

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Júlio de Mesquita Filho

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

“Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular”

Luciana Camargo de Oliveira

Tese apresentada ao Instituto de Química de Araraquara-UNESP como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Rocha

Co-orientador: Prof. Dr. André Henrique Rosa

Araraquara
Março de 2007

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Filiação Lauro Lucas de Oliveira e Ana Lúcia Camargo de Oliveira
Nascimento 21/09/1977 - São Paulo/SP
Carteira de 25.078.848-2 – SSP/SP - 14/05/1984
Identidade
CPF 215.473.968-73

Endereço Av. Alberto Toloi, 185 – Bloco 05, Apto. 24
residencial Quitandinha – Araraquara
14800-105, SP - Brasil
Telefone: 16 3332-4795
E-mail: lcamargo@iq.unesp.br

Endereço Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de
profissional Araraquara, Departamento de Química Analítica
Rua Professor Francisco Degni, s/n
Quitandinha – Araraquara
14800-900, SP - Brasil
Telefone: 16 3301-6600

Formação acadêmica / titulação

2004-2007 Doutorado em Química
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP
Título: Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular
Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Rocha
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

2002 – 2004 Mestrado em Química
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP
Título: Caracterização de substâncias húmicas de amostras de solos da bacia do médio Rio Negro-AM, Concluído em 09/01/2004
Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Rocha
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

1996 - 1999 Bacharel em Química
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP
Título: Estearatos metálicos como precursores para obtenção de óxidos mistos do tipo: $\text{Bi}_2\text{Sr}_2\text{Ca}_2\text{Cu}_3\text{O}_x$
Orientador: Prof Dr. Clóvis Augusto Ribeiro
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Artigos completos publicados em periódicos

1. OLIVEIRA, L.C.; SARGENTINI JÚNIOR, E.; ROCHA, J.C.; ROSA, A.H.; 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). **Journal of the Brazilian Chemical Society, aceito para publicação, 2007.**

2. SANTOS, A.; BOTERO, W.G.; **OLIVEIRA, L.C.**; BELLIN, I.C.; ROCHA, J.C.; MENDONÇA, A.G.R. Interaction between humic substances and metallic ions: a study of the selectivity of humic substances and their possible therapeutic application. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, **aceito para publicação, 2007.**
 3. **OLIVEIRA, L.C.**; SERUDO, R.L.; ROSA, A.H.; SILVA, H.C.; BOTERO, W.G.; PATERLINI, W.C.; ROCHA, J.C. Reduction capability of soil humic substances from the Rio Negro basin, Brazil, towards Hg(II) studied by a multimethod approach and principal component analysis (PCA). **Geoderma (Amsterdam)**, **aceito para publicação, 2007.**
 4. ROMÃO, L.P.C.; LEAD, J.R.; ROCHA, J.C.; **OLIVEIRA, L.C.**; ROSA, A.H.; MENDONÇA, A.G.R.; RIBEIRO, A.S. Structure and properties of Brazilian peat: analysis by spectroscopy and microscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, **aceito para publicação, 2007.**
 5. **OLIVEIRA, L.C.**; SERUDO, R.L.; ROCHA, J.C.; MENDONÇA, A.G.R.; BOTERO, W.G.; CARVALHO NETO, F.S.; SANTOS, A. Distribuição de mercúrio em diferentes solos da Bacia do Médio Rio Negro-AM: Influência da matéria orgânica no ciclo biogeoquímico do mercúrio, **Química Nova**, **aceito para publicação em 31/05/2006 e publicado na web em 24/10/2006.**
 6. ROSA, A.H.; GOVEIA, D.; **OLIVEIRA, L.C.**; BELLIN, I.C.; DIAS FILHO, N.L.; LOURENÇO, R.W., BURBA, P. Development of a new analytical approach based on cellulose membrane and chelator for differentiation of labile and inert metal species in aquatic systems. **Analytica Chimica Acta**, **567**, p. **152-154, 2006.**
 7. 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. **Thermochimica Acta**, **433**, p. **81-86, 2005.**
 8. ROSA, A.H.; SIMÕES, M.L.; **OLIVEIRA, L.C.**; ROCHA, J.C.; MARTIN NETO, L.; MILORDI, D.M.B.P. Multimethod study of the degree of humification of humic substances extracted from different tropical soils profiles in Brazil's Amazonian region. **Geoderma**, **127**, p. **1-10, 2005.**
-

Artigos completos submetidos para publicação em periódicos

1. SANTOS, A.; BOTERO, W.G.; **OLIVEIRA, L.C.**; TOGNOLLI, J.O.; ROCHA, J.C.; REZENDE, M.O.O. Especificação e distribuição de metais no solo da micro bacia de drenagem do Reservatório de captação de águas superficiais Anhumas. **Química Nova**, **submetido em 2006.**
 2. **OLIVEIRA, L.C.**; RIBEIRO, C.A.; ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; BOTERO, W. G.; SANTOS, A. Humic substances thermal decomposition kinetic extracted from Mid Rio Negro-AM basin soils samples. **Thermochimica Acta**, **submetido em 2007.**
-

Outras Informações Biográficas

1. Diploma de Honra ao Mérito como melhor aluna do curso de bacharelado em Química pelo Conselho Regional de Química - IV Região em Janeiro de 2000.
 2. Diploma de Honra ao Mérito como melhor aluna do curso de bacharelado em Química pelo Instituto de Química - Unesp, Araraquara em Janeiro de 2000.
 3. Resumos/Trabalhos Completos Publicados em Anais de Congressos Científicos Nacionais e Internacionais: 19
-

À **DEUS** eu agradeço:

Por tudo!

A ELE devo toda minha gratidão!!

Ao Prof. Dr. **Julio Cesar Rocha**,
Pela Orientação, amizade e confiança
Concedida durante os
anos de convivência.

Ao Prof. Dr. **André Henrique Rosa**,
Por sua grande amizade, estímulo e
Principalmente pela confiança.

Ao meu marido **Marcelo**

Pela paciência, carinho, dedicação
e compreensão
em todos os momentos.

A minha filha **Anna Júlia** que
me ensina a cada dia
que a vida é um aprendizado eterno.

Aos meus pais, **Lauro** e **Ana Lúcia**,

Pelo amor, incentivo e ajuda

nos momentos que precisei.

A Meu irmão **André** pelo carinho e

A minha irmã **Maria Isabel**, com saudades.

Ao **Dr. Ézio Sargentini Jr.** do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) pela grande ajuda com as amostras e contribuição científica, sem sua ajuda seria impossível a realização deste trabalho.

Wander e André Gustavo muito obrigado por tudo! Sem a amizade e o apoio de vocês tudo seria muito, mais muito mais difícil.

Ademir sem sua ajuda esse trabalho não seria o mesmo.

Ao **Felipe André** pela grande ajuda fornecida.

Ao **Robson** e ao **Ricardo** pelos socorros nos momentos que precisei.

Aos integrantes do Grupo de Química Analítica Ambiental: **Leandro** e **Fernando** pela amizade.

Ao Grupo de Ambiental coordenado pelo Prof. Dr. André Rosa em Sorocaba especialmente a **Dani**, pela grande ajuda nas análises.

A **Márcia Cristina Bizinoti** e ao Prof. Dr. **Wilson de Figueiredo Jardim** pela ajuda, discussões e sugestões.

A **Adriana Barbosa** pela grande força sempre que precisei.

Ao Prof. Dr. **Clóvis Augusto Ribeiro** pela amizade e incentivo.

À Prof^a Dr^a **Raquel P. Nogueira** e aos integrantes do grupo, **Milady**, Allan, Ivonete, pela amizade e auxílio nas análises de COT.

A meus amigos de todas as horas: **Patrícia Hatsue (Patty)**, **Renata**, **Carla**, **Elaine**, **Márcio**, **Patrícia Carneiro**, **William**, **Adriana**, **Enelton Fagnani (Neto)** e **Sérgio**, muito obrigada pelo incentivo e amizade.

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

A **EMBRAPA** – Instrumentação agrícola de São Carlos, especialmente ao Dr. **Marcelo L. Simões**, Dr. **Ladislau Martin-Neto** e Dr. **Wilson Tadeu Lopes da Silva** pelas análises de EPR, RMN, discussões, sugestões e contribuições para o trabalho.

Ao **Heliandro** e a **Mirela** pela sincera amizade e companheirismo.

A **Iramaia** e **Luciane** pelas sugestões e amizade.

Ao Prof. Dr. **Arnaldo Alves Cardoso** pela amizade e sugestões.

A Prof^a Dr^a **Maria Lúcia Ribeiro**, Bilú, pela amizade e incentivo.

A **Érika Félix** pela ajuda sempre que precisei.

Meus amigos: **Alexandre (Poca)**, **Gini**, **Vi**, **Izabel** pela amizade e momentos de descontração.

À **Josimara**, obrigada pelo apoio.

Ao **Valdenir** (Biotecnologia) pela enorme paciência e pelo bom humor.

À **FAPESP** pela bolsa concedida.

Ao **CNPq** pelo auxílio financeiro.

“ Não são as perdas e nem as caídas que fazem fracassar nossas vidas,
mas sim a falta de coragem para levantarmos e seguirmos adiante”

(V.M. Samael Aun Weor)

SUMÁRIO

RESUMO.....	I	
ABSTRACT.....	II	
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III	
ÍNDICE DE TABELAS.....	VI	
ABREVIATURAS.....	VII	
PREFÁCIO.....	01	
I	INTRODUÇÃO.....	02
I.1	Matéria orgânica natural	02
I.2	Substâncias húmicas.....	02
I.3	Estrutura das substâncias húmicas.....	03
I.4	Importância ambiental das substâncias húmicas.....	05
I.5	Caracterização das substâncias húmicas.....	06
I.5.1	Técnicas espectroscópicas.....	07
I.5.1.1	Ressonância paramagnética eletrônica (EPR).....	07
I.5.1.2	Ressonância magnética nuclear (RMN).....	08
I.6	Capacidade complexante das SH.....	09
I.7	Fracionamento das SH.....	10
I.8	Mercúrio.....	14
I.8.1	Propriedades químicas relevantes do mercúrio.....	14
I.8.2	Mercúrio no ambiente.....	15
I.8.3	Interação mercúrio-matéria orgânica.....	19
I.8.4	Toxicidade do mercúrio.....	20
I.8.5	Técnicas para determinação de mercúrio.....	21
I.8.5.1	Espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CVAAS).....	22
I.9	Análise estatística multivariada.....	23
I.10	Rio Negro-AM.....	24
II	OBJETIVOS.....	27
III	EXPERIMENTAL.....	28

III.1	Equipamentos, materiais e reagentes.....	28
III.2	Identificação da área de amostragem.....	29
III.3	Amostragens.....	30
III.4	Caracterização das amostras de água.....	30
III.5	Purificação da resina XAD 8.....	30
III.6	Extração das substâncias húmicas.....	30
III.7	Purificação das substâncias húmicas.....	31
III.7.1	Preparação das membranas de diálise.....	31
III.7.2	Diálise das substâncias húmicas.....	31
III.8	Liofilização dos extratos de SHA.....	32
III.9	Purificação da água.....	32
III.10	Caracterizações das amostras de SHA.....	32
III.10.1	Análise elementar.....	32
III.10.2	Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica.....	32
III.10.3	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	33
III.11	Limpeza da vidraria.....	33
III.12	Digestão das amostras das substâncias húmicas e determinações de mercúrio.....	34
III.13	Análise multivariada.....	35
III.14	Fracionamento das SHA extraídas de amostras coletadas periodicamente.....	35
III.15	Determinação do carbono orgânico total (COT).....	37
III.16	Determinação da capacidade de complexação da matéria orgânica dissolvida e SHA por íons Hg(II).....	37
III.17	Espectroscopia na região do infravermelho.....	38
III.18	Descarte de resíduos.....	39
IV	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
IV.1	Análise exploratória de dados para amostras de SHA.....	39
IV.2	Distribuição de carbono e determinação da capacidade de complexação em função do tamanho molecular.....	51
IV.3	Determinação da capacidade de complexação da matéria orgânica dissolvida e SHA por íons Hg(II).....	55
V	CONCLUSÃO	63
VI	REFERÊNCIAS	65

RESUMO

A Bacia do Rio Negro-AM possui características particulares de biodiversidade, temperatura e umidade e um importante fator a ser considerado nesta região é a grande quantidade de substâncias húmicas presentes nos sistemas aquáticos e terrestres. Neste trabalho, avaliou-se a influência da sazonalidade nas características estruturais das substâncias húmicas aquáticas (SHA) extraídas de amostras coletadas no Rio Negro-AM e sua interação com íons mercúrio. Os parâmetros razões atômicas C/H, C/N e C/O, grupos funcionais, radicais livres do tipo semiquinona, pH, índices pluviométricos e fluviométricos, concentrações de mercúrio foram interpretados por análise hierárquica de cluster (AHC) e análise de componentes principais (ACP). As análises estatísticas mostraram que, quanto maior o índice pluviométrico e menor o índice fluviométrico maior o grau de humificação das substâncias húmicas aquáticas. A seguinte ordem decrescente do grau de humificação das SHA coletadas mensalmente pode ser estabelecida: Novembro/02 a Fevereiro/03 > Março/02 a Maio/02 > Junho/02 a Outubro/02. As maiores concentrações de mercúrio foram determinadas nas amostras mais humificadas, sugerindo que devido a rearranjos inter e/ou intramoleculares, quanto maior o grau de humificação maior a afinidade dos íons Hg(II) pelas substâncias húmicas aquáticas. A capacidade de complexação das substâncias húmicas aquáticas por íons Hg(II), nas diferentes frações indicaram que quanto maior o teor de carbono, menor é a capacidade complexante das substâncias húmicas, podendo inferir que a capacidade complexante não está diretamente relacionada com o teor de carbono, mas com a disponibilidade dos grupos funcionais nas substâncias húmicas aquáticas. As análises estatísticas multivariadas indicaram que as frações se agruparam em função dos meses de coleta e não do tamanho molecular. De maneira geral, pode-se observar as tendências de mudanças das características das substâncias húmicas aquáticas em função da sazonalidade, sendo que nos períodos de cheia maior a disponibilidade de mercúrio para o meio.

