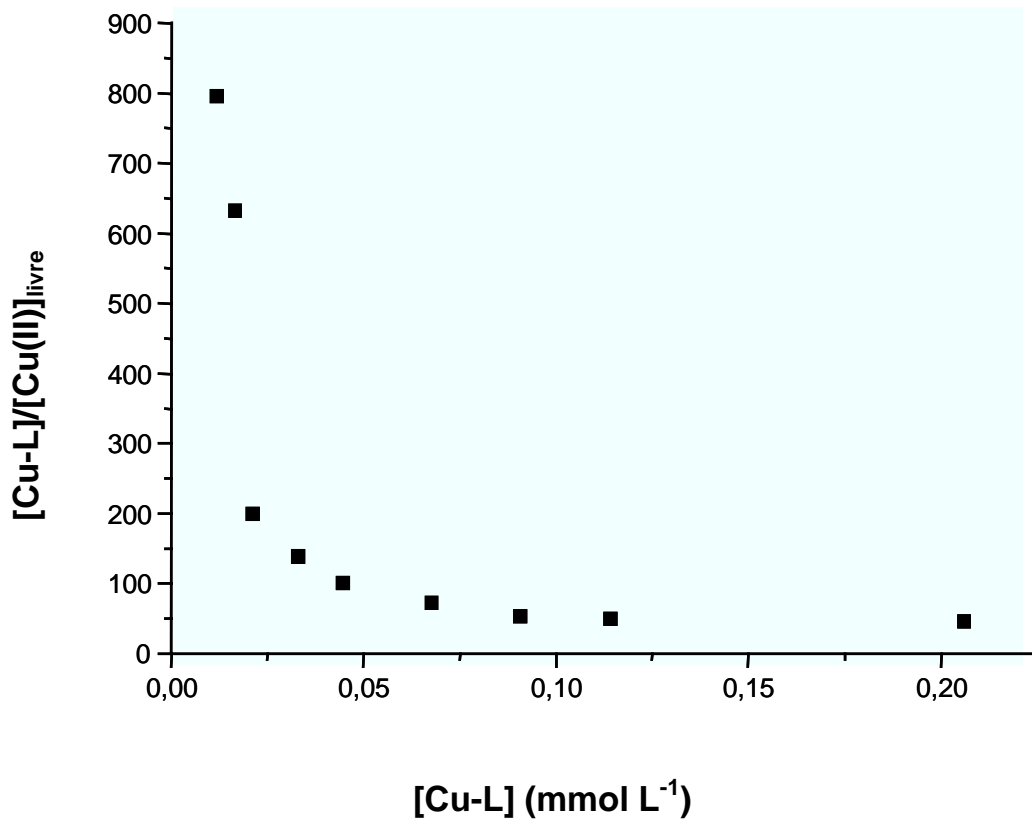


Figura 12 – Gráfico do modelo de Scatchard utilizando a técnica de ultrafiltração tangencial para substâncias húmicas extraídas de amostras de solos do Rio Negro-AM. Condições: 25°C, RNS-1 = 100 mg L⁻¹, pH 5,0 e I = 0,1 mol L⁻¹ NaNO₃

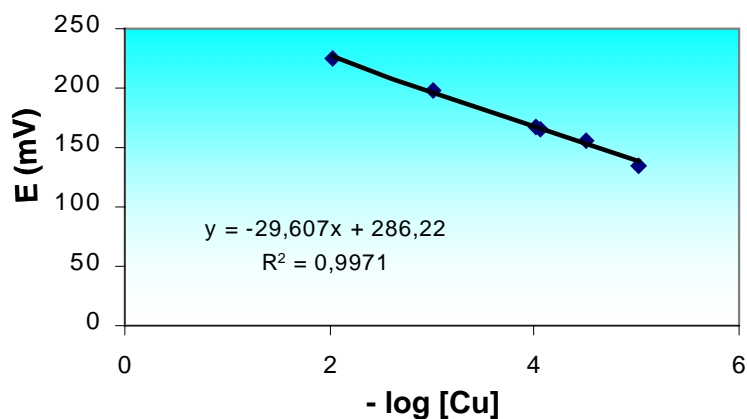


Figura 13 – Curva analítica do eletrodo íon seletivo de Cu(II). Condições: 25°C, I = 0,1 mol L⁻¹ NaNO₃

3.4 - CORRELAÇÃO ENTRE A CAPACIDADE DE COMPLEXAÇÃO (CC) E CARBONO ORGÂNICO TOTAL (COT)

Baseado nos resultados de CC (Tabela 5) e nos valores de COT (Tabela 3) verificou-se a existência de correlação entre os dois parâmetros pelo procedimento de ultrafiltração proposto e eletrodo íon seletivo (Figuras 14 e 15). Correlações 0,933 e 0,832 foram obtidas entre CC e COT pelos dois diferentes métodos utilizados. Resultados semelhantes foram obtidos por SOARES & VASCONCELOS, 1994.

