



SUBSTÂNCIAS HÚMICAS: EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, NOVAS PERSPECTIVAS E APLICAÇÕES

André Henrique Rosa

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
2001

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Julio Cesar Rocha

Instituto de Química da UNESP – Araraquara-SP

Prof. Dr. Ladislau Martin-Neto

EMBRAPA/CNPDI – São Carlos-SP

Prof. Dr. Nivaldo Baccan

Instituto de Química da UNICAMP – Campinas-SP

Prof. Dr. Mário Miyazawa

Instituto Agronômico do Paraná – Londrina-PR

Prof. Dr. Nilso Barelli

Instituto de Química da UNESP – Araraquara-SP

DADOS CURRICULARES

1. DADOS PESSOAIS

- 1.1 Nome: André Henrique Rosa
- 1.2 Data de nascimento: 05/12/1972
- 1.3 Nacionalidade: brasileira
- 1.4 Naturalidade: Araraquara
- 1.5 Estado civil: casado
- 1.6 Filiação: Demirço de Souza Rosa e Tercília de Souza Rosa
- 1.7 Documento de identidade: 20.663.220-4 SSP/SP
- 1.8 Cadastro de Pessoa Física : 183219478 75
- 1.9 End. residencial: Avenida Djalma Dutra, nº 980, Carmo, Araraquara-SP, CEP 14800-400, Tel. (016) 222-4398.
- 1.10 End. profissional: Instituto de Química de Araraquara - UNESP - Rua Prof. Francisco Degni, s/nº, Quitandinha, C.P. 355, Araraquara-SP - CEP 14800-900, Tel. (016) 201-6736 - Fax (016) 222 7932.
E-mail: andrrosa@ posgrad.iq.unesp.br ou andrrosa@bol.com.br

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1 Doutor em Química pelo Instituto de Química de Araraquara (UNESP), Araraquara - SP (03/1998 – 12/2001). Estágio em Maio/Junho de 2001 no *Institute of Spectrochemistry and Applied Spectroscopy*, Dortmund-Alemanha.

Área de concentração: Química Analítica.

Sub-área: Química Ambiental

Título da Tese: “Substâncias húmicas: extração, caracterização, novas perspectivas e aplicações” (Projeto financiado pela FAPESP, Proc. nº 97/10673-8).

Orientadores: Prof. Dr. Julio Cesar Rocha (IQ-Ar-UNESP) e Dr. Peter Burba (ISAS-Dortmund, Alemanha)

2.2 Mestre em Química pelo Instituto de Química de Araraquara (UNESP), Araraquara - SP (02/1996 –02/1998).

Área de concentração: Química Analítica.

Sub-área: Química Ambiental

Título da Dissertação : “Metodologia para extração de substâncias húmicas de solos”. Conceito: *Aprovado com “Distinção”* (Projeto financiado pela FAPESP, Proc. nº 95/04682-9).

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Rocha (IQ-Ar-UNESP)

2.3 Bacharel em Química pelo Instituto de Química da UNESP, Araraquara-SP (1992 -1995).

2.4 Técnico em Química pelo Colégio Duque de Caxias, Araraquara-SP (1988 - 1991).

3. PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

3.1 Capítulos de Livros

3.1.1 ROCHA, J.C.; ROSA, A.H.; BURBA, P.; Substâncias húmicas aquáticas: extração, fracionamento e interação com íons metálicos. In: MARTIN-NETO, L.; SÁ MENDONÇA, E. (Eds.) *Matéria orgânica e o ambiente*. Viçosa, Revista Brasileira de Ciência do Solo, 2001 (in press).

3.1.2 ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; SARGENTINI Jr, É.; A flow procedutre for extraction and fractionation of the humic substances from soils. In: SWIFT, R.; SPARK, K.M. (Eds.) *Understanding and managing organic matter in soils, sediments, and waters*. New York, International Humic Substances Society, 2001, pp.41-46.

3.2 Periódicos Científicos

3.2.1 ARAÚJO, A.B.; ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; ROMÃO, L.P.C.; Distribuição de metais e caracterização de constantes de troca entre espécies metálicas e frações húmicas aquáticas de diferentes tamanhos moleculares. *Química Nova*, 2001 (submetido).

3.2.2 ROSA, A.H.; BURBA, P.; ROCHA, J.C.; Extraction and exchange behavior of metal species in therapeutically applied peat characterized by competitive extractants. *Talanta*, 2001 (submetido).

3.2.3 SANTOS, A.; ROCHA, J.C.; REZENDE, M.O.O.; ROSA, A.H.; SARGENTINI Jr, É; Heavy metals characterization in the Anhumas surface water collection reservoir – Araraquara-São Paulo State-Brazil. Part I: Distribution profile and avaiability of Cr, Ni, Cu, Cd and Pb in different sediments. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 2001 (submetido).

3.2.4 SANTOS, A.; ROCHA, J.C.; REZENDE, M.O.O.; ROSA, A.H.; ZARA, L.F.; Caracterização de metais pesados no reservatório de captação de água superficial Anhumas – Araraquara-SP. Parte II: Distribuição de Cr, Ni, Cu, Cd e

Pb em frações húmicas extraídas de água e de sedimentos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 2001 (submetido).

3.2.5 ROSA, A.H.; ROCHA, RIBEIRO, C.A.; OLIVEIRA, L.C.; GUERREIRO, C.T.; Influence of alkaline extraction in characteristics of humic substances from soils. *Thermochimica Acta*, 2001 (submetido).

3.2.6 ZARA, L.F.; ROCHA, J.C.; MILANI, M.R.; ROSA, A.H.; SANTOS, A.; GOMES NETO, J.A.; A flow-injection-ICP system sequential multielemental analysis and mercury(II) preconcentration step. *Analytica Chimica Acta*, 2001 (submetido).

3.2.7 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 – a novel on-site approach. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2001 (submetido).

3.2.8 ROCHA, J.C.; SARGENTINI Jr, É.; ZARA, L.F.; ROSA, A.H.; SANTOS, A.; BURBA, P.; Reduction of mercury(II) by tropical river humic substances (Rio Negro). Part II - Influence of structural features (molecular size, aromaticity, phenolic groups, organically bound sulfur). *Talanta*, 2001 (submetido).

3.2.9 SARGENTINI Jr, É.; ROCHA, J.C.; ROSA, A.H.; ZARA, L.F.; SANTOS, A.; Substâncias húmicas aquáticas: fracionamento molecular e caracterização de rearranjos internos após complexação com íons metálicos. *Química Nova*, v.24(3), p. 339-344, 2001.

3.2.10 ROSA, A.H.; VICENTE, A.A.; ROCHA, J.C.; TREVISAN, H.C.; A new application of humic substances: activation of supports for invertase immobilization. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v.368, p.730-733, 2000.

3.2.11 SARGENTINI Jr, É.; ZARA, L.F.; ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; BURBA, P.; Mercury(II) reduction by aquatic humic substances from “Rio Negro” - Amazonas State/Brazil. *Talanta*, v. 53, p. 551-559, 2000.

3.2.12 ROSA, A.H. ; ROCHA, J.C. ; FURLAN, M.; Substâncias húmicas de turfa: estudo dos parâmetros que influenciam na extração. *Química Nova*, v.23 (4), p. 472-476, 2000.

3.2.13 ROCHA, J.C.; ZARA, L.F.; ROSA, A.H.; SARGENTINI Jr, É.; BURBA, P.; Substâncias húmicas: sistema de fracionamento sequencial por ultrafiltração com base no tamanho molecular. *Química Nova*, v.23 (3), p. 410-412, 2000.

3.2.14 ROCHA, J.C.; SARGENTINI Jr, É.; TOSCANO I.A.S.; ROSA, A.H.; BURBA, P.; Multimethodical study on aquatic humic substances from “Rio Negro” - Amazonas State/Brazil with emphasis on molecular-size classification of their metal complexes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.10, p. 169-175, 1999.

3.2.15 ROCHA, J.C.; ROSA, A.H.; FURLAN, M.; An alternative methodology for extraction of humic substances from soils. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 9, p. 51-56, 1998.

3.2.16 ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; FURLAN, M.; ZARA, L.F.; SANTOS, A.; Oxidação das substâncias húmicas de turfa durante extração alcalina. Estudo espectroscópico na região do infravermelho e do visível. *Anais da Associação Brasileira de Química*, v. 47(1), p. 25-28, 1998.

3.3 Trabalhos completos publicados em Anais de Congresso

3.3.1 SANTOS, A.; CARVALHO NETO, F.S.; ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; Caracterização e comparação de substâncias húmicas extraídas de solo e de biocompostos de diferentes origens. In: *FERTBIO 2000*, Santa Maria, 2000.

3.3.2 ROCHA, J.C.; SARGENTINI Jr, É.; ZARA, L.F.; ROSA, A.H.; SANTOS, A.; BURBA, P.; Mercury (II) reduction by aquatic humic substances from "Rio Negro" - Amazonas State/Brazil. In: *ROSE II (Refractory Organic Species Environmental)*. Karlsruhe-Alemanha, Agosto, p. 226, 2000 (ISBN:3-00-006539-3).

3.3.3 SANTOS, A.; ROSA, A.H.; RESENDE, M.O.O.; ROCHA, J.C.; Distribuição de metais em materiais suspensos e sedimentos de reservatório de captação de água superficial. In: *Anais do 2º Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas*. São Carlos: p. 122, 1997 (ISBN: 85-86463-02-7).

3.3.4 ROSA, A.H.; ROCHA, J.C. ; Sistema em fluxo contínuo para extração e fracionamento de substâncias húmicas de solos. In: *Anais do 2º Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas*. São Carlos: p. 127, 1997 (ISBN: 85-86463-02-7).

3.3.5 ROSA, A.H.; SANTOS, A.; OLIVEIRA, S.C.; ROCHA, J.C.; FURLAN, M.; Estudo dos parâmetros que influenciam na extração de substâncias húmicas de solos - Parte II. In: *Anais do 2º Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas*. São Carlos: p.128, 1997 (ISBN: 85-86463-02-7).

4. PATENTE

4.1 ROSA, A.H.; VICENTE, A.A.; ROCHA, J.C.; TREVISAN, H.C.; Utilização de substâncias húmicas na preparação de um novo suporte para imobilização da enzima invertase, 2001 (Processo sob julgamento).

5. PREMIAÇÕES

5.1 O trabalho "A new application of humic substances: activation of supports for invertase immobilization" foi escolhido como um dos dez melhores trabalhos do mundo na área de substâncias húmicas em 30/07/2000. Com esse trabalho e análise do Curriculum Vitae, André Henrique Rosa foi premiado com uma Travel Bursary no valor de U\$ 1,100.00 para participar do 10th International Meeting of IHSS realizado de 24-28/07/2000 em Toulouse, França.

5.2 Recebeu prêmio com o trabalho "Metodologia de extração/purificação de materiais húmicos de solos utilizando-se hidróxido de potássio", como um dos melhores painéis apresentados na sessão de Química Ambiental da XVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química realizada no dia 31/05/1995.

6. CONGRESSOS CIENTÍFICOS

6.1 Apresentação de Trabalhos/Participação em Congressos Internacionais

6.1.1 ROCHA, J.C.; SARGENTINI Jr, É.; ZARA, L.F.; ROSA, A.H.; BURBA, P.; Mercury(II) reduction by aquatic humic substances from "Rio Negro" - Amazonas State/Brazil. In: *ROSE II (Refractory Organic Species Environmental)*. Abstract. Karlsruhe-Alemanha, Agosto, p. 226, 2000.

6.1.2 ROSA, A.H.; VICENTE, A.A.; ROCHA, J.C.; TREVISAN, H.C.; A new application of humic substances: activation of supports for invertase immobilization. In: *10th International Meeting of IHSS*. Abstract. Toulouse-França, Julho, p. 987, 2000.

6.1.3 ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; SARGENTINI Jr, É.; A flow procedure for extraction and fractionation of humic substances from soils. In: *9th International Meeting of IHSS*. Abstract. Adelaide - Austrália, Setembro, p.195, 1998.

6.2 Apresentação de Trabalhos/Participação em Congressos Nacionais

6.2.1 ARAÚJO, A.B.; ROSA, A.H.; ROMÃO, L.P.C.; ROCHA, J.C.; Redução de crômio hexavalente por substâncias húmicas aquáticas imobilizadas em aminopropil sílica. In: *XIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química*, Resumos, Araraquara, p. 00, 2001.

6.2.2 ARAÚJO, A.B.; ROSA, A.H.; ROMÃO, L.P.C.; ROCHA, J.C.; Caracterização da complexação de espécies metálicas por frações húmicas de diferentes tamanhos moleculares. In: *IV Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas*. Resumos, Viçosa, p. 00, 2001.

6.2.3 ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; BURBA, P.; Extração e caracterização de espécies metálicas em turfas medicinais. Contribuição ao entendimento do mecanismo terapêutico. In: *IV Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas*. Resumos, Viçosa, p. 00, 2001.

6.2.4 ROCHA, J.C.; ROSA, A.H.; BERGH, J.V.; BURBA, P.; Interação entre substâncias orgânicas refratárias e espécies metálicas: caracterização on-site. In: *IV Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas*. Resumos, Viçosa, p. 00, 2001.

6.2.5 ZARA, L.F.; ROSA, A.H.; SARGENTINI Jr., E.; SANTOS, A.; ROCHA, J.C.; Redução de mercúrio por substâncias húmicas aquáticas: caracterização dos sítios complexantes e redutores em diferentes tamanhos moleculares. In: *IV Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas*. Resumos, Viçosa, p. 00, 2001.

6.2.6 ROCHA, J.C.; ROSA, A.H.; BERGH, J.V.; BURBA, P.; Interação entre substâncias orgânicas refratárias e espécies metálicas: caracterização on-site. In: *XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Resumos, Poços de Caldas, AB-062, 2001.

6.2.7 ZARA, L.F.; SANTOS, A.; ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; GOMES NETO, J.A.; Sistema de análise em fluxo sequencial multielementar e geração de hidreto acoplado a ICP-AES. In: *XI Encontro Nacional de Química Analítica*. Resumos, Campinas, p. 00, 2001.

6.2.8 SANTOS, A.; ROMÃO, L.P.C.; ROSA, A.H.; SARGENTINI Jr., É.; ROCHA, J.C.; REZENDE, M.O.O.; Competição de ligantes por espécies metálicas: substâncias húmicas x DTPA/EDTA. In: *XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Resumos, Poços de Caldas, AB-061, 2001.

6.2.9 ZARA, L.F.; ROSA, A.H.; SARGENTINI Jr., É.; SANTOS, A.; ROCHA, J.C.; Estudo cinético da redução de mercúrio iônico por frações húmicas aquáticas. In: *XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Resumos, Poços de Caldas, AB-037, 2001.

6.2.10 CARVALHO NETO, F.S.; SANTOS, A.; ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; Extração e caracterização de substâncias húmicas extraídas de 3 diferentes matrizes. In: *XXVI Congresso de Iniciação Científica da UNESP*. Resumos, Guaratinguetá, 2000.

6.2.11 SANTOS, A.; CARVALHO NETO, F.S.; ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; Caracterização e comparação de substâncias húmicas extraídas de solo e de biocompostos de diferentes origens. In: *FERTBIO 2000*. Resumos, Santa Maria, 2000.

6.2.12 ZARA, L.F.; ROCHA, J.C.; MILANI, M.R.; ROSA, A.H.; SANTOS, A.; LEHMKUHL, A.; Sistema de análise em fluxo acoplado a espectrometria de emissão atômica (FIA-ICP-AES) com etapa de pré-concentração de mercúrio em resina chelite e eluição redutiva. In: *VII Encontro Nacional de contaminantes inorgânicos*. Resumos, Campinas, 25-27/10, 2000.

6.2.13 ZARA, L.F.; ROSA, A.H.; SARGENTINI Jr, É.; SANTOS, A.; ROCHA, J.C.; Estudo das propriedades ácido-base das frações húmicas obtidas por ultrafiltração de substâncias húmicas aquáticas. In: *XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Resumos, Poços de Caldas, AB-021, 2000.

6.2.14 ROSA, A.H.; VICENTE, A.A.; ROCHA, J.C.; TREVISAN, H.C.; A new application of humic substances: activation of supports for invertase immobilization. In: *XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Resumos, Poços de Caldas, AB-020, 2000.

6.2.15 ZARA, L.F.; SARGENTINI Jr, E.; ROSA, A.H.; GOMES NETO, J.A.; ROCHA, J.C.; Estudo da redução de mercúrio iônico por substâncias húmicas. In: *III Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas*. Resumos, Santa Maria, p. 281, 1999.

6.2.16 SANTOS, A.; ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; RESENDE, M.O.O.; Fracionamento de substâncias húmicas em função do tamanho molecular: ordem de capacidade complexante relativa com Cr, Ni, Cu, Cd e Pb. In: *III Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas*. Resumos, Santa Maria, p. 149, 1999.

6.2.17 ROSA, A.H.; SARGENTINI Jr, É.; ZARA, L.F.; SANTOS, A.; ROCHA, J.C.; Substâncias húmicas de solos: sistema "on line" para extração e fracionamento utilizando-se ultrafiltração sequencial com múltiplos estágios e fluxo tangencial. In: *III Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas*. Resumos, Santa Maria, p.168, 1999.

6.2.18 ZARA, L.F.; ROSA, A.H.; GOMES NETO, J.A.; ROCHA, J.C.; In: Determinação de mercúrio iônico utilizando análise por injeção em fluxo com etapa de pré-concentração em resina acoplada à espectrometria de emissão atômica (ICP-AES). In: *XII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química*, Resumos, Ribeirão Preto, 1999.

6.2.19 SANTOS, A.; ROSA, A.H.; REZENDE, M.O.O.; ROCHA, J.C.; Metais em sedimentos do reservatório de captação de águas Anhumas (Araraquara-SP): origem e distribuição. In: *X Encontro Nacional de Química Analítica*. Resumos, Santa Maria, p. , 1999.

6.2.20 ZARA, L.F.; SARGENTINI Jr, E.; ROSA, A.H.; GOMES NETO, J.A.; ROCHA, J.C.; Estudo da redução de mercúrio iônico por substâncias húmicas. In: *XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Resumos, Poços de Caldas, AB-06, 1999.

6.2.21 SANTOS, A.; ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; RESENDE, M.O.O.; Fracionamento de substâncias húmicas em função do tamanho molecular: ordem de capacidade complexante relativa com Cr, Ni, Cu, Cd e Pb. In: *XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Resumos, Poços de Caldas, AB-08, 1999.

6.2.22 ROSA, A.H.; SARGENTINI Jr, É.; ZARA, L.F.; SANTOS, A.; ROCHA, J.C.; Substâncias húmicas de solos: sistema "on line" para extração e fracionamento utilizando-se ultrafiltração sequencial com múltiplos estágios e fluxo tangencial. In: *XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Resumos, Poços de Caldas, AB-02, 1999.

6.2.23 SARGENTINI Jr, É.; ROSA, A.H.; ZARA, L.F.; SANTOS, A.; ROCHA, J.C.; Desenvolvimento de sistema contínuo para fracionamento por ultrafiltração de substâncias húmicas. In: *XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Resumos, Poços de Caldas, AB-04, 1999.

6.2.24 ZARA, L.F.; TOSCANO, I.A.S.; ROSA, A.H.; Estudo das propriedades ácido-base de ácido húmico aquático utilizando as funções de Gran modificadas. In: *XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Resumos, Poços de Caldas, AB-67, 1998.

6.2.25 ROSA, A.H.; SANTOS, A.; ZARA, L.F.; ROCHA, J.C. ; FURLAN, M.; Estudo espectroscópico na região do infravermelho e visível: Oxidação das substâncias húmicas durante o processo de extração alcalina. In: *XXXVII Congresso Brasileiro de Química*. Resumos, Natal, 1997.

6.2.26 SANTOS, A.; ROSA, A.H.; RESENDE, M.O.O.; ROCHA, J.C.; Distribuição de metais em materiais suspensos e sedimentos de reservatório de captação de água superficial. In: *Anais do 2º Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas*. Resumos, São Carlos, p. 122, 1997.

6.2.27 SANTOS, A.; ROSA, A.H.; RESENDE, M.O.O.; ROCHA, J.C.; Distribuição de metais em materiais suspensos e sedimentos de reservatório de captação de água superficial. In: *IX Encontro Nacional de Química Analítica*. Resumos, São Carlos, p. 257, 1997.

6.2.28 ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; Sistema em fluxo contínuo para extração e fracionamento de substâncias húmicas de solos. In: *Anais do 2º Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas*. Resumos, São Carlos, p. 127, 1997.

6.2.29 ROSA, A.H.; ROCHA, J.C. ; Sistema em fluxo contínuo para extração e fracionamento de substâncias húmicas de solos. In: *IX Encontro Nacional de Química Analítica*. Resumos, São Carlos, p. 262, 1997.

6.2.30 ROSA, A.H.; SANTOS, A.; OLIVEIRA, S.C.; ROCHA, J.C.; FURLAN, M.; Estudo dos parâmetros que influenciam na extração de substâncias húmicas de solos - Parte II. In: *Anais do 2º Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas*. Resumos, São Carlos, p.128, 1997.

6.2.31 ROSA, A.H.; SANTOS, A.; OLIVEIRA, S.C.; ROCHA, J.C.; FURLAN, M.; Estudo dos parâmetros que influenciam na extração de substâncias húmicas de

solos - Parte II. In: *IX Encontro Nacional de Química Analítica*. Resumos, São Carlos, p. 263, 1997.

6.2.32 ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; FURLAN, M.; Desenvolvimento de metodologia para extração de substâncias húmicas de Turfas. Parte I - Estudo da influência do extrator e de sua concentração na extração. In: *XX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Resumos, Poços de Caldas, AB-014, 1997.

6.2.33 ROSA, A.H.; SANTOS, A; ZARA, L.F.; OLIVEIRA, S.C.; Determinação de metais pesados por espectroscopia de absorção atômica em efluente de indústria de galvanoplastia. In: *VIII Jornada Científica* - Resumos, Araraquara - 1996.

6.2.34 ROSA, A.H.; SANTOS, A; ZARA, L.F.; OLIVEIRA, S.C.; Determinação de metais pesados por espectroscopia de absorção atômica em efluente de indústria de galvanoplastia. In: *XXXVI Congresso Brasileiro de Química*. Resumos, São Paulo, MA-07, 1996.

6.2.35 ROSA, A.H.; SANTOS, A; ZARA, L.F.; OLIVEIRA, S.C.; Determinação de metais pesados por espectroscopia de absorção atômica em efluente de indústria de galvanoplastia. In: *XXXVI Congresso Brasileiro de Química*. Resumos, São Paulo, MA-08 , 1996.

6.2.36 ROSA, A.H.; ROCHA, J.C. ; BORALE, N.; FURLAN, M.; Estudo da interação de alumínio com Substâncias Húmicas utilizando ressonância magnética nuclear. In: *XXXVI Congresso Brasileiro de Química*. Resumos, São Paulo, p. MA-06 , 1996.

6.2.37 ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; FURLAN, M.; Estudos dos ácidos húmico e fúlvico obtidos por nova metodologia de extração utilizando EIV, RMN ^{13}C no estado sólido e termogravimetria. In: *VIII Encontro Nacional de Química Analítica*. Resumos, Belo Horizonte, UFMG, p. 280, 1995.

6.2.38 ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; FURLAN, M.; Determinação da capacidade de complexação de Cu^{+2} por ácidos húmico e fúlvico extraídos com hidróxido de potássio. In: *XI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química*. Resumos, Araraquara, p. 53, 1995.

6.2.39 ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; FURLAN, M.; Metodologia de extração / purificação de materiais húmicos de solos utilizando-se hidróxido de potássio. In: *VII Congresso de Iniciação Científica da UNESP* - Resumos, Guaratinguetá - 11/1995.

6.2.40 ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; FURLAN, M.; Metodologia de extração / purificação de materiais húmicos de solos utilizando-se hidróxido de potássio. In: *VII Jornada Científica* - Resumos, Araraquara, 1995.

6.2.41 ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; FURLAN, M.; Metodologia de extração / purificação de materiais húmicos de solos utilizando-se hidróxido de potássio. In: *XVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*. Resumos, Caxambu, AB-014, 1995.

6.2.42 ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; Desenvolvimento de metodologia para extração e separação de materiais húmicos de solos. Caracterização analítica empregando técnicas de cromatografia gasosa, espectroscopia de absorção atômica e espectroscopia no infravermelho. In: *VI Jornada Científica* - Resumos, Araraquara, p. 12, 1994.

7. ESTÁGIOS

7.1 Institute of Spectrochemistry and Applied Spectroscopy (ISAS), Dortmund-Alemanha: estágio realizado nos meses de Maio/Junho de 2001, sob supervisão do Dr. Peter Burba.

7.2 Instituto de Química de Araraquara (UNESP): estágio de 360 horas (1994 - 1995) em Iniciação a Pesquisa Científica, bolsista: PIBIC/CNPq. (Pré requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Química). Monografia: "Metodologia de extração/purificação de materiais húmicos de solos. Caracterização analítica utilizando espectroscopia no IV, UV-VIS e capacidade de complexação". Conceito de aprovação: 10 (Dez).

7.3 Indústria: estágio de 150 horas (1991) na indústria Minasa S/A (Araraquara - SP) no laboratório de controle de qualidade e desenvolvimento. (Pré requisito para obtenção do Título de Técnico em Química).

8. ATIVIDADES DOCENTE

8.1 Pós-Graduação: colaboração no Mini Curso ministrado no programa de Pós-Graduação do Instituto de Química de Araraquara - UNESP. Período de 27/10 a 12/11/1998, título: "Fracionamento de substâncias húmicas, digestão ácida das frações em forno de microondas e determinação de metais por ICP".

8.2 Segundo Grau: monitor das disciplinas de Química no Colégio "Duque de Caxias", Araraquara, São Paulo, 1993.

8.3 Alfabetização: Professor de Educação Básica (PEB I) da FUNDAP (Fundação de Amparo ao Trabalhador Preso) no período de 1990 a 1991. Aprovado em CONCURSO PUBLICO.

9. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

9.1 Exerceu o cargo de Operador da Estação de Tratamento de Água no Departamento Autônomo de Água e Esgoto (DAAE) de Araraquara (SP), durante 2 anos (1992- 1993). Aprovado em CONCURSO PÚBLICO.

10. HOMENAGENS

10.1 Homenageado como Travel Bursary 2000 pela International Humic Substances Society em sessão solene realizada durante o 10th International Meeting of IHSS: *“Entering the third millenium with a common approach to humic substances and organic matter in water, soil and sediments”*, Toulouse, França, 28/07/99.

10.2 Homenageado pela Diretoria do Diretório Acadêmico Prof. Waldemar Saffioti (DAWS) no encerramento da VII Jornada Científica intitulada: *“A iniciação científica e a pesquisa”* realizada no Instituto de Química de Araraquara de 08 a 10 de Junho de 1995.

11. OUTROS

Aprovado em exame de proficiência em inglês pelo English as a Second Language Achievement Test (ESLAT), gramática: 441 pontos (0-790 pontos), oral: 80 pontos (0-100 pontos) e redação: 73 (0-100 pontos). Conhecimento de informática (Word, Origin, Power Point e Acessórios).

