

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Júlio de Mesquita Filho

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

“Substâncias húmicas: interações com nutrientes e contaminantes”

Wander Gustavo Botero

Araraquara
Junho/ 2010

Wander Gustavo Botero

Substâncias húmicas: interações com nutrientes e contaminantes

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Rocha

Araraquara
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

B748s Botero, Wander Gustavo
Substâncias húmicas: interações com nutrientes e contaminantes / Wander Gustavo Botero. – Araraquara : [s.n], 2010
75 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Julio Cesar Rocha

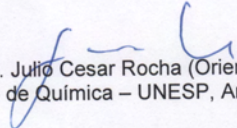
1. Química ambiental. 2. Matéria orgânica. 3. Macronutrientes .
4. Micronutrientes. 5. Interferentes endócrinos, I. Título.

WANDER GUSTAVO BOTERO

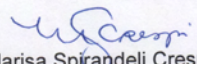
Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Araraquara, 24 de junho de 2010.

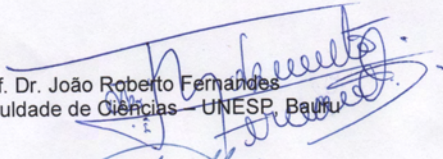
BANCA EXAMINADORA



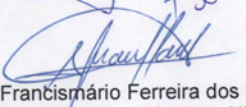
Prof. Dr. Julio Cesar Rocha (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



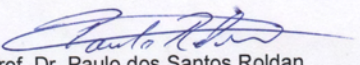
Profª Drª Marisa Spirandeli Crespi
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. João Roberto Fernandes
Faculdade de Ciências – UNESP, Bauru



Prof. Dr. Francismário Ferreira dos Santos
Universidade Federal de Goiás – UFG, Jataí



Prof. Dr. Paulo dos Santos Roldan
Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Maceió

A Pedra

O distraído nela tropeçou...

O bruto a usou como projétil.

O empreendedor, usando-a, construiu.

O camponês, cansado da lida, dela fez assento.

Para meninos, foi brinquedo.

Drummond a poetizou.

Já, Davi, matou Golias, e Michelangelo extraiu-lhe a mais bela escultura...

E em todos esses casos, a diferença não esteve na pedra, mas no homem!

Não existe "pedra" no seu caminho que você não possa aproveitá-la para o seu próprio crescimento.

Independente do tamanho das pedras, no decorrer de sua vida, não existirá uma, que você não possa aproveitá-la para seu crescimento espiritual. Quando a sua pedra atual, tenho certeza que Deus irá te dar sabedoria, para mais tarde você olhar para ela, e ter orgulho da maravilhosa experiência que causou em sua vida, no seu crescimento espiritual.

À Deus dedico este trabalho,que sempre
me deu Paz, Saúde, Amor e me mostrou
que a LUZ esta dentro de todos nós!
Basta olhar...

A Nilce, meu amor, pelo carinho, incentivo e
confiança. Obrigado por acreditar nos meus
sonhos e fazer parte deles.
TE AMO!.

Ao Ósmio, meu fiel escudeiro...

Ao Prof. Dr. Julio Cesar Rocha e Dr. Ademir dos Santos,
pela orientação científica e de vida. Obrigado pela
amizade, confiança, ensinamentos e
por terem acreditado em mim.

Aos meus Pais, Edna e Humberto e ao meu
irmão Weslei, pelo carinho, amor, e por terem me
apoiado em todos os momentos de minha vida.

Aos meus avós por sempre acreditarem em mim
e nos meus sonhos.

À Vó Laurinda, saudades ...

Aos meus amigos, **Andrezinho e Luciana**: Muito obrigado pela convivência, ensinamentos e sintonia. "*Vocês são amigos para a vida inteira*"...Luz para todos nós!

A toda minha família: Tios, Tias, primos, afilhados e todos os amigos de Matão (Lilian, Clebes, Marta, Alessandra) por terem torcido por mim.

Ao Prof. Dr. Andre Henrique Rosa, Isabel e Marcelo: Obrigado pela amizade e por confiarem em mim e em meu potencial.

Ao Paulo Roldan e Érica pela amizade e por terem tornado essa nova etapa de nossas vidas mais fácil e mais alegre! *Obrigado!*

Aos meus amigos de Maceió: Paulo, Érica, Zepe, Renata, Camila, Sergio, Sol, Silvia, Marcelo, William, Juliana, Marconi, Débora, Vivi e Marcos pelos momentos de alegria, descontração e que venham **muitas festas!!!**

Aos amigos da *Praia do Francês*, por tornarem o lugar que escolhemos para viver um verdadeiro "Paraíso".

Aos queridos amigos e colegas de trabalho da Universidade Federal de Alagoas - Campus Arapiraca: Que juntos possamos construir uma Universidade mais justa e democrática!

A Universidade Federal de Alagoas, pelo incentivo para o termino deste trabalho.

Aos meus queridos amigos do grupo de Química Analítica Ambiental: Raquel, Natalia, Vinicius, Eurípedes, Vanessa, Ednaldo, Mirela, Heliandro, Fernando, Luciane, Ricardo, Iramaia, Dani, Fabi, Felipe, Leandro, Bruno...vocês me ensinaram muitas coisas.

Ao Ricardo e Robson pela ajuda e bom humor em todas as horas!

Aos meus amigos de graduação e amigos que conheci no Instituto de Química,muito obrigado pela amizade e incentivo.

As meninas da Biblioteca, pela ajuda em todos os momentos.

As meninas da Seção de Pós-Graduação, Sandra, Célia, Wennia e Patrícia pela ajuda.

Ao pessoal do grupo do Prof. Arnaldo, pela ajuda sempre que precisei.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos. Sem estas colaborações tudo seria mais difícil.

À CNPq pelo período de bolsa concedida.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo principal estudar as interações entre as substâncias húmicas, nutrientes e contaminantes, com a análise sobre os efeitos da extração nesse processo. Na primeira parte do trabalho foi otimizado o procedimento para extração em fluxo contínuo de substâncias húmicas de turfas, em diferentes extratores (NaOH, Na₄P₂O₇ e KOH) nas concentrações 0,1 mol L⁻¹ e 0,5 mol L⁻¹. A montagem de uma planta piloto de extração em fluxo para fins comerciais. Após a extração em fluxo e purificação, verificou-se a influência do extrator nas características de complexação das substâncias húmicas por macro e micronutrientes. Os resultados desta etapa mostraram que o processo de extração em fluxo é eficiente, diminuindo o tempo na etapa de extração das substâncias húmicas. A planta piloto se mostrou eficiente para extração de substâncias húmicas em fluxo e os resultados da capacidade complexante mostraram que independentemente do extrator, as substâncias húmicas extraídas apresentaram maior afinidade por Ca e Mg, macronutrientes essenciais, e que uma maior complexação é favorecida quando se utiliza pirofosfato de sódio como extrator. Na segunda parte foi determinada a capacidade complexante das substâncias húmicas por micro e macronutrientes, e avaliou-se a competição dos sítios de complexação das substâncias húmicas pelos metais potencialmente tóxicos (alumínio e chumbo) nos solos e micro e macronutrientes. As substâncias húmicas apresentaram forte afinidade para Pb (II) e Al (III), formando complexos estáveis, liberando os nutrientes complexados. Embora as substâncias húmicas sejam utilizadas comercialmente como fertilizantes orgânicos, estudos sobre métodos de enriquecimento das SH, destinadas a evitar prejuízos, são altamente desejáveis dentro da perspectiva ambiental e econômica. Na terceira e última etapa do trabalho, estudou-se as interações entre substâncias húmicas aquáticas (SHA), de rios tropicais, e dois interferentes endócrinos (IE), utilizando o sistema de ultrafiltração em fluxo tangencial equipado com membrana de celulose de 1 kDa afim de separar os IE livres da fração ligada as SHA. A Quantificação do 17 α -etinilestradiol e bisfenol A foi realizada num cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (GC-MS). O tempo de equilíbrio entre as SHA e IE foi cerca de 30 minutos, e as capacidades complexantes do 17 α - etinilestradiol e bisfenol A foram em torno de 3,4 e 30,7 mg g⁻¹ de carbono orgânico total, respectivamente. A maior interação das SHA ocorreu para 17 α -etinilestradiol, em relação ao bisphenol A, devido a presença de hidrogênio na estrutura do 17 α -etinilestradiol, que podem interagir com os grupos grupos oxigenados nas SHA. Os resultados indicaram que as SHA podem influenciar fortemente no transporte e reatividade dos interferentes endócrinos em sistemas aquáticos.

Palavras-chave: Substâncias húmicas. Nutrientes. Contaminantes. Interferentes endócrinos.

ABSTRACT

This work was aimed at studying the interactions between humic substances (HS), nutrients and contaminants, including by examining the effects of this extraction process. In the first part of the procedure was optimized for extraction in continuous flow of peat humic substances, using different extractants (NaOH, KOH and $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) at concentrations of 0.1 mol L^{-1} and 0.5 mol L^{-1} and an assembly plant pilot extraction flow for commercial purposes. After extraction and purification in flow, there was the influence of extractant complexation characteristics of humic substances by macro-and micronutrients. The results of this phase showed that the extraction process flow is efficient, reducing the time step in the extraction of humic substances. The pilot plant was efficient for extraction of humic substances in flux and the results showed that the complexing capacity independent of the extractant used, the extracted HS have a high affinity for calcium and magnesium, essential nutrients, and that further complexation is favored when using sodium pyrophosphate as extractor. In the second part was determined by complexing ability of humic substances by micro and macronutrients, and evaluated the competition of binding sites of humic substances by potentially toxic metals (aluminum and lead) present in soils and micro and macronutrients. The humic substances have a strong affinity for Pb (II) and Al (III), forming stable complexes, releasing nutrients complexed. Although humic substances are used commercially as organic fertilizers, studies of methods for enrichment of SH, to prevent damage, are highly desirable from the perspective of environmental and economic. In the third and final stage of this work, it is studied interactions between humic substances (AHS), tropical river, and two endocrine disrupters (ED), using the system of tangential flow ultrafiltration membrane equipped with a pulp in order kDa to separate ED from the free fraction bound to SHA. The Quantification of 17α -ethinylestradiol and bisphenol A was performed using gas chromatograph coupled to mass spectrometry (GC-MS). The equilibrium time between the SHA and ED was about 30 minutes, and the complexing capacity of 17α -ethinylestradiol and bisphenol A was around 3.4 and 30.7 mg g^{-1} total organic carbon, respectively. The greater interaction of the AHS occurred for 17α -ethinyloestradiol in relation to bisphenol A, due to the presence of hydrogen in the structure of 17α -ethinylestradiol, which can interact with the groups oxygenated groups present in the SHA. The results indicate that the SHA can strongly influence the transport and reactivity of endocrine disrupters in aquatic systems

Key words: humic substances. Nutrients. Contaminants. Endocrine Disruptors

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1	Modelo estrutural proposto para o ácido húmico.	06
Figura I.2	Representação das reações de um íon metálico (M), em sistema aquático/ interface com sedimento. (Adaptado de BUFFLE, 1990).	09
Figura I.3	Sistema de ultrafiltração em fluxo tangencial equipado com membrana de 1 kDa.	15
Figura II.1	Esquema do procedimento utilizado na coleta das amostras de turfa.	21
Figura II.2	Secagem ao ar das amostras de turfa.	21
Figura II.3	Esquema para extração em fluxo de substâncias húmicas de turfas para fins comerciais e seu fracionamento. Bomba peristáltica (BP), frasco coletor (FC), Frasco extrator (FE), Filtros (F_1 e F_2), solução de NaOH (R_1), solução de HCl (R_2), agitador magnético (AM), tubos (T_1 , T_2 , T_3 e T_4), ponto de confluência (PC), descarte (W), ácido húmico (AH), ácido fulvico (AF).	22
Figura II.4	Sistema para extração em fluxo contínuo de substâncias húmicas de turfas para fins comerciais.	23
Figura II.5	Equipamento utilizado na extração das substâncias húmicas de amostras de turfas por batelada.	24
Figura II.6	Purificação das substâncias húmicas extraídas por fluxo contínuo de amostras de turfas.	25
Figura II.7	Planta piloto para extração em fluxo contínuo de substâncias húmicas para fins comerciais.	26
Figura III.1	Sistema de filtração adaptado (Amostrador de Aerossol – Millipore), utilizado no sistema de extração em fluxo contínuo.	38
Figura III.2	Curva para determinação da capacidade complexante das substâncias húmicas extraídas de amostras de turfas com	41

NaOH 0,1 mol L⁻¹ por íons Cu²⁺. Condições: pH ≈ 5,5; C_{SH} = 100 mg L⁻¹.

Figura III.3	Curva da capacidade complexante de substâncias húmicas de turfa por Pb(II), utilizando a técnica de ultrafiltração tangencial. Condições: concentração das amostras: 100 mg L ⁻¹ ; pH 5.0; I = 0.10 mol L ⁻¹ NaNO ₃ .	47
Figura III.4	Competição dos sítios ligantes das substâncias húmicas enriquecidas com micro e macronutrientes por Al(III).	49
Figura III.5	Competição dos sítios ligantes das SH enriquecidas com micro e macronutrientes por Pb(II).	49
Figura III.6	Tempo de equilíbrio entre (A) 17α-etinilestradiol e substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras do Rio Ribeira de Iguape, e (B) bisfenol A e substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras do Rio Itapanhaú.	54
Figura III.7	Curva da capacidade de complexação de substâncias húmicas aquáticas com bisfenol A, usando a técnica de ultrafiltração em fluxo tangencial. Concentração da amostra de SHA: 20 mg L ⁻¹ ; pH: 5.0.	55
Figura III.8	Competição entre 17α-etinilestradiol e bisfenol A por SHA extraídas de amostras de águas do (A) Rio Ribeira de Iguape, e (B) Rio Itapanhaú.	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I.1	Definições freqüentemente utilizadas na química do húmus.	05
Tabela I.2	Ligantes contendo oxigênio presentes na estrutura da matéria orgânica aquática.	11
Tabela I.3	Principais classes de compostos e substâncias interferentes do sistema endócrino.	18
Tabela III.1	Rendimentos das extrações de substâncias húmicas de amostras de turfa utilizando sistema em fluxo contínuo e por batelada.	38
Tabela III.2	Capacidade complexante das substâncias húmicas extraídas em fluxo de amostras de turfa, utilizando como extrator NaOH 0,1 mol L ⁻¹ , KOH 0,1 mol L ⁻¹ e Na ₄ P ₂ O ₇ 0,1 mol L ⁻¹ .	42
Tabela III.3	Razões atômicas (H/C, O/C) em diferentes amostras de substâncias húmicas extraídas de turfas e solos de diferentes regiões de acordo com a literatura e este estudo.	45
Tabela III.4	Capacidade de complexação de substâncias húmicas de turfa por micro e macronutrientes e metais potencialmente tóxicos.	48
Tabela III.5	Caracterização preliminar das amostras de água coletada nos Rios Itapanhaú e Ribeira do Iguape.	51
Tabela III.6	Resultados da razão atômica (C/H, C/O) e grupos funcionais quantificados por RMN ¹³ C das amostras de substâncias húmicas aquáticas extraídas do Rio Itapanhaú (RI), Rio Ribeira do Iguape (RRI) e literatura.	52
Tabela III.7	Capacidades de complexação de substâncias húmicas por interferentes endócrinos e outras substâncias orgânicas e inorgânicas.	56

ABREVIATURAS

MON	Matéria orgânica natural
SH	Substâncias húmicas
MOR	Matéria orgânica refratária
MOA	Matéria orgânica natural de origem aquagênica
MOP	Matéria orgânica de origem pedogênica
CTC	Capacidade de troca catiônica
M	Íon metálico
SHA	Substâncias húmicas aquáticas
UF	Ultrafiltração
UF-FT	Ultrafiltração em fluxo tangencial e simples estágio
IE	Interferentes Endócrinos
ICP-OES	Espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio induzido
IHSS	Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica
UGRH	Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
TOC	Carbono orgânico total
CGH	Grupos homólogos
CC	Capacidade de complexação

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO

I.1	Turfa	02
I.2	Matéria orgânica natural	03
I.3	Substâncias húmicas	04
I.3.1	Origem, formação e estrutura das substâncias húmicas	04
I.3.2	Caracterização das substâncias húmicas	08
I.3.3	Interações entre substâncias húmicas e espécies metálicas	09
I.3.4	Interações entre substâncias húmicas e compostos orgânicos	11
I.3.5	Capacidade complexante das substâncias húmicas	12
I.3.5.1	Técnicas utilizadas para determinar a capacidade de complexante	13
I.3.5.2	Determinação da capacidade de complexação por ultrafiltração	14
I.4	Novos contaminantes: interferentes endócrinos	16

II. EXPERIMENTAL

II.1	Otimização de metodologia para extração em fluxo contínuo de substâncias húmicas extraídas de amostras de turfa para fins comerciais.	21
II.1.1	Coleta e preparo das amostras	21
II.1.2	Montagem do sistema de extração de substâncias húmicas em fluxo contínuo	22
II.1.3	Extração de substâncias húmicas	23
II.1.3.1	Fluxo contínuo	23
II.1.3.2	Batelada	24
II.1.4	Purificação das substâncias húmicas	24
II.1.4.1	Preparação das membranas de diálise	24
II.1.4.2	Diálise das substâncias húmicas	25

II.1.5	Determinações do rendimento das extrações	25
II.1.6	Montagem e otimização de planta piloto para extração em fluxo de substâncias húmicas para fins comerciais	26
II.1.7	Determinação da capacidade complexante das substâncias húmicas em fluxo contínuo por diferentes extratores por macro e micro nutrientes	26
II.1.8	Determinação dos macro e micro-nutrientes	27
II.2	Substâncias húmicas de turfas enriquecidas com nutrientes para aplicação agrícola: competição entre nutrientes e metais potencialmente tóxicos presentes em solos tropicais.	28
II.2.1	Materiais e reagentes	28
II.2.2	Extração das substâncias húmicas	28
II.2.3	Purificação das substâncias húmicas	28
II.2.4	Caracterização das substâncias húmicas	28
II.2.4.1	Análise elementar	28
II.2.4.2	Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)	29
II.2.4.3	Espectroscopia na região visível (E_4/E_6)	29
II.2.5	Interações entre substâncias húmicas e espécies metálicas	29
II.2.5.1	Determinação da capacidade complexante de substâncias húmicas de turfas por micro e macronutrientes, e metais potencialmente tóxicos presentes em solos tropicais	29
II.2.5.2	Competição entre metais potencialmente tóxicos presentes em solos tropicais e substâncias húmicas enriquecidas com macro e micro-nutrientes	30
II.3	Interações entre substâncias húmicas e interferentes endócrinos	31
II.3.1	Materiais e reagentes	31
II.3.2	Local de amostragem e caracterização das amostras de água	31
II.3.3	Extração das substâncias húmicas aquáticas por resina XAD 8	32
II.3.4	Caracterização das substâncias húmicas aquáticas	32
II.3.5	Interações entre substâncias húmicas aquáticas e interferentes endócrinos	32

II.3.5.1	Determinação do tempo de equilíbrio de complexação entre SHA e 17- α etinilestradiol e Bisfenol A	33
II.3.5.2	Determinação da capacidade de complexação das SHA por 17 α -etinilestradiol e Bisfenol A	33
II.3.5.3	Competição entre interferentes endócrinos e substâncias húmicas aquáticas	34
II.3.6	Análise cromatográfica	34
II.3.6.1	Metodologia de extração	34
II.3.6.2	Análise cromatográfica	35

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.1	Otimização de metodologia para extração em fluxo contínuo de substâncias húmicas extraídas de amostras de turfa para fins comerciais.	37
III.1.1	Extração de substâncias húmicas em fluxo contínuo	37
III.1.2	Montagem da planta piloto para extração em fluxo de substâncias húmicas para fins comerciais	39
III.1.3	Determinação da capacidade complexante das SH extraídas em fluxo com diferentes extratores por macro e micro-nutrientes	40
III.2	Substâncias húmicas de turfas enriquecidas com nutrientes para aplicação agrícola: competição entre nutrientes e metais potencialmente tóxicos presentes em solos tropicais.	44
III.2.1	Caracterização das substâncias húmicas	44
III.2.2	Interações entre substâncias húmicas e macro, micronutrientes e metais potencialmente tóxicos presentes em solos tropicais	46
III.3	Interações entre substâncias húmicas e interferentes endócrinos.	51
III.3.1	Caracterização das substâncias húmicas aquáticas	51
III.3.2	Interações entre substâncias húmicas e interferentes endócrinos	53

IV Conclusões

IV	Conclusões	60
	Referências	63

INTRODUÇÃO

I. Introdução

I.1. Turfa

Turfa é uma pequena classe de combustíveis, formada a partir de material vegetal em pântanos e brejos, é caracterizada pelo tipo de material, condições de formação e grau de decomposição (MOORE, 1989). Estima-se que são necessários de 100 a 500 anos para produzir uma camada de 30 centímetros de turfa.