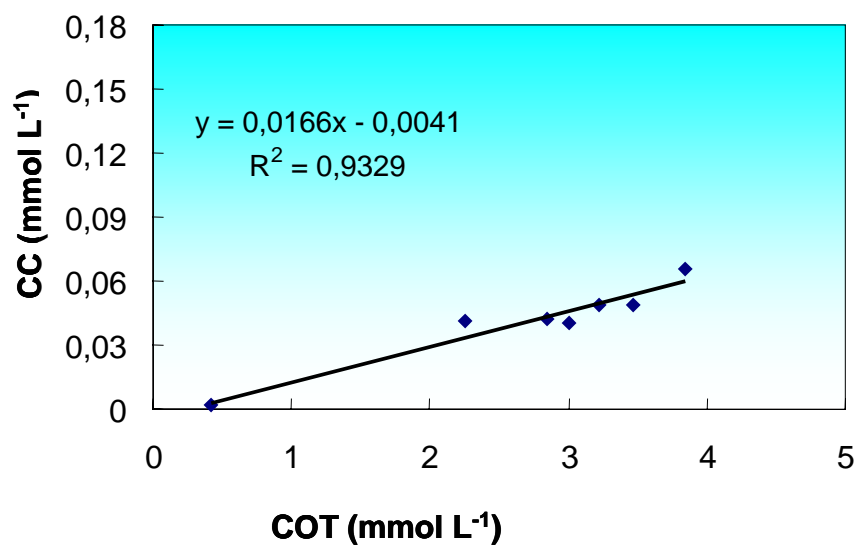


Figura 14 – Correlação entre a capacidade de complexação de Cu(II) determinada por ultrafiltração tangencial em função da concentração de carbono orgânico total nas amostras de matéria orgânica aquática, substâncias húmicas aquáticas e de solos de diferentes regiões brasileiras

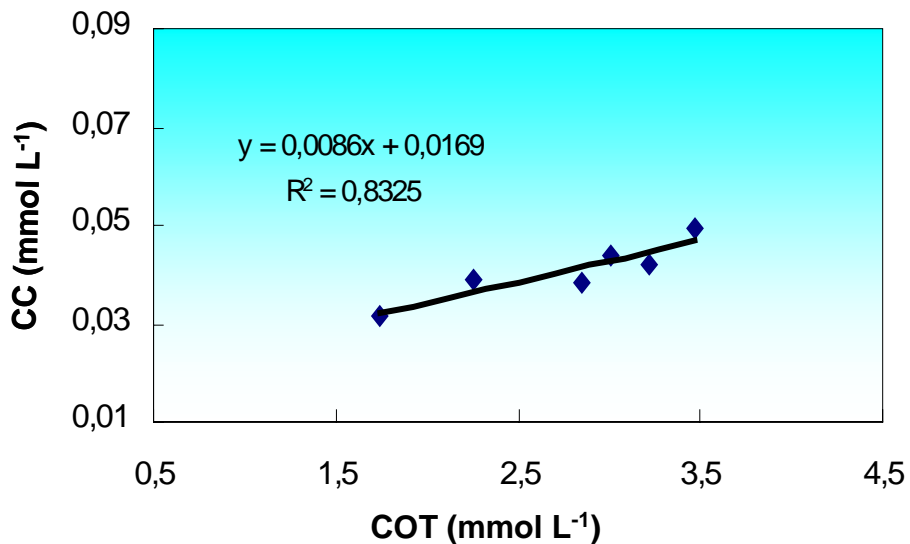


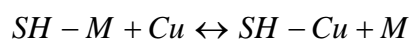
Figura 15 – Correlação entre a capacidade de complexação de Cu(II) determinada por eletrodo íon seletivo em função da concentração de carbono orgânico total nas amostras de matéria orgânica aquática, substâncias húmicas aquáticas e de solos de diferentes regiões brasileiras

3.5 – DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE TROCA POR ULTRAFILTRAÇÃO TANGENCIAL

Nos ambientes naturais várias espécies metálicas estão presentes como formas livres ou complexadas por ligantes orgânicos ou inorgânicos. Logo, durante o processo de complexação, há uma natural competição entre essas espécies pelos sítios ligantes disponíveis. Um melhor entendimento dos fatores os quais influem no destino, transporte e acúmulo de espécies metálicas é importante na avaliação do comportamento de metais em sistemas aquáticos.

Utilizando-se o sistema de ultrafiltração tangencial equipado com membrana de 1 kDa (Figuras 2 e 6) e aplicando um modelo de cálculo, é possível estimar as constantes termodinâmicas de troca entre espécies metálicas complexadas às SH (BURBA *et al.*, 2001; ROCHA *et al.*, 2002). Esse modelo foi empregado no tratamento dos dados para determinação de constantes de troca entre íons Cu(II) adicionados e espécies metálicas originalmente complexadas por substâncias húmicas.