ABSTRACT

The Rio Negro Basin has particular characteristics of biodiversity, temperature, humidity and an important factor to be considered is the great amount of humic substance in aquatic and terrestrial systems of this region. In this work, the influence of seasonalness on the structural characteristics of aquatic humic substances (AHS) extracted from samples collected in the Rio Negro-AM and its interaction with mercury ions were evaluated. The C/H, C/N and C/O atomic ratio parameters, functional groups, concentration of semiquinone-type free radicals, pH, pluviometric and fluviometric indices, and mercury concentrations were interpreted using hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA). The statistical analyses showed that when the pluviometric index was greater and the fluviometric index was smaller, the degree of humification of aquatic substances was greater. The following decreasing order of the degree of humification of the AHS collected monthly was established: Nov/02 to Feb/03 > Mar/02 to May/02 > Jun/02 to Oct/02. The greatest concentrations of mercury were detected in more humidified samples. These results suggest that due to inter and/or intra-molecular rearrangements, the degree of humification of aquatic humic substances is related to its affinity for Hg(II) ions. The complexing capacity of humic substances by Hg(II) ions in different fractions indicated that the greater the carbon content the lower the complexing capacity of humic substances, allowing one to infer that the complexing capacity is not directly related to the carbon content, but to the availability of functional groups in aquatic humic substances. Multivariate statistical analyses indicated that the fractions were grouped as a function of the collection months and not of the molecular size. A general tendency can be observed for seasonal changes in the characteristics of aquatic humic substances, with mercury showing a greater availability in the environment during the flooding period.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Modelo conceitual proposto para a teoria macromolecular. As letras A, B e C representam os espaços “vazios” na molécula (Schulten e Schnitzer, 1995).....	04
Figura 2	Estrutura da membrana como húmica sob superfície oxi-hidróxidos (Whershaw, 1993).....	05
Figura 3	Esquema da estabilização do radical livre semiquinona (Senesi & Schnitzer, 1977).....	07
Figura 4	Ciclo geral do mercúrio em ambientes naturais.....	16
Figura 5	Ponto de coleta das amostras de água no Rio negro-AM, entre as confluências dos Rios Tarumã e Tarumã Mirim, na Praia da Lua GPS:3 02' 22S 60 08' 21W.....	29
Figura 6	Sistema utilizado na diálise das substâncias húmicas extraídas de amostras de águas coletadas na Bacia do Rio Negro-AM.....	32
Figura 7	Sistema utilizado na limpeza das vidrarias.....	34
Figura 8	Sistema utilizado na determinação de mercúrio utilizando-se espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio - CVAAS. (Condições: solução de SnCl ₂ 20% (m/v) com fluxo de 2,5 mL min ⁻¹ ; vazão do gás carregador (N ₂) de 0,3 L min ⁻¹). 1-fluxômetro, 2-Frasco contendo solução de SnCl ₂ , 3-bomba peristáltica, 4-frasco reacional, 5- célula de quantificação.....	35
Figura 9	Esquema do sistema de fracionamento seqüencial por ultrafiltração para substâncias húmicas extraídas de amostras de águas coletadas no Rio Negro-AM. <u>Condições:</u> filtros equipados com membranas comerciais (Sartorius), com 50 cm ² M ₁ : 100, M ₂ : 50, M ₃ : 30, M ₄ : 10 e M ₅ : 5 kDa; frações obtidas e respectivos intervalos de tamanhos moleculares médios de F ₁ (>100), F ₂ : (100 - 50), F ₃ : (50 - 30), F ₄ : (30 - 10), F ₅ : (10 - 5) e F ₆ : (< 5 kDa); B: bomba peristáltica de 5 canais com tubos de bombeamento de Tygon®; R ₂ a R ₅ (25 mL), R ₁ (250 mL) e R ₆ (500 mL): reservatórios de frações; P ₁ a P ₅ : reguladores de pressão; Ma: manômetro; 250 mL de solução de substâncias húmicas 1,0 mg mL ⁻¹ em pH 5,0; fluxo tangencial com vazão de 85 mL min ⁻¹ em todos os filtros; pressão inicial de 0,2-0,3 bar; fluxo de permeação através das membranas 0,8-1,4 mL min ⁻¹ ; limpeza do sistema com 200 mL de água.....	36

Figura 10	Reservatório com volume interno de 25 mL, para coletas das frações durante o fracionamento dos extratos húmicos utilizando-se o sistema de fracionamento seqüencial por ultrafiltração. 1: entrada do filtrado húmico; 2: aspiração do filtrado húmico para o próximo filtro de membrana com fluxo tangencial; 3: retorno para circulação do material não filtrado no próximo filtro.....	37
Figura 11	Esquema do sistema utilizado para determinação da capacidade de complexação das substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras coletadas mensalmente no Rio Negro por íons Hg(II). Condições: sistema de ultrafiltração (Sartorius Ultrasart X), equipado com membrana de porosidade de 1 kDa e 47 mm de diâmetro (cellulose, Gelman Pall-Filtron OMEGA). pH da solução de SHA ou MOD 6,0; Solução de permanganato de potássio: 0,024 % (m/v), em solução de ácido sulfúrico, 4 % (v/v).....	38
Figura 12	Média anual dos níveis de água do Rio Negro-AM.....	40
Figura 13	Dendograma para as determinações feitas nas substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras de água coletadas mensalmente no Rio Negro-AM: razões atômicas C/H, C/N, C/O; grupos funcionais a partir dos dados de RMN ¹³ C, radicais livres tipo semiquinona (obtidos a partir dos dados de EPR), concentrações de mercúrio e parâmetros sazonais.....	46
Figura 14	Autovalores e suas porcentagens obtidas pelas componentes calculadas a partir das determinações feitas nas amostras de substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras de água coletadas mensalmente no Rio Negro-AM: razões atômicas (C/H, C/N, C/O), grupos funcionais, radicais livres do tipo semiquinona, concentrações de mercúrio e parâmetros sazonais.....	47
Figura 15a e 15b	Pesos das variáveis e escores das substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras de água coletadas mensalmente no Rio Negro-AM nas componentes principais 1 e 2 obtidas a partir das determinações das razões atômicas, grupos funcionais, radicais livres do tipo semiquinona, concentrações de mercúrio e parâmetros sazonais.....	49
Figura 16	Histograma do carbono orgânico dissolvido para água do rio (Thurman, 1985).....	51

Figura 17	Distribuição do teor de carbono e capacidade de complexação das frações húmicas de diferentes tamanhos moleculares por íons Hg(II) extraídas de amostras de água coletadas em Março/02, Julho/02 e Dezembro/02 no Rio Negro-AM e fracionadas por sistema de ultrafiltração sequencial em múltiplos estágios e fluxo tangencial.....	53
Figura 18	Intervalos dos tamanhos moleculares de partículas aquosas (Thurman, 1985).....	53
Figura 19	Espectros na região do infravermelho para as frações de substâncias húmicas aquáticas de diferentes tamanhos moleculares, extraídas de amostras de água coletadas em Dezembro/02 no Rio Negro-AM, utilizando-se sistema de ultrafiltração sequencial em múltiplos estágios e fluxo tangencial. Condições: 250 mL de SHA 1 mg mL ⁻¹ ; pH 5,0; frações F ₁ : > 100; F ₂ : 50-100; F ₃ : 30-50; F ₄ : 10-30; F ₅ : 5-10; F ₆ : <5 kDa.....	54
Figura 20	Curva típica para determinação da capacidade de complexação da matéria orgânica por íons Hg(II) (Condições: Temperatura ≈ 25° C, pH: 5-6).....	57
Figura 21	Redução de Hg (II) e capacidade de complexação da matéria orgânica dissolvida por íons Hg(II) de amostras de água coletadas na Bacia do Rio Negro-AM, com COT de aproximadamente 2 mg L ⁻¹ , pH: 5,0-6,0, temperatura: 25 °C.....	58
Figura 22	Dendograma obtido à partir das determinações da capacidade de complexação das frações de substâncias húmicas aquáticas por íons Hg(II); carbono orgânico total e índices pluviométricos e fluviométricos.....	61
Figura 23	Dendograma para as amostras de substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras coletadas no Rio Negro e fracionadas por tamanho molecular: F ₁ >100 kDa, F ₂ : (100 - 50), F ₃ : (50 - 30), F ₄ : (30 - 10), F ₅ : (10 - 5) e F ₆ : (< 5 kDa).....	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Atribuições do deslocamento químico em espectro de RMN ¹³ C para ácidos húmicos e fúlvicos (Swift, 1996).....	09
Tabela 2	Características físico-químicas das amostras de águas coletadas mensalmente na Bacia do Rio Negro-AM.....	40
Tabela 3	Valores das razões atômicas (H/C, C/N e C/O) e da concentração de spins (concentração de radicais livres orgânicos) de substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras de água coletadas mensalmente no Rio Negro-AM.....	41
Tabela 4	Razões atômicas (H/C, C/N e C/O) para diferentes amostras de matéria orgânica e substâncias húmicas extraídas de amostras coletadas na Bacia Amazônica, de acordo com a literatura.....	42
Tabela 5	Porcentagens dos diferentes tipos de carbono presentes nas substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras de água coletadas mensalmente no Rio Negro-AM.....	44
Tabela 6	Concentrações médias de mercúrio presentes nas substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras de água coletadas mensalmente no Rio Negro-AM.....	44
Tabela 7	Capacidade de complexação (CC) da matéria orgânica dissolvida em diferentes concentrações por íons Hg(II) (Temperatura ≈ 25°C, pH: 5 -6)...	57
Tabela 8	Ordem decrescente do teor de carbono orgânico total e da capacidade de complexação, estabelecidas para as frações húmicas de substâncias húmicas aquáticas de diferentes tamanhos moleculares extraídas de amostras de água coletadas mensalmente no Rio Negro-AM.....	59
Tabela 9	Tendências de mudanças de características das SHA do Rio Negro-AM em função da sazonalidade e de parâmetros físico-químicos.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP	Análise de componente principal
AF	Ácido fúlvico
AH	Ácido húmico
AHA	Análise hierárquica de agrupamentos
CC	Capacidade de complexação
COD	Carbono orgânico dissolvido
COT	Carbono orgânico total
CP	Componente principal
CP₁	Componente principal 1
CP₂	Componente principal 2
CVAAS	Espectroscopia de absorção atômica com geração de vapor frio
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica
HMB	Hexametil benzeno
M	Metal
MAS	Rotação segundo ângulo mágico
MO	Matéria orgânica
MOA	Matéria orgânica aquagênica
MOD	Matéria orgânica dissolvida
MON	Matéria orgânica natural
MOR	Matéria orgânica refratária
MOP	Matéria orgânica pedogênica
PC	Polarização cruzada
RLO	Radical livre orgânico
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1
RMN¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RT	Temperatura ambiente
SFSUF	Sistema de fracionamento seqüencial por ultrafiltração
SH	Substância húmica
SHA	Substância húmica aquática
UF	Ultrafiltração
VA	Amplitude variável

PREFÁCIO

O projeto de doutorado intitulado "Interações entre mercúrio(II) e substâncias húmicas aquáticas de diferentes tamanhos moleculares, extraídas de amostras coletadas no Rio Negro-AM" (Processo FAPESP nº 03/12563-8) que originou esta tese, está contextualizado ao projeto temático: "Fluxos de mercúrio na bacia do Rio Negro, Amazônia" (Processo FAPESP nº 2000/13517-1). Este teve como objetivo principal propor mecanismos para entendimento do ciclo do mercúrio na Bacia do Rio Negro-AM. O interesse no ciclo do mercúrio se deve ao seu elevado potencial tóxico para a biota e para os seres humanos, pois no ambiente interage com várias substâncias inclusive com matéria orgânica. A principal forma de matéria orgânica globalmente distribuída nos ecossistemas naturais são as substâncias húmicas, e um importante fator a ser considerado nessa região é o elevado teor dessas substâncias presentes nos sistemas aquáticos e terrestres. As substâncias húmicas aquáticas (SHA) exercem importante papel quanto ao acúmulo, transporte e redução da disponibilidade de espécies mercuriais na bacia Amazônica. Assim, neste trabalho pretende-se caracterizar as SHA e estudar interações (p.e. capacidade de complexação) entre mercúrio(II) e SHA extraídas do Rio Negro-AM e fracionadas em função de tamanhos moleculares, buscando contribuir para o melhor entendimento do ciclo biogeoquímico do mercúrio na Bacia do Rio Negro-AM.