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer meu Pai (Demirço) e minha Mãe (Tercília) pela vida, pelo esforço que me permitiu chegar até aqui, pela educação e carinho. Também agradeço minha esposa (Bel) pela compreensão em minhas ausências, pelo carinho e amor que nunca me faltaram.

Obrigado ao meu “Guru da Ciência” Prof. Dr. Julio Rocha! Pelo privilégio de ter trabalhado tão próximo a você por todo este tempo, pela confiança, pelo incentivo e por todo conhecimento científico e pessoal que você sempre fez questão de transmitir-me de forma clara e precisa. Julio muito obrigado também pela sua amizade, um sentimento que sinto ser sincero, muito além de interesses científicos e profissionais. Pode ter certeza que esse sentimento também é compartilhado por mim.

Agradeço ao Instituto de Química da UNESP e ao Departamento de Química Analítica, as casas que me acolheram e permitiram minha formação acadêmica. Não menos importante, agradeço aos meus professores da Graduação e Pós Graduação, especialmente àqueles que sentem carinho por mim. Podem ter certeza que eu os conheço, e sinto o mesmo por vocês. Não poderia esquecer de deixar explícito meu agradecimento ao Prof. Massao, por ter me apresentado ao Prof. Julio em 1994.

Obrigado aos funcionários do IQ, especialmente às meninas da Pós Graduação (Izolina, Sandra e Vilma) e do patrimônio (Marli, Rose e Bel) por todo auxílio prestado.

Um agradecimento especial a meus amigos e colegas de convivência mais íntima, do Grupo de Pesquisa, do laboratório e da Pós Graduação, todos vocês contribuíram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho. Prefiro não nomeá-los para evitar cometer alguma injustiça.

Muito obrigado à FAPESP pelo suporte financeiro e bolsas de Mestrado e Doutorado concedidas. Obrigado por ter me dado todas as condições de trabalho e com muita responsabilidade ter me permitido sustentar minha família durante 6 anos. Obrigado também à Assessoria Científica da FAPESP pela leitura e competência na análise de Projetos e relatórios, pela confiança e incentivo demonstrado à minha pessoa durante o desenvolvimento do Projeto.

Many thanks Institute of Spectrometry and Applied Spectroscopy and Dr. Peter Burba by Academic Interchange, which has been contributing in my scientific formation. Thank you very much Peter and his family (Christa, Christine and Putzle) by friendship and nice moments in Germany.

Finalizando, gostaria de fazer um agradecimento super especial à Deus minha fonte inesgotável de inspiração... Obrigado meu Deus por tudo... Tenho absoluta certeza e convicção que o nada que sou e tudo o que tenho na vida devo a Ti... Pai obrigado por estar sempre comigo, pelo amor, força, orientação e alegria interior... A única coisa que posso humildemente Te oferecer é minha gratidão, meus pensamentos e meu incondicional amor...

“O homem é o que é sua vida, se o homem não se aperfeiçoa a cada dia, a cada momento, se não modifica nada dentro de si mesmo, em seu coração, em seus pensamentos, em suas ações, se não elimina seus defeitos psicológicos, está perdendo seu tempo e sua vida miseravelmente...”

Samael Aun Weor

ÍNDICE

RESUMO.....	i
...	
ABSTRACT.....	iii
...	
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABELAS.....	Vi
APRESENTAÇÃO DA TESE.....	viii
CAPÍTULO 1– ASPECTOS GERAIS DA QUÍMICA DO HÚMUS.....	01
1.1	- 01
DEFINIÇÕES.....	
1. 2 - ORIGEM E FORMAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS.....	03
1.3 - ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS.....	05
1.4 - IMPORTÂNCIA DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS NO AMBIENTE.	08
CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTO EM FLUXO PARA EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE SUSBTÂNCIAS HÚMICAS DE SOLOS.....	11
2.1 - OBJETIVOS E RELEVÂNCIA.....	12
2.2 -	13
EXPERIMENTAL.....	
2.2.1 - Coleta e preparo da amostra.....	13
2.2.2 - Extração das substâncias húmicas.....	14
2.2.2.1 - Procedimento em batelada.....	14
2.2.2.1 - Procedimento em fluxo.....	15
2.2.3 - Purificação das substâncias húmicas.....	18
2.2.4 - Caracterizações.....	18
2.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
2.4	- 22
CONCLUSÕES.....	

CAPÍTULO 3 - IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA INVERTASE EM SUPORTE PREPARADO COM SUBSTÂNCIAS HÚMICAS.....	25
3.1	- 26
INTRODUÇÃO.....	
3.1.1 - Imobilização de enzimas.....	26
3.1.2 - Métodos de imobilização de enzimas	27
3.1.3- Suportes para imobilização de enzimas	29
3.2 - OBJETIVOS E RELEVÂNCIA DESTA ETAPA DO TRABALHO....	30
3.2.1 - Preparação de um novo suporte para imobilização de enzimas utilizando-se substâncias húmicas.....	30
3.2.2 – Imobilização da enzima invertase no suporte preparado com substâncias húmicas e em suporte tradicional visando a inversão do açúcar.....	31
...	
3.3 -	33
EXPERIMENTAL.....	
3.3.1 - Coleta e preparo da amostra de solo.....	33
3.3.2 - Extração das substâncias húmicas.....	33
3.3.3 - Purificação das substâncias húmicas.....	33
3.3.4 - Caracterizações.....	33
3.3.5 - Preparação dos suportes.....	34
3.3.5.1 - Ativação de aminopropil sílica com substâncias húmicas.....	34
3.3.5.2 - Ativação de aminopropil sílica com glutaraldeído.....	34
3.3.6 - Imobilização da enzima invertase.....	34
3.3.7 - Espectroscopia na região do infravermelho.....	35
3.3.8 - Medidas da atividade enzimática.....	35
3.3.8.1 - Determinação da atividade enzimática pelo método das velocidades iniciais.....	36
3.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
3.4.1 - Caracterização das substâncias húmicas.....	37
3.4.2 - Ativação da aminopropil sílica com substâncias húmicas.....	37
3.4.3 - Imobilização da invertase no suporte ATPS-SiO ₂ -HS.....	38
3.4.4 - Determinação da quantidade de invertase imobilizada nos suportes.....	39
...	
3.4.5 – Determinação da atividade de invertase imobilizada nos suportes.....	43
...	
3.4.6 – Comparação da quantidade e atividade da invertase imobilizada nos suportes.....	46
3.5 - CONCLUSÕES.....	46

CAPÍTULO 4 – EXTRAÇÃO E TROCA DE ESPÉCIES METÁLICAS EM EXTRATOS AQUOSOS DE TURFA MEDICINAL.....	49
4.1- INTRODUÇÃO.....	50
4.2 - OBJETIVOS E RELEVÂNCIA.....	52
4.3 EXPERIMENTAL.....	- 53
4.3.1 - Amostras de turfas medicinais.....	53
4.3.2 - Digestão com água régia.....	53
4.3.3 - Extração da matéria orgânica e metais das amostras de turfas..	54
4.3.4 - Determinação dos metais.....	54
4.3.5 - Caracterização do material orgânico dissolvido extraído utilizando-se espectroscopia nas regiões do UV/Vis.....	54
4.3.6 - Troca entre espécies metálicas da turfa por íons Cu(II).....	54
4.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.4.1 - Disponibilidade de metais em amostras de turfa medicinal por diferentes extratores.....	55
4.4.2 - Cinética da extração de espécies metálicas e material orgânico dissolvido (MOD) em turfas medicinais.....	59
4.4.3 - Troca entre metais presentes na turfa por íons Cu(II) e soluções de DTPA e EDTA.....	61
4.5 - CONCLUSÕES.....	65
CAPÍTULO 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
PROPOSTAS FUTURAS.....	77
APÊNDICE.....	79
...	

RESUMO

Este trabalho aborda novos desenvolvimentos relacionados à pesquisa científica de substâncias húmicas (SH) extraídas de amostras de solos/turfas .

Assim, na primeira etapa descreve-se o desenvolvimento de um procedimento em fluxo contínuo para extração de substâncias húmicas e fracionamento destas em ácidos húmicos e fúlvicos. O procedimento em fluxo proposto apresenta vantagens em relação ao procedimento tradicionalmente utilizado (batelada) devido ao aumento do rendimento e diminuição do tempo de extração. Além disso, facilita o trabalho dispendiosos no manuseio, transferência e ajuste de pH das frações.

Numa segunda parte do trabalho, descreve-se a preparação de um novo suporte para imobilização da enzima invertase utilizando-se substâncias húmicas. O suporte preparado pela ativação da aminopropil sílica com SH (APTS-SiO₂-HS) mostrou ser um método viável e interessante para a imobilização da invertase. Os resultados referentes a quantidade e atividade da invertase imobilizada no APTS-SiO₂-HS foi comparado com um suporte tradicional (aminopropil sílica ativada com glutaraldeído, APTS-SiO₂-GA). A quantidade de invertase imobilizada no APTS-SiO₂-HS foi 15200 U g⁻¹ enquanto que no APTS-SiO₂-GA foi 13400 U g⁻¹. As atividades enzimáticas experimentais foram 3700 e 3270 U g⁻¹, para os sistemas APTS-SiO₂-HS e APTS-SiO₂-GA, respectivamente.

A terceira etapa do trabalho trata da caracterização de espécies metálicas presentes em amostras de turfas, as quais são utilizadas em tratamentos terapêuticos. Estudaram-se a disponibilidade, estabilidade e extractibilidade da matéria orgânica dissolvida (MOD) e das espécies metálicas em diferentes extratores: água pH 4,5; água pH 5,0, soluções 0,01 mol L⁻¹ de CaCl₂ e de ácidos etilenodiaminotetraacético (EDTA) e dietilenotriaminopentaacético (DTPA). Os resultados obtidos podem auxiliar no entendimento dos mecanismos ainda desconhecidos da terapia com turfas e mostraram que:

- 1) a extração da MOD ocorre em um processo cinético complexo o qual atinge o equilíbrio após 30 minutos;

- 2) Mn é o metal mais disponível presente em amostras de turfas medicinais enquanto Fe e Al são os menos disponíveis;
- 3) os valores de pH exercem forte influência na extração da MOD e suas espécies metálicas;
- 4) as disponibilidades dos metais pelos extratores apresentaram as seguintes ordens decrescentes: Soluções de EDTA e DTPA: Mn >> Zn > Pb > Cd > Ni > Co > Fe > Sr, Al; Solução de CaCl₂: Sr >> Mn > Ni > Zn > Cd > Al > Fe; Água: Mn > Sr > Ni > Zn > Al > Fe;
- 5) o estudo de troca com íons Cu(II), indicou a seguinte ordem decrescente de troca: Sr (81,95) > Mn (79,00) > Al (21,76) > Fe (3,94);
- 6) as soluções de DTPA e EDTA exibiram similar e forte capacidade de extração dos metais presentes na amostra de turfa medicinal.

ABSTRACT

This work presents new developments about the scientific research of humic substances (HS) extracted from soils/peat samples.

So, the first part describes the development of continuous flow procedure for extraction and fractionation of humic substances in humic and fulvic acids. The proposed flow procedure presents advantages in relation to the traditional used procedure (batch) due to the increasing of the yields and decrease of extraction time. Besides, discharge the research work in the handling and transference and pH adjust of the fractions.

The second part, describes the preparation of a new support for immobilization of invertase enzyme using humic substances. The prepared support by aminopropil silica activation with HS (APTS-SiO₂-HS) showed be a good method for invertase immobilization. The results about the quantity and activity of the invertase immobilized in the APTS-SiO₂-HS it was compared with a traditional support (aminopropil silica activated with glutaraldehyde, APTS-SiO₂-GA). The quantify of immobilized invertase in the APTS-SiO₂-HS it was 15200 U g⁻¹, while in the APTS-SiO₂-GA it was 13400 U g⁻¹. The experimental enzymatic activities were 3700 and 3270 U g⁻¹, for the systems APTS-SiO₂-HS and APTS-SiO₂-GA, respectively.

The third step describes the characterization of the metal species in peat samples, which are used in therapeutical treatment. It were studied the availability, stability and extractability of dissolved organic matter (DOM) and their metal species in different extractors: water pH 4.5; water pH 5.0; 0.01 mol L⁻¹ CaCl₂ and diethilenodiaminotetraacetic acid (EDTA) and diethilenotriaminopentacetic acid (DTPA) solutions. The results obtained can clarify the understanding of the mechanism still unknown of peat therapy and showed that:

- 1) the DOM extraction occurs in a complex kinetic process, that attain the equilibrium after 30 minutes;
- 2) Mn is the most available metal found in the medically peat samples, while Fe and Al are the least available;

- 3) the pH values exert strong influence in the DOM extraction and their metal species;
- 4) the metal availability in relation to extractors used showed the following distribution order: EDTA and DTPA solutions: Mn >> Zn > Pb > Cd > Ni > Co > Fe > Sr, Al; CaCl₂ solution: Sr >> Mn > Ni > Zn > Cd > Al > Fe; Water: Mn > Sr > Ni > Zn > Al > Fe;
- 5) the exchange with Cu(II) ions, showed the following distribution order: Sr (81.95) > Mn (79.00) > Al (21.76) > Fe (3.94);
- 6) the DTPA and EDTA solution showed similar and strong capability of metal extraction from medically peat samples.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Esquema de fracionamento do material orgânico e das substâncias húmicas presentes no solo.....	03
Figura 1.2 - Principais vias propostas para a formação das substâncias húmicas.....	04
Figura 1.3 - Estrutura proposta para o ácido húmico.....	05
Figura 2.1 - Algumas linhas de pesquisa sobre substâncias húmicas....	12
Figura 2.2 - Sistema extrator utilizado na extração das substâncias húmicas de solos por batelada.....	14
Figura 2.3 – Diagrama do procedimento em fluxo proposto para extração, fracionamento de substâncias húmicas e purificação de ácido fúlvico de solos.....	16
Figura 2.4 – Sistema em fluxo para extração, fracionamento das substâncias húmicas e purificação de ácido fúlvico de solos.....	16
Figura 2.4 – Diagrama do procedimento em fluxo proposto para extração, fracionamento de substâncias húmicas e purificação de ácido fúlvico de solos.....	16
Figura 2.5 – Sistema em fluxo para extração, fracionamento de substâncias húmicas e purificação de ácido fúlvico de solos (em funcionamento).....	17
Figura 2.6 – Frasco de Extração (FE), tubos de Tygon para bombeamento, bomba peristáltica, recipientes para armazenamento de soluções de NaOH 0,5 mol L ⁻¹ (R ₁) e HCl 3,0 mol L ⁻¹ (R ₂).....	17
Figura 2.7 – Espectros de infravermelho de ácido húmico extraído de amostra de turfa utilizando procedimento em batelada (A) recomendado pela International Humic Substances Society e em fluxo (B), proposto neste trabalho.....	21
Figura 2.8 – Espectros de infravermelho de ácido fúlvico extraído de amostra de turfa utilizando procedimento em batelada (C) recomendado pela International Humic Substances Society e em fluxo (D), proposto neste trabalho.....	22
Figura 3.1 – Classificação dos métodos de imobilização de enzimas. E: enzima; S: suporte; A: albumina.....	27

Figura 3.2 - Suportes para imobilização de enzimas.....	30
Figura 3.3 – Esquema de reações envolvidas no método com ácido dinitrosalicílico.....	36
Figura 3.4 - Reatores em batelada (a) Enzima solúvel e (b) Enzima imobilizada.....	37
Figure 3.5 - Espectros na região do infravermelho do APTS-SiO ₂ -HS e da invertase imobilizada no APTS-SiO ₂ -HS (APTS-SiO ₂ -HS-Enz).....	39
Figure 3.6 - Reação entre o suporte ativado e a invertase.....	39
Figura 3.7 – Formação de glicose e frutose em função do tempo. Reação com a invertase em solução (teste para quantificação da enzima imobilizada).....	41
Figura 3.8 – Formação de glicose e frutose em função do tempo. Reação com a invertase imobilizada no suporte tradicional (teste para quantificação da enzima imobilizada).....	42
Figura 3.9 - Formação de glicose e frutose em função do tempo. Reação com a invertase imobilizada no suporte preparado com substâncias húmicas (teste para quantificação da enzima imobilizada).....	42
Figura 3.10 - Formação de glicose e frutose em função do tempo. Reação com a invertase imobilizada no suporte tradicional (teste para determinação da atividade da enzima imobilizada).....	45
Figura 3.11 - Formação de glicose e frutose em função do tempo. Reação com a invertase imobilizada no suporte preparado com substâncias húmicas (teste para determinação da atividade da enzima imobilizada).....	45
Figuras 4.1 – Fotos sobre terapia a base de turfas em um “spa” na Grécia.....	51
Figure 4.2 - Razões das absorbâncias a_{254nm}/a_{436nm} e metais extraídos em função do tempo nas amostras de turfa.....	60
Figura 4.3 - Troca entre espécies metálicas presentes em turfa por íons Cu(II).....	62
Figure 4.4 - Troca dos metais presentes na turfa por a) solução de EDTA e b) solução de DTPA.....	63
Figure 4.5 - Cinética da extração de espécies metálicas presentes em amostra de turfa por solução de EDTA.....	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 – Composição elementar média de ácidos húmico e fúlvico extraídos de solos.....	06
Tabela 1.2 – Conteúdo de grupos oxigenados (meq/100 g) de ácidos húmico e fúlvico extraídos de diferentes tipos de solos.....	07
Tabela 1.3 – Propriedades gerais das substâncias húmicas e efeitos causados ao solo.....	09
Tabela 2.1 – Comparação entre rendimento, razão E_4/E_6 e composição elementar dos ácidos húmico e fúlvico extraídos pelo procedimento em batelada e pelo procedimento em fluxo proposto.....	20
Tabela 3.1 - Algumas potenciais aplicações de enzimas imobilizadas....	26
Tabela 3.2 – Comparação entre os métodos de imobilização de enzimas.....	28
Tabela 3.3 – Formação de glicose e frutose em função do tempo. durante a reação da enzima solúvel com o substrato (teste para quantificação da enzima imobilizada).....	40
Tabela 3.4 – Formação de glicose e frutose em função do tempo. Reação entre o substrato e a enzima imobilizada no suporte tradicional (teste para quantificação da enzima imobilizada).....	40
Tabela 3.5 – Formação de glicose e frutose em função do tempo. Reação entre o substrato e a enzima imobilizada no suporte preparado com substâncias húmicas (teste para quantificação da enzima imobilizada).....	41
Tabela 3.6 – Formação de glicose e frutose em função do tempo. Reação entre o substrato e a enzima imobilizada no suporte tradicional (teste para determinação da atividade da enzima imobilizada).....	44
Tabela 3.7 – Formação de glicose e frutose em função do tempo durante a reação entre o substrato e a enzima imobilizada no suporte preparado com substâncias húmicas (teste para determinação da atividade da enzima imobilizada).....	44
Tabela 3.8 – Atividade da invertase imobilizada em diversos suportes.....	47
Tabela 4.1 – Metais em turfas medicinais: concentração total ^{a)} e percentagem dos metais disponíveis por diferentes extratores ^{b)}	57

APRESENTAÇÃO

Este trabalho consta de novos desenvolvimentos sobre a Química do Húmus. O texto divide-se em cinco capítulos e um apêndice. O primeiro capítulo descreve uma revisão bibliográfica contendo aspectos gerais relacionados às substâncias húmicas. Os demais são subdivididos nos tópicos introdução, objetivos e relevância, experimental, resultados e discussão e conclusões. Cada um desses capítulos apresenta estudos independentes mas, interrelacionados ao mesmo objeto da Investigação Científica proposto.

O segundo capítulo trata do desenvolvimento de um procedimento em fluxo para extração de substâncias húmicas. Este trabalho foi apresentado no 9th International Meeting of the International Humic Substances Society, Adelaide-Austrália, 09/1998 e publicado no Proceedings do referido Congresso.

O terceiro capítulo descreve a utilização de substâncias húmicas na preparação de um novo suporte para imobilização da enzima invertase. Este trabalho foi publicado no periódico Fresenius J. Anal. Chem., v. 368, p.730-733, 2000 e apresentado no 10th International Meeting of the International Humic Substances Society, Toulouse-França, 07/2000.

O quarto capítulo apresenta a caracterização de espécies metálicas presentes em amostras de turfas utilizadas terapeuticamente. Esta etapa da Tese foi desenvolvida no estágio feito durante Maio/Junho de 2001, no Institute of Spectrometry and Applied Spectroscopy (ISAS), Dortmund-Alemanha e os resultados foram submetidos para publicação no periódico Talanta.

Para evitar eventuais repetições, as referências bibliográficas foram citadas no quinto capítulo. O apêndice descreve cálculos, materiais, equipamentos, reagentes e procedimentos de preparo de soluções, utilizados na parte experimental do trabalho.

Procurou-se disponibilizar ao leitor a relevância de cada assunto, os resultados obtidos e suas interpretações, de forma clara, objetiva e menos cansativa possível. Entretanto, o autor receberá bem quaisquer comentários, sugestões e/ou críticas, os quais tenham como objetivo aprimorar o trabalho aqui apresentado.

CAPÍTULO 1

ASPECTOS GERAIS SOBRE A QUÍMICA DO HÚMUS

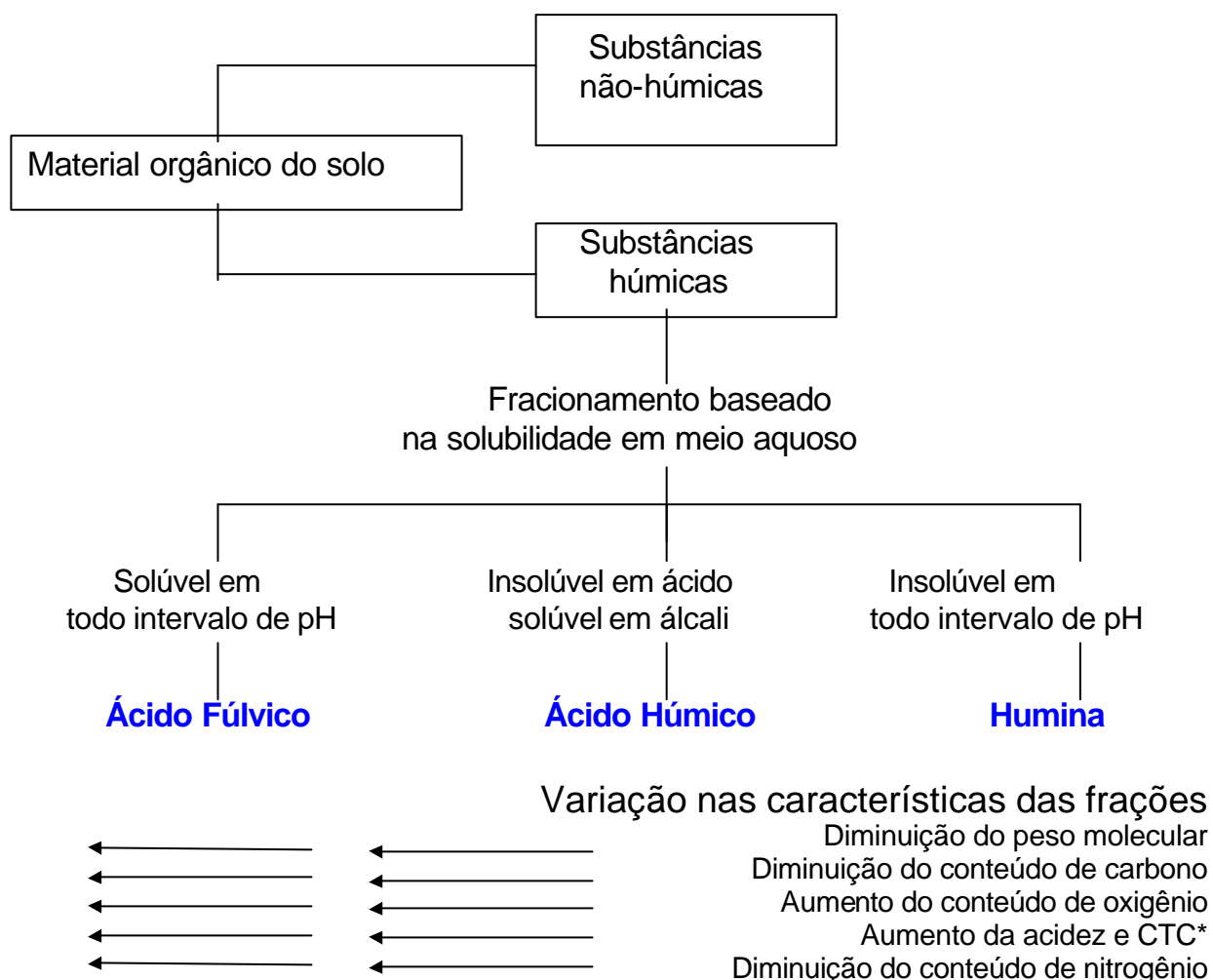
1.1 - DEFINIÇÕES

A matéria orgânica presente nos solos, turfas e sedimentos consiste de uma mistura de produtos em vários estágios de decomposição. São resultantes da degradação química e biológica de resíduos vegetais e animais e da atividade microbiana. Essa matéria orgânica tem sido classificada como húmus ou substâncias húmicas (SH) e substância não húmica.

A diferenciação entre substâncias não húmicas e húmicas está baseada na natureza definida das substâncias não húmicas como por exemplo: aminoácidos, carboidratos, proteínas e ácidos orgânicos, enquanto, as substâncias húmicas são de estrutura química indefinida formando uma mistura de compostos (STEVENSON, 1994).

As substâncias húmicas compreendem uma mistura de espécies com variações em suas propriedades moleculares. Por esta razão, tem sido feito o fracionamento das SH de acordo com suas propriedades para obter frações distintas com características similares. Geralmente as SH são fracionadas em função de sua solubilidade em 3 principais frações. Os ácidos húmicos (AH) definidos operacionalmente como a fração das SH solúvel em meio alcalino diluído a qual precipita pela acidificação do extrato alcalino. Os ácidos fúlvicos (AF) permanecem em solução quando o extrato alcalino é acidificado e a humina é a fração não extraída por ácido ou álcali diluído (STEVENSON, 1994; ROSA, *et al.* 2000a). As interrelações dessas três frações são mostradas no diagrama da Figura 1.1.

A Figura 1.1 mostra que ácido húmico, ácido fúlvico e humina não são extremamente heterogêneos, mas cada fração contém formas intermediárias com características similares.



CTC* - capacidade de troca de cátions

Figura 1.1 - Esquema de fracionamento do material orgânico e das substâncias húmicas presentes no solo (ROSA, 1998a).

1.2 - ORIGEM E FORMAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Embora existam vários estudos, a bioquímica da formação das SH constitui ainda hoje um dos aspectos pouco compreendidos da química do húmus. Vários trabalhos foram escritos sobre o assunto, dos quais destacam-se; KONONOVA (1966), SCHNITZER & KHAN (1978), GIESEKINGI (1975) e STEVENSON (1982).

A Figura 1.2 esquematiza pelo menos quatro das principais vias possíveis para a formação das SH durante a decomposição de resíduos no solo. O principal processo é a oxidação de substratos hidrolisados

monoméricos, formando polímeros macromoleculares de coloração mais ou menos escura e elevada massa molar .

