

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**Instituto de Química de Araraquara-UNESP**

**Redução de mercúrio iônico por substâncias húmicas  
aquáticas**

**Luiz Fabrício Zara**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação do Instituto de Química de Araraquara para a obtenção do título de Doutor em Química Analítica

**Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Rocha**

## **Banca Examinadora**

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Rocha

Instituto de Química de Araraquara – UNESP

Araraquara - SP

Prof<sup>a</sup>. Dra. Rachel Fernandes Pupo Nogueira

Instituto de Química de Araraquara – UNESP

Araraquara - SP

Prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim

Instituto de Química – UNICAMP

Campinas – SP

Prof. Dr. Jarbas José Rodrigues Rohwedder

Instituto de Química – UNICAMP

Campinas – SP

Prof. Dr. Joaquim de Araujo Nobrega

Dep. de Química – UFSCar

São Carlos – SP

---

## DADOS CURRICULARES

### 1. DADOS PESSOAIS

|                               |                                                                                                                            |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.1 Nascimento                | 07/10/1970                                                                                                                 |
| 1.2 Nacionalidade             | brasileira                                                                                                                 |
| 1.3 Naturalidade              | Matão - SP                                                                                                                 |
| 1.4 Estado civil              | casado                                                                                                                     |
| 1.5 Filiação                  | Pai: Nelson Zara<br>Mãe: M. de Lourdes B. Zara                                                                             |
| 1.6 Profissão                 | Bacharel em Química                                                                                                        |
| 1.7 Documento de identidade   | 20.219.582                                                                                                                 |
| 1.8 Cadastro de pessoa física | 145513058-39                                                                                                               |
| 1.9 Endereço Resid.           | R. Prudente de Moraes 841<br>Centro - CEP 15.990-000<br>Matão - SP                                                         |
| 1.10 Endereço profissional    | Instituto de Química de Araraquara<br>Rua Prof. Francisco Degni, s/n<br>Bairro Quitandinha - 14.800-900<br>Araraquara - SP |

### 2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

#### 2.1 Bacharel em Química com Atribuições Tecnológicas.

Curso de Química, concluído em junho de 1993, na Universidade Federal de São Carlos - UFSCar.

---

## 2.2 Mestrado em Química

Curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração: Química Analítica, Linha de Pesquisa: Química Analítica Ambiental, concluído em junho de 1997, no Instituto de Química de Araraquara - UNESP

## 2.3 Capacitação Pedagógica

Capacitação Pedagógica de Docentes para as Disciplinas do Currículo do Ensino Fundamental, do Ensino Médio e da Educação Profissional em Nível Médio, concluído em fevereiro de 1999, na Faculdade de Tecnologia – FATEC – Taquaritinga-SP.

## 2.4 Doutorado em Química

Curso de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração : Química Analítica, Linha de Pesquisa: Química Analítica Ambiental, concluído em novembro de 2001, no Instituto de Química de Araraquara - UNESP

---

## Produção Científica

### Artigos

1. ROCHA, J.C.; SARGENTINI Jr, É.; **ZARA, L.F.**; ROSA, A.H.; SANTOS, A.; BURBA, P. Reduction of mercury(II) by fraction humic. *Talanta*, (submetido 2002).
  2. **ZARA, L.F.**; ROCHA, J.C.; MILANI, M.R.; ROSA, A.H.; SANTOS, A. A flow-Injection-ICP system sequential multielemental analysis with simultaneously mercury (II) preconcentration step. *Analytical Letters*, v. 36, n. 4, p. 000-000, 2003.
  3. SANTOS, A.; ROCHA, J.C.; REZENDE, M.O.O. ; **ZARA, L.F.** Substâncias húmicas extraídas de água e sedimento do reservatório de captação de água superficial Anhumas: Fracionamento com base no tamanho molecular e distribuição de espécies metálicas (Cr, Ni, Cu, Cd e Pb). *Ciência e Cultura*, (submetido 2001).
  4. **ZARA, L.F.**; ROCHA, J.C.; TOSCANO, I.A.S.; ROSA, A.H. Aquatic humic acid: A structural conformation study. *J. Braz. Chem. Soc.*, (submetido 2000).
  5. 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, p. 339-344, 2001.
-

6. GOMES NETO, J.A.; **ZARA, L.F.**; ROCHA, J.C.; SANTOS, A.; DAKUZAKU C.; NÓBREGA, J.A.. Determination of mercury in agroindustrial samples by flow-injection cold vapor atomic absorption spectrometry using ion exchange and reductive elution. *Talanta*, v. 51, p. 587-594, 2000.
  7. ROCHA, J.C.; DE SENE, J.J.; SANTOS, A.; TOSCANO, I.A.S.; **ZARA, L.F.** Aquatic humus from an unpolluted Brazilian dark-brown stream: general characterization and size fraction of bound heavy metals. *J. Environmental Monitoring* , v. 2, p. 39-44, 2000.
  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) – A possible process of the mercury cycle in Brazil. *Talanta* , v. 53, p. 551-559, 2000.
  9. 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. In: *Symposium on Refractory Organic Substances In The Environment – ROSE II*. ISBN 3-00-006539-3, p. 226, 2000.
  10. ROCHA, J.C.; SARGENTINI Jr, É; **ZARA, L.F.**; ROSA, A.H.; BURBA, P. Substâncias húmicas: sistema de fracionamento sequencial por ultrafiltração com base no tamanho molecular. *Química Nova*, v. 23, p. 410-412, 2000.
  11. GOMES NETO, J.A.; **ZARA, L.F.**; SANTOS, A.; ROCHA, J.C.; CARDOSO, A.A. Reversible intermittent flow-injection determination of mercury in sediments and vinasses by cold vapor atomic absorption spectrometry. *Lab Robotics and Automation*, v. 11, p. 304-310, 1999.
-

## Resumo

A maior parte do carbono orgânico dissolvido nos ambientes aquáticos tropicais, particularmente em rios de água escura como o Rio Negro, está presente como substâncias húmicas aquáticas (SHA). O processo de redução de mercúrio iônico foi estudado utilizando SHA, extraídas com resina XAD-8 de amostra de água coletada no Rio Negro-AM. Foram desenvolvidos sistemas de reação e aprisionamento de  $\text{Hg}^0$  e análise por injeção em fluxo com etapa de pré-concentração em coluna empacotada com resina Chelite<sup>®</sup> S acoplado a espectrometria de absorção atômica com geração de vapor de mercúrio à frio (FIA-Chelite-CVAAS). Investigaram-se parâmetros operacionais, tais como concentração e volume de reagente, acidez, vazões de fluxos, tempo de pré-concentração e possíveis interferentes. Utilizando tempo de pré-concentração de 120 s, o sistema proposto possibilitou a análise de 25 amostras  $\text{h}^{-1}$  (50,0-500  $\text{ng L}^{-1}$ ), consumindo aproximadamente 10 mL de amostra e 5 mg  $\text{SnCl}_2$  por determinação.

Efeitos de relevantes parâmetros ambientais no processo de redução de mercúrio iônico por substâncias húmicas aquáticas, tais como valor de pH, razão  $\text{Hg(II)}/\text{SHA}$  e concentrações de SHA e  $\text{Hg(II)}$  foram estudados em função do tempo. A produção de  $\text{Hg}^0$  é favorecida em pH 8 e, nesta condição, 0,5 mg de SH reduz aproximadamente 35% da quantidade de  $\text{Hg(II)}$  inicial (1,0  $\mu\text{g}$ ) em 50 horas. A eficiência da redução de  $\text{Hg(II)}$  é fortemente influenciada pela concentração de SHA mas, independe da razão  $\text{Hg(II)}/\text{SHA}$ . A cinética de redução de  $\text{Hg(II)}$  por SHA apresenta mecanismo de primeira ordem com constante de velocidade de aproximadamente  $0,002 \text{ min}^{-1}$ . As SHA foram fracionadas utilizando sistema de ultrafiltração sequencial com múltiplos estágios e fluxo tangencial e obtiveram-se frações com os respectivos intervalos de tamanhos moleculares  $F_1 > 100$ ;  $F_2$ : 100-50;  $F_3$ : 50-30;  $F_4$ : 30-10;  $F_5$ : 10-5 and  $F_6 < 5$  kDalton. O fracionamento das SHA isoladas do Rio Negro indicou que 32% das moléculas estão concentradas na fração com

tamanho menor que 5 kDalton ( $F_6$ ), enquanto que  $F_1$  contem a menor quantidade (25,5%). As propriedades ácido-base das frações húmicas foram estudadas utilizando Funções de Gran modificadas aplicadas as curvas de titulação potenciométrica e indicaram que na estrutura das SHA os grupos oxigenados tituláveis mais abundantes são os carboxílicos (48,3-60,4 %) e fenólicos (23,7-33,0 %).

A redução de mercúrio iônico (1  $\mu$ g) por diferentes frações húmicas (368 mg C) em pH 5,0 é fortemente influenciada pelo tempo de reação (0-48 h). A maior quantidade de Hg(II) foi reduzida por frações com relativamente alta proporção de grupos fenólicos/carboxílicos. Portanto, pode-se estabelecer a seguinte ordem de eficiência de redução de Hg(II) pelas frações húmicas:  $F_5 > F_2 >> F_1 > F_3 > F_4 >> F_6$ . Ainda, verificou-se apenas uma parte dos íons Hg(II) adicionados são reduzidos enquanto a maior quantidade permanece complexados pelas frações húmicas. Os resultados evidenciam que as propriedades redutoras das substâncias húmicas aquáticas estão diretamente relacionados com os grupos fenólicos constituintes da macromolécula húmica.

## Abstract

The main pool of dissolved organic carbon in tropical aquatic environments, as in dark-coloured river of the Amazon basin, *Rio Negro*, is concentrated in aquatic humic substances (aquatic HS). The present study characterizes the abiotic reduction of Hg(II) ions by typical river humic substances (HS) conventionally pre-isolated by the adsorbent XAD-8 from the “Rio Negro” near Manaus. For the investigation of this reduction process a special reaction and Hg(0) trapping device combined with a flow-injection system with a Chelite S<sup>®</sup> cation resin packed was developed for the determination of trace levels of mercury by cold vapor atomic absorption spectrometry (FIA-Chelite-CVAAS). Concentration and volume of reagent, acidity, flow rates, commutation times and potential interfering species were investigated. For 120 s preconcentration, the proposed system handles about 25 samples h<sup>-1</sup> (50.0-500 ng L<sup>-1</sup>), consuming about 10 mL sample and 5 mg SnCl<sub>2</sub> per determination.

The effect of environmental relevant parameters such as the pH values, the Hg(II)/HS ratio and the HS concentration on the Hg(II) reduction process was studied as a function of time. The Hg(0) production was highest at pH 8.0 and 0.5 mg of HS reduces about 35% of initially Hg(II) (1.0 µg ) in 50 h. Moreover, the reduction efficiency of HS towards Hg(II) strongly depend on the HS concentration but hardly on the Hg(II)/HS ratio. The reduction kinetics followed a first-order mechanism with a rate constant around 0.002 min<sup>-1</sup>.

Using a tangential-flow multistage ultrafiltration sequential system the molecular-size distribution (F<sub>1</sub>>100; F<sub>2</sub>:100-50; F<sub>3</sub>: 50-30; F<sub>4</sub>: 30-10; F<sub>5</sub>: 10-5 and F<sub>6</sub> < 5 kDalton) of the isolated aquatic HS was characterized. The fractionation of the aquatic HS isolated from Rio Negro indicates that 32% of the molecules are concentrated in fraction with a molecular size around < 5 kDalton (F<sub>6</sub>), while F<sub>1</sub> contains a minor quantity (25.5%). A

potentiometric study of acid-base properties of the aquatic HS fractions using linear modified Gran functions indicated that the most abundant groups in the HS structure are the oxygenated ones, carboxylic (48.3-60.4%) and phenolic (23.7-33.0%).

The reduction of the Hg(II) (1  $\mu$ g) by aquatic HS fractions (1 mg C) at pH 5.0 was strongly influenced by reaction time (0-48 h). The major amount of Hg(II) was preferably reduced by molecules with relatively high phenolic/carboxylic groups ratio. Thus, the reduction of Hg(II) ions by aquatic HS fractions exhibited the following order:  $F_5 > F_2 >> F_1 > F_3 > F_4 >> F_6$ . Only a fraction of the added Hg(II) ions was reduced while most of it was probably complexed by aquatic HS fraction. The redox properties of aquatic humic substance is apparently associated with the phenolic groups.

# Índice

## Lista de figuras

|                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 01</b> - Ciclo do mercúrio no ambiente e seus mecanismos naturais de oxidação, redução e metilação.....                                                                                             | 09 |
| <b>Figura 02</b> - Diagrama da classificação dos métodos de análise em fluxo.....                                                                                                                             | 13 |
| <b>Figura 03</b> - Diagrama de fracionamento do carbono orgânico dissolvido proposto por LEENHEER E NOYES.....                                                                                                | 16 |
| <b>Figura 04</b> - Sistema desenvolvido para a determinação de mercúrio por FIA-CVAAS.....                                                                                                                    | 33 |
| <b>Figura 05</b> - Diagrama do sistema desenvolvido para a determinação de mercúrio por FIA-Chelate-CVAAS.....                                                                                                | 35 |
| <b>Figura 06</b> - Diagrama do sistema de reação/aprisionamento de mercúrio.....                                                                                                                              | 42 |
| <b>Figura 07</b> - Reservatório com volume interno de 25 mL, para coleta das frações durante o fracionamento dos extratos húmicos utilizando-se o sistema de fracionamento sequencial por ultrafiltração..... | 46 |
| <b>Figura 08</b> - Esquema do sistema de fracionamento sequencial por ultrafiltração utilizado para fracionar substâncias húmicas.....                                                                        | 46 |
| <b>Figura 09</b> - Representação esquemática das câmaras de reação/separação gás-líquido.....                                                                                                                 | 52 |
| <b>Figura 10</b> - Influência das vazões de gás transportador e arraste na intensidade do sinal analítico.....                                                                                                | 54 |
| <b>Figura 11</b> - Influência das vazões de gás transportador e arraste no tempo de limpeza da cela de absorção.....                                                                                          | 54 |
| <b>Figura 12</b> - Influência da proporção amostra:reagente na intensidade do sinal analítico..                                                                                                               | 55 |
| <b>Figura 13</b> - Influência da concentração de cloreto na intensidade do sinal analítico.....                                                                                                               | 56 |
| <b>Figura 14</b> - Influência das vazões do gases arraste e transportador na intensidade do sinal analítico.....                                                                                              | 59 |
| <b>Figura 15</b> - Influência da concentração de cloreto estano e a acidez do meio na intensidade do sinal analítico.....                                                                                     | 60 |
| <b>Figura 16</b> - Influência do tempo de amostragem da solução analítica na intensidade do sinal analítico.....                                                                                              | 62 |
| <b>Figura 17</b> - Influência da vazão de amostragem da solução analítica na intensidade do sinal analítico.....                                                                                              | 62 |
| <b>Figura 18</b> - Influência do volume de eluente na intensidade do sinal analítico. ....                                                                                                                    | 63 |

|                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 19</b> - Influência da concentração de cloreto na eficiência da etapa de pré-concentração do sistemas FIA-Chelite-CVAAS.....                                               | 65 |
| <b>Figura 20</b> - Localização do ponto de coleta da amostra de água do Rio Negro-AM.....                                                                                            | 67 |
| <b>Figura 21</b> - Influência da vazão do gás de arraste (N <sub>2</sub> ) e do tempo de aeração na eficiência do sistema de reação/aprisionamento de mercúrio reduzido.....         | 68 |
| <b>Figura 22</b> - Influência do tempo de reação e concentração dos íons mercúrio adicionado na reação de redução de mercúrio por SHA extraída do Rio Negro-AM .....                 | 70 |
| <b>Figura 23</b> - Velocidade da reação de redução dos íons Hg(II) por SHA extraída do Rio Negro-AM em função do tempo de reação.....                                                | 71 |
| <b>Figura 24</b> - Influência da massa de íons mercúrio(II) adicionado e do tempo de reação na velocidade da reação de redução de mercúrio(II) por SHA extraída do Rio Negro-AM..... | 71 |
| <b>Figura 25</b> - Influência da massa de SHA extraída do Rio Negro-AM no processo de redução de mercúrio(II). .....                                                                 | 73 |
| <b>Figura 26</b> - Influência dos valores de pH no processo de redução de mercúrio (II) por SHA. extraída do Rio Negro-AM.....                                                       | 75 |
| <b>Figura 27</b> - Distribuição das frações de substâncias húmicas aquáticas extraídas do Rio Negro-AM, em função do tamanho molecular e aromaticidade.....                          | 79 |
| <b>Figura 28</b> - Espectros na região do infravermelho das frações de substâncias húmicas aquáticas extraídas do Rio Negro-AM.....                                                  | 82 |
| <b>Figura 29</b> - Diagrama de blocos mostrando o fluxograma dos cálculos das Funções de Gran modificadas.....                                                                       | 88 |
| <b>Figura 30</b> - Curva de titulação potenciométrica e função linear da titulação da fração húmica F <sub>1</sub> (> 100 kDa).....                                                  | 89 |
| <b>Figura 31</b> - Curva de titulação potenciométrica e função linear da titulação da fração húmica F <sub>2</sub> (50-100 kDa).....                                                 | 89 |
| <b>Figura 32</b> - Curva de titulação potenciométrica e função linear da titulação da fração húmica F <sub>3</sub> (10-50 kDa).....                                                  | 90 |
| <b>Figura 33</b> - Curva de titulação potenciométrica e função linear da titulação da fração húmica F <sub>4</sub> (5-10 kDa).....                                                   | 90 |
| <b>Figura 34</b> - Curva de titulação potenciométrica e função linear da titulação da fração húmica F <sub>5</sub> (1-5 kDa).....                                                    | 91 |
| <b>Figura 35</b> - Curva de titulação potenciométrica e função linear da titulação da fração húmica F <sub>6</sub> (< 1 kDa).....                                                    | 91 |

|                                                                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 36</b> - Quantidade de íons mercúrio reduzido pelas frações de substâncias húmicas aquáticas extraídas do Rio Negro-AM.....                                                                                     | 96 |
| <b>Figura 37</b> - Mecanismo de redução de mercúrio(II) pelas frações de substâncias húmicas aquáticas extraídas do Rio Negro-AM.....                                                                                     | 97 |
| <b>Figura 38</b> - Cinética de redução dos íons mercúrio(II) pelas frações de substâncias húmicas aquáticas extraídas do Rio Negro-AM (Etapa I).....                                                                      | 98 |
| <b>Figura 39</b> - Cinética de redução dos íons mercúrio(II) pelas frações de substâncias húmicas aquáticas extraídas do Rio Negro-AM (Etapa II).....                                                                     | 98 |
| <b>Figura 40</b> - Influências da razão dos grupos fenólicos/carboxílicos e concentração de enxofre na quantidade de íons mercúrio reduzido pelas frações de substâncias húmicas aquáticas extraídas do Rio Negro-AM..... | 99 |

## Lista de tabelas

|                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 01</b> - Seqüência de toxicidade molar .....                                                                                                                                                                           | 06 |
| <b>Tabela 02</b> - Valores obtidos nos testes das três celas de absorção atômica.....                                                                                                                                            | 51 |
| <b>Tabela 03</b> - Valores obtidos na determinação de mercúrio (cinco repetições) em material certificado e vinhaças utilizando a técnica de geração de vapor de mercúrio a frio (CVAAS) e o sistema desenvolvido FIA-CVAAS..... | 57 |
| <b>Tabela 04</b> - Valores obtidos na determinação de mercúrio (cinco repetições) em água de rio utilizando a técnica de geração de vapor de mercúrio a frio (CVAAS) e o sistema desenvolvido FIA-CVAAS.....                     | 57 |
| <b>Tabela 05</b> - Valores obtidos na determinação de mercúrio ( $n=5$ ) em amostras de águas, vinhaça, açúcar e fertilizante utilizando o sistema FIA-Chelite-CVAAS.....                                                        | 66 |
| <b>Tabela 06</b> - Análise dos materiais certificados utilizando o sistema FIA-Chelite-CVAAS..                                                                                                                                   | 66 |
| <b>Tabela 07</b> - Resultados obtidos na titulação potenciométrica das frações húmicas com diferentes tamanhos moleculares obtidas por ultrafiltração de substâncias húmicas aquáticas extraídas dos Rio Negro-AM.....           | 92 |

|                                                                                                                                                                                                                                   |        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>1 - Objetivo</b> .....                                                                                                                                                                                                         | 01     |
| <b>2 – Introdução</b> .....                                                                                                                                                                                                       | 03     |
| 2.1 – Mercúrio.....                                                                                                                                                                                                               | 04     |
| 2.2 - Técnicas de determinação de mercúrio.....                                                                                                                                                                                   | 10     |
| 2.3 - Sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA).....                                                                                                                                                                         | 12     |
| 2.4 – Rio Negro.....                                                                                                                                                                                                              | 14     |
| 2.5 - Matéria orgânica natural aquática.....                                                                                                                                                                                      | 15     |
| 2.6 - Substâncias húmicas aquáticas (SHA).....                                                                                                                                                                                    | 17     |
| 2.7 – Redução de mercúrio iônico por SHA.....                                                                                                                                                                                     | 21     |
| 2.8 – Fracionamento das substâncias húmicas aquáticas.....                                                                                                                                                                        | 23     |
| <br><b>3 - Materiais</b> .....                                                                                                                                                                                                    | <br>26 |
| <br><b>4 – Experimental</b> .....                                                                                                                                                                                                 | <br>29 |
| 4.1 - Purificação da água.....                                                                                                                                                                                                    | 30     |
| 4.2 - Purificação dos ácidos.....                                                                                                                                                                                                 | 30     |
| 4.3 - Limpeza da vidraria.....                                                                                                                                                                                                    | 30     |
| 4.4 - Reagentes e soluções.....                                                                                                                                                                                                   | 30     |
| 4.5 - Sistema de purificação do ar.....                                                                                                                                                                                           | 31     |
| 4.6 - Sistema de análise por injeção em fluxo acoplado a espectrometria de absorção atômica com geração de vapor de mercúrio a frio (FIA-CVAAS).....                                                                              | 32     |
| 4.7 - Sistema de análise por injeção em fluxo acoplado a espectrometria de absorção atômica com etapa de pré-concentração utilizando resina Chelite S <sup>®</sup> e geração de vapor de mercúrio a frio (FIA-Chelite-CVAAS)..... | 34     |
| 4.8 - Parâmetros investigados.....                                                                                                                                                                                                | 36     |
| 4.9 - Digestão das amostras.....                                                                                                                                                                                                  | 40     |
| 4.10 - Extração de substâncias húmicas aquáticas.....                                                                                                                                                                             | 41     |
| 4.11 - Sistema de reação/aprisionamento de mercúrio.....                                                                                                                                                                          | 42     |
| 4.12 - Cinética de redução de mercúrio iônico por SHA.....                                                                                                                                                                        | 43     |
| 4.13 - Fracionamento das substâncias húmicas aquáticas.....                                                                                                                                                                       | 44     |
| 4.14 - Caracterizações das frações húmicas.....                                                                                                                                                                                   | 47     |

|                                                                   |            |
|-------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>4.15 - Redução de mercúrio iônico por frações húmica.....</b>  | <b>49</b>  |
| <b>5 - Resultados e discussão.....</b>                            | <b>50</b>  |
| <b>5.1 - Sistema FIA-CVAAS.....</b>                               | <b>51</b>  |
| <b>5.2 - Sistema FIA-Chelite-CVAES.....</b>                       | <b>58</b>  |
| <b>5.3 - Extração de substâncias húmicas aquáticas.....</b>       | <b>67</b>  |
| <b>5.4 - Sistema de reação/aprisionamento de mercúrio.....</b>    | <b>68</b>  |
| <b>5.5 - Cinética de redução de mercúrio(II) por SHA.....</b>     | <b>69</b>  |
| <b>5.6 - Fracionamento das substâncias húmicas aquáticas.....</b> | <b>76</b>  |
| <b>5.7 – Caracterização das frações húmicas.....</b>              | <b>77</b>  |
| <b>5.8 - Redução de mercúrio iônico por frações húmicas.....</b>  | <b>93</b>  |
| <b>6 - Conclusões.....</b>                                        | <b>100</b> |
| <b>7 – Referências bibliográficas.....</b>                        | <b>102</b> |

## Lista de abreviaturas

CVAAS: geração de vapor de mercúrio à frio acoplado a espectrometria de absorção atômica

FIA: análise por injeção em fluxo

AH: ácido húmico

COD: carbono orgânico dissolvido

MON: matéria orgânica natural

SH: substâncias húmicas

SHA: substâncias húmicas aquáticas

L: sítios ligantes simples

CGH: compostos com grupos homólogos

UF: ultrafiltração

SFSUF: sistema de fracionamento sequencial por ultrafiltração

FIA-CVAAS: sistema para análise por injeção em fluxo acoplado a espectrometria de absorção atômica com geração de vapor de mercúrio a frio

S: solução analítica ou amostra

R: reagente

L<sub>S</sub>: alça de amostragem de amostra

L<sub>R</sub>: alça de amostragem de reagente

C<sub>T</sub>: fluxo do gás transportador

C<sub>C</sub>: fluxo do gás de arraste

GL: câmara de reação/separação gás-líquido

IC: injetor-comutador

F: cela de fluxo

PS: sistema de separação gás/líquido constituído por uma membrana de PTFE

B: reator

FIA-Chelite-CVAAS: sistema para análise por injeção em fluxo acoplado a espectrometria de absorção atômica com etapa de pré-concentração utilizando resina Chelite S<sup>®</sup> e geração de vapor de mercúrio a frio

T: coluna empacotada com resina Chelite S<sup>®</sup>

I: linha opcional para estudos de interferentes

M: filtro de membrana *polyethesulfone*

F<sub>1</sub>: fração húmica com massa molecular >100 kDalton

F<sub>2</sub>: fração húmica com massa molecular entre 100-50 kDalton

F<sub>3</sub>: fração húmica com massa molecular entre 50-30 kDalton

F<sub>4</sub> : fração húmica com massa molecular entre 30-10 kDalton

F<sub>5</sub>: fração húmica com massa molecular 10-5 kDalton

F<sub>6</sub>: fração húmica com massa molecular <5 kDalton

R: reservatório das frações húmica

P: regulador de pressão

Ma: manômetro

1 Dalton: 1000 u

## 1 – Objetivos

- Desenvolver e avaliar dois sistemas de determinação de mercúrio aplicáveis a matrizes ambientais utilizando sistema:
  - análise por injeção em fluxo acoplado a espectrometria de absorção atômica com geração de vapor de mercúrio a frio (FIA-CVAAS);
  - análise por injeção em fluxo com etapa de pré-concentração em coluna empacotada com resina Chelite® S acoplado a espectrometria de absorção atômica com geração de vapor de mercúrio a frio (FIA-Chelite-CVAAS);
- estudar a cinética do processo de redução de mercúrio iônico por substâncias húmicas aquáticas (SHA) , extraídas de amostra de água coletada no Rio Negro-AM, considerando as influências de parâmetros ambientais tais como pH do meio reacional, concentrações de SHA e íons mercúrio, dentre outros;
- especiar grupos atuantes no processo de redução de mercúrio iônico por SHA, utilizando sistema de fracionamento sequencial por ultrafiltração em múltiplos estágios com base no tamanho molecular (SFSUF), espectrometria na região do UV-Visível, espectrometria na região do infravermelho e titulação potenciométrica.

## 2 – Introdução

## 2.1 - Mercúrio

O mercúrio é o único metal líquido à temperatura ambiente, podendo ocorrer em três estados de oxidação: mercúrio metálico ( $\text{Hg}^0$ ), íon mercurioso ( $\text{Hg}_2^{2+}$ ) e o íon mercúrico ( $\text{Hg}^{2+}$ ). O íon mercurioso, formado pela dimerização de dois átomos de mercúrio é pouco comum. Além dos sais simples como o cloreto, o nitrato e o sulfato, o íon mercúrico liga-se covalentemente a radicais orgânicos originando uma série de compostos organometálicos do tipo  $\text{RHgR}'$ . Algumas das formas mais comuns de R e R' são os radicais alquilas, fenilas e metoxietilas. Do ponto de vista toxicológico, os compostos organometálicos mais importantes são os alquilmercúricos de cadeia curta nos quais o mercúrio está ligado a um grupo metila, etila ou propila (WHO, 1976, 1989, 1990). Entretanto, a espécie metilmercúrio é mais presente no ambiente, tecidos e fluidos biológicos, sendo também a de maior potencial tóxico (LIMAVERDE FILHO & CAMPOS, 1999).

O aumento da contaminação de sistemas aquáticos por metais pesados, especialmente mercúrio, tem sido amplamente relatado nas últimas décadas (WILKEN *et al.*, 1990). São conhecidos exemplos de contaminações de mercúrio, como ocorrido na baía de Minamata no Japão (MOORE & RAMAMOORTHY, 1984), praias e solos florestais da Suécia (FORSTNE, 1981) e algumas regiões do Brasil (MICARONI *et al.*, 2001). Neste caso, a responsabilidade pelo despejo da maior carga de mercúrio em alguns efluentes brasileiros tem sido atribuída a atividades mineradoras as quais utilizam o metal para extração de ouro amalgamado (MALM *et al.*, 1990). Nesse processo são necessários 1,3 a 2,0 kg de mercúrio para obtenção de 1 kg de ouro extraído. Estima-se uma taxa de lançamento anual médio de 40-170 t de mercúrio na região Amazônica (PFEIPFER & LACERDA, 1992). Este aporte de mercúrio no ambiente divide-se em 40% para a água dos rios durante o processo de

amalgamação e 60% é lançado na atmosfera através do processo de purificação (PFEIPFER, 1988).

As contribuições naturais de mercúrio são oriundas de atividades vulcânicas, gaseificação do magma e minas (SCHLÜTER, 2000). Estudos sobre a mobilização de vapores de mercúrio na atmosfera, sustentam a hipótese de um problema global não limitado somente às áreas próximas do ponto de impactação (PFEIPFER & LACERDA, 1992; HANISCH, 1998).

### **2.1.1 - Essencialidade e toxicidade**

O termo “metal pesado”, embora ainda não bem definido, é amplamente reconhecido e utilizado para um grupo de metais e metalóides, os quais estão associados com poluição e toxicidade (Hg, Pb, Cd, As, Tl e U), mas também inclui alguns elementos biologicamente essenciais em baixas concentrações como Co, Cu, Mn, Se e Zn (ALLOWAY, 1993).

Estudos relativos à toxicidade de metais pesados indicam que as situações de carência levam à deficiência (MARTIN, 1980). A suplementação adequada resulta em ótimas condições para o organismo e o excesso resultaria em efeitos tóxicos ou até mesmo a morte. SPOSITO (1986) cita um estudo de NIEBOER & RICHARDSON (1980), com os resultados resumidos na Tabela 01, no qual os autores chegam a uma sequência de toxicidade molar considerando o fator de enriquecimento (concentração média do metal no organismo/concentração média do metal na crosta terrestre) em função do potencial iônico do respectivo metal.

**Tabela 01** - Sequência de toxicidade molar.

| Organismos          | Sequência de toxicidade molar                                        |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Algas               | Hg>Cu>Cd>Fe>Cr>Zn>Co>Mn                                              |
| Fungos              | Ag>Hg>Cu>Cd>Cr>Ni>Pb>Co>Zn>Fe                                        |
| Plantas ornamentais | Hg>Pb>Cu>Cd>Cr>Ni>Zn                                                 |
| Anelídeos           | Hg>Cu>Zn>Pb>Cd                                                       |
| Peixes              | Ag>Hg>Cu>Pb>Cd>Al>Zn>Ni>Cr>Co>Mn>>Sr                                 |
| Mamíferos           | Hg, Ag, Cd>Cu, Pb, Co, Sn, Be>>Mn, Zn, Ni, Fe, Cr<br>>>Sr>Cs, Li, Al |

(Dados obtidos considerando o fator de enriquecimento em função do potencial iônico do respectivo metal)

Adaptada de SPOSITO, 1986.

Para todos os tipos de organismos estudados o mercúrio apresenta alta toxicidade molar, ou seja, uma baixa concentração molar é suficiente para esse elemento produzir um substancial efeito tóxico.

### 2.1.2 - Mecanismo toxicológico do mercúrio

Os compostos de cadeia curta de alquilmercúrio são altamente tóxicos devido ao lento metabolismo e tendência à bioacumulação. Em particular, a ligação metilmercúrio é estável em muitos organismos e a adição de grupos alquil possibilitam a solubilidade em lipídios.

A solubilidade e a estabilidade da ligação entre  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  e ligantes biológicos resultam em alta meia-vida para essas espécies em vários organismos. Em humanos é de 60-70 dias, enquanto que o mercúrio na forma inorgânica apresenta meia-vida de 3-4 dias. A lenta excreção ocorre devido à decomposição do metilmercúrio em mercúrio inorgânico na flora intestinal. Mais de 90% do metilmercúrio é absorvido através do sistema gastrointestinal humano, seguido de absorções acumulativas nos eritrócitos (glóbulos vermelhos ou hemácias

responsáveis pelo transporte de oxigênio no organismo) originando células com razão plasmática acima de 100:1. A alta eficiência de transporte resulta na distribuição uniforme nos tecidos do organismo, sangue, rins e cérebro.

A elevada permeabilidade do metilmercúrio na interface sangue/cérebro possibilita a deterioração do sistema nervoso central por substituição das ligações metilmercúrio por fragmentos de sulfidril e subsequentemente a liberação dos íons mercúrio, os quais são fortemente ligados a sulfidril, inibindo a síntese de RNA e proteínas essenciais ao funcionamento motor e sensorial do sistema nervoso.

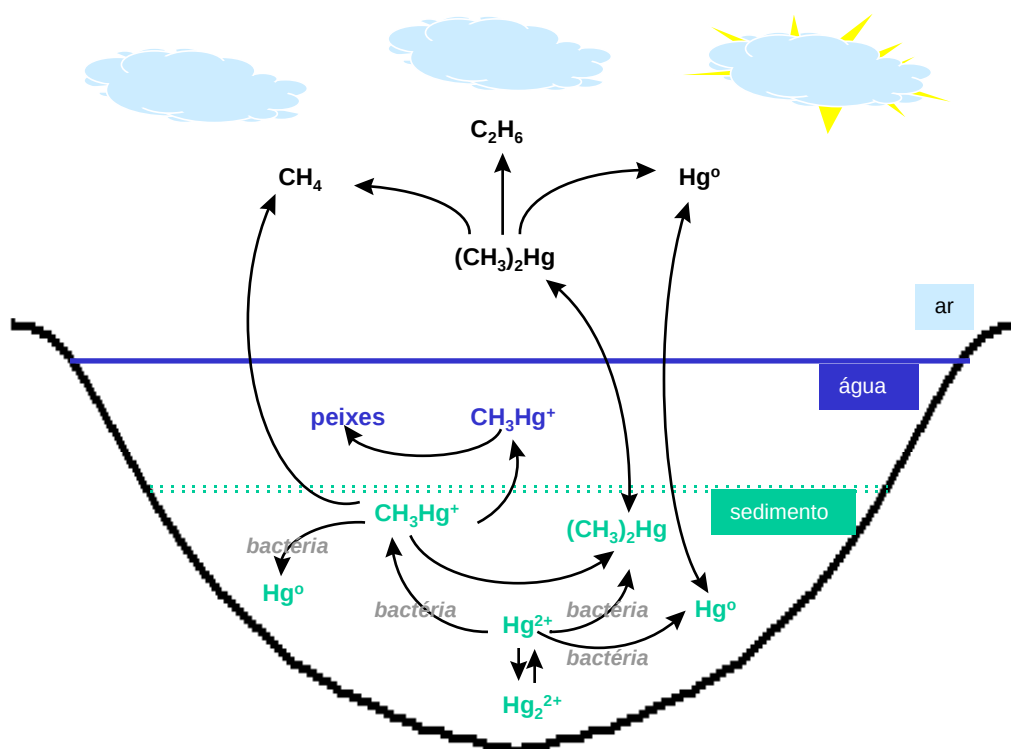
Em estudo sobre a diferença de toxicidade das espécies  $\text{Hg}^0$  e  $\text{Hg(II)}$  em meio de cultura contendo *Escherichia coli*, observou-se uma inibição na respiração das bactérias em função do tempo, usando  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de íons  $\text{Hg(II)}$ , similar àquela causada por  $5000 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Hg}^0$ , evidenciando a baixa toxicidade da espécie elementar (MICARONI *et al.*, 2000). No entanto, o mercúrio na forma de vapor é absorvido pelo organismo humano através do pulmão pelas membranas alveolares a uma proporção de 75 a 80%, quando inalado. No sangue, o mercúrio é oxidado pelos eritrócitos e, uma vez oxidado, o íon  $\text{Hg(II)}$  é rapidamente distribuído pelo corpo através do sangue, podendo se ligar também à albumina e à hemoglobina. Os principais sintomas associados à toxicidade por exposição ao mercúrio incluem tremor, vertigem, entorpecimento, dor de cabeça, fraqueza, depressão, distúrbios visuais, dispnéia, tosse, inflamações gastrointestinais, queda de cabelo, náusea e vômitos (MICARONI *et al.*, 2000; CRAIG, 1986).