As turfas se formam via sedimentação de areia, limo e argila oriundos dos terrenos à montante, da deposição de vegetais que crescem na água e pela contribuição das plantas nas margens de regiões alagadas.

As turfas brasileiras podem ser classificadas como hídrica, fibrosa e lenhosa. A primeira é formada em ambiente aquoso ou subaquoso, produzindo uma espécie de turfa rudimentar à base de algas, pólenes, plânctons e flora aquática. A segunda, comum na região Sudeste do Brasil, ocorre na superfície de terrenos, originada por acúmulos orgânicos naturais ou plantados, compondo-se de fibras e filamentos pouco decompostos, imersos em matriz de aspecto gelatinoso, de coloração escura ou marrom. A terceira é formada por vegetais de grande porte e originada na superfície de terrenos. Grande parte da matéria orgânica da turfa está humificada, mas ainda consiste de um material suscetível à fermentação e se estabilizar (LAMIN, 2001).

As turfeiras compreendem uma significativa porcentagem da superfície terrestre e estão presentes em diferentes regiões do planeta. As mais importantes concentram-se no hemisfério norte, particularmente na Rússia, mas, reservas economicamente relevantes, têm sido descobertas no Brasil, Indonésia, Tailândia e outras regiões tropicais e subtropicais do globo. Têm sido usadas como combustível há tempos, particularmente na Rússia, Finlândia, Irlanda e outras partes da Europa (SPEDDING, 1988).

Além de conter humina, ácido húmico e ácido fúlvico, as turfas possuem propriedades físico-químicas, as quais tornam possível sua aplicação em várias áreas técnicas, como estação de tratamento de águas (BAILEY *et al.* 1999), monitoramento ambiental (McLELLAN *et al.* 1988), produção de combustíveis (HARTCHER *et al.* 1983), imobilização de enzimas (ROSA *et al.* 2000) e possíveis aplicações terapêuticas (SANTOS *et al.* 2007). O uso terapêutico de

turfas também tem sido investigado, entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos qualitativos, fisiológicos e farmacológicos dos seus componentes. De acordo com alguns estudos, os efeitos medicinais das turfas estão provavelmente associados com as substâncias húmicas presentes em suas composições, as quais fornecem propriedades complexantes (ROSA *et al.*, 2002).

A turfa pode ser utilizada como suplemento agrícola em solos na etapa final do processo de recuperação da vegetação nativa e como suplemento de matéria orgânica nas áreas degradadas. Além disso, dados da literatura mostram melhoria no enraizamento de plantas, quando tratadas com turfa (MINDÉLLO NETO, 2005). Sua aplicação influencia nas propriedades químicas e físicas do solo, como retenção de cátions, efeito tampão, densidade aparente, condutividade hidráulica e porosidade. Também pode ser aplicada na geração de calor na forma de combustível fóssil, formando carvão mineral.

I.2. Matéria Orgânica Natural

A expressão matéria orgânica natural (MON) tem sido empregada para designar toda matéria orgânica de reservatórios ou ecossistemas naturais, sendo diferente da matéria orgânica viva e dos compostos de origem antropogênica.

Cerca de 20 % da MON nos ecossistemas naturais consiste de compostos orgânicos com estrutura química definida, tais como carboidratos, aminoácidos e hidrocarbonetos. Os 80 % restantes correspondem a massas de matéria orgânica detriticas, pertencentes a um grupo de estrutura química indefinida, com tempo de residência mais longo no ambiente e relativamente resistente à degradação denominada matéria orgânica refratária (MOR) (BUFFLE, 1984; ROCHA *et al.*, 2004).

A matéria orgânica natural pode ser classificada de acordo com a origem das plantas, as quais serviram como material de partida para a formação desses compostos. A matéria orgânica natural de origem aquagênica (MOA) é àquela formada na água, pela excreção e decomposição de plânctons e bactérias aquáticas, enquanto a matéria orgânica de origem pedogênica (MOP), origina-se à decomposição de plantas terrestres e microorganismos,

incluindo material lixiviado dos solos para os sistemas aquáticos (ROMÃO *et al.*, 2003).

A MOP é formada pela degradação de lignina, carboidratos e proteínas, os quais levam à formação de compostos aromáticos (especialmente substâncias carboxílicas, fenólicas e benzênicas) e em menor extensão, de compostos alifáticos.

Os principais constituintes da matéria orgânica natural, globalmente distribuídos nos sistemas aquáticos e terrestres, são as substâncias húmicas (SH).

I.3. Substâncias húmicas

As substâncias húmicas são compostos poliméricos heterogêneos, resultantes da decomposição de resíduos de animais e vegetais em vários estágios de decomposição. Genericamente é uma mistura de carboidratos, proteínas, lipídios, que fornecem grande quantidade de grupos funcionais em suas estruturas, passíveis às interações que beneficiem processos de biodisponibilidade de nutrientes e contaminantes para o ambiente (STEHLICKOVA *et al.*, 2009).

I.3.1. Origem, formação e estrutura das substâncias húmicas.

Várias são as teorias sobre a formação das SH. A chamada teoria clássica Waksman (STEVENSON, 1982), propõe que as SH são ligninas modificadas, mas, a maioria dos pesquisadores, acredita num mecanismo relacionado com a formação de quinonas. MALCOLM (1990), afirma que a lignina não é o principal precursor de substâncias húmicas de solos. Além disso, mostra que há grandes diferenças estruturais entre substâncias húmicas de diferentes origens.

Como as SH não podem ser definidas estruturalmente, a classificação das diferentes frações baseia-se em suas características de solubilidade, subdividindo-se em três principais frações: 1) Os ácidos húmicos definidos

operacionalmente como a fração das SH solúvel em meio alcalino diluído e que precipita pela acidificação do extrato alcalino. 2) Os ácidos fúlvicos que permanecem em solução quando o extrato alcalino é acidificado e 3) A humina que é a fração não extraída por ácido ou álcali diluído HAYES (2001).

A Tabela I.1. mostra definições freqüentemente utilizadas na química do húmus.

Tabela I.1. Definições usuais na química do húmus.

Termos	Definições
Substâncias húmicas/material húmico / húmus	Substâncias de coloração escura, elevada massa molecular, estrutura complexa e indefinida. Resultam da decomposição de vegetais e animais.
Substâncias não húmicas	Substâncias presentes no solo de composição e estrutura definida, tais como aminoácidos, carboidratos, ceras, lipídeos, resinas e ácidos graxos.
Humina	Parte do material orgânico do solo com coloração escura e insolúvel em álcalis e ácidos.
Ácido fúlvico	Material colorido remanescente da separação do ácido húmico por precipitação em meio ácido.
Ácido húmico	Material orgânico de coloração escura, pode ser extraído do solo por vários reagentes e insolúvel em meio ácido (pH < 2).
Ácido himatomelânico	Fração do ácido húmico solúvel em álcoois.

Adaptada de ROSA (2001)

Na literatura existem várias propostas estruturais para as SH (KONONOVA, 1966; SCHNITZER & KHAN, 1978; STEVENSON, 1994), entretanto, nenhuma delas parece ser inteiramente satisfatória. Provavelmente, isto ocorre não apenas devido à complexidade e heterogeneidade estrutural

das SH, mas principalmente pela falta de uma identidade estrutural genérica a qual é fortemente influenciada pelo grau e mecanismo de decomposição.

A Figura I.1. mostra um modelo tridimensional para o ácido húmico proposto por SEIN *et al.* (1999).

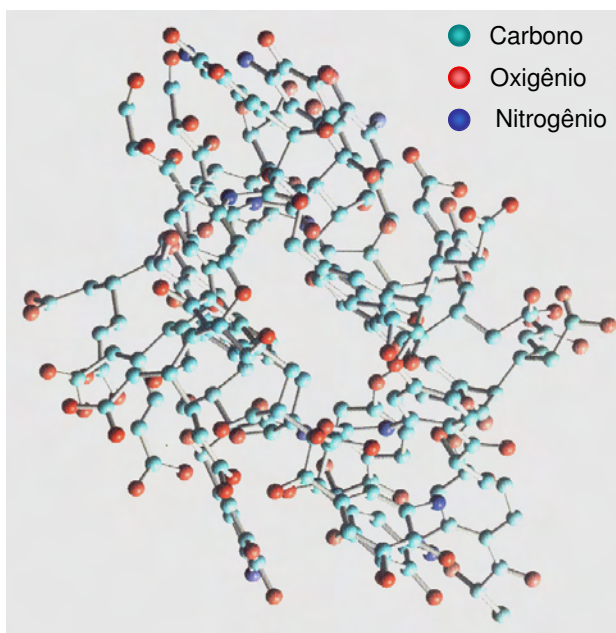


Figura I.1. Modelo estrutural para o ácido húmico.

Estudos têm mudado o conceito de estrutura macromolecular das SH baseado em resultados com técnicas como cromatografia de alta resolução por exclusão de tamanho molecular (HPSEC, do inglês *high-performance size-exclusion chromatography*) (PICCOLO, 2002), espectrometria de massa com ionização por eletrospray e espectroscopia de ressonância magnética eletrônica (STENSON *et al.*, 2003). Esses resultados direcionam para uma estrutura de associação supramolecular de auto-montagem (“auto-assemblage”) relativas às pequenas moléculas heterogêneas mantidas por forças dispersivas, tais como π - π , CH- π e forças de Van der Waals.

Entretanto, mesmo diante das contradições quanto ao modelo estrutural, algumas características das SH já estão bem definidas:

- As frações de ácidos fulvicos e ácidos húmicos são misturas heterogêneas de moléculas polidifusas (STEVENSON, 1982).
- Há variação da razão entre ácidos húmicos e ácidos fúlvicos em função do tipo de solo e essa razão está associado ao grau de humificação do mesmo (ROSA *et al.* 2001).
- Os ácidos húmicos e fúlvicos apresentam alto teor de grupos funcionais contendo oxigênio tais como carboxilas, hidroxilas fenólicas e carbonilas de vários tipos (STEVENSON, 1985).

Importância ambiental das substâncias húmicas:

- A quantidade de carbono presente na Terra na forma de SH ($6 \cdot 10^{12}$ Tton) excede àquela presente em organismos vivos ($7 \cdot 10^{11}$ Tton), representando assim a principal forma de matéria orgânica distribuída no planeta Terra.
- Influem na toxicidade de alguns metais, formando complexos com diferentes labilidades relativas (ROCHA *et al.*, 1997), reduzindo a toxicidade de certos metais como Cu^{2+} , Hg^{2+} , Al^{3+} para organismos aquáticos e solos (ROCHA & ROSA, 2003);
- Alta capacidade de retenção de água, com importante função reguladora evitando processos erosivos no solo (STEVENSON, 1994);
- Influem no transporte, acúmulo e concentração de espécies metálicas no ambiente. FRASER (1961) atribuiu a elevada acumulação de Cu^{2+} em turfas à presença desses compostos. REUTER & PERDUE (1977) citam a influência dos agentes complexantes no transporte de metais potencialmente tóxicos em sistemas aquáticos;
- De acordo com WERSHAW (1993), propriedades físico-químicas do solo e de sedimentos são em larga extensão controladas pelas substâncias húmicas;
- Atuam no mecanismo de sorção no solo de gases orgânicos e inorgânicos da atmosfera (ROCHA & ROSA, 2003);
- Formação de complexos com micronutrientes de plantas (Fe, Mn, Cu, Zn, Mo e outros), permitindo a migração dos mesmos tornando-os biodisponíveis (SANTOS *et al.*, 2007);
- Interagem com compostos orgânicos antrópicos, por exemplo, xenobióticos por efeitos de adsorção, solubilização, hidrólise, processos microbiológicos e fotossensibilizantes (BARCELÓ, 1991; SANTOS *et al.*, 1998);

- Em função das condições do meio, possuem características oxi-redutoras, influenciando na redução de espécies metálicas e fluxos para a atmosfera (p. e. redução do íon Hg(II) para Hg(0)) (ROCHA *et al.*, 2000; ROMÃO *et al.*, 2002).

1.3.2. Caracterização das substâncias húmicas

Vários métodos químicos, físicos e espectroscópicos, utilizados com sucesso em química orgânica e em estudos de macromoléculas, têm sido aplicados para estudos de substâncias húmicas, na tentativa de determinar a composição e estrutura geral da molécula. Entretanto, devido à natureza heterogênea das SH e da complexidade das interações inter e intramolecular, os resultados são sempre difíceis de interpretar (SWIFT, 1996).

A caracterização estrutural de turfas por análise elementar permite determinar a porcentagem de carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio e enxofre. A avaliação de parâmetros como fósforo, cálcio, magnésio, potássio, pH, acidez potencial, capacidade de troca catiônica (CTC) e saturação de bases constituem as primeiras etapas para a definição de medidas necessárias para a correção de fertilidade e manejo do solo, sendo a análise química, um conjunto de métodos quantitativos mais utilizados para essa finalidade. Possui vantagens tais como baixo custo operacional, disponibilidade de laboratórios e rapidez na obtenção dos resultados (SILVA, 1999).

Métodos espectroscópicos têm sido utilizados freqüentemente para caracterização das substâncias húmicas, principalmente por não alterarem a natureza da amostra, além de vantagens como utilização de pequenas quantidades de amostras. A análise espectroscópica na região do infravermelho permite determinar qualitativa e quantitativamente grupos reativos, como por exemplo, COOH, OH-fenólico, OH-alcoólico, OH-enólico, C=O, NH₂ e estruturas aromáticas e alifáticas. Outras técnicas como análise térmica, técnicas cromatográficas, ressonância magnética nuclear, ressonância paramagnética eletrônica tem sido também muito utilizadas na caracterização de SH (ROSA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2007; SERUDO *et al.*, 2007).

I.3.3. Interações entre substâncias húmicas e espécies metálicas

As espécies metálicas podem se encontrar no ambiente em diferentes formas químicas, apresentando assim diferentes reatividades. Alguns experimentos e trabalhos teóricos têm mostrado que a natureza e a característica do íon metálico influencia também diretamente em sua distribuição e transporte nos diferentes reservatórios.

A Figura I.2. resume as diferentes formas em que um íon metálico (M) pode ser encontrado em um sistema aquático: **a)** livre ou dissolvido; **b)** fracamente complexado com ligantes inorgânicos; **c)** complexado com ligantes orgânicos, macromoléculas ou ligantes coloidais; **d)** adsorvidos ou incorporados a partículas em suspensão; **e)** adsorvido ou assimilado por organismos vivos.

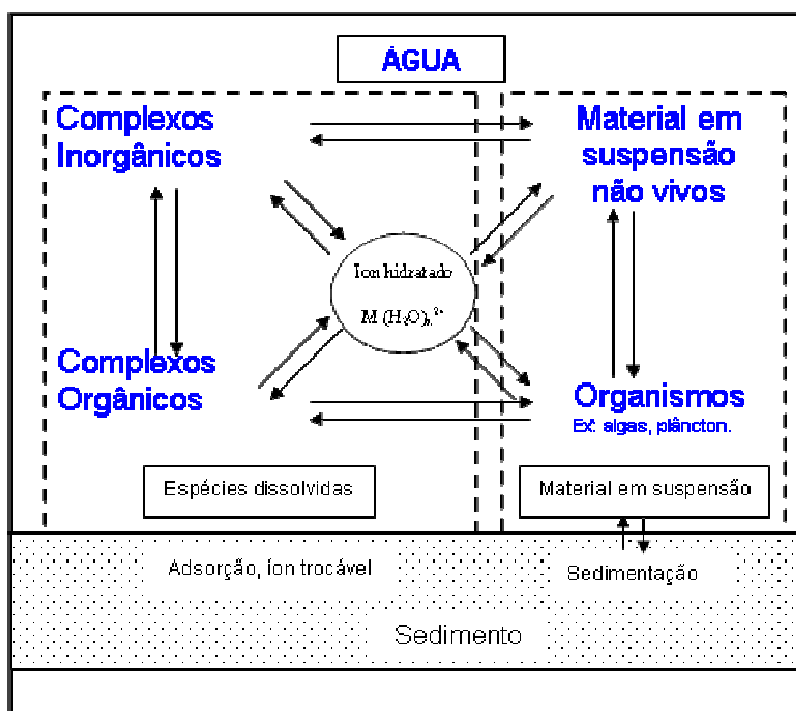


Figura I.2. Representação das reações de um íon metálico (M), em sistema aquático/ interface com sedimento. (Adaptado de BUFFLE, 1990).

Devido suas características estruturais as SH têm grande influência no comportamento de metais no ambiente (ROSA *et al.*, 2006a; ROSA *et al.*,

2006b; BURBA *et al.*, 1995; ROCHA *et al.*, 1997a; ROCHA *et al.*, 1997b). Em sistemas aquáticos, íons metálicos e SH apresentam variadas ligações e os metais podem distribuir-se em complexas trocas entre solução e fase sólida. Detalhados experimentos sobre mobilidade de metais em solos de florestas têm indicado dependências entre o teor metálico, acidez e a capacidade tamponante do solo. Nestas condições, considerada quantidade de íons metálicos ligados às SH estariam passíveis de dissociação. As conseqüências são águas de lixiviação com baixos valores de pH e altos teores de metais livres (p.e: Al), os quais para semelhantes ecossistemas apresentam elevada toxicidade (STEVENSON, 1982; ZHANG *et al.*, 1996; ROSA *et al.*, 2002).

Além disso, sabe-se que a biodisponibilidade de metais é influenciada principalmente pela forma encontrada na natureza e não só pela concentração total como se acreditava no passado (MORRISON *et al.*, 1989; ROSA *et al.*, 2006). De acordo com HART (1981), em sistemas aquáticos íons metálicos podem estar presentes em diferentes formas físico-químicas. O estudo e a busca do conhecimento de como essas formas influenciam no meio é freqüentemente denominado de especiação de metais. A especiação é influenciada por diversos fatores, tais como: pH, potencial redox, material particulado, coloidal e principalmente, tipos e concentrações de ligantes orgânicos (p.e: substâncias húmicas) e inorgânicos (p.e: hidróxidos e bicarbonatos). O transporte, complexação, (bio)disponibilidade e ação de metais no ambiente dependem também da estabilidade do complexo metal-MON. A estabilidade das espécies metal-MON é determinada por uma série de fatores, incluindo o número de átomos que formam a ligação com o metal, a natureza e a concentração do íon metálico, concentração da MON, pH, tempo de complexação etc. (ROCHA & ROSA, 2003; ROSA *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2003).