Considerando que no estado de equilíbrio a lei de ação das massas é obedecida, de acordo com a equação 1, é possível estimar os valores das constantes de troca entre as espécies metálicas Ni, Al e Fe por íons Cu(II).



$$K_{troca} = \frac{[SH - Cu][M]}{[SH - M][Cu]} \quad (1)$$

(as cargas são omitidas para simplificação)

As concentrações $[M]$ e $[Cu]$ são determinadas nas alíquotas dos filtrados (cerca de 2 mL). $[SH - M] = [M]_{total} - [M]$. A concentração de metal total, $[M]_{total}$, é a concentração de metal originalmente complexado pelas SH determinada na solução original; $[SH - Cu] = [Cu]_{total} - [Cu]$ e $[Cu]_{total}$ é o somatório das concentrações de íons Cu(II) adicionados em cada intervalo de tempo.

A partir dos dados das Figuras 16 e 17 foram calculados os valores das constantes de troca listados na Tabela 8, os quais caracterizam a troca dos metais Al, Fe e Ni complexados pelas SH e íons Cu(II).

De acordo com a equação 1, o valor da constante de troca é inversamente proporcional à estabilidade do complexo $SH-M$ ($M = Al, Fe, Ni$). Ou seja, altos valores de constante de troca indicam menor estabilidade do complexo $SH-M$, enquanto baixos valores indicam maior estabilidade.

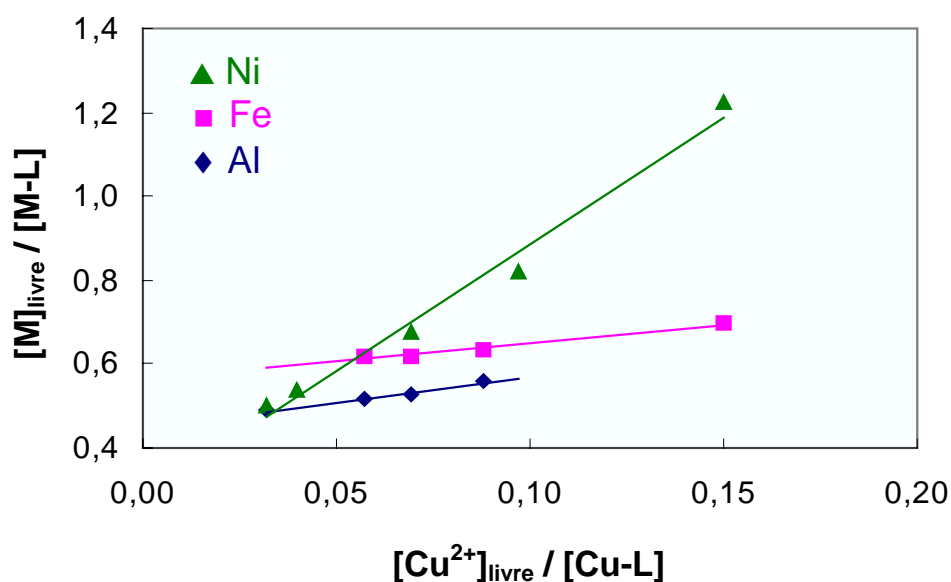


Figura 16 – Equilíbrio de troca entre íons Cu(II) e espécies SH-Metal, após complexação por substâncias húmicas extraídas de amostras de solo do Rio Negro-AM. Condições: 25°C, RNS-2 = 100 mg L⁻¹, pH 5,0 e I = 0,1 mol L⁻¹ NaNO₃

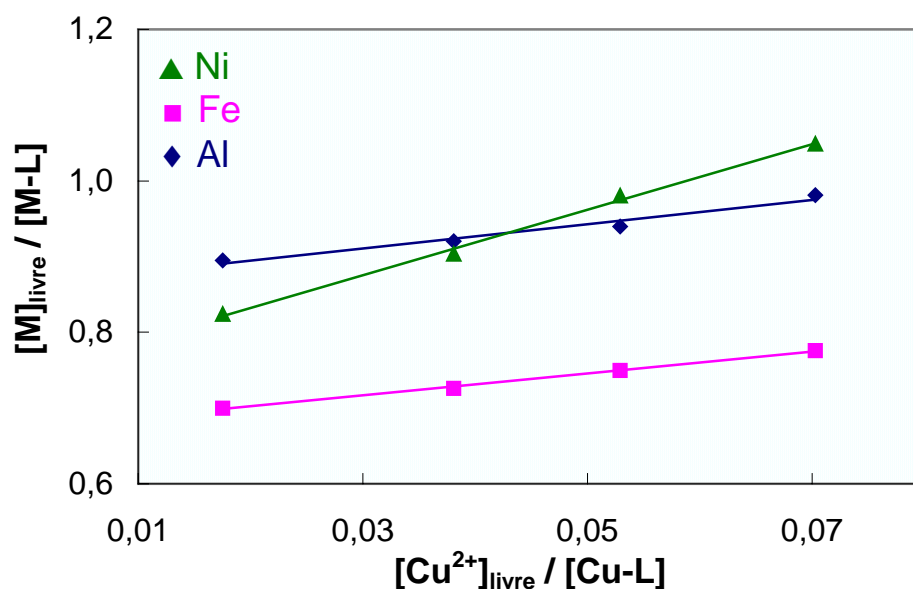


Figura 17 – Equilíbrio de troca entre íons Cu(II) e espécies SH-Metal, após complexação por substâncias húmicas extraídas de amostras de água do Rio Negro-AM. Condições: 25 °C, RN-XAD 8 = 100 mg L⁻¹, pH 5,0 e I = 0,1 mol L⁻¹ NaNO₃