### 2.1.3 - Interconversão de espécies e bioacumulação

Considerando o ciclo bioquímico global do mercúrio, a conversão mais importante entre espécies é a metilação do íon  $\text{Hg(II)}$  com conseqüente formação do íon metilmercúrio e do composto volátil dimetilmercúrio. Entretanto, a formação de metilmercúrio tem conseqüências mais sérias, pois este íon possui estabilidade química e entra facilmente na cadeia alimentar, principalmente a aquática, via peixes de consumo humano, acumulando-se sucessivamente (W.H.O, 1990). Estudos sobre a razão mercúrio total/metilmercúrio demonstram que peixes de diferentes espécies têm o mesmo potencial de bioacumulação e, comparados com outros organismos aquáticos, peixes são potencialmente mais capazes de fazê-lo (MAY *et al.*, 1987). Em peixes, o mercúrio orgânico encontra-se de 90-100% na forma de metilmercúrio (LIMAVERDE FILHO & CAMPOS, 1999).

Embora o processo não esteja ainda bem entendido, acredita-se que a metilação ocorra por ação bacteriológica, possivelmente como um mecanismo de eliminação de metais pesados por microorganismos (WOOD & WANG, 1983). A Figura 01 esquematiza o ciclo do mercúrio no ambiente.

Investigações específicas sobre o processo de metilação têm sido feitas considerando tanto metildoadores biogênicos como metildoadores abiogênicos (EBINGHAUS & WILKEN, 1993).



**Figura 01** - Ciclo do mercúrio no ambiente e seus mecanismos naturais de oxidação, redução e metilação. Adaptada de SALOMONS & FORSTNER, 1984.

O “ciclo do mercúrio” é regulado por processos físicos, químicos e biológicos, os quais ocorrem nas interfaces ar/água e água/sedimento (W.H.O., 1989). A extensão da toxicidade e a ação do mercúrio em ecossistema aquático não depende somente da concentração total, mas sim, da forma como estão ligados (ROCHA *et al.*, 1993). A compreensão desses mecanismos exige o emprego de técnicas analíticas aplicáveis a concentrações extremamente baixas em matrizes complexas, onde coexistem grande número de interferentes (BERNHARD, 1986).

## 2.2 - Técnicas para determinação de mercúrio

Espécies organo-mercuriais podem ser separadas e identificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada ou não a outras técnicas (BATLEY & LOW, 1989; WILKEN, 1992). Dentre as técnicas disponíveis para a determinação de mercúrio podem ser citadas a espectrometria de absorção molecular, análise por ativação neutrônica instrumental, diluição isotópica subestequiométrica, cromatografia, espectrometria de fluorescência atômica, espectrometria de fluorescência de raio-X, polarografia, eletrogravimetria, espectrometria de massas, espectrometria de emissão atômica e espectrometria de absorção atômica com chama ou geração de vapor frio (WILKEN & HINTELMANN, 1990).

### 2.2.1 - Geração de vapor de mercúrio à frio

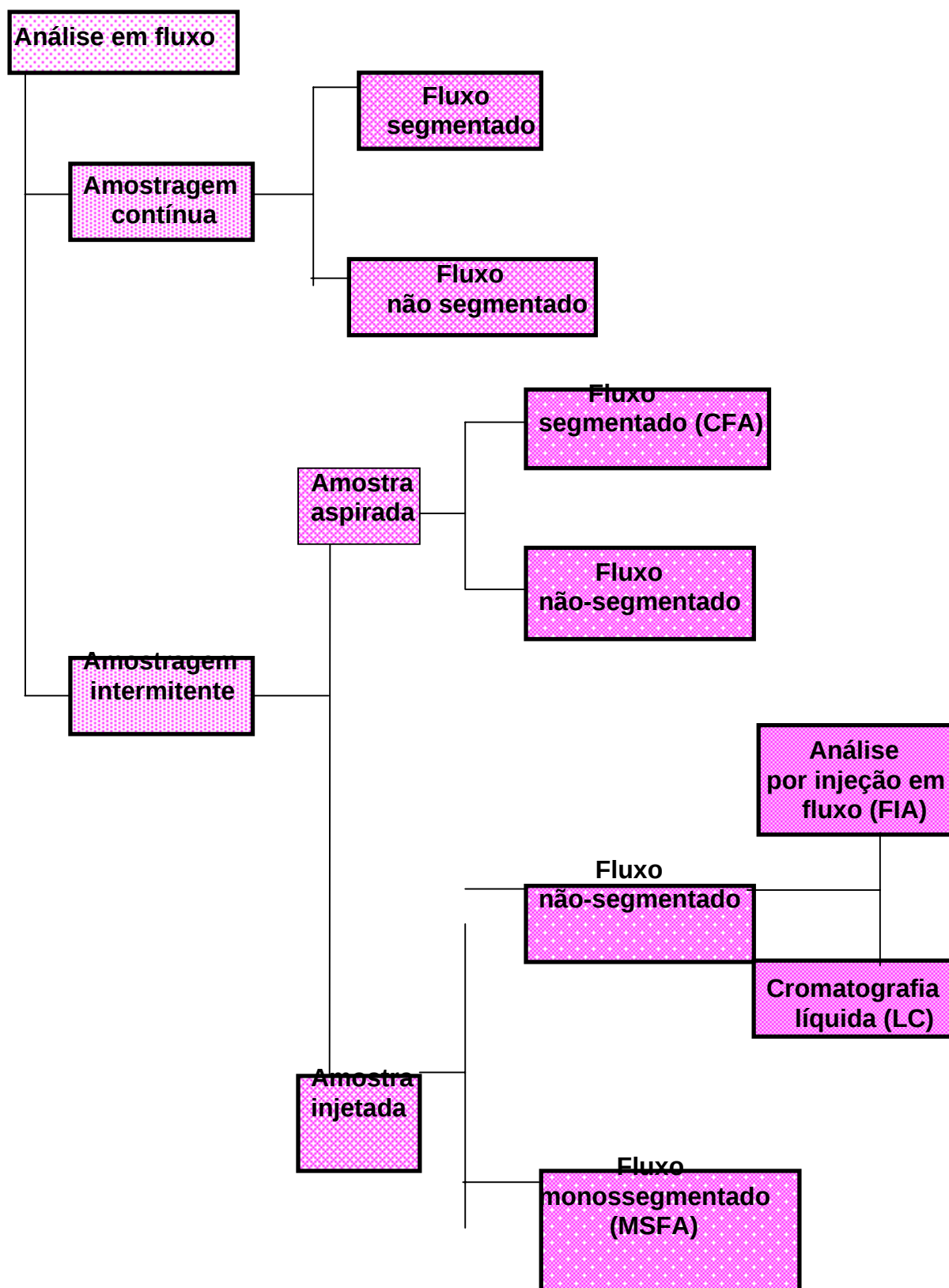
A geração de vapor à frio foi originalmente desenvolvida para amostras líquidas, e baseia-se na redução de íons mercúrio ao estado fundamental através de reação com estanho(II) ou borohidreto em solução aquosa (HATCH, 1968). A geração de vapor frio permite que o mercúrio seja determinado na fase de vapor sem a necessidade do uso de atomizadores com chama ou eletrotérmicos devido sua alta volatilidade, possibilitando a formação de átomos no estado gasoso sem a necessidade de tratamentos especiais.

RIMURA & MILLER, 1962, foram os primeiros a utilizar a redução de íons mercúrio(II) com solução de cloreto de estanho em meio ácido. O mercúrio reduzido era transportado por um gás de arraste e borbulhado em solução de permanganato de potássio contida em um tubo de vidro. Nesta solução coletora, o vapor de mercúrio era oxidado e a solução transferida para um funil de separação,

onde se procedia uma extração com ditizona em clorofórmio e posterior medida do ditizonato de mercúrio a 605 nm. Em 1964, POLUEKTOV *et al.*, utilizaram cloreto estanoso como redutor para a geração de vapor frio e sua detecção por espectrometria de absorção atômica, recebendo mais tarde a abreviatura CVAAS (do inglês “Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry”). BAILEY *et al.* (1971) automatizaram o método de CVAAS utilizando fluxo contínuo com segmentação por ar para a análise de águas, cinzas, óleo, sangue, urina, cabelo e peixe, utilizando digestão prévia. Este método permitia a análise de vinte e duas amostras por hora, utilizando-se um pequeno volume de amostra. Em 1983, ANDRADE *et al.*, propuseram o primeiro sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) para determinação de mercúrio por CVAAS. Desenvolveram um separador gás/líquido com membrana de PTFE permeável ao mercúrio. Este separador era acoplado diretamente à cela de absorção atômica. O sistema proposto apresentou frequência analítica de 110 amostras por hora e limite de detecção de  $1,4 \mu\text{g Hg L}^{-1}$ . Desde então, foram feitas várias modificações do procedimento inicial com o objetivo de aumentar a sensibilidade, seletividade e limite de determinação. Vários autores têm proposto sistemas automatizados ou não acoplados a técnica CVAAS (MALM *et al.*, 1989, ROCHA *et al.*, 1994), utilizando-se a técnica de análise por injeção em fluxo (FIA), descrita por RÜZICKA & HANSEN (1988), otimizando alguns parâmetros (GOMES NETO *et al.*, 2000). A técnica CVAAS, possibilita o isolamento do mercúrio de possíveis interferentes, é considerada prática, simples, de fácil manuseio e de baixo custo operacional. Além disto, é uma das técnicas mais adequadas para a determinação de mercúrio a níveis de traço e o sistema analítico é passível de modificações para a determinação de mercúrio em matrizes diversas.

## 2.3 - Sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA)

A definição análise em fluxo é recomendada a todos os métodos analíticos os quais são baseados na introdução e processamento de amostras em fluxos. Uma classificação preliminar pode ser baseada na forma como a alíquota da amostra é introduzida e na característica básica do fluxo, de acordo com o diagrama representado na Figura 02. Vários componentes dos analisadores em fluxo tais como amostradores (REIS *et al.*, 1992), filtros (FATIBELLO *et al.*, 1994), reatores (CALATAYUD & MATEO, 1993), pontos de adição de reagentes (BERGAMIN *et al.*, 1978), colunas de troca-iônica (ZARA *et al.*, 2001; BURBA *et al.*, 1993), detectores óticos (ZAGATTO *et al.*, 1992) e eletroquímicos (GOMES NETO *et al.*, 1994), podem ser deslocados de sua posição original até outra previamente selecionada do percurso analítico mediante comutação (KRUG *et al.*, 1986). Estas opções de automação possibilitam a utilização de diversas metodologias analíticas, citadas na literatura (ZAGATTO *et al.*, 1999). O acoplamento da técnica de determinação de mercúrio com sistemas de injeção em fluxo (FIA) tem se mostrado versátil não apenas em função da seletividade, sensibilidade e simplicidade do método, mas também pela facilidade das etapas de separação e/ou concentração que são incorporadas e operadas em condições altamente repetitivas. A disponibilidade de redutores de baixo custo, com grau de pureza satisfatório e cinética favorável com íons mercúrio, bem como a possibilidade de se empregar ar como gás de arraste do vapor de mercúrio (ROCHA *et al.*, 1994), são aspectos positivos para a automatização do processo de determinação de mercúrio.



**Figura 02** - Diagrama da classificação dos métodos de análise em fluxo. Adaptada de ZAGATTO *et al.*, 1999.

## 2.4 – Rio Negro

O Rio Negro, é um dos maiores afluentes do Rio Amazonas, sendo responsável pela maior parte do fluxo de ácidos húmicos (AH) para o Rio Amazonas, contribuindo com cerca de 2,5 vezes mais que o Rio Solimões (ERTEL *et al.*, 1986). A baixa concentração de cálcio e magnésio nas formações geológicas das nascentes do Rio Negro e as substâncias húmicas aquáticas, originárias de substâncias orgânicas não mineralizadas completamente no solo das florestas, são responsáveis pelos baixos valores de pH da água do Rio Negro (IVANISSEVICH, 1990). As substâncias húmicas são transportadas para o Rio Negro pelos Igarapés (riachos) que drenam os solos podozólicos das campinas. Durante prolongados períodos secos, não ocorre percolação do solo e os Igarapés transportam somente água e íons estocados por muito tempo no solo argiloso, aumentando a alcalinidade, o teor de íons e diminuindo a coloração das águas (WALKER, 1990). Os solos arenosos da Bacia Amazônica são pobres em nutrientes e permitem a percolação rápida da chuva pela areia, dificultando a decomposição completa da serapilheira. Assim, a maior parte do carbono orgânico dissolvido (COD) nos ambientes aquáticos tropicais, particularmente em rios de água escura como o Rio Negro, está presente como substâncias húmicas aquáticas (ROCHA *et al.*, 1998). Valores típicos de COD são de  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$  em água do mar,  $7,0 \mu\text{g L}^{-1}$  em rios,  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  em pântanos e nos estuários variam entre os valores dos rios e da água do mar. Em águas salgadas cerca de 20% do COD é proveniente de material húmico, 60% em rios e 70% em áreas alagadas. Estes dados mostram que as SH são importantes, se não predominantes, adsorventes metálicos em águas naturais (CHOUDRY, 1982).

## 2.5 - Matéria orgânica natural aquática

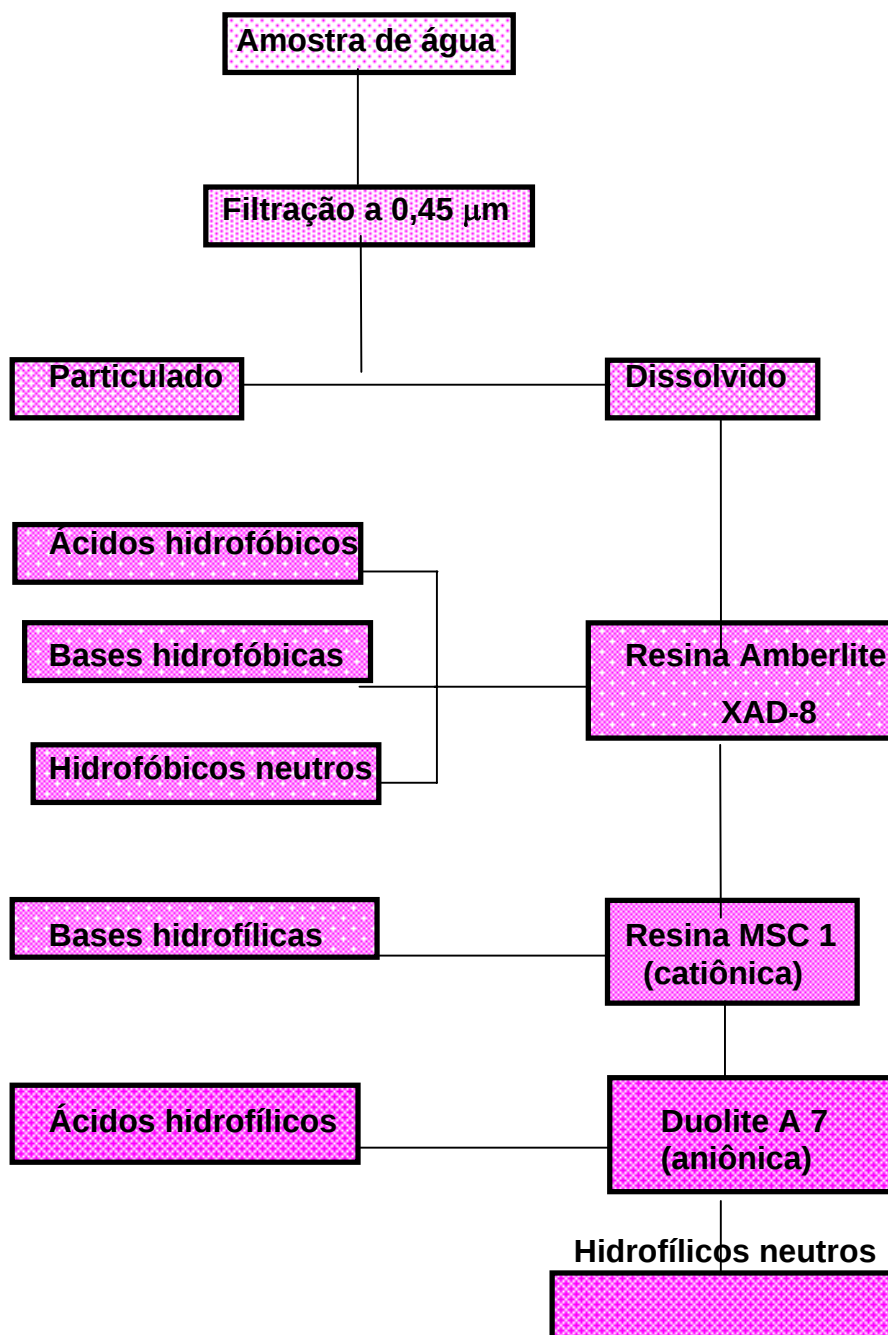
A expressão “matéria orgânica natural” (MON) é usada para designar o material orgânico no ecossistema natural. A MON em águas naturais é composta por uma mistura complexa de compostos, muitos dos quais não são identificados, originados por diversos processos naturais de síntese e degradação, sendo possível uma infinidade de compostos constituintes da mistura.

Em geral, a matéria orgânica natural em sistemas aquáticos pode ser diferenciada em :

**Pedogênica:** MON devido à lixiviação em solo com material orgânico, o qual resulta da decomposição de plantas, bactérias e fungos.

**Aquagênica:** MON formada no sistema aquático, essencialmente por excreção e decomposição de plâncton e bactérias aquáticas (BUFFLE, 1990).

A matéria orgânica em sistema aquático pode ser operacionalmente dividida em particulada e dissolvida, por processo de filtração com filtro de porosidade 0,45  $\mu\text{m}$  (DANIELSSON, 1982). O carbono orgânico dissolvido (COD) pode ser fracionado em hidrofóbico e hidrofílico, como mostra o diagrama de fracionamento pelo método de LEENHEER e NOYES (Figura 03).



**Figura 03** - Diagrama de fracionamento do carbono orgânico dissolvido proposto por LEENHEER e NOYES. Adaptada de FRIMMEL, 1992.

## 2.6 - Substâncias húmicas aquáticas (SHA)

A definição de substâncias húmicas aquáticas está baseada em métodos cromatográficos de extração. THURMAN & MALCOLM (1981) definiram SHA como a porção não específica, amorfa, constituída de carbono orgânico dissolvido em pH 2,0 e adsorvente em coluna de resina XAD-8 com altos valores de coeficiente de distribuição. As SHA são constituídas em sua maior parte por ácidos hidrofóbicos. A fração extraída de COD de uma amostra depende da polaridade da resina utilizada, da quantidade de amostra passada pela resina e do eluente utilizado. A variedade do material inicial e o grande número de possíveis reações ocorridas no processo de degradação da matéria orgânica, são as razões das dificuldades em sugerir a fórmula estrutural exata das SHA. Esses fatores, também levam a formação de várias composições de SHA, tornando indispensável aos estudos a descrição detalhada da origem, tratamento e dos métodos aplicados às amostras durante a extração (FRIMMEL, 1992).

A presença de diferentes grupos funcionais nas SH, permite o uso de várias técnicas para obter informações a respeito da funcionalidade e mecanismos de reação das SH no ambiente. Estudos utilizando espectrometria na região do infravermelho, ultravioleta-visível e ressonância magnética nuclear (RMN  $C^{13}$  e RMN  $H^1$ ) têm contribuído para um melhor conhecimento estrutural das SHA (HAIDER *et al.*, 1991; ABBT-BRAUN, 1992; ROCHA *et al.*, 2000). Entretanto, a complexidade dessas substâncias, não permite uma caracterização mais detalhada da composição estrutural e de possíveis mecanismos de formação de complexos (GAFFNEY *et al.*, 1996).

### 2.6.1 - Efeito das cargas intramoleculares e intermoleculares

Substâncias húmicas são consideradas como polieletrólito linear, flexível e com ocorrência de cargas negativas em pontos fixos ao longo de sua estrutura decorrente da ionização de grupos ácidos carboxílicos, tornando a macromolécula expandida devido a repulsão das cargas negativas (SCHNITZER, 1978). As interações intramoleculares do tipo pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals, elétrons  $\pi$  de anéis adjacentes e sítios hidrofóbicos favorecem a conformação estrutural condensada. O equilíbrio existente entre as forças de repulsão e atração intramoleculares e intermoleculares induzem a conformação estrutural da macromolécula húmica (SWIFT, 1989). A intensidade das forças de repulsão e a distância de aproximação entre as moléculas dependem de inúmeros fatores, alguns de grandeza de cargas, de tamanho macromolecular e força iônica da solução. As considerações teóricas desse comportamento estão baseadas nos efeitos de Donnan e na teoria da dupla camada elétrica (GHOSH & SCHNITZER, 1980). As forças de repulsão entre as moléculas podem ser superadas com o aumento da concentração de eletrólitos. Os contra-íons em solução minimizam o potencial de carga no polieletrólito húmico, o qual não é estendido em solução devido ao efeito da dupla camada possibilitando aproximações mais efetivas das macromoléculas húmicas. As interações intermoleculares podem levar a formação de dipolos induzidos devido ao deslocamento de elétrons  $\pi$  de anéis aromáticos favorecendo a conformação estrutural condensada (BARTSCHAT, 1992). Estes efeitos podem resultar na associação de macromoléculas causando a coagulação ou flotação, e eventual precipitação (SWIFT, 1989).

### 2.6.2 - Propriedades complexantes

Agentes complexantes aquáticos podem ser divididos em duas categorias:

*Ligante simples (L)*:  $\text{Cl}^-$ ;  $\text{CO}_3^{--}$  e aminoácidos.

*Compostos com grupos homólogos (CGH)*: SH, proteínas e óxidos de metais.

Compostos com grupos homólogos frequentemente contêm grande número de sítios complexantes por molécula e a concentração molar total destes sítios pode ser comparada à concentração de muitos ligantes simples. A estabilidade dos complexos correspondentes é geralmente alta e, portanto, têm importante papel na distribuição dos metais em águas naturais.

O ambiente pode exercer influência na estabilidade do complexo SH-Metal devido as macromoléculas húmicas apresentarem :

#### *I - Propriedades polifuncionais:*

##### *(a) Natureza química dos sítios de coordenação:*

Em contraste aos ligantes simples, os compostos com grupos homólogos possuem sítios de coordenação com diferentes naturezas químicas.

*(b) Meio eletrônico dos sítios de coordenação*: dentro de uma dada macromolécula grupos complexantes podem ser originários de diferentes fragmentações (cadeia alifática, anéis aromáticos), assim, podem exercer diferentes efeitos eletrônicos.

*(c) Impedimento estérico dos sítios*: os compostos com grupos homólogos podem formar uma capa ao redor dos ligantes simples influenciando a estabilidade do complexo formado.

*II - Cargas conformacionais*: O impedimento estérico dos sítios S depende da conformação espacial da macromolécula, a qual pode variar de acordo com a força iônica do meio, pH e concentração de íons na solução. A conformação depende em particular do processo de hidratação, desidratação e formação de pontes de

hidrogênio ou ligações com íons metálicos, as quais dependem do grau de ocupação dos sítios complexantes.

**III - Propriedades polieletrólíticas:** Sítios complexantes em macromolécula húmica são divididos em sítios maiores e sítios menores dependendo da fração molar total de sítios considerados. Sítios maiores são aqueles presentes na ordem de 90 % dos sítios presentes (carboxilatos e fenolatos). Sítios menores correspondem a uma pequena fração dos sítios complexantes totais, porém incluem um número variado de tipos de sítios com grupos funcionais contendo nitrogênio e enxofre. Para o controle de metais traço em sistemas naturais estes sítios são de grande importância devido à sua alta energia de complexação e afinidade por metais de transição e metais moles (ENCYCLOPEDIA ANALYTICAL SCIENCE, 1995). Em ligantes orgânicos naturais, particularmente nas macromoléculas, a formação de complexos mistos é favorecida por sua grande extensão e em especial à ocorrência simultânea de formação de interações  $\pi$ , interação eletrostática, ponte de hidrogênio, interação apolar de sítios hidrofóbicos, e interações de Van der Waals (BUFFLE, 1990).

## 2.7 – Redução de mercúrio iônico por SHA

Em ambientes aquáticos as SH estão envolvidas em múltiplos processos de interações com contaminantes inorgânicos e orgânicos devido sua elevada polifuncionalidade (ROCHA *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 1998). As interações de SH com metais pesados não está somente limitada à complexação, mas também reações de oxiredução, tais como manganês (HEINTZE & MANN, 1946), ferro (SZILAGYI, 1971), vanádio (POMMER, 1957), crômio e molibdênio (LAKATOS *et al.*, 1977) e mercúrio (ALBETS *et al.*, 1974; SKOGERBOE & WILSON, 1981; ALLARD & ARSENIE, 1991; MATTHIESSEN, 1995)

A interação de íons metálicos com SHA é geralmente controlada por fatores termodinâmicos e cinéticos (BURBA, 1998). Portanto, a estabilidade do complexo metal-SH em águas naturais não pode ser descrita utilizando constantes de estabilidade convencionais. Semelhantes aspectos são considerados no processos de complexação e redução de íons mercúrio(II) por substâncias húmicas aquáticas.

Em recentes investigações, FADINI & JARDIM (2001) sugerem que o solo da região da Bacia do Rio Negro (Amazônia) possui elevada concentração de mercúrio natural. Devido aos processos de lixiviação durante a maior parte do ano, os íons mercúrio são conduzidos provavelmente do solo para o sistema aquático da Bacia Amazônica. Destas investigações foi sugerido que as SHA funcionam como um importante tampão natural reduzindo a disponibilidade e a toxicidade do mercúrio nesses sistemas aquáticos. WALLSCHÄGER *et al.* (1995) observaram que consideráveis frações de mercúrio são volatilizadas, na forma de organomercúrio e mercúrio elementar, de compartimentos ambientais ricos em substâncias húmicas.

O processo de redução de mercúrio(II) a mercúrio elementar por substâncias húmicas foi cineticamente caracterizado por ALBERTS *et al.* (1974). De acordo com

estes estudos a redução de Hg(II) por ácido húmico aquático apresentou cinética de primeira ordem com constante de velocidade relativamente baixa de  $0,0009\text{ h}^{-1}$ . Um estudo análogo de investigação da redução de Hg(II) por ácido fúlvico extraído de solo utilizando espectrometria de absorção atômica, mostrou que ocorre a evolução de mercúrio elementar da solução de AF predominantemente durante os 20 s iniciais (SKOGERBOE & WILSON, 1981). ALLARD & ARSENIE (1991) mostraram que a capacidade de redução de Hg(II) por SHA depende fortemente das condições experimentais, por exemplo o valor do pH, condições aeróbias/anaeróbia, exposição à luz e a presença de cloreto. MATTIESSEN (1996) estudou detalhadamente o processo de redução de Hg(II) por ácido húmico comercial utilizando um sistema de titulação acoplado a espectrometria de absorção atômica com geração de vapor à frio de mercúrio elementar. Este estudo mostrou que a redução de Hg(II) por SH segue uma complexa cinética em duas etapas e após subseqüentes reduções de frações de Hg(II) ocorre a diminuição da capacidade de redução de Hg(II) por SH. Destas investigações pode ser sugerido que a redução de Hg(II) por SH é um importante processo a ser considerado para a volatilização deste metal de ambientes aquáticos ricos em substâncias húmicas.

## 2.8 – Fracionamento das substâncias húmicas aquáticas

Um importante pré requisito para trabalhar com SH é o desenvolvimento de procedimentos adequados para sua extração e fracionamento (BURBA *et al.*, 1995). Fracionamentos baseados em diferença de solubilidade (STEVENSON, 1982; ROSA, 1999), tamanho molecular (SWIFT, 1996; TOWN & POWELL, 1992), densidade de carga (SENESI *et al.*, 1994), precipitações com íons metálicos (SWIFT, 1985) e características de adsorção (SWIFT, 1985) têm sido utilizados para separar SH em diferentes frações.

A variação do pH é a forma mais utilizada para fracionamento das SH extraídas de solos por solventes alcalinos (STEVENSON, 1982). As frações obtidas são ácido húmico, ácido fúlvico e humina (HAYES, 1978). Recentemente, ROSA *et al.* (2001), propuseram um método para fracionamento de SH em ácidos húmicos e fúlvicos utilizando sistema de fluxo contínuo.

A cromatografia por permeação em gel tem sido extensivamente aplicada para o fracionamento de macromoléculas húmicas com base no tamanho molecular (SWIFT, 1996). Os géis mais utilizados consistem de polissacarídeos, poliestireno e poliamidas na forma de pequenos grânulos. A estrutura do gel é permeada por poros com capacidade de agir como meio cromatográfico permitindo a separação com base nas diferenças de tamanho molecular. Moléculas menores podem penetrar nos poros e sua passagem na coluna é retardada. Assim, as moléculas são eluídas em ordem decrescente de massa molecular. Esta técnica é rápida, barata e muito versátil. Entretanto, alguns problemas, tais como interações químicas ou físicas entre o gel e o soluto, devem ser contornados para não invalidar os resultados. As SH quando adsorvidas pelo gel, alteram os resultados da separação os quais não podem ser inteiramente atribuídos às diferenças de massa molecular. O mesmo

problema pode resultar da interação de cargas entre o gel e as macromoléculas húmicas. Esses inconvenientes podem ser evitados utilizando-se o gel e a solução eluidora adequada (SWIFT, 1971). TOWN & POWELL (1992), conseguiram eliminar os efeitos de adsorção adicionando soluções de tetraborato de sódio  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  e pirofosfato de sódio  $0,001 \text{ mol L}^{-1}$  ao eluente. O amplo intervalo de peso molecular característico das SH pode gerar dificuldades na escolha de um gel adequado.

A ultrafiltração (UF) é uma técnica simples e rápida a qual permite o fracionamento das SH utilizando uma série de membranas. A técnica de filtração através de membranas tem sido utilizada, principalmente em indústrias, para fracionar material dissolvido e particulado em sistemas aquosos e tem mostrado ser efetiva não só em procedimentos preparativos mas também em escala analítica (BUFFLE, 1988; KILDUFF & WELBER, 1992; GECKELER *et al.*, 1992). Unidades de ultrafiltração (UF) com fluxo tangencial permitem filtração relativamente rápida devido ao reduzido processo de obstrução dos poros pois, os compostos acumulados na superfície da membrana são deslocados pelo forte fluxo cruzado (SHKINEV *et al.*, 1996). O fracionamento de substâncias húmicas por UF em filtros de membranas adequados é, em princípio, um método simples para estudar essa complexa mistura de macromoléculas. Assim, a caracterização de importantes propriedades físicas e químicas das SH dissolvidas tais como solubilidade, comportamento de adsorção, acidez, capacidade complexante com íons metálicos, distribuição de grupos funcionais/estruturas reativas etc. pode ser feita em função da distribuição dos diferentes tamanhos moleculares (SWIFT, 1996).

Trabalhos recentes (ASTER *et al.*, 1996; BURBA *et al.*, 1998; SARGENTINI Jr, 2001) mostraram que sistemas de ultrafiltração com múltiplos estágios, podem

ser uma importante técnica para especiação de metais e caracterização de frações de substâncias húmicas aquáticas com diferentes tamanhos moleculares

Sistemas de ultrafiltração geralmente têm as membranas acopladas em peças individuais construídas em acrílico encaixadas umas nas outras e com os mini reservatórios das frações torneados nas próprias peças. São de construção relativamente complicada e, para evitar vazamentos, exigem mecânica de alta precisão e mão de obra especializada (BURBA *et al.*, 1998). Do ponto de vista operacional, têm o inconveniente de fornecer um volume de frações relativamente pequeno (0,5-10 mL), dificultando ou até mesmo impedindo maior número de caracterizações de uma mesma amostra.

ROCHA *et al.* (2000) propuseram um sistema de fracionamento sequencial por ultrafiltração (SFSUF) utilizando filtros comerciais com membranas de polietersulfônica (Sartocon<sup>®</sup> Micro) para fracionar substâncias húmicas aquáticas em diferentes tamanhos moleculares. No SFSUF a amostra é fracionada passando através de uma série de filtros de membrana com fluxo tangencial acoplados "on-line". É de montagem simples, fácil manuseio, operado por bomba peristáltica com múltiplos canais, custo relativamente baixo, trabalha-se em sistema fechado e possibilita obtenção de 25 mL de cada fração.

## 3 - MATERIAIS

- balança analítica Mettler, modelo H 10, mecânica de precisão 0,1 mg;
- balança Denver Instrument Company 400 XE séries, eletrônica, de prato externo, precisão 0,01 g e capacidade máxima de 400 g;
- banho termostático;
- bloco digestor para 15 determinações simultâneas, Sarge, modelo 15-60;
- bomba peristáltica Ismatec IPC-8;
- chapa aquecedora Quimis, modelo 31;
- medidor de pH Orion modelo 250 A;
- micro pipetas automáticas das marcas VWR e Finnpipette Labsystems;
- sistema purificador de água Millipore-Modelo Milli-Qplus;
- espectrofotômetro UV/VIS HITACHI, modelo U2000;
- evaporador rotativo Tecnal, modelo TE-120 equipado com sistema de alto vácuo Edwards, modelo Speedivac-2;
- filtros de membrana de *polyethersulfone*\* com diferentes porosidades (Sartocon<sup>®</sup> Micro): SM 15669-00-1 (100 KDa), SM 15650-00-1 (50 KDa), SM 15659-00-1 (30 KDa), SM 15639-00-1 (10 KDa) e SM 15629-00-1 (5K Da);
- espectrômetro de absorção atômica Perkin Elmer, modelo Analyst 300 equipado com lâmpada de cátodo oco para mercúrio Intralab, modelo 56-100034-0;
- cela de fluxo comerciais dos fabricantes Perkin Elmer e Varian;
- célula de fluxo feita em tubo de acrílico (5 x 200 mm;  $\phi = 3$  mm);
- espectrômetro de emissão atômica por plasma de argônio induzido ICP-AES, Thermo Jarrel-Ash, modelo IRIS/CID;
- câmara de separação gás-líquido feita em vidro (3 x 2 cm);
- tubos de bombeamento Tygon<sup>®</sup>;

- injetor-comutador proporcional;
- medidores de fluxo Cole Parmer, modelo IL 60714;
- vidraria comum a um laboratório de Química Analítica;
- sistema de filtração à vácuo acoplado a bomba de vácuo marca Primar, modelo 141, utilizando-se papel de filtro Whatman 42;
- resina de base acril-ester XAD-8;
- resina Chelite S<sup>®</sup>;
- tubos de PTFE de 0,8 mm de diâmetro interno para construção de bobinas de reação, linhas de transmissão e alças de amostragem;
- tubos de diálise da Fundação Sardi, de 12-14.000 MW, com 1X30 m e diâmetro com 27 mm. Referência: 57736-7000/1;

## 4 - EXPERIMENTAL

## 4.1 - Purificação da água

Toda água utilizada foi previamente destilada e purificada em sistema desionizador de água, marca Millipore, até apresentar resistividade de  $18,2 \Omega \text{ cm}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ .

## 4.2 - Purificação de ácidos

Todas as soluções concentradas de ácidos nítrico e clorídrico foram previamente pré-purificadas em destilador construído em quartzo (“subboiling”).

## 4.3 - Limpeza da vidraria

Feita com vapor de ácido nítrico concentrado, segundo procedimento proposto por TSCHÖPEL *et al.* (1980). Neste caso colocaram-se a vidraria com o fundo para cima em um suporte de vidro acoplado dentro de um béquer de 5 L contendo cerca de 300 mL de ácido nítrico concentrado e tampado com vidro de relógio. Aqueceu-se o béquer em chapa por, no mínimo, 6 h. Em seguida, enxaguaram-se os frascos exaustivamente com água desionizada. Alternativamente, a vidraria é lavada duas ou três vezes com água desionizada para tirar o excesso de ácido e repete-se o procedimento de refluxo substituindo-se o ácido nítrico por água desionizada. O ácido nítrico pode ser utilizado duas a três vezes e, então, descartado.

## 4.4 - Reagentes e soluções

### 4.4.1 - Sistema FIA-CVAAS

Prepararam-se diariamente as soluções de trabalho ( $5,0 \mu\text{g L}^{-1} \text{Hg}$ ) em  $\text{HNO}_3$  2,5 % (v/v) e  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  0,005 % (m/v) (FELDMAN, 1974) por diluição apropriada de solução

estoque contendo 1000,0 mg L<sup>-1</sup> (Normex®, Carlo Erba) e as soluções de SnCl<sub>2</sub> 10% (m/v) em HCl 1,0 mol L<sup>-1</sup>.

#### 4.4.2 - Sistema FIA-Chelite-CVAAS

Prepararam-se diariamente as soluções de trabalho (2,0 µg L<sup>-1</sup>) em HNO<sub>3</sub> 2,5 % (v/v) e K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0,005 % (m/v) (FELDMAN, 1974) por diluição apropriada de solução estoque contendo 1000,0 mg L<sup>-1</sup> (Normex®, Carlo Erba) e as soluções de eluição contendo SnCl<sub>2</sub> 20% (m/v) em HCl 6 mol L<sup>-1</sup>. Empacotaram-se a coluna (Tygon® 30x3 mm) com 30 mg resina de troca iônica Chelite S® (Serva Feinbiochemica Heidelberg, granulometria 0,3-0,8 mm).

#### 4.4.3 – Extração e fracionamento das substâncias húmicas

Utilizaram-se soluções de ácido clorídrico e hidróxido de sódio de alta pureza no preparo das soluções utilizadas no processo de extração das substâncias húmicas aquáticas. Utilizaram-se soluções de bicarbonato de sódio 2% (m/v) e EDTA dissódico dihidratado 0,01 mol L<sup>-1</sup>, para o preparo das membranas de diálise (SAMLESS CELL 16 X 100 CLEAR).

#### 4.4.4 - Sistema de reação/aprisionamento de mercúrio

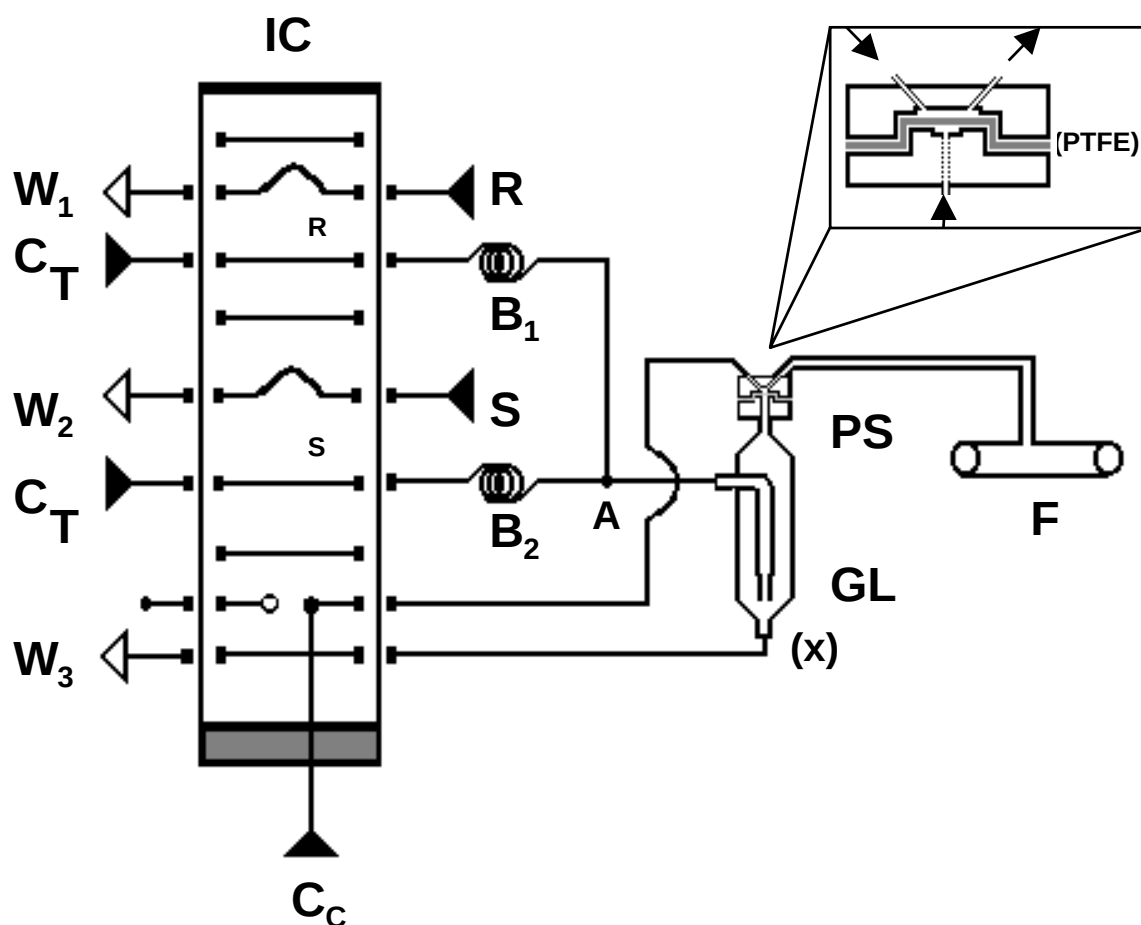
Preparou-se a solução de aprisionamento de Hg<sup>0</sup> contendo KMnO<sub>4</sub> 0,024 % (m/v) em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4,0 % (v/v) (HARSÁNYL *et al.*, 1973).

## 4.5 - Sistema de purificação do ar

Utilizaram-se sistema de purificação do ar constituído por 3 colunas (60 cm;  $\phi = 2$  cm) de lã de vidro, de sílica gel e de carvão ativo, respectivamente.

## 4.6 - Sistema desenvolvido para análise por injeção em fluxo acoplado a espectrometria de absorção atômica com geração de vapor de mercúrio a frio (FIA-CVAAS)

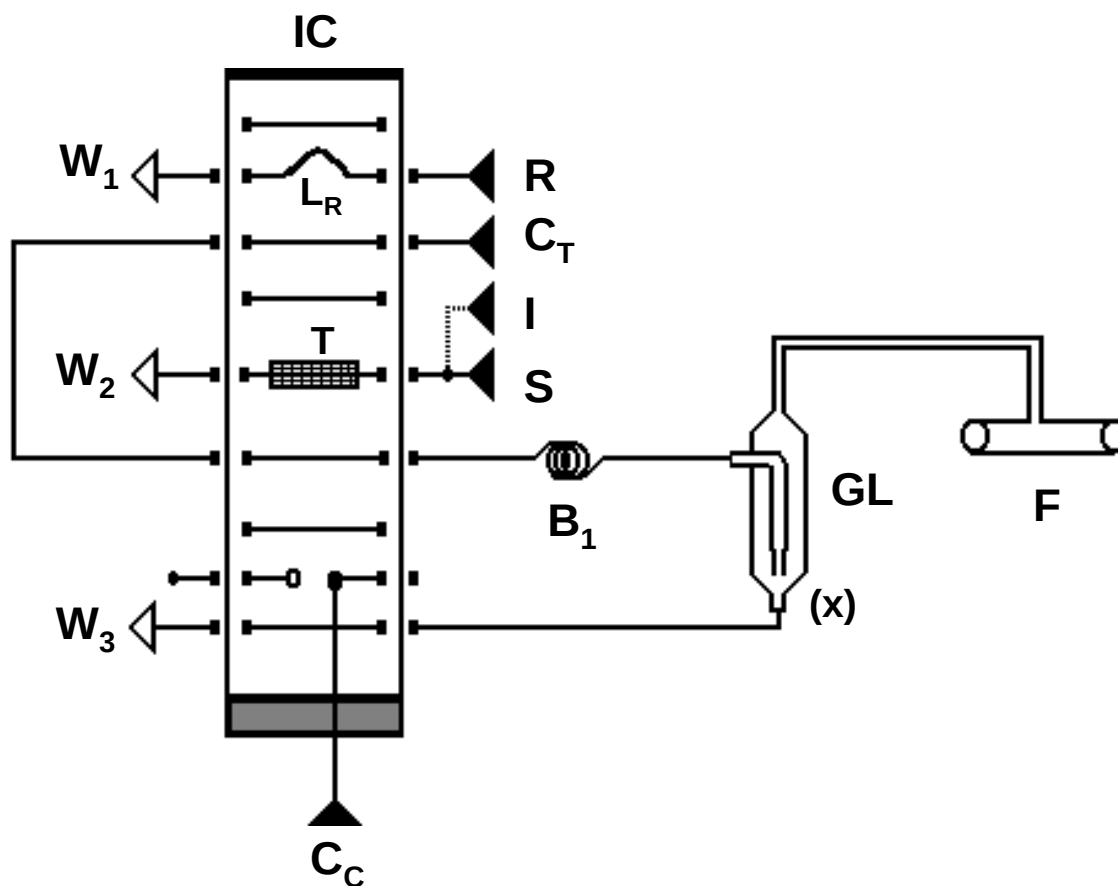
A Figura 04 mostra o sistema desenvolvido FIA-CVAAS. As alíquotas de amostra (S) e reagente (R), selecionadas pelas alças de amostragem  $L_S$  e  $L_R$ , respectivamente, são intercaladas no transportador  $C_T$  por um processo de zonas coalescente assíncronas e transportadas sequencialmente até o interior da câmara de reação/separação gás-líquido (GL). Na posição de injeção do injetor-comutador (IC), um fluxo de ar para arraste ( $C_C$ ) entra pelo orifício (X) localizado na parte inferior da câmara GL e arrasta o vapor de mercúrio em direção à cela de fluxo (F) do espectrômetro de absorção atômica, atravessando previamente um sistema de separação gás/líquido (P) constituído por uma membrana de PTFE, resultando um sinal transiente de absorbância. Após obtenção do máximo do sinal, o injetor-comutador é deslocado para a posição de amostragem e a solução no interior da câmara GL é aspirada por um fluxo intermitente reverso no orifício (X) e o fluxo de ar  $C_C$  é direcionado à cela de fluxo.



**Figura 4** - Sistema desenvolvido para a determinação de mercúrio por FIA-CVAAS. Condições: S: amostra,  $2,4 \text{ mL min}^{-1}$  ( $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ); R: reagente ( $2,4 \text{ mL min}^{-1}$ );  $C_T$ : gás transportador (ar,  $50 \text{ mL min}^{-1}$ );  $C_C$ : gás arraste (ar,  $75 \text{ mL min}^{-1}$ );  $L_S$  e  $L_R$ : alças de amostragem ( $2,5 \text{ mL}$ ) e reagente ( $0,5 \text{ mL}$ ,  $\text{SnCl}_2$  10% (m/v)), respectivamente;  $B_1$ : reator ( $150 \text{ cm}$ );  $B_2$ : reator ( $10 \text{ cm}$ ); W: frasco de descarte; GL: câmara de reação/separação gás-líquido; PS: câmara de separação gás/líquido; F: cela de fluxo; IC: injetor comutador; X: ponto do intermitente reverso, A: ponto de confluência reagente/amostra

#### **4.7 - Sistema desenvolvido para análise por injeção em fluxo acoplado a espectrometria de absorção atômica com etapa de pré-concentração utilizando resina Chelite S<sup>®</sup> e geração de vapor de mercúrio a frio (FIA-Chelite-CVAAS)**

A Figura 05 mostra o sistema desenvolvido FIA-Chelite-CVAAS. Na posição especificada do injetor-comutador (IC) as soluções amostras (S) são pré-concentradas na coluna de troca-iônica (T) enquanto uma alíquota de reagente/eluente é selecionada no alça de amostragem  $L_R$ . Mediante comutação,  $L_R$  e T são intercalados no fluxo de gás nitrogênio transportador ( $C_T$ ). O reagente/eluente é transportado pelo fluxo  $C_T$  e ao passar pela coluna T empacotada com resina Chelite<sup>®</sup> S desloca e reduz simultaneamente o analito. A mistura é injetada no interior da câmara de reação/separação gás-líquido (GL). Um fluxo de nitrogênio para arraste ( $C_C$ ) é introduzido pela parte inferior desta câmara (X) arrastando o vapor de mercúrio em direção à cela de fluxo (F) do espectrômetro de absorção atômica, resultando em um sinal transiente de absorbância. Após obtenção do máximo do sinal, o injetor-comutador é deslocado novamente, e a solução no interior da câmara GL é aspirada por um fluxo intermitente reverso no ponto (X).



**Figura 05** - Diagrama do sistema desenvolvido para a determinação de mercúrio por FIA-Chelate-CVAAS. Condições: S: amostra,  $2,5 \text{ mL min}^{-1}$  ( $2,0 \mu\text{g L}^{-1} \text{ Hg}$ ); R: reagente/eluyente ( $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ ); C<sub>T</sub>: gás transportador ( $4 \text{ mL N}_2 \text{ min}^{-1}$ ); C<sub>C</sub>: gás arraste ( $20 \text{ mL N}_2 \text{ min}^{-1}$ ); L<sub>R</sub>: alça de amostragem ( $50 \mu\text{L}$ ); eluyente:  $\text{SnCl}_2$  20% (m/v) em  $\text{HCl}$   $6 \text{ mol L}^{-1}$ ; T: coluna empacotada com resina de troca iônica Chelite® S ( $30 \times 3 \text{ mm}$ ); W: frasco de coleta; GL: câmara de reação/separação gás-líquido; IC: injetor comutador; X: ponto do intermitente reverso, B<sub>1</sub>: reator ( $10 \text{ cm}$ ); I: linha opcional para estudos de interferentes.

## 4.8 - Parâmetros investigados

### 4.8.1 - Sistema FIA-CVAAS

#### 4.8.1.1 - Cella de absorção

Estudaram-se três tipos de cela de absorção com janelas de quartzo, sendo, duas destas comerciais e uma proposta construída em tubo de acrílico. Avaliaram-se o desempenho dessas celas utilizando a câmara de reação/separação gás-líquido indicada na Figura 04 nas seguintes condições operacionais do sistema FIA-CVAAS: solução analítica: 2,0 mL ( $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ); eluente: 400  $\mu\text{L}$  ( $\text{SnCl}_2$  10% (m/v) em HCl 1 mol  $\text{L}^{-1}$ ); gás transportador: 50 mL  $\text{min}^{-1}$  e gás arraste: 75 mL  $\text{min}^{-1}$ .

#### 4.8.1.2 - Geometria da câmara de reação/separação gás-líquido

Estudaram-se três tipos de câmara de reação/separação gás-líquido construídas em vidro. Avaliaram-se a eficiência dessas câmaras utilizando a cela de absorção proposta construída em acrílico com janelas de quartzo utilizando o sistema FIA-CVAAS nas seguintes condições: solução analítica: 2,0 mL ( $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ); eluente: 400  $\mu\text{L}$  ( $\text{SnCl}_2$  10% (m/v) em HCl 1 mol  $\text{L}^{-1}$ ); gás transportador: 50 mL  $\text{min}^{-1}$  e gás arraste: 75 mL  $\text{min}^{-1}$ .

#### 4.8.1.3 - Sensibilidade e tempo de limpeza

Estudaram-se a intensidade do sinal analítico e o tempo de limpeza com as vazões dos gases transportador e de arraste de 25-100 mL  $\text{min}^{-1}$ , respectivamente utilizando o sistema FIA-CVAAS nas seguintes condições: solução analítica: 2,0 mL ( $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ); eluente: 400  $\mu\text{L}$  ( $\text{SnCl}_2$  10% (m/v) em HCl 1 mol  $\text{L}^{-1}$ ).

#### 4.8.1.4 – Quantidade de amostra:reagente

Estudaram-se a cinética de formação do vapor de mercúrio nas quantidades amostra : reagente de 500:100, 1000:200, 1500:300, 2500:500 e 3500:700 (v/v) utilizando o sistema FIA-CVAAS nas seguintes condições: solução analítica:  $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ; eluente:  $\text{SnCl}_2$  10% (m/v) em  $\text{HCl}$   $1 \text{ mol L}^{-1}$ ; gás transportador:  $50 \text{ mL min}^{-1}$  e gás arraste:  $75 \text{ mL min}^{-1}$ .

#### 4.8.1.5 - Concentração da solução de cloreto estanoso

Estudaram-se a influência da concentração da solução de cloreto estanoso de 0,60-40% (m/v) em  $\text{HCl}$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  na cinética de formação do vapor de mercúrio utilizando o sistema FIA-CVAAS nas seguintes condições: solução analítica:  $2,5 \text{ mL}$  ( $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ); eluente:  $500 \mu\text{L}$ ; gás transportador:  $50 \text{ mL min}^{-1}$  e gás arraste:  $75 \text{ mL min}^{-1}$ .

### 4.8.2 - Sistema FIA-Chelite-CVAAS

#### 4.8.2.1 - Vazões dos gases transportador e arraste

Estudaram-se a influência das vazões dos gases transportador ( $1,0$ - $8,0 \text{ mL min}^{-1}$ ) e arraste ( $15$ - $30 \text{ mL min}^{-1}$ ) na intensidade do sinal analítico utilizando o sistema FIA-Chelite-CVAAS nas seguintes condições: solução analítica:  $2,5 \text{ mL min}^{-1}$  ( $2,0 \mu\text{g L}^{-1} \text{ Hg}$ ); reagente/eluente:  $250 \mu\text{L}$  ( $\text{SnCl}_2$  20% (m/v) em  $\text{HCl}$   $12 \text{ mol L}^{-1}$  e tempo de amostragem: 120 s.

#### 4.8.2.2 - Concentração da solução de cloreto estanoso e acidez

Estudaram-se a influência da concentração de cloreto estanoso de 5-30 % (m/v) e da acidez  $2$ - $12 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{HCl}$  na intensidade do sinal analítico utilizando o sistemas FIA-Chelite-CVAAS nas seguintes condições: solução analítica:  $2,5 \text{ mL min}^{-1}$  ( $2,0 \mu\text{g L}^{-1} \text{ Hg}$ );

gás transportador  $4 \text{ mL min}^{-1}$  ( $\text{N}_2$ ); gás arraste:  $20 \text{ mL min}^{-1}$  ( $\text{N}_2$ ); reagente/eluente:  $250 \text{ }\mu\text{L}$  e tempo de amostragem: 120 s.

#### 4.8.2.3 - Tempo de pré-concentração

Estudaram-se a relação entre o tempo de pré-concentração de 30-240 segundos e a sensibilidade do sistemas FIA-Chelite-CVAAS nas seguintes condições: solução analítica:  $2,5 \text{ mL min}^{-1}$  ( $2,0 \text{ }\mu\text{g L}^{-1} \text{ Hg}$ ); gás transportador  $4 \text{ mL min}^{-1}$  ( $\text{N}_2$ ); gás arraste:  $20 \text{ mL min}^{-1}$  ( $\text{N}_2$ ); reagente/eluente:  $250 \text{ }\mu\text{L}$  ( $\text{SnCl}_2$  10% (m/v) em  $\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$ ).

#### 4.8.2.4 - Vazão da amostragem

Estudaram-se a influência da vazão de amostragem da solução analítica ( $5 \text{ mL}$ ) de  $1,25$ - $10 \text{ mL min}^{-1}$  na eficiência da etapa de pré-concentração do sistemas FIA-Chelite-CVAAS nas seguintes condições: solução analítica:  $2,0 \text{ }\mu\text{g L}^{-1} \text{ Hg}$ ; gás transportador  $4 \text{ mL min}^{-1}$  ( $\text{N}_2$ ); gás arraste:  $20 \text{ mL min}^{-1}$  ( $\text{N}_2$ ); reagente/eluente:  $250 \text{ }\mu\text{L}$  ( $\text{SnCl}_2$  10% (m/v) em  $\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$ ).

#### 4.8.2.5 - Volume do eluente

Estudaram-se a influência do volume de reagente/eluente de  $25$ - $250 \text{ }\mu\text{L}$  na intensidade do sinal analítico utilizando o sistemas FIA-Chelite-CVAAS nas seguintes condições: solução analítica:  $2,5 \text{ mL min}^{-1}$  ( $2,0 \text{ }\mu\text{g L}^{-1} \text{ Hg}$ ); gás transportador  $4 \text{ mL min}^{-1}$  ( $\text{N}_2$ ); gás arraste:  $20 \text{ mL min}^{-1}$  ( $\text{N}_2$ ); reagente/eluente:  $\text{SnCl}_2$  10% (m/v) em  $\text{HCl } 6 \text{ mol L}^{-1}$  e tempo de amostragem: 120 s.

#### 4.8.2.6 – Interferência de cloreto

Estudaram-se a influência da concentração de cloreto ( $0\text{--}2,0\text{ g L}^{-1}$ ) na eficiência da etapa de pré-concentração do sistemas FIA-Chelite-CVAAS nas seguintes condições: solução analítica:  $2,5\text{ mL min}^{-1}$  ( $2,0\text{ }\mu\text{g L}^{-1}\text{ Hg}$ ); gás transportador  $4\text{ mL min}^{-1}$  ( $\text{N}_2$ ); gás arraste:  $20\text{ mL min}^{-1}$  ( $\text{N}_2$ ); reagente/eluente:  $250\text{ }\mu\text{L}$  ( $\text{SnCl}_2$  10% (m/v) em  $\text{HCl } 6\text{ mol L}^{-1}$ , tempo de amostragem: 120s. Em seguida, estudaram-se a minimização da influência de cloreto ( $20\text{ g L}^{-1}$ ) contido na solução analítica por redução com permanganato de potássio (20% em excesso) em diferentes temperaturas ( $25$  e  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e na presença de catalisador ( $0,01\text{ }\%$  (m/v)  $\text{MnSO}_4$ ).

#### 4.8.2.7 - Interferentes

Estudaram-se a interferência de  $0\text{--}100\text{ mg L}^{-1}$  dos cátions metálicos Ni, Co, Cd, Pb, Cu, Zn, Fe e Al no sistema de pré-concentração do sistemas FIA-Chelite-CVAAS nas seguintes condições: solução analítica:  $2,5\text{ mL min}^{-1}$  ( $2,0\text{ }\mu\text{g L}^{-1}\text{ Hg}$ ); gás transportador  $4\text{ mL min}^{-1}$  ( $\text{N}_2$ ); gás arraste:  $20\text{ mL min}^{-1}$  ( $\text{N}_2$ ); reagente/eluente:  $250\text{ }\mu\text{L}$  ( $\text{SnCl}_2$  10% (m/v) em  $\text{HCl } 6\text{ mol L}^{-1}$ , tempo de amostragem: 120s. Com relação aos ânions, verificaram-se a influência de  $\text{SO}_4^{-2}$  ( $100\text{ mg L}^{-1}$ ),  $\text{PO}_4^{-3}$  ( $100\text{ mg L}^{-1}$ ) e  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$  ( $50\text{--}200\text{ mg L}^{-1}$ ).

## 4.9 - Digestão das amostras

Digeriram-se as amostras de sedimento certificado (Buffalo River Sediment, NIST) e vinhaças com procedimento de digestão por via úmida utilizando água régia e permanganato de potássio (MALM *et al.*, 1989). Em um tubo de digestão contendo 5 mL de água adicionaram-se 2,0 g de material seguido de 10 mL de solução de ácidos sulfúrico. Deixaram-se a mistura em repouso por 30 min e em seguida aqueceu-se a 60 °C durante 5 min. Após resfriamento, adicionaram-se 50 mL de água desionizada seguidos de 15 mL de solução de  $\text{KMnO}_4$  5% (m/v). Aqueceu-se a mistura a 60°C por 30 min. Estudos prévios mostraram que 50 mL de solução de  $\text{KMnO}_4$  5% (m/v) e 1 mL de solução de  $\text{MnSO}_4$  1 % (m/V) são suficientes para minimizar a interferência de  $20,0 \text{ g L}^{-1}$  de cloreto. Portanto, adaptou-se o procedimento proposto por MALM *et al.* (1989) para minimizar a concentração de cloreto presente na amostra. Adicionaram-se 50 mL de solução de  $\text{KMnO}_4$  5% (m/v), 1 mL de solução de  $\text{MnSO}_4$  1 % (m/V) e aqueceram-se novamente a mistura a 60 °C por 60 min. Após resfriamento, consumiu-se o excesso de oxidante com solução de hidróxilamina 12% (m/v) e completou-se o volume a 100 mL com água desionizada. Com exceção da quantidade inicial de amostra (10 mL), o mesmo procedimento foi utilizado para as amostras de águas.

## 4.10 - Extração de substâncias húmicas aquáticas

A resina macroporosa XAD-8 utilizada para a extração de SHA foi previamente condicionada por bateladas sucessivas com soluções de ácido clorídrico  $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ , hidróxido de sódio  $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  e metanol, respectivamente (24 horas cada batelada).

Para extração, utilizou-se o procedimento recomendado pela *Internacional Humic Substances Society (IHSS)* (MALCOLM & THURMAN, 1981). A amostra (100 L) coletada no Rio Negro-AM, próximo a confluência com o Rio Tarumanzinho, foi filtrada com papel de filtro Whatman 42 e, em seguida, acidificada com solução de ácido clorídrico concentrado até pH 2,0. Então, percolou-se com fluxo de  $4 \text{ mL min}^{-1}$  (por gravidade) através de coluna de vidro (2 cm de diâmetro interno e 25 cm de comprimento) empacotadas com resina XAD-8. Após saturação da resina pela SHA (verificada pelo escurecimento da resina), percolaram-se 10 mL de solução de ácido clorídrico  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  para a remoção de impurezas, fez-se eluição com solução de hidróxido de sódio  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  e o extrato húmico concentrado foi neutralizado com solução de ácido clorídrico  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ . Após eluição, a resina foi regenerada e as colunas colocadas novamente em operação.

### 4.10.1 Preparação das membranas de diálise

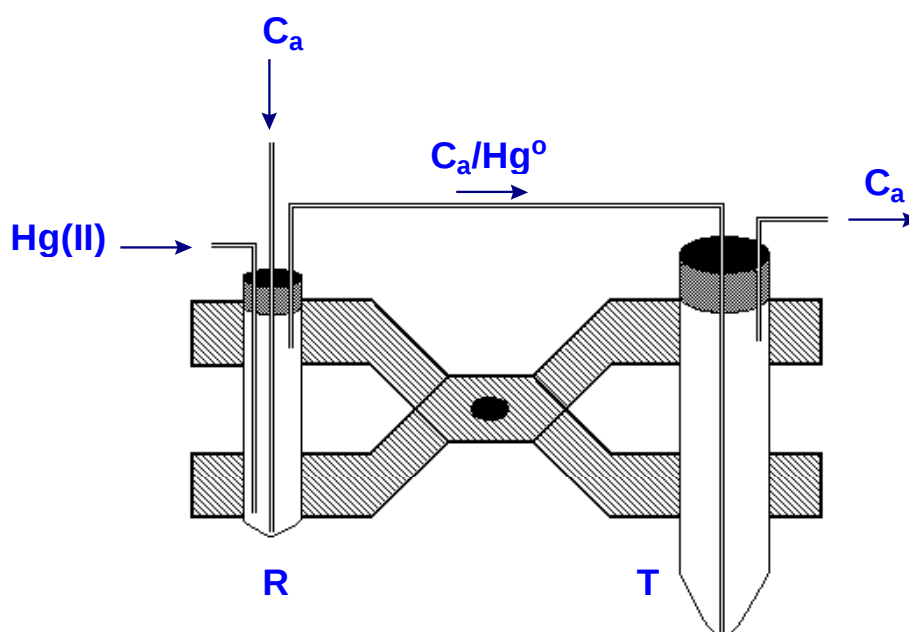
Prepararam-se as membranas de diálise (SAMLESS CELL 16 X 100 CLEAR) de acordo com o procedimento descrito por TOWN & POWELL (1992). Após tratamento por 10 minutos com solução de bicarbonato de sódio 2% (m/v) e EDTA dissódico dihidratado  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , lavaram-se as membranas com água desionizada ( $65^\circ \text{C}$ ) e estocou-se em refrigerador.

### 4.10.2 Diálise das substâncias húmicas aquáticas

Purificou-se o extrato húmico extraído em 4.10 utilizando-se membrana de diálise contra água deionizada até teste negativo para cloreto (teste com solução de nitrato de prata  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), conforme sugerido por CAMPANELLA *et al.* (1994). Após a remoção de excesso de sais liofilizou-se o extrato húmico conforme procedimento descrito por PITOMBO (1989). Estocou-se o material em pesa filtro mantido no dessecador.

#### 4.11 - Sistema de reação/aprisionamento de mercúrio

As soluções de SHA (1,4 mL) foram adicionadas no frasco reacional (R) e posteriormente utilizando-se uma bureta automática adicionou-se uma alíquota de solução de Hg(II) (100  $\mu\text{L}$ ). Após determinado tempo de reação, um fluxo de gás de arraste (Ca) transporta o vapor de mercúrio reduzido para o frasco de aprisionamento (T), contendo 5,0 mL de solução de aprisionamento.



**Figure 06** - Diagrama do sistema de reação/aprisionamento de mercúrio. Condições: R: frasco reacional; T: frasco de aprisionamento;  $C_a$ : gás arraste ( $\text{N}_2$ ,  $100 \text{ mL min}^{-1}$ ); tempo de aeração: 5 min; solução de aprisionamento:  $\text{KMnO}_4$  0,024 % (m/v) em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4 % (v/v); SHA: 1,4 mL e  $\text{Hg(II)}$ : 100  $\mu\text{L}$ .

Avaliaram-se a influência da vazão do gás arraste ( $50\text{-}100\text{ mL min}^{-1}$ ) na eficiência do sistema de aprisionamento utilizando soluções de  $\text{SnCl}_2$  10% (m/v) em  $\text{HCl}$   $1,0\text{ mol L}^{-1}$  e  $\text{Hg(II)}$   $10\text{ mg L}^{-1}$ .

## 4.12 - Cinética de redução de mercúrio iônico por SHA

### 4.12.1 - Concentração de mercúrio iônico

Estudou-se a influência da quantidade de mercúrio iônico ( $0,5\text{-}4,0\text{ }\mu\text{g}$ ) na cinética de redução por SHA ( $1,0\text{ mg}$ ) durante  $48\text{ h}$  em  $\text{pH } 5,0$ . Utilizou-se o sistema de reação/aprisionamento de mercúrio nas seguintes condições: vazão do gás arraste:  $100\text{ mL min}^{-1}$ , tempo de aeração:  $5\text{ min}$  e solução aprisionamento:  $5,0\text{ mL}$  ( $\text{KMnO}_4$   $0,024\%$  (m/v) em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $4\%$  (v/v)). Após o consumo de  $\text{KMnO}_4$  com cloridrato de hidroxilamina, quantificaram-se o mercúrio retido na solução de aprisionamento utilizando o sistemas FIA-Chelite-CVAAS nas seguintes condições: solução analítica:  $2,5\text{ mL min}^{-1}$  ( $2,0\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$   $\text{Hg(II)}$ ); gás transportador  $4\text{ mL min}^{-1}$  ( $\text{N}_2$ ); gás arraste:  $20\text{ mL min}^{-1}$  ( $\text{N}_2$ ); reagente/eluyente:  $50\text{ }\mu\text{L}$  ( $\text{SnCl}_2$  10% (m/v) em  $\text{HCl}$   $6,0\text{ mol L}^{-1}$  e tempo de amostragem:  $120\text{ s}$ .

### 4.12.2 - Concentração de SHA

Estudou-se a influência da quantidade de substâncias húmicas aquáticas ( $0,5\text{-}4,0\text{ mg}$ ) na reação de redução de mercúrio iônico ( $1\text{ }\mu\text{g}$ ) em  $\text{pH } 5,0$  durante  $48\text{ h}$ . Utilizou-se o sistema de reação/aprisionamento de mercúrio e o sistema FIA-Chelite-CVAAS nas condições descritas no experimento 4.12.1.

### 4.12.3 - Influência do pH

Estudou-se a influência do pH (2,0-11,0) na cinética de redução de mercúrio iônico (1,0 µg) por substâncias húmicas aquáticas (1,0 mg), durante 24 h de reação. Utilizou-se o sistema de reação/aprisionamento de mercúrio e o sistema FIA-Chelite-CVAAS nas condições descritas no experimento 4.12.1.

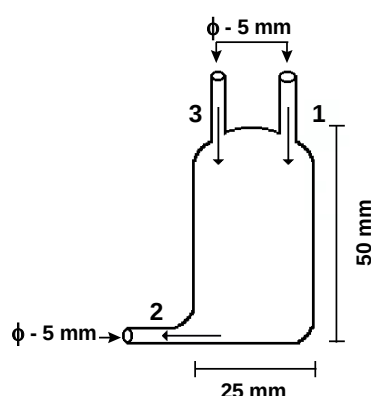
## 4.13 - Fracionamento das substâncias húmicas aquáticas

O fracionamento foi feito utilizando o sistema de fracionamento sequencial por ultrafiltração (SFSUF) com membrana de *polyethersulfone* desenvolvido por SARGENTINI Jr (1999).