Em geral, a matéria orgânica aquática (MOA) possui cerca de 45% de oxigênio e 1-2 % de nitrogênio e enxofre em suas estruturas. Esses grupamentos, doadores de elétrons, são os principais responsáveis pelas características da MOA relativas à complexação de metais (BUFFLE, 1990; ROSA *et al.*, 2000). O oxigênio na MOA encontra-se predominantemente na forma de grupos carboxílicos e fenólicos, cujas concentrações são aproximadamente 5-10 e 1-3 mmol g⁻¹, respectivamente (FISH & MOREL,

1985). Na Tabela I.2. se reúne as principais subestruturas presentes na MON, as quais são importantes ligantes na complexação de metais. Termodinamicamente são mais estáveis os complexos que possuem ligantes bi ou multidentados como os formados por ácidos salicílicos ou 1,2 – difenóis.

Tabela I.2. Ligantes contendo oxigênio na estrutura da matéria orgânica aquática*.

	Ligantes	Referências
<i>FENÓLICOS</i>	Ácido salicílico	BUFFLE (1990)
	Ácidos hidroxibenzóicos	BUFFLE (1990)
	1,2 – Difenóis	BUFFLE (1990)
	Catecol	BUFFLE (1990)
<i>CARBOXÍLICOS</i>	Ácido ftálico	BUFFLE (1990)
	Ácido hidroxâmico	BURBA <i>et.al</i> (1998)
	Ácido cítrico	BUFFLE (1990)

*Adaptada de ROCHA & ROSA, 2003

I.3.4. Interações entre substâncias húmicas e compostos orgânicos

As SH interagem com compostos orgânicos xenobióticos, por exemplo, pesticidas e herbicidas por efeitos de adsorção, solubilização, hidrólise, processos microbiológicos e fotossensibilizantes. O efeito solubilizante das SH sobre compostos orgânicos exerce importante função na dispersão, mobilidade e transporte dessas substâncias no ambiente aquático e terrestre (MARTINETO *et al.*, 1994; SANTOS *et al.*, 1998; STEINBERG *et al.*, 2003).

Além disto, em sistemas aquáticos compostos orgânicos e substâncias húmicas aquáticas (SHA) apresentam variadas ligações e os compostos orgânicos podem distribuir-se em complexas trocas entre solução e fase sólida. Transporte, armazenamento e ação de compostos xenobióticos no ambiente dependem também da estabilidade do complexo formado. A estabilidade dos complexos xenobiótico-SHA é determinada por uma série de fatores, incluindo o número de átomos que formam a ligação, a natureza e a concentração do

xenobiótico, concentração/estrutura da SHA, pH, tempo etc. (ROCHA & ROSA, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2004).

1.3.5. Capacidade complexante das substâncias húmicas

As substâncias húmicas estão próximas de serem as substâncias orgânicas mais abundantes da natureza e devido à presença de diferentes grupos funcionais em sua estrutura, as SH interagem com diversas espécies.

A capacidade das SH de reter espécies é tão importante que pode influenciar diretamente no aquecimento global. Isto é, a formação de SH é uma forma de armazenar carbono na forma de substâncias refratárias, minimizando assim efeitos do aquecimento global (ROCHA & ROSA, 2003). Os complexos formados entre SH e espécies metálicas, nutrientes e compostos orgânicos (SH-M) possuem diferentes estabilidades, as quais são altamente dependentes do pH, espécies metálicas, força iônica, concentração de SH e condições redox (NINFANT'EVA *et al.*, 1999). Recentes investigações concluíram que para caracterizar a "reatividade" da ligação entre esses compostos e SH, são necessários procedimentos analíticos adequados que forneçam informações sobre a estabilidade termodinâmica - cinética (ROCHA & ROSA, 2003).

Estudos de troca-iônica têm demonstrado que a disponibilidade de espécies metálicas, nutrientes e compostos orgânicos ligadas as SH parece ser dependente também de fatores cinéticos. Além disto, a força e natureza da ligação entre SH e esses compostos são fortemente influenciadas pelo tamanho molecular das SH, cujas massas molares podem variar, por exemplo, de > 100 a < 5 kDa (NINFANT'EVA *et al.*, 1999).

Assim, procedimentos de fracionamento por tamanhos moleculares são alternativas viáveis para reduzir a polidiversidade das SH, obter frações distintas com propriedades similares e permitir a caracterização de suas interações com espécies metálicas (ROCHA *et al.*, 1999).

Qualquer modelo completo de especiação química deverá ser capaz de distinguir as formas do íon metálico, nutrientes e compostos orgânicos livres das formas complexadas. Na maioria dos casos, a concentração da substância

livre é determinada e em seguida estimada a concentração da substâncias complexada (PERDUE, 1998).

1.3.5.1. Técnicas utilizadas para determinar a capacidade de complexação das substâncias húmicas

A escolha de um método para especiação química influencia os resultados encontrados, pois as várias técnicas medem aspectos diferentes do sistema e operam sob condições diferentes. Segundo ROCHA & ROSA (2003), fatores como concentração das SH e espécies metálicas, nutrientes e compostos orgânicos, pH, força iônica e temperatura influenciam os parâmetros de complexação das substâncias húmicas. Os processos de complexação das SH dependem de sua origem, características estruturais e do procedimento utilizado em sua extração.

Diversas técnicas têm sido utilizadas para o estudo de complexação de metais por SH, dentre as quais pode-se citar a voltametria, potenciometria (BUFFLE, *et al.*, 1990; ABATE & MASINI, 1999; ROMÃO *et al.*, 2003); ultrafiltração (ROCHA *et al.* 2002) e cromatografia (BUFFLE, 1990).

Todas estas técnicas possuem vantagens e limitações (NIFANTEVA *et al.*, 1999; TUSCHALL & BREZONIK, 1983; THURMAN, 1985). As principais técnicas de separação são as eletroanalíticas, destacando-se as potenciométricas e voltamétricas. Nas voltamétricas é medida a corrente gerada na interface eletrodo/solução, enquanto nas potenciométricas a corrente é aproximadamente zero (BUFFLE, 1990).

Na técnica potenciométrica, utilizam-se membranas seletivas acopladas a eletrodos (EIS), mais utilizada na determinação da capacidade complexante de SH. É simples, rápida e de fácil operação, além de determinar a atividade dos íons em solução, não existe ambigüidade na medida da concentração das espécies (NIFANTEVA *et al.*, 1999).

A grande limitação da potenciometria é a existência de poucos eletrodos seletivos disponíveis comercialmente (p.e. Cu, Cd, Pb, Ca) (THURMAN, 1985), sendo necessária a busca de técnicas alternativas, as

quais possam ser utilizadas no estudo da capacidade de complexação para outras espécies metálicas de importância ambiental.

1.3.5.2. Determinação da capacidade de complexação por ultrafiltração

A técnica de ultrafiltração (UF) é uma técnica recente, simples, rápida e baixo custo. O procedimento de ultrafiltração para determinação de espécies metálicas, nutrientes e compostos orgânicos, baseia-se na separação das SH, das espécies em estudo livres/complexadas através de membrana de 1 kDa. Como as SH possuem tamanhos moleculares maiores que 1 kDa, estas são retidas pela membrana, enquanto espécies livres são filtradas. Este procedimento possibilita separar as espécies metálicas, nutrientes e compostos orgânicos complexados dos livres, estudar diferentes espécies simultaneamente e caracterizar parâmetros de complexação como capacidade complexante, constantes de troca e estabilidade das espécies por substâncias húmicas (ROCHA *et al.*, 2002; ROMÃO *et al.*, 2003).

Burba *et al.* (2001), desenvolveram um procedimento de ultrafiltração em fluxo tangencial e simples estágio (UF-FT) capaz de discriminar a concentração das espécies metálicas, nutrientes e compostos orgânicos livres (Figura 1.3.). O sistema UF-FT comparado com o UF convencional apresenta vantagens como trabalhar com sistemas abertos, redução de efeitos da polarização e/ou entupimento das membranas; menor volume do filtrado diminuindo o tempo de filtração e minimizando deslocamentos no equilíbrio da solução, além da maior rapidez na filtração (cerca de 2 mL min⁻¹).

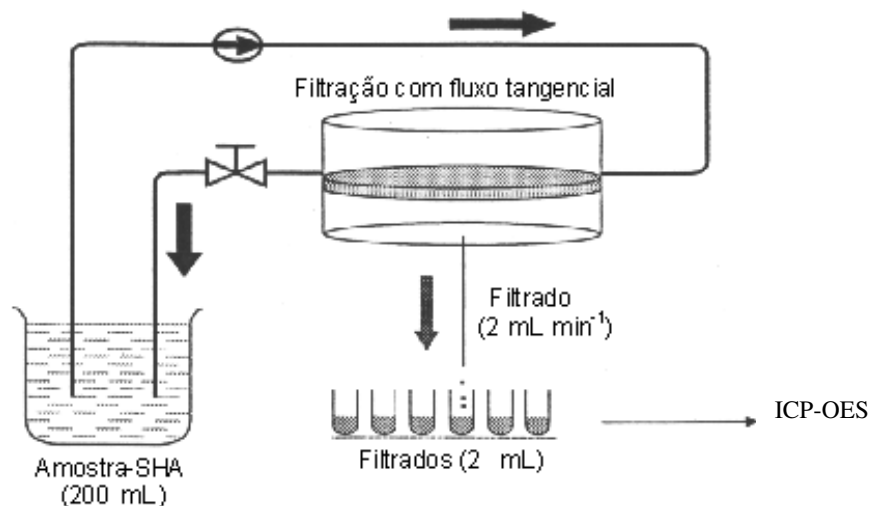


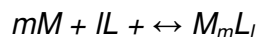
Figura I.3. Sistema de ultrafiltração em fluxo tangencial equipado com membrana de 1 kDa.

Este procedimento de ultrafiltração em fluxo tangencial é capaz de fornecer informações termodinâmicas - cinéticas, as quais caracterizam as espécies em estudo ligadas à matéria orgânica pela utilização de reações de troca de ligante e/ou metal.

A principal vantagem da ultrafiltração é não possuir limitação nem quanto a natureza da espécie em estudo, nem do ligante (BUFFLE & STAUB, 1984). Além disso, os limites de determinação para os metais são limitados às sensibilidades das técnicas empregadas na determinação dos mesmos (ex. espectrometria atômica) (VAN DEN BERGH *et al.*, 2001). Comparada a outras técnicas de separação, a UF mostra-se mais rápida e não perturba o equilíbrio de complexação como no caso da cromatografia de troca iônica (NIFANTEVA *et al.*, 2001).

Para o estudo de reações de complexação de substâncias húmicas têm sido utilizados modelos matemáticos, os quais são baseados nas propriedades físicas das SH. Todos os modelos de complexação das espécies metálicas, nutrientes e compostos orgânicos por SH são empíricos haja vista a complexidade do sistema. Logo, um modelo deve descrever a interação das espécies em função da concentração de SH, do pH e concentração iônica (PERDUE, 1998).

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



$$K = \frac{[M_mL_l]}{[M]^m[L]^l}$$

Onde os termos M , L e ML representam as concentrações das espécies em estudo, ligante e do complexo, respectivamente.

Muitos dados de complexação encontrados na literatura foram obtidos tratando os sítios complexantes como ligantes dissolvidos em uma solução, não considerando a existência de interações entre os sítios e negligenciando a influência da carga elétrica da molécula na reação de complexação (ANTONELLI *et al.*, 2001; SOARES & VASCONCELOS *et al.*, 1994; TOWN & POWELL *et al.*, 1992; ABATE & MASINI, *et al.*, 1999).

Métodos gráficos que utilizam modelos de ligantes discretos são utilizados para avaliar e modelar sistemas e determinar o valor de k e $[L]$ para os complexos formados entre espécies metálicas, nutrientes e compostos orgânicos e diversos ligantes. Dentre estes, os mais discutidos na literatura estão SCATCHARD (1957) e RUZIC (1980), os quais utilizam linearizações para o modelo de formação de complexo 1:1, considerando um número finito de diferentes sítios complexantes nas SH e inexistência de interações entre esses sítios (PARMEGGIANI & MASINI, 2003).

1.4. Novos contaminantes: interferentes endócrinos

O crescimento populacional, o desenvolvimento de novos produtos e a intensificação do uso do solo e água na indústria e agricultura, tem levado a introdução no ambiente de novos compostos com diferentes toxicidades e efeitos à saúde humana e de animais. Recentemente, atenção especial tem sido dada a uma classe de substâncias presentes em águas superficiais e

efluentes, denominados Interferentes Endócrinos (IE), devido ao risco que oferecem a vida mesmo quando presente em baixas concentrações no ambiente. Em 1996, a Comissão Europeia definiram esta classe de compostos como “*substâncias exógenas que causam efeitos adversos à saúde de organismo intacto, ou em seus descendentes, causando alterações em suas funções endócrinas*” (JEANNOT *et al.*, 2002; ALDA & BARCELÓ, 2001).

Os Interferentes Endócrinos (IE) são caracterizados como substâncias que podem causar distúrbios no sistema endócrino de seres humanos e animais, seja bloqueando sítios receptores de células ou aumentando a produção e/ou secreção de hormônios naturais, bem como interferindo em seu sistema reprodutor (YING *et al.*, 2002; RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2004; SODRÉ *et al.*, 2007a,b). Na Tabela I.3. estão apresentadas as principais classes de compostos e substâncias que podem provocar algum tipo de interferência no sistema endócrino, bem como as possíveis fontes de contaminação ao ambiente. Verifica-se que os IE acabam sendo produzidos e, conseqüentemente, podem ser aportados aos sistemas aquáticos através de diferentes atividades naturais ou antrópicas, estando principalmente presente em águas superficiais decorrente do lançamento de efluentes domésticos e/ou industriais.

Justamente por caracterizarem-se por uma classe emergente de contaminantes, informações associadas ao comportamento e interações dos IE nos corpos hídricos têm sido pouco estudadas. Devido suas características estruturais, as Substâncias Húmicas Aquáticas (SHA) como principal classe de agentes complexantes presentes no ambiente, pode exercer importante papel no transporte e comportamento dos IE em sistemas aquáticos (SUN *et al.*, 2007). A caracterização das interações dos IE com as SHA pode levar a importantes informações relacionadas à disponibilidade dos IE para a biota aquática, através da verificação de formação e caracterização da estabilidade de possíveis complexos IE-SHA.

Tabela I.3. Principais classes de compostos e substâncias interferentes do sistema endócrino*.

Classes	Exemplos de substâncias	Fontes
Plastificantes	Ftalatos	Polímeros sintéticos utilizados na estocagem/preservação de alimentos
	Bisfenol A	Agente plastificante e endurecedor utilizado na produção de resinas policarbonato e epóxi
Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	Naftaleno Benzo[a]antraceno Benzo[a]pireno	Incêndios florestais, erupções vulcânicas, afloramento de petróleo e sínteses biológicas
Bifenilas policloradas	Triclorobifenil Heptaclorobifenil	Fluídos hidráulico e dielétrico, isolante em capacitores e transformadores, refrigerante em motores elétricos, etc.
Retardantes de chama bromados	Tetrabromobisfenol A Hexabromociclododecano Éteres difenílicos polibromados	Redução de incêndio e minimizar dano causado por ignição
Pesticidas	Clorados Fosforados	Agricultura para destruição ou repleção de agentes que apresentem efeitos nocivos a plantas e animais

Estrogênios naturais	17 β -estradiol	Originados a partir do colesterol ou da acetil coenzima-A
	Estrona, Estriol	
Estrogênios sintéticos	17 α -etinilestradiol	Formulação de fármacos, contraceptivos e agentes terapêuticos de reposição hormonal

**Adaptada de SODRÉ et al. 2007b*

Embora os valores de log K_{ow} (coeficiente de partição octanol/água) da maioria dos IE indiquem o favorecimento da ocorrência de reações de adsorção em material particulado em suspensão, estudos têm relatado que alguns IE podem apresentar características físico-químicas que favorecem sua permanência no efluente final, mesmo após aplicação aos tratamentos convencionais para seu tratamento (YING *et al.*, 2002; FALCONER *et al.*, 2006; MULLER *et al.*, 2008). Por exemplo, apenas 59% do bisfenol A é retido no tratamento convencional e em torno de 60% para o 17 β -estradiol e o 17 α -etinilestradiol. Através de filtração/microfiltração são removidos em torno de 70% e 95% através da osmose reversa que como sabe-se, trata-se de um processo de custo elevado (BIRKETT & LESTER, 2003; SODRÉ *et al.*, 2007b). Desta forma, fica evidente a necessidade da busca de novas possibilidades/procedimentos para tratamento de águas superficiais/efluentes contendo os interferentes endócrinos.

EXPERIMENTAL

II. Experimental

II.1. Otimização de metodologia para extração em fluxo contínuo de substâncias húmicas de amostras de turfa para fins comerciais

II.1.1. Coleta e preparo das amostras

As amostras de turfa foram coletadas no município de Ribeirão Preto–SP (distrito de Taquaral–SP). O esquema da Figura II.1 mostra o procedimento de amostragem na profundidade de 50 cm, onde amostras simples A_1 - A_5 formaram amostra composta A.

$$50 \text{ cm} \left\{ \begin{array}{|c|c|c|c|c|} \hline A_1 & A_2 & A_3 & A_4 & A_5 \\ \hline \end{array} \right. \quad A = \sum_{A_1-A_5}$$

Figura II.1. Esquema do procedimento de coleta das amostras de turfa.

As amostras foram transferidas para bandejas de madeira e após a secagem ao ar (Figura II.2), durante aproximadamente 2 dias, foram passadas em peneiras plásticas com abertura de 2 mm.

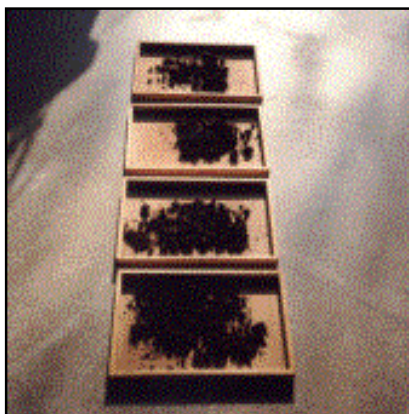


Figura II.2. Secagem ao ar das amostras compostas de turfa.

II.1.2. Montagem do sistema de extração de substâncias húmicas em fluxo contínuo

O sistema de extração de SH em fluxo contínuo foi montado conforme o esquema da Figura II.3.