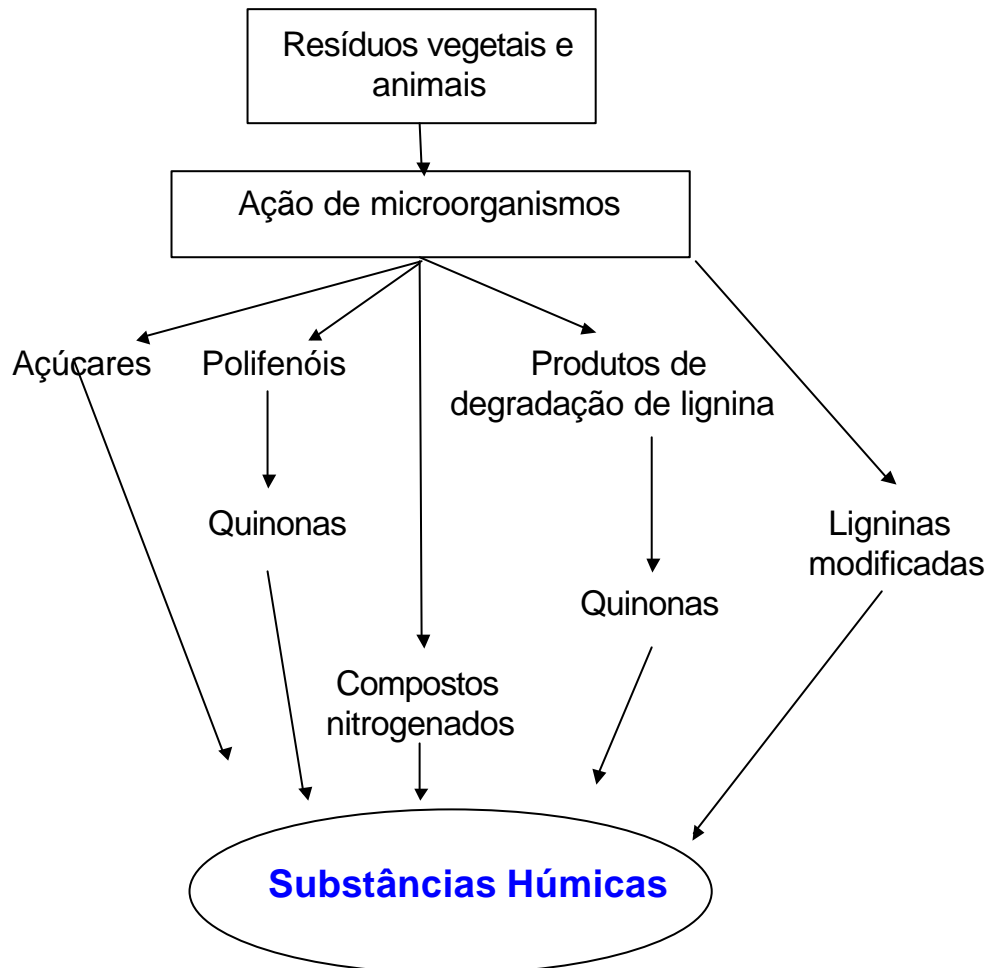


Figura 1.2 - Principais vias propostas para a formação das substâncias húmicas.

As quatro vias podem ocorrer simultaneamente no solo porém, não com a mesma extensão e importância. A via da degradação da lignina pode processar predominantemente em solos mal drenados e em áreas hidromórficas, enquanto a síntese a partir de polifenóis, pode ser importante em alguns solos sob florestas. Devido a rápida assimilação biológica dos açúcares, a teoria de condensação de aminoaçúcares é válida principalmente para meios de baixa atividade biológica (CARDOSO, *et al.* 1992).

1.3 - ESTRUTURA DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Na literatura existem várias propostas estruturais para as SH (FLAIG, 1960; KONONOVA, 1966; SCHNITZER & KHAN, 1978; STEVENSON, 1982) entretanto, de acordo com STEVENSON (1985) nenhuma parece ser inteiramente satisfatória. Provavelmente, isto ocorre não apenas por causa da complexidade e heterogeneidade estrutural das SH mas, principalmente devido à falta de uma identidade estrutural genérica a qual é fortemente influenciada pelo grau e mecanismo de decomposição. A Figura 1.3 mostra o mais recente modelo estrutural para o ácido húmico, o qual foi proposto por SCHULTEN (1995) a partir de estudos espectroscópicos, pirólise, degradação oxidativa e microscopia eletrônica.

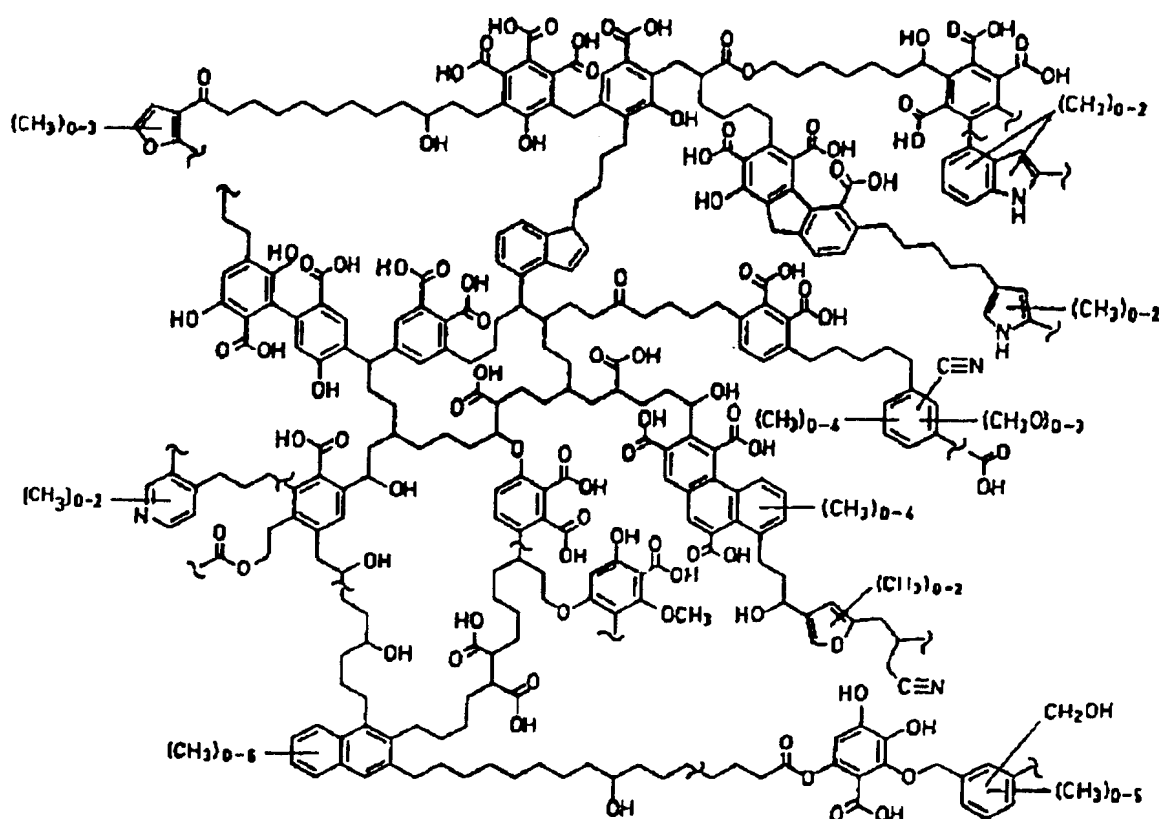


Figura 1.3 - Estrutura proposta para o ácido húmico (SCHULTEN, 1995).

Recentes estudos (PICCOLO, *et al.* 2000), 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. O paradigma da estrutura das SH tem permanecido, enquanto novos procedimentos analíticos e desenvolvimentos especialmente na área de espectroscopia têm sido desenvolvidos visando a obtenção de resultados mais contundentes os quais suportem as hipóteses propostas (PICCOLO, 2000; FERREIRA *et al.*, 2001; STEVENSON, 1994; HAYES *et al.*, 1989).

Mesmo com as contradições existentes quanto ao modelo estrutural, algumas características das SH já estão bem definidas:

1) as frações de ácido húmico e ácido fúlvico, são misturas heterogêneas de moléculas polidifusas, com intervalos de massa molar variando de algumas centenas até milhares (STEVENSON, 1982);

2) há variação da razão entre ácido húmico e ácido fúlvico em função do tipo de solo. Essa razão está associada ao grau de humificação do mesmo (ROCHA, *et al.* 1998).

3) as substâncias húmicas extraídas de solos têm composição elementar média de acordo com a Tabela 1.1.

Tabela 1.1 - Composição elementar média de ácidos húmico e fúlvico extraídos de solos (CALDERONI, *et al.* 1984).

SH	Composição elementar média (%)				
	C	H	O	N	S
Ác. Húmico	53,8-58,7	3,2-6,2	32,8-38,3	0,8-4,3	0,1-1,5
Ác. Fúlvico	40,7-50,6	3,8-7,0	39,7-49,8	0,9-3,3	0,1-3,6

Da Tabela 1.1 verifica-se que o AH tem maior teor de carbono e menor teor de oxigênio que o AF. A razão molar C/H é maior para o AH indicando maior aromaticidade e uma estrutura mais condensada. A razão C/N, associada ao grau de decomposição do material, não apresenta grande variação para os ácidos.

4) os ácidos húmico e fúlvico apresentam alto teor de grupos funcionais contendo oxigênio (Tabela 1.2) tais como, carboxilas, hidroxilas fenólicas e carbonilas de vários tipos (STEVENSON, 1985).

A Tabela 1.2 mostra a variação do conteúdo de grupos oxigenados presentes nos ácidos húmico e fúlvico extraídos de diferentes tipos de solo. As variações observadas podem ser explicadas pelas diferentes condições ambientais as quais influenciam no processo de decomposição da matéria orgânica e formação do material húmico.

Tabela 1.2 - Conteúdo de grupos oxigenados (meq/100 g) de ácidos húmico e fúlvico extraídos de diferentes tipos de solos de diferentes regiões (adaptada de STEVENSON, 1985).

Grupo funcional	Clima / solo			
	Temperada/ Ácido	Temperada/ Neutro	Subtropical/ Ácido	Tropical/ Ácido
Ácidos húmicos				
Acidez total	570-890	620-660	630-770	620-750
COOH	150-570	390-450	420-520	380-450
OH ácido	320-570	210-250	210-250	220-300
OH alcoólico	270-350	240-320	290	20-160
Quinona C=O / Cetona C=O	10-180	450-560	80-150	30-140
OCH ₃	40	30	30-50	60-80
Ácidos fúlvicos				
Acidez total	890-1420	-----	640-1230	820-1030
COOH	610-850	-----	520-960	720-1120
OH ácido	280-570	-----	120-270	30-570
OH alcoólico	340-460	-----	690-950	260-950
Quinona C=O / Cetona C=O	170-310	-----	120-260	120-420
OCH ₃	30-40	-----	80-90	30-120

1.4. IMPORTÂNCIA DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS NO AMBIENTE

As SH representam a principal forma de Matéria Orgânica (MO) distribuída no planeta Terra. Elas são encontradas não apenas em solos mas também em águas naturais, turfas, pântanos, sedimentos aquáticos e marinhos. A quantidade de carbono presente na Terra na forma de SH (60×10^{11} t) excede àquela presente em organismos vivos (7×10^{11} t) (STEVENSON, 1994). As SH são ambientalmente importantes principalmente pelas seguintes razões:

- 1) podem influenciar no transporte, biodisponibilidade e complexação de metais e pesticidas no ambiente;
- 2) reduzem a toxicidade de certos metais (p.e. Cu^{+2} e Al^{+3}) para organismos aquáticos incluindo peixes;
- 3) dependendo das condições do meio possuem características oxi-redutoras. Podem influenciar na química aquática como por exemplo, interação com pesticidas (MARTIN-NETO *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 1998) e redução do íon Hg(II) para Hg^0 (ROCHA, *et al.* 2000);
- 4) atuam no mecanismo de sorção no solo de gases orgânicos e inorgânicos presentes na atmosfera;
- 5) quando presentes em altas concentrações durante o processo de tratamento de água podem reagir com o cloro, produzindo compostos orgânicos halogenados os quais possuem características cancerígenas.

Além da relevância ambiental, as características físico-químicas do húmus também causam alguns efeitos benéficos ao solo conforme mostra a Tabela 1.3.

Tabela 1.3 - Propriedades gerais das substâncias húmicas e efeitos causados ao solo (STEVENSON, 1994).

Propriedades	Observações	Efeitos no solo
Cor	A coloração escura de muitos solos é causada pelas SH	Retenção de calor, auxiliando na germinação de sementes
Retenção de água	Podem reter água até 20 vezes a sua massa	Evitam erosão e mantêm a umidade do solo
Combinação com argilas minerais	Cimentam partículas do solo formando agregados	Permitem a troca de gases e aumentam a permeabilidade do solo
Quelação	Formam complexos estáveis com Cu^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} e outros cátions polivalentes	Melhoram a disponibilidade de nutrientes para as plantas superiores
Insolubilidade em água	Devido sua associação com argilas e sais de cátions di e tri valentes	Pouca matéria orgânica é lixiviada
Ação tampão	Têm função tamponante em amplos intervalos de pH	Ajudam a manter as condições reacionais do solo
Troca de cátions	A acidez total das frações isoladas do húmus varia de 300 a 1400 cmoles kg^{-1}	Aumentam a CTC no solo. De 20 a 70 % da CTC de solos é devida a MO
Mineralização	A decomposição da MO fornece CO_2 , NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{-3} e SO_4^{-2}	Fornecimento de nutrientes para o crescimento das plantas

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTO EM FLUXO PARA EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS DE SOLOS

2.1 - OBJETIVOS E RELEVÂNCIA

A Figura 2.1 ilustra várias linhas de pesquisa, as quais estudam substâncias húmicas. Por exemplo, caracterização de estruturas parciais (SWIFT, 1996), determinação de constantes de equilíbrio metal-SH, labilidade relativa de metais (ROCHA, *et al.* 1997), interação com pesticidas (SANTOS, *et al.* 1998), imobilização de enzima (ROSA, *et al.* 2000b) etc..

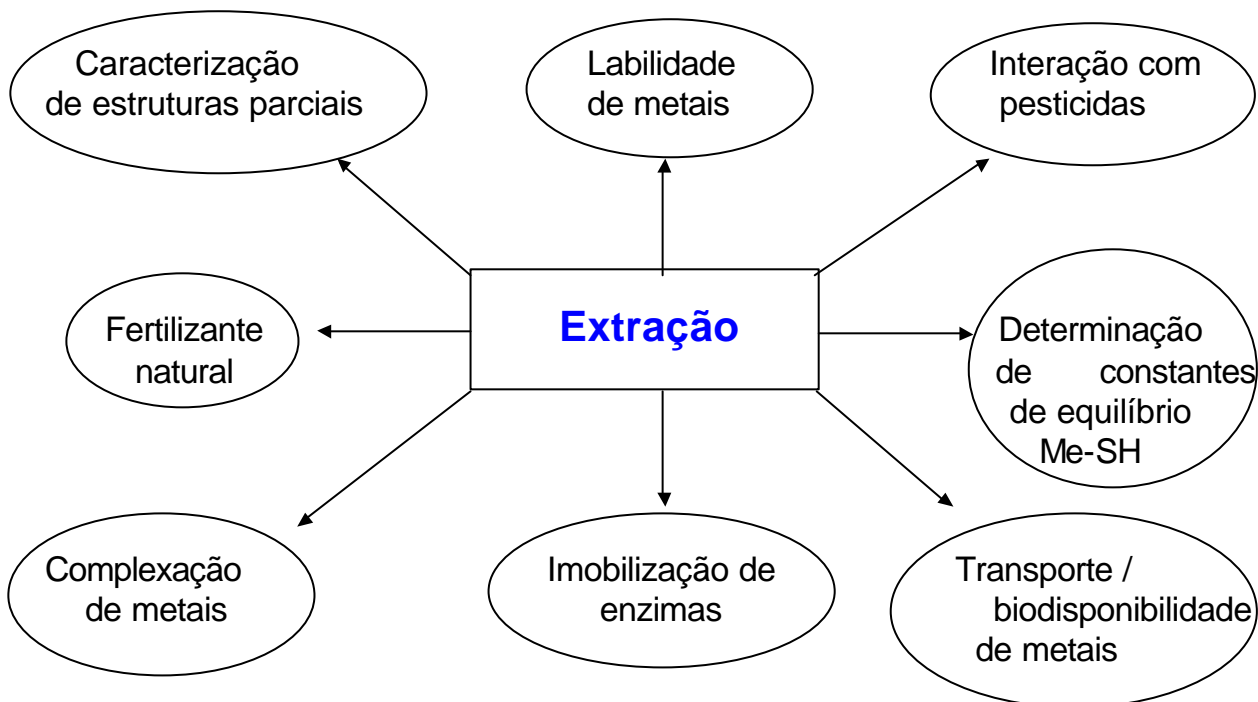


Figura 2.1 - Algumas linhas de pesquisa sobre substâncias húmicas (ROSA, 1998a).

Para a maioria desses estudos, as etapas de extração, o fracionamento e a purificação de substâncias húmicas de solos são pré-requisitos fundamentais. Das condições experimentais utilizadas no procedimento de extração dependerão as interpretações futuras.

Na literatura existem diversos procedimentos descritos sobre extração de SH de solos utilizando solventes alcalinos, orgânicos, pirofosfato de sódio, agentes complexantes etc. (SWIFT, 1996; ROCHA, *et al.* 1998; HAYES & GRAHAM, 2000). Entretanto, ainda não existe uma metodologia para extração de substâncias húmicas de solos oficialmente adotada. A Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) tem recomendado um

procedimento padrão baseado em 4 horas de extração com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ à temperatura ambiente sob atmosfera de nitrogênio (WERSHAW, *et al.* 1990; ROSA, *et al.* 1998b; ROSA, *et al.* 2000a).

Mesmo variando o extrator, as metodologias têm sido utilizadas em procedimentos por batelada tornando trabalhosas as etapas de extração, fracionamento e purificação, consumindo tempo e trabalho demasiado. Alternativamente, alguns autores têm até preferido em seus experimentos a utilização de SH comerciais, mesmo com as severas críticas existentes na literatura quanto a validade dos resultados obtidos do ponto de vista ambiental (MALCOLM & MAcCARTHY, 1986; QIANG, *et al.* 1993).

Desta forma é de importância fundamental o desenvolvimento de métodos analíticos os quais permitam extrair substâncias húmicas de solos, com mínimas alterações em suas estruturas originais, em tempo relativamente curto e com bom rendimento. Assim, o objetivo desta etapa do trabalho foi desenvolver um sistema simples, em fluxo contínuo, para extração das SH, fracionamento em ácidos húmico (AH) e fúlvico (AF) e purificação do AF. Os resultados obtidos foram comparados com o procedimento por batelada recomendado pela IHSS.

2.2 – EXPERIMENTAL

2.2.1 - Coleta e preparo da amostra

Amostra contendo 44,30 % (m/m) de matéria orgânica foi coletada a profundidade de 20 cm da superfície de turfeira do município de Batatais, interior do Estado de São Paulo. Após secagem ao ar por 3 dias foi triturada em gral de porcelana e passada em peneiras de 0,59 mm.

2.2.2 - Extração das substâncias húmicas

2.2.2.1 Procedimento em batelada - metodologia recomendada pela IHSS (CLAPP, et al. 1993; WERSHAW, et al. 1990)

Tomaram-se 5,0 g da amostra, adicionaram-se 50,0 mL de solução de HCl 0,1 mol L⁻¹ e ajustou-se o pH da solução em 1,5 com solução de HCl 1,0 mol L⁻¹. Deixou-se a mistura HCl/solo sob agitação por 1 hora e em seguida fez-se centrifugação a 1478 g por 10 minutos separando-se o sobrenadante do resíduo. Ajustou-se o pH do resíduo em 7,0 com solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ e adicionaram-se 50,0 mL de solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹. Deixou-se a mistura sob agitação mecânica por 4 horas sob atmosfera de nitrogênio em sistema ilustrado na Figura 2.2. A seguir, centrifugou-se a mistura em 1478 g por 10 minutos, separando-se o sobrenadante (SH) do resíduo (Humina). A Humina foi descartada e o sobrenadante (SH) acidificado até pH 1,5 com solução de HCl 6,0 mol L⁻¹. Após decantação do AH (fração insolúvel em pH < 2,0) separou-se o AF (fração solúvel em todo intervalo de pH) por sifonação e centrifugação a 1478 g por 10 minutos. Os ácidos foram purificados por diálise (TOWN & POWELL, 1992) para posterior caracterização.



Figura 2.2 - Sistema extrator utilizado na extração das substâncias húmicas de solos por batelada.

2.2.2.2 - Procedimento em fluxo

2.2.2.2.1 – Diagrama do sistema de extração e fracionamento das SH em fluxo contínuo (Figura 2.3)

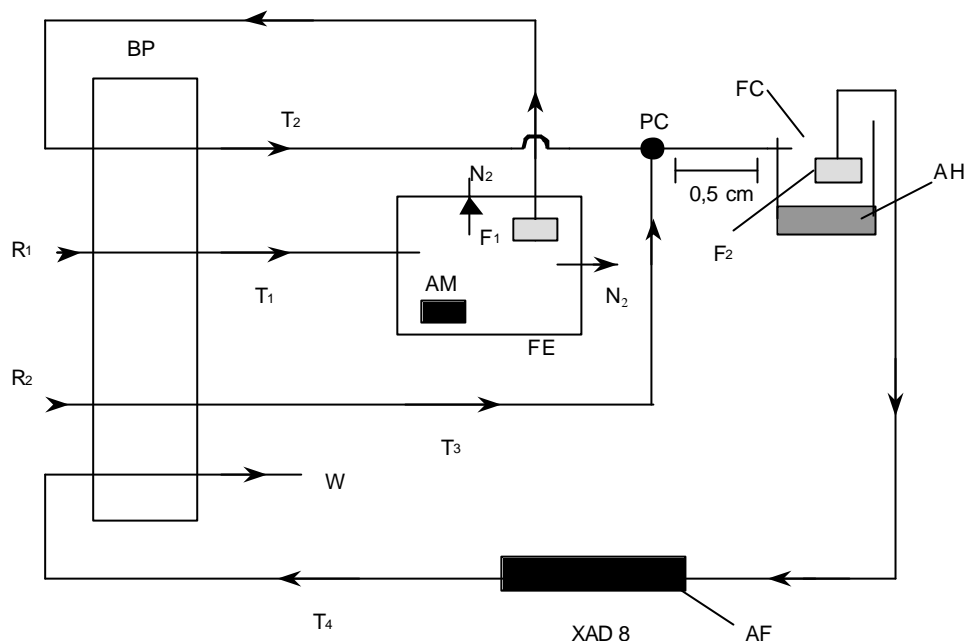


Figura 2.3 - Diagrama do procedimento em fluxo proposto para extração, fracionamento de substâncias húmicas e purificação de ácido fúlvico de solos. Condições: Bomba peristáltica (BP); Frasco extrator (FE); Frasco coletor (FC); Filtros (F_1 and F_2); solução de NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (R_1); solução de HCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ (R_2); Agitador magnético (AM); Tubos (T_1 , T_2 , T_3 e T_4); Ponto de confluência (PC); Descarte (W); Ácido húmico (AH); Ácido fulvico (AF).

Transferiram-se 5,0 g de amostra de solo para o Frasco de Extração (FE). Adicionaram-se solução de NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (R_1) com fluxo de $5,0 \text{ mL min}^{-1}$ pelo tubo 1 (T_1). Nitrogênio foi injetado no frasco de extração em fluxo de 100 mL min^{-1} para minimizar a oxidação do material extraído. Fez-se agitação magnética no interior do frasco extrator para auxiliar no processo de extração. As SH extraídas foram succionadas pelo tubo 2 (T_2) passando pelo filtro (F_1) para retenção de materiais sólidos em suspensão (Humina). Em seguida foi feita adição em linha de solução de HCl 3 mol L^{-1} (R_2) pelo tubo 3 (T_3) com fluxo de $1,0 \text{ mL L}^{-1}$. No Ponto de Confluência (PC) ocorre a diminuição do pH para 1,5 havendo fracionamento das SH pela precipitação

do ácido húmico, enquanto o ácido fúlvico permanece em solução. Esta mistura é recebida em um Frasco Coletor (FC) e por decantação separou-se o AH do AF. Por sifonação, o tubo 4 (T_4) succiona o AF através de um filtro (F_2) com fluxo de $5,0 \text{ mL min}^{-1}$ para uma coluna contendo resina XAD-8 a qual irá pré-concentrar e purificar o AF de impurezas de natureza não húmica e sais inorgânicos (MALCOLM, 1990). Mantidos todos os fluxos do sistema, o processo é contínuo até a perda de coloração escura do extrato húmico no frasco de extração. A seguir fecham-se os canais da bomba na seguinte ordem: T_1 , T_2 , T_3 e T_4 . A coluna contendo o AF é separada do sistema e faz-se eluição com solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (MALCOLM, 1990). Purifica-se os ácidos por diálise (TOWN & POWELL, 1992) para posterior caracterização.

As Figuras 2.4, 2.5 e 2.6 mostram detalhes do procedimento em fluxo proposto.



Figura 2.4 - Sistema em fluxo para extração, fracionamento das substâncias húmicas e purificação de ácido fúlvico de solos.

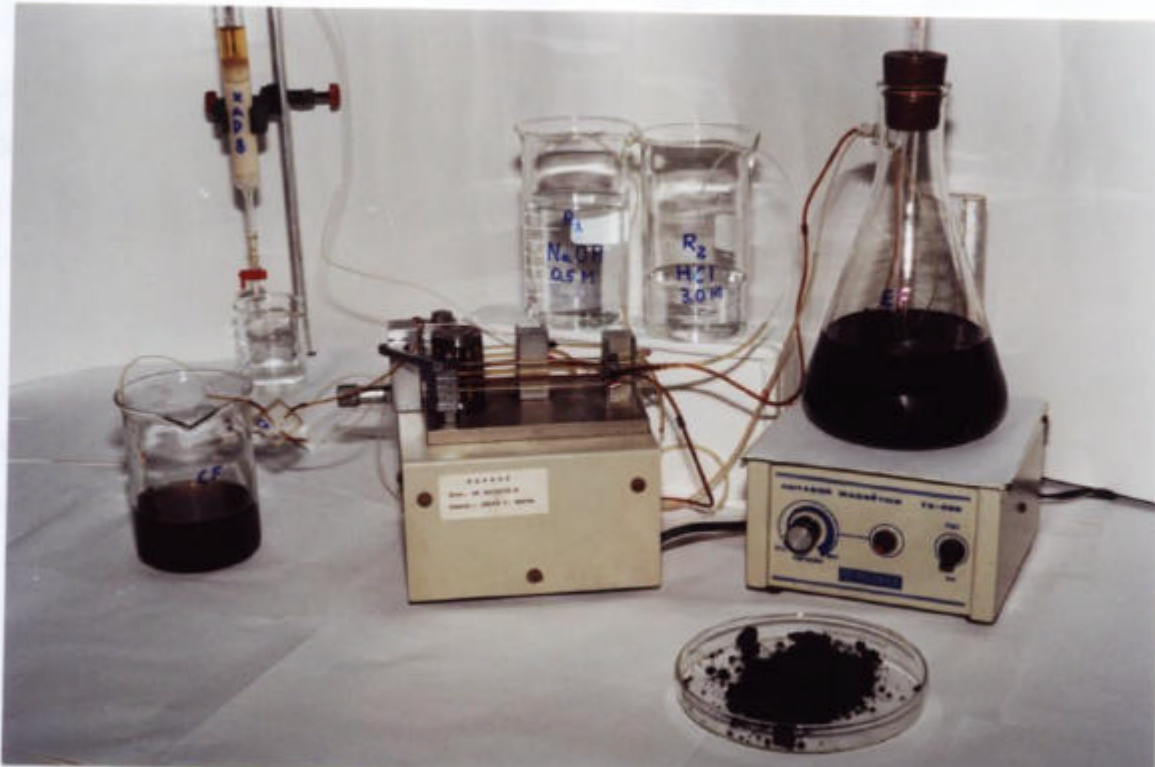


Figura 2.5 - Sistema em fluxo proposto para extração, fracionamento de substâncias húmicas e purificação de ácido fúlvico de solos (em funcionamento).