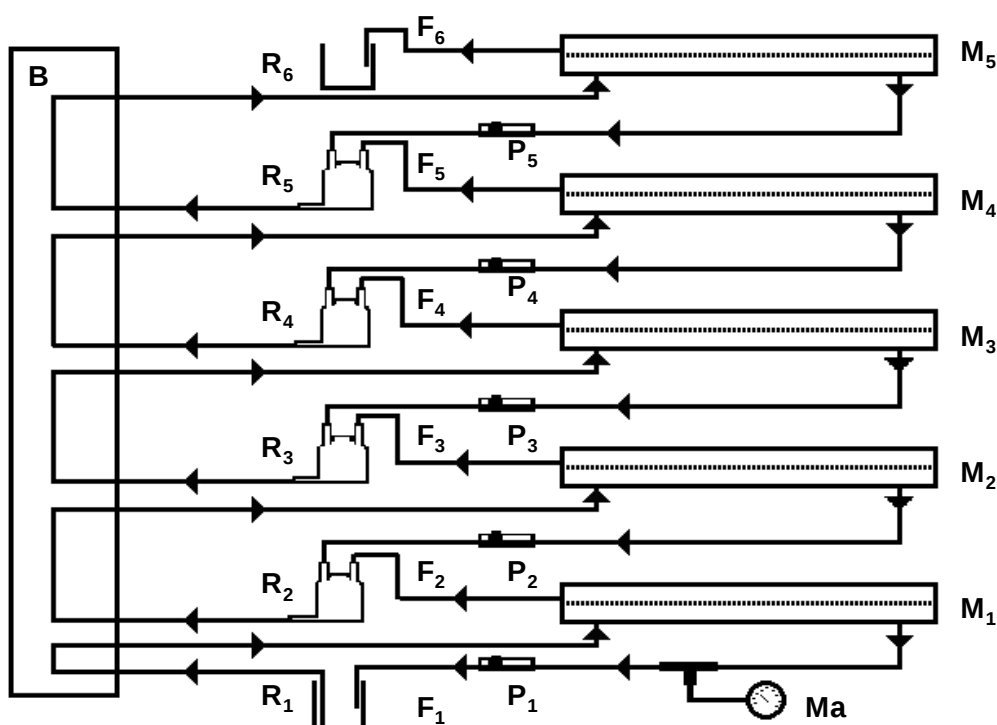
A Figura 07 ilustra um reservatório para coleta das frações construído em vidro de borosilicato e suas respectivas dimensões. O extrato húmico entra pelo ponto (1) e é aspirado pelo ponto (2) o qual está conectado a um dos filtros de membrana (M) do sistema de fracionamento sequencial por ultrafiltração ilustrado na Figura 08. Como o fluxo no interior do filtro é tangencial sobre a membrana, o material não filtrado retorna ao reservatório pelo ponto (3). Essa circulação contínua evita o entupimento da membrana, concentra o material não filtrado no reservatório e fraciona o extrato húmico em diferentes tamanhos moleculares. O reservatório  $R_1$  (Figura 08), no qual concentra a fração  $F_1$ , é o próprio frasco da solução de SH a qual está sendo fracionada. Por outro lado,  $R_6$  é um frasco com cerca de 400 mL para coletar a fração  $F_6$ . Esta, é composta pelo volume inicial do extrato a ser fracionado mais cerca de 150 mL de água que são aspirados através de todo o SFSUF para limpeza preliminar do sistema e recolhidos em  $R_6$ .

Utilizaram-se as condições experimentais sugeridas por ROCHA *et al.* (2000): 250 mL de solução SHA 1,0 mg mL<sup>-1</sup> em pH 5,0, fluxo tangencial: 85 mL min<sup>-1</sup>, fluxo de permeação: 0,8-1,4 mL min<sup>-1</sup> e pressão: 0,2-0,3 bar.

Após fracionamento da amostra, nas mesmas condições experimentais, aspira-se cerca de 150 mL de água pelo SFSUF para limpeza preliminar. Ao final do fracionamento, a retirada das seis frações com diferentes tamanhos moleculares é feita individualmente. Para o SFSUF entrar em equilíbrio interno, desliga-se a bomba peristáltica, descomprimem-se os tubos de bombeamento e os reguladores de pressão. Com o respectivo tubo de bombeamento pressionado na bomba peristáltica, por sucção, retira-se a fração  $F_1$ , após transferir o tubo de retorno de  $R_1$  para uma proveta de 50 mL. Para remoção do material aderido no interior dos tubos e no filtro  $M_1$ , adicionam-se 10-15 mL de água em  $R_1$  e repete-se a sucção recolhendo-se a água na mesma proveta de  $F_1$ . Como  $R_2$  é diferente de  $R_1$ , para retirar  $F_2$  troca-se o tubo de sucção ligado no ponto 2 de  $R_2$  (Figura 08), por um outro tubo através do qual o material é transferido para uma proveta. Transferem-se 10-15 mL de água para um bequer e, pelo tubo de sucção, remove-se o material aderido recolhendo-se a água na mesma proveta de  $F_2$ . Repete-se este procedimento para retirada de  $F_3$ ,  $F_4$  e  $F_5$ . Por ser a última fração,  $F_6$  é concomitantemente recolhida durante o processo de fracionamento. Entretanto, como o volume final de  $F_6$  é grande (cerca de 400 mL), esta fração precisa ter o volume reduzido aos volumes das demais frações utilizando-se evaporador rotativo.



**Figura 07** - Reservatório com volume interno de 25 mL, utilizado para coleta das frações durante o fracionamento dos extratos húmicos utilizando-se o sistema de fracionamento sequencial por ultrafiltração. 1: entrada do filtrado húmico; 2: aspiração do filtrado húmico para o filtro subsequente; 3: retorno para recirculação do material não filtrado no filtro subsequente.



**Figura 08** - Esquema do sistema de fracionamento sequencial por ultrafiltração utilizado para fracionar substâncias húmicas. Condições: filtros equipados com membranas comerciais (Sartocon® Micro), com 50 cm<sup>2</sup>, M<sub>1</sub>-100; M<sub>2</sub>-50; M<sub>3</sub>-30; M<sub>4</sub>-10 e M<sub>5</sub>-5 kDalton; frações obtidas e respectivos intervalo de tamanho molecular médio de F<sub>1</sub> (>100), F<sub>2</sub> (100-50), F<sub>3</sub> (50-30), F<sub>4</sub> (30-10), F<sub>4</sub> (10-5) e F<sub>6</sub> (<5 kDalton); B: bomba peristáltica de 4 canais com tubos de bombeamento de Tygon®; reservatórios de frações R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> (25 mL), R<sub>1</sub> (250 mL) e R<sub>6</sub> (500 mL); reguladores de pressão (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub> e P<sub>5</sub>); manômetro (Ma); 250 mL de solução de substância húmica aquática 1,0 mg mL<sup>-1</sup> em pH 5,0; fluxo tangencial com vazão de 85 mL min<sup>-1</sup> em todos os filtros; pressão inicial de 0,2-0,3 bar; fluxo de permeação através das membranas 0,8-1,4 mL min<sup>-1</sup>.

### 4.13.1 - Limpeza dos filtros

Lavaram-se os filtros  $M_1$ - $M_5$  individualmente através de sucção de 200 mL de solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> e 200 mL de água com aplicação de um fluxo reverso ao utilizado durante o fracionamento. Eventualmente, quando fracionam-se soluções contendo íons metálicos, deve-se lavar os filtros também com cerca de 100 mL de solução de HCl 0,01 mol/L e posteriormente água (ROCHA *et al.*, 2000).

## 4.14 - Caracterizações das frações húmicas

### 4.14.1 - Determinação de carbono e enxofre

Determinaram-se as concentrações de carbono e enxofre por espectrometria de emissão com plasma de argônio induzido (ICP-AES). Utilizaram-se soluções padrão de EDTA dissódico dihidratado e sulfato de amônio, respectivamente para a construção das curvas de calibração nas seguintes condições de operação:

- detecção simultânea (CID, “charge-injection device”);
- leitura em axial
- nebulizador concêntrico: 32 psi;
- câmara de nebulização: 30 psi;
- aspiração: 1,85 mL min<sup>-1</sup>;
- fluxo de gás auxiliar: 0,50 mL min<sup>-1</sup>;
- rádio frequência: 950 W
- tempo de integração: 20 s
- linhas de emissão: C 193.090 {134} (atômica); S 180.731{143} (iônica)

#### 4.14.2 - Espectrometria na região do UV-Visível

Obtiveram-se os espectros na região do UV-Visível por varredura da região de 200 a 700 nm, utilizando-se cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico e soluções das frações húmicas  $F_1$  a  $F_6$  contendo  $20 \mu\text{g C mL}^{-1}$  em tampão pH 5,0 (PEURAVUORI & PIHLAJA, 1997).

#### 4.14.3 - Espectrometria na região do Infravermelho

Para a obtenção dos espectros na região do infravermelho prepararam-se pastilhas contendo 3,0 mg das frações húmicas  $F_1$  a  $F_6$  liofilizadas e 100 mg de KBr previamente seco a  $100^\circ\text{C}$ , respectivamente. Obtiveram-se os espectros no intervalo entre 400 a  $4000 \text{ cm}^{-1}$  (MARTIN-NETO *et al.*, 1994; ABBT-BRAUN, 1992).

#### 4.14.4 - Propriedades ácido-base

Após a calibração do eletrodo de vidro combinado de acordo com o procedimento proposto por PEHRSSON *et al.* (1976), as soluções das frações húmicas  $F_1$  a  $F_6$  (20,0 mL) contendo 4,072, 3,803, 3,635, 2,029, 1,430 e 1,787 mg de carbono, respectivamente e força iônica ajustada com solução de KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , foram tituladas com a adição de 0,025 mL de NaOH  $0,132 \text{ mol L}^{-1}$  a cada 30 s, sob atmosfera de nitrogênio, agitação magnética e temperatura constante em  $25,0 \pm 0,4^\circ\text{C}$ . O pH inicial das soluções das frações húmicas foi ajustado a 2,0 com solução de HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Trataram-se as curvas potenciométricas obtidas com as funções de Gran Modificadas utilizando o programa Microsolf Exel 7.0.

## 4.15 - Redução de mercúrio iônico por frações húmicas

Estudou-se a cinética de redução de mercúrio iônico (1,0  $\mu\text{g}$  Hg) pelas frações húmicas com diferentes tamanhos moleculares ( $F_1$ - $F_6$ ) em pH 5,0 durante 48 h. Ajustou-se as frações húmicas à 368  $\mu\text{g}$  de carbono equivalente a 1,0 mg de SHA utilizada no experimento 4.12.1, respectivamente. Utilizou-se o sistema de reação/aprisionamento de mercúrio e o sistema FIA-Chelite-CVAAS nas condições descritas em 4.12.1.

## 5 – Resultados e Discussão

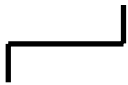
## 5 - Resultados e discussão

### 5.1 - Sistema FIA-CVAAS

#### 5.1.1 - Cella de absorção

A cela de absorção tem como função conter no seu interior o maior número de átomos de mercúrio, livres de interferências, para ser quantificado pelo espectrômetro de absorção atômica (DEDINA *et al.*, 1995). Os valores obtidos nos diferentes modelos das celas de absorção atômica são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Valores obtidos nos testes das três celas de absorção atômica.

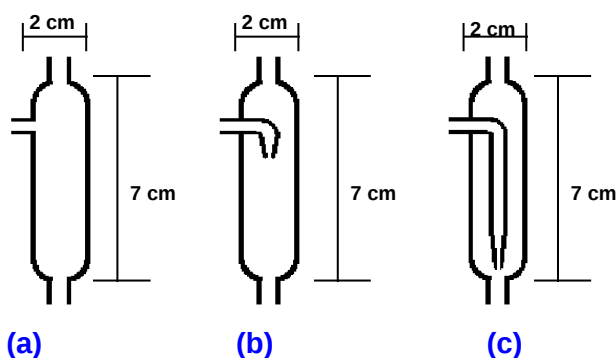
| Especificações                                                   | Cela - Varian                                                                       | Cela - Perkin Elmer                                                                  | Cela proposta                                                                         |
|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Comprimento (mm)                                                 | 170                                                                                 | 160                                                                                  | 200                                                                                   |
| $\phi$ externo (mm)                                              | 17                                                                                  | 15                                                                                   | 5                                                                                     |
| $\phi$ interno (mm)                                              | 14                                                                                  | 7                                                                                    | 3                                                                                     |
| Volume interno (cm <sup>3</sup> )                                | 26,15                                                                               | 6,15                                                                                 | 1,41                                                                                  |
| Material                                                         | quartzo                                                                             | quartzo                                                                              | acrílico                                                                              |
| Formato                                                          |  |  |  |
| Intensidade de absorbância<br>(5 $\mu\text{g L}^{-1}\text{Hg}$ ) | 0,031                                                                               | 0,045                                                                                | 0,084                                                                                 |

Os efeitos de dispersão do vapor de mercúrio no interior da cela de absorção são minimizados com a diminuição do diâmetro interno. Entretanto, a sensibilidade desta técnica de detecção está comprometida com o número de átomos que atravessam o feixe ótico em um dado instante. As dimensões da cela proposta apresentam diâmetro interno de 42% menor e comprimento de 25% maior em relação a cela do fabricante Perkin Elmer inferindo a esta um aumento de 85% na intensidade de absorção.

### 5.1.2 - Câmara de reação/separação gás-líquido

A câmara de reação/separação gás-líquido deve permitir uma alta homogenização e eficiente reação da amostra com o reagente, ser simples sem o comprometimento da taxa de amostragem e da sensibilidade (DEDINA *et al.*, 1995).

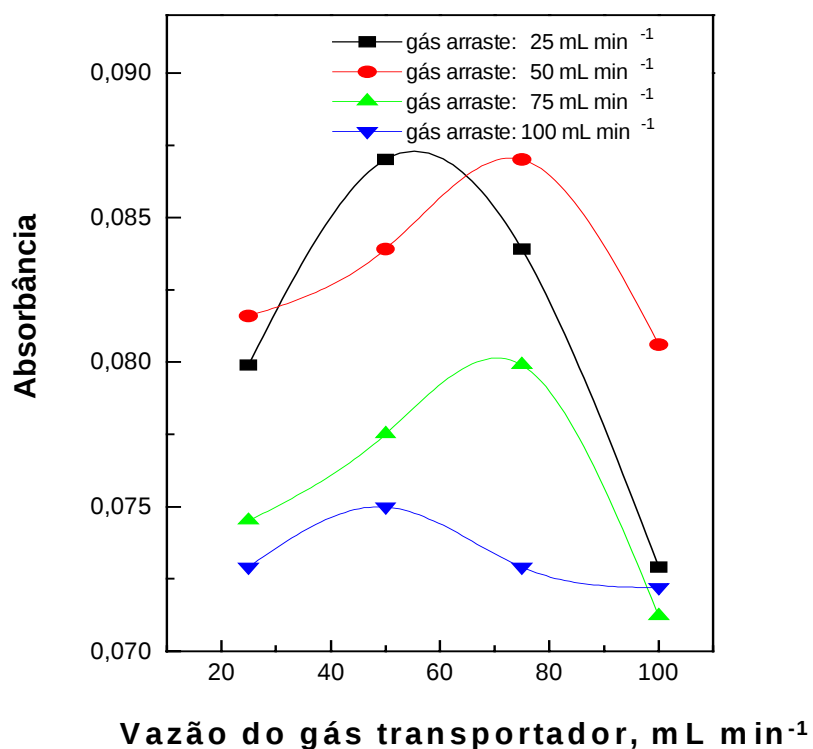
A câmara inicialmente projetada, representada pela Figura 09 (a), apresentou alta taxa de vapores de água e grande dispersão dos vapores de mercúrio, devido ao fluxo cruzado do gás transportador e do gás arraste no interior da câmara, causando sinais transientes largos com baixa intensidade e repetibilidade. O acoplamento do sistema de separação gás/líquido constituído por uma membrana de Teflon<sup>®</sup> (PS) entre a câmara de reação/separação gás-líquido (GL) e a cela de fluxo (F) minimizou os efeitos do vapor de água no caminho do feixe ótico. Com a introdução da amostra e reagente no centro da câmara (Figura 09 (b)) observou-se minimização da taxa de vapores de água e o aumento da homogeneização da amostra/reagente. Entretanto, os fluxos em sentidos contrários dos gases transportador e arraste causam dispersão dos vapores de mercúrio comprometendo a intensidade do sinal analítico e a repetibilidade. A câmara representada pela Figura 09 (c) apresentou alta homogenização e pequena dispersão dos vapores de mercúrio. Nessa configuração de câmara, o fluxo do gás transportador auxilia o fluxo do gás arraste e o sistema tem elevada sensibilidade e repetibilidade.



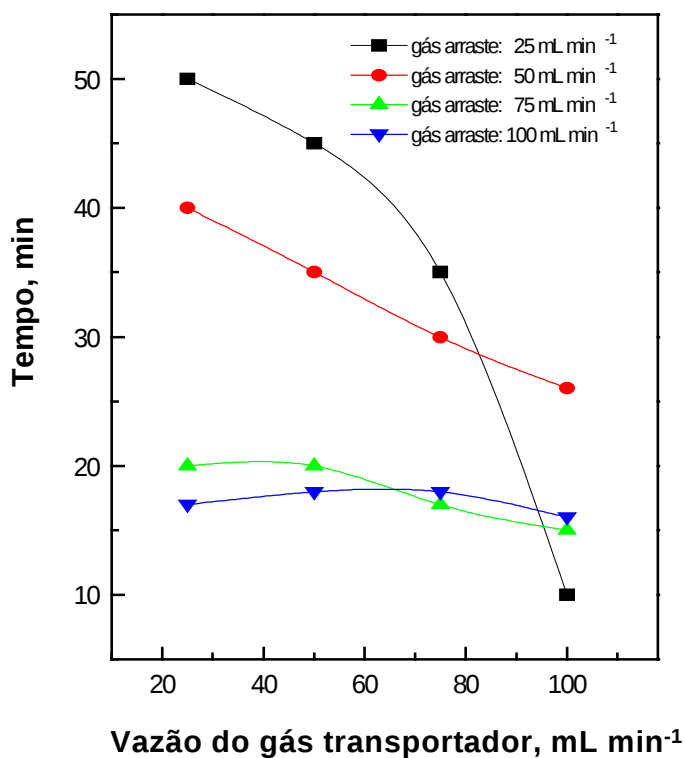
**Figura 09** - Representação esquemática das câmaras de reação/separação gás-líquido

### 5.1.3 - Sensibilidade e tempo de limpeza

A sensibilidade da técnica de detecção depende do número de átomos de mercúrio que atravessam o feixe ótico do espectrômetro em um dado instante (DEDINA *et al.*, 1995). Portanto, a vazão do gás de arraste deve causar a menor dispersão possível dos vapores de mercúrio na cela de absorção atômica. Em baixas vazões de gás transportador, o redutor é introduzido lentamente na câmara de reação/separação gás-líquido causando menor velocidade de redução e consequentemente possibilitando maior dispersão dos vapores de mercúrio pelo fluxo de gás arraste. Entretanto, altas vazões de gás transportador causam grande turbulência do meio reacional no interior da câmara de reação/separação gás-líquido causando grande dispersão dos vapores de mercúrio formados. A Figura 10 mostra que duas proporções de gás transportador e arraste dão ao sistema elevada intensidade de absorbância. Entretanto, de acordo com a Figura 11, o sistema com vazão de gás transportador de  $50 \text{ mL min}^{-1}$  e gás de arraste de  $75 \text{ mL min}^{-1}$  apresentaram o menor tempo limpeza em relação a segunda proporção de gases, possibilitando assim maior taxa de amostragem.



**Figura 10** - Influência das vazões de gás transportador e arraste na intensidade do sinal analítico. Condições: solução trabalho: 2,0 mL ( $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e eluente: 400  $\mu\text{L}$  ( $\text{SnCl}_2$  20% (m/v) em  $\text{HCl}$  1,0 mol  $\text{L}^{-1}$ ).



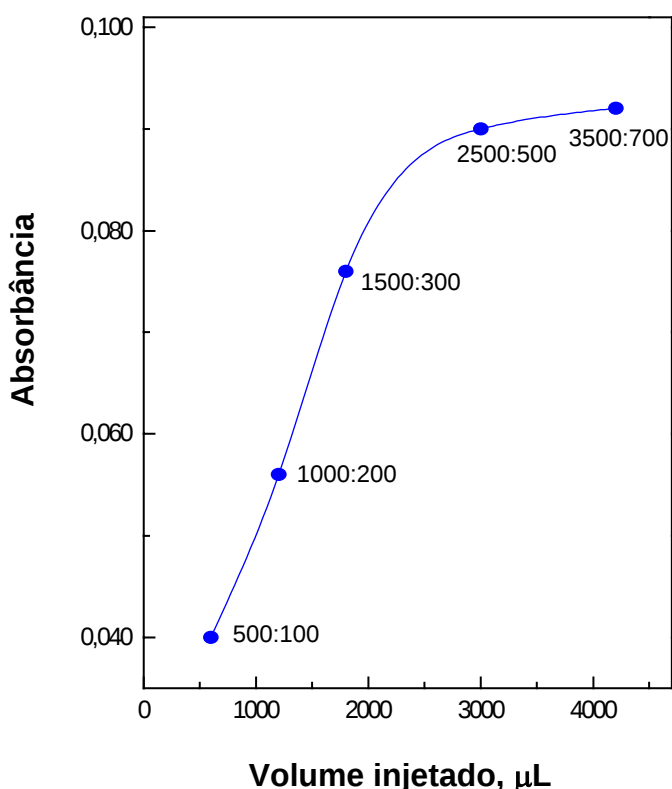
**Figura 11** - Influência das vazões de gás transportador e arraste no tempo de limpeza da cela de absorção. Condições: solução trabalho: 2,0 mL ( $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) e eluente: 400  $\mu\text{L}$  ( $\text{SnCl}_2$  20% (m/v) em  $\text{HCl}$  1,0 mol  $\text{L}^{-1}$ ).

#### 5.1.4 – Quantidade de amostra:reagente

A proporção amostra:reagente está relacionada com a sensibilidade e a frequência analítica do sistema desenvolvido.

Neste sistema, pequenas proporções não apresentam perfeita homogeneização entre amostra/reagente e comprometem a sensibilidade. Entretanto, para grandes proporções são necessárias altas vazões de gás transportador causando turbulência e elevada dispersão dos vapores de mercúrio no interior da câmara de reação /separação gás-líquido.

A Figura 12 mostra que o valor máximo do sinal do analítico correspondente à situação de mínima dispersão ou de volume infinito é obtido com a proporção 2500:500 (v/v).

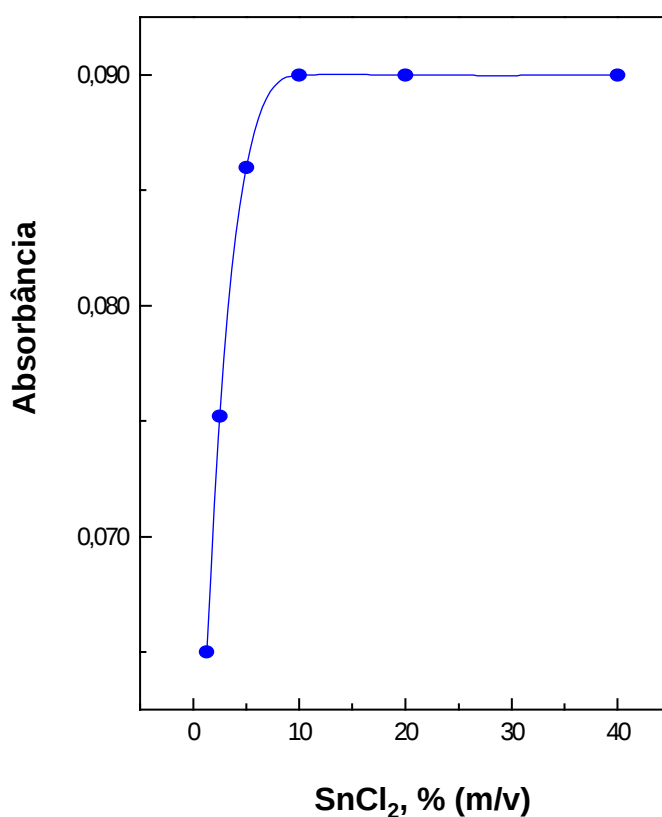


**Figura 12** - Influência da proporção amostra:reagente na intensidade do sinal analítico. Condições: solução trabalho:  $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ; eluente:  $\text{SnCl}_2$  20% (m/v) em  $\text{HCl}$   $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ; gás transportador:  $75 \text{ mL min}^{-1}$  e gás arraste:  $50 \text{ mL min}^{-1}$ .

### 5.1.5 - Concentração da solução de cloreto estanoso

A concentração da solução do reagente foi estabelecida como a menor possível, sem comprometer a redução do mercúrio e sua dispersão. Na utilização deste sistema, deve-se estimar a estequiometria da reação oxidante/redutor juntamente com a relação da fração volumétrica das soluções amostra e reagente, mantendo-se sempre um excesso de redutor no meio, deslocando o equilíbrio no sentido de formação quantitativa do vapor de mercúrio atômico.

Em geral, os trabalhos analíticos usando redução de mercúrio com  $\text{SnCl}_2$  mencionam o uso deste reagente na concentração de 20 % (m/v) (ROCHA *et al.*, 1994). De acordo com a Figura 13, soluções de  $\text{SnCl}_2$  10 % (m/v) em  $\text{HCl}$  1,0 mol  $\text{L}^{-1}$  são suficientes para garantir a redução quantitativa dos íons mercúrio.



**Figura 13** - Influência da concentração de cloreto estanoso na intensidade do sinal analítico. Condições: solução trabalho: 2,5 mL ( $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ ); eluente: 500  $\mu\text{L}$  ( $\text{SnCl}_2$  em  $\text{HCl}$  1,0 mol  $\text{L}^{-1}$ ); gás transportador: 75 mL  $\text{min}^{-1}$  e gás arraste: 50 mL  $\text{min}^{-1}$ .

### 5.1.6 - Exatidão do método

As Tabelas 3 e 4 mostram os resultados obtidos em determinações de mercúrio em sedimento, vinhaças e águas utilizando o sistema desenvolvido de análise por injeção em fluxo FIA-CVAAS e sistema convencional de geração de vapor de mercúrio a frio (CVAAS) (ROCHA *et al.*, 1994). O sistema FIA-CVAAS apresentou nível de confiabilidade de 95% em relação ao material de referência. As amostras de sedimentos, vinhaças e águas, tiveram recuperações de 92 a 103%. O sistema FIA-CVAAS apresentou taxa de amostragem de 50 determinações/hora ( $0,5\text{--}5,0 \mu\text{g L}^{-1} \text{Hg}$ ), consumindo  $50 \text{ mg SnCl}_2$  e  $2,5 \text{ mL}$  de amostra por determinação. O desvio padrão relativo foi de 3% ( $n = 12$ ) para amostras contendo  $2,5 \mu\text{g L}^{-1} \text{Hg}$  e o limite de detecção ( $3\sigma$ ) de  $1,5 \text{ ng L}^{-1}$ . O sistema não apresentou efeitos de memória mensuráveis durante períodos de trabalho contínuo de 6 horas.

**Tabela 3** - Valores obtidos nos testes de recuperação de mercúrio (cinco repetições) em material certificado (SRM) e vinhaças utilizando a técnica de geração de vapor de mercúrio a frio (CVAAS) e o sistema desenvolvido FIA-CVAAS.

| Amostra     | Concentração ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) |                | Valor certificado ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) |
|-------------|---------------------------------------|----------------|--------------------------------------------|
|             | FIA-CVAAS                             | CVAAS          |                                            |
| SRM*        | $1,44 \pm 0,05$                       | $1,43 \pm 0,1$ | $1,47 \pm 0,07$                            |
| Vinhaça 1** | $8,9 \pm 0,3$                         | $8,2 \pm 0,2$  | —                                          |
| Vinhaça 2** | $6,5 \pm 0,2$                         | $7,3 \pm 0,1$  | —                                          |
| Vinhaça 3** | $4,9 \pm 0,2$                         | $4,5 \pm 0,2$  | —                                          |

\*Amostra diluída 1:10 (v/v); \*\*Amostra diluída 1:100 (v/v)

**Tabela 4** - Valores obtidos na determinação de mercúrio (cinco repetições) em água de rio utilizando a técnica de geração de vapor de mercúrio a frio (CVAAS) e o sistema desenvolvido FIA-CVAAS.

| Amostra | Adicionado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) |       | Recuperado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) |                 |
|---------|-------------------------------------|-------|-------------------------------------|-----------------|
|         | FIA-CVAAS                           | CVAAS | FIA-CVAAS                           | CVAAS           |
| Rio 1   | 20,0                                | 20,0  | $21,2 \pm 0,99$                     | $19,1 \pm 0,85$ |
| Rio 2   | 35,0                                | 35,0  | $35,2 \pm 0,94$                     | $35,3 \pm 0,72$ |
| Rio 3   | 10,0                                | 10,0  | $9,4 \pm 0,86$                      | $9,1 \pm 0,53$  |

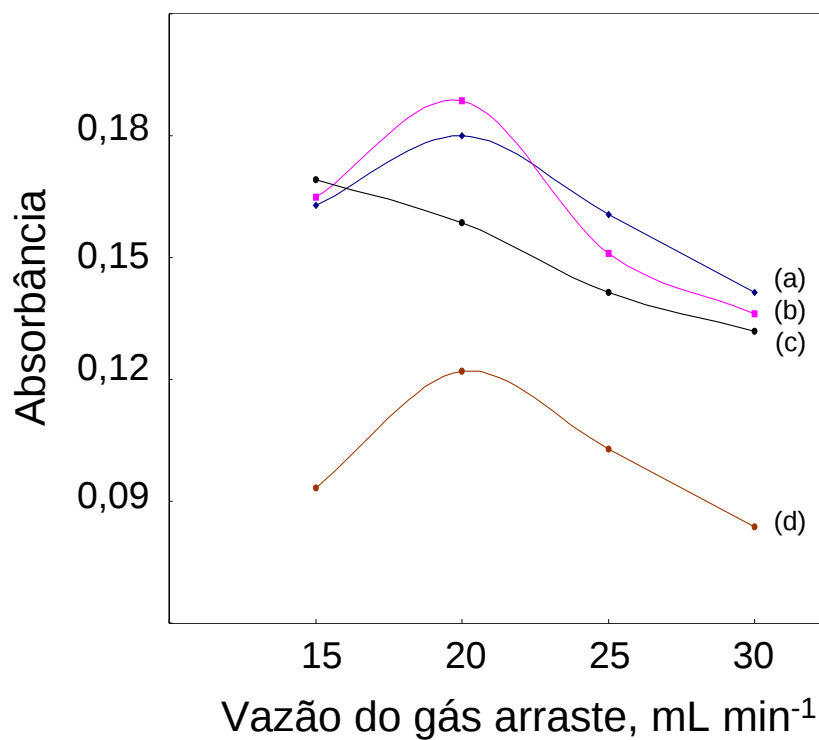
<sup>(1)</sup> Rio Tietê; <sup>(2)</sup> Rio Negro; <sup>(3)</sup> Rio Grande

## 5.2 - Sistema FIA-Chelite-CVAES

### 5.2.1 - Vazões dos gases transportador e arraste

O fluxo do gás transportador desloca a alíquota do reagente/eluente da alça de amostragem para a coluna empacotada com resina Chelite S<sup>®</sup>. Portanto, este parâmetro está relacionado com a cinética de eluição/redução simultânea do mercúrio. Em baixos valores de vazão do gás transportador, o eluente contendo o analito é introduzido lentamente na câmara de reação/separação gás-líquido, possibilitando alta dispersão do vapor de mercúrio formado pelo fluxo do gás de arraste. Entretanto, altos valores de vazão do gás transportador causam maior dispersão dos vapores de mercúrio e deslocam rapidamente a alíquota do reagente/eluente através da coluna de troca iônica causando baixa remoção do metal, devido ao baixo tempo de contato entre o eluente e a superfície do suporte sólido. A vazão do gás de arraste está relacionada com a dispersão dos vapores de mercúrio na cela de absorção atômica. Entretanto, baixas vazões do gás de arraste possibilitam elevada dispersão do vapor de mercúrio na câmara de reação/separação gás-líquido comprometendo a intensidade do sinal analítico.

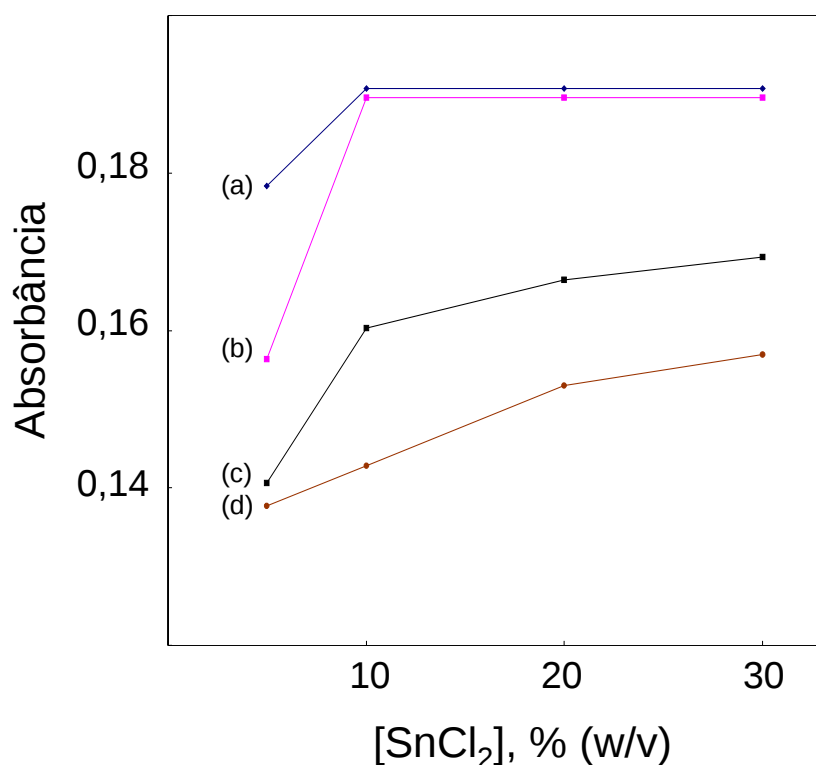
A Figura 14, mostra sinais analíticos referentes a diferentes vazões de gás transportador e arraste. O melhor sinal analítico foi observado nas vazões de 4 mL min<sup>-1</sup> e 20 mL min<sup>-1</sup> desses gases, respectivamente.



**Figura 14** – Influência das vazões dos gases arraste e transportador na intensidade do sinal analítico. Condições: solução analítica: 2,5 mL min<sup>-1</sup> (2,0 µg L<sup>-1</sup> Hg); reagente/eluente: 250 µL (SnCl<sub>2</sub> 20% (m/v) em HCl 12 mol L<sup>-1</sup> e tempo de pré-concentração: 120 s. As curvas (a), (b), (c) e (d) correspondem as vazões de 8, 4, 2 e 1 mL min<sup>-1</sup>, respectivamente.

### 5.2.6 - Concentração de cloreto estanoso e acidez do meio

A concentração de cloreto estanoso e a acidez estão diretamente relacionados com a eficiência do processo de eluição da resina Chelite S<sup>®</sup>. ROCHA *et al.*, 1998, mencionam o uso de solução HCl 12 mol L<sup>-1</sup> como eluente dessa resina. O sistema de eluição redutiva proposta neste sistema de análise por injeção em fluxo possibilita eluições eficientes com solução 10 % (m/v) de SnCl<sub>2</sub> em HCl 6 mol L<sup>-1</sup> (Figura 15). Eluentes com concentrações de cloreto estanoso elevadas causam forte efeito memória devido a impregnação na coluna de troca-iônica e nos tubos de transporte, comprometendo o mecanismo de pré-concentração e consequentemente a sensibilidade e precisão das medidas.



**Figura 15-** Influência da concentração de cloreto estanoso e a acidez do meio na intensidade do sinal analítico. Condições: solução analítica: 2,5 mL min<sup>-1</sup> (2,0 µg L<sup>-1</sup> Hg); gás transportador 4 mL min<sup>-1</sup> (N<sub>2</sub>); gás arraste: 20 mL min<sup>-1</sup> (N<sub>2</sub>); reagente/eluente: 250 µL e tempo de pré-concentração: 120 s. As curvas (a), (b), (c) e (d) correspondem as concentrações das soluções de HCl 12, 6, 4 e 2 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente.