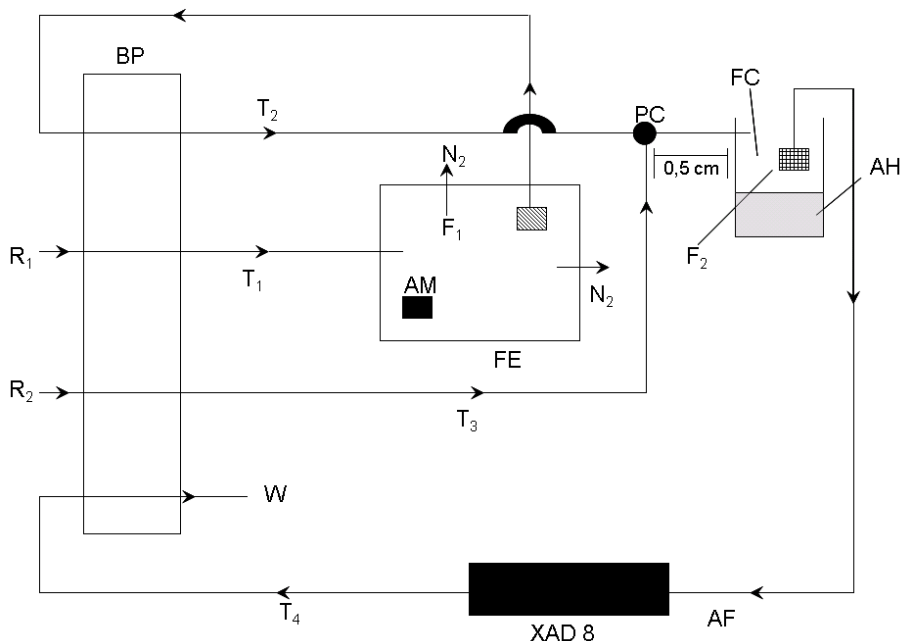


Figura II.3. Esquema para extração em fluxo de substâncias húmicas de turfas para fins comerciais e seu fracionamento. Bomba peristáltica (BP), frasco coletor (FC), Frasco extrator (FE), Filtros (F_1 e F_2), solução de NaOH (R_1), solução de HCl (R_2), agitador magnético (AM), tubos (T_1 , T_2 , T_3 e T_4), ponto de confluência (PC), descarte (W), ácido húmico (AH), ácido fulvico (AF), coluna com resina de troca iônica XAD 8 (XAD 8).

Para otimização do sistema foram feitos vários testes com diferentes massas de amostras, volumes de extratores e diferentes filtros qualitativos e quantitativos, afim de selecionar as melhores condições para extração.

Após a adequação do sistema, foram feitas extrações das SH de turfa em fluxo contínuo utilizando como extratores NaOH, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ e KOH nas concentrações $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

II.1.3. Extração de substâncias húmicas

II.1.3.1. Fluxo contínuo

Transferiram-se 5,00 g de amostra de turfa para o frasco de extração (FE) com agitação magnética, adicionaram-se solução de extrator (R₁) com fluxo de 5,0 mL min⁻¹ pelo tubo 1 (T₁). Nitrogênio foi injetado no frasco extrator em fluxo de 100 mL min⁻¹ para minimizar a oxidação do material extraído. As SH extraídas foram succionadas pelo tubo 2 (T₂) passando pelo filtro (F₁) para retenção da parte insolúvel, denominado humina e o sobrenadante é então seco em estufa com renovação de ar para determinação do rendimento.

A Figura II.4 mostra detalhes do sistema de extração de SH em fluxo contínuo

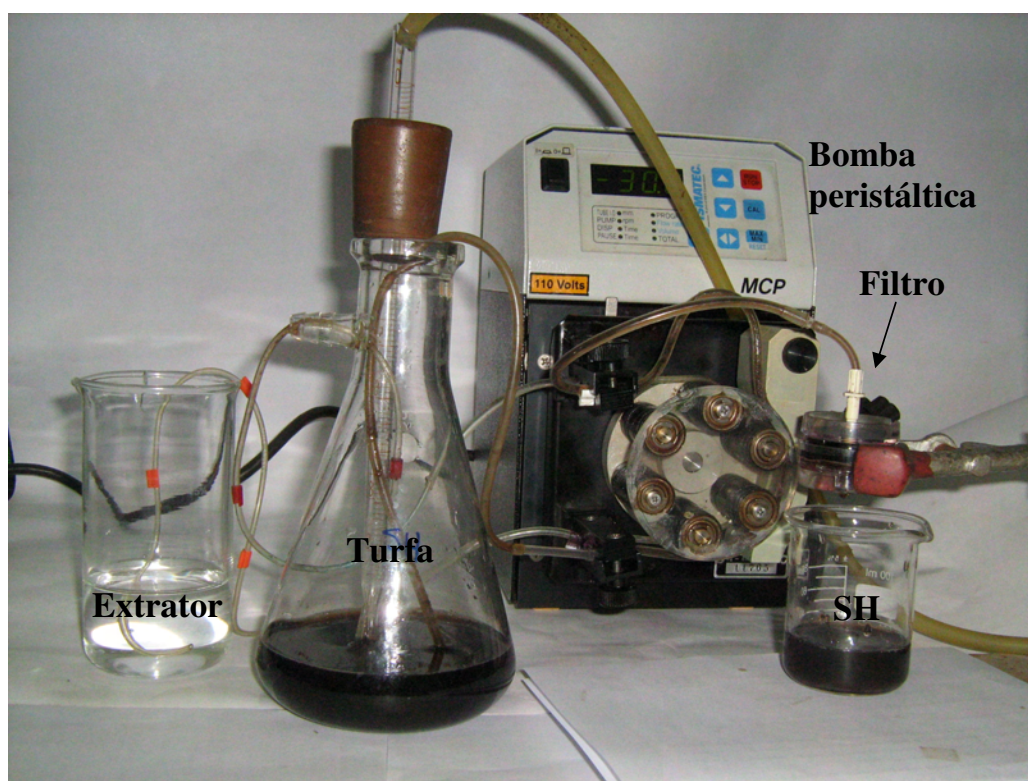


Figura II.4. Sistema para extração em fluxo contínuo de substâncias húmicas de turfas para fins comerciais.

II.1.3.2. Batelada

Para extração das substâncias húmicas por batelada, utilizou-se a metodologia recomendada pela IHSS, (ROSA *et al.*, 2000). Em 5,0g de turfa, adicionou-se solução de extratores na razão 1:10 (m/v) e deixou-se a mistura sob agitação mecânica por 4 horas no equipamento Jar Test – JT 102, sob atmosfera de nitrogênio. Separou-se o sobrenadante colocando-o para secar em estufa com renovação de ar para determinação do rendimento. A Figura II.5 ilustra o sistema de extração das substâncias húmicas de turfa por batelada.



Figura II.5. Equipamento de extração das substâncias húmicas de amostras de turfas por batelada.

II.1.4. Purificação das substâncias húmicas

Impurezas inorgânicas (p.ex. sais, espécies metálicas etc.) e orgânicas (p.e. carboidratos, proteínas, lipídeos etc.) geralmente presentes nos estratos das SH (WERSHAW *et al.*, 1993).

II.1.4.1. Preparação das membranas de diálise

O procedimento para a preparação das membranas de diálise (SAMLESS CELL 16 X 100 CLEAR) foi conduzido como descrito por TOWN *et al.* (1992). Após tratamento por 10 minutos com soluções de NaHCO_3 2 % (m/v) e Na_2EDTA 0,01 mol L^{-1} , as membranas foram lavadas com água (65°C) e estocadas a -6 °C.

II.1.4.2. *Diálise das substâncias húmicas*

As SH extraídas das amostras de turfa foram transferidas para membranas de diálise purificadas e num bquer, fez-se a imersão em água desionizada. Mergulhou-se o eletrodo de um condutímetro deixando sob agitação magnética. Substituíu-se a água do sistema quando a condutividade estabilizava, até que a condutividade do sistema fosse igual à condutividade da água ultrapura usada inicialmente; $0,054 \mu\text{S cm}^{-1}$. Em seguida transferiram-se as SH para placas de Petri previamente taradas e secou-se em estufa com renovação de ar a 55°C até massa constante. A Figura II.6 ilustra o sistema de purificação das substâncias húmicas extraídas das amostras de turfas.



Figura II.6. Purificação das substâncias húmicas extraídas por fluxo contínuo de amostras de turfas.

II.1.5. Determinações do rendimento das extrações

O rendimento das extrações foi calculado pela relação entre a massa de turfa seca submetida à extração e a massa de material orgânico extraído no sistema em fluxo contínuo e por batelada.

II.1.6. Montagem e otimização de planta piloto para extração em fluxo de substâncias húmicas para fins comerciais

A planta piloto para extração de substâncias húmicas em fluxo para fins comerciais foi montada e otimizada na Universidade Federal de Alagoas – Campus Arapiraca.

Na Figura II.7 exibe-se a planta piloto montada no Campus da UFAL Arapiraca-AL para extração em fluxo de substâncias húmicas para fins comerciais.

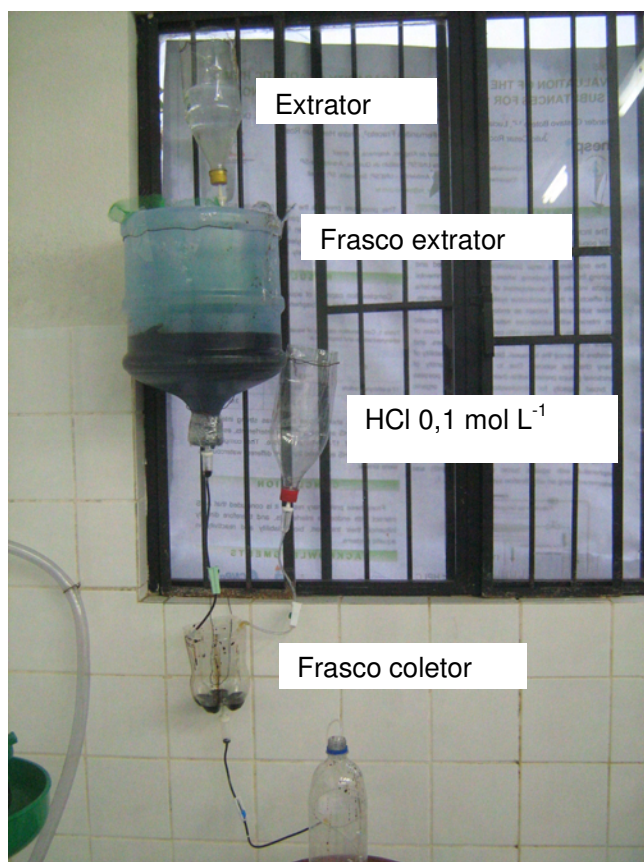


Figura II.7. Planta piloto para extração em fluxo contínuo de substâncias húmicas para fins comerciais.

II.1.7. Determinação da capacidade complexante das substâncias húmicas em fluxo contínuo por diferentes extratores por macro e micronutrientes

Para determinação da capacidade complexante das SH extraída de amostras de turfa em fluxo por macronutrientes (Ca^{2+} e Mg^{2+}) e micronutrientes (Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} e Mo^{2+}) utilizou-se o sistema de ultrafiltração tangencial

proposto por BURBA (2001) e apresentado na Figura I.3. As titulações foram feitas em volume de 250 mL de solução de SH 100 mg L⁻¹ extraídas com NaOH 0,1 mol L⁻¹, KOH 0,5 mol L⁻¹ e Na₄P₂O₇ 0,1 mol L⁻¹, ajustou-se o pH em torno de 5,5 com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹. Antes da adição das soluções de micro e macronutrientes, deixou-se o sistema bombeando por cerca de cinco minutos para condicionamento da membrana. A seguir filtrou-se a primeira alíquota (cerca de 2 mL), a qual corresponde ao tempo zero, ou seja, antes da adição da solução dos nutrientes. Essa alíquota contém uma pequena quantidade de nutrientes, correspondente a fração livre (não complexada às SH), mais aquela fração ligada originalmente as SH com tamanho molecular menor que 1 kDa. Adicionaram-se alíquotas de solução dos nutrientes à solução de SH para atingir concentrações finais 0,24; 0,48; 0,72; 1,32; 1,92; 2,52; 3,72; 4,92; 6,12 e 7,32 mg L⁻¹. Após cada adição deixou-se o sistema sob agitação por 10 minutos para atingir o equilíbrio de complexação. Coletaram-se alíquotas (cerca de 2 mL) e as concentrações das macro e micronutrientes livres foram determinadas por ICP-OES (SANTOS *et al.*, 2007).

II.1.8. Determinação dos macro e micronutrientes

A concentração dos macro e micronutrientes foram determinadas por espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio induzido (ICP-OES), Thermo Jarrel Ash (SANTOS *et al.*, 2007), utilizando-se soluções padrões mista para curva analítica e as seguintes condições experimentais.

- . detecção simultânea (CID “change-injection device”);
- . leitura em axial;
- . nebulizador concêntrico, 32psi;
- . gás de nebulização e refrigeração argônio;
- . aspiração da amostra, 1,9 mL min⁻¹;
- . fluxo de gás auxiliar, 0,50 L min⁻¹;
- . radio frequência, 1350W;
- . tempo de integração, 20 s;
- . fluxo de gás externo argônio, 15 L min⁻¹.

II.2. Substâncias húmicas de turfas enriquecidas com nutrientes para aplicação agrícola: competição entre nutrientes e metais potencialmente tóxicos presentes em solos tropicais.

II.2.1. Materiais e reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza analítico ACS. As soluções ácidas foram preparadas por diluição de 30% ácido clorídrico (Suprapur, Merck AG) e 65% de ácido nítrico (Merck AG, grau analítico, pré-purificada por destilação) com água de alta pureza (sistema Milli-Q, Millipore). Padrão sintético (Multi-elementar ICP - Merck AG) foi usado para calibrações.

II.2.2. Extração das substâncias húmicas

As amostras de turfas foram coletadas na região do Rio Mogi, nas proximidades do município de Ribeirão Preto-SP. As substâncias húmicas foram extraídas de acordo com o procedimento recomendado pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS).

II.2.3. Purificação das substâncias húmicas

As substâncias húmicas extraídas das amostras de turfas foram transferidas para tubos de diálise e dializadas com água desionizada para eliminação de sais solúveis. A água externa foi trocada três vezes depois de 3-5 horas e depois de 12 horas até que os íons Cl^- não fossem detectados.

II.2.4. Caracterização das substâncias húmicas

II.2.4.1. Análise elementar

A composição da análise elementar (C, H, N, O e S) das amostras de SH foi determinada usando analisador elementar Thermo Finnigan Flash EA 1112.

II.2.4.2. Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

Os espectros de EPR foram adquiridos em um equipamento Bruker EMX-operacional espectrômetro de marca na banda X (~ 9 GHz), à temperatura ambiente. Para a análise quantitativa, tubos de quartzo foram preenchidos com as amostras de SH, observando as suas respectivas massas para posterior normalização dos dados. A aproximação $I \times (\Delta H_{PP})^2$ foi usado para obter as áreas dos picos, quando I é a intensidade do sinal e (ΔH_{PP}) a distancia de pico a pico do sinal. Os radicais livres do tipo semi-quinona foram quantificados pelo método padrão secundário, utilizando um cristal de rubi (Al_2O_3), contendo 0,5 wt.% de Cr (III). Seu fator g é de 1,263, não interferindo com o radical livre semi-quinona, cujo valor de g está em torno de 2,003 (WEIL, 1994)

II.2.4.3. Espectroscopia na região visível (E_4/E_6)

A razão E_4/E_6 foi determinada por dissolução de 2,0 mg de SH de turfa em 10 mL de solução 0,05 mol L^{-1} de $NaHCO_3$, fazendo em seguida leituras de absorbância a 465 e 665 nm em espectrômetro Hitachi U2000 (GAO *et al.* 1999).

II.2.5. Interações entre substâncias húmicas e espécies metálicas

II.2.5.1. Determinação da capacidade complexante de substâncias húmicas de turfas por micro e macronutrientes, e metais potencialmente tóxicos presentes em solos tropicais.

Para a determinação da capacidade complexante das substâncias húmicas por metais potencialmente tóxicos (Al e Pb) / micro e macronutrientes (Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Zn, Ca e Mg), utilizou-se o procedimento analítico proposto por BURBA *et al.* (2001) ilustrado na Figura I.3. Este procedimento

baseia-se na utilização de um sistema de ultrafiltração tangencial (Sartorius Ultrasart X), equipado com membrana de 1 kDa (Gelman Pall-Filtron OMEGA,) a qual impede a passagem das SH e dos complexos SH/metais com tamanho molecular maior que 1 kDa. Logo, os íons metálicos livres não complexados às SH ou trocados por elas passam através da membrana.

II.2.5.2. Competição entre metais potencialmente tóxicos presentes em solos tropicais e substâncias húmicas enriquecidas com macro e micronutrientes.

Com base na capacidade de complexação das SH, em 40 mL de solução de SH $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$ adicionaram-se 10 mL de solução padrão multielementar de micro e macronutrientes (20 mg L^{-1} de Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Zn, Ca e Mg). Ajustou-se o pH em 5,0 com solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, adicionou-se água até o volume de 200,0 mL e deixou-se a solução sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente (cerca de 28°C). Utilizou-se o sistema de ultrafiltração tangencial equipado com membrana de 1kDa (Figura I.3). Antes da adição da solução dos metais potencialmente tóxicos (Al, Pb), deixou-se o sistema bombeando por cerca de cinco minutos para condicionamento da membrana. A seguir, filtrou-se a primeira alíquota (cerca de 2 mL), a qual corresponde ao tempo zero, ou seja, antes da adição da solução do metal não essencial. Essa alíquota contém uma pequena quantidade de metais correspondente à fração livre (não complexadas às SH) mais aquela fração ligada às SH, com tamanho molecular menor que 1kDa.

Adicionaram-se alíquotas de solução do metal não essencial ($500,00 \text{ mg L}^{-1}$) à solução de SH-micro e macronutrientes para atingir concentrações finais 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 5,00; 10,00 e $20,00 \text{ mg L}^{-1}$. Após cada adição deixou-se a mistura sob agitação por 30 minutos para atingir o equilíbrio de troca (SANTOS *et al.*, 2007). Coletaram-se alíquotas (cerca de 2 mL) e as concentrações das espécies metálicas livres foram determinadas por espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio induzido (ICP-OES).

II.3. Interações entre substâncias húmicas aquáticas e interferentes endócrinos

II.3.1. Materiais e reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza. As soluções ácidas e básicas utilizadas na extração das SHA foram preparadas por diluição de 30% ácido clorídrico (Suprapur, Merck AG) ou hidróxido de sódio monohidratado (suprapure, Merck AG, Germany) em água de alta pureza (sistema Milli-Q, Millipore). O adsorvente XAD 8 (Serva Feinbiochemica, Germany) necessário para isolar as SHA, foi pré-purificado com sucessivas imersões em HCl 0,5 mol L⁻¹, NaOH 0,5 mol L⁻¹ e metanol (24 h cada). As soluções estoque de Bisfenol A (Sigma-Aldrich) and 17 α -etinilestradiol (Sigma-Aldrich) foram obtidas por solubilização em acetonitrila (Merck AG, Germany).

II.3.2. Local de amostragem e caracterização das amostras de água

O Rio Itapanhaú está localizado no Parque Estadual da Serra do Mar (Latitude: 23°50'23"S, Longitude: 46°08'21"W), em uma área de proteção ambiental na 7ª Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHs) na Baixada Santista, município de Bertioga-SP. O Rio Ribeira do Iguape está situado na Estação Ecológica Juréia (Latitude: 24°41'59"S, Longitude: 47°33'05"W), localizado no 11ª Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHs) no município de Iguape-SP. Essas regiões são caracterizadas por clima temperado tropical, índice pluviométrico de 2,692 mm/ano, humidade de 81,2% e tempo de exposição de sol de 152,5 horas/mês em Janeiro e 96,8 horas/mês em julho.