Figura 2.6 - Frasco de extração (FE), tubos de Tygon para bombeamento, bomba peristáltica, recipientes para armazenamento de soluções de NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (R_1) e HCl $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ (R_2).

2.2.3 - Purificação das substâncias húmicas

Para as caracterizações espectroscópicas e determinação da composição elementar dos ácidos fez-se diálise para a remoção do excesso de sais dissolvidos.

2.2.3.1 - Limpeza das membranas de diálise

Foi feita segundo procedimento descrito por TOWN & POWEL (1992). Após tratamento por 10 minutos com soluções de NaHCO_3 2 % (m/v) e EDTANa_2 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$), as membranas foram lavadas com água ($65 \text{ }^\circ\text{C}$) e estocadas a $-6 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.3.2 - Diálise dos ácidos húmico e fúlvico

Adicionaram-se os ácidos na membrana de diálise e fez-se imersão em água desionizada, deixando sob agitação magnética até teste negativo para Cl^- (teste com solução de AgNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Em seguida transferiram-se os ácidos para placas de Petri previamente taradas e secou-se em estufa de circulação forçada a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ até peso constante.

2.2.4 - Caracterizações

2.2.4.1 - Determinação do rendimento das extrações

Calculou-se o rendimento da extração baseado-se na relação entre a massa de solo seca submetida a extração (5,0 g) e a massa de material orgânico extraído.

2.2.4.2 - Determinação do teor de cinzas do material extraído

O teor de cinzas foi determinado seguindo o procedimento descrito por GRIFFITH & SCHNITZER (1975), calcinando-se o material a $750 \text{ }^\circ\text{C}$ por 4 horas em cadinho previamente tarado. O teor de cinzas é determinado pela relação entre massa de amostra seca submetida a calcinação e o resíduo de calcinação obtido.

2.2.4.3 - Espectroscopia na região do visível

Tomaram-se 20 mg de cada material, dissolveu-se em 10 mL de solução de NaHCO_3 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e fizeram-se leituras a 465 e 665 nm, obtendo-se a relação E_4/E_6 (GRIFFITH & SCHNITZER, 1975).

2.2.4.4 - Análise elementar

Carbono, hidrogênio e nitrogênio foram determinados em equipamento da Perkin-Elmer modelo 240-B, de acordo com recomendações do fabricante.

2.2.4.5 - Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros no IV foram obtidos de pastilhas com cerca de 200 mg de KBr, pulverizado e seco a $110 \text{ }^\circ\text{C}$ e 50 mg de cada material. As pastilhas foram obtidas submetendo a mistura (KBr/amostra) a pressão de 10 t cm^{-2} em pastilhador de 14 mm de diâmetro.

2.3 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 2.1 mostra resultados referentes ao rendimento, razão E_4/E_6 e composição elementar dos ácidos húmico e fúlvico extraídos por batelada e pelo procedimento em fluxo proposto.

A razão das absorbâncias a 465 e 665 nm (E_4/E_6) geralmente é utilizada na caracterização das substâncias húmicas e varia de acordo com o grau de humificação e condensação (SWIFT, 1996; PEURAVUORI & PIHLAJA, 1997). Os valores da razão E_4/E_6 obtidos para os ácidos húmico e fúlvico extraídos estão associados ao alto grau de condensação molecular e decomposição do material orgânico presente na amostra de turfa utilizada. A menor razão indica maior condensação molecular do AF em relação ao AH.

Tabela 2.1 - Comparação entre rendimento, razão E_4/E_6 e composição elementar dos ácidos húmico e fúlvico extraídos pelo procedimento em batelada e pelo procedimento em fluxo proposto.

Parâmetros	Procedimento em fluxo		Procedimento em batelada	
	AH	AF	AH	AF
Rendimento(%)	15,67	8,96	11,56	6,14
E_4/E_6	7,5	6,0	7,2	6,4
C (%)	52,60	49,85	50,51	45,24
H (%)	5,21	4,49	4,85	5,00
N (%)	0,60	1,11	0,72	1,16
O (%)*	41,59	44,56	43,92	48,60

* calculado por diferença livre de cinzas

A composição elementar está de acordo com dados da literatura (TOWN & POWEL, 1992; MALCOLM, 1990) e os resultados mostram características similares entre os ácidos extraídos por ambos procedimentos. A razão molar C/H corrobora os dados da razão E_4/E_6 indicando a maior aromaticidade do AF em relação ao AH.

Os espectros dos ácidos húmicos obtidos na região do infravermelho pelos dois procedimentos de extração são mostrados na Figura 2.7 e apresentaram as seguintes frequências de absorção:

- 1) estiramento OH de silicatos na região de 3700 cm^{-1} ;
- 2) estiramento OH (livre e ligado por ponte de hidrogênio) de álcoois e/ou fenóis e/ou ácidos carboxílicos na região de $3500 - 3300\text{ cm}^{-1}$;
- 3) estiramento CO de álcoois e/ou fenóis e SiO na região de ~ 1030 e 1080 cm^{-1} , indicando a presença de álcoois e impurezas de silicatos;
- 4) a presença de anéis aromáticos pode ser caracterizada devido estiramento CH de alquenos e/ou aromáticos acima de 3000 cm^{-1} , forte banda na região de 1630 cm^{-1} referente ao estiramento C=C de alquenos e/ou aromáticos e bandas na região de 900 cm^{-1} referente a deformação fora do plano da ligação CH de anéis aromáticos;

- 5) as bandas de absorção na região de 2930 cm^{-1} e o estiramento C-C na região de 1420 cm^{-1} indicam a presença de alifáticos;
- 6) a forte banda na região de 1710 cm^{-1} , pode ser atribuída ao estiramento C=O de cetonas e/ou ácidos carboxílicos.

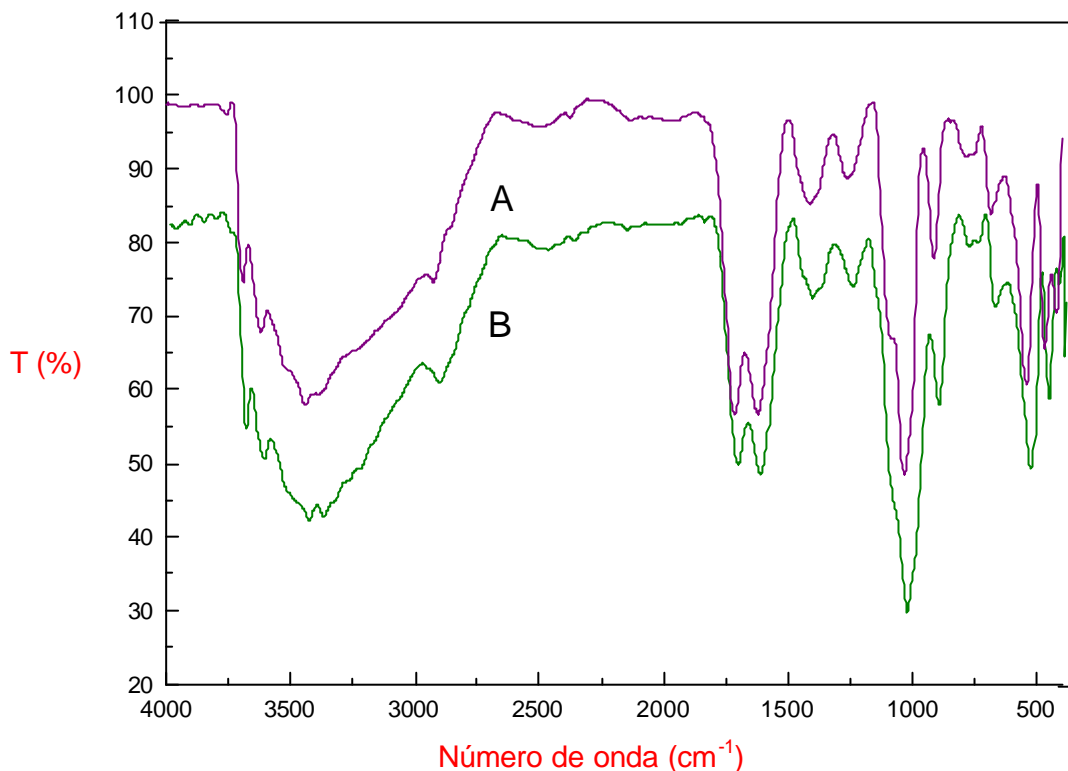


Figura 2.7 - Espectros de infravermelho de ácido húmico extraído de turfa utilizando procedimento em batelada recomendado pela International Humic Substances Society (A) e em fluxo (B), proposto neste trabalho.

Os espectros dos ácidos fúlvicos (Figura 2.8) mostram praticamente as mesmas frequências de absorção do AH, com exceção da banda cerca de 1700 cm^{-1} a qual encontra-se deslocada para frequências próximas de 1680 cm^{-1} podendo estar associada ao estiramento C=O de cetonas conjugadas. Estas observações, os valores da razão E_4/E_6 e composição elementar indicam a maior condensação da estrutura do AF em relação ao AH.

Também, verificam-se nos espectros do AF o desaparecimento da banda na região de 3700 cm^{-1} e diminuição da banda na região de 1000 cm^{-1} ,

associadas ao estiramento OH de silicatos, indicando a presença deste contaminante principalmente na fração húmica.

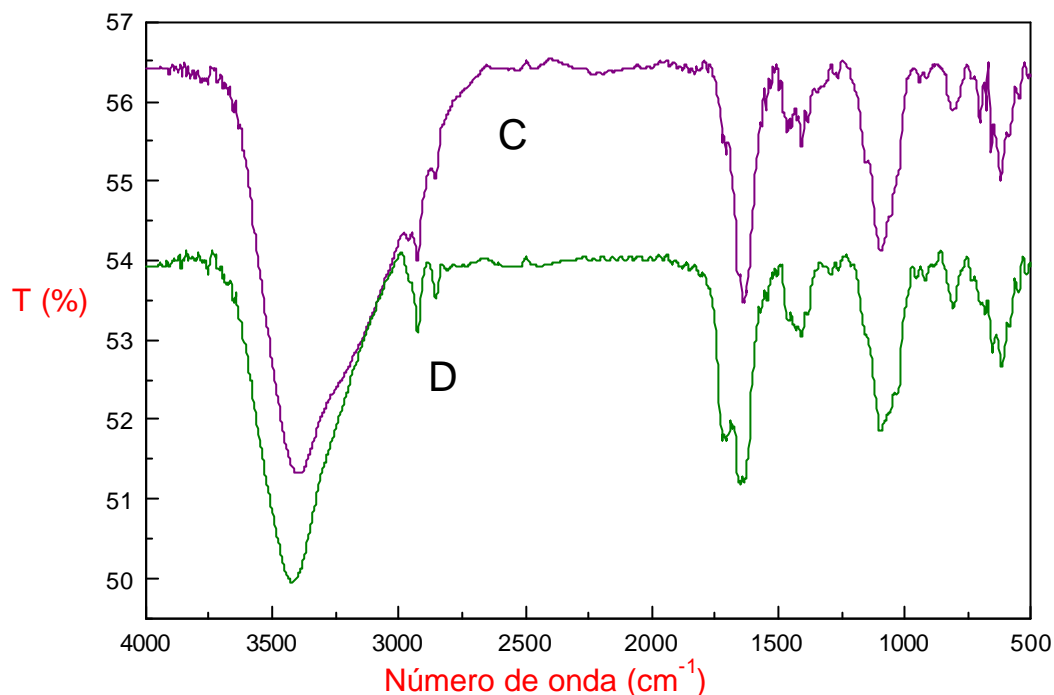


Figura 2.8 - Espectros de infravermelho de ácido fúlvico extraído de turfa utilizando procedimento em batelada recomendado pela International Humic Substances Society (C) e em fluxo (D), proposto neste trabalho.

2.4 - CONCLUSÕES

Procedimentos de extração e fracionamento de substâncias húmicas de turfa pelo procedimento em fluxo e batelada foram comparados. De acordo com as caracterizações espectroscópicas e pelos valores da composição elementar, os ácidos extraídos pelo procedimento em batelada, recomendado pela IHSS e, em fluxo, proposto neste trabalho, apresentaram similaridades.

A vantagem do procedimento em fluxo é o aumento do rendimento e redução do tempo de extração (em aproximadamente 2 horas), devido a contínua extração do material húmico pelo hidróxido de sódio o qual vai sendo renovado. Outra importante vantagem é que não apenas a extração mas

também o fracionamento das substâncias húmicas é feita sob atmosfera de nitrogênio minimizando assim, a ocorrência de alterações estruturais.

O procedimento em fluxo também dispensa o trabalho em etapas de filtração, centrifugação, ajuste de pH, transferência, manuseio de amostra e frações, elevando o rendimento e diminuindo o tempo total do processo. Esse procedimento é indicado para amostras com alto teor de matéria orgânica (p.e. turfas) e pode ser adaptado a outros procedimentos de extração/separação de ácidos húmico e fúlvico de solos.

CAPÍTULO 3

IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA INVERTASE EM SUPORTE PREPARADO COM SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

3.1- INTRODUÇÃO

3.1.1 - Imobilização de enzimas

Enzimas são catalisadores biológicos constituídos de proteínas ou glicoproteínas, os quais participam de reações nos organismos vivos. Possuem melhor desempenho em relação aos catalisadores inorgânicos devido sua alta especificidade, condições brandas de reação (temperatura, pH e pressão), baixo consumo de energia e alta atividade catalítica.

Para aproveitar as vantagens da catálise biológica em relação à catálise química, as enzimas têm sido imobilizadas em suportes e aplicadas em diversas áreas como industrial, ambiental, analítica, médica, química fina etc. (BRODELLIUS, 1978; SOLOMON, 1978; CHIBATA, 1978; KENT, *et al.* 1978; KENNEDY, *et al.* 1983; HULTIN, 1983; ROSEVEAR, 1984; CHEETHAM, 1985; LASKIN, 1985), conforme mostra a Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Algumas potenciais aplicações de enzimas imobilizadas (ZANIN, 1989).

Área de atuação	Aplicações
Química analítica	- desenvolvimento de biosensores;
Bioremediação	- degradação de pesticidas;
Química orgânica	- sínteses orgânicas;
Química fina	- produção de corantes (p.e. Shiconin) - produção de alcalóides (p.e. Ajmalicina) - isomerização da glicose;
Indústria alimentícia	- hidrólise da lactose; - resolução de racêmicos; - clarificação de bebidas;

Tabela 3.1 - continuação

Área de atuação	Aplicações
Indústria farmacêutica	- produção de antibióticos (p.e. penicilinas); - produção de esteróides (p.e. prednisolon); - produção de ácidos orgânicos (p.e. málico, cítrico);
Medicina	- desenvolvimento de órgãos artificiais (p.e. rim e pulmão); - tratamento de doenças (p.e. acatalessemia);
Conversão de biomassas	- desenvolvimento de produtos químicos pela conversão de substratos (p.e. produção do 2,3 butenodiol); - produção de combustíveis pela conversão de substratos (p.e. produção de butanol);

3.1.2 - Métodos de imobilização de enzimas

Existem várias formas para classificar os métodos de imobilização de enzimas. De acordo com a natureza da interação responsável pela imobilização, as enzimas imobilizadas podem ser classificadas em duas categorias (Figura 3.1):

- 1) imobilização por ligação; 2) imobilização por retenção física.

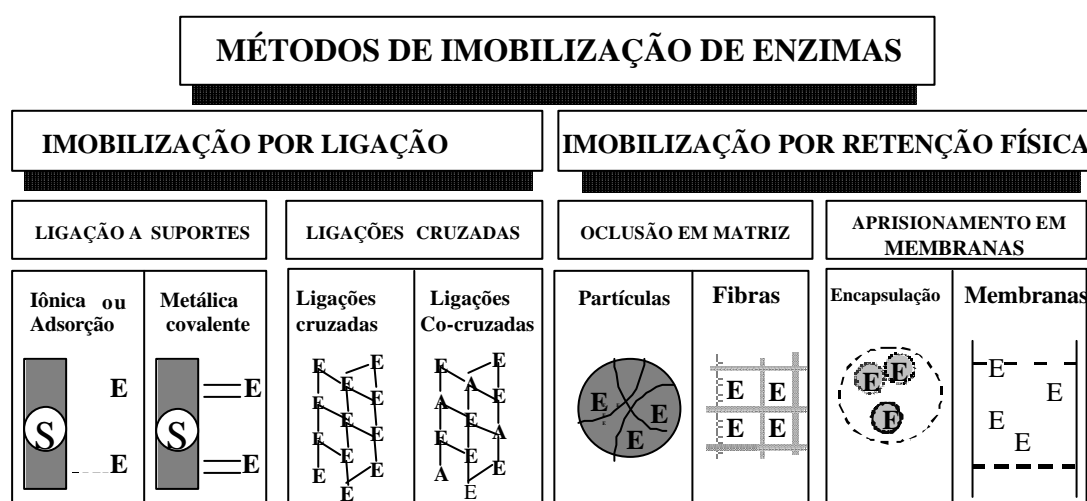


Figura 3.1 - Classificação dos métodos de imobilização de enzimas. *E*: enzima; *S*: suporte; *A*: albumina (Adaptada de BLANCH & CLARK, 1996).

Embora várias técnicas de imobilização possam ser usadas para uma mesma enzima, nenhuma delas pode ser considerada como um método geral, devido à diversidade estrutural das enzimas, substratos e produtos. Cada método tem suas limitações específicas e, para uma aplicação em particular, é necessário utilizar um procedimento simples e barato, o qual resulte numa boa atividade e estabilidade operacional. A Tabela 3.2 apresenta algumas das vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de imobilização (KENNEDY & CABRAL, 1987).

Tabela 3.2 - Comparação entre os métodos de imobilização de enzimas (KENNEDY & CABRAL, 1987).

Características	Ligações cruzadas	Adsorção física	Ligação iônica	Ligação metálica	Ligação covalente	Oclusão
Preparação	±	simples	simples	simples	difícil	difícil
Ligação	forte	fraca	±	±	forte	±
Atividade	baixa	±	alta	alta	alta	baixa
Recuperação do suporte	impossível	possível	possível	possível	rara	impossível
Custo	±	baixo	baixo	±	alto	±
Estabilidade	alta	baixa	±	±	alta	baixa
Aplicabilidade geral	não	sim	sim	sim	não	sim
Proteção microbiana	±	não	não	não	não	sim

± intermediário

A imobilização por métodos químicos (ligações covalentes) envolve modificações estruturais da enzima e pode causar desativação parcial quando o sítio ativo participa da ligação. Assim, a imobilização por esses métodos deve ser feita em condições mais brandas possíveis, de forma a minimizar esse problema. A ligação enzima-enzima ou enzima-suporte é muito forte e resulta em alta estabilidade operacional. A recuperação dos suportes é difícil ou impossível, principalmente no caso de suportes orgânicos.

A imobilização pelos outros três métodos (adsorção física, ligação iônica e metálica) pode ser feita facilmente em condições brandas, com ligações fracas enzima-suporte. A estabilidade operacional da enzima imobilizada é baixa, podendo ocorrer desprendimento da mesma. Como não há modificações na estrutura química da enzima, a atividade é praticamente mantida. Outra vantagem desses métodos é a possibilidade de recuperação do suporte quando a atividade diminui.

No método de oclusão não há ligação enzima-suporte e, por isso, deve-se esperar uma boa atividade, limitada a substratos e produtos de baixo peso molecular (KENNEDY & CABRAL, 1987).

Devido a vantagens como elevada atividade e estabilidade da enzima imobilizada, as quais não permitem perdas da enzima do suporte durante a sua aplicação, o método por ligação covalente é mais interessante do ponto de vista econômico e do desempenho reacional. Por isto, foi o método estudado neste trabalho.

3.1.3 - Suportes para imobilização de enzimas

Quando se considera a utilização de uma enzima imobilizada deve-se procurar o tipo de suporte mais adequado às características de aplicação no qual a enzima possa ser eficientemente imobilizada. De acordo com a composição, os suportes disponíveis podem ser classificados em orgânicos e inorgânicos e segundo do método de obtenção em naturais ou sintéticos (Figura 3.2).

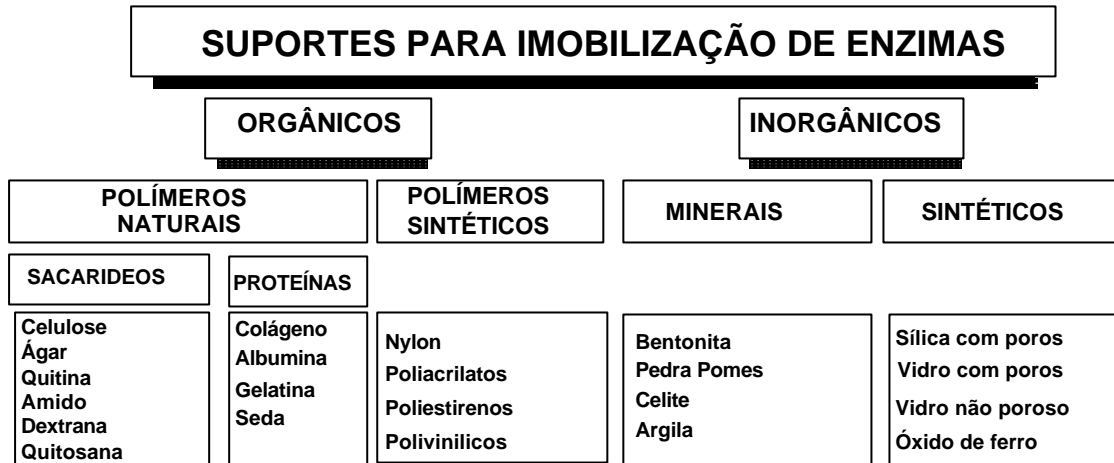


Figura 3.2 - Suportes para imobilização de enzimas (WISEMAN, 1985).

3.2 - OBJETIVOS E RELEVÂNCIA

3.2.1 - Preparação de um novo suporte para imobilização de enzimas utilizando-se substâncias húmicas

Embora sejam muitas as potenciais aplicações de enzimas imobilizadas (Tabela 3.1), os processos que as utilizam ainda são poucos. Segundo VICENTE (2000) e ZANIN (1989), isto deve-se principalmente aos seguintes fatores:

- 1) elevado custo de suportes e reagentes para imobilização;
- 2) baixa eficiência dos métodos de imobilização;
- 3) baixa estabilidade operacional da enzima imobilizada;

O suporte utilizado na imobilização de enzimas é um dos fatores de maior importância para o bom desempenho do preparado enzimático. As principais propriedades do suporte, estão relacionadas com suas características superficiais como, pH, carga, natureza hidrofóbica e hidrofílica, efeito redutor e presença de íons metálicos (ZANIN, 1989). Estas características são muito peculiares às das substâncias húmicas (HAYES, 1989). Assim, neste trabalho estudou-se a possibilidade de utilização das SH na preparação de um novo suporte para imobilização de enzimas visando reduzir os custos de preparação do suporte, elevar o rendimento e desempenho do preparado enzimático.

3.2.2 – Imobilização da enzima invertase no suporte preparado com substâncias húmicas e em suporte tradicional, visando a inversão da sacarose

Com o aumento significativo da população mundial, novas prioridades foram estabelecidas para aumentar a quantidade e a qualidade de alimentos disponíveis. Os alimentos industrializados surgiram causando redução de custos e aumento do tempo de conservação. A indústria passou a utilizar diversos compostos capazes de dar aos alimentos algumas características necessárias tais como antioxidantes, aromatizantes e adoçantes. Esses compostos são conhecidos como aditivos e podem ser de origem natural ou sintética. Dentre os aditivos, os edulcorantes (adoçantes) destacam-se por darem sabor doce aos produtos alimentícios. Dentre os adoçantes nutritivos, a sacarose é o mais empregado nas dietas alimentares (LENHINGER, 1990).

Entretanto, o consumo de adoçantes nutritivos, em especial da sacarose, nem sempre é bem-vindo para todas as pessoas, como é o caso dos diabéticos e obesos. Para estes casos foram desenvolvidos adoçantes não-nutritivos os quais estimulam as mesmas estruturas linguais (sabor) mas, sem aproveitamento calórico para o usuário. Dentre os adoçantes sintéticos mais empregados no Brasil, tem-se o acesulfame-K, aspartame, ciclamato e sacarina, fabricados pela Hoechst, Monsanto, Brasfanta e Pan Americana, respectivamente. Esses adoçantes foram liberados para o consumo no início da década de 80, sendo o mercado atualmente constituído por mais de 50 empresas, com uma estimativa superior a 40 milhões de consumidores (FUOCO, 1991).

Em relação a esses adoçantes o mais recomendado é o acesulfame-K, devido aos testes de inocuidade em seres humanos, ratos, macacos e coelhos terem demonstrados que o mesmo não é metabolizado, não afetando as funções do organismo humano (SINKELDMAN, *et al.* 1991). Os demais, aspartame, ciclamato de sódio e sacarina ainda são motivos de suspeitas e controvérsias quanto aos seus efeitos e potencial cancerígeno (RANNEY, *et al.*, 1976; O'BRIEN & GELARDI, 1981; AHMED & THOMAS 1992).

Devido à dificuldade de se encontrar um adoçante sintético, “sem restrições médicas”, o açúcar invertido (mistura equimolar de frutose e glicose) tem sido utilizado como uma possível alternativa. Dentre as vantagens de sua utilização pode-se citar:

- 1) maior solubilidade que a sacarose e elevada pressão osmótica;
- 2) maior capacidade de retenção de umidade;
- 3) maior doçura;

Por ser mais solúvel que a sacarose (DHAMPUR INVERTOS LTD, 1999) e ter elevada pressão osmótica, o açúcar invertido é muito utilizado na indústria de suco concentrado, leite condensado, geléias, gomas, frutas enlatadas, marmelada, sorvetes (10% açúcares totais) e em suspensões (remédios), reduzindo o ponto de congelação (cristalização) do produto final e as possibilidades de crescimento de microrganismos.