I – INTRODUÇÃO

I.1 – Matéria orgânica natural

A expressão matéria orgânica natural (MON) tem sido empregada para designar toda matéria orgânica existente nos 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) refere-se àquela formada na água, pela excreção e decomposição de plâncton e bactéria aquática, enquanto a matéria orgânica de origem pedogênica (MOP), refere-se a decomposição de plantas terrestres e microorganismos, incluindo material lixiviado dos solos para os sistemas aquáticos (Macalady, 1998).

A MOP é formada pela degradação de lignina, carboidratos e proteínas, os quais levam 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.2- Substâncias húmicas

As substâncias húmicas (SH) são formadas por processos microbiológicos, pela decomposição de resíduos de plantas e animais, bem como consistem de uma grande variedade de sub-estruturas alifáticas e aromáticas (Stevenson, 1994). Embora há cerca de 200 anos venham sendo estudadas as características e propriedades das substâncias húmicas presentes nos solos, apenas nos últimos 30 anos tem aumentado o interesse pelo estudo das substâncias húmicas aquáticas (SHA), principalmente em razão da conscientização sobre a importância da

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

qualidade química da água para o consumo humano. Nesse contexto, o estudo de suas propriedades associadas ao transporte, labilidade e complexação de espécies metálicas/pesticidas em sistemas aquáticos é essencial para melhor entender o comportamento dessas espécies no ambiente (Rocha & Rosa, 2003).

As SH são amorfas, escuras e com grande conteúdo de funções orgânicas, tais como derivados dos grupos carboxílicos, fenólicos, enólicos, alcoólicos, quinonas, dentre outros. Possuem massa molar aparente que varia de centenas a milhares de unidade de massa atômica (u.m.a) e são bastante resistentes à degradação química e biológica (Schnitzer, 1978; Stevenson, 1994; Schulten e Schnitzer, 1995). De acordo com suas características de solubilidade em meio aquoso, as SH podem ser divididas em ácidos fúlvicos (AF), ácidos húmicos (AH) e humina.

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

As SHA podem ser de origem alóctone (levadas por lixiviação e/ou erosão dos solos e transportadas aos lagos, rios e oceanos pelas águas das chuvas, pequenos cursos de água e águas subterrâneas) ou autóctones (derivadas dos constituintes celulares e da degradação de organismos aquáticos nativos). Diferente de qualquer outro grupo de produtos naturais, a análise estrutural das SH ainda é um assunto em estudo (Hayes *et al.*, 1989).

I.3- Estrutura das substâncias húmicas

Desde meados do século XIX, modelos vêm sendo propostos para a estrutura das substâncias húmicas, mas ainda não existe um modelo estrutural para as SH explicando totalmente a composição química, a estrutura, a forma e o tamanho (Kononova, 1966; Schnitzer, 1978; Clapp e Hayes, 1999; Burdon, 2001; Hayes e Clapp, 2001, Piccolo, 2001). Provavelmente, isto ocorre não apenas por causa da complexidade e heterogeneidade estrutural das SH, mas principalmente devido à falta de uma identidade estrutural genérica, a qual é fortemente influenciada pelo grau e mecanismo de decomposição.

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

Na literatura existem várias propostas estruturais para as SH (Flaig, 1960; Kononova, 1966; Schnitzer & Khan, 1978; Stevenson, 1982). Schulten e Schnitzer (1995) propuseram uma estrutura para as substâncias húmicas baseada na proposta de que substâncias húmicas seriam macromoléculas orgânicas, com características similares às macromoléculas biológicas, como proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e lignina. Schnitzer e Khan (1978), Schulten e Schnitzer (1997) e Sein *et al.* (1999) propuseram a existência de espaços vazios de diferentes tamanhos onde podem estar outros compostos orgânicos, hidrofílicos ou hidrofóbicos, como carboidratos, lipídeos, pesticidas e também componentes inorgânicos, como argilas e óxidos-hidróxidos, baseados no modelo da macromolécula (Figura 1).

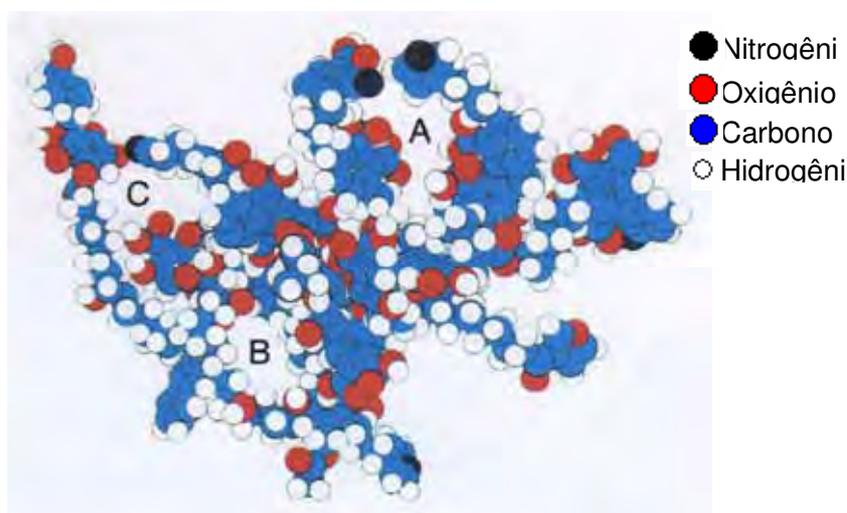


Figura 1 – Modelo conceitual proposto para a teoria macromolecular. As letras A, B e C representam os espaços “vazios” na molécula (Schulten e Schnitzer, 1995).

Wershaw (1993) propôs que as substâncias húmicas, sendo anfifílicas, formam misturas de agregados de moléculas em solução, os agregados húmicos são mantidos por ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Ainda de acordo com Wershaw, os agregados húmicos são semelhantes a micelas, as quais possuem interiores preferencialmente compostos por porções hidrofóbicas e a parte hidrofílica está posicionada na superfície externa (Figura 2). Este é o modelo supramolecular proposto para as substâncias húmicas, o qual deu origem à teoria supramolecular proposta por Piccolo (2001, 2002). De acordo com esta teoria, a qual atualmente tem sido aceita por muitos pesquisadores da área, as substâncias húmicas são formadas por agregados de pequenas moléculas heterogêneas de várias origens, auto-organizadas em conformações supramoleculares, o que explicaria o grande tamanho molecular aparente das SH. No conceito

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

supramolecular, os ácidos fúlvicos são associações de pequenas moléculas hidrofílicas dispersas em solução, devido à repulsão eletrostática das cargas negativas provenientes da dissociação dos grupos ácidos. Os ácidos húmicos são constituídos por associações de estruturas predominantemente hidrofóbicas que são estabilizadas em pH neutro por forças dispersivas hidrofóbicas, aumentando gradualmente seu tamanho com o decréscimo do pH, até a sua precipitação. A influência do pH ocorre por meio da protonação da molécula e conseqüente aumento das ligações de hidrogênio intermoleculares (Piccolo, 2001).

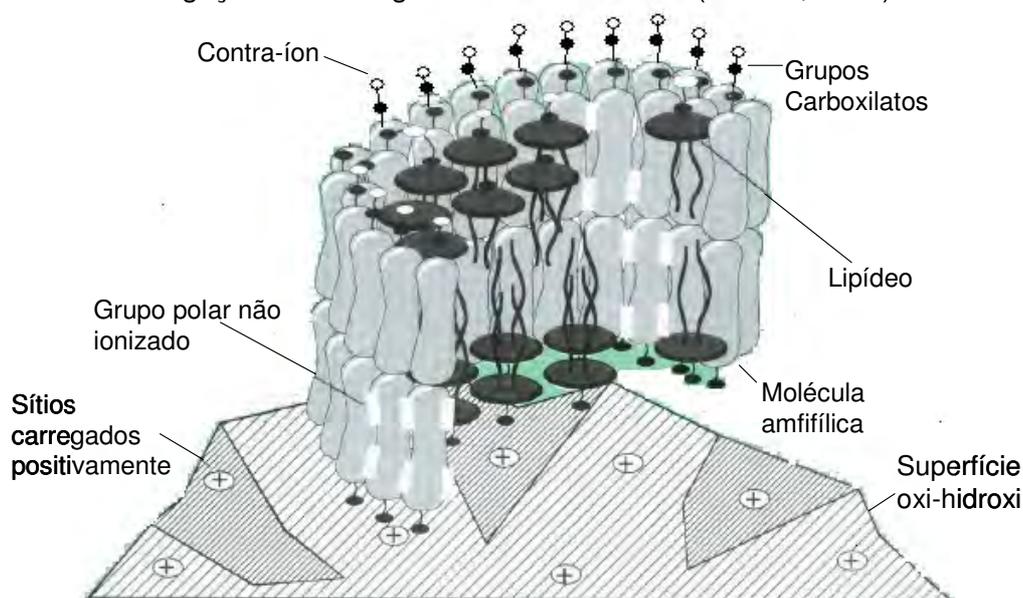


Figura 2 – Estrutura da membrana como húmica sob superfície oxi-hidróxidos (Whershaw, 1993).

I.4- Importância ambiental das substâncias húmicas

- A quantidade de carbono presente na Terra na forma de SH (60 1011 T) excede àquela presente em organismos vivos (7 1011 T), representando assim a principal forma de matéria orgânica distribuída no planeta Terra.
- Algumas características das SH responsáveis por sua grande importância ambiental são:
 - 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 de solos (Rocha e Rosa, 2003);

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

- 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 e 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 presentes na atmosfera (Rocha e 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, 2003);
- Interação com compostos orgânicos antrópicos, por exemplo, xenobióticos por efeitos de adsorção, solubilização, hidrólise, processos microbiológicos e fotossensibilizantes (Barceló, 1991; Santos *et al.*, 1998);
- Dependendo 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).

1.5 – 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 de solos, na tentativa de determinar a composição e estrutura geral da macromolécula. Entretanto, devido à natureza heterogênea das SH e da complexidade das reações inter e intramolecular, os resultados são sempre difíceis de interpretar (Swift, 1996).

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.

I.5.1 - Técnicas espectroscópicas

I.5.1.1 - Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

A técnica de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) tem sido utilizada para caracterização de espécies com elétrons desemparelhados. Quando moléculas contendo elétrons desemparelhados são submetidas a um campo magnético, ocorre o desdobramento dos níveis de energia do spin eletrônico (efeito Zeeman). Ao passar uma radiação na frequência de microondas (10^{12} - 10^9) sob essas moléculas ocorre o fenômeno de ressonância paramagnética eletrônica e esta absorção de EPR pode ser quantificada e é proporcional à concentração de spins presentes na amostra de interesse.

A primeira descoberta de radicais livres estáveis em substâncias húmicas foi feita por Rex (1960). Desde então, numerosos estudos foram feitos sobre a natureza e propriedade desses radicais. Essa estabilidade tem sido atribuída a elétrons desemparelhados em um sistema aromático, sugerindo a presença de radicais livres do tipo semiquinona nas substâncias húmicas (Swift, 1996). Na Figura 3 é mostrado um esquema da estabilização do radical livre semiquinona (Senesi & Schnitzer, 1977).