Para caracterização das amostras de água, pH, temperatura, condutividade e oxigênio dissolvido foram determinados *in situ* após calibração do equipamento, usando soluções padrões de referência. No laboratório, as amostras de água foram digeridas com HNO₃ concentrado a 120°C e as concentrações dos metais Cu, Fe, Mn e Ni foram determinados por espectroscopia de absorção atômica. Os teores de carbono orgânico dissolvido (COD) presente nas amostras de água foram determinados por combustão

catalítica com fluxo de oxigênio e em sequência detecção de Infra Vermelho com Shimadzu TOC 5000 analyzer (ROSA *et al.*, 2006).

II.3.3. Extração das substâncias húmicas aquáticas por resina XAD 8.

As substâncias húmicas aquáticas (SHA) foram extraídas das amostras de águas após filtração em membranas de 0,45 μm , acidificadas em pH 2,0 com HCl 0,5 mol L^{-1} e extraídas por resina XAD 8, seguindo recomendações de AIKEN *et al.* (1985). Após eluição com NaOH 0,1 mol L^{-1} , as SHA concentradas foram acidificadas a pH 5,0 com solução de HCl 0,1 mol L^{-1} HCl, evaporado a vácuo e seco em estufa de circulação de ar a 55 $^{\circ}\text{C}$ (ROSA *et al.*, 2006).

II.3.4. Caracterização das substâncias húmicas aquáticas

A composição elementar (C,H,N,O e S) das SHA foram determinadas usando analisador elementar Thermo Finnigan Flash EA 1112. Os experimentos de RMN ^{13}C com polarização cruzada (PC) e rotação do ângulo mágico (MAS) com amplitude variável (VA) foram feitos em um espectrômetro Varian (modelo Unity Inova 400). As amostras de SHA foram acondicionadas em um rotor cilíndrico de zircônia, com 5 mm de diâmetro (Doty Supersonic), girando a 6 kHz em um probe Doty Supersonic para provas sólidas. Os espectros de RMN ^{13}C VACP/MAS foram obtidos nas seguintes condições experimentais: frequência de ressonância de 100.05 MHz para ^{13}C , banda espectral para polarização cruzada de 20 kHz, pulso de preparação do próton de 3,8 μs , tempo de contato de 1 ms, tempo de aquisição de 12,8 ms e tempo de espera para relaxação de 500 ms. Os valores de deslocamento químico foram referenciados ao hexametil benzeno (HMB), o qual possui linha bem definida em 17,2 ppm.

II.3.5. Interações entre substâncias húmicas aquáticas e interferentes endócrinos

Para os estudos de interação entre SHA e IE (17 α -etinilestradiol e Bisfenol A), utilizou-se o procedimento analítico baseado em ultrafiltração proposto por BURBA *et al.* (2001) e ilustrado na Figura I.3. Este procedimento

baseia-se na utilização de um sistema de ultrafiltração tangencial (Sartorius Ultrasart X), equipado com membrana de 1 kDa (Gelman Pall-Filtron OMEGA) o qual permite a separação dos complexos SHA-IE com tamanho molecular maior que 1 kDa em relação aos IE livres.

II.3.5.1. Determinação do tempo de equilíbrio de complexação entre SHA e 17 α -etinilestradiol e Bisfenol A

Estudos cinéticos de complexação das SH fornecem importantes informações quanto ao tempo mínimo necessário para que a espécie química em estudo se complexa às SHA. Adicionaram-se 8,00 mL da solução de 100 mg L⁻¹ de 17 α -etinilestradiol e Bisfenol A à 192,0 mL de uma solução de SHA 20 mg L⁻¹ e 10 alíquotas de 1,0 mL cada foram coletadas em intervalos entre 5 e 210 minutos. Após as determinações dos IE por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa, o tempo de equilíbrio de complexação foi determinado representando graficamente a concentração de metal livre em função do tempo.

II.3.5.2. Determinação da capacidade de complexação das SHA por 17 α -etinilestradiol e Bisfenol A.

As titulações foram feitas em volume de 200 mL de solução de SHA 20 mg L⁻¹, ajustou-se o pH em 5,0 com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹. Antes da adição da solução dos IE, deixou-se o sistema bombeando por cerca de cinco minutos para condicionamento da membrana. A seguir filtrou-se a primeira alíquota (cerca de 2 mL), a qual é correspondente ao tempo zero, ou seja, antes da adição da solução dos IE. Adicionaram-se alíquotas de solução de IE à solução de SHA para atingir concentrações finais 0,05; 0,15; 0,25; 0,35; 0,45; 0,55; 0,65 e 0,75 mg L⁻¹ em IE. Entre cada adição deixou-se a mistura sob agitação por 30 minutos para atingir o equilíbrio de troca. Coletaram-se alíquotas (cerca de 2,0 mL) e as concentrações dos IE foram determinadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. A capacidade complexante das SHA foi determinada representando graficamente a

concentração dos IE adicionados pelos IE “livre” (separado usando o sistema de ultrafiltração).

II.3.5.3. Competição entre interferentes endócrinos e substâncias húmicas aquáticas

Com base na capacidade de complexação das SHA, em 196 mL de solução de SHA 20 mg L⁻¹, adicionaram-se 2 mL de cada solução padrão dos interferentes endócrinos 100 mg L⁻¹ ajustando-se o pH em 5,0 com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹. Antes da adição da solução dos IE, deixou-se o sistema bombeando por cerca de cinco minutos para condicionamento da membrana. A seguir, recolheu-se cerca de 1,0 mL das alíquotas contendo os IE livres, nos seguintes tempos: 0, 10 min, 30 min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 8h, 24h, 48h e 72h.

II.3.6. Análise Cromatográfica

II.3.6.1 Metodologia de extração

A otimização da extração dos analitos usando cartuchos Nexus (Varian) foi realizada de acordo com as recomendações Nexus para interferentes endócrinos. Primeiramente, 10 mL de cada amostra foi passada através de um cartucho Nexus (3 mL) preenchidos com 60 mg do adsorvente. Após a secagem a vácuo, os cartuchos foram eluídos com 5 mL de metanol / acetato de etila (10:90, v/v). Os extratos foram então derivatizados, após a evaporação do metanol/acetato de etila. As soluções padrões e amostras foram derivatizadas de acordo com o procedimento proposto por JEANNOT *et al.* (2002), o qual consiste em evaporar até a secura a 30°C, adicionou-se 50 µL do agente derivatizante conhecido como BSTFA, os tubos de ensaio foram fechados e colocados em banho de água termostatizada a 60 °C por 30 min. Em seguida, foram adicionados 500 µL de 2,2,4-trimetilpentano (isooctano) e levados a banho de ultrasom por 10 min. Em seguida, foram completadas com isooctano até 1 mL e analisadas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS).

II.3.6.2 Análise cromatográfica

Usou-se o aparelho GC-MS 450-GC (Varian) equipado com um injetor com programação de temperatura (split-splitless) modelo 1079 acoplado a um espectrômetro de massa 200-MS com ION-TRAP e um software gerenciador SATURNO 2000 (Varian).

Foram injetados 40 µL dos extratos derivatizados. A temperatura inicial do injetor foi de 90°C, mantida por 1,5 min, em seguida, aumentada a uma razão de 200°C min⁻¹ até a temperatura de 300°C e mantida por 12,4 min. A válvula split-splitless foi operada no modo split até 1,5 min, em modo splitless de 1,5 a 3 min, e retornado ao modo split de 3 até 15 min.

Os compostos foram separados por uma coluna VF-5ms (95% dimetil-5% fenilpolisiloxano; Varian-Chrompack, Les Ulis. France). A temperatura inicial da coluna foi mantida a 90°C por um período de 0,5 min, aumentada a uma razão de 30°C min⁻¹ até 240°C, em seguida, aumentada lentamente a 5°C min⁻¹ até 280°C, a qual foi mantida por 1,5 min. O gás de arraste utilizado foi o hélio 6,0 a um fluxo de 1,2 mL min⁻¹. A temperatura da linha de transferência foi de 280°C.

As análises qualitativas referem-se as condições: tempos de retenção e íons de quantificação foram 7,97 min e m/z 357 de bisfenol A, e 12,73 min e m/z 368 e 285 para 17α-etinilestradiol.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

III. Resultados e Discussão

III.1. Otimização de metodologia para extração em fluxo contínuo de substâncias húmicas de amostras de turfa para fins comerciais

III.1.1. Extração de substâncias húmicas em fluxo contínuo e batelada

Após a montagem do sistema de extração de SH em fluxo contínuo, foram verificados diferentes parâmetros como: fluxo de extrator, fluxo de SH, massa de amostra, volume de extrator e filtro qualitativo para retenção do material insolúvel, denominado humina.

As condições que apresentaram melhores rendimentos e menores inconvenientes foram:

- Fluxo de extrator: $5,0 \text{ mL min}^{-1}$;
- Fluxo de SH: $2,0 \text{ mL min}^{-1}$;
- Velocidade da bomba peristáltica: 30 rpm;
- Massa de amostra: 5,0 g
- Razão amostra:extrator 1:10

Diferentes filtros foram testados e utilizou-se um Monitor de Análise de Aerossol da marca Millipore de poliestireno adaptado com papel de filtro qualitativo Whatman nº 42 como sistema de filtração. Esse filtro mostrou-se eficiente na retenção do material insolúvel, diminuindo problemas com entupimento, exercendo uma pressão no interior do sistema. O filtro adaptado pode ser observado na Figura III.1.



Figura III.1. Sistema de filtração adaptado (Amostrador de Aerossol – Millipore), utilizado no sistema de extração em fluxo contínuo.

Após a otimização do sistema em fluxo contínuo foram feitas extrações com diferentes extratores (NaOH , KOH e $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) em diferentes concentrações ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,5 \text{ mol L}^{-1}$).

Para avaliação da eficiência do sistema em fluxo, foram feitas extrações por batelada também com diferentes extratores e concentrações e os resultados dos rendimentos obtidos nos dois métodos estão listados na Tabela III.1.

Tabela III.1. Rendimentos das extrações de substâncias húmicas em amostras de turfa pelos sistema em fluxo contínuo e por batelada.

Extratores	Rendimento (% m/m) por batelada	Rendimento (% m/m) por fluxo contínuo
$\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$	50,00	68,00
$\text{NaOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$	48,00	65,00
$\text{KOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$	35,00	42,00
$\text{KOH } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$	40,00	45,00
$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \text{ } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$	35,00	38,00
$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \text{ } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$	37,00	41,00

Os resultados mostraram que o sistema de extração em fluxo contínuo apresentou melhores rendimentos quando comparado com o sistema por batelada, diminuindo o tempo necessário para extração (em aproximadamente

2 horas), devido a contínua extração do material húmico pelo extrator, o qual vai sendo renovado. Esses resultados corroboram com aqueles obtidos por ROSA *et al.* (2000) onde avaliou-se a extração em fluxo contínuo de substâncias húmicas de solos com NaOH.

Com relação aos diferentes extratores, os maiores rendimentos nos dois sistemas de extração foram obtidos quando utilizou-se NaOH 0,1 mol L⁻¹ como extrator, entretanto o Na₄P₂O₇ tem sido amplamente utilizado na extração de SH, produzindo pequenas alterações químicas e diferentes estudos tem sugerido o uso de mistura de NaOH e Na₄P₂O₇ como extrator (ZACCONE *et al.*, 2007). Os rendimentos não apresentaram diferença significativa quanto a concentração dos extratores.

III.1.2. Montagem da planta piloto para extração em fluxo de substâncias húmicas para fins comerciais.

A Figura II.7 mostra a planta piloto montada no Campus da UFAL Arapiraca-AL para extração em fluxo de substâncias húmicas para fins comerciais.

Para a montagem da planta piloto utilizou-se materiais de baixo custo e o sistema em fluxo baseou-se na gravidade, eliminando assim, a necessidade de bomba peristáltica, o que pode encarecer o processo.

Na planta piloto projetada, utilizou-se recipiente de 30 L, garrafas PET e materiais utilizados em procedimentos de enfermagem, os quais permitem controlar o fluxo controlado dos reagente e das substâncias húmicas extraídas.

No frasco onde ocorre a extração das SH, foi necessário utilizar duas camadas de telas para impedir entupimentos. A adição do HCl 0,1 mol L⁻¹ deve ser feita para fracionar as SH em ácido húmico e ácido fulvico.

Após a montagem da planta piloto para extração de SH em fluxo, fez-se a otimização das condições a fim de garantir maior rendimento para as extrações. As condições que apresentaram melhores rendimentos e menores inconvenientes foram:

- Fluxo de extrator: 10,0 mL min⁻¹;
- Fluxo de SH: 5,0 mL min⁻¹;

- Razão amostra:extrator 1:10;

A extração foi feita com diferentes extratores e após essa etapa, as amostras de SH foram secas em estufas a 60°C.

A extração em fluxo na planta piloto mostrou-se eficiente e independente do extrator, assim foi possível extrair cerca de 100 litros de SH em 8 horas de processo. O processo de extração em fluxo ainda mostrou-se adequado, quando comparado com o processo por batelada, pois dispensa o trabalho em etapas de filtração, centrifugação, ajuste de pH e manuseio das amostras.

III.1.3. Determinação da capacidade complexante das SH de turfas extraídas em fluxo com diferentes extratores por macro e micronutrientes.

Na comercialização das substâncias húmicas como adubo orgânico, além da etapa de extração, também é comum a prática de enriquecimento do material extraído com macro e micronutrientes, que fornece ao consumidor um produto rico do ponto de vista agrônômico, entretanto, pouco se conhece sobre a capacidade das SH extraídas de complexar esses nutrientes. Assim, os dados de capacidade de complexação (CC) são úteis, fornecendo as concentrações máximas de nutrientes que as SH conseguem complexar, evitando desperdícios e possível contaminação.

Na determinação da capacidade complexante das SH extraídas de amostras de turfa em fluxo por macronutrientes (Ca^{2+} e Mg^{2+}) e micronutrientes (Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} e Mo^{2+}), foi feita titulação utilizando-se o sistema de ultrafiltração tangencial. Durante a titulação, primeiro ocorre saturação dos sítios ligantes mais fortes e depois a saturação dos mais fracos.

A Figura III.2 mostra uma curva típica para a determinação das capacidades complexantes das SH pelos nutrientes, onde se representou graficamente a concentração do nutriente livre versus a concentração nutriente total (mmol L^{-1}). As curvas apresentam uma mudança no coeficiente angular e a capacidade complexante é obtida pela intersecção das duas seções lineares (EINAX & KUNZE, 1996).

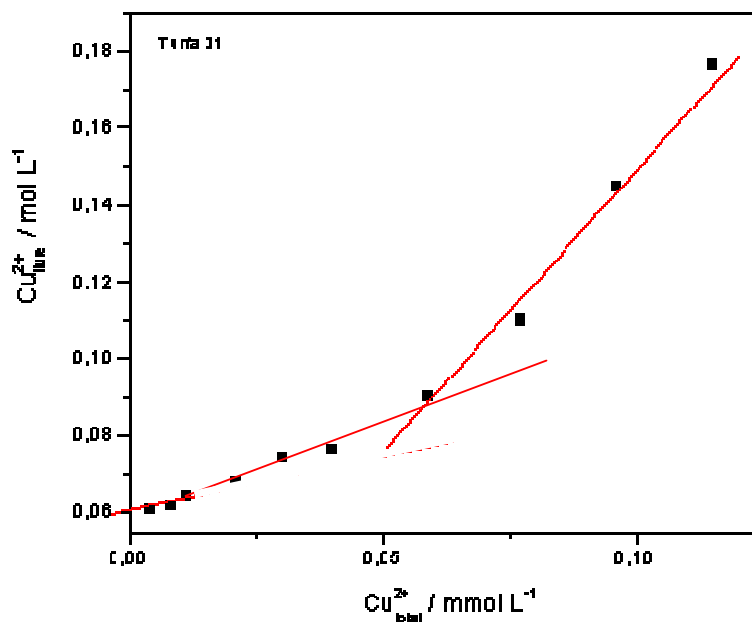


Figura III.2. Curva para determinação da capacidade complexante das substâncias húmicas extraídas de amostras de turfas com NaOH 0,1 mol L⁻¹ por íons Cu²⁺. Condições: pH ≈ 5,5; C_{SH} = 100 mg L⁻¹; I = 0,10 mol L⁻¹ NaNO₃.

A Tabela III.2 apresenta os valores determinados da capacidade complexante das substâncias húmicas extraídas em fluxo de amostras de turfa, utilizando como extrator NaOH 0,1 mol L⁻¹, KOH 0,1 mol L⁻¹ e Na₄P₂O₇ 0,1 mol L⁻¹.

Tabela III.2. Capacidades complexantes das substâncias húmicas extraídas em fluxo de amostras de turfa, com os extratores: NaOH 0,1 mol L⁻¹, KOH 0,1mol L⁻¹ e Na₄P₂O₇ 0,1 mol L⁻¹

SH / Extrator	Capacidades complexantes (mmol metal g ⁻¹ SH)						
	Ca	Mg	Zn	Co	Mn	Cu	Mo
NaOH 0,1 mol L ⁻¹	0,97	0,65	0,50	0,39	0,55	0,45	0,20
KOH 0,1 mol L ⁻¹	0,88	0,63	0,51	0,48	0,53	0,43	0,14
Na ₄ P ₂ O ₇ 0,1 mol L ⁻¹	1,07	0,70	0,53	0,43	0,57	0,41	0,22

Os valores de CC para as SH fornecem importantes informações de natureza quantitativa (quantidades complexadas de cada metal) bem como, quanto à afinidade das mesmas por diferentes espécies metálicas. Assim, de acordo com os dados da Tabela III.2, pode-se estabelecer a seguinte ordem crescente de afinidade entre os íons metálicos estudados pelas substâncias húmicas extraídas com diferentes extratores das amostras de turfa:

SH NaOH 0,1 mol L⁻¹: Mo << Co < Cu ≤ Zn ≤ Mn ≤ Mg < Ca

SH KOH 0,1 mol L⁻¹: Mo << Cu < Co ≤ Zn ≤ Mn ≤ Mg < Ca

SH Na₄P₂O₇ 0,1 mol L⁻¹: Mo << Cu < Co ≤ Zn ≤ Mn ≤ Mg < Ca

Segundo PEARSON (1963), as espécies químicas podem ser classificadas como ácidos e bases "duros" e "moles" e os conceitos de "dureza" e "maciez" ajudam a interpretar parte dos mecanismos envolvidos nas reações de complexação. A tendência dos ácidos "moles" ligarem-se às bases "moles" e a dos ácidos "duros" ligarem-se às bases "duras", explica a forma com que os elementos são encontrados na crosta terrestre. Nesta classificação existem duas classes principais: os elementos litofílicos e os elementos calcofílicos. Os elementos litofílicos são cátions duros, entre eles o magnésio, alumínio, lítio, cálcio, ferro, manganês, que tem grande afinidade por bases duras, como O²⁻. Por outro lado os elementos calcofílicos (ácidos moles) são frequentemente encontrados em combinação com grupos tióis e cianos (bases moles) e incluem cobre, chumbo, zinco, cádmio, dentre outros.

Pelas capacidades complexantes das substâncias húmicas das amostras de turfa com diferentes extratores, observou-se que a maior afinidade está relacionada ao magnésio e ao cálcio, os quais são classificados como ácidos duros. Esta maior afinidade deve estar relacionada com a grande quantidade de grupos oxigenados (bases “duras”) presentes nas amostras de SH. Os elementos Co e Cu apresentaram afinidades intermediárias e o Mo foi o micronutriente que apresentou a menor afinidade pelas substâncias húmicas independente do extrator, corroborando com os dados de MENDONÇA (2010).