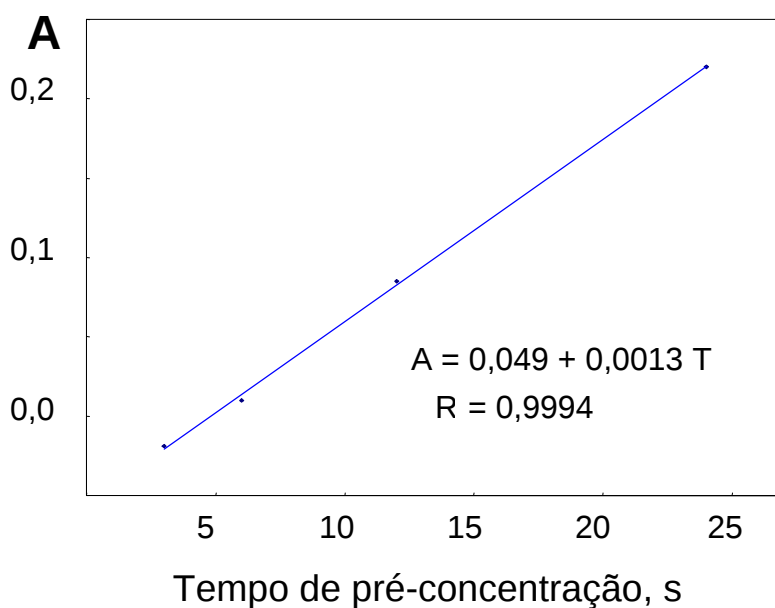
### 5.2.7 - Tempo de pré-concentração

O sistema apresentou elevada proporcionalidade entre o tempo de pré-concentração da solução analítica com vazão constante ( $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ ) e a intensidade do sinal analítico (Figura 16). Esse fato possibilita inferir que mecanismo de troca-iônica na coluna empacotada com resina Chelite S<sup>®</sup> apresenta alta eficiência. Estes resultados estão de acordo com as especificações do fabricante, o qual indica alta seletividade e elevada capacidade de troca ( $320 \text{ g Hg(II) L}^{-1}$  de resina).

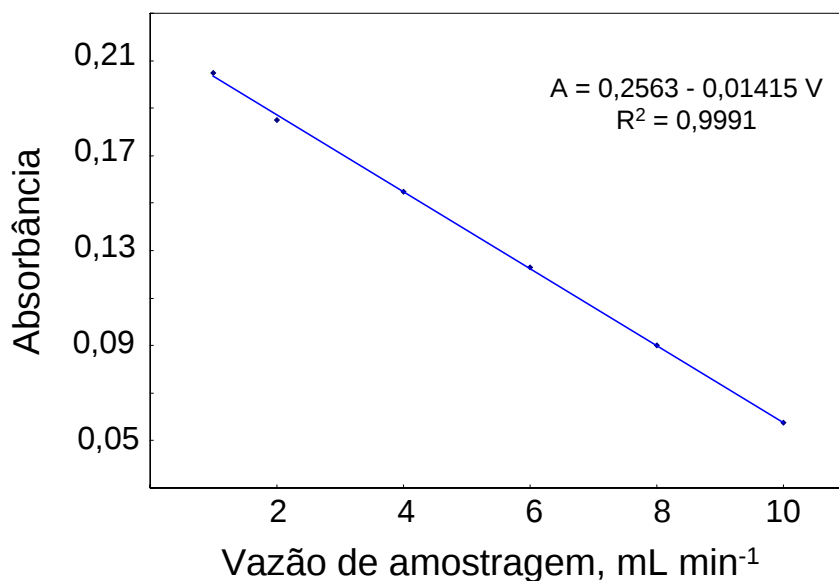
O tempo de pré-concentração da solução analítica está comprometido com a velocidade analítica do sistema FIA-Chelite-CVAAS porém quando baixos limites de detecção são necessários, esse sistema é passível de operar com maior tempo de pré-concentração elevando a sensibilidade do sistema, porém conseqüentemente diminuindo a frequência analítica.

### 5.2.8 - Vazão de amostragem

A vazão para a etapa de pré-concentração da solução analítica está relacionada com o tempo de residência dos íons mercúrio na coluna empacotada com resina Chelite S<sup>®</sup>, influenciando a cinética de troca-iônica na superfície do suporte sólido. A Figura 17 mostra a influência da vazão de amostragem de  $5,0 \text{ mL}$  de solução analítica ( $2,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1} \text{ Hg}$ ) na intensidade do sinal analítico. O aumento da vazão de amostragem diminui o tempo de contato entre os íons mercúrio e resina de troca-iônica causando menor eficiência do processo de pré-concentração. Entretanto, a diminuição da vazão de amostragem da solução analítica confere ao sistema maior sensibilidade, ocasionando o comprometimento da velocidade analítica.



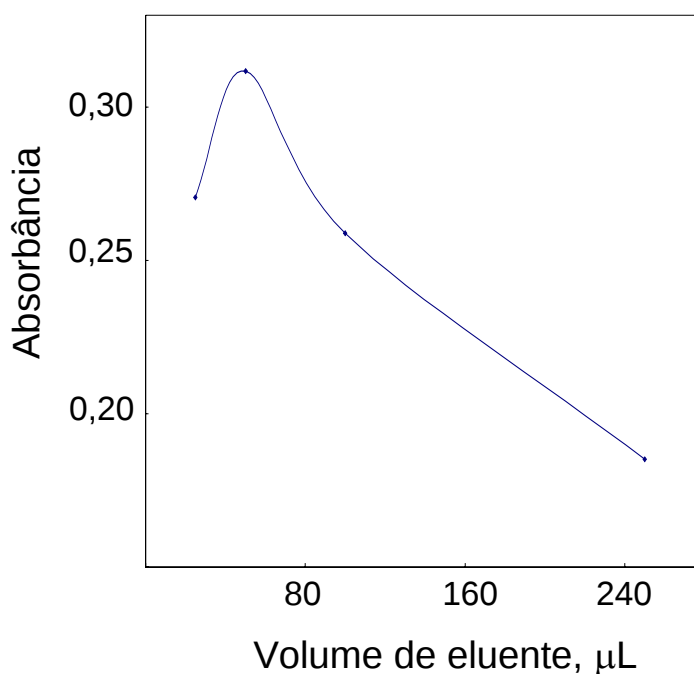
**Figura 16** – Influência do tempo de amostragem da solução analítica na intensidade do sinal analítico. Condições: solução analítica:  $2,5 \text{ mL min}^{-1}$  ( $2,0 \mu\text{g L}^{-1} \text{ Hg}$ ); gás transportador  $4 \text{ mL min}^{-1}$  ( $\text{N}_2$ ); gás arraste:  $20 \text{ mL min}^{-1}$  ( $\text{N}_2$ ); reagente/eluyente:  $250 \mu\text{L}$  ( $\text{SnCl}_2$  10% (m/v) em  $\text{HCl}$   $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ ). A – Absorbância e T - tempo



**Figura 17** - Influência da vazão de amostragem da solução analítica na intensidade do sinal analítico. Condições: solução analítica:  $2,0 \mu\text{g L}^{-1} \text{ Hg}$ ; gás transportador  $4 \text{ mL min}^{-1}$  ( $\text{N}_2$ ); gás arraste:  $20 \text{ mL min}^{-1}$  ( $\text{N}_2$ ); reagente/eluyente:  $250 \mu\text{L}$  ( $\text{SnCl}_2$  10% (m/v) em  $\text{HCl}$   $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ ). A – Absorbância e V – vazão de amostragem da solução analítica.

### 5.2.9 - Volume de eluente

O volume de eluente deve garantir as quantidades estequiométricas ou excesso de cloreto estanoso e ácido clorídrico necessárias para a eluição e redução quantitativa dos íons mercúrio retidos na coluna empacotada com resina Chelite S<sup>®</sup>. Pequenos volumes de eluente causam eluições ineficientes e comprometem a sensibilidade e precisão das medidas. Entretanto, grandes volumes de eluente são introduzidos lentamente na câmara de reação/separação gás-líquido possibilitando dispersão dos vapores de mercúrio pelo fluxo de gás arraste, associado ao maior efeito memória no sistema devido a impregnação de cloreto estanoso nos tubos de transporte. De acordo com a Figura 18, 50  $\mu\text{L}$  de eluente são suficientes para garantir eluições eficientes e minimizar o efeito de diluição da alíquota de reagente/eluente, não comprometer a sensibilidade das medidas.



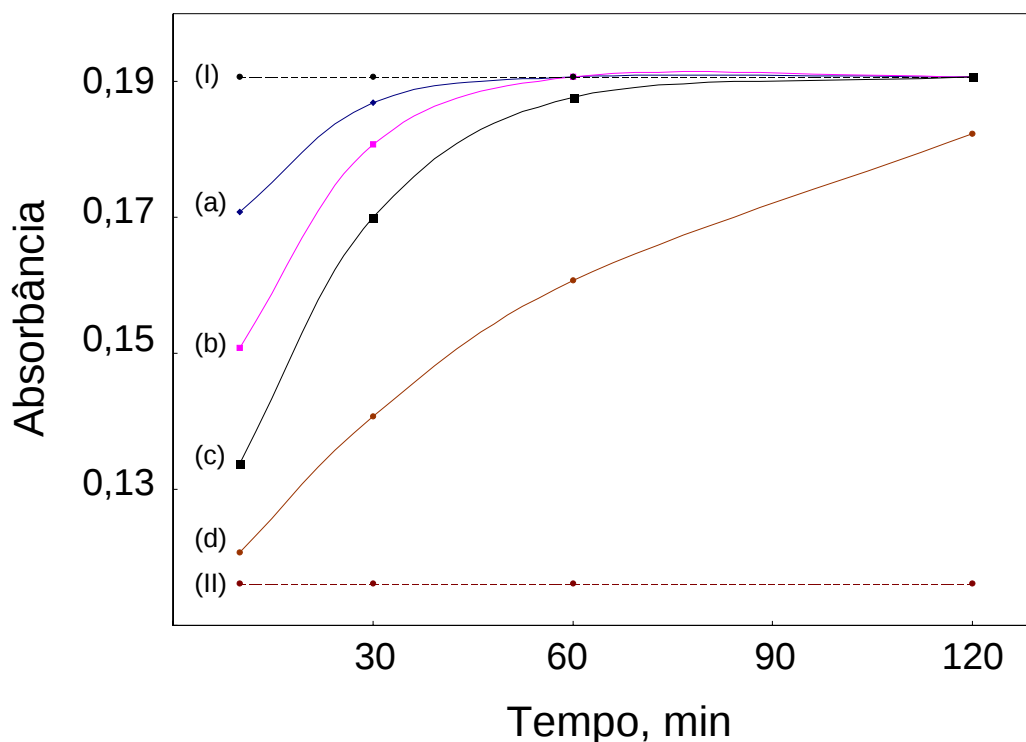
**Figura 18** - Influência do volume de eluente na intensidade do sinal analítico. Condições: solução analítica:  $2,5 \text{ mL min}^{-1}$  ( $2,0 \mu\text{g L}^{-1} \text{ Hg}$ ); gás transportador  $4 \text{ mL min}^{-1}$  ( $\text{N}_2$ ); gás arraste:  $20 \text{ mL min}^{-1}$  ( $\text{N}_2$ ); reagente/eluente:  $\text{SnCl}_2$  10% (m/v) em  $\text{HCl}$   $6,0 \text{ mol L}^{-1}$  e tempo de pré-concentração: 120 s.

### 5.2.10 - Interferentes

A presença de íons cloreto na solução analítica causou forte interferência no processo de pré-concentração dos íons mercúrio(II) na coluna empacotada com resina Chelite S<sup>®</sup>. As soluções analíticas contendo concentrações de íons cloreto menores que 250 mg L<sup>-1</sup>, não apresentaram diferenças significativas na intensidade do sinal analítico. Entretanto, ocorre forte influência da concentração de íons cloreto acima dessa concentração limite, sendo que 20,0 g L<sup>-1</sup> causa um decréscimo de 70% na intensidade do sinal analítico. Este fato possivelmente está associado à formação de complexos de cloreto com o íons mercúrio ([HgCl<sub>4</sub>]<sup>-2</sup>) os quais não são retidos pela resina de troca catiônica Chelite S<sup>®</sup>.

A estratégia proposta para minimizar a interferência dos íons cloreto na etapa de pré-concentração de mercúrio na coluna empacotada com resina Chelite S<sup>®</sup> foi a redução dos íons cloreto (Cl<sup>-1</sup>) a cloro (Cl<sub>2</sub>) utilizando permanganato (MnO<sub>4</sub><sup>-1</sup>) (KOLTHOFF *et al.*, 1969) durante o processo de digestão das amostras (REIS *et al.*, 1992; MALM *et al.*, 1989). A Figura 19 mostra que há uma diminuição de 40 % da intensidade do sinal analítico da solução digerida na presença de 2,0 g L<sup>-1</sup> de íons cloreto (B) quando comparada a solução digerida com ausência de íons cloreto (A). O processo de minimização da interferência dos íons cloreto com permanganato durante o procedimento de digestão da amostra mostrou ser influenciado pela temperatura e presença de catalisador (Mn(II)) (KOLTHOFF *et al.*, 1969). A Figura 19 mostra que com uma pequena adaptação do procedimento de digestão da amostra adicionando 50 mL de solução 5 % (m/v) KMnO<sub>4</sub> e 1 mL de solução 1 % (m/v) MnSO<sub>4</sub> são suficientes para minimizar a influência de 20 g L<sup>-1</sup> de íons cloreto após 60 minutos de aquecimento a 60 °C.

Utilizando uma linha opcional (I) no sistema FIA-Chelite-CVAAS (Figura 05) verificou-se que as soluções analíticas na presença dos íons Ni, Co, Cd, Pb, Cu, Zn, Fe, Al, SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> e Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>-2</sup> não apresentaram diferenças significativas na intensidade do sinal analítico.



**Figura 19** - Influência da concentração de cloreto na eficiência da etapa de pré-concentração do sistemas FIA-Chelite-CVAAS. Condições: solução analítica:  $2,5 \text{ mL min}^{-1}$  ( $2,0 \mu\text{g L}^{-1} \text{ Hg}$ ); gás transportador  $4 \text{ mL min}^{-1} (\text{N}_2)$ ; gás arraste:  $20 \text{ mL min}^{-1} (\text{N}_2)$ ; reagente/eluyente:  $250 \mu\text{L}$  ( $\text{SnCl}_2$  10% (m/v) em  $\text{HCl } 6,0 \text{ mol L}^{-1}$ , tempo de pré-concentração: 120s. As curvas (a) e (b) correspondem as adequações do procedimento de digestão da amostra quanto a presença do catalisador  $\text{Mn}^{+2}$  a  $60^\circ\text{C}$  e  $\text{Mn}^{+2}$  a  $25^\circ\text{C}$ , respectivamente. Enquanto que as curvas (c) e (d) correspondem ao procedimento de digestão da amostra na ausência de catalisador a  $60^\circ\text{C}$  e  $25^\circ\text{C}$ , respectivamente. As curvas (B) e (A) correspondem a solução analítica não digerida na presença de  $2,0 \text{ g L}^{-1}$  de íons cloreto e na ausência de íons cloreto, respectivamente.

### 5.2.11 - Exatidão do método

As Tabelas 5 e 6 mostram os resultados obtidos na determinação de mercúrio em amostras de água, vinhaças, açúcar e materiais certificados utilizando o sistema FIA-Chelite-CVAAS em suas condições operacionais otimizadas. O sistema FIA-Chelite-CVAAS apresentou nível de confiabilidade de 95% em relação ao material de referência (teste-t). O sistema FIA-Chelite-CVAAS quando aplicado às soluções analíticas com concentrações entre 50-500 ng L<sup>-1</sup> apresentou linearidade (r) de 0,9996. O sistema FIA-Chelite-CVAAS apresentou taxa de amostragem de 25 determinações/hora, consumindo 5,0 mg SnCl<sub>2</sub> e 10,0 mL de amostra por determinação. O desvio padrão relativo foi de 5% (n = 12) para amostras contendo 76,7 ng L<sup>-1</sup> Hg e o limite de detecção (3σ) de 0,8 ng L<sup>-1</sup>.

**Tabela 05** - Valores obtidos na determinação de mercúrio (n=5) em amostras de águas, vinhaça, açúcar e fertilizante utilizando o sistema FIA-CVAAS

| Amostra                                    | Adição | Recuperação |
|--------------------------------------------|--------|-------------|
| Água <sup>1</sup> (ng L <sup>-1</sup> )    | 400    | 391,4±18,5  |
| Água <sup>2</sup> (ng L <sup>-1</sup> )    | 400    | 394,8±15,1  |
| Água <sup>3</sup> (ng L <sup>-1</sup> )    | 400    | 436,3±21,2  |
| Vinhaça <sup>1</sup> (µg L <sup>-1</sup> ) | ---    | 572,7±17,2  |
| Vinhaça <sup>2</sup> (µg L <sup>-1</sup> ) | ---    | 606,2±19,7  |
| Vinhaça <sup>3</sup> (µg L <sup>-1</sup> ) | ---    | 515,3±21,6  |
| Açúcar <sup>1</sup> (µg kg)                | ---    | 2,36±0,06   |
| Açúcar <sup>2</sup> (µg kg)                | ---    | 2,78±0,09   |
| Açúcar <sup>3</sup> (µg kg)                | ---    | 2,22±0,07   |
| Açúcar <sup>4</sup> (µg kg)                | ---    | 1,67±0,07   |
| Fertilizante (µg L <sup>-1</sup> )         | ---    | 2,73±0,08   |

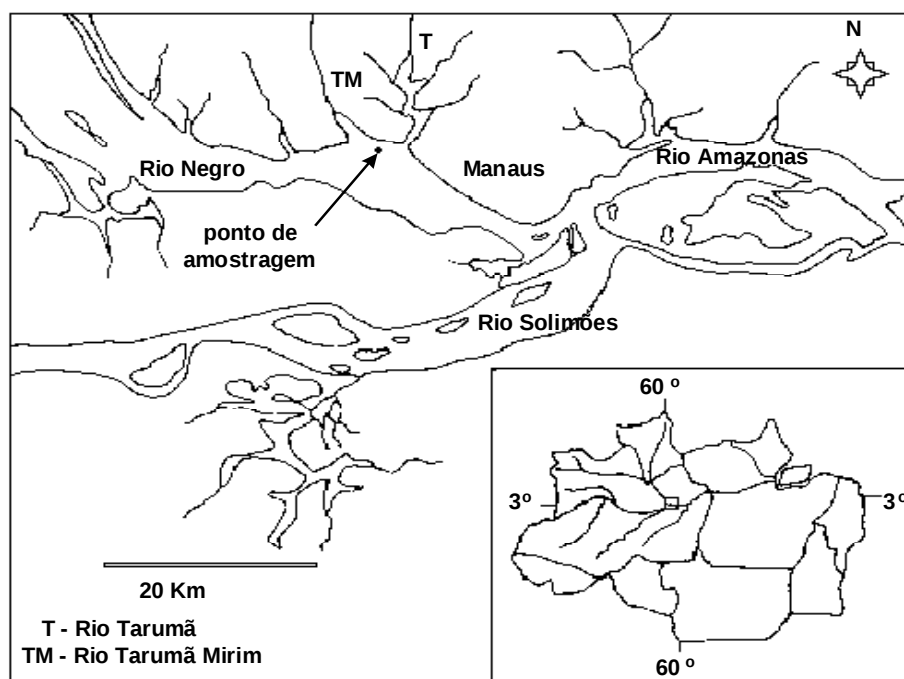
Água: <sup>1</sup>Rio Araguaia, São Miguel do Araguaia-GO; <sup>2</sup>Rio Cuiabá, Barão de Melgaço-MT e <sup>3</sup>Rio Tietê, Ibitinga-SP

**Tabela 06**– Análise dos materiais certificados (n=5) utilizando o sistema FIA-Chelite-CVAAS

| Amostra                | Valor certificado (µg g <sup>-1</sup> ) | Valor encontrado (µg g <sup>-1</sup> ) |
|------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|
| 1572 Citrus Leaves     | 0,79±0,03                               | 0,80±0,02                              |
| Buffalo River Sediment | 1,42±0,05                               | 1,47±0,07                              |

### 5.3 - Extração de substâncias húmicas aquáticas

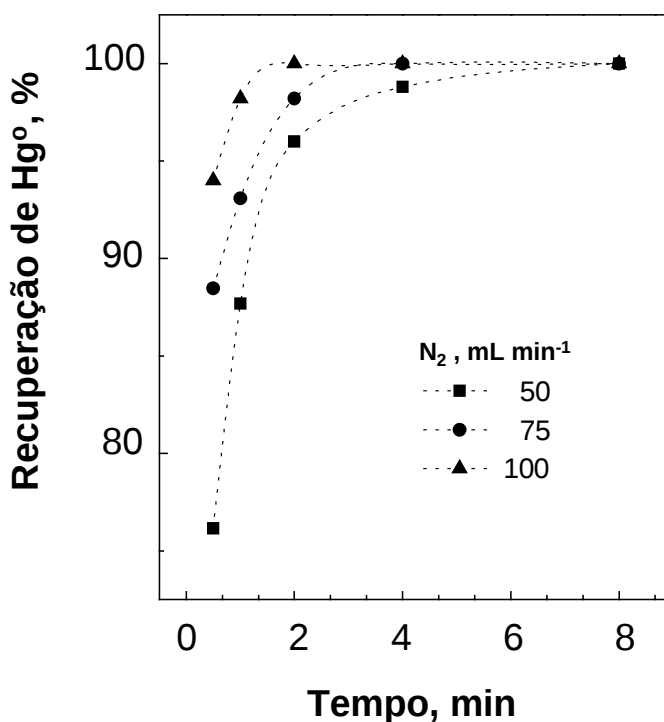
O método de extração de substâncias húmicas aquáticas por resinas XAD é o mais adequado quando se trata do procedimento de grandes volumes de amostra, por ser de fácil manuseio e baixo custo. Entretanto, apresenta como inconveniente liberação de produtos oriundos do processo de fabricação da resina e adsorção irreversível, podendo causar alterações na amostra. O processo de extração com XAD-8 permite extrair a maior parte do carbono orgânico dissolvido (LARA & THOMAS, 1994). No processo de extração de SHA, obteve-se 110 mL de extrato alcalino após a percolação de 100 L de amostra de água coletada no Rio Negro-AM, próximo a confluência com o Rio Tarumanzinho (Figura 20), resultando em um fator de concentração de aproximadamente 100 vezes.



**Figura 20** – Localização do ponto de coleta da amostra de água do Rio Negro-AM

## 5.4 - Sistema de reação/aprisionamento de mercúrio

No sistema de reação/aprisionamento desenvolvido, os efeitos de dispersões produzidos pelo fluxo de nitrogênio no transporte do vapor de  $\text{Hg}^0$  formado pela reação de redução dos íons  $\text{Hg(II)}$  com SHA não influenciam na eficiência do trapeamento. Entretanto, há um compromisso entre a vazão do gás de arraste e o tempo de aeração. De acordo com a Figura 21, 2 min de aeração com vazão do gás arraste de  $100 \text{ mL min}^{-1}$  são suficientes para se obter a máxima eficiência de trapeamento do mercúrio volatilizado.



**Figura 21** - Influência da vazão do gás de arraste ( $\text{N}_2$ ) e do tempo de aeração na eficiência do sistema de reação/aprisionamento de mercúrio reduzido. Condições: solução de aprisionamento: 5,0 mL ( $\text{KMnO}_4$  0,024 % (m/v) em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4 % (v/v)); SHA: 1,4 mL e  $\text{Hg(II)}$ : 100  $\mu\text{L}$ .

## 5.5 - Cinética de redução de mercúrio(II) por SHA

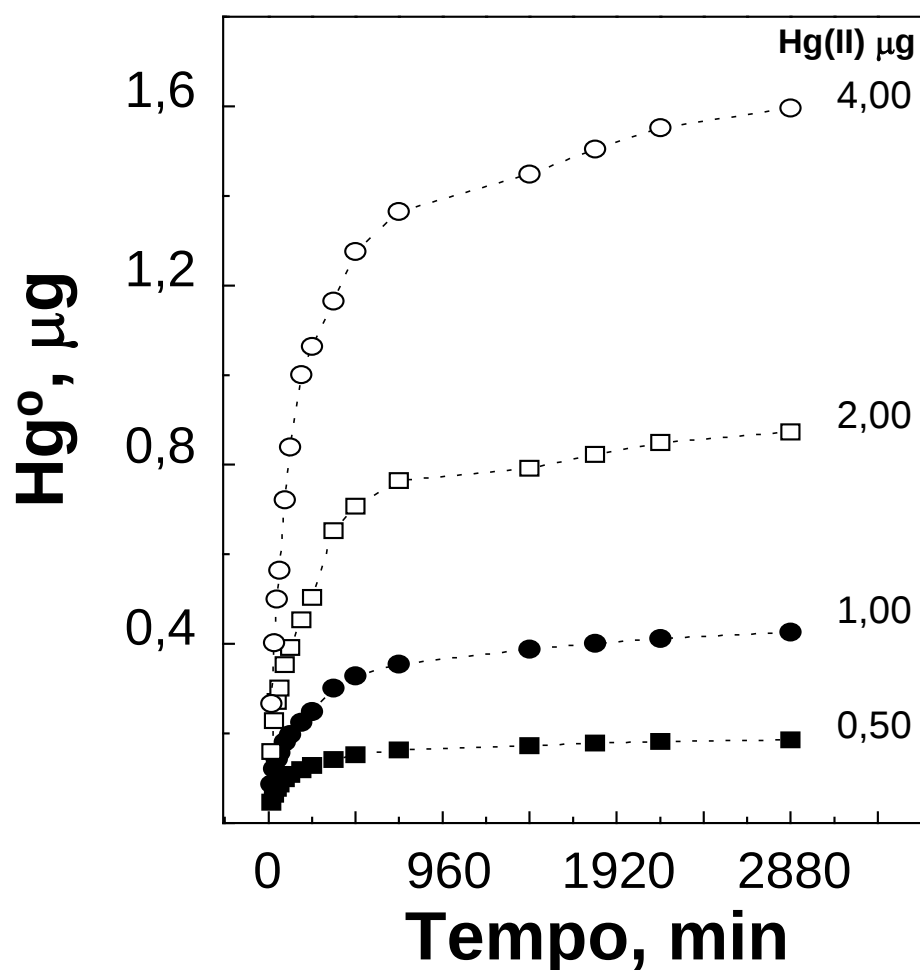
### 5.5.1 – Influência da concentração de mercúrio(II)

A Figura 22 mostra uma relação entre a quantidade de íons Hg(II) adicionados e a quantidade de mercúrio reduzido por 1,0 mg de SHA em pH 5,0. Independente da razão Hg(II)/SHA, após 48 horas de reação apenas 40% do Hg(II) é reduzido. As SHA são capazes de reduzir 1,6  $\mu\text{g}$  de Hg(II) em meio contendo inicialmente 4,0  $\mu\text{g}$  de Hg(II), entretanto reduzem apenas 0,19  $\mu\text{g}$  de Hg(II) adicionado inicialmente 0,5  $\mu\text{g}$  Hg(II) no meio reacional, durante 78 h de reação. ALLARD *et al.* (1991) sugeriram que os íons mercúrio são complexados e posteriormente reduzidos. Neste caso, apenas uma parte dos íons mercúrio adicionados foram reduzidos provavelmente devido à competição entre os sítios de complexação e redução dos íons Hg(II) por SHA.

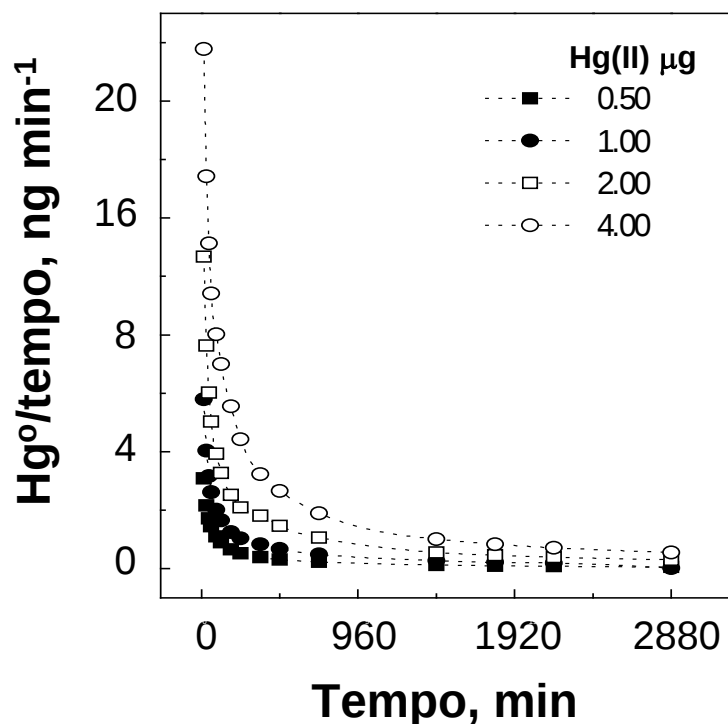
A Figura 23 mostra um forte decréscimo na velocidade de reação de redução de íons Hg(II) por SHA em função ao tempo de reação tendendo a zero durante as 24 h iniciais. Estudos recentes relatados por (SARGENTINI Jr, 2001), indicam que a labilidade relativa de íons metálicos complexados a SHA em função do tempo de complexação (“ageing”) é fortemente influenciada durante as 24 h iniciais devido a possíveis rearranjos dos íons metálicos na macromolécula húmica ocupando sítios mais internos.

Na Figura 24 as curvas de velocidade de formação de  $\text{Hg}^0$  em função da massa de íons mercúrio adicionada, apresentam uma relação linear indicando reação de primeira ordem em relação ao mercúrio. Utilizando método gráfico similar ao aplicado por ALBERTS *et al.* (1974) o valor da constante de velocidade foi estimado em  $0,002 \text{ min}^{-1}$  assumindo reação de primeira ordem. A linearidade entre a velocidade reacional e a concentração de íons mercúrio adicionados ao meio é

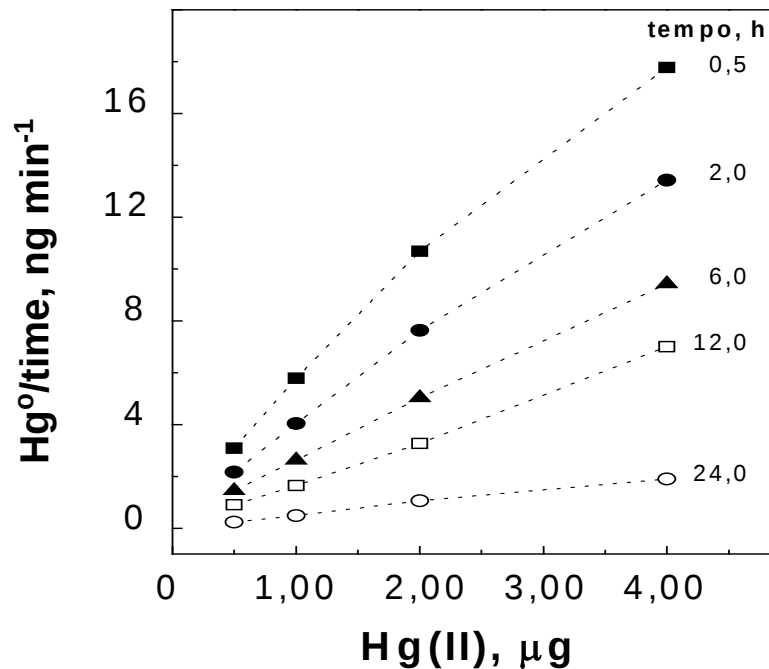
mantida durante as primeiras 24 h, sendo possível inferir que o mecanismo de redução de mercúrio por SHA permanece o mesmo durante todo o processo.



**Figura 22** - Influência do tempo de reação e concentração dos íons mercúrio adicionado na reação de redução de mercúrio por SHA extraída do Rio Negro-AM . Condições: SHA 1,0 mg e pH 5,0.



**Figura 23** - Velocidade da reação de redução dos íons Hg(II) por SHA extraída do Rio Negro-AM em função do tempo de reação. Condições: SHA 1,0 mg e pH 5,0.

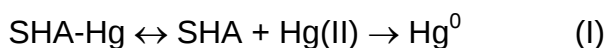


**Figura 24** - Influência da massa de íons mercúrio(II) adicionados e do tempo de reação na velocidade da reação de redução de mercúrio(II) por SHA extraída do Rio Negro-AM. Condições: SHA 1,0 mg e pH 5,0.

### 5.5.2 – Influência da concentração de substâncias húmicas aquáticas

As substâncias húmicas apresentam um grande espectro de sítios ligantes inferindo à macromolécula considerável capacidade de complexação de íons metálicos, interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals e complexos metálicos mistos. Em estudos de interações de metais com substâncias húmicas é necessário considerar as propriedades complexantes e redutoras das macromoléculas húmicas.

A discriminação das frações metálicas complexadas/reduzidas por substâncias húmicas pode ser descrita pela equação simplificada (I):



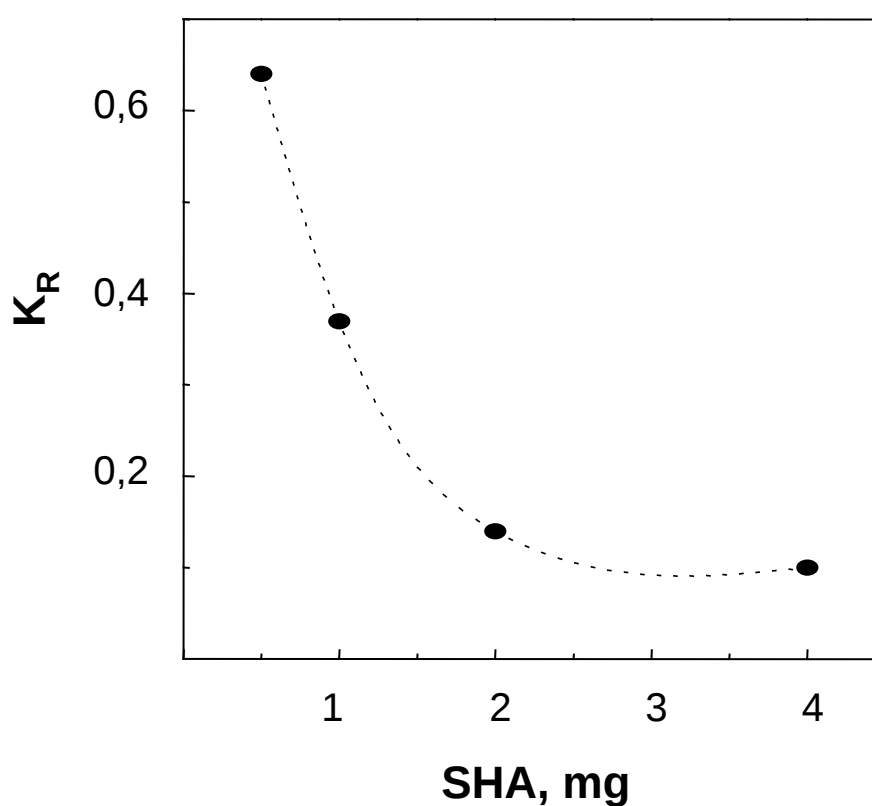
Onde: SHA-Hg: espécie formada pela complexação e  $\text{Hg}^0$ : espécie formada pela redução.

Em analogia ao coeficiente de redução utilizado para discriminação das frações metálicas lábil/inerte em estudos com resinas de troca iônica (BURBA *et al.*, 1994 e BURBA *et al.*, 1993), o processo de complexação/redução de  $\text{Hg(II)}$  por substâncias húmicas aquáticas pode ser estimado utilizando o coeficiente de redução ( $K_R$ ) definido como o quociente entre a razão da massa de mercúrio reduzido ( $\text{Hg}^0$ ) em relação à massa de substâncias húmicas aquáticas adicionada ao meio (SHA) pela razão da massa de íons mercúrio(II) adicionado ( $\text{Hg(II)}$ ) em relação ao volume total (V), descrito pela equação (II):

$$K_R = \frac{(\text{Hg}^0) / (\text{SHA})}{(\text{Hg(II)}) / (\text{V})} \quad (\text{II})$$

De acordo com a equação (II), os valores de  $K_R$  podem ser utilizados para investigar aspectos cinéticos e quantitativos do processo de redução de  $\text{Hg(II)}$  por SHA.