Devido a maior capacidade de retenção de umidade (poder umectante) e doçura, este, é muito utilizado na indústria de papel, tabaco e principalmente em produtos de padaria fermentáveis e não fermentáveis (pães, pães com frutas cristalizadas, bolos, bolachas, biscoitos e massas especiais) e confeitaria (cremes, chocolates) dando ao produto final maior maciez, aumento de massa, enriquecimento do sabor, menor tempo de cozimento ou de fermentação, menor consumo de açúcar, maior permanência do vigor de pães, dentre outras aplicações.

Também por ser mais doce que a sacarose (KIRK, 1994), o açúcar invertido pode ser utilizado para disfarçar o sabor amargo de suspensões (remédios) e principalmente na indústria de refrigerantes e refrescos, reduzindo a quantidade de açúcar no produto final.

A imobilização da invertase e sua aplicação em processos contínuos para produção do açúcar invertido é atraente, na medida em que se consegue um produto final de elevada pureza, típico do processo biológico e ainda sem causar problemas de águas residuárias, muito comum nos processos químicos. Em comparação com a hidrólise através da enzima solúvel, o método utilizando a invertase imobilizada pode reduzir bastante os custos do

processo pois, elimina etapas posteriores ao processo de hidrólise e principalmente por reduzir a quantidade de enzima necessária. Alta produtividade/estabilidade e o baixo custo para imobilização da invertase são requisitos fundamentais para competir com o processo tradicional (MANSFELD, *et al.* 1992).

3.2 - EXPERIMENTAL

3.3.1 - Coleta e preparo da amostra de solo

A amostra de turfa foi coletada até 20 cm de profundidade da superfície no município de Cananéia, interior do Estado de São Paulo. Após secagem ao ar por 3 dias, foi triturada em gral de porcelana e passada em peneira de 2 mm.

3.3.2 - Extração das substâncias húmicas - Procedimento recomendado pela IHSS (CLAPP, *et al.* 1993; WERSHAW, *et al.* 1990) – vide 2.2.2.1, pág. 14.

3.3.3 - Purificação das substâncias húmicas - vide 2.2.3, pág. 18.

3.3.4 - Caracterizações

3.3.4.1 - *Composição elementar* - vide 2.2.4.4, pág. 19.

3.3.4.2 - *Espectroscopia na região do infravermelho* - vide 2.2.4.5, pág. 19.

.

3.3.4.3 - *Titulação potenciométrica*

O teor de grupos funcionais das SH foi determinado por titulação potenciométrica conforme procedimento descrito por ALEIXO, *et al.* (1992).

3.3.5 - Preparação dos suportes

3.3.5.1 - Ativação de aminopropil sílica com substâncias húmicas (APTS-SiO₂-HS)

Em alíquota de 40 mL de solução de SH (1 mg mL⁻¹) adicionou-se 1,0 g de aminopropil sílica, ajustou-se o pH em 7,5 e o volume a 50 mL, deixando-se a mistura sob agitação mecânica por 24 horas à temperatura ambiente. A aminopropil sílica ativada com SH foi separada por centrifugação a 1478 g por 10 minutos e seca a 55 °C em estufa com renovação de ar. Fizeram-se lavagens do APTS-SiO₂-HS com água desionizada pH 4,5. Após curagem a 120 °C por 5 horas do APTS-SiO₂-HS, fizeram-se outras lavagens com água desionizada para verificar liberação das SH através de leituras espectrais nas regiões do ultravioleta e visível (KOOPAL, *et al.* 1998).

3.3.5.2 - Ativação de aminopropil sílica com glutaraldeído (APTS-SiO₂-GA)

Adicionaram-se 10,0 mL de solução de glutaraldeído 0,05 mol L⁻¹ a 1,0 g de aminopropil sílica, ajustou-se o pH em 7,5 e deixou-se a mistura sob agitação mecânica por 2 horas a temperatura ambiente (CHIBATA, 1978).

3.3.6 - Imobilização da enzima invertase

Adicionaram-se 20 mL de solução de invertase (5,0 mg mL⁻¹) aos suportes preparados (APTS-SiO₂-HS e APTS-SiO₂-GA), deixando-se as misturas sob agitação mecânica a temperatura ambiente por 48 horas. Filtrou-se a mistura à vácuo e separou-se o sobrenadante (enzima não imobilizada), para determinação da quantidade de enzima imobilizada. O resíduo (enzima imobilizada nos suportes) foi lavado com solução tampão acetato (0,05 molL⁻¹, pH 4,5) até teste negativo para invertase, feito por leituras espectrais nas regiões do ultravioleta e visível. A enzima imobilizada foi estocada a 4 °C em solução tampão acetato 0,05 mol L⁻¹ e pH 4,5.

3.3.7 - Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros na região do infravermelho do suporte APTS-SiO₂-HS e da invertase imobilizada no APTS-SiO₂-HS (APTS-SiO₂-HS-Enz), foram obtidos em pastilhas preparadas com KBr na razão 1:100 utilizando espectrômetro Nicolet 730 SX-FT.

3.3.8 - Medidas da atividade enzimática

A unidade de atividade (U) corresponde a quantidade de enzima que hidrolisa 1,0 μmol min⁻¹ de sacarose (0,146 mol L⁻¹) em solução tampão acetato, pH 4,5 e temperatura de 45 °C. Assim, a atividade enzimática foi determinada por medidas da velocidade de formação de açúcares redutores, durante a hidrólise da sacarose (0,146 mol L⁻¹) em solução tampão acetato, pH 4,5 e temperatura de 45 °C.

Os açúcares redutores (glicose e frutose) foram determinados colorimetricamente a 540 nm, utilizando-se a reação com ácido di-nitro salicílico (DNS) (SUMMER, 1921; MILLER, 1959). O método do DNS baseia-se na redução do ácido 3,5-di-nitro salicílico a ácido 3-amino-5-nitro salicílico e, ao mesmo tempo, a oxidação do grupo aldeídico ou cetônico a grupos carboxílicos, com o desenvolvimento de coloração laranja-marrom forte. O esquema das reações envolvidas estão ilustradas na Figura 3.3.

A concentração de glicose e frutose formada em função do tempo foi calculada utilizando-se curva de calibração, obtida através da determinação das absorvâncias de uma série de cinco concentrações padrões de glicose.

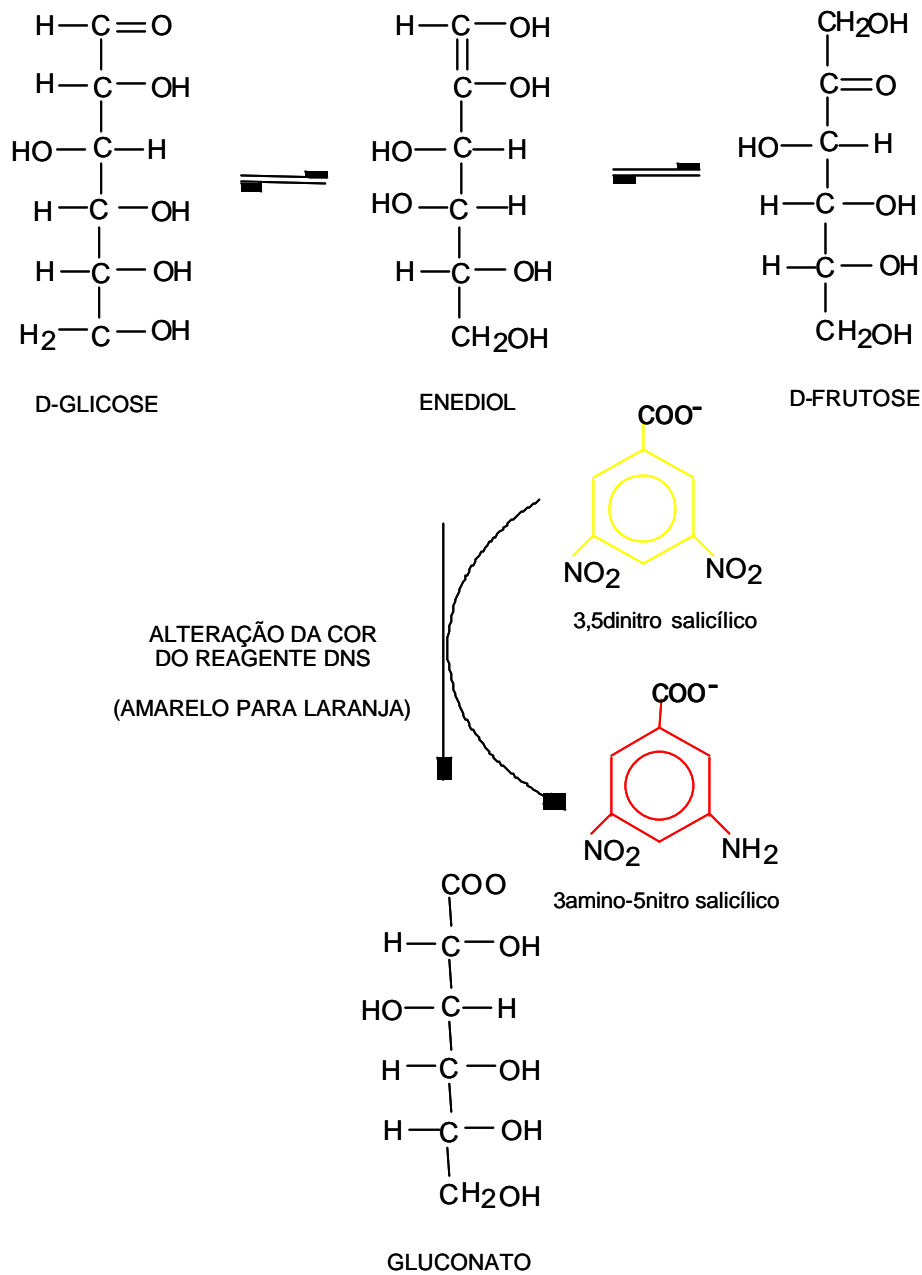


Figura 3.3 - Esquema das reações envolvidas no método com ácido dinitro salicílico (BERGAMASCO, 1989).

3.3.8.1 - Determinação da atividade pelo método das velocidades iniciais.

A atividade da enzima invertase tanto na forma livre como imobilizada foi determinada pelo método das velocidades iniciais, utilizando-se os reatores ilustrados na Figura 3.4.

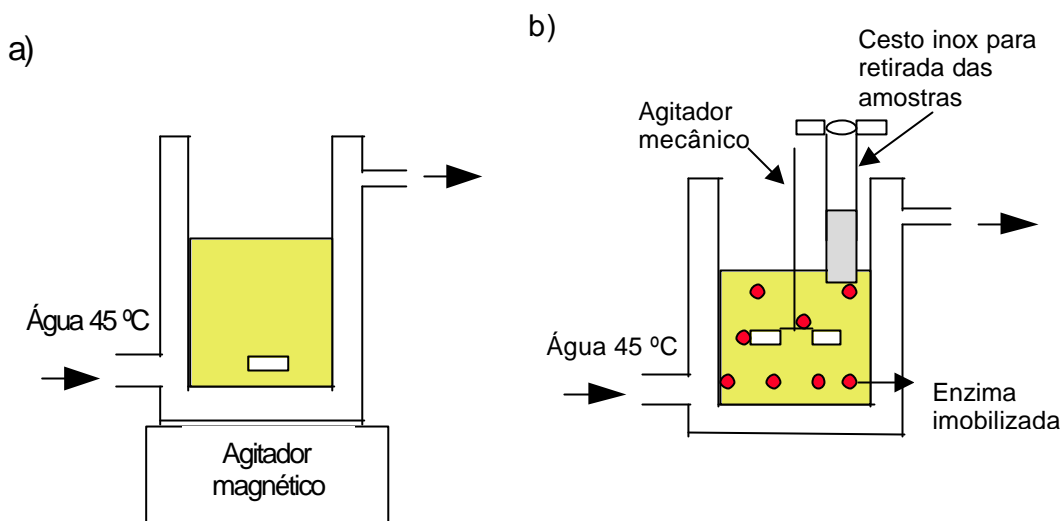


Figura 3.4 - Reatores em batelada (a) Enzima solúvel e (b) Enzima imobilizada.

3.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 - Caracterização das substâncias húmicas

As SH extraídas do solo de Cananéia apresentaram composição elementar de 47,92 % de carbono, 6,16 % de hidrogênio, 1,44 % de nitrogênio e 44,48 % de oxigênio. A quantificação dos grupos funcionais por potenciometria caracterizou uma distribuição de ácidos carboxílicos 55%, hidroxilas fenólicas 22 %, aminas terciárias 16 % e 7 % de aminas secundárias. Estes resultados auxiliaram na caracterização das interações entre as SH/aminopropil sílica e SH-aminopropil sílica/invertase.

3.4.2 - Ativação de aminopropil sílica com substâncias húmicas

A ativação da aminopropil sílica por SH foi feita em pH 7,5 para favorecer a reação entre as SH e os grupamentos amina presentes no APTS-SiO₂ pois, nesse pH as SH encontram-se em conformação estrutural estendida (SWIFT, 1989). Durante a reação de ativação, observou-se perda da coloração da solução das SH como consequência de sua adsorção/interação covalente com o suporte APTS-SiO₂. Após 24 horas sob

agitação mecânica, confirmou-se por quantificação, que toda SH adicionada (50 mg) reagiu com a aminopropil sílica. Após lavagens do biocatalizador com solução tampão acetato $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,5, não verificou-se liberação das SH. Isto corrobora os resultados obtidos por KOOPAL, *et al.* (1998) os quais estudaram a estabilidade do APTS-SiO₂-HS frente a diversos solventes e valores de pH.

3.4.3 - Imobilização da invertase no suporte APTS-SiO₂-HS

Devido a grande distribuição de massa molar e constituição química indefinida das SH, é pouco conhecido o tipo de interação ocorrida entre SH e proteínas (PFORTNER, *et al.* 1998). A imobilização da invertase foi feita em pH 4,5 pois, neste pH a enzima apresenta maior atividade (VICENTE, 2000; VASANTI, 1996).

Os espectros obtidos na região do infravermelho do APTS-SiO₂-HS e da enzima imobilizada no APTS-SiO₂-HS são mostrados na Figura 3.5. A região do espectro abaixo de 1300 cm^{-1} foi desconsiderada para análise, devido a forte banda de absorção na região de 1250 e 1000 cm^{-1} , associada ao estiramento assimétrico da ligação Si-O-Si, o qual mascara as demais bandas de absorção (GOETZ, *et al.* 1991).

Comparando-se os espectros do APTS-SiO₂-HS com o da enzima imobilizada no APTS-SiO₂-HS (ATPS-SiO₂-HS-Enz), verificam-se algumas diferenças quanto às intensidades das bandas de absorção a 3500 cm^{-1} (associadas ao estirando O-H de álcool e/ou fenóis e/ou ácidos carboxílicos), 2350 cm^{-1} (deformação axial associada ao grupo imina N=C) e 1700 cm^{-1} (estiramento C=O de grupos carbonílicos). A forte banda na região de 2300 cm^{-1} e diminuições das bandas nas regiões de 3500 e 1700 cm^{-1} do espectro da enzima imobilizada no APTS-SiO₂-HS, indicam a ligação covalente entre os grupos NH₂ da invertase com os grupos carbonílicos do suporte ativado (Figura 3.6).

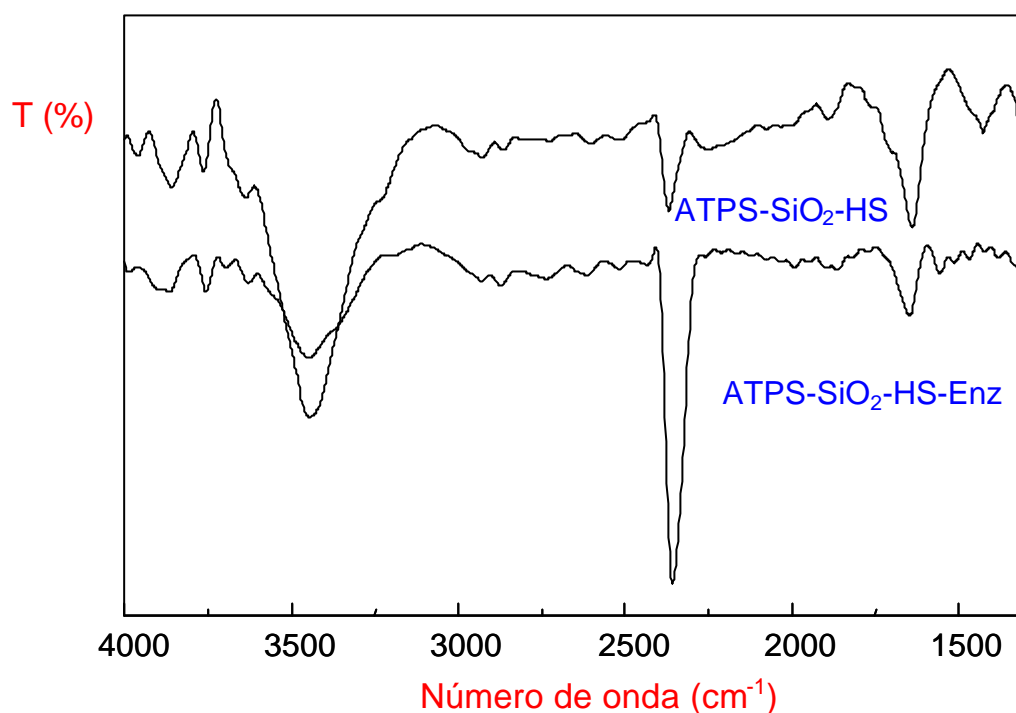


Figure 3.5 - Espectros na região do infravermelho do APTS-SiO₂-HS e da invertase imobilizada no APTS-SiO₂-HS (APTS-SiO₂-HS-Enz).

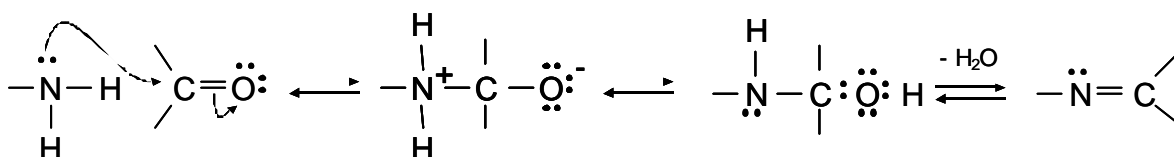


Figure 3.6 – Reação entre o suporte ativado e a invertase.

No processo de imobilização, as forças iônicas são também importantes e participam da interação HS/invertase. De acordo com PFORTNER, *et al.* (1998), existe uma relação entre a carga da proteína e sua afinidade pelas SH. Em pH 4,5 a invertase encontra-se negativamente carregada (Ponto isoelétrico = 4,0), permitindo a ocorrência de interações iônicas com os grupos protonados das SH (KOOPAL, *et al.* 1998).

3.4.4 - Determinação da quantidade da invertase imobilizada nos suportes.

Os valores da concentração de glicose e frutose formada em função do tempo durante a reação do substrato com a enzima solúvel, imobilizada no suporte tradicional e no suporte preparado com as substâncias húmicas, são mostrados nas Tabelas 3.3, 3.4 e 3.5, respectivamente.

Tabela 3.3 – Formação de glicose e frutose em função do tempo. Reação da sacarose com a invertase solúvel (teste para quantificação da invertase imobilizada).

Tempo (min.)	Absorbância (540 nm)	[G + F] (mg mL ⁻¹)	[G + F] (mmol mL ⁻¹)	Vol. diluição (5 x)	[G + F] (mmol mL ⁻¹)
3	0,165	0,3150	0,8751	4,3758	4,3758
6	0,215	0,3999	1,1097	5,5489	5,5489
9	0,291	0,5279	1,4660	7,3321	7,3321
12	0,408	0,7255	2,0154	10,0773	10,0773
15	0,492	0,8674	2,4096	12,0483	12,0483
18	0,535	0,9401	2,6114	13,0571	13,0571
21	0,631	1,1022	3,0619	15,3095	15,3095

Tabela 3.4 – Formação de glicose e frutose em função do tempo. Reação da sacarose com a invertase imobilizada no suporte tradicional (teste para quantificação da invertase imobilizada).

Tempo (min.)	Absorbância (540 nm)	[G + F] (mg mL ⁻¹)	[G + F] (mmol mL ⁻¹)	Vol. diluição (5 x)	[G + F] (mmol mL ⁻¹)
3	0,258	0,4743	1,3175	6,5875	6,5875
6	0,361	0,6477	1,7993	8,9965	8,9965
9	0,483	0,8550	2,3750	11,8750	11,8750
12	0,587	1,0310	2,8640	14,3200	14,3200
15	0,703	1,2276	3,4100	17,0500	17,0500
18	0,828	1,4391	3,9975	19,9875	19,9875
21	0,983	1,7031	4,7309	23,6545	23,6545

Tabela 3.5 – Formação de glicose e frutose em função do tempo. Reação da sacarose com a invertase imobilizada no suporte preparado com substâncias húmicas (teste para quantificação da invertase imobilizada).

Tempo (min.)	Absorbância (540 nm)	[G + F] (mg mL ⁻¹)	[G + F] (mmol mL ⁻¹)	Vol. diluição (5 x)	[G + F] (mmol mL ⁻¹)
3	0,271	0,4950	1,3750	6,8750	6,8750
6	0,361	0,6477	1,7992	8,9959	8,9959
9	0,487	0,8622	2,3950	11,9750	11,9750
12	0,578	1,0168	2,8244	14,1222	14,1222
15	0,676	1,1827	3,2853	16,4263	16,4263
18	0,767	1,3366	3,7128	18,5639	18,5639
21	0,838	1,4570	4,0472	20,2361	20,2361

A partir dos valores das Tabelas 3.3, 3.4 e 3.5 construíram-se as Figuras 3.7, 3.8 e 3.9 para obtenção do coeficiente angular das curvas e determinação das atividades da enzima solúvel e imobilizada nos suportes.

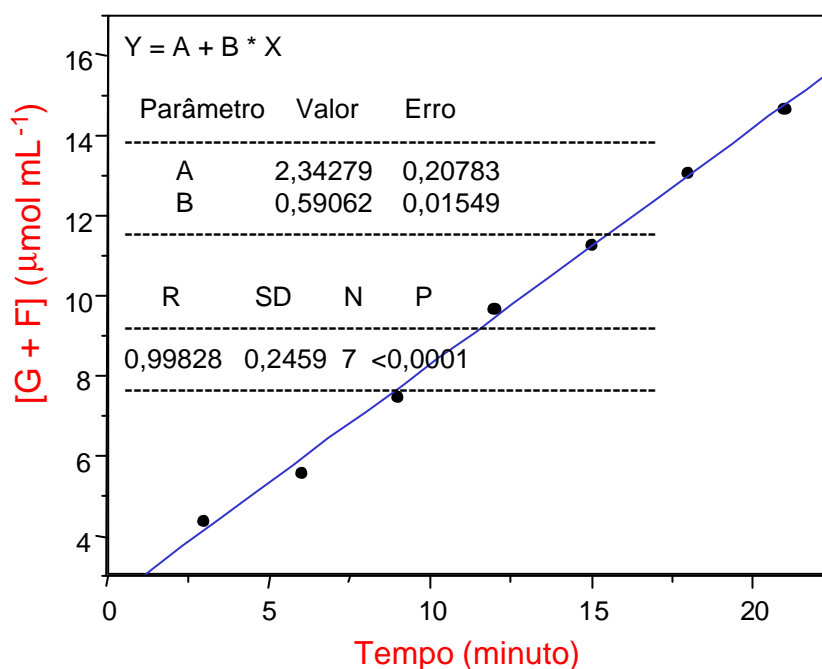


Figura 3.7 – Formação de glicose e frutose em função do tempo. Reação da sacarose com a invertase em solução (teste para quantificação da invertase imobilizada).

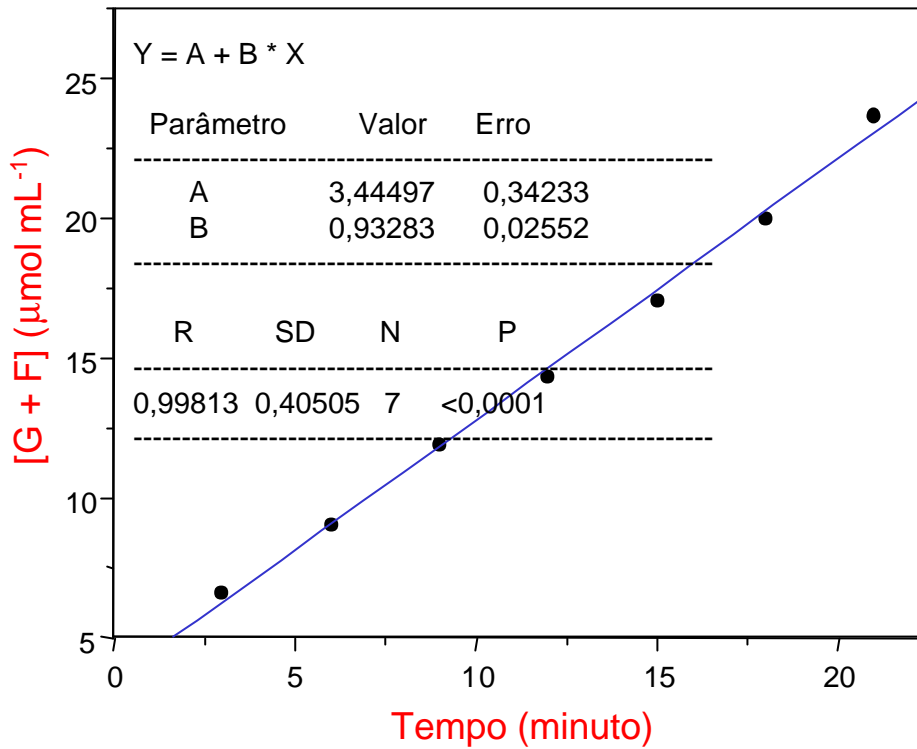


Figura 3.8 – Formação de glicose e frutose em função do tempo. Reação da sacarose com a invertase imobilizada no suporte tradicional (teste para quantificação da invertase imobilizada).