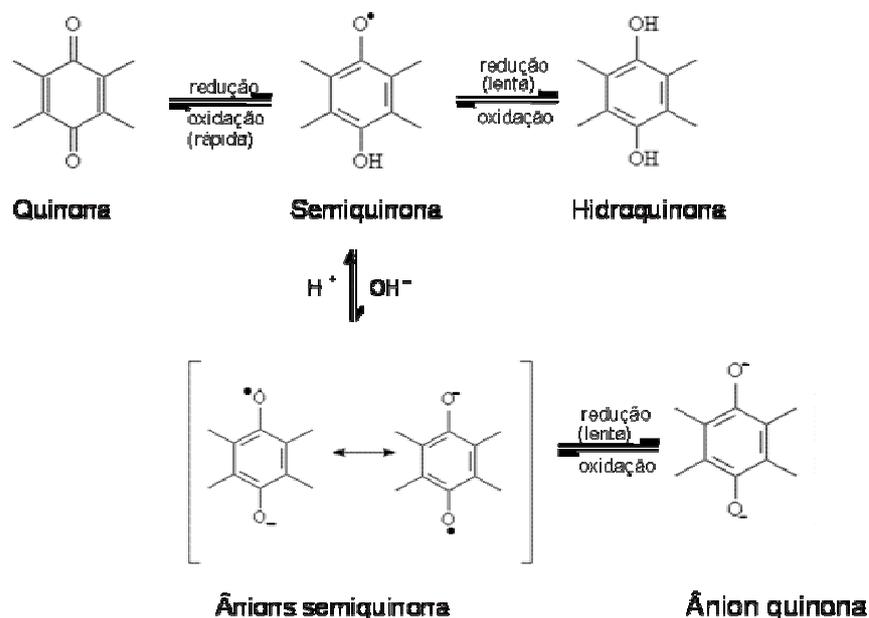


Figura 3 – Esquema da estabilização do radical livre semiquinona (Senesi & Schnitzer, 1977).

Uma das principais informações a respeito das SH é a medida do grau de humificação, o qual está associado à estabilidade e complexidade das moléculas

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

húmicas. A técnica de EPR possibilita determinar a concentração de radicais livres e, conseqüentemente, estimar o grau de humificação das SH (Martin-Neto *et al.*, 1994).

I.5.1.2 – Ressonância magnética nuclear (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é basicamente outra forma de espectroscopia semelhante ao EPR. Sob condições adequadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequência em uma frequência dependente das características estruturais da amostra. O espectro obtido é um registro gráfico das frequências dos picos de absorção em função de suas intensidades (Silverstein *et al.*, 1991).

Devido à elevada abundância isotópica e razão giromagnética de hidrogênio (^1H), seus núcleos são mais facilmente observados que os de ^{13}C . Logo, na aplicação para substâncias húmicas, a RMN ^1H não tem sido muito utilizada devido a baixa resolução dos hidrogênios das subestruturas presentes nas substâncias húmicas (Stevenson, 1994).

A técnica de espectroscopia de RMN ^{13}C é muito utilizada para caracterização da matéria orgânica de solos. As técnicas de RMN ^{13}C podem ser aplicadas tanto para amostras no estado sólido como no estado líquido. Devida à insolubilidade de alguns componentes da matéria orgânica, a espectroscopia de RMN ^{13}C no estado sólido para amostras de SH tem sido mais utilizada (Stevenson, 1994).

Embora a técnica de RMN ^{13}C , não permita identificar diretamente a estrutura das substâncias húmicas, fornece importantes informações sobre os tipos de grupos orgânicos presentes na molécula, auxiliando na caracterização das substâncias húmicas. Permite estimar o teor e tipo de carbonos presentes, os quais podem ser obtidos pela integração dos picos nas regiões específicas dos espectros (Swift, 1996). Para análise, os espectros têm sido divididos em regiões correspondentes às classes químicas específicas, como listado na Tabela 1.

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

Tabela 1 – Atribuições do deslocamento químico em espectro de RMN ¹³C para ácidos húmicos e fúlvicos (Swift, 1996).

Possíveis atribuições para os C ¹³	Regiões espectrais (δ)
- Carbono alifático	0–65
- Éteres, hidroxilas e açúcares	65–110
- C aromático	110–140
- C fenol (O-aril)	140–160
- C carboxílicos, ésteres e amidas.	160–190
- C=O de aldeídos e cetonas	190–220

I.6 – Capacidade complexante das SH

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

A capacidade das SH de reter substâncias é tão importante que pode influenciar diretamente no aquecimento global, isto é, a formação de SH é uma forma de seqüestro de carbono, armazenando o CO₂ e contribuindo para minimizar o aquecimento global. Além disso, a alta capacidade complexante das substâncias húmicas aquáticas (SHA) pode alterar a biodisponibilidade e os efeitos toxicológicos de metais em sistemas aquáticos (Rocha e Rosa, 2003). Os complexos formados entre SHA e espécies metálicas (SHA-M) possuem diferentes estabilidades, as quais são altamente dependentes do pH, espécies metálicas, força iônica, concentração de SHA e condições redox (Ninfant'eva *et al.*, 1999). Recentes investigações concluíram que, para caracterizar a "reatividade" da ligação entre espécies metálicas e SHA, são necessários procedimentos analíticos adequados que forneçam informações sobre a estabilidade termodinâmica e cinética (Rocha e Rosa, 2003). Estudos de troca-iônica têm demonstrado que a disponibilidade de metais ligados as SHA parece ser dependente também de fatores cinéticos. E mais, a força e natureza da ligação entre SHA e metais são fortemente influenciadas pelo tamanho molecular das SHA, 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 SHA, obter frações distintas com propriedades similares e permitir a caracterização de suas interações com espécies metálicas (Rocha *et al.*, 1999).

I.7 – Fracionamento das SH

Procedimentos baseados nas diferenças de solubilidade, reações com íons metálicos, massa molar, densidade de carga e características de adsorção, têm sido os mais utilizados para fracionamento das SH.

A variação do pH é a forma mais utilizada para fracionamento das SH extraídas de solos por solventes alcalinos (Stevenson, 1982). As frações obtidas são ácidos húmicos (AH), solúveis em álcali e insolúveis em ácido (precipitam em $\text{pH} < 2$); ácidos fúlvicos (AF), solúveis em álcali e ácido e humina, insolúvel em álcali e em ácido. Estas definições são baseadas na extração alcalina de solos e sedimentos. Porém, a mesma terminologia pode ser utilizada quando o extrator é neutro, ácido ou solvente orgânico.

Alguns fatores influenciam no fracionamento baseado na variação do pH. A fração húmica obtida por precipitação em $\text{pH} < 2,0$, seguida de liofilização, é facilmente dissolvida por solventes neutros ou fracamente alcalino. Entretanto, quando o ácido húmico é seco ao ar, é menos solúvel. A razão ácidos húmicos/ácidos fúlvicos extraídos com solventes alcalinos também é influenciada pela presença de metais e concentração do extrator (Gascho *et al.*, 1968 ; Rosa, 1998). Esse efeito deve-se ao rompimento de forças intermoleculares como ligações de hidrogênio e ligações do tipo éster entre o AH e o AF (Stevenson, 1982). De acordo com Senesi *et al.* (1994), o armazenamento de AF sob condições ácidas pode induzir sua polimerização.

Solventes orgânicos, sais e íons metálicos têm sido usados para separar AH e AF em diferentes subfrações. Um exemplo do fracionamento das SH utilizando solvente orgânico é a obtenção do ácido himatomelânico a partir de tratamento dos ácidos húmicos com etanol (Oden, 1919). As SH também podem ser fracionadas com acetona, metanol, metil iso-butilcetona e éter dietílico (Post *et al.*, 1992).

Eletrólitos influenciam o comportamento das macromoléculas húmicas (polietrólito) devido alterações nas cargas. Aumentando a concentração de sais, diminui-se a extensão da dupla camada, aproximando-se mais da superfície da macromolécula, podendo ocorrer a precipitação. Ácidos húmicos redissolvidos em base podem ser fracionados pela adição de sais, como cloreto de potássio (Springer, 1938) ou sulfato de amônio, precipitando o ácido húmico "Gray" enquanto o ácido húmico "Brown" permanece em solução (Theng *et al.*, 1968).

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

Vários íons divalentes e polivalentes são capazes de formar sais ou complexos insolúveis com SH, causando a precipitação. Íons cobre foram muito utilizados para fracionamento de AF em ácidos "Apocrênico" e "Crênico", e Swift (1985) fracionou SH por precipitação com íons metálicos. Entretanto, o fracionamento das SH utilizando solventes orgânicos, sais e íons metálicos não tem tido muita aplicação, pois a maioria dos estudos tem sido feita com as 3 principais frações ou seja, AH, AF e humina.

A eletroforese é baseada no movimento de cargas de moléculas do soluto em um campo elétrico. Em um experimento tradicional de eletroforese, a amostra de SH é dissolvida em tampão alcalino e colocada em suporte com superfície plana ou em pérolas de gel em sistemas por coluna. A migração ocorre em função inversa da massa molecular e direta da densidade de carga. Geralmente, a eficiência do fracionamento pela eletroforese tradicional é inferior ao obtido com base na massa molar ou solubilidade (Senesi *et al.*, 1994).

A cromatografia por permeação em gel tem sido extensivamente aplicada para o fracionamento de macromoléculas húmicas com base na massa molar. Os géis mais comumente utilizados consistem de polissacarídeos, poliestireno e poliamidas na forma de pequenos grânulos. A estrutura do gel é permeada por um sistema de poros com capacidade de agir como meio cromatográfico, permitindo a separação baseada nas diferenças de massa molar. Moléculas menores que o tamanho dos poros do gel podem entrar nos poros e sua passagem na coluna é retardada. Assim, as moléculas são eluídas em ordem decrescente de massa molar.

Esta técnica é rápida, barata e muito versátil. Entretanto, alguns problemas, tais como interações químicas ou físicas entre o gel e o soluto, devem ser contornados para não invalidar os resultados. As SH, quando adsorvidas pelo gel, alteram os resultados da separação que não podem ser inteiramente atribuídos às diferenças de massa molar. O mesmo problema pode resultar da interação de cargas entre o gel e as macromoléculas húmicas. Esses inconvenientes podem ser evitados utilizando-se o gel e a solução eluidora apropriada (Swift, 1971). Town *et al.* (1992) também conseguiram eliminar os efeitos de adsorção adicionando ao eluente tetraborato de sódio ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e solução de pirofosfato de sódio ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$).

O amplo intervalo de massa molar característico das SH pode gerar dificuldades na escolha de um gel adequado. O uso sucessivo de géis de vários

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

limites de exclusão com reaplicação das frações em géis com maior ou menor limite de exclusão pode minimizar o problema.

Resinas trocadoras aniônicas podem ser utilizadas para fracionar SH de solo (Wright *et al.*, 1960 e Roulet *et al.*, 1963). Depois da adsorção das moléculas húmicas, o fracionamento pode ser obtido por eluição com soluções tampão, salinas e, se necessário, com reagentes alcalinos. Na prática, o fracionamento obtido não é satisfatório, provavelmente por causa do limite da área superficial da resina, o qual limita a possibilidade de interação com os sítios carregados das macromoléculas húmicas. Como consequência, há perda de resolução no fracionamento.

Procedimentos baseados em processos de adsorção em alumina, géis e, mais recentemente, resinas macroporosas XAD, têm sido utilizados para fracionamento de SH, especialmente AF (Swift, 1985). A dessorção pode ser feita por solventes orgânicos e reagentes ácidos ou básicos. O inconveniente é a forte adsorção de SH na resina, sendo necessário utilizar reagentes que às vezes causam danos ao material da resina. Uma exceção é a resina XAD 8, a qual tem adsorção menor sendo de maior aplicabilidade, tanto para fracionamento como para propriedades de purificação.

Ultracentrifugação utilizando gradiente de densidade ou técnica de centrifugação zonal também tem sido aplicada para fracionamento das SH. O procedimento é um pouco trabalhoso, se comparado com cromatografia em gel e ultrafiltração. Além disso, a supressão da repulsão entre as cargas intermoleculares pela adição de eletrólito é essencial para fracionar as SH por técnicas de ultracentrifugação (Hayes, 1978).

A ultrafiltração é uma técnica simples e rápida, a qual permite o fracionamento das SH utilizando uma série de membranas. Membranas com diâmetro de poro de alguns nanômetros podem ser usadas para filtrar moléculas em solução com base no tamanho molecular. O fracionamento pode ser feito em ordem ascendente ou descendente de tamanho molecular. Um inconveniente é a distribuição não completamente uniforme dos tamanhos dos poros nessas membranas e, nesse caso, o tamanho molecular pode não ser o esperado. Os resultados das interações entre as cargas da macromolécula húmica e as da membrana podem interferir no processo de filtração, o qual não será mais baseado somente no tamanho molecular (Senesi *et al.*, 1994).