As constantes de troca entre íons Cu(II) e o Fe foram menores que 1 nas amostras RNS-1 e RNS-2, indicando maior estabilidade desses complexos SH-Fe que os complexos SH-Cu. Para alumínio e níquel as constantes de troca foram superiores a 1 em todas as amostras, indicando menor estabilidade dos complexos SH-Al e SH-Ni que os complexos SH-Cu. No caso do níquel ainda, as constantes de troca foram bem superiores às constantes dos íons Al e Fe, indicando serem os complexos SH-Ni os de menor estabilidade, ou seja, o níquel nas amostras é mais facilmente trocado por íons Cu(II) do que alumínio e ferro.

Os resultados das constantes de troca dos complexos, apresentados na Tabela 7, permitem estabelecer a seguinte ordem de K_{troca} para os

metais: $Fe < Al << Ni$. Estes resultados são corroborados por BURBA *et al.* (2001), quando da caracterização “*on site*” de águas naturais por reações de troca com íons Cu(II) e também por MANDAL *et al.* (1999), quando da utilização da resina de troca Chelex-100 no estudo de competição de cobre e de cobalto com íons níquel originalmente complexados por ligantes orgânicos, os quais caracterizaram maior afinidade dos sítios pelos íons cobre adicionados.

Tabela 7 – Constantes de troca entre íons Cu(II) e espécies metálicas (Ni, Al, e Fe) em substâncias húmicas extraídas de amostras de água e de solos coletadas em diferentes regiões brasileiras

Amostras	Alumínio		Ferro		Níquel	
	K_{troca}	$[M]^a$ (mmol L ⁻¹)	K_{troca}	$[M]^a$ (mmol L ⁻¹)	K_{troca}	$[M]$ (mmol L ⁻¹)
IR-XAD 8	1,27	$1,19 \times 10^{-1}$	1,54	$4,73 \times 10^{-1}$	-- ^b	$5,96 \times 10^{-5}$
RN-XAD 8	1,60	$1,29 \times 10^{-1}$	1,45	$8,71 \times 10^{-2}$	4,33	$7,87 \times 10^{-5}$
RNS-1	1,00	$1,84 \times 10^{-1}$	0,70	1,38	-- ^b	$8,14 \times 10^{-5}$
RNS-2	1,24	$1,45 \times 10^{-1}$	0,87	2,51	6,04	$6,80 \times 10^{-5}$

^a Concentração do metal na solução 100 mg L⁻¹, pH 5,0 e I = 0,1 mol L⁻¹ NaNO₃

^b Não determinado

4 - CONCLUSÕES

A caracterização feita pelas razões molares C/N e H/C indicaram maior humificação e aromaticidade da matéria orgânica presente nas amostras aquáticas que nas amostras de solo. Os espectros de infravermelho apresentaram bandas largas, comuns nos espectros de substâncias húmicas, atribuídas às superposições de absorções individuais e similaridades entre os grupos funcionais presentes nas estruturas das substâncias húmicas aquáticas e de solos.

O procedimento de ultrafiltração com fluxo tangencial utilizando membrana polietersulfônica com porosidade 1 kDa proposto neste trabalho é eficaz na diferenciação do metal retido pela matéria orgânica do metal isolado no filtrado, pelo alto coeficiente de retenção do ligante ($R= 0,98$) e baixo valor do coeficiente de retenção do metal ($R= 0,02$).

Os valores das capacidades de complexação da matéria orgânica natural (MON) determinados por ultrafiltração para Cu(II) variaram de 0,17 a 1,99 mmol Cu(II)g⁻¹ COT e os valores das constantes de estabilidade condicional variaram de 2,30 a 4,35 (log K_1) e 1,36 a 2,60 (log K_2)

A validação da metodologia de ultrafiltração em fluxo tangencial foi feita comparando as médias das capacidades de complexação para cobre(II) determinadas por UF, e àquelas obtidas por eletrodo íon seletivo utilizando o teste de student *t*. Os resultados mostraram que não existem diferenças entre os valores das capacidades de complexação determinados por ambos os procedimentos. Assim, o procedimento analítico baseado na ultrafiltração em fluxo tangencial (UF-FT) proposto, constitui-se em uma alternativa viável na determinação de parâmetros de complexação para MOA. Pois, não existe limitação quanto à natureza dos íons metálicos a serem estudados e os limites de determinação para os mesmos são implicitamente dependentes da técnica analítica a ser aplicada.