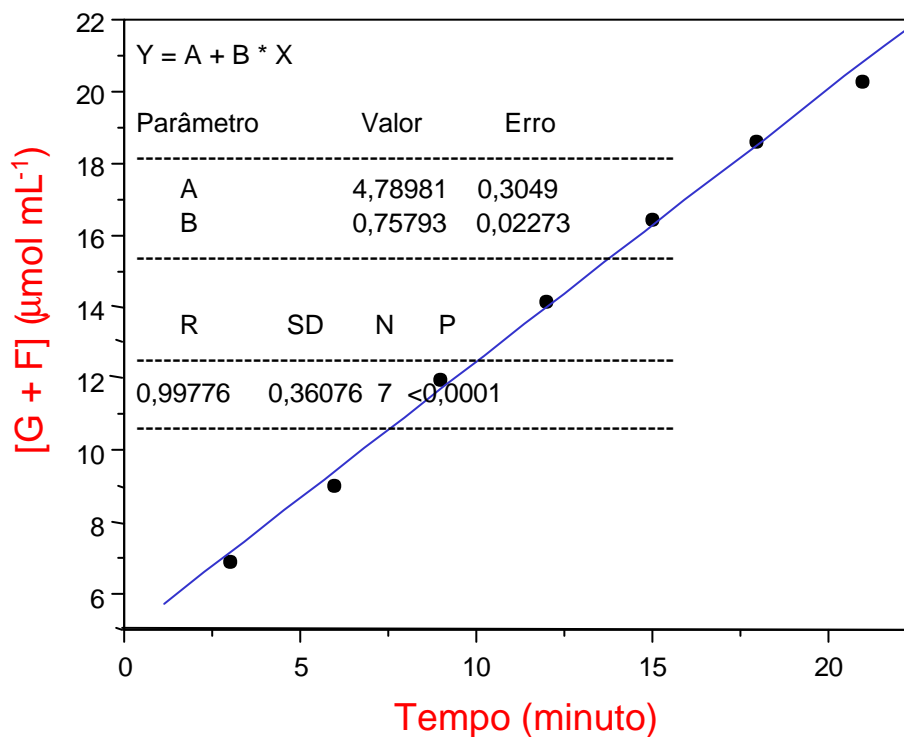


Figura 3.9 – Formação de glicose e frutose em função do tempo. Reação da sacarose com a invertase imobilizada no suporte preparado com substâncias húmicas (teste para quantificação da invertase imobilizada).

Assim, a partir do modelo de cálculos descritos no apêndice, determinou-se a quantidade de invertase imobilizada nos suportes conforme mostrado a seguir:

$$A_s = [0,59 (\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ substrato. min}) \times 50 (\text{mL de substrato})] / 0,025 (\text{mL de enzima}) = \mathbf{1180 \text{ U mL}^{-1} \text{ de enzima}}$$

$$A_{EST} = [0,93 (\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ substrato. min}) \times 50 (\text{mL de substrato})] / 0,100 (\text{mL de enzima}) = \mathbf{465 \text{ U mL}^{-1} \text{ de enzima}}$$

$$A_{ESSH} = [0,76 (\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ substrato. min}) \times 50 (\text{mL de substrato})] / 0,100 (\text{mL de enzima}) = \mathbf{380 \text{ U mL}^{-1} \text{ de enzima}}$$

Onde: A_s = atividade da enzima adicionada; A_{EST} é a atividade de enzima imobilizada no suporte tradicional e A_{ESSH} é a atividade de enzima imobilizada no suporte preparado com substâncias húmicas.

$$E_{IST} = (1180 \times 20) - [465 \times (20+2)] = \mathbf{13370 \text{ U g}^{-1}}$$

$$E_{ISSH} = (1180 \times 20) - [380 \times (20+2)] = \mathbf{15240 \text{ U g}^{-1}}$$

Onde: E_{IST} é a quantidade de enzima imobilizada no suporte tradicional e E_{ISSH} é a quantidade de enzima imobilizada no suporte preparado com substâncias húmicas.

3.4.5 - Determinação da atividade da invertase imobilizada nos suportes

As Tabelas 3.6 e 3.7 mostram a formação dos açúcares redutores em função do tempo durante a reação com as enzimas imobilizadas no suporte tradicional e suporte preparado com substâncias húmicas, respectivamente, levando-se em consideração a alteração do volume no reator durante a retirada das alíquotas.

Tabela 3.6 – Formação de glicose e frutose em função do tempo. Reação da sacarose com a invertase imobilizada no suporte tradicional (teste para determinação da atividade da invertase imobilizada).

Tempo (min.)	Abs. 540nm	[G+F] mg mL ⁻¹	[G+F] mmol mL ⁻¹	Vol. Dil. (25 x)	[G+F] Vol. reator	[G+F] mmol
0	0,002	0,020135	0,055931	1,398273	49,5	69,91365
3	0,211	0,371407	1,031687	25,79218	49,0	1276,713
6	0,239	0,418468	1,162411	29,06027	48,5	1423,953
9	0,27	0,47057	1,30714	32,6785	48,0	1584,907
12	0,328	0,568053	1,577924	39,4481	47,5	1893,509
15	0,388	0,668896	1,858046	46,45114	47,0	2206,429
18	0,458	0,786547	2,184854	54,62135	46,5	2567,203
21	0,558	0,95462	2,651723	66,29308	46,0	3082,628

Tabela 3.7 - Formação de glicose e frutose em função do tempo. Reação da sacarose com a invertase imobilizada no suporte preparado com substâncias húmicas (teste para determinação da atividade da invertase imobilizada).

Tempo (min.)	Abs. 540nm	[G+F] mg mL ⁻¹	[G+F] mmol mL ⁻¹	Vol. Dil. (25 x)	[G+F] Vol. reator	[G+F] mmol
0	0,002	0,020135	0,055931	1,398273	49,5	69,91365
3	0,035	0,075599	0,209998	5,249943	49,0	259,8722
6	0,079	0,149551	0,41542	10,3855	48,5	508,8897
9	0,148	0,265522	0,73756	18,439	48,0	894,2913
12	0,236	0,413426	1,148405	28,71012	47,5	1378,086
15	0,307	0,532757	1,479882	36,99704	47,0	1757,359
18	0,39	0,672258	1,867383	46,68458	46,5	2194,175
21	0,479	0,821843	2,282897	57,07241	46,0	2653,867

As Figuras 3.10 e 3.11, construídas com os dados das Tabelas 3.6 e 3.7, mostram a formação da glicose e frutose em função do tempo durante a reação com as enzimas imobilizadas no suporte tradicional e preparado com substâncias húmicas, respectivamente.

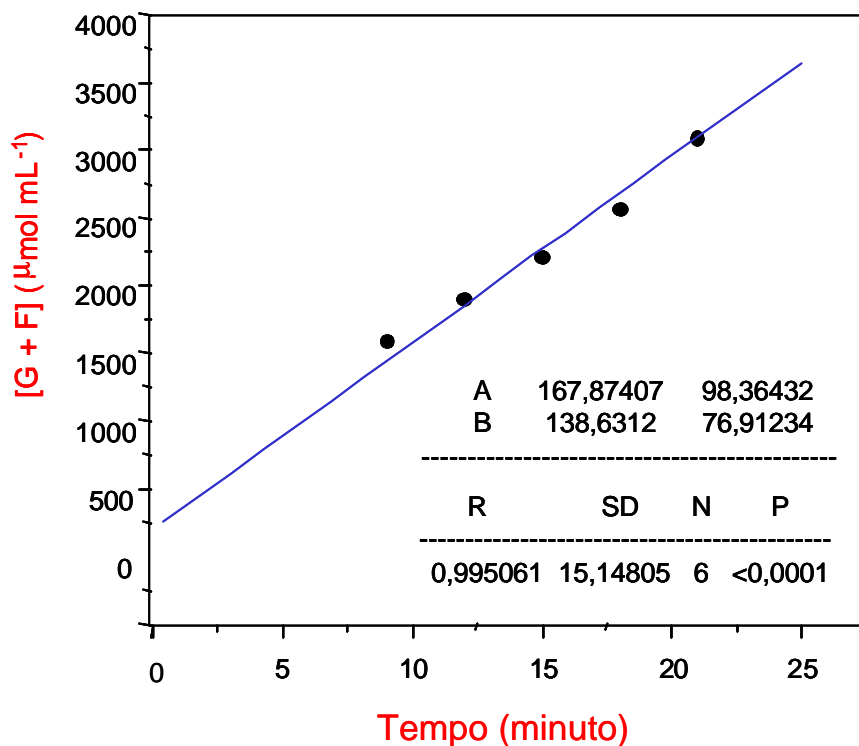


Figura 3.10 – Formação de glicose e frutose em função do tempo. Reação da sacarose com a invertase imobilizada no suporte tradicional (teste para determinação da atividade da invertase imobilizada).

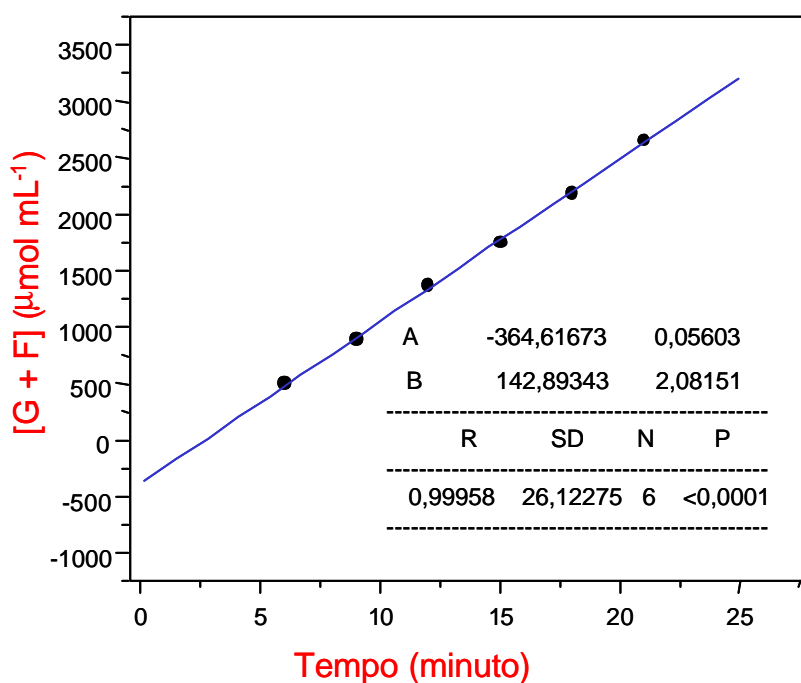


Figura 3.11 - Formação de glicose e frutose em função do tempo. Reação da sacarose com a invertase imobilizada no suporte preparado com substâncias húmicas (teste para determinação da atividade da invertase imobilizada).

Assim, a partir do modelo de cálculos descritos no apêndice, determinou-se a atividade da invertase imobilizada no suporte tradicional e no suporte preparado com substâncias húmicas.

$$A_{\text{EIST}} = [138,631270 (\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ substrato min}^{-1}) / 0,04239 (\text{g})] = \mathbf{3270 \text{ U g}^{-1} \text{ de suporte}}$$

$$A_{\text{EISH}} = [142,89343 (\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ substrato min}^{-1}) / 0,03861 (\text{g})] = \mathbf{3700 \text{ U g}^{-1} \text{ de suporte}}$$

3.4.6 - Comparação da quantidade e atividade da invertase imobilizada nos suportes

A quantidade de invertase imobilizada no APTS-SiO₂-HS foi 15200 U/g enquanto que no APTS-SiO₂-GA foi 13400 U/g. As atividades enzimáticas experimentais foram 3700 ± 100 e 3270 ± 80 U/g, para os sistemas APTS-SiO₂-HS e APTS-SiO₂-GA, respectivamente. Estes resultados estão associados a alta porcentagem dos grupos carbonílicos e carboxílicos presentes na estrutura das SH os quais favorecem as interações covalentes e iônicas, respectivamente. Comparando-se as atividades da invertase imobilizada em vários suportes (Tabela 3.8), pode-se inferir que a ativação da sílica aminopropil por SH é um método viável e interessante para a imobilização da invertase.

3.5 - CONCLUSÕES

Considerando o aumento da quantidade e da atividade da invertase imobilizada pelo novo suporte desenvolvido, em comparação a outros disponíveis na literatura (Tabela 3.8), este trabalho abre uma nova perspectiva de aplicação desse suporte para imobilização da invertase. Outra vantagem do suporte desenvolvido em relação aos tradicionais é a redução dos custos de sua preparação, pois as SH podem ser extraídas a baixo custo em solos ricos em matéria orgânica.

Tabela 3.8 - Atividade da invertase imobilizada em diversos suportes.

Suporte	Atividade (U g⁻¹ suporte)	Condições	Referências
Sílica magnética	469	55 °C, pH 4,5 0,292 mol L ⁻¹ sacarose	(GOETZ, <i>et al.</i> 1991)
Poli(tetraethyleno penta aminomethylene)	3050	25 °C, pH 4,5 0,146 mol L ⁻¹ sacarose	(MANSFELD & SCHELLEN- BERGER, 1987)
Celulose de Glicidil metacrilato PS-DVB	333 334 205	37 °C, pH 5,0 0,5 mol L ⁻¹ sacarose	(MAREK, <i>et al.</i> 1984)
Corn stover (200mm)	36000	40 °C, pH 4,5 0,4 mol L ⁻¹ sacarose	(MONSANT, <i>et al.</i> 1984)
Poli(aminomethyl stirene) (600mm)	1200	25 °C, pH 5,0 0,146 mol L ⁻¹ sacarose	(MANSFELD, <i>et al.</i> 1992)
Sílica aminopropil ativada por substâncias húmicas (150-300mm)	3700	45 °C, pH 4,5 0,146 mol L ⁻¹ sacarose	Presente trabalho
Sílica aminopropil ativada por glutaraldeído (150-300mm)	3300	45 °C, pH 4,5 0,146 mol L ⁻¹ sacarose	Presente trabalho

CAPÍTULO 4

EXTRAÇÃO E TROCA DE ESPÉCIES METÁLICAS EM EXTRATOS AQUOSOS DE TURFA MEDICINAL

4.1 – INTRODUÇÃO

Turfas são formadas continuamente por um complexo processo de decomposição e humificação de resíduos de plantas através de oxidação microbológica durante milhares de anos (MARTHUR & FARNHAM, 1985; ROSA, 1998a). Existem cerca de 500 milhões de hectares de turfa no planeta (aproximadamente metade da área da Europa), os quais contribuem com cerca de $0,67 \times 10^{12}$ toneladas de carbono (BRAMRYD, 1985). Devido seu elevado teor de humina, ácido húmico e ácido fúlvico, as turfas possuem interessantes propriedades físico-químicas as quais possibilitam sua aplicação em diversas áreas como por exemplo, tratamento de águas (BROWN, *et al.* 2000; BAILEY *et al.* 1999), monitoramento da poluição ambiental (VIRARAGHAVAN, 1993; MCLELLAN & ROCK, 1986), produção de combustíveis (HATCHER, *et al.* 1983), medicina e medicina veterinária (BEER, *et al.* 2000).

Baseado em suas características anti inflamatórias (p.e. reumatismo, artrite, dermatite), anti viral e estrogênica, muitos pacientes têm utilizado e obtido resultados positivos em terapias a base de turfas há centenas de anos. A terapia com turfas teve início na Grécia, a qual possui hoje centros equipados (“Spas”) para o tratamento, conforme mostra a Figura 4.1 (NASTOS & GARAGOUNIS, 2000).





Figuras 4.1 – Fotos sobre terapia a base de turfas em um “Spa” localizado na Grécia (NASTOS & GARAGOUNIS, 2000).

Recentemente, também foi confirmada a aplicabilidade de turfas em tratamentos de sinusite crônica (STANKIEWCZ, *et al.* 2000) e em medicina veterinária (GRYBAN, *et al.* 2000; STEPCHENKO & TIKHONOV, 2000; CSICSOR & TOTH, 2000). GRYBAN, *et al.* (2000) estudaram a utilização de preparados de turfa para prevenir doenças em potros e STEPCHENKO & TIKHONOV (2000) verificaram a redução de complicações após vacinação em frangos utilizando medicamentos alternativos a base de turfa. CSICSOR & TOTH (2000) também verificaram a possibilidade da utilização de turfas ao invés de antibióticos geralmente utilizados em práticas veterinárias e os quais provocam alguns problemas para a saúde dos animais como por exemplo, alergia, diminuição da resistência e do sistema imonológico.

4.2. OBJETIVOS E RELEVÂNCIA

Embora hajam experiências positivas com tratamentos a base de turfas, existem apenas limitados conhecimentos a respeito de suas propriedades e componentes medicinais (KLÖCKING, 1994). Especula-se que seus efeitos estariam associados ao alto teor de substâncias húmicas (SH) e suas espécies metálicas (KLÖCKING, 1994; GRYBAN, *et al.* 2000; CSICSOR & TOTH, 2000; ROSA, *et al.* 2001). Entretanto, o enriquecimento natural de metais em banhos de turfas (NAUCKE, 1980) e sua possível (bio) disponibilidade durante o tratamento tem sido pouco investigada (BEER, *et al.* 1999). Estes autores verificaram a extração e o acúmulo de metais em pacientes durante o tratamento com turfas. Também, metais pesados em extratos aquosos de turfas medicinais foram recentemente caracterizados (BURBA, *et al.* 2001a). Para tal, eficientes procedimentos para especiação, diferenciação e extratibilidade de metais são requeridos.

Nesta etapa do trabalho, a cinética de extração do Material Orgânico Dissolvido (MOD) e as espécies metálicas de turfas utilizadas

terapeuticamente foram caracterizadas. Particularmente, a disponibilidade e a cinética de troca por íons Cu(II) das espécies metálicas presentes em extratos aquosos de turfas foram estudadas. Para tal, procedimentos analíticos combinando eficientes métodos de diferenciação e determinação foram utilizados.

4.3 - EXPERIMENTAL

4.3.1 - Amostras de turfas medicinais

Foram obtidas da empresa "Großes Gifhorner Moor" - Sassenburg/Norte da Alemanha, coletadas em 2 diferentes pontos de um mesmo campo. Os teores de água das amostras foram determinados por secagem em estufa de circulação de ar renovada a 110 °C por 4 horas e apresentaram 77,6 e 79,2 % (m/m) de água, para as amostras 1 e 2, respectivamente.

4.3.2 - Digestão com água régia

Utilizou-se o procedimento padrão convencionalmente utilizado por BURBA, *et al.* (2001a). Tomaram-se 0,5 g de amostra de turfa previamente seca a 110 °C, adicionaram-se 21 mL de solução HCl 30 % (suprapur) e 7 mL de solução de HNO₃ 65 % (suprapur) em um béquer de quartzo (200 mL). Aqueceu-se cautelosamente a mistura até 100 °C e depois até 120 °C. Em seguida, o material remanescente foi digerido pela adição de mais 20 mL de solução de HNO₃ (suprapur) e refluxo por 3 h. Finalmente, o digerido foi diluído com água desionizada (MilliporeQ-System) até volume final de 100 mL. Pequenos resíduos de turfa ainda remanescentes foram removidos por filtração.

4.3.3 - Extração da matéria orgânica e metais das amostras de turfas

Uma amostra de 200 g de turfa foram suspensas em 500 mL de água desionizada e cerca de 3,0 mL de solução 2,0 mol L⁻¹ de NaOH (suprapur) para ajustar o pH em 4,5. A mistura foi agitada e o pH monitorado durante o experimento. Depois de diferentes períodos de tempo (5, 10, 15, 30 60 e 120 minutos), alíquotas (cerca de 50 mL cada) foram filtradas através de papel de filtro qualitativo e posteriormente em membrana 0,45 µm para remover material particulado. As frações foram utilizadas para caracterização por espectroscopia na região do UV/vis e determinação dos metais. Utilizando o mesmo procedimento, a influência do pH (5,0) e diferentes extratores (soluções de CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) 0,01 mol L⁻¹ e ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) 0,01 mol L⁻¹) foram estudados.

4.3.4 - Determinação dos metais

Os metais foram determinados nos extratos das amostras de turfa por espectrometria de absorção (EAA- PyeUnicamSP9) e emissão (ICP-OES-spectrometer Thermo Jarrel Ash IRIS AP) atômica, dependendo do analito de interesse e sua concentração, seguindo as recomendações dos fabricantes e da literatura (WELZ & SPERLING, 1997).

4.3.5 - Caracterização do material orgânico dissolvido (MOD) utilizando-se espectroscopia nas regiões do UV/vis

O material orgânico dissolvido (MOD) dos extratos de turfa foram caracterizados por medidas de absorbância nos comprimentos de onda a 254 e 436 nm utilizando um espectrômetro Varian Cary 1/3.

4.3.6 - Troca entre espécies metálicas da turfa por íons Cu(II)

Determinou-se a concentração do MOD em um filtrado do extrato aquoso da turfa (50,0 g de turfa seca e 200,0 mL de água pH 4,5)

utilizando-se método de combustão catalítica em equipamento Shimadzu-5000. Posteriormente, adicionaram-se em intervalos de 30 minutos diferentes quantidades de íons Cu(II) (5, 10, 20, 30, 50, 100, 500 and 1000 mg) e após cada intervalo de tempo, alíquotas foram filtradas e a concentração dos metais determinadas (BURBA, *et al.* 2001b).

4.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Disponibilidade de metais em amostras de turfa medicinal utilizando diferentes extratores

De acordo com BEER, *et al.* (1999), as propriedades terapêuticas das turfás podem estar associadas à extratibilidade de suas espécies metálicas. Neste caso, a disponibilidade dos metais em amostras de turfás medicinais seria um importante parâmetro a ser considerado no tratamento. A Tabela 4.1 mostra os resultados da concentração total e da concentração disponível dos metais (Al, Fe, Mn, Sr, Zn, Ni, Cd, Co, Pb e Cr) em amostras de turfás utilizando diferentes extratores. A disponibilidade dos metais foram calculadas considerando a concentração dos metais após 60 minutos de extração e a concentração total dos metais nas amostras, determinados após digestão com água régia.

A concentração total dos metais na amostra de turfa 2 foram maiores do que na amostra turfa 1 para todos os metais estudados (Al, Cd, Co, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb, Sr e Zn), com exceção do Pb. Provavelmente, esses resultados estão associados ao maior teor de SH nessa amostra de turfa, o que resulta em sua maior capacidade de complexação (ROSA, *et al.* 2001). Isto foi observado durante a digestão por água régia da amostra de turfa 1 pois, houve formação de espuma característica da degradação de carboidratos, indicando sua menor humificação (STEVENSON, 1994).

A Tabela 4.1 mostra também que o extrator utilizado influencia fortemente na disponibilidade dos metais presentes e a seguinte ordem decrescente de extração pode ser estabelecida: DTPA, EDTA >> solução de CaCl_2 > água pH 5,0 > água pH 4,5. Água e solução de CaCl_2 remobilizaram os metais presentes em maiores quantidades (Al, Fe, Mn, Sr, Zn e Ni) das amostras de turfa, enquanto, as soluções de EDTA e DTPA extraíram também outros metais (Cd, Co e Pb) presentes em menores concentrações. Crômio praticamente não foi disponibilizado pelos extratores utilizados provavelmente devido sua forte ligação às SH (BURBA, 1998).

Baseado nos resultados listados na Tabela 4.1, as seguintes ordens de disponibilidades dos metais em função dos extratores puderam ser caracterizadas: Soluções de EDTA e DTPA: Mn >> Zn > Pb > Cd > Ni > Co > Fe > Sr, Al; Solução de CaCl_2 : Sr >> Mn > Ni > Zn > Cd > Al > Fe; Água: Mn > Sr > Ni > Zn > Al > Fe. Comparando a disponibilidade dos metais em função dos extratores, pode-se concluir que o Mn foi o metal mais disponível enquanto Fe e Al apresentaram menor disponibilidade. Da mesma forma, considerando que geralmente o tratamento tem sido feito em suspensões aquosas, os metais os quais poderiam influenciar na terapia com turfas seriam Al, Fe, Mn, Sr e Ni, pois, apenas esses metais foram extraídos por água.

Tabela 4.1 – Metais em turfas medicinais: concentração total^{a)} e porcentagem de metais disponibilizados utilizando-se diferentes extratores^{b)}.

Metal	Conc. total ^{a)} (mg g ⁻¹)	Turfa 1					Conc. total ^{a)} (mg g ⁻¹)	Turfa 2				
		% de metal extraído em relação a concentração total ^{b)}						% de metal extraído em relação a concentração total ^{b)}				
		água pH 4,5	água pH 5,0	CaCl ₂ (0,01 molL ⁻¹) pH 4,5	EDTA (0,01 molL ⁻¹) pH 4,5	DTPA (0,01 molL ⁻¹) pH 4,5		água pH 4,5	água pH 5,0	CaCl ₂ (0,01 molL ⁻¹) pH 4,5	EDTA (0,01 molL ⁻¹) pH 4,5	DTPA (0,01 molL ⁻¹) pH 4,5
Al	851,2	0,12	0,86	2,15	7,66	7,45	1278,5	0,06	1,48	0,68	3,61	4,17
Fe	2276,8	0,12	0,78	0,58	13,77	13,86	3932,5	0,04	4,72	0,68	16,58	17,83
Mn	74,6	3,38	7,62	5,69	99,49	100,61	88,9	8,15	11,19	7,22	92,58	68,92
Sr	29,7	1,54	1,36	19,15	4,88	7,52	51,0	3,96	3,90	20,28	4,73	8,48
Zn	81,0	0,32	0,45	3,21	77,20	69,79	96,0	0,18	0,58	0,76	54,46	43,13
Ni	2,1	1,39	1,14	3,63	25,76	28,65	3,7	1,20	2,53	23,10	19,08	31,97
Cd	0,5	----	----	2,88	39,84	40,31	0,5	----	----	3,17	31,40	28,27
Co	0,9	----	----	----	23,47	24,81	1,3	----	----	----	21,28	20,91
Pb	1,9	----	----	----	64,94	67,43	6,5	----	----	----	65,66	57,77
Cr	0,9	----	----	----	----	----	2,5	----	----	----	----	----

^{a)} determinados por EAA ou ICP-OES após digestão com água régia; ^{b)} valores de porcentagem expressos em relação concentração total; (----) – metal não detectado.

Também, de acordo com a Tabela 4.1 observa-se que o pH exerce forte influência na remobilização dos metais. Para as amostras de turfa 1 e 2, e extração utilizando água em pH 4,5 pode-se estabelecer a seguinte ordem de remobilização: $Mn > Zn > Sr > Fe = Al$. Entretanto, em extrato aquoso com pH 5,0 verificou-se a ocorrência do aumento da remobilização para todos os metais com exceção de Sr. Em pH 5,0 caracterizou-se a seguinte ordem de remobilização: $Mn > Sr > Fe > Al > Zn$. O aumento da extração de Fe e Al provavelmente está associado ao aumento da extração das SH em pH 5,0. Ao contrário, o teor praticamente constante de Sr extraído em pH 4,5 e 5,0, indicam que esse metal está fracamente ligado às SH podendo ser facilmente remobilizado em água, independentemente do pH.

4.4.2 Cinética da extração de espécies metálicas e material orgânico dissolvido (MOD) em turfas medicinais

As Figuras 4.2a e 4.2b mostram a influência do tempo na extração do MOD e de espécies metálicas das amostras de turfa em pH 4,5 e 5,0.

Verifica-se pela Figura 4.1a que todos os metais estudados (Al, Fe, Mn, Sr e Zn) tiveram um comportamento similar de extração em função do tempo. Entretanto, cada metal atinge o equilíbrio de extração em diferentes tempos. Mn e Zn extraídos atingem o equilíbrio após 15 minutos de extração, enquanto Al e Fe após 30 minutos. Estrôncio foi praticamente extraído em cerca de 10 minutos. Obviamente, estes resultados mostram pouca diferença entre a cinética de extração para os metais estudados. Entretanto, a Figura 4.1b mostra que o aumento do pH altera significativamente o equilíbrio da extração dos metais disponíveis. Além das alterações da disponibilidade dos metais e da extração do MOD, a cinética da extração dos metais é significativamente alterada. Para todos os metais a cinética é consideravelmente mais lenta e o equilíbrio é atingido em cerca de 60 minutos.