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

A técnica de filtração através de membranas tem sido utilizada principalmente em indústrias para fracionar material dissolvido e particulado em sistemas aquosos. Esta técnica tem-se mostrado ser efetiva não só em procedimentos preparativos, mas também em escala analítica (Buffle, 1988 e Kilduff & Weber, 1992). Particularmente, filtração em cascata com membranas dispostas em série tem sido utilizada para essa proposição. Cada cela consiste de um sistema com um filtro de membrana semipermeável, dreno, tubos e instrumentos de controle (Barker & Till, 1992). Entretanto, semelhantes sistemas têm desvantagens práticas, tais como dificuldade de separação das espécies na presença de várias partículas, devido à formação de gel ou coagulação de camadas na superfície do filtro, baixas vazões e dificuldades no controle operacional.

Ao invés de utilizar os sistemas de celas de ultrafiltração convencionais, pode-se também utilizar fibras porosas dispostas em séries para separações analíticas como, por exemplo, para especiação de elementos traço associado com componentes de águas naturais. Entretanto, as fibras porosas são muito sensíveis a obstruções dos poros por partículas sólidas e de custo relativamente alto. Sistemas de fibras porosas dispostas em cascata podem ser mais úteis para concentrar espécies macromoleculares dissolvidas em grandes volumes de amostras. Nos processos de separação, além da obstrução dos poros e conseqüentemente maior tempo demandado, outros problemas analíticos podem ocorrer devido a fenômenos de contaminação e adsorção. Semelhantes fenômenos ocorrem em alguns sistemas de filtração em cascata devido a inerente utilização de tubos relativamente longos, muitas válvulas e conectores. Em princípio, essas dificuldades poderiam ser minimizadas utilizando-se sistemas de ultrafiltração sequencial com múltiplos estágios.

Unidades de ultrafiltração (UF) com fluxo tangencial permitem filtração relativamente rápida devido ao reduzido processo de obstrução dos poros, pois os compostos acumulados na superfície da membrana são deslocados pelo forte fluxo cruzado. Em sistemas semelhantes, várias celas de fluxo tangencial acopladas "on-line" são operadas por uma simples bomba peristáltica com múltiplos canais de fácil manuseio, trabalhando em sistema fechado, bem como a coleta das frações obtidas é simples.

Particularmente, o fracionamento de substâncias húmicas por UF em filtros de membranas adequados é, em princípio, um método simples para estudar misturas

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

complexas de macromoléculas, tais como substâncias húmicas, em função da distribuição dos respectivos tamanhos moleculares. Nesse caso, seria possível a caracterização de importantes propriedades físicas e químicas das SH dissolvidas em função do tamanho molecular (Swift, 1989), como por exemplo a solubilidade, o comportamento de adsorção, a acidez, a capacidade complexante com íons metálicos, a distribuição de grupos funcionais e as estruturas reativas.

Um sistema de ultrafiltração seqüencial com múltiplos estágios, desenvolvido por Burba *et al.* (1995), foi utilizado no fracionamento e caracterização das SH em estudos ambientais e biológicos. Burba *et al.* (1998); Shkinev *et al.* (1996) e Aster *et al.* (1996) e (1997), Rocha *et al.* (1999) mostraram que sistemas de ultrafiltração com múltiplos estágios podem ser uma importante técnica para caracterização de frações de substâncias húmicas aquáticas com diferentes tamanhos moleculares.

I.8 – Mercúrio

I.8.1 – Propriedades químicas relevantes do mercúrio

O mercúrio é o único metal líquido existente. Conhecido desde a Antiguidade, sua designação em latim, hydrargyrum, significa prata líquida com a qual se assemelha (Nascimento e Chasin, 2001). O mercúrio é pouco solúvel em água ($6 \cdot 10^{-5} \text{ g L}^{-1}$; 25°C), líquido, volátil ($1,22 \cdot 10^{-3} \text{ mm}$; 20°C) e de acordo com Pearson (1963) é um metal da "classe B". Logo, tende a se associar com bases moles como enxofre (S^{2-} , SH^-), iodo e enxofre orgânico, fósforo e nitrogênio (Stumm e Morgan, 1981). Como resultado da seletividade de coordenação, Hg prefere NH_3 a H_2O , CN^- a OH^- , Cl^- , F^- , S-doador a O-doador como ligante. Pode estar presente nas formas metálica (mercúrio elementar), inorgânica e orgânica. Mercúrio metálico é branco-prata brilhante e líquido a temperatura ambiente. Compostos de mercúrio inorgânico ocorrem quando reage com elementos tais como cloreto, enxofre ou oxigênio. Esses sais de mercúrio são cristais brancos, exceto sulfeto mercúrico (também conhecido como cinábrio), o qual é vermelho e torna-se preto após exposição à luz. Os compostos organomercuriais são espécies nos quais o mercúrio está ligado a átomos de carbono. Existe uma grande variedade de compostos orgânicos de mercúrio, contudo o mais comum é o metil mercúrio (monometilmercúrio) que é a forma mais tóxica. No passado, o composto organomercurial fenilmercúrio foi muito

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

usado em produtos comerciais. Tanto o fenilmercúrio como o metilmercúrio existem na forma de sais, p.e. cloreto de metilmercúrio e acetato de fenilmercúrio e quando puros, são sólidos brancos cristalinos (Unep chemicals, 2002).

I.8.2 – Mercúrio no ambiente

O mercúrio ocorre naturalmente no ambiente estando presente em diferentes estados de oxidação. Encontra-se principalmente associado a outros elementos, sendo enxofre o mais comum. Uma importante fonte de mercúrio é o minério cinábrio (HgS), com as maiores reservas encontradas em Almadén na Espanha, Monte Amiata na Itália e Ídria na Iugoslávia (Micaroni *et al.*, 2000). Outras fontes naturais de mercúrio são erupções vulcânicas, evaporação natural e minas de mercúrio. As estimativas das emissões naturais de mercúrio são muito variadas na literatura, encontram-se valores de 2.700 a 125.000 toneladas ano⁻¹ (Micaroni *et al.* 2000; Nascimento e Chasin, 2001). As principais fontes emissoras antrópicas de mercúrio são as indústrias que queimam combustíveis fósseis e as de tintas a base de espécies mercuriais (Nascimento e Chasin, 2001). De acordo com estes autores, as estimativas mais recentes para a proporção anual de emissões naturais e antropogênicas de mercúrio para a atmosfera é de 1:1.

No ciclo biogeoquímico geral do mercúrio (Figura 4), espécies Hg⁺², metilmercúrio, dimetilmercúrio e Hg⁰ são interconvertidas nos compartimentos atmosféricos, aquáticos e terrestres. Na atmosfera, a espécie predominante é o Hg⁰ e nos sedimentos solo e água, Hg²⁺ é mais abundante. Assim, os processos atmosféricos são os principais responsáveis pelo transporte de mercúrio das fontes para os receptores por processos de emissão e aporte do Hg⁰. Uma importante característica do ciclo biogeoquímico do mercúrio são as diferentes vias que esta espécie pode seguir no ambiente. Destas, destacam-se sua liberação dos solos e das águas para a atmosfera, seu transporte na atmosfera e deposição em solos e águas. Quando em contato com solos (deposição atmosférica) e sedimentos, pode ocorrer a sorção do mercúrio na forma insolúvel seguida de metilação/demetilação. O ciclo é completado pelas vias de precipitação, bioconversão em formas voláteis e solúveis, liberação para a atmosfera ou bioacumulação em organismos aquáticos.

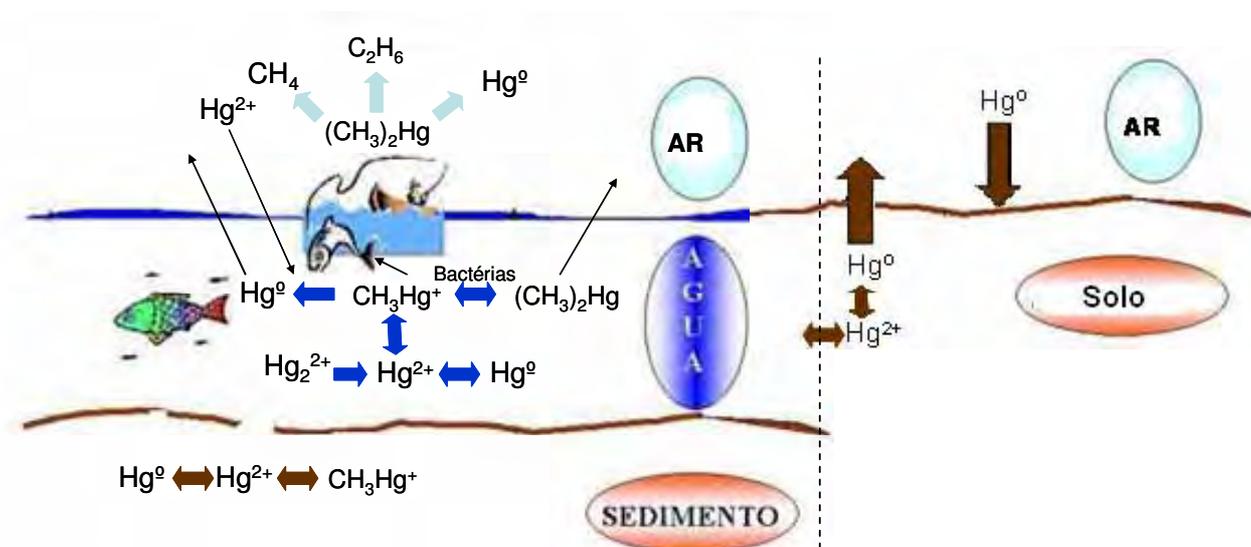


Figura 4 – Ciclo geral do mercúrio em ambientes naturais (Adaptado de Bisinoti, 2005).

Segundo Galperin *et al.* (1996), na atmosfera o mercúrio ocorre principalmente na forma metálica (Hg^0) e também no estado de valência ($+2$). Em ambos os casos, estão presentes nas formas gasosas, de aerossóis ou adsorvidos em materiais particulados. As principais espécies encontradas na atmosfera são mercúrio elementar (Hg^0), dicloreto de mercúrio ($HgCl_2$), óxido de mercúrio (HgO), sulfato de mercúrio ($HgSO_3$) e dimetilmercúrio. A interação entre as diferentes espécies é dinâmica. Pirrone *et al.* (2001) concluíram que mais do que 60 % da emissão de mercúrio antropogênico na Europa está na forma elementar gasosa, 30 % como mercúrio bivalente gasoso e 10 % como mercúrio elementar em particulados. De acordo com Schluter (2000), estudos feitos em minas de mercúrio em Almadén, Espanha, indicam que o vapor de mercúrio emitido por solos com elevada concentração é dependente da temperatura e da vegetação.

A remoção do mercúrio elementar (Hg^0) da atmosfera ocorre via deposição úmida. As formas divalentes de mercúrio (Hg^{2+}) e mercúrio particulado ($Hg(p)$) são no mínimo 10^5 vezes mais solúveis que o Hg^0 (Lindberg e Stratton, 1998) e são prontamente removidas após emissão em escala local ou regional via processos de deposição seca ou úmida (Schroeder e Munthe, 1998). Estas duas formas de mercúrio têm tempos de residência na atmosfera que vão de algumas horas a vários meses. O mercúrio divalente, conceituado como mercúrio gasoso reativo (RGM), pode reagir com um número considerável de ligantes diferentes (OH^- , Cl^- , Br^- , I^- , SO_3^{2-} e CN^-) para formar complexos inorgânicos relativamente estáveis como $HgCl_2$,

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

Hg(OH)₂ e Hg(SO₃)₂. O mercúrio particulado é formado quando o mercúrio divalente na forma de Hg(OH)₂, HgCl₂, HgSO₃ e Hg(NO₃)₂ é adsorvido em partículas atmosféricas principalmente em fase aquosa (chuva, nuvens).

A maior parte das emissões a partir de combustíveis fósseis ocorre na fase gasosa. Na zona de combustão, o mercúrio presente no carvão e outros combustíveis fósseis evaporam na forma elementar (Hg⁰) e parte do produto da combustão é oxidada. O processo de emissão de mercúrio durante a incineração de efluentes é semelhante, exceto que mais mercúrio na forma oxidada é obtido devido ao maior teor de cloreto presente nos efluentes do que em combustíveis fósseis.

A distribuição do mercúrio nos sedimentos está relacionada com o teor de carbono orgânico, ferro, argila, fósforo, enxofre, potencial redox, dentre outros fatores. Os compostos orgânicos, complexantes solúveis em água como humatos e fulvatos, podem quelar as espécies solúveis e insolúveis na água, sendo que estas precipitam diretamente da solução para o sedimento. O pH ácido favorece a adsorção de mercúrio pelo húmus, e em pH básico o mercúrio é preferencialmente adsorvido pela fração mineral (Nascimento e Chasin, 2001).