Os valores das capacidades de complexação das amostras de matéria orgânica aquática ($1,25 \pm 0,07$, $1,18 \pm 0,05$ e $1,81 \pm 0,30$) e das amostras de substâncias húmicas aquáticas ($1,23 \pm 0,11$, $1,12 \pm 0,05$ e $1,44 \pm 0,04$) foram similares, indicando que o procedimento de extração utilizando resina acrílica XAD-8 não modificou significativamente as características complexantes originais das amostras.

Resultados de experimentos de troca entre íons Cu(II) adicionados e espécies metálicas (Ni, Al e Fe) originalmente complexadas por substâncias húmicas, permitiram estabelecer a seguinte ordem decrescente de estabilidade relativa do complexo SH-metal: $Fe < Al < Ni$.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, G.; MASINI, J. C. Utilização de eletrodos potenciométricos de amálgama em estudos de complexação de substâncias húmicas. **Quím. Nova**, v. 22, n. 5, p. 661-665, 1999.

AIKEN, G. R.; THURMAN, E. M.; MALCOLM, R. L.; WALTON, H. F. Comparison of XAD macroporous resins for the concentration of fulvic acid from aqueous solution. **Anal. Chem.**, v. 51, p. 1799-1803, 1979.

AIKEN, G. R. Isolation and concentration techniques for aquatic humic substances. In: AIKEN, G. R.; McKNIGHT, D. M.; WERSHAW, R. L.; MacCARTHY, P. (Ed.). **Humic substances in soil, sediment and water: geochemistry, isolation and characterization**. New York: John Wiley & Sons, 1985. p. 363-385.

AIKEN, G. R. A critical evaluation of the use of macroporous resins for the isolation of aquatic humic substances. In: FRIMMEL, F. H.; CHRISTMAN, R. F. (Ed.). **Humic substances and their role in the environment**. New York: John Wiley & Sons, 1988. p. 15-27.

ALMEIDA, R. N. H. M. **Desenvolvimento de metodologia para extração de matéria orgânica aquática**. 2002. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)- Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

ANTONELLI, M. L.; CALACE, N.; CENTIOLI, D.; PETRONIO, B. M.; PIETROLETTI, M. Complexing capacity of different molecular weight fractions of sedimentary humic substances. **Analytical Letters**, v. 34, p. 989-1002, 2001.

ARAÚJO, A. B.; ROSA, A. H.; ROCHA, J. C.; ROMÃO, L. P. C. Distribuição de metais e determinação da constante de troca de frações húmicas aquáticas de diferentes tamanhos moleculares. **Quím. Nova**, v. 25, p. 1103-1107, 2002.

ASTER, B.; BURBA, P.; BROEKAERT, J. A. C. Analytical fractionation of aquatic humic substances and their metal species by means of multistage ultrafiltration. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 354, p. 722-728, 1996.

BISINOTI, M. C. **Produção de Hg orgânico em sedimentos tropicais a partir do Hg(0): experimentos em microcosmos.** 2002. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) Departamento de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

BOND, A. M. **Modern polarographic methods in analytical chemistry.** New York: Marcel Dekker , 1980. p. 435-472.

BUFFLE, J.; GRETER, F. L.; HAERDI, W. Measurement of complexation properties of humic and fulvic acids in natural waters with lead and copper ion-selective electrodes. **Anal. Chem.**, v. 49, n. 2, p. 216-221, 1977.

BUFFLE, J.; DELADOEY, P.; GRETER, F. L.; HAERDI, W. Study of the complex formation of copper(II) by humic and fulvic substances. **Anal. Chim. Acta**, v.116, p. 255-274, 1980.

BUFFLE, J. Natural organic matter and metal-organic interactions in aquatic systems In: **Metal ions in biological systems: circulation of metals in the environment.** New York : Marcel Dekker, 1984. v. 18, p. 165-221.

BUFFLE, J.; STAUB, C. Measurement of complexation properties of metal ions in natural conditions by ultrafiltration: measurements of equilibrium constants for complexation of zinc by synthetic and natural ligands. **Anal. Chem.**, v. 56, p. 2837-2842, p. 1984.

BUFFLE, J. **Complexation reactions in aquatic systems: an analytical approach.** New York: Ellis Horwood, 1990. 692 p.

BURBA, P.; ROCHA, J. C.; KLOCKOW, D. Labile complexes of trace metals in aquatic humic substances investigations by means of ion exchange-based flow procedure. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 349, p. 800-807, 1994.

BURBA, P.; SHKINEV, V.; SPIVAKOV, B. Y. On-line fractionation and characterization of aquatic humic substances by means of sequential-stage ultrafiltration. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 351, p. 74-82, 1995.

BURBA, P.; ASTER, B.; NIFANT'EVA, T.; SHKINEV, V.; SPIVAKOV, B. Y. Membrane filtration studies of aquatic humic substances and their metal species: a concise overview: part 1- Analytical fractionation by means of sequential-stage ultrafiltration. **Talanta**, v. 45, p. 977-988, 1998.