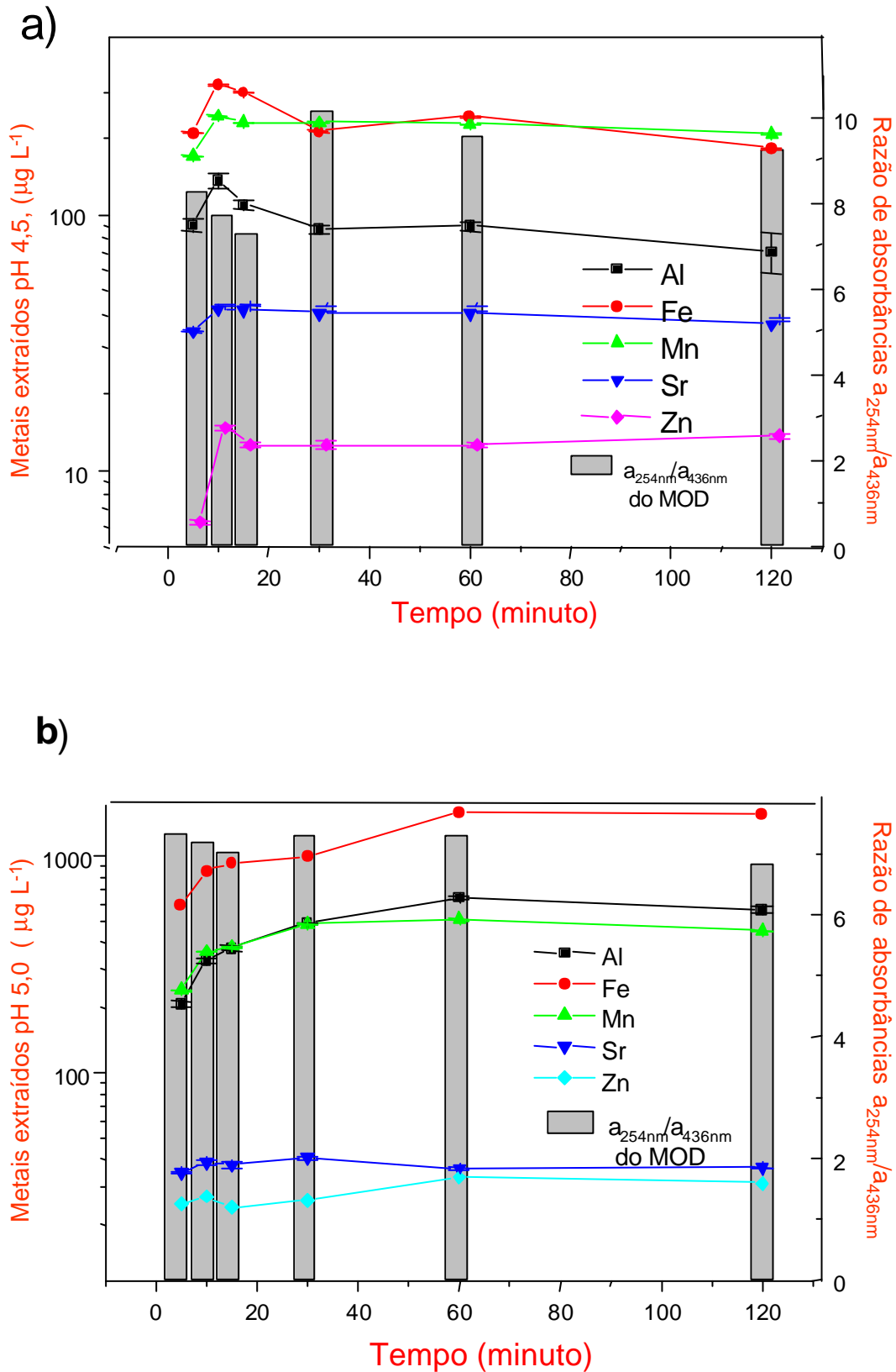


Figura 4.2 – Razões das absorvâncias $a_{254\text{nm}}/a_{436\text{nm}}$ e metais extraídos em função do tempo nas amostras de turfa. a) 200 g de turfa 1, 500 mL água desionizada pH 4,5; b) 200 g de turfa 1, 500 mL água desionizada pH 5,0.

Razões de absorvâncias $a_{254 \text{ nm}} / a_{436 \text{ nm}}$ têm sido frequentemente utilizadas na caracterização das SH (ABBT-BRAUN, 1992; ROSA, *et al.* 2001). As Figuras 4.2a e 4.2b mostram que após 30 minutos a extração do MOD atinge o equilíbrio. Assim, pode-se sugerir que a extração das espécies metálicas está diretamente associada com a extração do MOD, especialmente Al e Fe. As razões $a_{254 \text{ nm}} / a_{436 \text{ nm}}$ do MOD extraído em 5 e 10 minutos (Figura 4.2a) são um pouco menores, provavelmente devido provavelmente à diferenças entre as características do material orgânico extraído nesses tempos. ASTER (1998) verificou que moléculas maiores (100-50 kDa) possuem maiores valores de absorvância em 254 nm ao contrário de moléculas menores. Assim, provavelmente, no início do processo a extração de moléculas maiores são predominantes em relação às menores. Estas observações estão de acordo com novo conceito sobre a estrutura das SH em solução, o qual sugere as SH sendo formadas por moléculas de diferentes tamanhos agregadas entre si (PICCOLO, 2000).

4.4.3 - Troca entre metais presentes na turfa por íons Cu(II) e soluções de DTPA e EDTA

A determinação da concentração total dos metais em amostras de turfás fornece limitadas informações em relação às suas disponibilidades. Assim, a disponibilidade de espécies metálicas presentes em turfás pode ser caracterizada utilizando um metal fortemente competitivo como por exemplo íons Cu(II) (BURBA, 1998). A Figura 4.3 mostra a troca de espécies metálicas da amostra de turfa (Al, Fe, Mn e Sr) por íons Cu(II). É possível verificar que 500 mg de íons Cu(II) adicionados à suspensão aquosa de turfa foram suficientes para trocar os metais complexados na turfa nas seguintes porcentagens: 21,76 (Al), 3,94 (Fe), 79,00 (Mn) e 81,95 % (Sr). O cálculo foi feito considerando-se a concentração total de cada metal na amostra de turfa. De acordo com os resultados, Mn e Zn foram mais trocados com íons Cu(II) que Fe e Al. Estes resultados são corroborados por outros estudos os quais mostram que Fe e Al possuem forte ligação em amostras ricas em material

húmico (BURBA, *et al.* 2001b; STEVENSON, 1994). ROCHA, *et al.* (2001) também verificaram similar comportamento de troca entre espécies metálicas e hidrocolóides ricos em material húmico presentes em águas do lago *Venner Moor* – Münster/Alemanha. Assim, pode-se sugerir similaridades da troca de metais nessas duas diferentes matrizes.

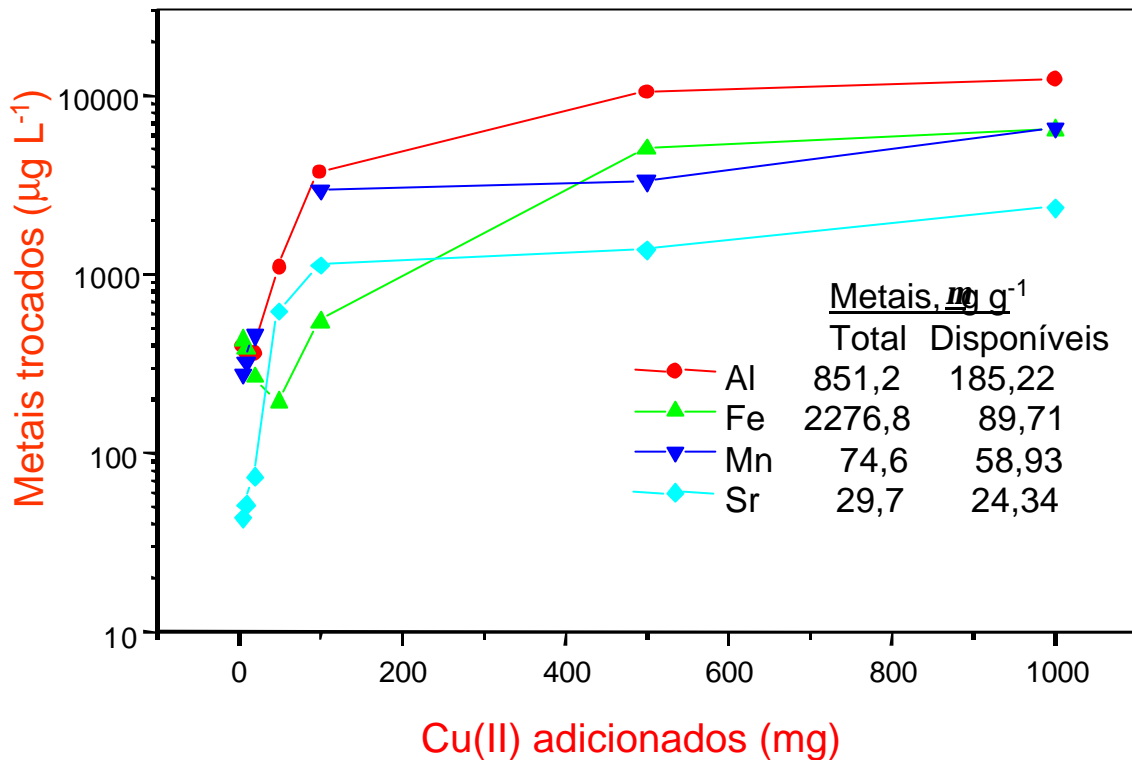


Figura 4.3 - Troca entre espécies metálicas presentes em turfa por íons Cu(II). Condições: 50 g de turfa 1, 200 mL de água, pH inicial 4,5.

Além da troca por íons Cu(II), as espécies metálicas de amostras de turfa foram caracterizadas utilizando-se agentes complexantes como DTPA e EDTA. Em ciências do solo, soluções de DTPA e EDTA têm sido consideradas como bons trocadores para estimativa da bio disponibilidade de metais (KLUTE, 1986). As curvas de troca dos metais complexados em amostra de turfa medicinal por soluções de DTPA e EDTA são mostradas nas Figuras 4.4a e 4.4b.

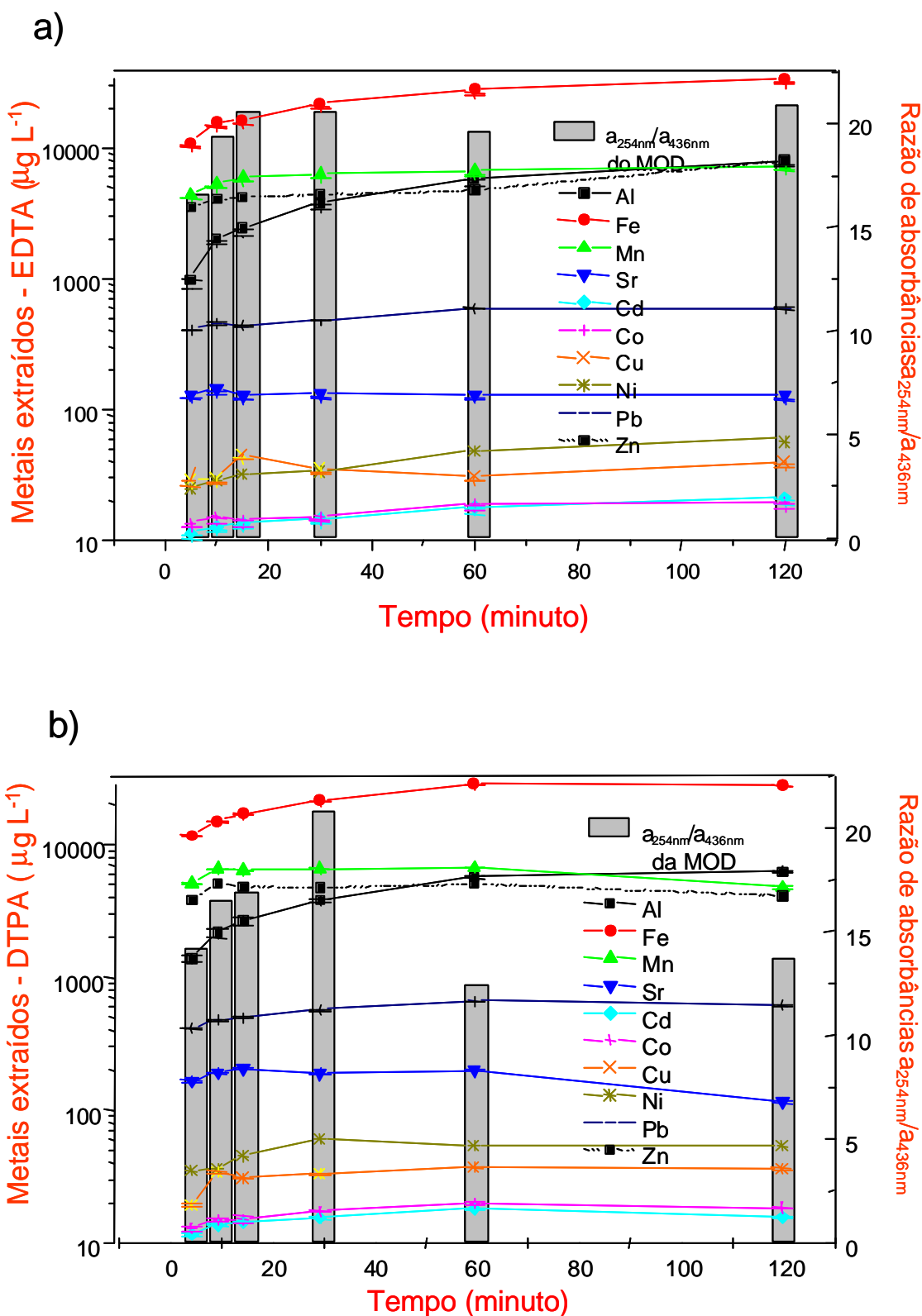


Figure 4.4 – Extração dos metais presentes na turfa por a) solução de EDTA e b) solução de DTPA. Condições: 200 g de turfa 1, 500 mL soluções de EDTA ou DTPA ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e pH 4,5.

As razão entre as absorvâncias $a_{254 \text{ nm}} / a_{436 \text{ nm}}$ da MOD extraída por soluções de EDTA e DTPA tiveram maiores valores (cerca de 20) em relação aos valores obtidos utilizando água como extrator (cerca de 7), mostrados na Figura 4.2. Este aumento provavelmente está associado a extração de moléculas maiores em relação a extração feita com soluções aquosas (STEVENSON, 1994; ROSA, *et al.* 2000a).

Para ambos complexantes (soluções de EDTA e DTPA), pode-se observar similar capacidade de extração para os metais estudados. Isto indica que as soluções de EDTA e DTPA possuem similar poder de remobilização de metais em turfa medicinal e o mecanismo do processo é praticamente o mesmo. Também foi possível caracterizar a cinética de extração dos metais por esses trocadores. De acordo com os resultados das Figuras 4.2a e 4.2b, Fe e Al reagiram lentamente com a solução de EDTA indicando cinética de primeira ordem ($t_{1/2} \cong 60$ minutos) enquanto Pb, Sr, Cu, Co e Cd trocaram mais rapidamente. Zn, Ni e Mn mostraram uma velocidade de reação intermediária. Com os dados da Figura 4.4.a construiu-se a Figura 4.5, a qual mostra a cinética da extração de algumas espécies metálicas utilizando-se solução de EDTA.

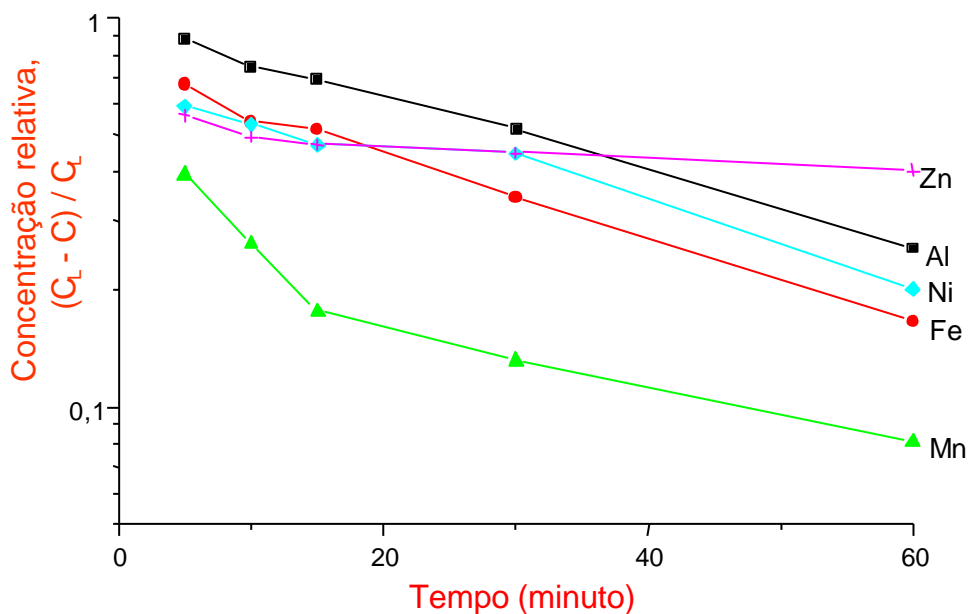


Figura 4.5 - Cinética da extração de espécies metálicas presentes em amostra de turfa por solução de EDTA. Condições: 200 g de turfa 1, 500 mL de solução de EDTA ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e pH 4,5.

4.5 – CONCLUSÕES

Conforme recentes consultas, na literatura existe apenas um artigo publicado associado à cinética de extração de matéria orgânica dissolvida e metais em amostras de turfa (GOSSET, *et al.* 1986), indicando a necessidade de mais pesquisas associadas ao estudo do mecanismo dos efeitos terapêuticos de turfas medicinais. Desta forma, este trabalho contribui para o início do entendimento das interações entre turfas medicinais e suas espécies metálicas, podendo ser de especial relevância para compreensão dos efeitos terapêuticos do tratamento com turfas. Os resultados obtidos mostraram que:

- 1) a extração da MOD ocorre em um processo cinético complexo e após cerca de 30 minutos o equilíbrio é atingido;
- 2) Mn é o metal mais disponível presente em amostras de turfas medicinais enquanto que Fe e Al são os menos disponíveis. Entretanto, Fe e Al estão em elevadas concentrações podendo influenciar fortemente no processo;
- 3) o pH exerce forte influência na extração da MOD e suas espécies metálicas. Em pH natural da turfa (4,5), a cinética de extração parece ser simples ao contrário do que ocorre com um pequeno aumento do pH (5,0);
- 4) as seguintes ordens de disponibilidades dos metais em função dos extratores puderam ser caracterizadas: Soluções de EDTA e DTPA: Mn > > Zn > Pb > Cd > Ni > Co > Fe > Sr, Al; Solução de CaCl₂: Sr >> Mn > Ni > Zn > Cd > Al > Fe; Água: Mn > Sr > Ni > Zn > Al > Fe.
- 5) o estudo de troca com íons Cu(II) indicou ordem decrescente de troca Sr (81,95) > Mn (79,00) > Al (21,76) > Fe (3,94);
- 6) soluções de DTPA e EDTA exibiram similar e forte capacidade de extração dos metais presentes na amostra de turfa medicinal.

PROPOSTAS FUTURAS

Pretende-se dar continuidade aos estudos associados a imobilização de enzimas em suporte preparado com substâncias húmicas. Para tal, solicitou-se bolsa ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), no âmbito do Programa Especial de Estímulo à Fixação de Doutores (PROFIX). No projeto proposto, pretende-se utilizar Substâncias Húmicas (SH) como suporte e/ou ativante de suporte na imobilização de enzimas de interesse em biorremediação e biotecnologia. As enzimas: lactase, fosfatase, penicilina acilase e peroxidase serão imobilizadas em SH e em suporte tradicional. O desempenho reacional dos suportes serão comparados por medidas de atividade e estabilidade do preparado enzimático.

Além da relevância da proposta para criação de conhecimento em temas de fronteira, este Projeto pode ser considerado estratégico para o desenvolvimento científico e tecnológico do País pois, visa gerar novos desenvolvimentos em áreas de Pesquisa ainda carentes como, biorremediação ambiental e biotecnologia.

CAPÍTULO 5

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBT-BRAUN, G.; Spectroscopic characterization of humic substances in the ultraviolet and visible region and by infrared spectroscopy. In: MATTHESS, G.; FRIMMEL, F.H.; HIRSCH, P.; SCHULZ, H.D.; USDOWSKI, E. (Eds.) **Progress in Hydro Geochemistry**, Springer-Verlag, Berlin, pp.29-36, 1992

AHMED, F.A. & THOMAS, D.B.; **Critical Reviews in Toxicology**, v.22, p.81, 1992. Apud VICENTE, A.A.; *Preparação de açúcar invertido por meio de invertase imobilizada em sílica. Dissertação de Mestrado*, Instituto de Química da UNESP, Araraquara, 2000.

ALEIXO, L.M.; GODINHO, O.E.S.; COSTA, W.F.; *Potentiometric study of acid-base properties of humic acid using linear functions for treatment of titration data. Analytica Chimica Acta*, v.257, p.35-49, 1992.

ASTER, B.; *Fraktionierung und charakterisierung von aquatischen huminstoffen und ihrer metallspezies: untersuchungen mittels merrstufen-ultrafiltration, metallaffinitäts-chromatographie sowie austauschreaktionen. Tese de Doutorado*, University of Dortmund, Dortmund, 1998.

BAILEY, S.E.; OLI, T.J.; BRICKA, R.M.; ADRIAN, D.D.; *A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals. Water Research*, v.33, p.2469-2479, 1999.

BEER, AM.; FEY, S.; LUKANOV, J.; SARGOCHEV, P.; *Atomspektrometrische untersuchungen zum nachweis der unbedenklichkeit des einsatzes von torf in der medizin. In: Internationales Moortherapie-Symposion, Book of Abstracts, Bad Kissingen, S. 9-10, 1999.*

BEER, A.M.; LÜTTIG, G.; LUKANOV, J.; In: **Moortherapie 2000 – Peat Therapy on it's Way Into the Next Millenium**, Book of Abstracts, Bad Kissinger, 2000.

BERGAMASCO, R.; *Cinética da hidrólise da sacarose pela invertase: modelagem matemática. Dissertação de Mestrado*, Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos da UEL, Londrina, 1989.

BLANCH, H.W.; CLARK, D.S.; In: **Biochemical Engineering**, Marcel Dekker, New York, 1996.

BRAMRYD, T.; *The role of peatlands for the global carbon dioxide balance. In: Proccedings of 6th International Peat Congress*, pp. 9-11, 1985. Apud In: AIKEN, G.R.; MCKINGHT, D.M.; WERSHAW, R.L. (Eds.) **Humic Substances in Soil, Sediment and Water**, John Wiley and Sons, New York, 1985.

BRODELLIUS, P.; *Industrial applications of immobilized biocatalysts. In: GHOSE, T.K.; FIECHTER, A.; BLAKEBROUGH, N. (Eds.). Advances in*

Biochemical Engineering - Immobilized Enzymes, vol.10, Springer-Verlag, Berlim, 1978.

BROWN, P.A.; GILL, S.A.; ALLEN, S.J.; *Metal removal from wastewater using peat*. **Water Research**, v. 34, p. 3907-3916, 2000.

BURBA, P.; *Zur Analytik von Huminstoffen und Ihren Metallspezies in Gewässern*. In: **Analytiker-Taschenbuch**, v.20, Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 45-79, 1998.

BURBA, P.; BEER, A-M.; LUKANOV, J.; *Metal distribution and binding in balneological peats and their aqueous extracts*. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, 2001a (in press).

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 Journal of Analytical Chemistry**, 2001b (in press)

CALDERONI, G.; SCHNITZER, M.; *Effects of age on the chemical structure of paleosol humic acids and fulvic acids*. **Geochemistry Cosmochim. Acta.**, v. 48, p. 2045-2051, 1984.

CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P.; In: **Microbiologia do solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, 1992.

CHEETHAM, P.S.J.; *Principles of industrial enzymology basis of utilization of soluble and immobilized enzymes in industrial processes*. In: WISEMAN, A. (Ed.) **Handbook of Enzymes Biotechnology**, 2^a Ed., John Wiley & Sons, New York, 1985.

CHIBATA, I.; In: **Immobilized Enzymes - Research and Development**. John Wiley & Sons, New York, 1978.

CLAPP, C.E.; HAYES, M.H.B.; SWIFT, R.S.; *Isolation, fractionation, functionalities, and concepts of structures of soil organic macromolecules*. In: . BECK, A.J.; JONES, K.C.; HAYES, M.H.B.; MINGELGRIN, U. (Eds.) **Organic Substances in Soil and Water: Natural Constituents And Their Influences On Contaminant Behavior**. The Royal Society of Chemistry, Cambridge pp. 31-69, 1993.

CSICSOR, J.; TOTH, A.; *Application possibilities of the peat humic acids in veterinary practice*. In: BEER, A.M.; LÜTTIG, G.; LUKANOV, J. (Eds.) **Moortherapie 2000 – Peat Therapy on it's Way Into the Next Millenium**, Book of Abstracts, Bad Kissinger, pp. 67-80, 2000.

DHAMPUR INVERTUS LTD; <http://www.sugarindia.com>.

FERREIRA, J.A.; NASCIMENTO, O.R.; MARTIN-NETO, L.; *Hydrophobic interactions between spin-labeled 5-SASL and humic acid as revealed by ESR spectroscopy. Environ. Sci. Technol.*, v. 35, p. 761-765, 2001.

FLAIG, W.; *Comparative chemical investigations on natural humic compounds and their model substances. Sci. Proc. Royal Dublin Society*, v.4, p.149-162, 1960.

FUOCO, T.H.; *Dietéticos buscam sua identidade. Química e Derivados*, v. 21, p.21-23, 1991.

GIESEKINGI, J.E.; In: **Soil Components. Organic Components.** Springer, New York, pp.534, 1975.

GOETZ, V.; REMAUND, M.; GRAVES, D.J.; *A novel magnetic silica support for use in chromatographic and enzymatic bioprocessing, Biotechnology Bioengineering*, v. 37, 614-626, 1991.

GOSSET, T.; TRANCART, J-L.; THEVENOT, D.R.; *Batch metal removal by peat – kinetics and thermodynamics. Water Research*, v. 20, p. 21-26, 1986.

GRIFFITH, S.M.; SCHNITZER, M.; *Analytical characteristics of humic and fulvic acids extracted from tropical volcanic soils. Soil Science American Proc.*, v.39, p.861-867, 1975.