A influência da massa de SHA no processo de redução em função dos valores de  $K_R$  é caracterizada na Figura 25 utilizando  $1,0 \mu\text{g Hg(II)}$  em pH 5,0. Neste caso, os valores de  $K_R$  e consequentemente o processo de redução decresce com o aumento da massa de SHA. Estes dados estão de acordo com os dados apresentados na Figura 22 e sugerem uma maior quantidade de sítios complexação específicos em relação aos sítios redutores na macromolécula húmica

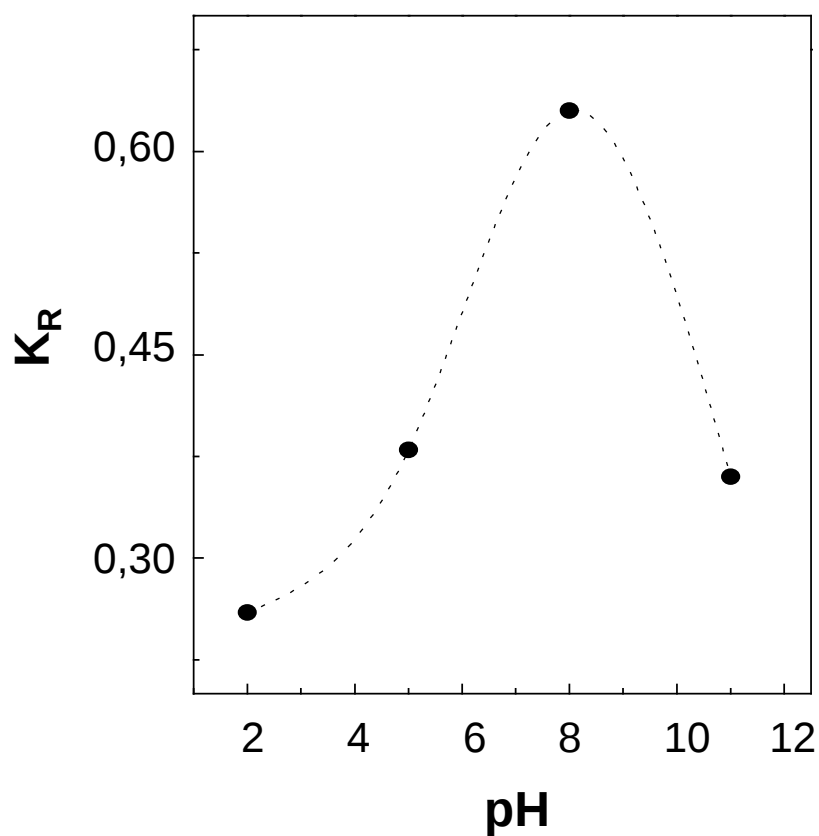


**Figura 25** - Influência da massa de substâncias húmicas aquáticas extraída do Rio Negro-AM no processo de redução de mercúrio(II). Condições:  $\text{Hg(II)}$   $1,0 \mu\text{g}$ , pH 5,0 e tempo de reação 24 horas.

### 5.5.3 - Influência do pH

MATTHIESSEN (1998, 1996 e 1994) tem reportado uma correlação entre a quantidade de mercúrio(II) reduzido por substância húmica sintética e o valor do pH. A Figura 26 mostra a influência do pH nos valores do coeficiente de redução ( $K_R$ ) utilizando 1,0 mg de SHA e 1,0  $\mu\text{g}$  Hg(II). De acordo com ZARA *et al.* (2000), EPHRAIM *et al.* (1996) e SWIFT (1989), a macromolécula húmica apresenta variações na conformação estrutural em diferentes valores de pH. A conformação estrutural condensada é favorecida em altos e baixos valores de pH, devido as interações intermoleculares e intramoleculares, respectivamente. Em pH neutro a macromolécula húmica flexível encontra-se com conformação estrutural estendida devido as repulsões intramoleculares. Nesta condição, os sítios redutores estão mais suscetíveis a reação de redução dos íons mercúrio(II) favorecendo o processo de redução.

Associado ao efeito da conformação estrutural o aumento do pH da solução favorece o processo de complexação pois ocorre o decréscimo no grau de hidratação dos íons Hg(II) e diminuição na competição entre os íons  $\text{H}_3\text{O}^+$  e os íons Hg(II) (STEVENSON, 1985). Entretanto, em altos valores de pH ocorre forte competição entre a reação de complexação das substâncias húmicas e as reações de hidrólise dos íons metálicos, em especial o mercúrio levando a formação de  $[\text{Hg}(\text{OH})_n]^{2-n}$  ( $n=1; 2$ ) (ALLARD & ARSENE, 1991). HELBURN & Mac CARTHY, 1994 relataram que em elevados valores de pH ocorre a ionização dos grupos fenólicos diminuindo a capacidade de redução de Hg(II) por SH.



**Figura 26** - Influência dos valores de pH no processo de redução de mercúrio(II) por substâncias húmicas aquáticas extraída do Rio Negro-AM. Condições: SHA 1,0 mg; Hg(II) 1,0  $\mu$ g e tempo de reação-24 horas.

## 5.6 - Fracionamento das substâncias húmicas aquáticas

Atualmente, são disponíveis no mercado ampla variedade de filtros de membranas construídas com materiais relativamente inertes, com diferentes porosidades e relativa precisão. Isto traz novas perspectivas para o desenvolvimento de sistemas de fracionamento de macromoléculas com diferentes tamanhos moleculares. Utilizando a técnica de fracionamento por ultrafiltração com membrana de polyethersulfone, BURBA *et al.* (1995), estudaram a influência da concentração, força iônica e pH na distribuição de SHA. Caracterizaram que soluções de SHA 1,0 mg mL<sup>-1</sup> e pH 6,0 são as condições mais adequadas para o fracionamento utilizando-se membranas de polyethersulfone (Sartocon<sup>®</sup> Micro). De acordo com o esquema do sistema de fracionamento sequencial por ultrafiltração (SFSUF) representado na Figura 08, a pressão é ajustada nos reguladores P1-P5 conectados nos respectivos tubos os quais dão retorno ao material não filtrado e pode variar de 0,0 a 0,5 bar. Porém, para evitar vazamentos nas conexões, optou-se por operar com 0,3 bar de pressão. O conjunto bomba peristáltica (com cinco canais)/tubos de Tygon<sup>®</sup> acoplado ao SFSUF, permite vazão máxima de até 85 mL min<sup>-1</sup>. Embora seja uma vazão relativamente menor que a máxima especificada pelo fabricante, é possível trabalhar sem obstruir significativamente os poros das membranas Sartocon<sup>®</sup> Micro, permitindo o fracionamento dos extratos húmicos, inclusive das frações com maiores tamanhos moleculares. A importância de uma alta velocidade do fluxo tangencial sobre as superfícies das membranas é deslocar os compostos acumulados evitando a obstrução dos poros. Entretanto, de acordo com ROCHA *et al.* (2000) a eficiência de um sistema de filtração não está relacionada só com a vazão do fluxo tangencial mas, principalmente, com as pressões exercidas nos tubos os quais dão retorno ao material não filtrado.

## 5.7 – Caracterização das frações húmicas

### 5.7.1 – Distribuição de carbono e aromaticidade

A grande variedade de tamanho molecular característica das substâncias húmicas aquáticas, deveria, em princípio, permitir a separação da amostra em muitas frações específicas. Na prática, devido às complexas associações intermoleculares, é difícil obter frações com tamanhos moleculares específicos. Entretanto, mesmo tratando-se de intervalos de tamanhos moleculares, o fracionamento é um importante procedimento para melhor compreender importantes propriedades físicas e químicas das SHA tais como solubilidade, comportamento de adsorção, capacidade complexante com íons metálicos, propriedades ácido-base, distribuição de grupos funcionais/estruturas reativas etc. (SWIFT, 1996).

A Figura 27 mostra a distribuição das frações de SHA, com diferentes tamanhos moleculares, em função das respectivas porcentagens de carbono e aromaticidade. A fração de menor tamanho molecular  $F_6$  (< 5 kDa) tem cerca de quatro vezes mais carbono que a fração de maior tamanho molecular  $F_1$  (> 100 kDa) e as frações de tamanho moleculares intermediários têm entre 10-20% de carbono. Assim, após o fracionamento, pode-se estabelecer a seguinte ordem decrescente de distribuição de carbono nas diferentes frações:  $F_6 > F_2 > F_3 > F_5 = F_4 > F_1$ . A perda no balanço de massa, cerca de 2-8 %, é atribuído à adsorção de matéria orgânica na superfície das membranas do sistema de ultrafiltração (BURBA *et al.*, 1995; ROCHA *et al.*, 1999). De acordo com ASTER *et al.* (1996) a extração de substâncias húmicas aquáticas utilizando XAD-8 causa um deslocamento sistemático de todas as frações húmicas comparado a amostra original, provavelmente devido a grande variação do valor do pH durante o processo de extração (adsorção: pH 2,0; eluição: pH 13,0).

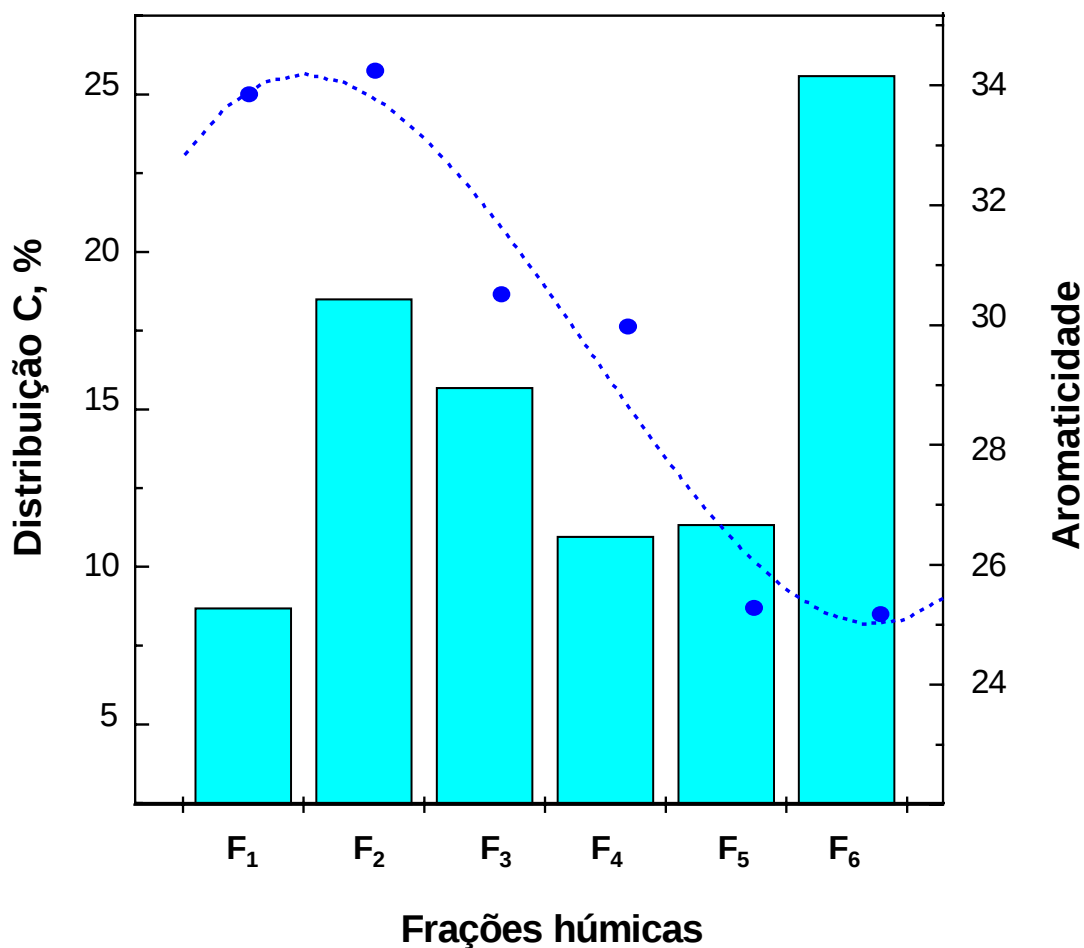
A espectrofotometria UV-VIS é uma técnica valiosa na identificação de grupos funcionais cromóforos, uma vez que alguns compostos presentes nas SH absorvem fortemente abaixo de 280 nm. Este comprimento de onda não representa a absorbância máxima das SH, mas é onde ocorrem as transições eletrônicas do tipo  $\pi - \pi$ , características de compostos como ácidos benzóicos, derivados de anilina e outros correlatos que são sub unidades da estrutura das substâncias húmicas aquáticas. Entretanto, considerando a natureza complexa das substâncias húmicas essa técnica não possibilita medir ou caracterizar um cromóforo em particular, mas a sobreposição de absorbâncias de vários grupos funcionais (STEVENSON, 1982).

TRAINA *et al.* (1990) estudaram a correlação entre medidas de absorbância na região do UV-VIS e a porcentagem de carbono aromático, determinado por RMN. Os resultados mostraram que a aromaticidade das substâncias húmicas pode ser estimada quantitativamente por espectrofotometria na região do UV-visível. PEURAVUORI & PIHLAJA (1997) sugeriram que a relação entre a aromaticidade e a razão  $E_2/E_3$  (absorbância em 250 e 365 nm) para material húmico pode ser obtida de acordo com a equação:

$$\text{aromaticidade} = 52,509 - 6,780 E_2/E_3 \quad (\text{III})$$

Isto implica que a diminuição do quociente  $E_2/E_3$  ocorre com o aumento da aromaticidade das substâncias húmicas. Esses autores, correlacionaram aromaticidade e tamanho molecular, utilizando RMN e cromatografia de exclusão, com a absorvidade molar de SH. Mesmo o coeficiente de correlação linear não sendo muito bom ( $r^2=0,82$ ), foi possível notar que a quantidade de unidades aromáticas aumenta em função do aumento do tamanho molecular. Utilizando a equação (I), a Figura 27 mostra que as frações com maior tamanho molecular ( $F_1 > 100$  e  $F_2$ : 50-100 kDa) contem maior número de estruturas aromáticas e uma gradual diminuição

de estruturas aromáticas nas frações com menor tamanho molecular. Isto pode ser associado com a contínua diminuição do tamanho molecular das frações  $F_3$  para  $F_6$  e a presença de maior número de estruturas alifáticas. Recentes trabalhos com substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostra de água superficial coletada no Rio Itapanhaú, localizado no Parque Estadual da Serra do Mar (Bertioga-SP), mostraram similar distribuição de aromaticidade em frações com diferentes tamanhos moleculares (ROCHA *et al.*, 2000).



**Figura 27** – Distribuição das frações de substâncias húmicas aquáticas extraídas do Rio Negro-AM, em função do tamanho molecular e aromaticidade (F<sub>1</sub>: > 100 kDa; F<sub>2</sub>: 50-100 kDa; F<sub>3</sub>: 30-50 kDa; F<sub>4</sub>: 10-30 kDa; F<sub>5</sub>: 5-10 kDa e F<sub>6</sub>: < 5 kDa)

### 5.7.2 – Espectroscopia na região do infravermelho

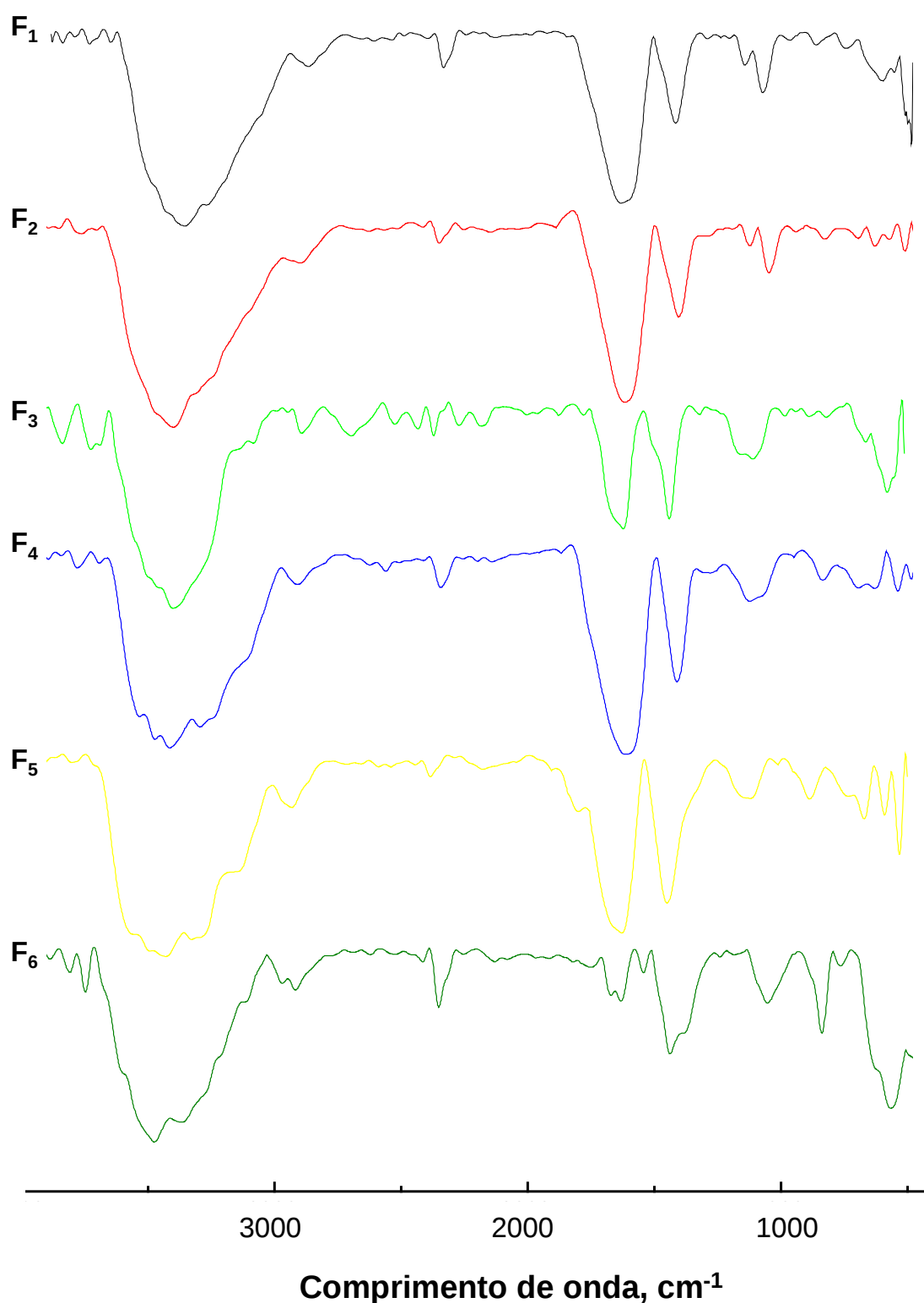
Para informações qualitativas análises espectrométricas, têm sido de grande utilidade na caracterização de substâncias húmicas. Devido à mistura complexa de moléculas orgânicas polieletrólíticas, o comportamento espectroscópico das substâncias húmicas representa a soma das respostas de muitas espécies diferentes (AIKEN *et al.*, 1985 ; KUCKUK *et al.*, 1994; ROCHA *et al.*, 2000).

Os espectros na região do infravermelho das substâncias húmicas mostram bandas largas provavelmente devido a sobreposição das bandas de absorção dos constituintes individuais da mistura heterogênea de grupos os quais constituem as substâncias húmicas (ABBT-BRAUN, 1992).

A Figura 28 mostra os espectros na região do infravermelho entre  $400\text{ cm}^{-1}$  e  $4000\text{ cm}^{-1}$  das frações húmicas de  $F_1$  a  $F_6$ . Em todos os espectros, observa-se uma banda larga na região de  $3400\text{ cm}^{-1}$  devido ao estiramento OH provavelmente em ligação por ponte de hidrogênio. As bandas em  $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$  são observadas nos espectros da maioria das SH, usualmente superpostas à banda larga de estiramento O-H. Estas bandas são atribuídas ao estiramento C-H dos grupos metil ou metileno alifáticos. As bandas em  $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento vibracional C=O de grupos carboxílicos ou carbonilas cetônicas. A banda em  $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$  é atribuída a vibração C=C de anéis aromáticos. Entre  $1380$  e  $1440\text{ cm}^{-1}$  notam-se bandas devido a grupos C-H alifáticos e vibração O-H de álcoois ou ácidos carboxílicos.

Todas as frações húmicas de  $F_1$  a  $F_6$  mostraram semelhantes espectros na região do infravermelho. Entretanto, de acordo com ABBT-BRAUN (1992), apesar da pequena diferença entre os espectros de SH, isto não significa que todos tenham a mesma estrutura.

ROCHA *et al.* (2000), utilizando espectroscopia na região do infravermelho relataram uma diminuição na intensidade da banda em  $1720\text{ cm}^{-1}$  e a extinção da banda em  $1200\text{ cm}^{-1}$  em substâncias húmicas aquáticas complexadas com mercúrio(II) em relação a amostra natural. Os autores inferiram que aparentemente os íons mercúrio(II) são preferencialmente complexados por troca iônica com os hidrogênios dos grupos carboxílicos. PICCOLO & STEVENSON (1982) sugeriram que em baixos graus de saturação do íon metálico provavelmente formam-se ligações covalentes mas, à medida em que a concentração do metal aumenta, aproximando-se da capacidade complexante da SH, tais ligações tornam-se crescentemente iônicas. Estes resultados indicam que outros grupos funcionais contendo oxigênio, além de COOH, participam da ligação entre SH e o íon Hg(II).



**Figura 28** – Espectros na região do infravermelho das frações de substâncias húmicas aquáticas extraídas do Rio Negro-AM (F<sub>1</sub>: > 100 kDa; F<sub>2</sub>: 50-100 kDa; F<sub>3</sub>: 30-50 kDa; F<sub>4</sub>: 10-30 kDa; F<sub>5</sub>: 5-10 kDa e F<sub>6</sub>: < 5 kDa)). Condições: 3,0 mg de fração húmica, pH 5,0 e 100 mg de KBr

### 5.7.3 – Titulação potenciométrica

A titulação potenciométrica tem sido empregada no estudo de substâncias húmicas por vários pesquisadores, tanto para a determinação de grupos funcionais ácidos, como para estudar a interação com metais (PERDUE, 1988; ALEIXO *et al.*, 1992). As curvas de titulação geralmente são sigmoidais devido as dissociações de próton justapostas dos diferentes grupos funcionais COOH e OH fenólicos. O uso das funções de Gran modificadas em linearização de curvas de titulações potenciométricas ácido-base possibilita a determinação da concentração e pKa de cada tipo de grupamento ácido na macromolécula húmica (GOMEZ *et al.*, 1991).

Os métodos lineares são considerados mais simples do ponto de vista matemático, por facilitar a elaboração dos cálculos e possibilitar representação gráfica, a qual permite uma visualização mais clara sobre o sistema em estudo (ALEIXO & GODINHO, 1987; ALEIXO *et al.*, 1992; MASINI *et al.*, 1998).

De uma forma generalizada as funções de Gran modificadas são definidas pelas equações II e III:

Ácido forte (HAo):

$$F_{HAo} = V_{HAo}C_b - V C_b \quad (IV)$$

$$F_{HAo} = ([H^+] - [OH^-]) (V_o + V) - \sum_{n=1}^N (V_{AHn} - V_{AH(n-1)}) C_b (K_{HA n} / (K_{HA n} + [H^+])) (V)$$

Ácidos fracos (HAn):

$$F_{HAN} = V_{HAN} K_{HAN} - V K_{HAN} \quad (VI)$$

$$F_{HAN} = [([H^+] - [OH^-]) (V_o + V) (K_{HAN} + [H^+]/C_b)] + (V - V_{HAO}) [H^+] +$$

$$[(V_{HA(n-1)} - V_{HAO}) K_{HAN}] - \{ [\sum_{j=1, n>1}^{n-1} (V_{AHj} - V_{AH(j-1)}) (K_{AHj} / (K_{AHj} + [H^+]))] \} +$$

$$[\sum_{j=n+1}^N (V_{AHj} - V_{AH(j-1)}) (K_{AHj} / (K_{AHj} + [H^+]))] \} (K_{HAN} + [H^+]) \quad (VII)$$

Onde:

$F_{HAO}$ : função de Gran modificada para o ácido forte HAO

$F_{HAN}$ : função de Gran modificada para o ácido fraco Han, com n variando de 1 até N

$[H^+]$ : concentração dos íons hidrogênio

$[OH^-]$ : concentração dos íons hidroxila

$V_o$ : volume inicial da titulação

$C_b$ : concentração da base

$K_{HAN}$ : constante de ionização do ácido fraco HAN

$V_{HA}$  = volume de equivalente;

$V_{HAj}$  e  $K_{HAj}$  têm significado análogos aos termos  $V_{HA}$  e  $K_{HA}$

Os termos  $V_{HAO}$  e  $V_{HAN}$  que aparecem nas equações II e IV, representam o volume total de base forte para a neutralização de cada componente ácido presente. Portanto, os volumes de base forte necessários para neutralizar cada componente ácido presente pode ser definido como:  $(V_{HA1} - V_{HAO})$ ,  $(V_{HA2} - V_{HA1})$ ,  $(V_{HA3} - V_{HA2})$  ....  $(V_{HAN} - V_{HA(n-1)})$ . Os termos  $V_{HAj}$  e  $K_{HAj}$  os quais aparecem na equação V, têm significado análogo aos termos  $V_{HAN}$  e  $K_{HAN}$ .

De acordo com dados da literatura as substâncias húmicas apresentam para esse sistema de linearização seis grupos tituláveis (ALEIXO *et al.*, 1992). Portanto, o sistema de linearização apresenta  $N = 6$ .

As funções de Gran modificadas são inicialmente calculadas aproximadamente e em seguida os cálculos são refinados. A função de Gran modificada aproximada para o ácido forte ( $F_{\text{HCl}}$ ) pode ser definida como:

$$F_{\text{HCl}} = ([\text{H}^+] - [\text{OH}^-]) (V_0 + V) \quad (\text{VII})$$

O valor aproximado do volume de base forte necessário para neutralizar o ácido forte ( $V_{\text{HCl}}$ ) é calculado a partir do coeficiente linear da reta formada por  $F_{\text{HCl}}$  vs.  $V$ , utilizando-se os primeiros pontos da curva de titulação potenciométrica.

A função de Gran modificada aproximada para o primeiro grupo titulável das SHA ( $F_{\text{HA1}}$ ) é calculada utilizando os dois primeiros termos da equação  $V$ , o valor aproximado do  $V_{\text{HCl}}$  e  $K_{\text{HA1}}$  estimada. Os valores aproximados do volume de base forte necessário para neutralizar o primeiro grupo ácido titulável das SHA ( $V_{\text{HA1}}$ ) e da constante de ionização deste grupo ( $K_{\text{HA1}}$ ) são calculados a partir do coeficiente linear e angular da reta formada por  $F_{\text{HA1}}$  vs.  $V$ , respectivamente, utilizando-se os primeiros pontos para valores de  $V > V_{\text{HCl}}$ .

Os cálculos das funções de Gran modificadas aproximadas para o restante dos grupo tituláveis das SHA ( $F_{\text{HA2}}$  a  $F_{\text{HA6}}$ ) são semelhantes ao cálculo aproximado da  $F_{\text{HA1}}$ , utilizando sempre os primeiros pontos para valores  $V > V_{\text{HA}(n-1)}$  aproximado e introduzindo os valores aproximados obtidos anteriormente de  $V_{\text{HCl}}$  e  $V_{\text{HA}(n-1)}$ .

A função de Gran modificada refinada para o ácido forte ( $F_{\text{HCl}}$ ) é calculada com todos os valores aproximados de volumes de equivalência e constantes de ionização estimadas, utilizando  $V < V_{\text{HCl}}$  aproximado. Os cálculos refinados das funções de Gran modificadas para os grupos tituláveis das SHA ( $F_{\text{HA1}}$  a  $F_{\text{HA6}}$ ) são semelhantes ao cálculo refinado de  $F_{\text{HCl}}$ , utilizando os pontos na região de  $V_{\text{HA}(n-1)}$  refinado  $< V < V_{\text{HA}(n+1)}$  aproximado, os valores refinados de  $V_{\text{HCl}}$  e  $V_{\text{HA}(n-1)}$ , os valores

aproximados de  $V_{HA(n+1)}$  e os valores estimados de  $K_{HA_n}$ . Nesses cálculos as substâncias húmicas aquáticas foram consideradas como uma mistura de monoácidos.

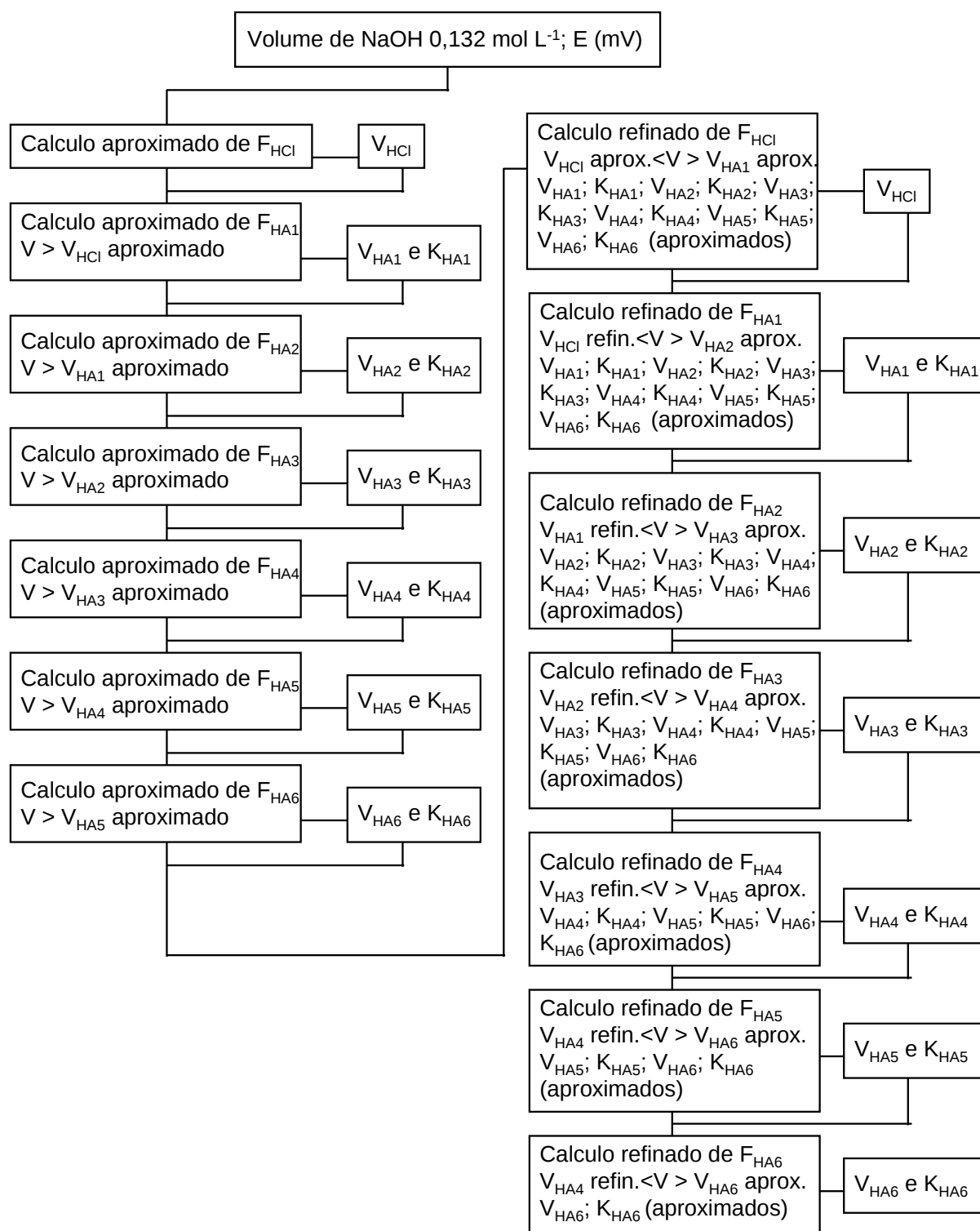
As funções de Gran modificadas foram aplicadas as curvas de titulação potenciométrica das frações húmicas de  $F_1$  a  $F_6$  utilizando o programa computacional Microsoft Excel, versão 7.0 de acordo com o diagrama representado na Figura 29

As Figuras de 30 a 35, mostram as curvas de titulação potenciométrica e as funções de Gran modificadas para as frações húmicas com diferentes tamanhos moleculares. A utilização de programas de planilhas de cálculos com geração simultânea de gráficos possibilitou melhor resolução desse cálculo iterativo. Os valores dos volumes de equivalência para cada componente ( $F_{HA1}$  a  $F_{HA6}$ ) das frações húmicas ( $F_1$  a  $F_6$ ) são indicados pela intersecção da reta correspondente a função de Gran modificada com o eixo do volume de NaOH adicionado.

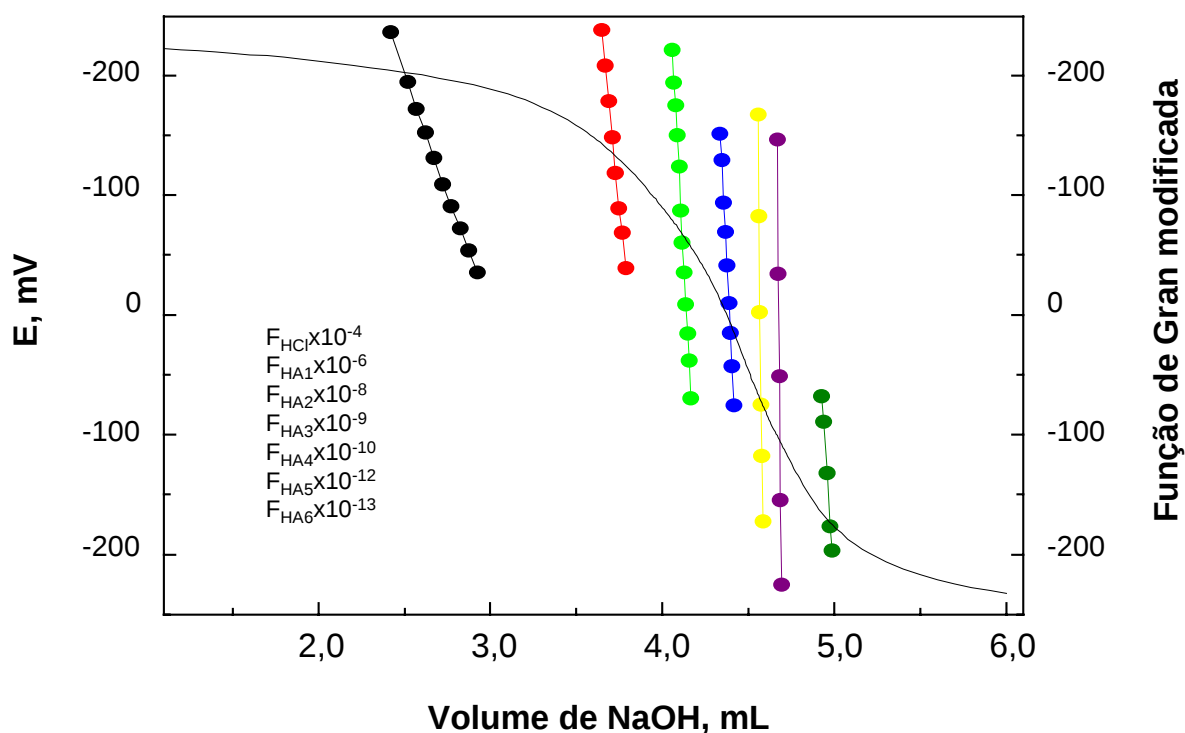
O material húmico apresenta seis grupos tituláveis, sendo que as componentes  $F_{HA1}$ ,  $F_{HA2}$  e  $F_{AH3}$  são atribuídas a grupos carboxílicos,  $F_{AH4}$  e  $F_{HA5}$  a aminas secundárias ou terciárias e  $F_{HA6}$  a grupos fenólicos (ALEIXO *et al.*, 1992; PAXÉUS & WEDBORG, 1985).