BURBA, P.; VAN Den BERGH, J.; KLOCKOW, D. On-site characterization of humic-rich hydrocolloids and their metal loads by means of mobile size-fractionation and exchange techniques. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 371, p. 660-669, 2001.

DAVIES, G.; GHABBOUR, E. A.; STEELINK, C. Humic acids: marvelous products of soil chemistry. **J. Chem. Ed.**, v. 78, n. 12, 2001.

EINAX, J.; KUNZE, C. Complexation capacity of aquatic systems in dependence on different ligands and heavy metals- electroanalytical investigations and statistical evaluation. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 354, p. 895-899, 1996.

FLORENCE, T. M. Electrochemical approaches to trace element speciation in waters: a review. **Analyst**, v. 111, p. 489-504, 1986.

FLORENCE, T. M.; MORRISON, G. M.; STAUBER, J. L. Determination of trace element speciation and the role of speciation in aquatic toxicity. **Sci. Total Environ.**, v. 125, p. 1-13, 1992.

FRIMMEL, F. H. Complexation of paramagnetic metal ions by aquatic fulvic acids. In: BROEKAERT, J. A. C.; GÜCER, S.; ADAMS, F. (Ed.). **Metal speciation in the environment**. Berlim: Springer, 1990. p. 57-69.

FRIMMEL, F. H. Investigations of metal complexation by polarography and fluorescence spectroscopy. In: MATTHESS, G.; FRIMMEL, F. H.; HIRSCH, P.; SCHULZ, H. S.; USDOWSKI, E. (Ed.). **Progress in hydrogeochemistry**. Berlim: Springer-Verlag, 1992. p. 61-65.

FRIMMEL, F. H.; ABBT-BRAUN, G. Comparison of aquatic humic substances of different origin. In: ALLARD, A.; BOREN, H.; GRIMVALL, A. (Ed.). **Humic substances in the aquatic and terrestrial environment**. Berlim: Springer, 1991. p. 37-46.

GJESSING, E. T. Ultrafiltration of aquatic humus. **Environ. Sci. Technol.**, v. 4, p. 437-438, 1970.

HART, B. Trace metal complexing capacity of natural waters: a review. **Environ. Technol. Lett.**, v. 2, p. 95-110, 1981.

HAYES, M. H. B. Extraction of humic substances from soil. In: AIKEN, G. R.; McKNIGHT, D. M.; WERSHAW, R. L.; MacCARTHY, P. (Ed.). **Humic substances in soil, sediment and water: geochemistry, isolation and characterization**. New York: John Wiley & Sons, 1985. p. 330-334.

HAYES, M. H. B. Humic substances: progress towards more realistic concepts of structures. In: DAVIES, G.; GHABBOUR, E. A. (Ed.). **Humic substances: structures, properties and uses**. Cornwall: MPG Books, 1998. p. 259.

HOLT, M. S. Sources of chemical contaminants and routes into the freshwater environment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. S21-S27, 2000.

KILDUFF, J.; WEBER JR., W. J. Transport and separation of organic macromolecules in ultrafiltration processes. **Environ. Sci. Technol.**, v. 26, p. 569-577, 1992.

LARA, R. J.; THOMAS, D. N. Isolation of marine dissolved organic matter: evaluation of sequential combinations of XAD resins 2, 4 and 7. **Anal. Chem.**, v. 66, p. 2417-2421, 1994.

LEENHEER, J. A. Chemistry of dissolved organic matter in rivers, lakes, and reservoirs. In: BAKER, L. A. (Ed.). **Environmental chemistry of lakes and reservoirs**. Washington: American Chemical Society, 1994. p. 196-221.

LU, Y.; ALLEN, E. H. Characterization of copper complexation with natural dissolved organic matter (DOM)-link to acidic moieties of DOM and competition by Ca and Mg. **Water Res.**, n. 36, p. 5083-5101, 2002.

LUND, W. The complexation of metal ions by humic substances in natural waters. In: BROEKAERT, J. A. C.; GÜÇER, S.; ADAMS, F. (Ed.). **Metal speciation in the environment**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. p. 45-55.

MACALADY, D. L.; RANVILLE, J. F. The chemistry and geochemistry of natural organic matter (NOM). In: MACALADY, D. L. (Ed.). **Perspectives in environmental chemistry**. New York: Oxford University, 1998. p. 95-137.

MALCOLM, R. L. The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environments. **Anal. Chim. Acta**, v. 232, p. 19-30, 1990.

MANDAL, R.; SEKALY, A. I. R.; MURIMBOH, J.; HASSAN, N. M.; CHAKRABARTI, C. L.; BACK, M. H.; GRÉGOIRE, D. C.; SCHROEDER, W. H. Effect of the competition of copper and cobalt on the lability of Ni(II)-organic ligand complexes, Part II: in freshwaters (Rideau River surface waters). **Anal. Chim. Acta**, v. 395, p. 323-334, 1999.