No solo, há favorecimento para a formação de compostos inorgânicos, tais como, HgCl, Hg(OH) e compostos de Hg(II) inorgânico, os quais formam complexos com ânions orgânicos. Esses complexos organo-mercuriais são adsorvidos na superfície das argilas e na matriz sólida a qual consiste principalmente de óxidos de ferro, alumínio e manganês e substâncias húmicas (Roulet *et al.*, 1998). A mobilidade do mercúrio nos solos é dependente principalmente do potencial de óxi-redução, pH drenagem e tipo de solo. Solos argilosos têm alta capacidade de reter (complexar, adsorver química e/ou fisicamente) mercúrio. Podem acumulá-lo durante anos e a quantidade acumulada depende da deposição, das características físico-químicas e do tempo de formação do solo. Estudos em solos oxisóis-podzóis na Guiana Francesa e na região do Rio Tapajós no Estado do Pará têm apresentado altas concentrações de mercúrio associadas a complexos organo-metálicos na fração mineral do solo (Roulet *et al.*, 1998; Roulet *et al.*, 1995). Embora também região Amazônica (Brabo *et al.*, 2003), em alguns solos caracterizados por baixas concentrações de matéria orgânica coletados no Estado do Acre (localizados em regiões sem emissões antrópicas de Hg), foram determinados teores relativamente elevados desse metal (0,017 – 0,279 µg g⁻¹) comparados com teores considerados por alguns autores como sendo basais em solos (0,140 µg g⁻¹) (Grigal, 2003). Valle

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

et al. (2005), estudando a distribuição de mercúrio em diferentes tipos de solos da região de Manaus, observaram que a localização geográfica, o tipo de solo e a granulometria das amostras influenciam na distribuição da concentração do metal e as concentrações determinadas foram semelhantes às obtidas por outros autores em áreas com atividades mineradoras.

O comportamento complexante da matéria orgânica limita a mobilidade do mercúrio no solo, pois grande parte está ligada fortemente à matéria orgânica. Por esta razão, o mercúrio tem longo tempo de retenção no solo e como resultado é acumulado e lentamente liberado para águas superficiais (Pirrone *et al.*, 2001).

De acordo com Schultzer (2000), a importante rota para o fluxo de mercúrio no ambiente é a evaporação a partir dos solos. Segundo Rocha *et al.* (2000) e Oliveira *et al.* (2006), a matéria orgânica aquática e de solos pode complexar e/ou reduzir Hg(II), sendo a redução processo fundamental na introdução de Hg⁰ para a atmosfera (Figura 4). Por precipitação ou deposição seca o mercúrio é trazido da atmosfera para o solo. Umidade, composição e pH do solo influem na formação do mercúrio gasoso. A redução do mercúrio é dificultada quando o solo se encontra seco ou quando a temperatura está baixa e o pH é ácido, abaixo de 5,2 (Nascimento e Chasin, 2001).

Em águas naturais, o mercúrio ocorre em diferentes formas, incluindo mercúrio elementar (Hg⁰), iônico (Hg⁰, Hg²⁺), e metilado (CH₃Hg⁺, (CH₃)₂Hg). Destes, a espécie monometilada (CH₃Hg⁺, referindo-se ao metil mercúrio) é uma neurotoxina (Halbach, 1995) e é comumente encontrada em ambientes aquáticos. Devido sua afinidade por tecidos adiposos, o metilmercúrio tende a bioacumular e biomagnificar mais rapidamente que outras espécies mercuriais. Em águas naturais, a metilação ocorre principalmente nos dois centímetros superiores ao sedimento, pois a maioria da população microbiana responsável pela síntese do metilmercúrio está localizada nessa camada. A metilação é influenciada pela temperatura, concentração de bactérias presentes no meio, pH, tipo de solo ou sedimento, concentração de sulfito, condições de óxi-redução do meio e variações sazonais. A metilação máxima ocorre no intervalo de 0,1 a 0,2 V, sendo o metilmercúrio mais estável em pH neutro e ácido e o dimetilmercúrio em pH básico. Como outros metais, a especiação de mercúrio é influenciada pela complexação com ligantes orgânicos e inorgânicos que estão presentes nas águas.

A disponibilidade de Hg⁰ para organismos aquáticos é limitada pela taxa de

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

oxidação a Hg(II), além do equilíbrio entre a metilação de Hg(II) a metilmercúrio e a desmetilação/volatilização, sendo os principais agentes oxidantes presentes nas águas oxigênio, nitrato, nitrito, íon férrico, sulfato, enxofre, dióxido de carbono e bicarbonato (Bisinoti, 2005).

Hg(II) forma complexos em água até mesmo a baixos valores de pH. Estes complexos predominam entre as formas inorgânicas de mercúrio sob condições naturais, até mesmo na presença de altas concentrações de íons cloreto. Mercúrio pode também formar complexos estáveis com vários ligantes orgânicos, especialmente aqueles contendo enxofre e compostos orgânicos naturais como ácidos húmicos e fúlvicos. Em águas naturais, compostos mercuriais são fortemente ligados a material particulado e facilmente transportados em mananciais e acumulados em sedimentos. O aporte das espécies mercuriais em sistemas aquáticos é regulado por processos químicos, físicos e biológicos, os quais ocorrem nas interfaces ar/água e água/sedimento (Fadini e Jardim, 2001).

I.8.3 – Interação mercúrio-matéria orgânica

A matéria orgânica dissolvida (MOD) interage com mercúrio influenciando no transporte, especiação, solubilidade e biodisponibilidade (Buffle, 1988). Heiden e Aiken (1983) mostraram evidências da forte ligação de mercúrio com a MOD ao recomendar ácido húmico como preservante para minimizar perdas de mercúrio em tanques de poliolefina. Fortes interações entre mercúrio e matéria orgânica dissolvida têm sido indicadas por correlações positivas entre suas concentrações em águas naturais (Kolka, *et al.* 1999). Dependendo das condições do meio, matéria orgânica dissolvida também acelera ou inibi a formação de espécies tóxicas e bioacumulativas de metilmercúrio (Weber, 1993). A complexação com MOD limita a disponibilidade de mercúrio para microorganismos responsáveis pela metilação e a disponibilidade de metilmercúrio para a bioacumulação. As frações ácidos húmicos e fúlvicos da MOD são também capazes de reduzir mercúrio iônico para mercúrio elementar volátil (Alberts *et al.*, 1974), aumentando o refluxo de mercúrio a partir da água e do solo para a atmosfera. Entretanto, a MOD aumenta a formação de Hg⁰ a partir de Hg⁺² por meio de reações fotoquímicas, as quais devem reduzir a disponibilidade de mercúrio para metilação e bioacumulação (Allard e Arsenie, 1991; Rocha *et al.*, 2000).

Mercúrio e outros metais traço geralmente estão ligados a sítios ácidos na

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

matéria orgânica. Os grupos funcionais mais comumente encontrados na MOD são ácidos carboxílicos, fenóis, íons amônio, álcoois e tióis. Destes diferentes grupos, ácidos carboxílicos e fenóis contribuem com 90% da acidez da matéria orgânica (Thurman, 1985). Esses grupos funcionais têm diferentes constantes de dissociação e deprotonação a diferentes pH. Schnitzer e Skinner (1966) e Schnitzer (1969) postularam que metais estão ligados a unidades estruturais aromáticas de ftalato e salicilato na matéria orgânica. Leenheer *et al.* (1998) sugeriram que a matéria orgânica contém sítios ligantes polidentados com potencial para ligações de esfera interna e externa. Embora haja abundância de ácidos carboxílicos e outros grupos funcionais contendo oxigênio na MOD, mercúrio se liga preferencialmente a tióis e outros grupos contendo enxofre, os quais estão presentes apenas em quantidades traço na matéria orgânica.

I.8.4 – Toxicidade do mercúrio

A exposição ao vapor de mercúrio origina a "doença do chapeleiro maluco", personagem da Inglaterra vitoriana descrito no famoso livro de Lewis Carrol, "Alice no país das maravilhas". Na Inglaterra, os chapéus eram tratados no vapor de mercúrio metálico para atender aos requisitos de elegância. Com anos de exposição ao vapor, os chapeleiros desenvolviam uma forma clínica caracterizada por uma exuberante sintomatologia neurológica (Silveira *et al.*, 2004).

A exposição crônica ao vapor de mercúrio metálico compromete clinicamente o sistema nervoso, inicialmente com sintomatologia inespecífica e, posteriormente, com distúrbios característicos da motricidade, ou seja, tremor de pequena amplitude, parestias, disreflexia e dificuldade de coordenação motora (Silveira *et al.*, 2004). O vapor de mercúrio é absorvido pelo organismo humano no pulmão pelas membranas aveolares a uma proporção de 75 a 80%, quando inalado. No sangue, o Hg⁰ é oxidado pelos eritrócitos a Hg²⁺ e este é rapidamente distribuído pelo corpo, podendo se ligar também à albumina e à hemoglobina (Micaroni *et al.*, 2000).

Na região Amazônica, vários estudos sobre contaminação de mercúrio têm sido atribuídos principalmente a atividades mineradoras (Lacerda *et al.*, 2004, Malm, 1998). Branches e colaboradores (1993), em estudos nesta região, verificaram vários sintomas como vertigens, palpitações, dores de cabeça e tremores, em pacientes expostos ao vapor de mercúrio. Contudo, do ponto de vista epidemiológico, a preocupação maior é a exposição das comunidades ribeirinhas a

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

compostos organomercuriais como o metilmercúrio. A expressão clínica da exposição humana ao metilmercúrio e outros organomercuriais é potencialmente grave, com repercussões neurológicas muitas vezes irreversíveis. Essa patologia foi descrita pela primeira vez no Japão, onde ocorreu a contaminação da baía de Minamata pelos resíduos de uma indústria química. Esta utilizava sulfeto de mercúrio como catalisador para a produção de ácido acético e seus derivados e cloreto de mercúrio como catalisador na produção de cloreto de vinila, sendo que o metilmercúrio era um subproduto na síntese do acetaldeído (Lacerda, 1997). O metilmercúrio contaminou a biota marinha e o sistema aquático, atingindo a população pela ingestão de peixes e frutos do mar. A "Doença de Minamata" foi oficialmente descoberta em 1956, quando uma criança foi hospitalizada com mãos e pés paralisados, sendo desde então vários casos similares encontrados, atingindo níveis epidêmicos. A exposição crônica aos compostos orgânicos do mercúrio causa grave comprometimento do sistema nervoso, com efeitos diversos em adultos e crianças que foram expostas nas fases precoces do desenvolvimento do sistema nervoso, tanto pré como pós-natal. As lesões no sistema nervoso central do adulto são focalizadas e atingem principalmente o cerebelo e o córtex visual. O sistema nervoso periférico é comprometido, especialmente em intoxicações mais graves e a sintomatologia indica comprometimento motor, somestésico, auditivo e visual.

I.8.5 – Técnicas para determinação de mercúrio

A elevada toxicidade do mercúrio associada à baixa concentração em algumas amostras faz com que sejam necessárias técnicas sensíveis e precisas para sua determinação. Dentre as técnicas e métodos disponíveis para a determinação de mercúrio podem ser citados os métodos colorimétricos, a espectrometria de fluorescência atômica, espectrometria de emissão atômica, métodos cromatográficos, análise por ativação com nêutrons, espectrometria fotoacústica, espectrometria de fluorescência de raios-X, métodos eletroquímicos e espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (Micaroni, 2000). O método colorimétrico já foi muito utilizado devido sua simplicidade, baixo custo e rapidez. Entretanto, como neste método podem ocorrer interferências por outros elementos, exigindo etapas de separação, este método foi substituído pelos de absorção atômica (Chilov, 1975).

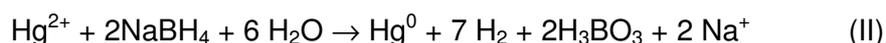
I.8.5.1 - Espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CVAAS)

A geração de vapor frio foi desenvolvida originalmente para amostras líquidas e se baseia na redução de íons mercúrio ao estado fundamental através de reação com Sn^{2+} ou borohidreto em solução aquosa (Hatch, 1968). Devido à alta volatilidade do mercúrio metálico, a geração de vapor frio permite sua determinação na fase de vapor sem a necessidade do uso de atomizadores eletrotérmicos, possibilitando que os átomos no estado gasoso ocorram sem necessidade de tratamentos especiais.

Rimura & Miller (1962), foram os primeiros a utilizar a redução de íons Hg^{2+} com solução de cloreto estanoso em meio ácido (Reação I). O mercúrio reduzido era transportado por um gás de arraste e borbulhado em solução de permanganato de potássio contida em um tubo de vidro. Nesta solução coletora, o vapor de mercúrio era oxidado e a solução transferida para funil de separação, onde em seguida se extraía com ditizona em clorofórmio e posterior medida do ditizonato de mercúrio a 605 nm.