Os resultados listados na Tabela III.2 mostram também que os elementos litofílicos (Ca, Mg e Mn) apresentaram maiores capacidades complexantes para as substâncias húmicas extraídas com pirofosfato de sódio em comparação com os outros extratores. Diversos trabalhos mostram que substâncias húmicas extraídas com pirofosfato de sódio apresentam maior concentração de moléculas oxidadas (LAVORENTI *et al.*, 1997; GIEGUZYNSKA *et al.*, 2009). Segundo GIEGUZYNSKA *et al.* (2009) cátions polivalentes como Ca(II) e Mg(II) são capazes de formar ligações entre as cargas locais de superfície negativa e as macromoléculas húmicas aniônicas. Por complexação dos cátions, o pirofosfato libera as macromoléculas orgânicas, as quais apresentam maior concentração de grupos oxigenados e susceptíveis à complexação. Assim, pode-se inferir que a maior afinidade entre Ca e Mg pelas SH extraídas com pirofosfato, deve estar relacionada com a grande quantidade de grupos oxigenados presentes nas estruturas das SH quando se utiliza este extrator.

Os resultados da capacidade de complexação mostraram que independente do extrator, as SH extraídas apresentaram maior afinidade por Ca e Mg, macronutrientes essenciais, e que uma maior complexação é favorecida quando se utiliza pirofosfato de sódio como extrator.

III.2. Substâncias húmicas de turfas enriquecidas com nutrientes para aplicação agrícola: competição entre nutrientes e metais potencialmente tóxicos presentes em solos tropicais.

III.2.1. Caracterização das substâncias húmicas.

As razões atômicas obtidas pelo resultado da análise elementar forneceram informações sobre as características estruturais das substâncias húmicas. A razão H/C está relacionada com o grau de aromaticidade das SH, isto é, quanto menor a razão H/C, maior o grau de aromaticidade das SH. Também, um aumento no conteúdo de hidrogênio indica um maior número de carbonos alifáticos (CH_2) do que carbonos insaturados ($\text{CH}_2=\text{CH}_2$). O valor obtido para a razão atômica H/C está similar ao relatado na literatura (Tabela III.3) (ZACCONE *et al.* 2007).

A razão atômica O/C está relacionada com os teores de carboidratos das SH. Elevados valores dessa razão indicam menor grau de humificação, devido à diminuição nos teores de carboidratos. A amostra em estudo apresenta um menor número de grupos oxigenados, comparado com os dados da literatura (Tabela III.3).

Tabela III.3. Razões atômicas (H/C, O/C) em diferentes amostras de substâncias húmicas extraídas de turfas e solos de diferentes regiões de acordo com a literatura e este estudo.

Amostras	H/C	O/C	Referências
Ácido húmico de solo tropical	1,29-1,45	0,47-0,75	Canellas <i>et al.</i> , 2008
Ácido húmico de turfa	1,05-1,30	0,40-0,65	Zaconne <i>et al.</i> , 2007
Ácido húmico de solo tropical	1,21	0,63	González-Pérez <i>et al.</i> , 2006
Substâncias húmicas de solos tropicais	0,20-0,71	0,80-3,23	Rosa <i>et al.</i> , 2005
Ácido húmico de turfa	1,0-1,6	0,36-0,52	Li <i>et al.</i> , 2003
Substâncias húmicas de turfas	0,79	0,67	Lu <i>et al.</i> , 2000
Este estudo	1,16	1,24	-

A concentração de radicais livres do tipo semi-quinona, obtidos por ressonância paramagnética eletrônica, foi utilizada para caracterizar as SH extraídas de amostras de turfas, pois de acordo com vários pesquisadores (SAAB & MARTIN-NETO, 2007; SERUDO *et al.*, 2007; GONZÁLEZ-PÉREZ *et al.*, 2006; ROSA *et al.*, 2005) fornece boas indicações do grau de humificação da SH em estudo.

O valor médio obtido do teor de radicais livres para as amostras de substâncias húmicas foi de $2,6 \times 10^{18} \pm 0,5 \text{ spin g}^{-1}$ de carbono que são comparáveis às amostras de substâncias húmicas extraídas de solos tropicais (ROSA *et al.*, 2005).

A razão E_4/E_6 é um importante indicativo do grau de condensação da macromolécula húmica que geralmente está associada à sua aromaticidade. O aumento da razão indica estrutura com menor aromaticidade e a diminuição da razão maior aromaticidade. De acordo com a literatura, razões menores que 4 indicam maior presença de estruturas aromáticas condensadas, e valores maiores que 4, presença de poucas estruturas aromáticas condensadas (ROSA *et al.* 2000). O valor determinado para substâncias húmicas extraídas de amostras de turfa da região do Rio Mogi-SP foi de 3,47.

III.2.2. Interações entre substâncias húmicas, macro, micronutrientes e metais potencialmente tóxicos presentes em solos tropicais.

Dentre os metais potencialmente tóxicos com origem em solos tropicais destaca-se o alumínio. Este está presente no solo como fragmentos de rochas aluminossilicatas, minerais secundários, hidróxidos, sais de alumínio e em solução. O teor de alumínio disponível no solo está relacionado com o pH do mesmo (MALAVOLTA, 1976). O excesso de alumínio em solos, além de alterar o pH e influenciar na absorção de nutrientes pelas plantas pode diminuir a taxa de crescimento das mesmas, influenciando no desenvolvimento radicular.

A concentração de chumbo em solos é bem variável e valores mais elevados podem ser determinados em regiões densamente povoadas ou próximas de áreas industriais. FADIGAS *et al.* 2006, propôs valores de referência para a concentração natural de metais potencialmente tóxicos inclusive chumbo. De acordo com esses autores, os valores permitidos dependem de vários fatores, mas principalmente da composição dos solos. A adição de matéria orgânica, calagem e aplicação de fosfatos nos solos reduzem o conteúdo de chumbo disponível e subsequente absorção pelas plantas. A liberação de chumbo em solos aumenta em função da acidez, sendo maior em solos com baixo conteúdo orgânico (MALAVOLTA, 1976).

Os minerais são classificados em micro e macronutrientes, que podem ser fornecidos pelo solo ou por adubos e corretivos para seres autotróficos (vegetais). Dentre a lista de macronutrientes estão, cálcio e magnésio, e na lista de micronutrientes cobalto, cobre, ferro, manganês, molibdênio e zinco (MALAVOLTA, 2006). O níquel é um elemento traço essencial, por exemplo, na enzima uréase. Entretanto, é importante notar que, em excesso, estes nutrientes podem se tornar tóxicos, e sua aplicação direta no solo, sem estudos anteriores sobre suas interações, pode levar a danos ambientais e/ou colheitas reduzidas (MALAVOLTA, 2006).

A capacidade complexante (CC) das SH é um importante parâmetro que fornece a capacidade máxima das SH em complexar determinadas espécies

como íons metálicos. A CC mostra a maior afinidade dos sítios ligantes das SH em estudo por determinada espécie metálica.

A Figura III.3 é uma curva típica que reflete a capacidade de complexação de amostras de substâncias húmicas de turfa com soluções padrões de metais, no caso, Pb(II) com o procedimento de ultrafiltração em fluxo tangencial. A determinação da capacidade de complexação (CC) foi obtida plotando a concentração da espécie metálica livre (mmol L^{-1}) versus a concentração da espécie metálica total (mmol L^{-1}). A curva apresenta uma mudança no coeficiente angular e a capacidade de complexação foi obtida pela intersecção das duas seções lineares do gráfico (EINAX *et al.*, 2001).

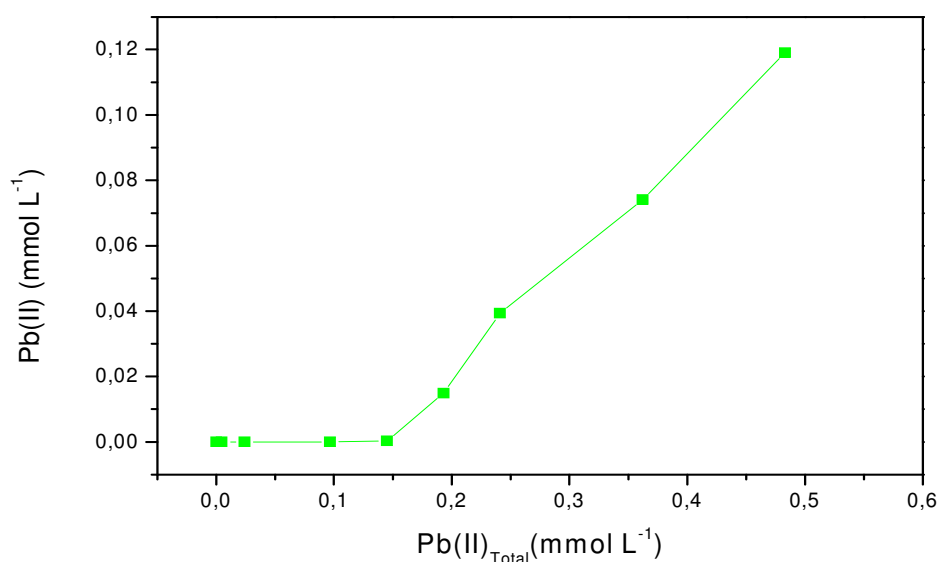


Figura III.3. Curva da capacidade complexante de substâncias húmicas de turfa por Pb(II), utilizando a técnica de ultrafiltração tangencial. Condições: concentração das amostras: C_{SH} : 100 mg L^{-1} ; pH 5.0; $I = 0.10 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaNO}_3$.

Pela análise dos resultados das capacidades complexantes (Tabela III.4.) pode-se descrever a seguinte ordem crescente de afinidade das SH pelos micro e macronutrientes:



Tabela III.4. Capacidade de complexação de substâncias húmicas de turfa por micro e macronutrientes e metais potencialmente tóxicos.

Metais	<i>Capacidade de complexação (mmol metal g⁻¹ TOC)</i>
Ca	4,25
Mg	4,33
Zn	2,10
Co	3,07
Ni	4,58
Mn	4,52
Cu(II)	13,75
Mo	13,37
Al(III)	13,59
Pb(II)	8,33



Macronutrientes



metais potencialmente tóxicos



Micronutrientes

As Figuras III.4. e III.5. mostram as tendências de micro e macronutrientes complexados por substâncias húmicas extraídas de amostras de turfa, frente aos metais potencialmente tóxicos Al(III) e Pb(II), respectivamente.

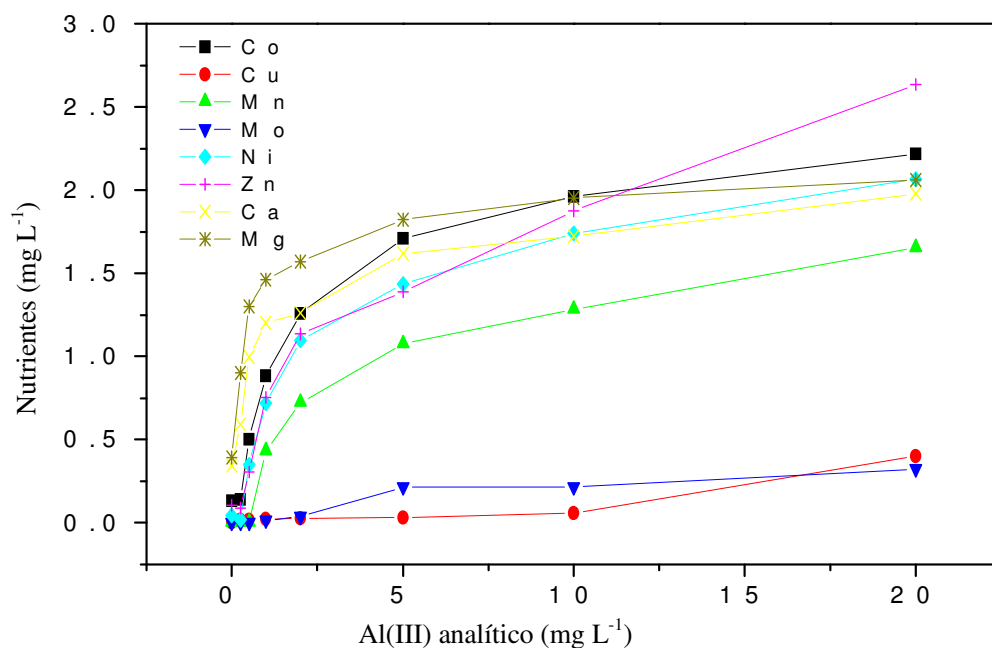


Figura III.4. Competição dos sítios ligantes das substâncias húmicas enriquecidas com micro e macronutrientes por Al(III).

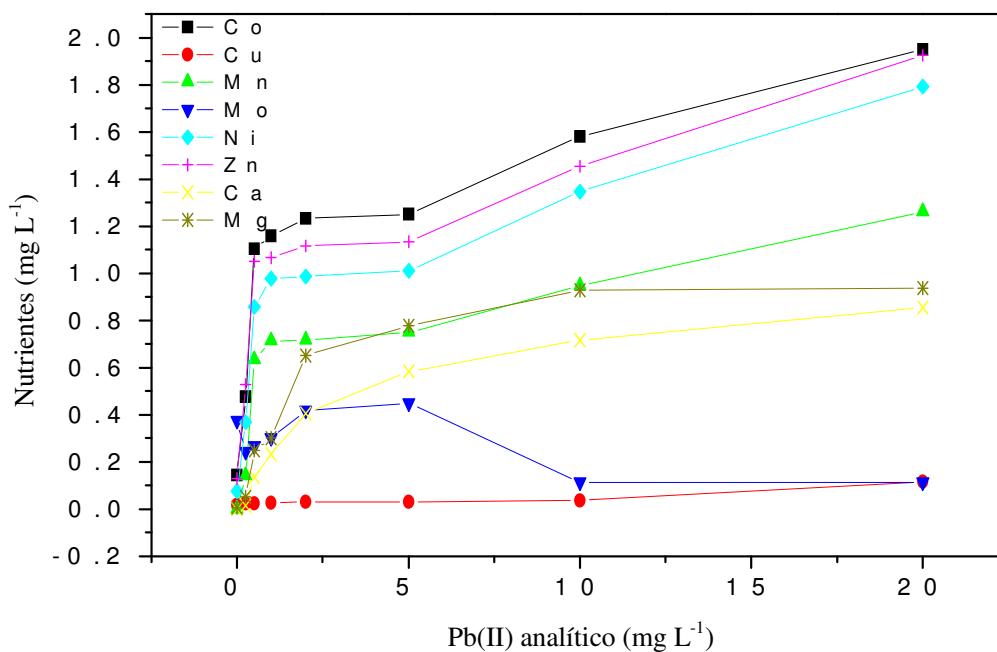


Figura III.5. Competição dos sítios ligantes das SH enriquecidas com micro e macronutrientes por Pb(II).

De acordo com os resultados, os micro e macronutrientes seguem um comportamento semelhante, sendo liberados quando há complexação dos metais potencialmente tóxicos pelas SH. De acordo com os resultados podemos inferir que a liberação dos metais essenciais estudados ocorre depois da ocupação dos sítios de complexação pelos metais potencialmente tóxicos, quando a afinidade destes é maior que a dos micro e macronutrientes.

Os resultados obtidos mostram que Zn(II), Co(II), Ni(II) e Mn(II) são os metais essenciais minoritários mais trocados pelas substâncias húmicas, evidenciando que elas possuem maior afinidade pelos metais potencialmente tóxicos (Al e Pb) que pelos micronutrientes. Mo(II) e Cu(II), são pouco trocados evidenciando sua alta estabilidade pelas substâncias húmicas.

Os resultados mostram também, que os complexos SH-Zn, SH-Co, SH-Ni e SH-Mn são menos estáveis que aqueles formados pelas espécies SH-Al, SH-Pb. Os complexos SH-Mo e SH-Cu possuem estabilidade maior que aqueles formados pelos metais potencialmente tóxicos. Os resultados obtidos corrobora com os estudos feitos por BURBA *et al.* (2001). Os autores citam a alta estabilidade dos complexos SH-Cu, tanto em ambiente aquático e terrestre, frente a outros metais, como também na competição entre diferentes quelantes (EDTA).

O comportamento de troca dos macronutrientes é semelhante ao dos micronutrientes. Quando trocados com Al(III) e Pb(II), o metal de maior labilidade foi o Mg(II), mas Ca(II) também foi liberado, sendo substituído por Al(III) e Pb(II), podendo-se inferir que os complexos *SH- metais potencialmente tóxicos* são mais estáveis que os complexos *SH-Ca* e *SH-Mg*.

Observa-se, que no caso do zinco, cobalto e magnésio, ocorre uma maior liberação de metais essenciais que aquela adicionada, isto ocorre devido à ocupação dos não essenciais não só pelos sítios ocupados pelos nutrientes em contato por 24 horas, mas também pelos sítios que possuem metais originalmente complexados às substâncias húmicas.

Comparando os metais potencialmente tóxicos como trocadores, podemos inferir que metais com capacidade de complexação maiores tendem a formar complexos mais estáveis. Quando os metais potencialmente tóxicos competem com sítios complexados com nutrientes, trocam, liberando-os. Este comportamento não é observado na competição entre os metais

potencialmente tóxicos (Al e Pb) com íons Cu(II), devido a alta estabilidade do complexo SH-Cu.

III.3. Interações entre substâncias húmicas e interferentes endócrinos

III.3.1. Caracterização das substâncias húmicas aquáticas

A Tabela III.5. lista os resultados da caracterização preliminar das amostras de água. Os estudos foram feitos em dois rios para verificar a influencia dos fatores ambientais na formação, decomposição e nas características estruturais das SHA e consequentemente, suas interações nos corpos d'água com 17 α -etinilestradiol e Bisfenol A.

Tabela III.5. Caracterização preliminar das amostras de água dos Rios Itapanhaú e Ribeira do Iguape.

Parâmetros determinados	Amostras de água	
	Itapanhaú	Ribeira de Iguape
pH	4,4 $\pm$ 0,2	5,8 $\pm$ 0,2
Temperatura ($^{\circ}$ C)	23,0 $\pm$ 0,1	21,0 $\pm$ 0,1
Condutividade ($\square$ S cm $^{-1}$)	39,0 $\pm$ 0,4	303,0 $\pm$ 0,5
Oxigênio dissolvido (mg L $^{-1}$)	2,2 $\pm$ 0,2	5,1 $\pm$ 0,2
Carbono Orgânico Total (mg L $^{-1}$)	15,3 $\pm$ 2,1	37,8 $\pm$ 2,4
Absorbância em 436 nm (A)	0,085	0,220
Absortividade Molar (A L/cm mol C)	66,7	71,4
Metais Totais		
Fe (μ g L $^{-1}$)	909,0 $\pm$ 0,4	1455,0 $\pm$ 5,8
Mn (μ g L $^{-1}$)	250,1 $\pm$ 0,6	50,6 $\pm$ 0,3
Cu (μ g L $^{-1}$)	0,83 $\pm$ 0,1	3,2 $\pm$ 0,1
Pb (μ g L $^{-1}$)	7,3 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,2
Ni (μ g L $^{-1}$)	30,8 $\pm$ 0,7	6,8 $\pm$ 0,6

As SHA foram caracterizadas pela razão atômica (C/H e C/O) calculado a partir dos dados de análise elementar e dados dos grupos funcionais quantificados por RMN ^{13}C (Tabela III.6.)