MATHUTHU, A. S.; EPHRAIM, J. H. Calcium binding by fulvic acids studies by an ion selective electrode and an ultrafiltration method. **Talanta**, v. 40, n. 4, p. 521-526, 1993.

MILLER, J. C.; MILLER, J. N. Statistics for analytical chemistry. 2nd ed. New York: Ellis Horwood, 1989. p. 53-80.

MORRISON, G. M. P. Trace element speciation and its relationship to bioavailability and toxicity in natural waters. In: BATLEY, G. E. (Ed.). **Trace element speciation: analytical methods and problems**. Florida: CRC Press, 2000. p. 25-41.

MORRISON, G. M. P.; FLORENSE, T. M. Comparison of physicochemical speciation procedures with metal toxicity to chlorella-pyrenoidosa-Copper complexation capacity. **Electroanalysis**, v. 1, n. 2, p. 107-112, 1989.

NEUBECKER, T. A.; ALLEN, H. E. The measurement of complexation capacity and conditional stability constants for ligands in natural waters. **Water Res.**, v. 17, p. 1-14, 1983.

NIFANT'EVA, T. I.; SHKINEV, V. M.; SPIVAKOV, B. Y.; BURBA, P. Membrane filtration studies of aquatic humic substances and their metal species: a concise overview. Part 2. Evaluation of conditional stability constants by using ultrafiltration. **Talanta**, v. 48, p.257-267,1999.

NURNBERG, H. W. Voltammetric trace analysis in ecological chemistry of toxic metals. **Pure & Appl. Chem.**, v. 54, n. 4, p. 853-878, 1982.

PARDO, R.; BARRADO, E.; VEJA, M.; DEBAN, L.; TASCÓN, M. L. Voltammetric complexation capacity of waters of the Pisuerga river. **Water Res.**, v. 28, n. 10, p. 2139-2146, 1990.

PARMEGGIANI, A. C.; MASINI, J. C. Evaluating scatchard and differential equilibrium functions to study the binding properties of Cu(II) to the surface of mixed species of lyophilized *Spirulina* (Cyanobacteria). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n. 3, p. 416-424, 2003.

PERDUE, E. M. Chemical composition, structure, and metal binding properties. In: HESSEN, D. O.; TRANVIK, L. J. (Ed.). **Aquatic humic substances/Ecology and biogeochemistry**. New York: Spring-Verlag, 1998. p. 41-61.

PICCOLO, A.; NARDI, S.; CONCHERI, G. Micelle-like conformation of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. **Chemosphere**, v. 33, p. 595-602, 1996.

POPPI, N. R.; TALAMONI, J. Estudo dos ácidos húmico e fúlvico, extraídos de solos, por espectroscopia de infravermelho. **Química Nova**, n. 15, v. 4, p. 281-285, 1992.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; FURLAN, M. An alternative methodology for the extraction of humic substances from organic soils. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 9, p. 51-56, 1998.

ROCHA, J. C.; SARGENTINI Jr., E.; TOSCANO, I. A. S.; ROSA, A. H.; BURBA, P. Multi-method study on aquatic humic substances from the "Rio Negro" – Amazonas state/Brazil. Emphasis on molecular-size classification of their metal contents. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 10, n. 3, p. 169-175, 1999.

ROCHA, J. C.; SARGENTINI Jr., E.; ZARA, L. F.; ROSA, A. H.; SANTOS, A.; BURBA, P. Reduction of mercury(II) by tropical river humic substances (Rio Negro)- a possible process of the mercury cycle in Brazil. **Talanta**, v. 53, p. 551-559, 2000a.

ROCHA, J. C.; SARGENTINI Jr., E.; ZARA, L. F.; ROSA, A. H.; BURBA, P. Substâncias húmicas: sistema de fracionamento sequencial por ultrafiltração com base no tamanho molecular. **Quím. Nova**, v. 23, p. 410-412, 2000b.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; VAN Den BERGH, J.; BURBA, P. Characterization of humic-rich hydrocolloids and their metal species by means of competing ligand and metal exchange-an on site approach. **J. Environ. Monit.**, v. 4, p. 799-802, 2002.

ROMÃO, L. P. C.; ARAÚJO, A. B.; ROSA, A. H.; ROCHA, J. C. Redução de crômio hexavalente por substâncias húmicas aquáticas imobilizadas em aminopropil sílica. **Ecl. Quím.**, v. 27, p. 383-391, 2002.

ROSA, A. H.; VICENTE, A. A.; ROCHA, J. C.; TREVISAN, H. C. A new application of humic substances: activation of supports fo invertase immobilization. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 368, p. 730-733, 2000.

ROSA, A. H. **Substâncias húmicas: extração, caracterização, novas perspectivas e aplicações.** 2001. Tese (Doutorado em Química Analítica), Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

RUZIC, I. Theoretical aspects of the direct titration of natural waters and its information yield for trace metal speciation. **Anal. Chem. Acta**, v. 140, p. 99-113, 1982.