Poluektov *et al.* (1964) foram os primeiros a utilizar o cloreto estanoso como redutor para a geração de vapor frio e sua detecção por espectrometria de absorção atômica, recebendo mais tarde a abreviatura CVAAS (do inglês "Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry"). Desde então, foram feitas muitas modificações do procedimento inicial com o objetivo de aumentar a sensibilidade, sensibilidade e precisão. Borohidreto de sódio também tem sido utilizado como redutor para a geração de vapor frio (Reação II).



Entretanto, por ser uma reação mais energética, a reação com borohidreto pode causar arraste de vapor d'água para a cela de absorção.

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

Com CVAAS pode-se atingir limites de detecção semelhantes à técnica de ativação neutrônica, utilizando-se uma etapa de pré-concentração. Além desta vantagem, a geração de vapor frio implica no isolamento do mercúrio de possíveis interferentes. A técnica CVAAS é considerada prática, simples e de fácil manuseio, aliada a um baixo custo operacional. O sistema analítico é passível de modificações para a determinação de mercúrio em diversas matrizes (Micaroni, 2000). Embora existam outras técnicas mais sensíveis (i.e. fluorescência atômica), a espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio é considerada uma técnica adequada para a determinação de mercúrio (Andrade *et al.*, 1983).

Rocha *et al.* (1994) adaptaram um sistema proposto por Jackwerth *et al.* (1979) para determinação de Hg por CVAAS com velocidade analítica de 50 amostras por hora e limite de detecção de $0,5 \mu\text{g Hg L}^{-1}$.

Para a determinação de Hg orgânico em amostras ambientais as técnicas CVAAS e espectrometria de fluorescência atômica com geração de vapor frio (CVAFS) têm sido as mais utilizadas (Bizinoti, 2005). A diferença para a determinação entre o Hg total e o orgânico é o preparo da amostra, sendo o procedimento de quantificação o mesmo para ambos os casos. Para cada matriz ambiental analisada (p.e. cabelo, peixe, solo, água, sedimento) é necessário um procedimento específico para abertura da amostra (Boischio e Barbosa, 1993; Bisinoti, 2005). Em análises de traços procedimentos de pré-concentração da amostra têm sido utilizados. Um exemplo, é a utilização de uma coluna de quartzo (contendo em seu interior areia de quartzo recoberta por ouro) enrolada por um fio de níquel cromo ($R = 1,2 \Omega$) que quando submetido a uma tensão por um determinado intervalo de tempo libera o Hg para a cela de quantificação (Magarelli, 2006).

I.9 – Análise estatística multivariada

Em estudos ambientais onde geralmente um grande número de variáveis devem ser consideradas simultaneamente, técnicas exploratórias têm se mostrado eficientes para avaliar correlações e interpretar os resultados obtidos. A análise exploratória é utilizada para detectar padrões de associação no conjunto de dados,

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

podendo se estabelecer relações entre as variáveis. Neste caso, análise de componentes principais (ACP) e análise hierárquica de agrupamentos (AHA) têm sido as mais utilizadas (de Barros Neto *et al.*, 2006; Burns *et al.*, 1997; Salau *et al.*, 1997).

O principal objetivo da ACP é reduzir a dimensão dos dados originais, facilitando a interpretação das informações mais importantes em menor número de fatores ou componentes principais, preservando ao mesmo tempo o máximo de informação, e isto é feito calculando-se combinações lineares das variáveis originais. A primeira componente principal a CP₁ é a combinação linear de máxima variância (isto é de máxima informação), a segunda componente, CP₂, também é de máxima variância, porém ortogonal a CP₁ e a terceira é de máxima variância e ortogonal as duas primeiras CPs. Como esses eixos são calculados em ordem decrescente de importância, muitas vezes a informação relevante fica concentrada nas duas ou três primeiras CPs (de Barros Neto, *et al.* 2006).

A AHA tem como objetivo a formação de agrupamentos naturais, em uma estrutura hierárquica em que as amostras são colocadas em um sistema de grupos e subgrupos, dependendo do grau de similaridade entre elas. Neste caso, o que define a similaridade entre dois pontos é a distância entre eles no espaço multidimensional. Quanto menor esta distância, maior a similaridade entre as variáveis representadas pelos dois pontos (de Barros Neto, *et al.* 2006).

I.10- Rio Negro-AM

Os mananciais de águas doces exercem importante função no ciclo global do carbono via aporte de matéria orgânica (MO) de origem terrestre e sua transferência para os oceanos (McClain, 1997). A região Amazônica abriga o sistema fluvial mais extenso e de maior massa líquida da Terra, sendo coberta pela maior floresta pluvial tropical. De acordo com Bluntschli *et al.* (1921), a circulação da água marinha pelo compartimento atmosfera acima da floresta e desta através da planície fluvial novamente para o mar tem função decisiva no ecossistema Amazônico. Segundo Sioli (1985), a floresta e os regimes de cheias e vazantes dessa região estão intimamente relacionados. O Rio Amazonas tem a maior massa líquida com vazão média anual de 200.000 m³ seg⁻¹ e drena aproximadamente 7 milhões de km² de terras, submetidas a uma precipitação média de 2500 mm por ano (Sioli, 1985). De

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

acordo com Spitzky (1991), nenhum outro rio do planeta transfere mais MO para o oceano que o Amazonas.

O Rio Negro é um grande tributário do Rio Amazonas, drenando aproximadamente 700.000 km² de floresta tropical predominantemente não perturbada. Desde a sua nascente na Colômbia pré-Andina, o Rio Negro possui extensão de aproximadamente 1.700 km, drena grande diversidade de solos e rochas com idades variando do período Cambriano ao Holoceno com estados de intemperismo químico e físico distintos, caracterizando uma área com grande potencial para estudos pedológicos. Além disto, é o afluente do Rio Amazonas com maior concentração de matéria orgânica dissolvida (MOD), cerca de 600-900 µmol L⁻¹ enquanto outros afluentes desse rio possuem 300-500 µmol L⁻¹ de MOD (Mc Clain, 1997). Assim, os tributários do Rio Negro são ácidos e extremamente pobres em sais e nutrientes (Sioli, 1968). A alta acidez das águas é devida à baixa concentração de cálcio e magnésio nas formações geológicas das nascentes do rio e ao grande aporte de substâncias húmicas provenientes de extensas áreas de podsóis hidromórficos na porção superior da bacia (Ivanissevich, 1990).

Elevadas concentrações de mercúrio determinadas na região Amazônica têm sido atribuídas principalmente à atividade garimpeira (Bastos et al., 2007; Dorea et al., 2006b). Na Bacia do Rio Negro-AM, embora seja geograficamente distante de fontes emissoras antrópicas, elevadas concentrações de mercúrio foram determinadas em amostras de cabelos da população ribeirinha (Malm, 1998; Dorea et al., 2003; Forsberg et al., 1995) e em peixes predadores (Barbosa et al., 2003; Dorea et al., 2003; Dorea et al., 2006a; Dorea et al., 2006b).

Barbosa e colaboradores (2003) coletaram 951 amostras de peixes das espécies representativas da cadeia alimentar: herbívoros, detritivos, onívoros e piscívoros ao longo do Rio Negro-AM, e determinaram o teor de mercúrio total. A maior concentração média foi determinada nas espécies piscívoras (688,9 ng g⁻¹), seguidos pelos onívoros (190,3 ng g⁻¹), detritivos (136,0 ng g⁻¹) e herbívoros (70,4 ng g⁻¹). As concentrações determinadas nos peixes excedem aquelas permitidas na legislação brasileira (500 ng g⁻¹) para consumo humano principalmente nas espécies piscívoras (aproximadamente 60%). Em estudos recentes, realizados no Rio Negro-AM, Dorea e colaboradora (2006) avaliaram a influência da inundação sazonal na bioacumulação de mercúrio em espécies de peixe que são consumidos pela população humana local, verificando que os efeitos da inundação sazonal sobre

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

a bioacumulação de mercúrio em peixes ocorre em espécies específicas.

Como poluente global derivado de processos naturais e antrópicos, o mercúrio possui tempo de residência na atmosfera relativamente longo e é transportado via deposição atmosférica seca e/ou úmida (Fadini e Jardim; 2001). Após aporte na água ou no solo, a dinâmica do mercúrio pode estar associada à do carbono orgânico e, neste caso, um importante fator a ser considerado é o alto teor de substâncias húmicas presentes nos sistemas aquáticos e terrestres dessa região (Bourgoin et al., 2003; Rocha et al., 2000; Miretzky et al., 2005). Embora haja alguma similaridade entre substâncias húmicas presentes no solo e na água, as diversidades no ambiente de formação e nos compostos de origem as fazem apresentar diferenças peculiares (Cheng, 1977). A natureza da água (rios, lagos ou mar) e a estação do ano são fatores determinantes nos processos de formação e de humificação das SHA (Thurman, 1985).

II – OBJETIVOS

Devido à região em estudo possuir características particulares de biodiversidade, temperatura, umidade, bem como apenas duas estações no ano, períodos de cheias e vazantes bem definidos, as substâncias húmicas extraídas de amostras coletadas periodicamente podem apresentar diferenças nas suas características estruturais e influenciar nos ciclos biogeoquímicos (p.e. mercúrio) de maneiras distintas. Assim, neste trabalho verificou-se a influência da sazonalidade nas características estruturais das substâncias húmicas extraídas de amostras de água coletadas mensalmente. Os objetivos específicos foram:

- Extrair e purificar as substâncias húmicas de amostras de água coletadas mensalmente durante o período de 1 ano;
- Caracterizar as substâncias húmicas por análise elementar, ressonância paramagnética eletrônica e ressonância magnética nuclear de ^{13}C ;
- Determinar a concentração de mercúrio nas amostras de substâncias húmicas aquáticas;
- Correlacionar os grupos funcionais das SHA (obtidos por RMN ^{13}C), as razões atômicas C/H, C/N, C/O (calculadas a partir da análise elementar de C, H, N, S, O), concentração de mercúrio, índices pluviométricos e fluviométricos utilizando análise estatística multivariada.
- Fracionar as SHA extraídas de amostras de águas coletadas no Rio Negro-AM em função do tamanho molecular, utilizando sistema de ultrafiltração seqüencial em fluxo tangencial;
- Determinar o teor de carbono orgânico total nas frações obtidas;
- Determinar a capacidade de complexação (CC) das SHA com íons Hg(II) nas diferentes frações;
- Caracterizar a influência da sazonalidade nas amostras fracionadas, interpretando os parâmetros determinados por análises estatísticas multivariadas.

III – EXPERIMENTAL

III.1 - Equipamentos, materiais e reagentes

- balança analítica Metler-Toledo, AB 204-S com capacidade máxima de 220 g;
- espectrômetro de absorção atômica com geração de vapor frio (CVAAS) Perkin-Elmer Analyst 300;
- medidor portátil de pH Orion modelo 250 A;
- micropipetas automáticas, de vários volumes (fixos e variáveis) VWR e Finnpiquette Labystems;
- sistema purificador de água Millipore-Multi-Q;
- agitador magnético Variomag Telesystem;
- bomba peristáltica GILSON, modelo Miniplus 3;
- hidróxido de sódio, NaOH, (Mallinckrodt) $M = 40,00 \text{ g mol}^{-1}$;
- nitrato de prata, AgNO₃, (Merck) $M = 169,98 \text{ g mol}^{-1}$;
- bicarbonato de sódio, NaHCO₃, (Mallinckrodt) $M = 84,00 \text{ g mol}^{-1}$;
- Etilenodiaminotetraacetato disódico, Na₂EDTA, $M = 372,24 \text{ g mol}^{-1}$;
- peróxido de hidrogênio, H₂O₂, (Mallinckrodt - solução 30%) $M = 34,01 \text{ g mol}^{-1}$;
- permanganato de potássio, KMnO₄, (Mallinckrodt) $M = 158,03 \text{ g mol}^{-1}$;
- persulfato de potássio, K₂S₂O₈ (J.T.Baker) $M = 270,32 \text{ g mol}^{-1}$;
- ácido nítrico, HNO₃ (Synth) $M = 63,01 \text{ g mol}^{-1}$;
- ácido sulfúrico, H₂SO₄ (Merck) $M = 98,08 \text{ g mol}^{-1}$;
- ácido clorídrico, HCl, (Merck) $M = 36,5 \text{ g mol}^{-1}$;
- padrão de mercúrio (Tec Lab) concentração 1000 mg L⁻¹ em 5% (m/v) de ácido nítrico;
- dicromato de potássio, K₂Cr₂O₇ (Mallinckrodt) $M = 294,18 \text{ g mol}^{-1}$;
- cloridrato de hidroxilamina, NH₂OH. HCl (Synth) $M = 69,49 \text{ g mol}^{-1}$;
- cloreto estano, SnCl₂.2H₂O (J.T. Baker) $M = 225,65 \text{ g mol}^{-1}$;
- analisador de carbono Shimadzu COT-5000 Analyzer;
- espectrômetro de absorção atômica com geração de vapor frio (CVAAS) Perkin-Elmer Analyst 300;
- evaporador rotativo Tecnal, modelo TE-120 equipado com sistema de alto vácuo Edwards, modelo Speedivac – 2;
- sistema purificador de água Millipore-Multi-Q;

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

- filtro de membrana de com porosidade de 1 kDa e 47 mm de diâmetro (celulose, Milipore);
- sistema de ultrafiltração;
- vidraria comum a um laboratório de Química Analítica.