Os resultados da titulação potenciométrica das frações húmicas, obtidas por ultrafiltração de substâncias húmicas aquáticas extraídas do Rio Negro-AM, (Tabela 09) indicam que na estrutura das SHA os grupos oxigenados mais abundantes são os grupos carboxílicos (48,3-60,4 %) e fenólicos (23,7 a 33,0 %). De acordo com ALEIXO *et al.* (1992) a soma dos grupos carboxílicos e hidroxilas fenólicas é denominada de acidez total. O teor de acidez da matéria orgânica dissolvida tem importantes efeitos sobre o pH e biodisponibilidade de metais em sistemas aquáticos (CABANISS, 1991).

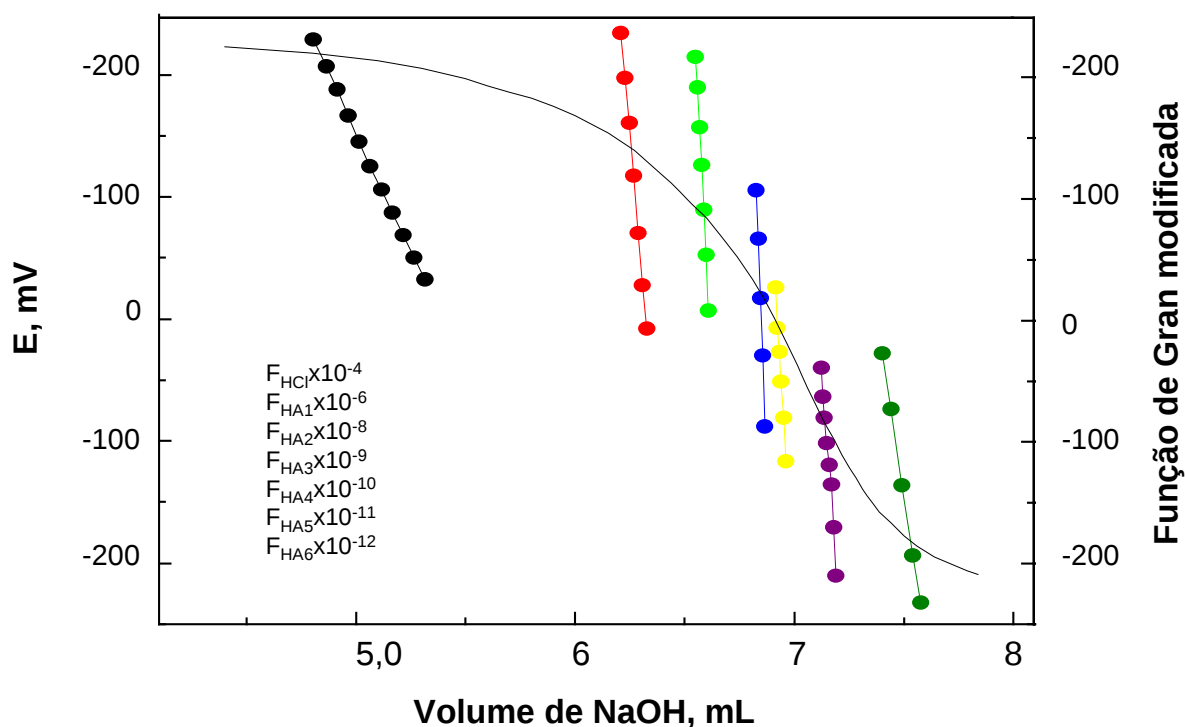
A heterogeneidade dos grupos funcionais em função do tamanho molecular sugere diferentes mecanismos de complexação de íons metálicos às frações húmicas. Em recente trabalho ROCHA *et al.* (2000) utilizando SHA extraída do Rio Itapanhaú, localizado no Parque Estadual da Serra do Mar, relataram diferentes distribuições de íons metálicos (Cd, Mn, Hg, Ni, Co e Cu) em função dos tamanhos moleculares das frações. A correlação dos resultados desse trabalho com os dados apresentados por ROCHA *et al.* (1999) utilizando SHA extraída do Rio Negro-AM, mostra que o mesmo metal apresenta diferente distribuição em função dos tamanhos moleculares em amostras de origens diferentes.



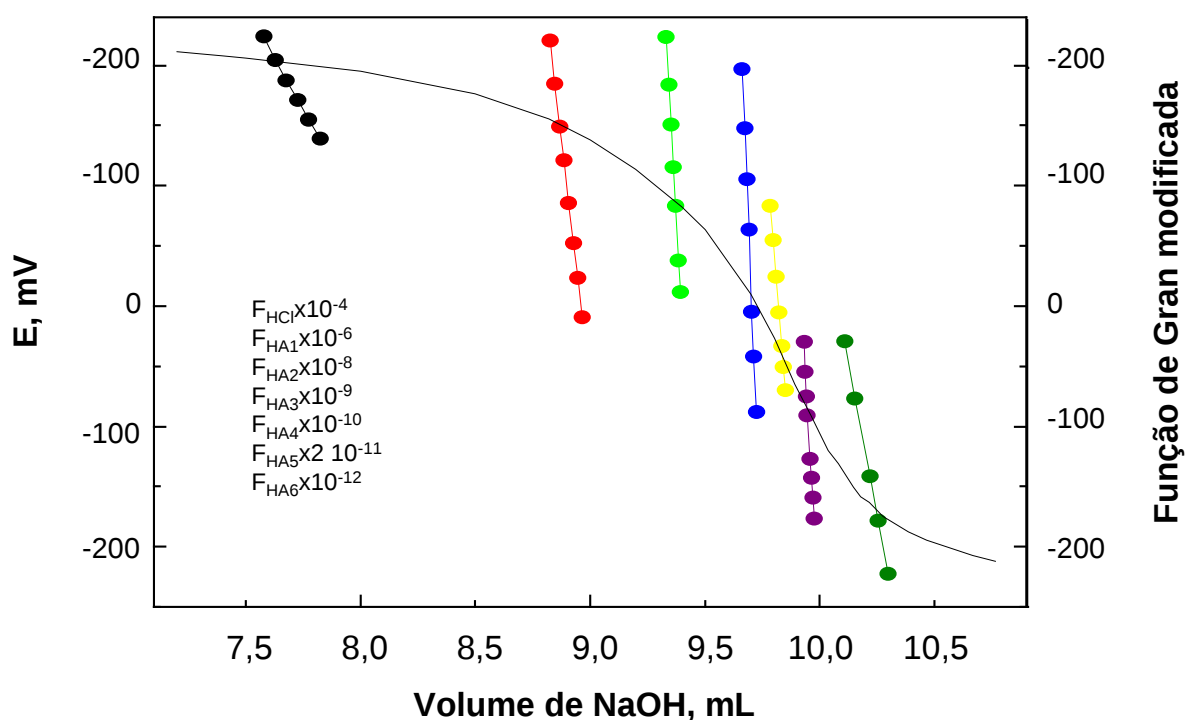
**Figura 29** – Diagrama de blocos mostrando o fluxograma dos cálculos das funções de Gran modificadas.



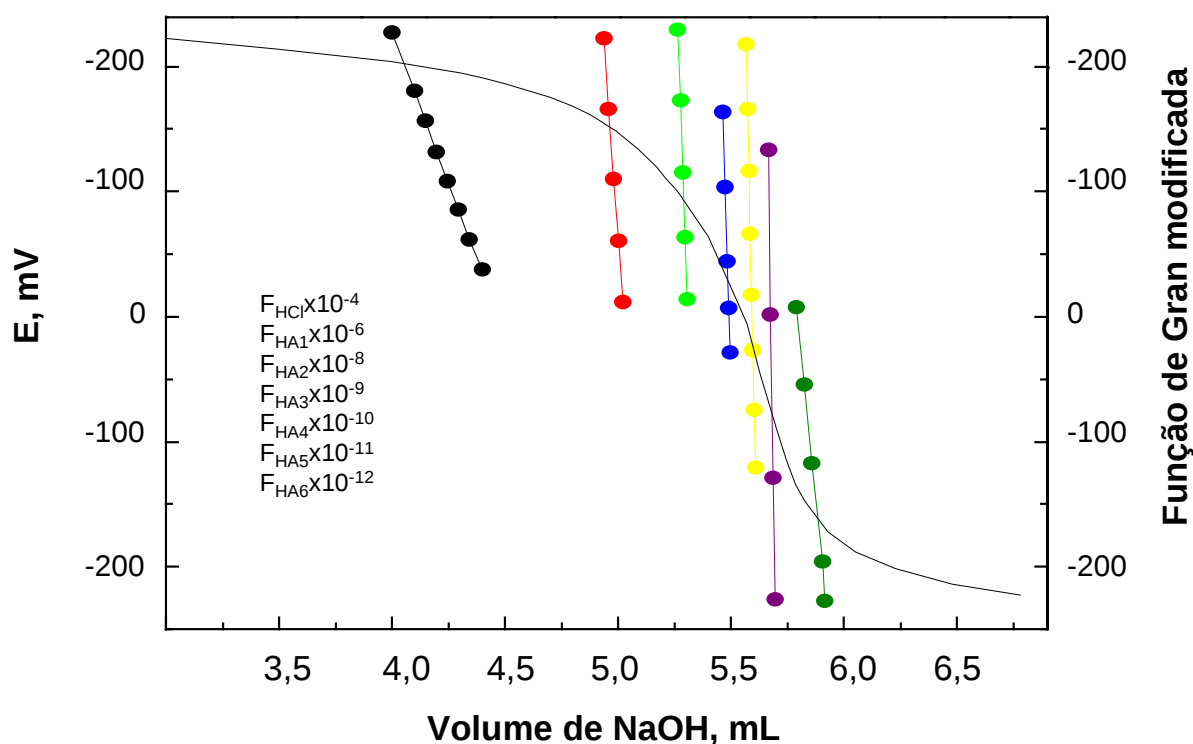
**Figura 30** – Curva de titulação potenciométrica e função linear da titulação da fração húmica  $F_1$  (> 100 KDa). Condições: 20 mL de solução 203,6 mg C L<sup>-1</sup>; NaOH 0,132 mol L<sup>-1</sup>; força iônica 0,1 mol L<sup>-1</sup>; atmosfera de nitrogênio e agitação magnética a 25 °C



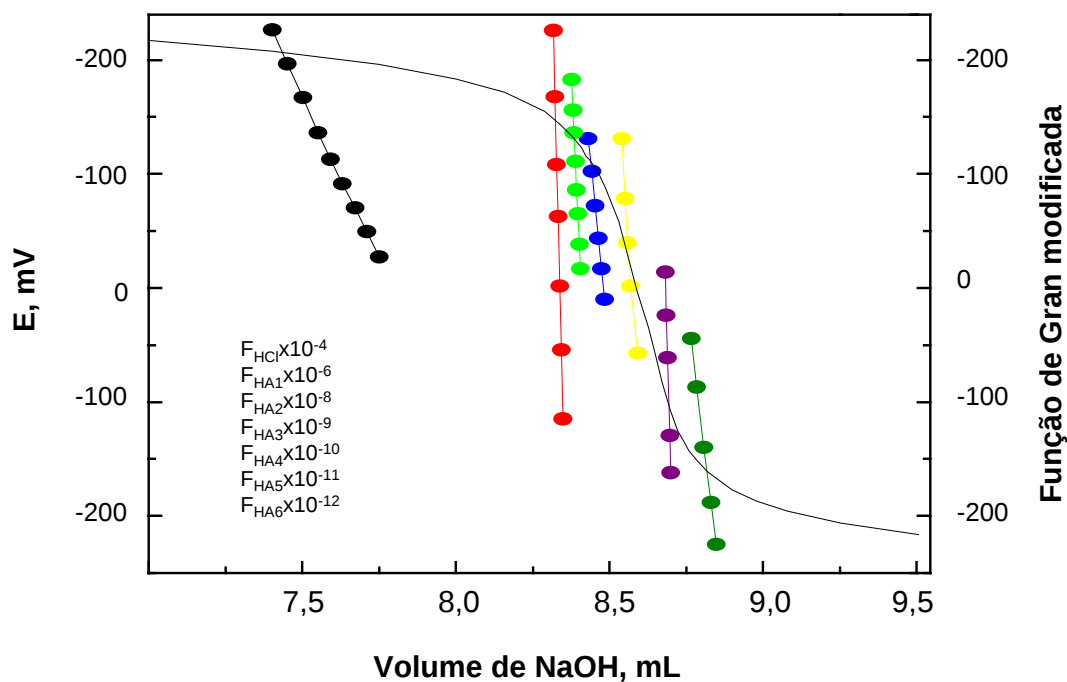
**Figura 31** – Curva de titulação potenciométrica e função linear da titulação da fração húmica  $F_2$  (50-100 kDa). Condições: 20 mL de solução 190,15 mg C L<sup>-1</sup>; NaOH 0,132 mol L<sup>-1</sup>; força iônica 0,1 mol L<sup>-1</sup>; atmosfera de nitrogênio e agitação magnética a 25 °C



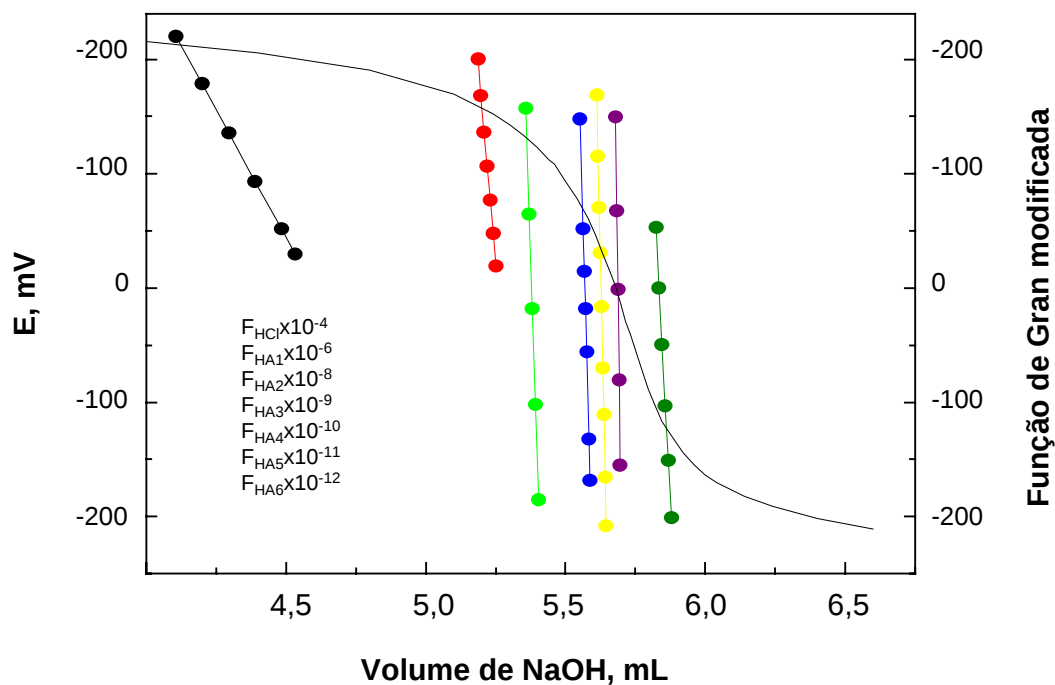
**Figura 32** – Curva de titulação potenciométrica e função linear da titulação da fração húmica F<sub>3</sub> (30-50 kDa). Condições: 20 mL de solução 181,75 mg C L<sup>-1</sup>; NaOH 0,132 mol L<sup>-1</sup>; força iônica 0,1 mol L<sup>-1</sup>; atmosfera de nitrogênio e agitação magnética a 25 °C



**Figura 33** – Curva de titulação potenciométrica e função linear da titulação da fração húmica F<sub>4</sub> (10-30 kDa). Condições: 20 mL de solução 101,45 mg C L<sup>-1</sup>; NaOH 0,132 mol L<sup>-1</sup>; força iônica 0,1 mol L<sup>-1</sup>; atmosfera de nitrogênio e agitação magnética a 25 °C



**Figura 34** – Curva de titulação potenciométrica e função linear da titulação da fração húmica  $F_5$  (5-305 kDa). Condições: 20 mL de solução 71,50 mg C L<sup>-1</sup>; NaOH 0,132 mol L<sup>-1</sup>; força iônica 0,1 mol L<sup>-1</sup>; atmosfera de nitrogênio e agitação magnética a 25 °C



**Figura 35** – Curva de titulação potenciométrica e função linear da titulação da fração húmica  $F_6$  (< 5 kDa). Condições: 20 mL de solução 89,35 mg C L<sup>-1</sup>; NaOH 0,132 mol L<sup>-1</sup>; força iônica 0,1 mol L<sup>-1</sup>; atmosfera de nitrogênio e agitação magnética a 25 °C

**Tabela 07** - Resultados obtidos na titulação potenciométrica das frações húmicas com diferentes tamanhos moleculares obtidas por ultrafiltração de substâncias húmicas aquáticas extraídas do Rio Negro-AM.

| Fração húmica                            | pKa  | meq g <sup>-1</sup> C | Grupos característicos           | % Grupos |
|------------------------------------------|------|-----------------------|----------------------------------|----------|
| <b>F<sub>1</sub></b><br>(> 100 kDalton)  | 2,82 | 1,169 ± 0,017         | Carboxílicos                     | 16,3     |
|                                          | 4,55 | 1,550 ± 0,034         |                                  | 21,5     |
|                                          | 5,55 | 1,239 ± 0,028         |                                  | 17,2     |
|                                          | 6,88 | 0,794 ± 0,014         | Aminas secundárias ou terciárias | 11,0     |
|                                          | 8,82 | 0,529 ± 0,013         |                                  | 7,4      |
|                                          | 9,76 | 1,912 ± 0,038         | Fenólicos                        | 26,6     |
| <b>F<sub>2</sub></b><br>(100-50 kDalton) | 2,79 | 1,192 ± 0,018         | Carboxílicos                     | 14,5     |
|                                          | 4,45 | 1,517 ± 0,027         |                                  | 18,4     |
|                                          | 5,35 | 1,264 ± 0,020         |                                  | 15,4     |
|                                          | 6,97 | 1,049 ± 0,023         | Aminas secundárias ou terciárias | 12,7     |
|                                          | 8,95 | 0,566 ± 0,014         |                                  | 6,9      |
|                                          | 9,67 | 2,640 ± 0,041         | Fenólicos                        | 32,1     |
| <b>F<sub>3</sub></b><br>(50-30 kDalton)  | 2,78 | 1,406 ± 0,015         | Carboxílicos                     | 17,1     |
|                                          | 4,41 | 1,670 ± 0,025         |                                  | 20,2     |
|                                          | 5,38 | 1,485 ± 0,034         |                                  | 18,0     |
|                                          | 6,91 | 0,844 ± 0,020         | Aminas secundárias ou terciárias | 10,2     |
|                                          | 8,84 | 0,669 ± 0,013         |                                  | 8,1      |
|                                          | 9,82 | 2,182 ± 0,033         | Fenólicos                        | 26,4     |
| <b>F<sub>4</sub></b><br>(30-10 kDalton)  | 2,79 | 1,884 ± 0,023         | Carboxílicos                     | 21,3     |
|                                          | 4,43 | 1,668 ± 0,032         |                                  | 18,9     |
|                                          | 5,41 | 1,783 ± 0,037         |                                  | 20,2     |
|                                          | 7,10 | 0,667 ± 0,015         | Aminas secundárias ou terciárias | 8,3      |
|                                          | 8,65 | 0,551 ± 0,013         |                                  | 5,8      |
|                                          | 9,73 | 2,312 ± 0,024         | Fenólicos                        | 25,5     |
| <b>F<sub>5</sub></b><br>(10-5 kDalton)   | 2,83 | 2,084 ± 0,036         | Carboxílicos                     | 22,7     |
|                                          | 4,55 | 1,079 ± 0,021         |                                  | 11,7     |
|                                          | 5,45 | 1,308 ± 0,028         |                                  | 14,2     |
|                                          | 6,97 | 1,260 ± 0,029         | Aminas secundárias ou terciárias | 13,7     |
|                                          | 8,68 | 0,431 ± 0,009         |                                  | 4,7      |
|                                          | 9,93 | 3,033 ± 0,035         | Fenólicos                        | 33,0     |
| <b>F<sub>6</sub></b><br>(<5 kDalton)     | 2,80 | 2,431 ± 0,044         | Carboxílicos                     | 28,4     |
|                                          | 4,43 | 1,470 ± 0,027         |                                  | 17,1     |
|                                          | 5,50 | 1,228 ± 0,027         |                                  | 14,3     |
|                                          | 6,91 | 0,812 ± 0,019         | Aminas secundárias ou terciárias | 9,5      |
|                                          | 8,81 | 0,598 ± 0,013         |                                  | 7        |
|                                          | 9,87 | 2,035 ± 0,019         | Fenólicos                        | 23,7     |

## 5.8 - Redução de mercúrio iônico por frações húmicas

A Figura 36 mostra a quantidade de mercúrio reduzido na presença de diferentes frações húmicas ajustadas para 368  $\mu\text{g}$  de carbono, equivalente a 1 mg de substância húmica aquática, em pH 5,0. As frações  $F_2$  e  $F_5$  mostraram elevadas capacidades de redução de  $\text{Hg(II)}$ , possibilitando a redução de aproximadamente 34% dos íons mercúrio adicionados. Entretanto a fração  $F_6$  reduziu apenas 7% do  $\text{Hg(II)}$  e as frações  $F_1$ ,  $F_3$  e  $F_4$  de 17-25% dos íons mercúrio adicionados. De acordo com a distribuição das frações de SHA, com diferentes tamanhos moleculares (Figura 27), as frações  $F_2$  e  $F_5$  correspondem a cerca de 33 % do carbono das substâncias húmicas aquáticas. Portanto, pode-se inferir que as propriedades redutoras das substâncias húmicas aquáticas estão diretamente relacionadas com as frações húmicas com tamanho molecular de 50-100 kDa ( $F_2$ ) e 1-5 kDa ( $F_5$ ). Estes valores de capacidade de redução de mercúrio(II) estão de acordo com os dados apresentados na Figura 22, onde independente da massa de  $\text{Hg(II)}$  adicionado, após 24 horas de reação em pH 5, apenas 36% do  $\text{Hg(II)}$  é reduzido pelas substâncias húmicas aquáticas.

O processo de redução de  $\text{Hg(II)}$  por frações das SHA é fortemente influenciado pelo tempo de reação durante as 24 horas iniciais. As Figuras 37 e 38 mostra que todas as frações apresentam o mesmo mecanismo de redução de mercúrio(II) composto por duas etapas, apresentando reações de primeira ordem em relação aos íons mercúrio(II) de  $0,002 \text{ min}^{-1}$ . Este valor está de acordo com os dados da Figura 24, a qual indica o mesmo mecanismo de redução de mercúrio(II) por substâncias húmicas aquáticas, possibilitando inferir que o processo de fracionamento por ultrafiltração não altera a matriz ambiental com relação às propriedades redutoras.

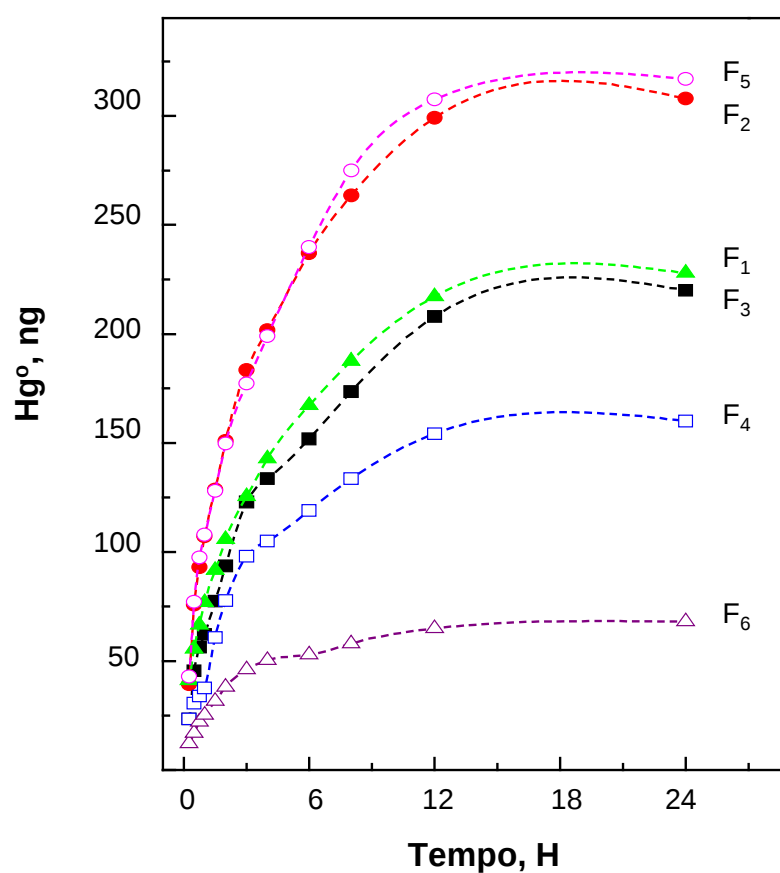
Durante a etapa I ocorre a redução de 50-55 % da quantidade de íons mercúrio reduzíveis, enquanto que o restantes são reduzidos na etapa II. Portanto as frações húmicas apresentam o mesmo processo de redução independentemente do tamanho molecular e da heterogeneidade da composição de grupos funcionais carboxílicos e fenólicos apresentada na Tabela 07.

BURBA *et al.* (1994) relata que as interações de íons metálicos com substâncias húmicas são geralmente controladas por fatores termodinâmicos e cinéticos, não podendo ser descritas utilizando constantes de estabilidade convencionais. A análise das equações das retas das frações húmicas ( $F_1$  a  $F_6$ ) apresentadas na figura 38 impossibilitam a determinação das constantes de velocidade e tempo de meia vida da cinética de redução de mercúrio(II) pelas frações húmicas, respectivamente. Possivelmente este fato está associado a influência de fatores termodinâmicos no processo de complexação e redução de mercúrio(II) pelas frações húmicas nas 3 horas iniciais.

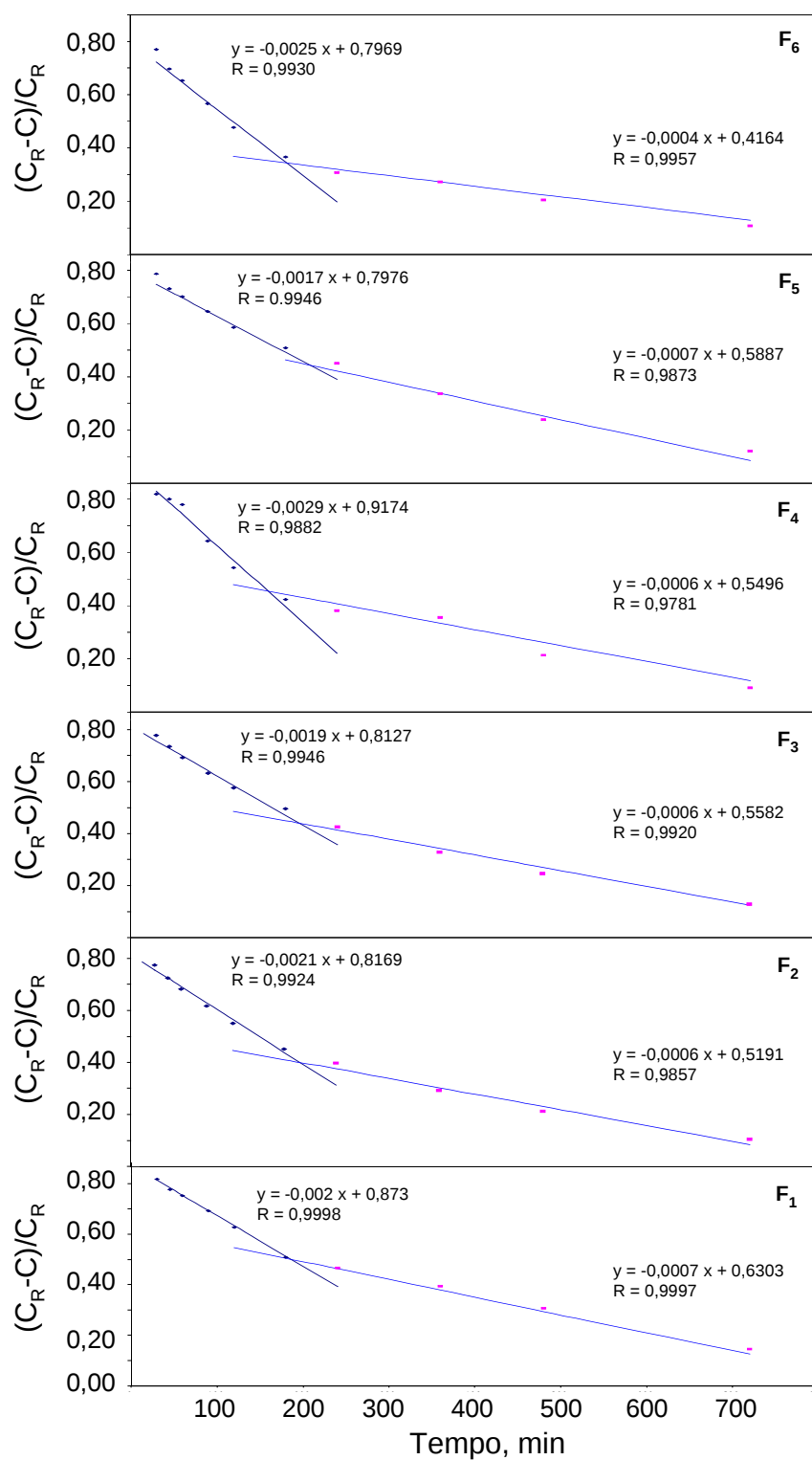
A Figura 40 mostra que a quantidade de mercúrio reduzido na presença das frações húmicas é fortemente influenciada pela razão dos grupos fenólicos/carboxílicos (calculada a partir dos dados da Tabela 09) e pela concentração de enxofre, indicando um complexo equilíbrio entre os processos de complexação e redução de íons mercúrio por substâncias húmicas aquáticas. As frações húmicas  $F_3$  e  $F_4$  contêm quantidades similares de grupos fenólicos, entretanto a fração  $F_4$  contém 10% a mais de grupos carboxílicos quando comparado a  $F_3$ . Este fato, diminui em 30% a quantidade de mercúrio(II) reduzido pela fração húmica  $F_4$ , evidenciando a competição entre os processos de complexação e redução.

ALLARD *et al.* (1991) sugeriram que os íons mercúrio(II) são complexados e posteriormente reduzidos pela transferência intramolecular de elétrons dos grupos quinonas para os íons Hg(II). ROCHA *et al.* (2000) utilizando espectroscopia na região do infravermelho relataram que aparentemente os íons mercúrio(II) são preferencialmente complexados por troca iônica com os hidrogênios dos grupos carboxílicos. HELBURN & MacCARTHY (1994) relataram similares propriedades redox do ácido húmico com uma mistura sintética de diferentes grupos fenólicos e propuseram essa mistura como modelo para substância húmicas.

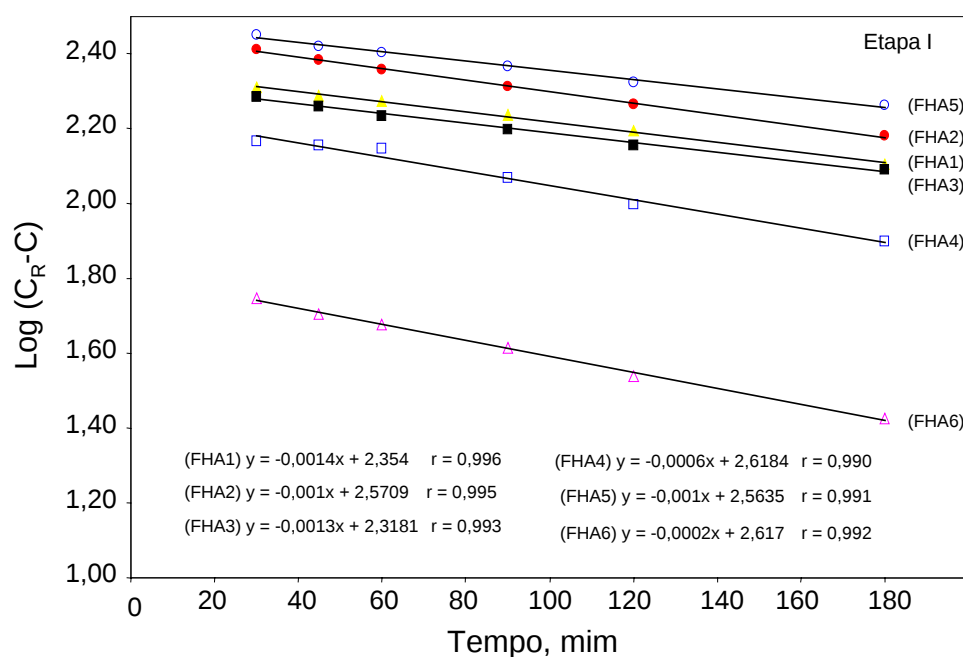
Portanto, de acordo com a Figura 39, o aumento da quantidade de grupos fenólicos em relação aos grupos carboxílicos infere às frações das SHA a seguinte ordem crescente de eficiência de redução de Hg(II):  $F_6 < F_4 < F_1; F_3 < F_5, F_2$ , evidenciando que as propriedades redutoras das substâncias húmicas aquáticas estão diretamente relacionados com os grupos fenólicos constituintes da macromolécula húmica. MATTHIESSEN (1996) em estudos cinéticos de redução de íons mercúrio por substâncias húmicas, relatou uma diferença distinta entre o modelo aplicado a substâncias húmicas sintéticas e a substâncias húmicas naturais, devido à heterogeneidade dos grupos funcionais e à presença de enxofre. PICCOLO & STEVENSON (1982) utilizando estudos espectroscópicos sugeriram que outros grupos funcionais contendo oxigênio, além de COOH, participam da ligação entre substâncias húmicas e íons mercúrio. A Figura 39 mostra que o aumento de concentração de enxofre e a diminuição da razão dos grupos fenólicos/carboxílicos, ou seja, o aumento da concentração de grupos carboxílicos na estrutura da macromolécula húmica, aparentemente favorece o processos de complexação dos íon mercúrio e, conseqüentemente causa a diminuição da capacidade de redução de Hg(II) por SHA.



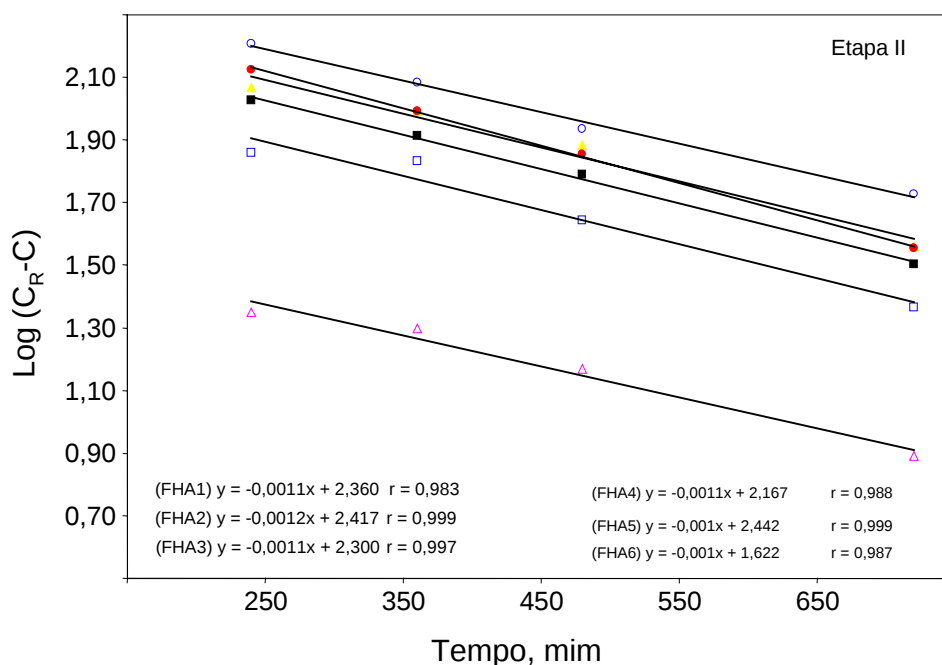
**Figura 36** – Quantidade de íons mercúrio reduzido pelas frações de substâncias húmicas aquáticas extraídas do Rio Negro-AM (F<sub>1</sub>: > 100 kDa; F<sub>2</sub>: 50-100 kDa; F<sub>3</sub>: 30-50 kDa; F<sub>4</sub>: 10-30 kDa; F<sub>5</sub>: 5-10 kDa e F<sub>6</sub>: < 5 kDa). Condições: frações húmicas: 368 µg de carbono, Hg(II): 1,0 µg e pH 5,0.