SAAR, R. A.; WEBER, J. H. Fulvic acid: modifier of metal-ion chemistry. **Environ. Sci. Technol.**, v. 16, n. 9, p. 510A-517A, 1982.

SCATCHARD, G.; COLEMAN, J. S.; SHEN, A. L. Physical chemistry of protein solutions. VII. The binding of some small anions to serum albumin. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 79, p. 12-20, 1957.

SILVA, S. T. **Competição entre os processos de complexação e adsorção de íons Cu^{2+} e Cd^{2+} do rio Atibaia**. 1996. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)- Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 1996.

SOARES, H. M. V. M.; VASCONCELOS, M. T. S. D. Study of the lability of copper(II)-fulvic acid complexes by ion selective electrodes and potentiometric stripping analysis. **Anal. Chim. Acta**, v. 293, p. 261-270, 1994.

SPOSITO, G. Trace metals in contaminated waters. **Environ. Sci. Technol.**, v. 15, n. 4, p. 396-403, 1981.

STAUB, C.; BUFFLE, J.; HAERDI, W. Measurement of complexation properties of metal ions in natural conditions by ultrafiltration: influence of various factors on the retention of metals and ligands by neutral and negatively charged membranes. **Anal. Chem.**, v. 56, p. 2843-2849, 1984.

STEVENSON, F. J.; COLE, M. A. **Cycles of soil. Carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur, micronutrients**. New York: John Wiley & Sons, 1985. p. 1-45.

STEVENSON, F. J. **Humus chemistry: genesis, composition and reaction**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1994.

SUFFET, I. H.; MacCARTHY, P. **Aquatic humic substances: influence on fate and treatment of pollutants**. Washington: American Chemical Society, 1989. 838 p.

SWIFT, R. S. Organic matter characterization. In: SPARKS, D. L. (Ed.). **Methods of soil analysis: chemical methods**. Madison: SSSA, 1996. p. 1011-1069.

TANI, Y.; SOMA, M.; HARSANYI, E. G.; UMEZAWA, Y. Effect of dissolved oxygen on the response of Cu(II) ion-selective electrodes in metal buffer solutions. **Anal. Chim. Acta**, v. 395, p. 53-63, 1999.

THURMAN, E. M. **Organic geochemistry of natural waters**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1985a. 488 p.

THURMAN, E. M. Humic substances in groundwater. In: AIKEN, G. R.; McKNIGHT, D. M.; WERSHAW, R. L.; MacCARTHY, P. (Ed.). **Humic substances in soil, sediment and water: geochemistry, isolation and characterization**. New York: John Wiley & Sons, 1985b. p. 87-104.

THURMAN, E. M.; MALCOLM, R. L. Preparative isolation of aquatic substances. **Environ. Sci. Technol.**, v. 15, p. 463-466, 1981.

TOWN, R. M.; POWELL, H. K. J. Elimination of adsorption effects in gel permeation chromatographic of humic substances. **Anal. Chim. Acta**, v. 256, p. 81-86, 1992.

TOWN, R. M.; POWELL, H. K. J. Ion-selective electrode potentiometric studies on the complexation of copper(II) by soil-derived humic and fulvic acids. **Anal. Chim. Acta**, v. 279, p. 221-233, 1993.

TSCHOPEL, P.; KOTZ, I.; SHULZ, W.; VEBER, M.; TOLG, G. Zur Ursache und Vermeidung systematischer Fehler bei Elementbestimmungen in wässrigen Lösungen im ng/ml und pg/ml-Bereich. **Fresenius Z. Anal. Chem.**, v. 302, p. 1-14, 1980.

TUSCHALL JR., J. R.; BREZONIK, P. L. Application of continuous-flow ultrafiltration and competing ligand/differential spectrophotometry for measurement of heavy metal complexation by dissolved organic matter. **Anal. Chim. Acta**, v. 149, p. 47-58, 1983.

VAN Den BERGH, J.; JAKUBOWSKI, B.; BURBA, P. Investigations on the conditional kinetic and thermodynamic stability of aquatic humic substance-metal complexes by means of EDTA exchange, ultrafiltration and atomic spectrometry. **Talanta**, v. 55, p. 587-593, 2001.

VANLOON, G. W.; DUFFY, S. J. **Environmental chemistry a global perspective**. New York: Oxford University, 2000. p. 258-281.

ZHANG, Y. J.; BRYAN, N. D.; LIVENS, F. R.; JONES, M. N. Complexing of metal ions by humic substances. In: GAFFNEY, J. S.; MARLEY, N. A. (Ed.). **Humic and fulvic**: isolation, structure and environmental role. Washington: American Chemical Society, 1996. p. 194-206.

ZIECHMANN, W.; HUBNER, M.; JONASSEN, K. E. N.; BATSBERG, W.; NIELSEN, T.; HAHNER, S.; HANSEN, P. E.; GUDMUNDSON, A. L. Humic substances and humification. In: GHABBOUR, E. A.; DAVIES, G. (Ed.). **Humic substances** : versatile components of plants and water. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000. p. 09-21.