GRYBAN, V.G.; STEPCHENKO, L.M.; MASYUSK, D.M.; STOYAN, U.S.; *Experience in Natural Humic Substances Preparation in Veterinary Medicine.* In: BEER, A.M.; LÜTTIG, G.; LUKANOV, J. (Eds.) **Moortherapie 2000 – Peat Therapy on it's Way Into the Next Millenium**, Book of Abstracts, Bad Kissinger, pp. 109-114, 2000.

HATCHER, P.G.; BREYER, J.A.; DENNIS, L.N.; MACIEL, G.E.; *Solid-state ¹³C NMR of sedimentary humic substances: new revelations on their composition.* In: CHRISTMAN, R.F.; GJESSING, E.T. (Eds.) **Aquatic and Terrestrial Humic Materials**, Ann Arbor Science, Ann Arbor, pp.37-82, 1983.

HAYES, M.H.B.; GRAHAM, C.L.; *Procedures for the isolation and fractionation of humic substances.* In: GHABBOUR, E.A.; DAVIES, G. (Eds.) **Humic Substances Versatile Components of Plants, Soil and Water**, Royal Society of Chemistry, Cornwall, pp.91-110, 2000.

HAYES, M.H.B.; MACCARTHY, P.; MALCOLM, R.L.; SWIFT, R.S.; In: **Humic Substances II - In Search of Structure.** John Wiley & Sons, New York, 1989.

HULTIN, H.O.; *Current and potential uses of immobilized enzymes. Food Technology*, v. october, p. 66-82, 1983.

KENNEDY, J.F. & CABRAL, J.M.S.; *Immobilized enzymes*. In: SCOUTEN, W.H. (Ed.) **Solid Phase Biochemistry - Analytical And Synthetic Aspects - Chemical Analysis**. John Wiley & Sons, New York, 1983.

KENNEDY, J.F.; CABRAL, J.M.S.; *Enzyme immobilization*. In: REHM, H.J; REED, G. (Eds) **Enzyme Technology**, Verlagsgesellschaft mbH-Weinheim, Berlim, v.7, p.347-406, 1987.

KENT, C.; ROSEVEAR, A.; THOMSON, A.R.; *Enzymes immobilized on inorganic supports*. In: WISEMAN, A. (Ed.) **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology**, vol.2, John Wiley & Sons, Chichester, 1978.

KIRK OTHMER, D.F.; In: **Encyclopedia of Chemical Technology**. John Wiley & Sons, New York, 1994.

KLÖCKING, R.; *Humic substances as potential therapeutics*. In: SENESI, N.; MIANO, T. (Eds.) **Proceedings of 6th International Meeting of the International Humic Substances Society**, Elsevier, Amsterdam, pp.1245-1257, 1994.

KLUTE, A.; In: **Methods of Soil Analysis, Part 1-Physical and Mineralogical Methods**, 2nd Ed., Am. Soc. Agronomy, Madison, pp.310-312, 1986.

KONONOVA, M.M.; *Soil organic matter*. Pergamon Press, Oxford, 1966, p.75-156. Apud RÉ POPPI, N.; *Estudos dos ácidos húmicos e fúlvicos extraídos de solos, por métodos químicos e espectroscópicos - separação e identificação de seus produtos de oxidação por CG/EM. Tese de Mestrado*, Instituto de Química e Física de São Carlos, São Carlos, 1988.

KOOPAL, L.K.; YANG Y.; MINNAARD A.J.; THEUNISSEN, P.L.M.; VAN RIEMSDIJK, W.H.; *Immobilization of humic substances on silica*. **Journal of Colloids and Surfaces**, v.141, p.385-395, 1998.

LASKIN, A.I.; In: **Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology**. The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc., London, 1985.

LENHINGER, A.L.; In: **Princípios de Bioquímica**. Editora Sarvier, São Paulo, 1990.

MALCOLM, R.L.; MACCARTHY, P.; *Limitations in the use of commercial humic acids in water and soil research*. **Environmental Science and Technology**, v.20, p.904-911, 1986.

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

MANSFELD, J. & SCHELLENBERGER, A.; *Invertase immobilized on macroporous polystyrene: properties and kinetic characterization.* **Biotechnology and Bioengineering**, v. 29, p.72-79, 1987.

MANSFELD, J.; SCHELLENBERGER, A.; ROMBACH, J.; *Application of polystyrene-bound invertase to continuous sucrose hydrolysis on pilot scale.* **Biotechnology and Bioengineering**, v.40, p. 997-1003, 1992.

MAREK, M.; VALENTOVÁ, O.; KAS, J.; *Invertase immobilisation its carbohydrate moiety.* **Biotechnology and Bioengineering**, v.26, p.1223-1226, 1984.

MARTIN-NETO, L.; TRAGHETTA, D.G.VAZ, C.M.P.; CRESTANA, S.; SPOSITO, G.; *On the interaction mechanisms of atrazine and hydroxyatrazine with humic substances.* **J. Environ. Qual.**, v. 30, p. 520-525, 2001.

MATHUR, S.P.; FARNHAM, R.S.; *Geochemistry of humic substances in natural and cultivated peatlands.* In: AIKEN, G.R.; MCKNIGHT, D.M.; WERSHAW, R.L.; MCCARTHY, P. (Eds.) **Humic Substances in Soil Sediment and Water.** John Willey and Sons, New York, pp. 53-86, 1985.

MCLELLAN, J.K.; ROCK, C.A.; *Pretreating landfill leachate with peat to remove metals.* **Water Air Soil Pollution**, v.1, p.1-14, 1986.

MILLER, G.L.; *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.* **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.

MONSANT, P.; COMBES, D.; ALEMZADEH, I.; *Application of immobilised invertase to continuous hydrolysis of concentrated sucrose solutions.* **Biotechnology and Bioengineering**, v.29, p. 658-664, 1984.

NASTOS, V.; GARAGOUNIS M.; *Contribution of curative peat therapy on human health in Greece.* In: BEER, A.M.; LÜTTIG, G.; LUKANOV, J. (Eds.) **Moortherapie 2000 – Peat Therapy on it's Way Into the Next Millenium**, Book of Abstracts, Bad Kissinger, pp. 202-208, 2000.

NAUCKE, W.; *High bog or low bog peat for the peat therapy – studies on peat from lower saxony to determine its suitability for peat therapy.* **Medizinische Welt**, v.10, p.227-240, 1980.

O'BRIEN, L.; GELARDI, R.C.; *Alternative sweeteners.* **Chemtechnology**, v.11, p.274-278, 1981.

PEURAVUORI, J.; PIHLAJA, K.; *Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances.* **Analytica Chimica Acta**, v.337, p.133-49, 1997.

PFORTNER, P.; WELLER, M.G.; NIESSNER, R.; *Immunological method for the detection of nitroaromatic residues covalently bound to humic acids. Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v.360, p.192-198, 1998.

PICCOLO, A.; *Differences in high performance size exclusion chromatography between humic substances and macromolecular polymers. In: GHABBOUR, E.A.; DAVIES, G. (Eds.) Humic Substances Versatile Components of Plants, Soil and Water*, Royal Society of Chemistry, Cornwall, pp.111-124, 2000.

QIANG, T.; SHAN, X.; ZHE-MING, N.; *Comparative characteristic studies on soil and commercial humic acids. Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, v.347, p.330-36, 1993.

RANNEY, R.E.; OPPERMAN, J.A.; MULDOON, E.; MCMAHON, F.G.; *Comparative metabolism of aspartame in experimental animals and humans. Journal of Toxicology Environmental Health*, v.2, p.441-451, 1976.

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

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 – a novel on-site approach. Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2001 (submetido para publicação).

ROCHA, J.C.; TOSCANO, I.A.S.; BURBA, P.; *Lability of heavy metal species in aquatic humic substances chracterized by ion exchange with cellulose phosphate. Talanta*, v.44, p. 69-74, 1997.

ROCHA, J.C.; SARGENTINI Jr, É.; TOSCANO I.A.S.; ROSA, A.H.; BURBA, P.; *Multimethodical study on aquatic humic substances from “Rio Negro” - Amazonas State/Brazil with emphasis on molecular-size classification of their metal complexes. Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.10, p.169-175, 1999.

ROCHA, J.C.; SARGENTINI Jr, É.; 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, 2000.

ROSA, A.H.; In: *Desenvolvimento de metodologia para extração de substâncias húmicas de turfa utilizando-se hidróxido de potássio. Dissertação de Mestrado*, Instituto de Química da UNESP, Araraquara, 1998a.

ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; SARGENTINI Jr, E.; *Flow procedure for extraction and purification of humic substances from organic soils*. In: SWIFT, R.; SPARK, K.M.; **Understanding and managing organic matter in soils, sediments, and waters**. International Humic Substances Society, New York, pp. 41-46, 2001.

ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; FURLAN, M.; *Substâncias húmicas de turfa: estudo dos parâmetros que influenciam no processo de extração alcalina*. **Química Nova**, v. 23 (4), p. 472-476, 2000a.

ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; FURLAN, M.; ZARA, L.F.; SANTOS, A.; *Oxidação de substâncias húmicas durante o processo de extração alcalina. Estudo espectroscópico nas regiões do infravermelho e do visível*. **Anais da Associação Brasileira de Química**. v.47 (1), p.25-28, 1998b.

ROSA, A.H.; VICENTE, A.A.; ROCHA, J.C.; TREVISAN, H.C.; *A new application of humic substances: activation of supports for invertase immobilization*. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v.368(7), p.730-733, 2000b.

ROSEVEAR, A.; *Immobilized biocatalysts - a critical review*. **Journal Chemical Technology and Biotechnology**, v. 34, p.127-150, 1984.

SANTOS, T.C.; ROCHA, J.C.; ALONSO, R.M.; MARTINÉZ, E.; IBANEZ, C.; BARCELÓ, D.; *Rapid degradation of propanil in rice crop fields*. **Environmental Science and Technology**, v.32, p. 3479-3484, 1998.

SCHNITZER, M.; KHAN, S.U.; *Soil Organic Matter*. Elsevier, New York, p.319, 1978. Apud In: AIKEN, G.R.; MCKNIGHT, D.M.; WERSHAW R.L. (Eds.) **Humic Substances in Soil, Sediment and Water**. John Wiley & Sons, New York, pp. 465, 1985.

SCHULTEN, H.R.; *The three-dimensional structure of humic substances and soil organic matter studied by computational analytical chemistry*. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 351, p. 62-73, 1995.

SINKELDMAN, E.J.; KUPER, C.F.; BEEMS, R.B.; NEWMAN, A.J.; FERON, V.J.; **Food Science and Technology**, v.47, p.43, 1991. Apud VICENTE, A.A.; *Preparação de açúcar invertido por meio de invertase imobilizada em sílica*. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Química da UNESP, Araraquara, 2000.

SOLOMON, B.; *Starch hydrolysis by immobilized enzymes industrial applications*. In: GHOSE, T.K.; FIECHTER, A.; BLAKEBROUGH, N. (Eds.) **Advances in Biochemical Engineering - Immobilized Enzymes**, vol.10, Springer-Verlag, Berlim, 1978.

STANKIEWICZ, W.; DABROWSKI, M.P.; JABLKOWSKI, M.; LIGEZINSKI, A.; *Immunological and clinical results of peat extract PPT application for the treatment of chronic sinusitis*. In: BEER, A.M.; LÜTTIG, G.; LUKANOV, J. (Eds.) **Moortherapie 2000 – Peat Therapy on it's Way Into the Next Millenium**, Book of Abstracts, Bad Kissinger, pp. 265-274, 2000.

STEPCHENKO, L.M.; TIKHONOV, Y.T.; *The impact of peat preparations on the reduction of past-vaccine complications with chickens*. In: BEER, A.M.; LÜTTIG, G.; LUKANOV, J. (Eds.) **Moortherapie 2000 – Peat Therapy on it's Way Into the Next Millenium**, Book of Abstracts, Bad Kissinger, pp. 275-279, 2000.

STEVENSON, F.J.; In: **Humus Chemistry: Genesis, Composition and Reaction**, 2^a Ed., John Wiley & Sons, New York, 1994

STEVENSON, F.J.; In: **Humus Chemistry: Genesis, Composition and Reaction**, 1^a Ed., John Wiley & Sons, New York, 1982.

STEVENSON, F.J.; *Geochemistry of soil humic substances*. In: AIKEN, G.R.; MCKNIGHT, D.M.; WERSHAW, R.L. (Eds.) **Humic Substances in Soil, Sediment and Water**, John Wiley & Sons, New York, pp.13, 1985.

SUMMER, J.B.; *Dinitro salicylic acid. A reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine*. **Journal of Biologyc Chemistry**, v.108, p.51, 1921.

SWIFT, R.S.; *Molecular weight, size, shape and charge characteristics of humic substances: some basic considerations*. In: HAYES, M.H.B.; MAcCARTHY, P.; MALCOLM, R.L.; SWIFT, R.S. (Eds.) **Humic Substances II - In Search of Structure**. John Wiley & Sons, New York, 1989.

SWIFT, R.S.; *Organic matter characterization*. In: **Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods – SSSA Book series nº 5** Soil Science Society of America and American Society of Agronomy, Madison, pp.1011–1069, 1996.

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

VANSANT, F.F.; VAN DER VOORT, P.; VRANCKEN, K.C.; In: **Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface**, Elsevier, Amsterdam, Ch. 9, 1996.

VICENTE, A.A.; *Preparação de açúcar invertido por meio de invertase imobilizada em sílica*. **Dissertação de Mestrado**, Instituto de Química da UNESP, Araraquara, 2000.

VIRARAGHAVAN, T.; *Peat-based on-site wastewater systems*. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 28, p.1-10, 1993.

WELZ, B.; SPERLING, M.; In: **Atomabsorptionsspektrometrie**, Wiley-VCH, Weinheim, 1997.

WERSHAW, R. L.; PINCKNEY, D. J.; LLAGUNO, E. C.; VICENTE-BECKETT, V.; *NMR characterization of humic acid fractions from different Philippine soils and sediments*. **Analytica Chimica Acta**, v.232, p.31-42. 1990.

WISEMAN, A.; WOODWARD, J.; *Industrial yeast invertase stabilization*. **Process in Biochemistry**, v.10, p.24-30, 1985.

ZANIN, G.M.; *Sacarificação de amido em reator de leito fluidizado com enzima amiloglicosidase imobilizada*. **Tese de Doutorado**, UNICAMP, Campinas, 1989.

ANEXO

APÊNDICE

6.1 - Equipamentos

- agitador magnético Variomag Telesystem;
- agitador mecânico Tecnal modelo TE-033;
- balança analítica Sartorius – 2432, com capacidade máxima de 200 g;
- balança eletrônica Denver Instrument Company 400 XE séries, de prato externo, precisão 0,01 g e capacidade máxima de 400 g;
- bomba peristáltica de quatro canais Ismatec modelo MC-MS/CA;
- centrífuga Tomy modelo IC-15SN, com capacidade de até 3000 g;
- controlador e indicador de temperatura MLW, modelo 8;
- destilador de ácidos em quartzo, Micronal;
- equipamento para análise elementar CHNSO – CE Instruments, Perkin Elmer modelo EA 1110;
- espectrofotômetro para leituras na região do UV/visível SHIMADZU, modelo UV-1203;
- espectrômetro para leituras na região do infravermelho Nicolet modelo 730 SX-FT;
- espectrômetro para leituras na região do UV/visível Varian Cary 1/3;
- espectrômetro de absorção atômica PyeUnicamSP9;
- espectrômetro de emissão atômica com plasma de argônio induzido - ICP-AES, Thermo Jarrel IRIS-AP;
- estufa de circulação forçada da Soc. Fabbe Ltda, modelo 305/5;
- evaporador rotativo Tecnal modelo TE120, equipado com sistema de alto vácuo Edwards, modelo Speedivac-2;
- medidor portátil de pH Orion modelo 250 A;
- micropipetas automáticas, vários volumes (fixos e variáveis) VWR e Finnpipette Labsystems;
- mufla EDGCON 5P;
- placa de aquecimento Marchesoni modelo 046;
- rotaevaporador Buchi R-114 equipado com sistema vácuo Buchi B-169;
- sistema purificador de água Millipore-Multi-Q;
- vidraria comum a um laboratório de Química Analítica;

6.2 - Reagentes e materiais

- acetato de sódio tri-hidratado (Reagen), $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$, MM = 136,10 g mol⁻¹;
- ácido 3,5- dinitro salicílico monohidratado (Sigma), $C_8H_6N_2O_7$, MM = 242,10 g mol⁻¹;
- ácido acético glacial (Merck), $C_2H_4O_2$, $d^{25^\circ} = 1,05 \text{ g mL}^{-1}$, título = 100 % (m/m), MM = 60,05 g mol⁻¹;
- ácido clorídrico p.a. (Merck), HCl, $d^{25^\circ} = 1,19 \text{ g mL}^{-1}$, título = 37% (m/m), MM = 36,46 g mol⁻¹;
- ácido clorídrico suprapur (Merck), HCl, $d^{25^\circ} = 1,19 \text{ g/mL}$, título = 30% (m/m), MM = 36,46 g mol⁻¹;
- ácido dietilenotriaminopentaacético-DTPA (Merck), $C_{14}H_{23}N_3O_{10}$, MM = 393,35 g mol⁻¹;
- ácido etilenodiaminotetraacético-EDTA (Merck), $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2 H_2O$, MM = 372,24 g mol⁻¹;
- ácido nítrico suprapur (Merck), HNO_3 , $d^{25^\circ} = 1,4 \text{ g mL}^{-1}$, título = 65 % (m/m), MM = 63,01 g mol⁻¹;
- bicarbonato de sódio (Merck), $NaHCO_3$, MM = 84,01 g mol⁻¹;
- cloreto de cálcio $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ (Sigma), MM = 147,0 g mol⁻¹;
- D-glicose anidro (Sigma), $C_6H_{12}O_6$, MM = 180,20 g mol⁻¹;
- enzima Invertase (EC 3.2.1.26, β -D-fructofuranosidase fructohydro-lase) N200000, atividade de 300 U mg⁻¹ (Novo Nordisk Bioindustrial do Brasil Ltda, Brasil);
- ftalato ácido de potássio (Merck), $HOCOC_6H_4COOK$, MM = 204,22 g mol⁻¹;
- glutaraldeído 25 % (m/m) (Sigma), $C_5H_8O_2$, MM = 100,10 g mol⁻¹;
- hidróxido de sódio p.a. (Merck), NaOH, MM = 40,00 g mol⁻¹;
- hidróxido de sódio suprapur (Merck); NaOH, MM = 40,00 g mol⁻¹;
- membranas 0,45 μm , Durapore (Millipore), nº referência HULP04700;
- nitrato de prata (Merck), $AgNO_3$, MM = 169,87 g mol⁻¹;
- padrão multielementar de metais para ICP, solução IV, Merck;

- resina macroporosa acril ester Amberlite XAD 8 (Serva Feinbiochimica);
- sacarose p.a. (Sigma), $C_{12}H_{22}O_{11}$, MM = 342,30 g mol⁻¹;
- sílica (150-300 μ m, diâmetro de poro 450 Å) preparada com γ -aminopropiltriethoxysilane.
- tubos de diálise adquiridos na Fundação Sardi, de 12 –14.000 MW, com 1x30 m e diâmetro com 27mm, referência: 57736-7000/1;

6.3 - Preparo das soluções estoque

As soluções foram preparadas por dissoluções e/ou diluições dos respectivos reagentes. Toda água utilizada foi previamente destilada e purificada em sistema desionizador de água, marca Milli-Qplus até apresentar resistividade 18,2 M ohm/cm a 25 °C.

Solução de ácido clorídrico (6,0, 3,0 e 0,1 mol L⁻¹): preparadas por diluições da solução concentrada de HCl.

Solução de ácido dietilenotriaminopentaacético (0,01 mol L⁻¹): dissolveram-se 3,9 g de DTPA em béquer, transferiu-se para balão volumétrico de 1,0 L e completou-se o volume com água.

Solução de ácido etilenodiaminotetraacético (0,01 mol L⁻¹): dissolveram-se 3,7 g de EDTA em béquer, transferiu-se para balão volumétrico de 1,0 L e completou-se o volume com água.

Solução de AgNO₃ (0,01 mol L⁻¹): dissolveram-se 1,70 de AgNO₃ em béquer, transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água.

Solução de cloreto de cálcio ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$): dissolveram-se 1,47 g de CaCl_2 em béquer, transferiu-se para balão volumétrico de 1,0 L e completou-se o volume com água.

Solução de hidróxido de sódio ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$): dissolveram-se 40,00 g de NaOH em béquer, transferiu-se para balão volumétrico de 500 mL e completou-se o volume com água.

Solução de NaHCO_3 ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$): dissolveram-se 0,42 g de carbonato ácido de sódio em béquer, transferiu-se para balão volumétrico de 100,00 mL e completou-se o volume com água.

Solução de NaHCO_3 (2 % m/v): dissolveram-se 2,00 g de carbonato ácido de sódio em béquer, transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água.

Solução tampão ácido acético/acetato de sódio: preparou-se uma solução de ácido acético (1,0 L), $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e uma solução de acetato de sódio (1,0 L), $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida adicionou-se a solução de ácido acético na solução de acetato de sódio, sob agitação, ajustando-se o pH para 4,5 em pHmetro calibrado com padrões 4,0 e 6,9.

O preparo das soluções de trabalho de concentrações menores foi feito por diluição das respectivas soluções estoque.

6.4 – Cálculos utilizados para determinação da atividade da invertase imobilizada nos suportes preparados

6.4.1 - Método do reator em batelada para enzima em solução

A velocidade inicial da reação foi calculada fazendo-se a regressão linear da concentração de glicose e frutose produzida ao longo do tempo,

utilizando-se o método dos mínimos quadrados na parte reta inicial da curva. O cálculo da atividade da enzima em solução foi feito de acordo com o seguinte procedimento:

Para cada amostra converteu-se a absorvância medida, em concentração de glicose e frutose formada (mg mL^{-1}), com o auxílio da curva padrão:

$$\boxed{[G + F]_t = \frac{\text{Absorbância} - a}{b}} \quad (1)$$

a = coeficiente linear da curva padrão de glicose;
b = coeficiente angular da curva padrão de glicose;

Calculou-se a concentração de produto no reator, convertendo-se em substrato consumido ($\mu\text{mol mL}^{-1}$):

$$\boxed{[G + F]_{\text{Formada}} = \frac{[G+F]_t * F}{\text{MM}_{\text{Glicose} + \text{Frutose}}}} \quad (2)$$

$[G+F]_t$ = concentração de glicose e frutose (mg mL^{-1}) no tempo “t” qualquer; determinada para cada amostra diluída.

F = fator de diluição da amostra;

$\text{MM}_{\text{Glicose} + \text{Frutose}}$ = massa molar da glicose e frutose (360 g mol^{-1});

$G+F_{\text{Formada}}$ = concentração de glicose e frutose ($\mu\text{mol mL}^{-1}$) no reator no tempo “t” qualquer, ou de sacarose consumida ($\mu\text{mol mL}^{-1}$).

A atividade da enzima em solução (A_S) foi determinada a partir do coeficiente angular (b_1) da reta ajustada, multiplicando-se pelo volume útil do reator (V_R) e dividindo-se pela quantidade de enzima adicionada (E_A).

$$A_S = \frac{b_1 * V_R}{E_A} \quad (3)$$

A_S = atividade da enzima em solução ($U \text{ mL}^{-1}$ de enzima);
 b_1 = coeficiente angular da reta ($\mu\text{mol mL}^{-1}$ substrato min^{-1});
 V_R = volume de substrato utilizado na reação (mL de substrato);
 E_A = quantidade de enzima adicionada no reator (mL enzima).

6.4.2 - Método do reator em batelada para enzima imobilizada

Para a enzima imobilizada, as equações alteram-se devido à fase não ser homogênea como na enzima solúvel. Para a enzima em solução retira-se determinada quantidade de enzima junto com cada amostra, mantendo-se a concentração no meio reacional. Para a enzima imobilizada, o volume de reação diminui cada vez que retira-se uma alíquota, mas a quantidade de enzima imobilizada permanece constante. Para correção, multiplicou-se a concentração de glicose e frutose pelo volume presente no reator em cada retirada de alíquota, calculando-se a quantidade total de produto formado e não a concentração, como no caso da enzima solúvel. As equações para o cálculo da atividade da enzima imobilizada estão expressas a seguir, com a quantidade total de substrato consumido em μmol .

$$[G + F]_{\text{Formada}} = \frac{[G+F]_t * F * V_R}{MM_{\text{Glicose + Frutose}}} \quad (4)$$

$[G+F]_t$ = concentração de glicose e frutose (mg mL^{-1}) no tempo “t” qualquer; para amostras diluídas;

F = fator de diluição da amostra;

V_R = volume de substrato após a retirada de cada alíquota (subtrai-se de 0,5 mL do valor anterior).

$MM_{\text{Glicose + Frutose}}$ = massa molar da glicose e frutose (360 g mol^{-1});

$G+F_{\text{Formada}}$ = quantidade total de glicose e frutose (μmol) no tempo “t” qualquer, a qual equivale à sacarose consumida.

Determinou-se a atividade da enzima imobilizada (A_{EI}) a partir do coeficiente angular (b_2) da reta, dividindo-se pelo valor da massa de suporte utilizado (M_E).

$$A_{EI} = \frac{b_2}{M_E} \quad (5)$$

A_{EI} = atividade da enzima imobilizada ($U\ g^{-1}$ de suporte);

b_2 = coeficiente angular da reta (U);

M_E = massa de suporte expresso em gramas (g), após recuperação, lavagem e secagem do suporte.

6.5 – Cálculos utilizados para determinação da quantidade de invertase imobilizada nos suportes preparados

Determinou-se a quantidade de enzima imobilizada, pela diferença entre a quantidade de enzima adicionada e a quantidade de enzima presente no sobrenadante (enzima não imobilizada).

$$E_{\text{Imobilizada}} = E_{\text{Adicionada}} - E_{\text{Sobrenadante}} \quad (6)$$

$E_{\text{Adicionada}}$ = Quantidade de enzima solúvel adicionada. Este valor foi obtido multiplicando-se a atividade da enzima em solução (A_S) pelo volume de enzima adicionada ao suporte (U - unidades adicionadas).

$$E_{\text{Adicionada}} = A_S * V_{\text{Enzima adicionada}} \quad (7)$$

$E_{\text{Sobrenadante}}$ = Quantidade de enzima que restou na solução (enzima não imobilizada). Este valor foi obtido multiplicando-se a atividade da enzima do sobrenadante pela soma do volume de enzima adicionada e de tampão retido (U - unidades que restaram).

$$E_{\text{Sobrenadante}} = A_{\text{Sobrenadante}} * V_{\text{(Enzima oferecida + tampão retido)}} \quad (8)$$

Rearranjando as equações tem-se:

$$E_{\text{Imobilizada}} = (A_S * V_{\text{Enzima adicionada}}) - (A_{\text{Sobrenadante}} * V_{\text{(Enzima adicionada + tampão retido)}}) \quad (9)$$

Para o cálculo das atividades das enzimas adicionada e do sobrenadante (não imobilizada) seguiu-se a metodologia descrita nos itens 6.4.1 e 6.4.2 (pág. 83-86).