Tabela III.6. Resultados da razão atômica (C/H, C/O) e grupos funcionais quantificados por RMN ^{13}C das amostras de substâncias húmicas aquáticas extraídas do Rio Itapanhaú (RI), Rio Ribeira do Iguape (RRI) e literatura.

Parâmetros	Amostras				
	RI	RRI	Itapanhaú (ROMÃO, 2001)	Rio Negro (ROMÃO, 2001)	Rio Negro (SERUDO, <i>et al.</i> , 2007)
C/H	0,84	0,95	3,7	3,6	8,5
C/O	1,1	1,1	1,2	1,2	0,9
Alifático (%)	34,2	31,9	25,0	23,1	32,0
Éter(%)	20,0	16,6	15,2	12,3	22,0
Aromático (%)	23,1	22,8	33,6	38,0	9,0
Fenol (%)	3,2	5,3	4,8	6,2	11,0
Carboxílicos, éters e amidas (%)	13,7	13,4	18,5	15,4	14,0
Aldeídos / Cetonas (%)	5,8	9,9	2,9	5,0	11,0

Comparando-se os dados da razão atômica C/H, verifica-se que as amostras de SHA extraídas de Ribeira de Iguape possuem uma característica mais aromática que as SHA extraídas rio Itapanhaú (ROSA et al., 2005a; ROSA et al., 2001; STEVENSON, 1994). A razão atômica C/O se refere ao conteúdo de carboidratos presente nas SH. Elevados valores da razão C/O indicam um elevado grau de humificação, devido a diminuição de carboidratos de grupos COOH e OH (tanto aromáticos quanto alifáticos). Observa-se nos valores das razões atômicas C/O uma proporção muito semelhante na distribuição de grupos oxigenados nas estruturas das SHA estudadas e aquelas encontradas na literatura.

As variações nos tipos de carbonos das amostras, observadas através dos espectros de RMN ^{13}C , mostram diferenças estruturais das SHA extraídas dos diferentes mananciais em estudo e de outros dados da literatura (ROMÃO *et al.*, 2001; SERUDO *et al.*, 2007). Essas diferenças estão associadas ao processo de decomposição da matéria orgânica original, o qual tende a levar a transformações que dependem do tipo de substrato original, presença e características de microorganismos, além de outros fatores ambientais tais como: intensidade de radiação solar, temperatura, oxigênio, pH etc (OLIVEIRA *et al.*, 2007; ROCHA *et al.*, 2003).

III.3.2. Interações entre substâncias húmicas aquáticas e interferentes endócrinos

A Figura III.6. A e B mostram a curva típica para determinação do tempo de equilíbrio de complexação entre o 17 α -etinilestradiol e SHA extraída do Rio Ribeira de Iguape (A) e Bisfenol A e SHA extraída do Rio Itapanhau (B).

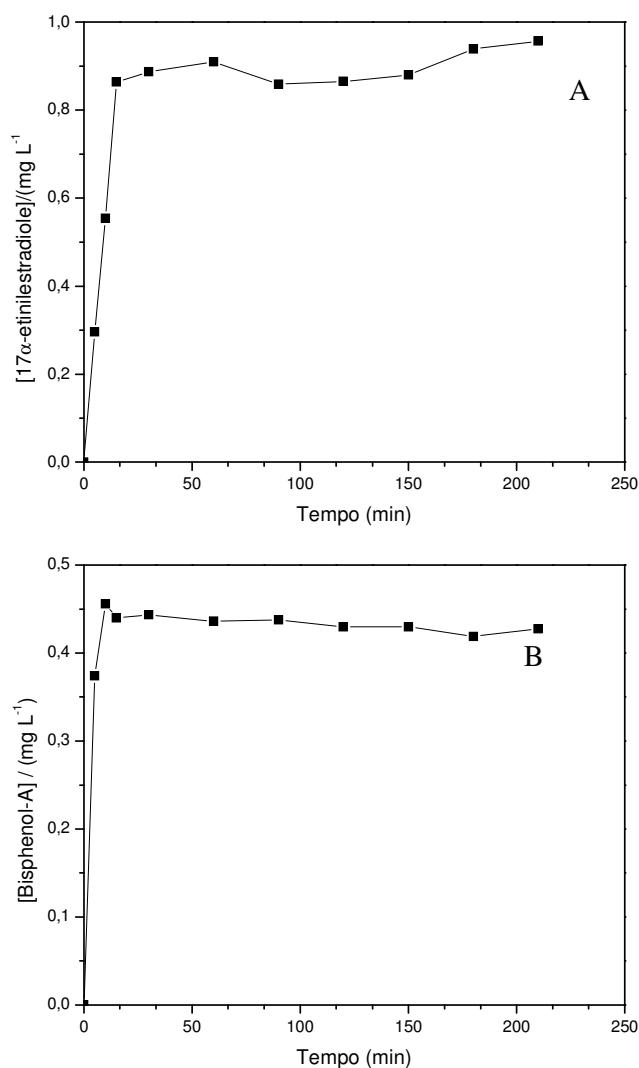


Figura III.6. Tempo de equilíbrio entre (A) 17α-estradiol e substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras do Rio Ribeira de Iguape, e (B) bisfenol A e substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras do Rio Itapanhaú.

Segundo OLIVEIRA *et al.* (2007), os complexos com a matéria orgânica tendem a se estabilizar em função do tempo, ocorrendo rearranjos inter e/ou intra moleculares com transferência das espécies complexantes para os sítios de complexação mais internos das moléculas.

O equilíbrio de complexação entre os IE e SHA extraída dos diferentes rios ficaram em torno de 20 minutos para ambos IE e os resultados são comparáveis com aqueles determinados em estudos de complexação entre SH extraídas de diferentes matrizes e elementos inorgânicos potencialmente

tóxicos, que apresentaram cinética de complexação em torno de 30 minutos.(SANTOS *et al.*, 2008, ROSA *et al.* 2006).

Na titulação das SHA com interferentes endócrinos, primeiro ocorre a saturação dos sítios de complexação mais fortes, seguido pela saturação dos mais fracos (ROCHA & ROSA, 2003). A Figura III.7. apresenta uma curva típica da titulação de substâncias húmicas aquáticas solução padrão de IE, por exemplo, Bisfenol A, usando o processo de ultrafiltração em fluxo tangencial. A capacidade de complexação (CC) foi determinada através da representação gráfica da concentração de IE livre (mg L^{-1}) em função da concentração IE total (mg L^{-1}). A curva apresenta uma mudança de inclinação e a capacidade de complexação é obtida pela intersecção das duas secções lineares do gráfico (SANTOS *et al.*, 2008, EINAX & KUNZE, 2001).

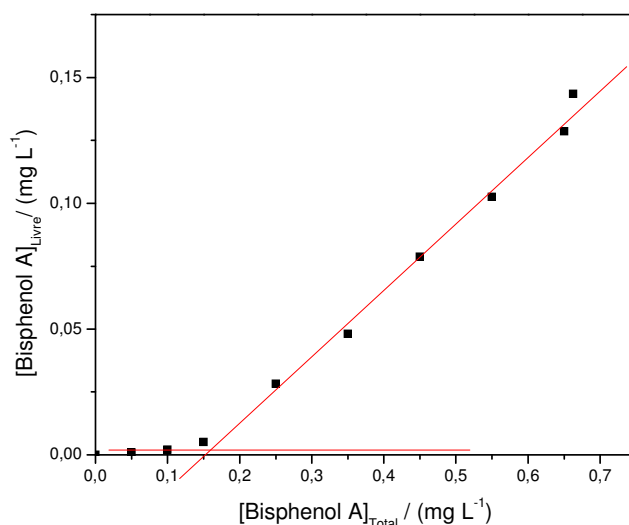


Figura III.7. Curva da capacidade de complexação de substâncias húmicas aquáticas com bisfenol A, usando a técnica de ultrafiltração em fluxo tangencial. Concentração da amostra de SHA: 20 mg L^{-1} ; pH: 5.0.

Na literatura há poucos resultados para comparação entre as capacidades de complexação das SHA por interferentes endócrinos. Na Tabela III.7. estão apresentadas diferentes capacidades de complexação de SHA para substâncias orgânicas e inorgânicas, incluindo os resultados obtidos neste estudo.

Tabela III.7. Capacidades de complexação de substâncias húmicas por interferentes endócrinos e outras substâncias orgânicas e inorgânicas.

Espécies	CC	Amostras de SH	Referencias
	(mg g ⁻¹ TOC)		
Cu	79,40	Água do córrego Itapitanguí-SP	ROSA <i>et al.</i> , 2001
Cu	74,90	Água do Rio Iguape-SP	ROSA <i>et al.</i> , 2001
Cu	91,51	Água do Rio Negro, Bacia Amazônica	ROSA <i>et al.</i> , 2001
Al	55,90 – 67,45	Rios da Nova Zelândia	HAYES <i>et al.</i> , 1989
4-Nitrocatecol	25,80	Turfas	HAWKE <i>et al.</i> , 1996
1-Nafetol	30,40	Ácido húmico	GHOSH & SCHNITZER, 1980
Bisfenol A	3,68	Água do Rio Ribeira do Iguape-SP	<i>Este trabalho</i>
Bisfenol A	3,24	Água do Rio Itapanhaú-SP	<i>Este trabalho</i>
17 α -etinilestradiol	32,80	Água do Rio Ribeira do Iguape-SP	<i>Este trabalho</i>
17 α -etinilestradiol	28,60	Água do Rio Itapanhaú-SP	<i>Este trabalho</i>

Pelas CC obtidas (Tabela III.7.), observa-se que as SHA das duas amostras apresentaram maior afinidade pelo 17 α -etinilestradiol frente ao

Bisfenol A. De maneira geral, ambas moléculas podem atuar nos sítios de complexação das SHA pelos grupamentos –OH presentes, formando ligações do tipo hidrogênio.

Estudos propostos por PACHECO *et al.* (2003) e YAMAMOTO *et al.* (2007), sugerem que as SH formam micelas com tamanhos específicos, assim pode-se inferir que mesmo o 17 α -etinilestradiol que apresenta uma massa molar maior que o Bisfenol A, dentro das micelas de SH, ocorre uma maior interação do tipo Van der Waals, devido a maior quantidade de hidrogênios presentes nessa molécula. Uma outra característica importante das SH ocorre devido a presença de grupos homólogos (CGH). Esses grupos podem formar uma capa ao redor dos sítios complexantes das SHA, influenciando diretamente a estabilidade dos complexos formados (ROCHA & ROSA, 2003).

Comparando os resultados de CC para diferentes espécies químicas listadas na Tabela III.7., observa-se que os IE apresentam uma afinidade menor do que as espécies metálicas, o que pode estar associado ao tamanho e impedimento estérico desses compostos. Entretanto, apresentam afinidades comparáveis com compostos orgânicos como 4-Nitrocatecol e 1-nafetol (PACHECO *et al.*, 2003).

Estudos de competição são realizados afim de avaliar a afinidade de um determinado composto frente à outros. As Figuras III.8. A e B, ilustram os resultados obtidos na competição entre os IE e SHA extraídas do Rio Ribeira de Iguape e Rio Itapanhaú, respectivamente.

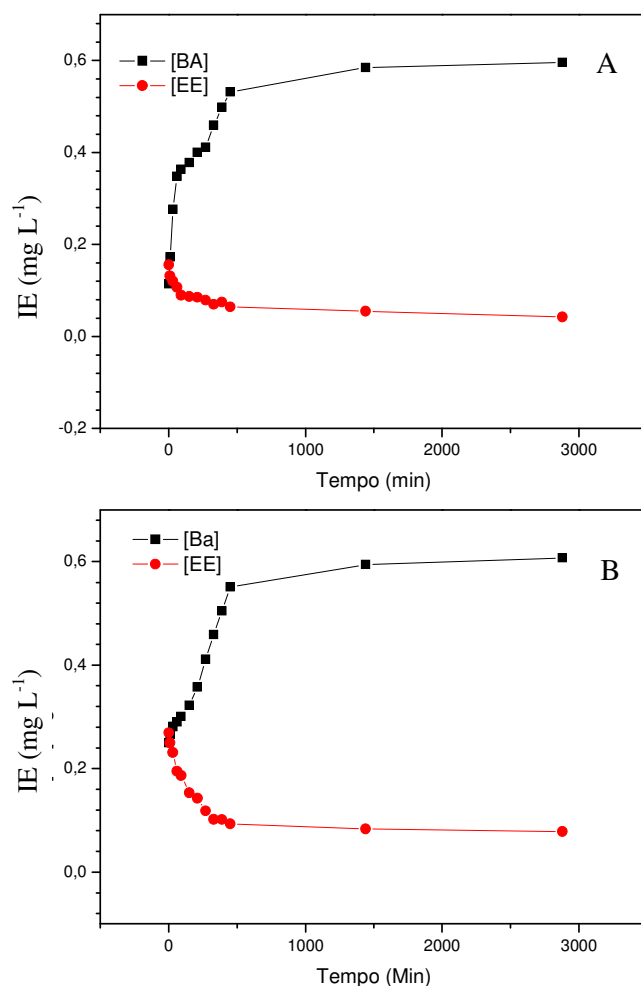


Figura III.8. Competição entre os interferentes endócrinos (IE) (17 α -etinilestradiol e bisfenol A) por SHA extraídas de amostras de águas do (A) Rio Ribeira de Iguape, e (B) Rio Itapanhaú.

De acordo com os dados, para ambas as amostras, ocorre a liberação do Bisfenol A e a complexação do 17 α -etinilestradiol, corroborando com os dados da capacidade de complexação. Esses resultados evidenciam, que o 17 α -etinilestradiol apresenta maior afinidade pelas SH que o Bisfenol A.

Dados físico-químicos indicam que a molécula húmica apresenta estrutura flexível em razão das interações intra/intermoleculares e ligações de hidrogênio. Segundo SWIFT (1989), essa estrutura flexível resulta em uma molécula aproximadamente como uma esfera (micelas), com distribuição gaussiana de massa molar com alta densidade de massa no centro e decrescente para os limites da extremidade da esfera. HAYES (1985) e GHOSH (1980) citam ainda que a dimensão da esfera depende de fatores

como densidade de carga, solvatação, ionização dos grupos ácidos, extensões de ramificações e ligações cruzadas.

Para ambos interferentes endócrinos estudados, pode-se inferir que a principal interação existente nas SH são as ligações de hidrogênio dos grupos oxigenados e os grupamentos –OH presentes nessas moléculas. Por apresentar um número maior de hidrogênios disponíveis para interações do tipo Van der Waals em sua estrutura, pode-se inferir que o 17 α -etinilestradiol consegue ocupar os sítios de complexação presentes nas micelas húmicas, antes ocupados pelo Bisfenol A, evidenciando o comportamento observado nos estudos de competição.

Os resultados mostram também que para as SHA extraídas do Rio Ribeira de Iguape, ocorrem as maiores complexações para os IE, corroborando com os dados da capacidade de complexação.

CONCLUSÕES

IV. Conclusões

O sistema de extração em fluxo contínuo se mostrou adequado e eficiente, diminuindo o tempo necessário para extração e apresentando maiores rendimentos quando comparado com o procedimento por batelada, dispensando o trabalho em etapas de filtração, centrifugação, ajuste de pH e manuseio das amostras.

A planta piloto se mostrou eficiente para extração de substâncias húmicas em fluxo e os resultados da capacidade complexante mostraram que independente do extrator utilizado, as SH extraídas apresentaram maior afinidade por Ca e Mg, macronutrientes essenciais, e que uma maior complexação é favorecida quando se utiliza pirofosfato de sódio como extrator.

Os resultados dos estudos das capacidades complexantes mostraram que as substâncias húmicas possuem grande afinidade pelos metais potencialmente tóxicos Al(III) e Pb(II), formando complexos estáveis. Assim, os estudos de competição entre micro e macronutrientes e metais potencialmente tóxicos por sítios ligantes das SH mostraram resultados semelhantes, isto é, elevada afinidade das SH por íons Al(III) e Pb(II), liberando os nutrientes complexados. Embora, a utilização das SH como adubo orgânico já é feita comercialmente, ambientalmente e economicamente é interessante que se faça estudos para enriquecer estas SH de maneira adequada para que se evitem desperdícios.

Assim, a aplicação de substâncias húmicas de turfa enriquecidas com nutrientes em solos agrícolas com elevados teores de metais potencialmente tóxicos se mostra interessante, pois esta atua como fertilizante, liberando nutrientes e também complexando metais prejudiciais ao crescimento e desenvolvimento de diversas culturas agrícolas.

Nos estudos de complexação entre SHA e Interferentes endócrinos (17 α etinilestradiol e Bisfenol A), observou-se que a estabilidade de complexação ocorre em torno de 20 minutos e o 17- α etinilestradiol apresentou maior capacidade de complexação (28,6-32,8 mg g⁻¹ TOC) frente ao Bisfenol A (3,24-3,68 mg g⁻¹ TOC). As maiores capacidades de complexação foram para as SHA extraídas do rio Ribeira de Iguape, as quais apresentaram característica

mais aromáticas e grau de humificação maior que aquelas extraídas de Itapanhaú River.

Na competição entre o 17- α etinilestradiol e Bisfenol A frente aos sítios de complexação das SHA, observou-se a liberação do Bisfenol A e a complexação do 17- α etinilestradiol. Esse comportamento pode estar associado ao elevado número de hidrogênio disponíveis para interações do tipo Van der Waals na molécula de 17 α -etinilestradiol, ocupando sítios antes complexados pelo Bisfenol A.

Esses resultados mostram a elevada afinidade existente entre as SHA e os interferentes endócrinos podendo-se inferir que a disponibilidade desses compostos no ambiente, está diretamente relacionada com a presença das substâncias húmicas no meio. Assim, os estudos de interações entre as SHA e os interferentes endócrinos são importantes para o melhor entendimento do transporte e/ou estabilidade desse tipo de contaminantes no ambiente, podendo ainda indicar uma alternativa para o controle da poluição aquática pelos IE.

REFERÊNCIAS

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

AIKEN, G. R.; WERSHAW, R. L.; MacCARTHY, P. **Humic substances in soil, sediment and water: geochemistry, isolation and characterization**. New York: Wiley, 1985. 198 p.

ALDA, M. J. L.; BARCELO, D. Review of analytical methods for the determination of strogens and progestogens in waste water. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 371, p. 437-447, 2001.

ANTONELLI, M. L.; CALACE, N.; CENTIOLI, D.; PETRONIO, B. M.; PIETROLETTI, M. Complexing capacity of different molecular weight fractions of sedimentary humic substances. **Anal. Letters**, v. 34, n. 6, p. 989-1002, 2001.

BAILEY, S. E.; OLIN, T. J.; BRICKA, R. M.; ADRIAN, D. D. A review of potentially low- cost sorbents for heavy metals. **Water Res.**, v. 33, n. 11, p. 2469-2479, 1999.

BARCELÓ, D. Occurence handling and chromatographic determination of pesticides in the aquatic environment. **Analyst**, v. 116, n. 2, p. 681-689, 1991.

BIRKETT, J. W.; LESTER, J. N. **Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes**. London: CRC Press, 2003. 285 p.

BUFFLE, J. **Complexation reactions in aquatic systems: an analytical approach**. 2nd ed. New York: Ellis Horwood, 1990, 692 p.

BUFFLE, J.; STAUB, C. Measurement of complexation properties of metal-ions in natural conditions by ultrafiltration - measurement of equilibrium-constants for complexation of zinc by synthetic and natural ligands. **Anal. Chem.**, v. 56, n. 14, p. 2837-2842, 1984.