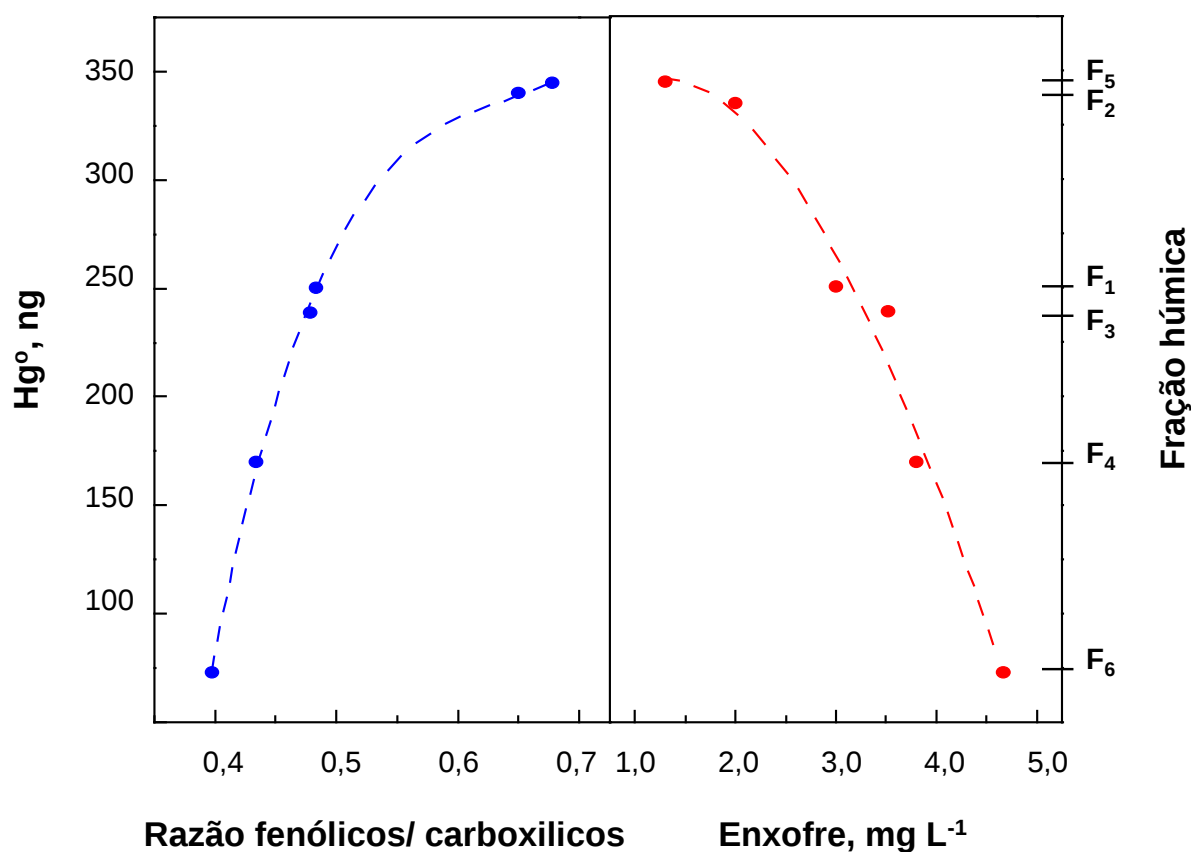
**Figura 37** – Mecanismo de redução de mercúrio(II) pelas frações de substâncias húmicas aquáticas extraídas do Rio Negro-AM. Condições: frações húmicas: 368 µg de carbono, Hg(II): 1,0 µg e pH 5,0.



**Figura 38** – Cinética de redução dos íons mercúrio(II) pelas frações de substâncias húmicas aquáticas extraídas do Rio Negro-AM (Etapa I). Condições: frações húmicas: 368  $\mu\text{g}$  de carbono,  $\text{Hg(II)}$ : 1,0  $\mu\text{g}$  e pH 5,0.



**Figura 39** – Cinética de redução dos íons mercúrio(II) pelas frações de substâncias húmicas aquáticas extraídas do Rio Negro-AM (Etapa II). Condições: frações húmicas: 368  $\mu\text{g}$  de carbono,  $\text{Hg(II)}$ : 1,0  $\mu\text{g}$  e pH 5,0.



**Figura 40** – Influências da razão dos grupos fenólicos/carboxílicos e concentração de enxofre na quantidade de íons mercúrio reduzido pelas frações de substâncias húmicas aquáticas extraídas do Rio Negro-AM (F<sub>1</sub>: > 100 kDa; F<sub>2</sub>: 50-100 kDa; F<sub>3</sub>: 10-50 kDa; F<sub>4</sub>: 5-10 kDa; F<sub>5</sub>: 1-5 kDa e F<sub>6</sub>: < 1 kDa). Condições: frações húmicas: 368 µg de carbono, Hg(II): 1,0 µg e pH 5,0.

## 6 – CONCLUSÕES

## 6 - Conclusões

- Os sistemas desenvolvidos para análise por injeção em fluxo acoplado à espectrometria de absorção atômica com geração de vapor de mercúrio a frio apresentaram elevada sensibilidade para determinação de traço de mercúrio em amostras de interesse agro-industrial e ambientais.
- A eficiência da redução de Hg(II) por SHA é fortemente influenciada pelo valor do pH do meio, concentração de SHA. Entretanto independe da razão Hg(II)/SHA.
- A cinética de redução de Hg(II) por SHA apresenta mecanismo de primeira ordem com constante de velocidade de aproximadamente  $0,002 \text{ min}^{-1}$ .
- O processo de redução de Hg(II) pelas frações húmicas com diferentes tamanhos moleculares ocorre em duas etapas, apresentando reações de primeira ordem em relação aos íons mercúrio(II) de  $0,002 \text{ min}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 60 \text{ min}$ ) e  $0,0006 \text{ min}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 450 \text{ min}$ ), respectivamente.
- O fracionamento por ultrafiltração não altera a matriz ambiental com relação ao processo de redução de mercúrio(II) por substâncias húmicas aquáticas.
- A de redução de mercúrio(II) é fortemente influenciada pela razão dos grupos fenólicos/carboxílicos e pela concentração de enxofre na estrutura da macromolécula húmica, indicando um complexo equilíbrio entre os processos de complexação e redução de íons mercúrio por SHA.
- Os resultados evidenciam que as propriedades redutoras das substâncias húmicas aquáticas estão diretamente relacionadas com os grupos fenólicos constituintes da macromolécula húmica.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## Referências bibliográficas

ABBT-BRAUN, G. Spectroscopic characterization of humic substances in ultraviolet and visible region and by infrared spectroscopy. In: MATTHESS, G.; FRIMMEL, F.H.; HIRSCH, P.; SCHULS, H.D.; USDOWSKI, E. (Eds) [Progress in hidrogeochemistry. Springer-Verlag](#), 1992, p. 29-35.

AIKEN, G.R., THURMAN, E.M., MALCON, R.L. WALTON, H.F. Comparison of XAD macroporous resins for the concentration of fulvic acid from aqueous solution. [Anal. Chem.](#), v. 51, p. 1799-1803, 1979.

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

AIKEN, G.R. Isolation and concentration techniques for aquatic humic substances. In: AIKEN, G.R.; MCKNIGHT, D.M.; WERSHAW, R.L.; MACCARTHY, P. (Eds). [Humic substances in soil, sediment and water - Geochemistry, isolation and characterization](#). John Wiley & Sons, New York, (1985), p. 363-385.

ALBERTS, J.J.; SCHINDLER, J.E.; MILLER, R.W.; NUTTER Jr., D.E. Elemental mercury evolution mediated by humic acid. [Science](#), v. 184, p. 895-897, 1974.

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. [Anal. Chim. Acta](#), v. 257, p. 35-39, 1992.

ALEIXO, L.M. & GODINHO, O.E.S. Discussão sobre o uso de funções de Gran modificadas em titulações potenciométricas ácido-base. Aplicação à titulação da mistura de ácidos clorídrico e cítrico com base forte. [Química Nova](#), v. 10, p. 83-90, 1987.

ANDRADE, J.C.; PASQUINI, C.; BACCAN, N.; VAN LOON, J.C. Cold vapor atomic absorption determination of mercury by flow injection analysis using a Teflon membrane phase separator coupled to the absorption cell. [Spectrochimica Acta](#), v. 38B, p. 1329-1338, 1983.

ALLARD, B. & ARSENIE, I. Abiotic reduction of mercury by humic substances in aquatic system - important process for the mercury cycle. [Water Air Soil Pollut](#), v. 56, p. 457-464, 1991.

ALLOWAY, B.J. [Heavy metal in soils](#). John Wiley & Sons, New York, (1993), p. 1-6.

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

BAILEY, B.W. & LO, F.C. Automated method for determination of mercury. [Anal. Chem.](#), v. 43, p. 1525-1526, 1971.

BARROS, M.C.P.; PAULA, J.R.; RESENDE, M.O.O. Caracterização físico-química do ácido húmico de solo da ilha de Cananéia e de sua interação com Fe(III), Cu(II) e Cd(II). [Quím. Nova](#), v. 17, p. 376-380, 1994.

BATLEY, E.G.; LOW, G.K.C. In: BATLEY, E.G. (Ed.) [Trace element speciation: analytical methods and problems](#). Boca Raton: CRC Press, (1989), p. 210.

BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E.A.G.; KRUG, F.J.; REIS, B.F. Merginz in flow injection analysis Part. 1 - Double proportional injector and reagent consumption. [Anal. Chim. Acta](#), v. 101, p. 17-23, 1978.

BERNHARD, M. (Ed). [The importance of chemical "speciation" in environmental process](#). Springer-Verlag, Berlin, (1986), p. 761.

BUFFLE, J. [Complexation reactions in aquatic systems : an analytical approach](#). Ellis Horwood, New York, (1990), p. 65-72, 90-95, 174-175 e 195-200.

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

BURBA, P.; ROCHA, J.C.; SCHULTE, A. Cellulose TETPA: A chelating collector designed for multielement preconcentration in flow systems. [Fresenius J. Anal. Chem.](#), v. 346, p. 414-419, 1993.

BURBA, P., ROCHA, J.C., KLOCKOW, D. Labile complexes of trace metals in aquatic humic substances : Investigations by means of an ion exchange-based flow procedure. [Fresenius J. Anal. Chem.](#), v. 349, p. 800-807, 1994.

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

CABANISS, S.E. Carboxylic acid content of a fulvic acid determined by potentiometry and aqueous Fourier transform infrared spectrometry. [Anal. Chim. Acta](#), v. 255, p. 23-30, 1991

CALATAYUD, J.M. & MATEO, J.V.C. Bed reactors for use in unsegmented continuous-flow methodologies- analysis of inorganic species. [Chem. Anal. Warsaw](#), v.23, p. 1-24, 1993.

CAMPANELLA, L.; PETRONIO, B.M.; BRAGUGLIA, C. Study of humic fraction from water of Antarctic lake. [International Journal Analytical Chemistry](#), v. 60, p. 49-60, 1994.

CHOUDHRY, G.G. Interactions of humic substances with environmental chemical. In: AWTZINGER, O. (Ed) [The handbook of environmental chemistry](#). Springer-Verlag, Berlin, (1982), pt. B, p. 103-127.

CRAIG, P.J. (Ed) [Organometallic compounds in the environment-principles and reactions](#). Jhon Wiley & Sons, New York, (1986), p.72.

DANIELSSON, L.G. On the use of filters for distinguishing between dissolved and particulate fractions in natural waters. [Water Res.](#), v. 16, p. 179-182, 1982.

DEDINA, J.; TSALEV, D.L. Hydride generation atomic absorption spectrometry. In: WINEFORDNER, J.D.; KOLTHOFF, I.M. (Eds) [Chemical Analysis A series of monographs on analytical chemistry and its application](#). John Wiley & Sons, New York, (1995), v. 130, p. 3-115.

DRESSLER, V.L.; POZEBON, D.; CURTIUS, A.J. Determination of heavy metals by inductively coupled plasma mass spectrometry after on-line separation and preconcentration. [Spectrochim Acta Part B](#), p. 1527-1539, 1998.

EBINGHAUS, R. & WILKEN, R.D. Transformations of mercury species in the presence of Elbe river bacteria. [J. Appl. Organom. Chem.](#), v. 7, p. 127-135, 1993.

[ENCYCLOPEDIA OF ANALYTICAL](#). Academic Press, London, (1995), p. 2017-2027.

EPHRAIM, J.H.; PETTERSSON, C.; ALLSRD, B. Correlations between acidity and molecular size distributions of an aquatic fulvic acid [Environ. Intern.](#), v. 22, p. 475-483, 1996.

ERTEL, J.R.; HEDGES, J.I.; DEVOL, A.H.; RICHEY, J.E. Dissolved humic substances of the Amazon River system. [Limnol. Oceanogr.](#), v. 31 (4), p. 739-754, 1986.

FATIBELLO FILHO, O.; NÓBREGA, J.A.; SANTOS, A.J.M.G. Flow injection potentiometric determination of saccharin in dietary products with filtration unit. [Talanta](#), v. 41, p. 731-734, 1994.

FELDMAN, C. Preservation of dilute mercury solutions. [Anal. Chem.](#), v. 97, p. 99-102, 1974.

FORSTNER, U. & WITTNANN, G.T.W. [Metal pollution in the aquatic environment](#). Springer-Verlag, Berlin, (1981), p. 152.

FRIMMEL, F.H. Polar organic substances and their role in the water - saturated and - unsaturated zones. In: MATTHESS, G.; FRIMMEL, F.; HIRSCH, P.; SCHULZ, H.D. and USDOWSKI, H.E. (Eds) [Progress in hydrogeochemistry](#). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, (1992), p. 7-8.

GAFFNEY, J.S.; MARLEY, N.A.; CLARK, S.B. Humic and fulvic acids and organic colloidal materials in the environmental. In: GAFFNEY, J.S.; MARLEY, N.A.; CLARK, S.B. (Eds) [Humic and fulvic acids: isolation, structure, and environmental role](#). ACS, Washington - DC, (1996), v. 651, p. 2-16.

GECKELER, K.E.; BAYER, E.; SHKINEV, V.M.; GOMOLITSKII, N.N.; SPIVAKOV, B.Ya. A new tangencial flow filtration cell for analytical concentration and separation. [International Labmate](#), v. 47, p. 17, 1992.

GHOSH, K. & SCHNITZER, M. Macromolecular structures of humic substances. [Soil Science](#), v. 129, p. 266-276, 1980.

GOMEZ, M.J.; MARTÍ, I.; DONOSO, L. Acid-base properties of aquatic humic substances isolated from unpolluted tropical black water rivers. [Fresenius J. Anal. Chem.](#), v. 339, p. 664-668, 1991.

GOMES NETO, J.A.; ZARA, L.F.; SANTOS, A.; ROCHA, J.C.; CARDOSO, A.A. Reversible intermittent flow-injection determination of mercury in sediments and vinasses by cold vapor atomic absorption spectrometry. [Lab Robotics and Automation](#), v. 11, p. 304-310, 1999.

GOMES NETO, J. A.; ZARA, L.F.; SANTOS, A.; ROCHA, J.C.; NÓBREGA, J.A.; Determination of mercury in agroindustrial samples by flow-injection cold vapor atomic absorption spectrometry using ion exchange and reductive elution. [Talanta](#), v. 51, p. 587-594, 2000.

GOMES NETO, J.A.; BERGAMIN FILHO, H.; SARTINI, R.P.; ZAGATTO, E.A.G. Determination of cadmium in foodstuffs and plant materials by flow injection - spectrophotometry including ion exchange. [Anal. Chim. Acta](#), v. 306, p. 343-349, 1995.

GOMES NETO, J.A.; NOGUEIRA, A.R.A.; BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E.A.G. Multi- site detection in flow analysis. Part. 3 - Periodate tubular electrode with low inner volume as a relocatable detector. [Anal. Chim. Acta](#), v. 285, p. 293-299, 1994.

HAIDER, K.; SPITELLER, M.; REICHERT, K.; FILD, M. Derivatization of humic compounds: an analytical approach for bound organic residues. [Intern. J. Environ. Anal. Chem.](#), v. 46, p. 201-211, 1991.

HANISCH, C. Where is mercury deposition coming from? [Environ. Sci. Technol](#), v. 32, p. 176A-179A, 1998.

HARSÁNY, E.; PÓLOS, L.; PUNGOR, E. Enhancement of sensitivity for determination of mercury in waters [Anal. Chim. Acta](#), v. 67, p. 229-233, 1973.

HATCH, W.R.; OTT, W.L. Determination of sub-microgram quantities of mercury by atomic absorption spectrophotometry. [Anal. Chem.](#), v. 40, p. 2085-2087, 1968.

HAYES, M.H.B. & SWIFT, R.S. The chemistry of soil organic colloids. In: GREENLAND, D.J.; HAYES, M.H.B. (Eds) [The chemistry of soil constituents](#). John Wiley & Sons, New York, (1978), p. 179-230.

HEINTZE, S.G. & MANN, P.J.G. Divalent manganese in soil extracts. [Nature](#), v. 158, p. 791-792, 1946

HELBURN, R.S.; MacCARTHY, P. Determination of some redox properties of humic acid by alkaline ferricyanide titration. [Anal. Chim. Acta](#), v. 295, 263-272, 1994.

IVANISSEVICH, A. Três cores para os rios amazônicos. [Ciência Hoje \(SBPC\)](#), v. 11, p. 47, 1990.

FADINI, P.S.; JARDIM, W.F. Is the Negro River Basin (Amazon) impacted by naturally occurring mercury? [The Sci. Total Environment](#), v. 275, p. 71-82, 2001.

JARDIM, W.F.; GIMENEZ, S.M.N.; CANELA, M.C.; MORAES, S.G. Acute toxicity of  $\text{Hg}^0$  and  $\text{Hg}^{+2}$  ions to Escherichia-coli. [Chem. Speciat. Bioavailab.](#) v. 5:(3), p. 97-100, 1993.

KILDUFF, J. & WELBER, W.J. Transport and separation of organic macromolecules in ultrafiltration processes. [Envir. Sci. Technol.](#), v. 26, p. 569-577, 1992.

KOLTHOFF, I.M. & CHANTOON, M.K. Effect of water on dissociation and dissociation constant of picric acid in acetonitrile. [J. Amer. Chem. Soc.](#), v. 91, p. 6907, 1969

KRUG, F.J.; BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E.A.G. Commutation in flow injection analysis. [Anal. Chim. Acta](#), v. 179, p. 103-118, 1986.

KUCKUK, R.; BURBA, P.; DAVIES, A.N. Pyrolysis-GC-FTIR for structural elucidation of aquatic humic substances. [Fresenius J. Anal. Chem.](#), v. 350, p. 528-532, 1994.

LAKATOS, B.; TIBAI, T.; MEISEL, J. EPR spectra of humic acids and their metal complexes. [Geoderma](#), v.19, p. 319-338, 1977.

LARA, R.J.; & THOMAS, D.N. Isolation of marine dissolved organic matter: evolution of sequential combinations on XAD resins 2,4 and 7. [Anal. Chem.](#), v. 66, p. 2417-2421, 1994.

LIMAVERDE FILHO, A.M. & CAMPOS, R.C. Redução seletiva aplicada à especiação de mercúrio em peixes: uma adaptação do método de Magos. [Química Nova](#), v. 22, p. 477-482, 1999.

MALCOLM, R.L. & THURMAN, E.M. Preparative isolation of aquatic humic substances. [Environ. Sci. Technol.](#), v. 15, p. 463-466, 1981.

MALM, O., PFEIFFER, W.C., SOUZA, C.M.M., REUTHER, R. Mercury pollution due to gold mining in the Madeira river basin, Brazil. [Ambio](#), v. 19, p. 11-15, 1990.

MALM, O.; PFEIFFER, W.C.; BASTOS, W.R.; SOUZA, C.M.M. Utilização de acessório de geração de vapor frio para análise de mercúrio em investigações ambientais por espectrometria de absorção atômica. [Ciência e Cultura](#), v. 41, p. 89-92, 1989.

MARTIN, R.B. Bioinorganic chemistry of metal ion toxicity. In: SIGEL, H. [Metal ions in biological in systems](#). Marcel Dekker, New York, (1980), v. 18, p. 21-65.

MARTIN-NETO, L.; VIEIRA, E.M. SPOSITO, G. Mechanism of atrazine sorption by humic acid: a spectroscopic study. [Environ. Sci. Technol.](#), v. 28, p. 1867-1873, 1994.

MASINI, J.C.; GODINHO, O.E.S.; ALEIXO, L.M. Determination of ionizable groups of proteins by potentiometric titration in concentrated solutions of guanidine hydrochloride. [Fresenius J. Anal. Chem.](#), v. 360, p. 104-111, 1998.

MATTHIESSEN, A. Determining the redox capacity of humic substances as a function of pH. [Von Wasser](#), v. 84, p. 229-235, 1995.

MATTHIESSEN, A. Kinetic aspects of the reduction of mercury ions by humic substances I. Experimental design. [Fresenius J. Anal. Chem.](#), v. 354, p. 747-749, 1996.

MATTHIESSEN, A. Reduction of divalent mercury by humic substances - kinetic and quantitative aspects. [Sci. Total Envir.](#), v. 213, p. 177-183, 1998

MAY, K., STOEPLER, M., REISINGER, K. Studies in the ratio total mercury/methylmercury in the aquatic food chain. [Toxicol. Environ. Chem.](#), v. 13, p.153-159, 1987.

MICARONI, R.C.C.M.; BUENO, M.I.M.S.; JARDIM, W.F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. [Química Nova](#), v. 23, p. 487-495, 2001

MOORE, J.W. & RAMAMOORTHY, S. [Heavy metals in natural water - Applied monitoring and Impact assessment](#). Sprig Verlag, New York, (1984), p. 125

NIEBOER, E. & RICHARDSON, H.S. Environ. Pollut. Ser. B, v.1, n. 3, 1980 apud SPOSITO, G. Distribution of potentially hazardous trace metals. In: SIGEL, H. [Metal ions in biological systems](#). Marcel Dekker, New York, (1986), v.18, p. 1-19.

PAXÉUS, N. & WEDBORG, M. Acid-base properties of aquatic fulvic-acid. [Anal. Chim. Acta](#), v. 169, p. 87-98, 1985.

PEHRSSON, L.; INGMAN, F.; JOHANSSON, A. Acid-base titrations by stepwise additions of equal volumes of titrant with special reference to automatic titrations .1. theory, discussion of gran functions, hofstee method and 2 proposed methods for calculating equivalence volumes. [Talanta](#), v. 23, p. 769-780, 1976.

PERDUE, E.M. Measurements of binding site concentrations in humic substances. In: KRAMER, J.R. & ALLEN, H.E. (Eds) [Metal speciation: theory, analysis and application](#). Lewis Publishers, Inc. Chelsea, USA, (1988), p. 135-154.

PEURAVUOI, J. & PIHLAJA, K. Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. [Anal. Chim. Acta](#), v. 337, p. 133-149, 1997.

PFEIPFER, W.C. Mercury Inputs into The Amazon Region, Brazil. [Environ. Technol. Letters.](#), vol. 9, p. 325-330, 1988.

PFEIPFER, W.C. & LACERDA, L.D. Mercury from gold mining in the Amazon environment - Na overview. [Química Nova](#), vol. 15, p. 155-160, 1992

PICCOLO, A. & STEVENSON, F.J. Infrared spectra of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  complexes of soil humic substances. [Geoderma](#), v. 27, p. 195-208, 1982.

PITOMBO, R.N.M. A liofilização como técnica de conservação de material de pesquisa. [Ciência e Cultura \(SBPC\)](#), v. 4, p. 427, 1989.

POLUEKTOV, N.S., VITKUN, R.A., ZELYUKOVA, V.YU. Determination of milligramma amounts of mercury by atomic absorption in the gaseous phase. [Zh. Anal. Khim.](#), v. 19, p. 937-942, 1964.

POMMER, A.M. Reduction of quinquevalent vanadium solutions by wood and lignite. [Geochim Cosmochim Acta](#), v. 13, p. 20-27, 1957.

REIS, B.F.; GINÉ, M.F.; SANTOS FILHA, M.M.; BACCAN, N. Preconcentration with anion exchange resin in a flow injection system to determine low levels of chloride ions in interior waters. [J. Braz. Chem. Soc.](#), v. 3, p. 80-85, 1992.

REIS, B.F.; JACINTO, A.O.; MORTATTI, J.; KRUG, F.J.; ZAGATTO, E.A.G.; BERGAMIN FILHO, H; PESSENDA, L.C.R. Zone - sampling processes in flow injection analysis. [Anal. Chim. Acta](#), v. 123, p. 221-228, 1992.

RILEY, J.P. & TAYLOR, D. The analytical concentration of traces of dissolved organic materials from seawater with Amberlite XAD-1. [Anal. Chim. Acta](#), v.46, p. 307-309, 1969.

RIMURA, Y. & MILLE, V.L. Mercury determination at the microgram level by a reduction - aeration method of concentration. [Anal. Chim. Acta](#), v. 27, p. 325-331, 1962.

ROCHA, J.C.; BURBA, P.; KLOCKOW, D. Mercúrio em substâncias húmicas aquáticas: investigação da reatividade através de resina trocadora iônica seletiva para Hg(II). I. Estudos prévios com procedimento em fluxo. [Ecl. Quím.](#), v. 18, p. 83-92, 1993.

ROCHA, J.C.; SANTOS, A. dos; SENE, J.J. Método modificado para determinação de mercúrio por espectrofotometria de absorção atômica sem chama. [Ecl. Quím.](#), v. 19, p. 119-127, 1994.

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

ROCHA, J.C.; SENE,J.J.; BURBA, P.; KLOCKOW, D. Interaction of mercury(II) with humic substances from the Rio Negro (Amazonas States, Brazil) by means of ion exchange procedure. [J. Braz. Chem. Soc.](#), v.9, p. 79-84, 1998.

ROCHA, J.C.; SARGENTINI JR, É.; TOSCANO, I.A.S.; ROSA, A.H.; BURBA, P. Multi-method study on aquatic humic substances the “Rio Negro” – Amazonas State, Brazil. Emphasis on molecular-size classification of their metal contents. [J. Braz. Chem. Soc.](#), v.10, p. 169-173, 1999.

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

ROCHA, J. C.; DE SENE, J. J.; SANTOS, A.; TOSCANO, I. A. S.; ZARA, L.F. Aquatic humus from an unpolluted Brazilian dark-brown stream: general characterization and size fraction of bound heavy metals. [J. Environmental Monitory](#) , v. 2, p. 39-44, 2000.

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 cicle in Brazil. [Talanta](#) , v. 53, p. 551-559, 2000.

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. In: [Symposium on Refractory Organic Substances In The Environment – ROSE II](#). p. 226, 2000.

ROCHA, J. C.; SARGENTINI Jr, É; ZARA, L. F.; ROSA, A. H.; SANTOS, A.; BURBA, P. Reduction of mercury(II) by fraction humic. [Talanta](#) , (submetido 2001).

ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; SARGENTINI Jr, É. A flow procedure for extraction and fractionation of humic substances from soils. In: SWIFT, R.S.; SPARK, K.M. (Eds) [Understanding and managing matter in soils, sediments and water](#). IHSS, (2001) p. 41-46.

RUZICKA, J. & HANSEN, E.H. [Flow Injection Analysis](#). John Wiley & Sons, New York, (1988).

SANTOS, T.C.R.; ROCHA, J.C.; BARCELÓ, D. Multiresidue analysis of rice pesticides by on-line solid phase extraction followed by LC-DAD. Influence of humic acids isolated from a brazilian estuary. Intern. [J. Environ. Anal. Chem.](#), v. 67, p. 1-10, 1998.

SANTOS, A.; ROCHA, J. C.; REZENDE, M. O. O.; ROSA, A.H.; ZARA, L. F. Substâncias húmicas extraídas de água e sedimento do reservatório de captação de água superficial Anhumas: Fracionamento com base no tamanho molecular e distribuição de espécies metálicas (Cr, Ni, Cu, Cd e Pb). [Revista Brasileira de Ciência do Solo](#) (submetido 2001).

SARGENTINI Jr, É. [Substância húmica aquática do rio Negro-AM: extração, caracterização, fracionamento e distribuição de metais](#). Araraquara-SP, Tese Doutorado - Instituto de Química de Araraquara - UNESP, 1999.

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. [Quím. Nova](#), v. 24, p. 339-344, 2001.

SCHLÜTER, K. Review: evaporation of mercury from soils. An integration and synthesis of current knowledge. [Environ. Geology](#), v. 39, p. 249-271, 2000.

SCHNITZER, M. Some observations on the chemistry of humic substances. [Agrochimica](#), v. 22, p. 216-225, 1978.

SENESI, N.; MIANO, T.M.; BRUNETTI, G. Methods and related problems for sampling soil and sediment organic matter. Extraction, fractionation and purification of humic substances. [Química Analítica](#), v. 13, p. 26-33, 1994.

SHKINEV, V.M.; FEDOROVA, O.M.; SPIVAKOV, B.Ya.; MATTUSCH, J.; WENNRICH, R.; LOHSE, M. Speciation of metals associated with natural water components by on-line membrane fractionation combined with inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometries. [Anal. Chim. Acta](#), v. 327, p. 167-174, 1996.

SIGEL, H. & Mc CORMICK, D.B. On the discriminating behavior of metal ions and ligands with regard to their biological significance. [American Chemical Society](#), v. 13, p. 201-208, 1979.

SKOGERBOE, R.K. & WILSON, S.A. Reduction of ionic species by fulvic acid. [Anal. Chem.](#), v. 53, p. 228-232, 1981.

SOLOMONS, W. & FORSTNER, U. [Metals in the hydrocycle](#), Springer Verlag, Germany, (1984).

SPOSITO, G. Distribution of potentially hazardous trace metals. In: SIGEL, H. [Metal ions in biological systems](#). Marcel Dekker, New York, (1986), v.20, p. 1-19.

STEELINK, C.; Implications of elemental characteristics of humic substances. In: AIKEN, G.R.; MCKNIGHT, D.M.; WERSHAW, R.L.; MACCARTHY, P. (Eds). [Humic substances in soil, sediment and water - Geochemistry, isolation and characterization](#). John Wiley & Sons, New York, (1985), p. 457-476.

STEVENSON, F.J. [Humus chemistry. New York](#). Wiley & Sons, p. 26-53, 1982.

STUERMER, D.H. & HARVEY, G.R. The isolation of humic substances and alcohol-soluble organic matter from seawater. [Deep-sea Res.](#), v. 24, p. 303-309, 1977.

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. and SWIFT, R.S. (eds) [Humic substances II](#). John Wiley & Sons, New York, p. 450-465, 1989.

SWIFT, R.S. Fractionation of soil humic substances. In: AIKEN, G.R.; MCKNIGHT, M.D.; WERSHAW, R.L.; MacCARTHY, P. (eds) [Humic substances in soil, sediment and water. Geochemistry, isolation and characterization](#). John Wiley & Sons, New York, p. 387-408, 1985.

SWIFT, R.S. Organic matter characterization. In: SPARKS, D.L. [Methods of soil analysis: chemical methods](#). Maddison, SSSA, p. 1011-1069, 1996.

SWIFT, R.S. & POSNER, A.M. Gel chromatography of humic acid. [J. Soil Sci.](#), v. 24, p. 303-309, 1977.

SZILAGYI, M. Reduction of  $\text{Fe}^{+3}$  ion by humic acid preparation. [Soil Sci.](#), v. 111, p. 233-235, 1971.

THURMAN, E.M., MALCOLM, R.L.; Preparative isolation of aquatic humic substances. [Environ. Sci. Technol.](#), v. 15, p. 463-466, 1981.

THURMAN, E.M.; MALCOLM, R.L. and AIKEN, G.R. Prediction of capacity factors for aqueous organic solutes adsorbed on a porous acrylic resin. [Anal. Chem.](#), v. 50, p. 775-779, 1978.

TOWN, R.M. & POWELL, H.K.J. Elimination of adsorption effects in gel permeation chromatographic of humic substances. [Anal. Chim. Acta](#), v. 256, p. 81-86, 1992.

TRAINA, S.J.; NOVAK, J.; SMECK, N.E. An ultraviolet absorbance method of estimating the percent aromatic carbon content of humic acids. [J. Environ. Qual. P.](#), v. 19, p. 151-153, 1990.

TSCHÓPEL, P.; KOTZ, I.; SHULZ, W.; VEBER, M. TÖLG, G. Zur ursache und vermeidung systematischer fehler bei elementbestimmungen in wabrigen losungem im ng/ml und pg/ml-Bereich. [Fresenius J. Anal. Chem.](#), v. 302, p. 1-14, 1980.

WALKER, I. Ecologia e biologia dos igapós e igarapés. [Ciência Hoje \(SBPC\)](#), v. 11, p. 44-53, 1990.

WALLSCHÄGER, D.; DESAI, M.V.M.; WILKEN, R.D. The role of humic substances in the aqueous mobilization of mercury from contaminated floodplain. [Water Air Soil Pollut](#), v. 90, p. 507-520, 1996

W.H.O [Environmental health criteria 101: Methylmercury](#). 1<sup>a</sup> ed., World Health Organization, Genebra, (1990).

W.H.O [Environmental health criteria 86: Mercury - Environmental aspects](#). 1<sup>a</sup> ed. World Health Organization, Genebra, (1989).

WILKEN, R.D. Mercury analysis: a special example of species analysis. [Fresenius J. Anal. Chem.](#), v. 342, p. 795-801, 1992.

WILKEN, R.D. & HINTELMANN, H. In: BROEKAERT, J.A.C., GÜÇER, S., ADAMS, F. (Ed.) [Metal speciation in the environment](#). Springer-Verlag, Berlim, 1990.

---

[ZARA, L. F. Tese/Doutorado - CAPES - IQ Ar. - UNESP](#)

WOOD, J.M. & WANG, H.K. Microbial resistance to heavy metals. [Environ. Sci. Technol.](#), v. 17, p. 582A-590A., 1983.

ZAGATTO, E.A.G.; BERGAMIN FILHO, H.; BRIENZA, S.M.B.; ARRUDA, M.A.Z. Multi-site detection in flow analysis Part. 1-Relocation of spectrophotometric detector. [Anal. Chim. Acta](#), v. 261, p. 59-65, 1992.

ZAGATTO, E.A.G.; OLIVEIRA, C.C.; COLLINS, C.H. Classificação e definição dos métodos de análise em fluxo (recomendações - IUPAC 1994). [Química Nova](#), v. 22, p. 143-146, 1999.

ZARA, L. F.; ROCHA, J. C.; TOSCANO, I. A. S.; ROSA, A. H. Aquatic Humic Acid: A Structural conformation study. [J. Braz. Chem. Soc.](#), (submetido 2002).

ZARA, L. F.; ROCHA, J. C.; MILANI, M. R.; ROSA, A. H.; SANTOS, A. A Flow-Injection-ICP system sequential multielemental analysis with simultaneously mercury(II) preconcentration step. [Anal. Letters](#), v. 36, p. 000-000, 2003.