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, n. 2, p. 74-82, 1995.

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

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.

CANELLAS, L. P.; VELLOSO, A. C. X.; MARCIANO, C. R.; RAMALHO, J. F. G. P.; RUMJANEK, V. M.; REZENDE, C. E.; SANTOS, G. A. Propriedades químicas de um Cambissolo cultivado com cana-de-açúcar, com preservação do palhço e adição de vinhaça por longo tempo. **Rev. Bras. Cienc. Sol.**, v. 27, p. 935-944, 2008.

DESBROW, C.; ROUTLEDGE, E. J.; BRIGHTY, G. C.; SUMPTER, J. P.; WALDOCK, M. Identification of Estrogenic Chemicals. in STW Effluent. 1. Chemical fractionation and *in vitro* Biological Screening. **Environ. Sci. Technol.**, v. 32, p. 1549-1558, 1998.

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

EINAX, J.; KUNZE, C. Complexation capacity of aquatic systems in dependence on different ligands and heavy metals-electroanalytical investigations and statistical evaluation. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 371, p. 660-669, 2001.

FADIGAS, F. D.; BASTOS SOBRINHO, N. M.; MAZUR, N. Estimation of reference values for cadmium, cobalt, chromium, copper, nickel, lead, and zinc in Brazilian soils. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, v. 37, p. 945-959, 2006.

FALCONER, I. R.; CHAPMAN, H. F.; MOORE, M. R.; RANMUTHUNGALA, G. Endocrine-disrupting compounds: a review of their challenge to sustainable and safe water supply and water reuse. **Environ. Toxicol.**, v. 21, p. 181-191, 2006.

FISH, W.; MOREL, F. Propagation of error in fulvic acid titration data. A comparison of three analytical methods. **Can. J. Chem.**, v. 63, p. 1185-1193, 1985.

FRASER, D. C. Organic sequestration of copper. **Econ. Geol.**, v. 56, n. 1, p. 1063-1078, 1961.

GAO, K.; PEARCE, J.; JONES, J.; TAYLOR, C. Interaction between peat, humic acid and aqueous metal ions. **Environ. Geochem. Health**, v. 21, p. 13-26, 1999.

GHOSH, K.; SCHNITZER, M. Macromolecular structures of humic substances. **Soil Sci.**, v. 129, p. 266-276, 1980.

GIEGUZYNSKA, E.; AMINE-KHODJA, A.; TRUBETSKOJ, O. A.; TRUBETSKAYA, O. E.; GUYOT, G.; TER HALLE, A.; GOLEBIEWSKA, D.; RICHARD, C. Compositional differences between soil humic acids extracted by various methods as evidenced by photosensitizing and electrophoretic properties. **Chemosphere**, v. 75, p. 1082-1088, 2009.

GONZALEZ-PEREZ, M.; MARTIN NETO, L.; COLNAGO, L. A. Characterization of humic acids extracted from sewage sludge-amended oxisols by electron paramagnetic resonance. **Soil Til. Res.**, v. 21, p. 95-100, 2006.

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

HATCHER, P. G.; BREYER, L. N.; DENNIS, G. E. Solid-state ^{13}C NMR of sedimentary humic substances: new revelations on their composition, In: CHRISTMAN, R. F.; GJESSING, E.T. (Ed.). **Aquatic and terrestrial humic materials**. Ann Arbor: Ann Arbor Science, 1983. p. 37-82.

HAWKE, D. J.; POWELL, K. J.; GREGOR, J. E. Determination of the aluminium complexing capacity of fulvic acids and natural waters, with examples from five New Zealand rivers. **Marine Fresh. Res.**, v. 47, p. 11-17, 1996.

HAYES, M. H. B.; CLAPP, C. E. Humic substances: considerations of compositions, aspects of structures and environmental influences. **Soil Sci.**, v. 166, n. 2, p. 723-737, 2001.

HAYES, M. H. B.; MacCARTHY, P.; MALCOLM, R. L.; SWIFT, R. S. **Humic substances II – In search of structure**. New York: John Wiley & Sons, 1989. 279 p.

JEANNOT, R.; SABI, H.; SAUVARD, E.; DAGNAC, T.; DOHRENDORF, K. Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry. **J. Chromatogr.**, v. 974, p. 143-159, 2002.

JOHNSON, A. C.; BELFROID, A.; DI CORCIA, A. Estimating steroid estrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. **Sci. Total Environ.**, v. 256, p. 163-173, 2000.

KLÖCKING, R. Humic substances as potential therapeutics. In: SENESI, N.; MIANO, T. (Ed.). **Humic substances in the global environmental and implications on human health**. Amsterdam: Elsevier, 1994. p. 1245-1257.

KOLPIN, D. W.; FURLOG, E. T.; MEYER, M. T.; THURMAN, E. M.; ZAUGG, S. D.; BARBER, L. B.; BUXTON, H. T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: a national reconnaissance. **Environ. Sci. Technol.**, v. 36, p. 1202-1205, 2002.

KONONOVA, M. M. **Soil organic matter**: its nature, its role in soil formation and in soil fertility. New York: Pergamon, 1966. 544 p.

LAMIM, A. P. B.; JORDÃO, C. P.; PEREIRA, J. L.; BELLATO, C. R. Caracterização química e física de turfa litorânea e avaliação da adsorção competitiva por cobre e zinco. **Quím. Nova**, v. 24, n. 1, p. 18-23, 2001.

LAVORENTI, A.; PEIXOTO, M. F. S. P.; BURAUDEL, P.; WAIS, A.; FUHR, F. Comparação entre hidróxido de sódio e pirofosfato de sódio na extração e distribuição do resíduo ligado de ¹⁴C- atrazina, nas frações húmicas de dois solos. **Res. Ecotoxicol. e Meio Amb.**, v. 7, p. 77-88 1997.

LI, H. Y.; CHIOU, M. S. Adsorption behavior of reactive dye in aqueous solution on chemical cross-linked chitosan beads. **Chemosphere**, v. 50, p. 1095-1105, 2003.

LU, X. Q.; HANNA, J. V.; JOHNSON, W. D. Source indicators of humic substances: an elemental composition, solid state ¹³C CP/MAS NMR and Py-GC/MS Study. **Appl. Geochem.**, v. 15, p. 1019-1033, 2000.

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

MALAVOLTA, E. **Manual de química agrícola**: nutrição de plantas e fertilidade do solo. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976. 357 p.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 219 p.

MALCOLM, R. The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environments. **Anal. Chim. Acta**, v. 232, n. 1, p. 19-30, 1990.

MARTIN NETO, L.; SPOSITO, G.; VIEIRA, E. M. Mechanism of atrazine sorption by humic acids: a spectroscopy study. **Environ. Sci. Technol.**, v. 28, p. 1867-1873, 1994.

McLELLAN, J. K.; ROCK, C. A. Pretreating landfill leachate with peat to remove metals. **Water, Air, Soil Pollut.**, v. 37, n. 1-2, p. 203-215, 1988.

MENDONÇA, A. G. R. **Turfa**: interações com espécies metálicas e estudo de parâmetros que influenciam na utilização em setores agrícolas. 2010. 158 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

MINDÉLLO NETO, U. R. Enraizamento de estacas de pessegueiro em função do uso de ácido indolbutírico e fertilizante orgânico. **Rev. Bras. Frut.**, v. 27, n. 1, p. 92-94, 2005.

MOORE, P. D. The ecology of peat-forming processes: a review. **Int. J. Coal Geol.**, v. 12, p. 89-103, 1989.

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

- MULLER, M.; RABENOELINA, F.; BALAGUER, P.; PATUREAU, D.; LEMENACH, K.; BUDZINSKI, H.; BARCELO, D.; ALDA, M. L.; KUSTER, M.; DELGENES, J. P.; HERNANDEZ-RAQUET, G. Chemical and biological analysis of endocrine-disrupting hormones and estrogenic activity in an advanced sewage treatment plant. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 27, p. 1649-1658, 2008.
- NASCIMENTO, N. R.; NICOLA, S. M. C., REZENDE, M. O. O.; OLIVEIRA, T. A.; OBERG, G. Pollution by hexachlorobenzene and pentachlorophenol in the coastal plain of São Paulo State, Brazil. **Geoderma**, v. 121, p. 221-232, 2004.
- NIFANT'EVA, T. I.; SHKINEV, V. M.; SPIVAKOV, B. Y.; BURBA, P. Membrane filtration studies of aquatic humic substances and their metal species: a concise overview. Part 2. Evaluation of conditional stability constants by using ultrafiltration. **Talanta**, v. 48, p. 257-267, 1999.
- OLIVEIRA, L. C.; SARGENTINI JUNIOR, E.; ROSA, A. H.; PEREIRA JUNIOR, O. L.; SIMÕES, M. L.; MARTIN NETO, L.; SILVA, W. T. L.; SERUDO, R. L. The influence of seasonalness on the structural characteristics of aquatic humic substances extracted from samples collected from Rio Negro (Black River) – AM: Interactions with Hg(II). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, p. 860-868, 2007.
- PACHECO, M. L.; PENA-MÉNDES, E. M.; HAVEL, J. Supramolecular interactions of humic acids with organic and inorganic xenobiotics studied by capillary electrophoresis. **Chemosphere**, v. 51, p. 95-108, 2003.
- PARMEGGIANI, A. C.; MASINI, J. C. Evaluating scatchard and differential equilibrium functions to study the binding properties of Cu(II) to the surface of mixed species of lyophilized Spirulina (Cyanobacteria). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n. 3, p. 416-424, 2003.
- PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 85, n. 22, p. 3533-3539, 1963.
- PENTEADO, J. C. P.; VAZ, J. M. The legacy of the polychlorinated biphenyls (PCBs). **Quím. Nova**, v. 24, p. 390-398, 2001.

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

PETRONI, S. L. G.; PIRES, M. A. F.; MUNITA, C. S. Adsorption of zinc and cadmium on peat columns. **Quim. Nova**, v. 23, p. 477-481, 2000.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. **Adv. Agron.**, v. 75, p. 57-134, 2002.

REUTER, J. H.; PERDUE, E. M. Importance of heavy metal-organic matter interactions in natural waters. **Geochim. Cosmochim. Acta**, v. 41, n. 4, p. 325-334, 1977.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H. **Substâncias húmicas aquáticas**: interação com espécies metálicas. São Paulo: Ed. UNESP, 2003. 138 p.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. **Introdução à química ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2004. 154 p.

ROCHA, J. C.; TOSCANO, I. A. S.; BURBA, P. Relative lability of trace metals complexed in aquatic humic substances using ion-exchanger cellulose-hyphan. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 8, n. 2, p. 239-243, 1997.

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

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

ROCHA, J. C.; SARGENTINI JUNIOR, E.; ZARA, L. F.; ROSA, A. H.; SANTOS, A.; BURBA, P. Reduction of mercury(II) by tropical river humic substances (Rio Negro): a possible process of the mercury cycle in Brazil. **Talanta**, v. 53, n. 1, p. 551-559, 2000.

ROCHA, J. C.; SARGENTINI JUNIOR, E.; ZARA, L. F.; ROSA, A. H.; SANTOS, A.; BURBA, P. Reduction of mercury(II) by tropical river humic substances (RIO Negro) – Part II. Influence of structural features (molecular size, aromaticity, phenolic groups, organically bound sulfur). **Talanta**, v. 61, p. 699-707, 2003.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; MARCO, M.; ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: a review article. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 378, p. 588-598, 2004.

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

ROMÃO, L. P. C.; CASTRO, G. R.; ROSA, A. H.; ROCHA, J. C.; PADILHA, P. M.; SILVA, H. C. Tangential flow ultrafiltration: an alternative methodology for determination of complexation parameters in organic matter from waters and soils samples from Brazilian regions. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 375, p. 1097-1100, 2003.

ROSA, A. H. **Substâncias húmicas**: extração, caracterização, novas perspectivas e aplicações. 2001. 89 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

ROSA, A. H.; ROCHA, J. C.; FURLAN, M. Humic substances of peat: study of the parameters that influence on the process of alkaline and extraction. **Quim. Nova.**, v. 23, p. 472-476, 2000.

ROSA, A. H.; ROCHA, J. C.; BURBA, P. Extraction and exchange behavior of metal species in therapeutically applied peat. **Talanta**, v. 58, p.969-978, 2002.

ROSA, A. H.; ROCHA, J. C.; SAREGENTINI JUNIOR, E. Humic substances and extraction. In: SWIFT, R. S.; SPARK, K. M. (Ed.). **Understanding and managing organic matter in soils, sediments and waters**. New York: Wiley & Sons, 2001. p. 41-46.

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

ROSA, A. H.; ROCHA, J. C.; FURLAN, M.; ZARA, L. F.; SANTOS, A. Oxidação das substâncias húmicas de turfa durante o processo de extração alcalina. Estudo espectroscópico na região do infravermelho e do visível. **Anais Assoc. Bras. Quím.**, v. 47, p. 25-28, 1998.

ROSA, A. H.; SIMÕES, M. L.; OLIVEIRA, L. C.; ROCHA, J. C.; MARTIN NETO, L.; MILORI, D. P. M. B. Multimethod study of the degree of humification of humic substances extracted from different tropical soil profiles in Brazil's Amazonian region. **Geoderma**, v. 127, p. 1-10, 2005a.

ROSA, A. H.; OLIVEIRA, L. C.; BELLIN, I. C.; ROCHA, J. C.; ROMÃO, L. P. C.; DIAS FILHO, N. L. Influence of alkaline extraction on the characteristics of humic substances in Brazilian soils. **Thermochim. Acta**, v. 433, p. 77-82, 2005b.

ROSA, A. H.; GOVEIA, D.; BELLIN, I. C.; LESSA, S. S.; DIAS FILHO, N. L.; PADILHA, P. M. New analytical procedure based on cellulose bag and ion exchanger with p-aminobenzoic groups for differentiation of labile and inert metals species in aquatic systems. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 386, p. 2153-2157, 2006.

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

SAAB, S. D.; MARTIN NETO, L. Condensed aromatic rings and E-4/E-6 ratio: humic acids in gleysoils studied by NMR CP/MAS C-13, and dipolar dephasing. **Quim. Nova**, v. 30, p. 260-263, 2007.

SACHER, F.; LANGE, F. T.; BRAUCH, H.; BLANKENHORN, I. Pharmaceuticals in groundwaters: analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. **J. Chromatogr.**, v. 938, p. 199-203, 2001.

SANTOS, A.; BOTERO, W. G.; BELLIN, I. C.; OLIVEIRA, L. C.; ROCHA, J. C.; MENDONÇA, A. G. R.; GODINHO, A. F. Interaction between humic substances and metallic ions: a selectivity study of humic substances and their possible therapeutic application. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, n. 4, p. 824-830, 2007.

SANTOS, A.; BELLIN, I. C.; CORBI, P. P.; CUIN, A.; ROSA, A. H.; REZENDE, M. O. O.; ROCHA, J. C.; MELNIKOV, P. Competition between humic

substances and alpha-amino acids by metal species. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 15, n. 3, p. 437-440, 2004.

SANTOS, T. C. R.; ROCHA, J. C.; BARCELÓ, D. Multiresidue analysis of pesticides in water from rice cultures by on-line solid phase extraction followed by LC-DAD. **Int. J. Environ. Anal. Chem.**, v. 70, n. 1/4, p. 19-28, 1998.

SANTOS, T. C.; ROCHA, J. C.; ALONSO, R. M.; MARTÍNEZ, E.; IBÁÑEZ, C.; BARCELÓ, D. Rapid degradation of propanil in rice crop fields. **Environ. Sci. Technol.**, v.32, p. 3479-3484, 1998.

SCHNITZER, M. Reaction between fulvic acid, a soil humic compound and inorganic soil constituents. **Soil Sci. Soc. Amer.**, v. 33, n. 3, p. 75-81, 1969.

SCHNITZER, M.; KHAN, S. U. **Soil organic matter**. Amsterdam: Elsevier, 1978. 319 p.

SEIN, L. C.; VARNUM, J. M.; JANSEN, S. A. Conformational modeling of a new building block of humic acid: approaches to the lowest energy conformer. **Environ. Sci. Technol.**, v. 33, n. 3, p. 546-552, 1999.

SERUDO, R. L.; OLIVEIRA, L. C.; ROCHA, J. C.; PATERLIN, W. C.; ROSA, A. H.; SILVA, H. C.; BOTERO, W. G. Reduction capability of soil humic substances from Rio Negro basin - Brazil, towards Hg(II) studied by a multimethod approach and principal components analysis (PCA). **Geoderma**, v. 138, p. 229-236, 2007.

SILVA, F. C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. p. 77-149,

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

SODRÉ, F. F.; MONTAGNER, C. C.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil). **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 2, p. 187-196, 2007.

SODRÉ, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Origem e destino de interferentes endócrinos em águas naturais. **Cad. Tem.**, v. 6, p.23-27, 2007.

SPEDDING, P.J. Peat (Review). **Fuel**, v. 67, p. 883-899, 1988.

STEHLICKOVA, J.; SVAB, M.; WIMMEROVA, L.; KOZLER, J. Intensification of phenol biodegradation by humic substances. **Int. Biodet. Biodegr.**, v. 63, p. 923-927, 2009.

STEINBERG, C. E. W.; PAUL, A.; PFLUGMACHER, S.; MEINELT, T.; KLOCKING, R.; WIEGAND, C. Pure humic substances have the potential to act as xenobiotic chemicals – a review. **Fresenius Environ. Bulletin**, v. 12, p. 391-401, 2003.

STEVENSON, F. J. Extraction, fractionation, and general chemical composition of soil organic matter. **Humus chemistry**. New York: Wiley & Sons, 1982. p. 26-53.

STEVENSON, F. J. **Humus chemistry**. 2nd ed. New York: John Wiley, 1994a. 496 p.

STEVENSON, F. J. **Humus chemistry**: genesis, composition and reaction, 2nd ed. New York: John Wiley, 1994b. 496 p.

STEVENSON, F. J.; COLE, M. A. **Cycles of soil. carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur, micronutrients**. New York: John Wiley, 1985. 380 p.

STEVENSON, A. C.; MARSHALL, A. G.; COOPER, W. T. Exact masses and chemical formulas of individual Suwannee River fulvic acid from ultrahigh resolution electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectra. **Anal. Chem.**, v. 75, p. 1275-1284, 2003.

SUN, W. L.; NI, J. R.; XU, N.; SUN, L. Y. Fluorescence of sediment humic substances and its effect on the sorption of selected endocrine disruptors. **Chemosphere**, v. 66, p. 700-707, 2007.

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

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

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

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

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

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

WEIL, J. A.; BOLTON, J. R. **Electron paramagnetic resonance**: elementary theory and practical applications. New York: Wiley, 1994. 231 p.

WERSHAW, R. L. Model for humus in soils and sediments. **Environ. Sci. Technol.**, v. 27, n. 2, p. 814-816, 1993.

YING, G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environ. Int.**, v. 28, p. 545-551, 2002.

ZACCONE, C.; CACCOZZA, C.; D'ORAZIO, V.; PLAZA, C.; CHEBURKIN, A.; MIANO, T. M. Influence of extractant on quality and trace elements content of peat humic acids. **Talanta**, v. 73, p. 820-830, 2007.

ZACCONE, C.; MIANO, T. M.; SHOTYK, W. Qualitative comparison between raw peat and related humic acids in an ombrotrophic bog profile. **Org. Geochem.**, v. 38, p. 151-160, 2007.

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