III.2 - Identificação da área de amostragem

O ponto de amostragem situa-se à margem esquerda do Rio Negro-AM, entre as confluências dos Rios Tarumã e Tarumã Mirim, a cerca de 20 km a oeste da cidade de Manaus-AM (Figura 5).

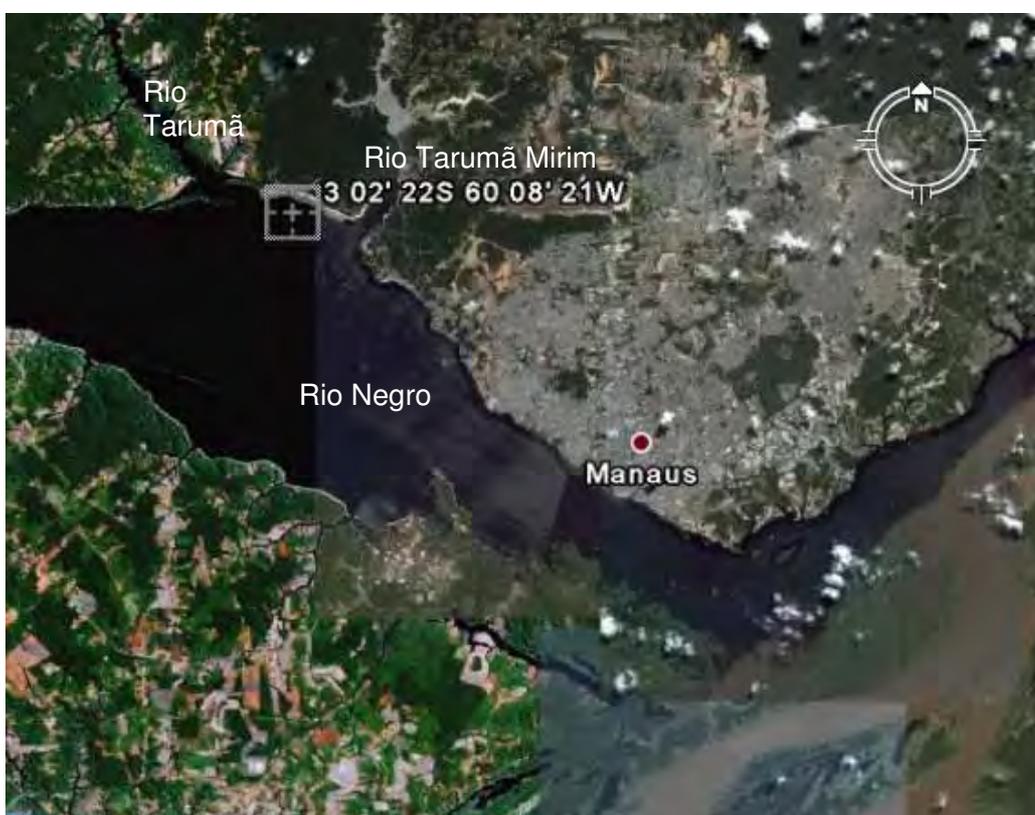


Figura 5 – Ponto de coleta das amostras de água no Rio negro-AM, entre as confluências dos Rios Tarumã e Tarumã Mirim, na Praia da Lua GPS:3 02' 22S 60 08' 21W.

III.3 - Amostragens

Para verificar a influência da sazonalidade nas características estruturais das SHA foram feitas coletas mensais de amostras de água no período de Março/02 a Fevereiro/03.

As amostras de água foram coletadas submergindo frascos de polietileno aproximadamente 20 cm abaixo da superfície da água e contra a corrente, isto é antes que a água a ser coletada atinja o barco e seja contaminada pelo mesmo. Amostras simples foram coletadas (aproximadamente 35 L) em intervalos de 10 dias, acidificadas a pH entre 3-4 e mantidas sob refrigeração (temperatura de aproximadamente 4° C). Durante o mês foram coletadas 3 amostras simples sendo que ao final de cada mês estas foram misturadas originando uma amostra composta (aproximadamente 100L). Após obtenção da amostra composta foi feita a extração das substâncias húmicas aquáticas, conforme procedimento descrito no item III-6 página 30.

III.4 - Caracterização das amostras de água

As amostras foram caracterizadas físico-quimicamente por determinação de pH, condutividade e temperatura.

III.5 - Purificação da resina XAD 8

A resina macroporosa XAD 8 utilizada para a extração das SHA foi previamente purificada por bateladas sucessivas com soluções de ácido clorídrico 0,50 mol L⁻¹, hidróxido de sódio 0,50 mol L⁻¹ e metanol, respectivamente (24 horas cada batelada).

III.6 - Extração das substâncias húmicas

Após coleta, as amostras compostas foram filtradas em membrana de 0,45 µm e acidificadas a pH 3,0 com solução de ácido clorídrico 1,0 mol L⁻¹.

A seguir, por gravidade, as amostras foram percoladas através de coluna de vidro (2 cm de diâmetro interno e 25 cm de altura) contendo resina XAD 8 com fluxo de 3,8 mL min⁻¹. XAD 8 é uma resina de base acril-éster macroreticular adequada à concentração e adsorção de substâncias húmicas aquáticas. Após saturação, verificada pelo escurecimento da resina, percolaram-se 10 mL de solução de HCl

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

0,01 mol L⁻¹ para a remoção de impurezas, eluindo-se em seguida com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹, vazão de 1,2 mL min⁻¹. O pH da solução de SHA foi ajustado para 4,5 – 5,0, valor do pH da amostra inicial (Sargentini Jr., 1999).

III.7 - Purificação das substâncias húmicas

A purificação das substâncias húmicas extraídas foi feita por diálise, na qual as moléculas do soluto são transferidas por difusão através de uma membrana de separação entre uma solução concentrada e uma solução diluída. Assim, os sais, como por exemplo NaCl, e metais livres são removidos. Entretanto, metais originalmente complexados ou fortemente adsorvidos nas substâncias húmicas não são remobilizados (Sargentini Jr., 1999) (Figura 6).

III.7.1 - Preparação das membranas de diálise

As membranas de diálise foram purificadas segundo o procedimento descrito por Town *et. al.* (1992). Após tratamento por 10 minutos com soluções de NaHCO₃ 2 % (m/v) e EDTANa₂ 0,01 mol L⁻¹, foram lavadas com água desionizada a 65 °C e estocadas a -6 °C.

III.7.2 - Diálise das substâncias húmicas

Transferiram-se as amostras de SHA para as membranas de diálise previamente purificadas e fizeram-se as imersões destas em béquer contendo água desionizada e deixou-se sob agitação mecânica por 12 horas (Figura 6).

Após este tempo, testou-se a presença de íons cloreto (Cl⁻) com solução de AgNO₃ e trocou-se a água externa até teste negativo para cloretos. Em seguida, as amostras foram secas a 55 °C em estufa com renovação de ar.

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.



Figura 6 – Sistema utilizado na diálise das substâncias húmicas extraídas de amostras de águas coletadas na Bacia do Rio Negro–AM.

III.8 - Liofilização dos extratos de SHA

Os extratos aquosos das amostras de SHA foram congelados em banho de nitrogênio líquido e liofilizados a temperatura de -40°C .

III.9 – Purificação da água

Toda água utilizada foi previamente destilada e purificada em sistema desionizador marca Millipore, modelo Milli-Qplus, até apresentar resistividade $18,2\ \text{M}\Omega/\text{cm}$ a 25°C .

III.10 - Caracterizações das amostras de SHA

III.10.1 - Análise elementar

A análise elementar (C, H, N, O, S) foi feita em equipamento Thermo Finningan Flash EA1112.

III.10.2 - Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica

Espectros de ressonância paramagnética eletrônica foram obtidos de amostras de SH secas, utilizando espectrômetro Bruker EPR operando na banda-X e frequência de 9 GHz com detector de temperatura ambiente (RT), potência 0,2 mw (determinada por experimento de saturação de potência) e amplitude de modulação

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

1 Gauss. Radicais livres semiquinona foram detectados e quantificados utilizando-se aproximação convencional, intensidade $X \Delta H^2$ (Martin-Neto *et al.*, 1998).

III.10.3 - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os experimentos de RMN ^{13}C com polarização cruzada (PC) e rotação do ângulo mágico (MAS) com amplitude variável (VA) foram feitos em espectrômetro Varian (modelo Unity Inova 400). As amostras 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 δ . Foram feitas acumulações de sinal que dependeram da amostra de SHA.

III.11 – Limpeza da vidraria

A limpeza da vidraria foi feita com vapor de ácido nítrico concentrado, segundo procedimento proposto por Tschöpel (1980). Colocou-se a vidraria com o fundo para cima em um suporte de vidro acoplado dentro de um béquer de 10 litros, contendo cerca de 300 mL de ácido nítrico concentrado e tampado com vidro de relógio (Figura 7). Aqueceu-se o béquer em chapa por, no mínimo, duas horas e, em seguida, enxaguaram-se os frascos exaustivamente com água desionizada. O ácido nítrico foi utilizado de duas a três vezes e, então, descartado.



Figura 7 – Sistema utilizado na limpeza das vidrarias.

III.12 - Digestão das amostras das substâncias húmicas e determinações de mercúrio

Em 0,20 g de SHA adicionaram-se lentamente e sob agitação 5,0 mL de solução de peróxido de hidrogênio (solução 30 %) para solubilização das SHA. Após total dissolução da amostra, adicionaram-se lentamente 15,0 mL de solução sulfonítrica na proporção 1:1 (v/v), mantendo a solução da amostra em banho de gelo. Aqueceu-se a solução durante 1 hora a 70 °C e, após resfriar à temperatura ambiente, adicionaram-se 10,0 mL de solução de permanganato de potássio 7,5% (m/v). Após 15 minutos, acrescentaram-se 5,0 mL de solução de persulfato de potássio 8% (m/v). Aqueceram-se as soluções contendo as amostras de SH por 2 horas a 70°C, deixando-as em repouso por aproximadamente 12 horas. Adicionou-se solução de cloridrato de hidroxilamina (12% m/v) suficiente para reduzir o permanganato de potássio, observado via descoloração da solução violeta restante e logo em seguida fizeram-se as determinações de mercúrio por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio, como adaptado por Rocha *et al.* (1994) (Figura 8).

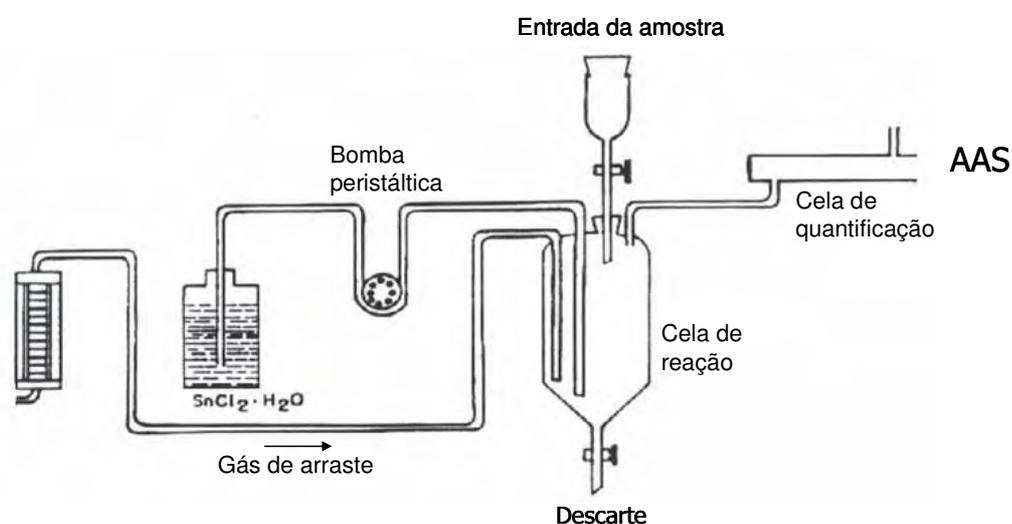


Figura 8 – Sistema utilizado na determinação de mercúrio utilizando-se espectroscopia de absorção atômica com geração de vapor frio - CVAAS. (Condições: solução de SnCl_2 20% (m/v) com fluxo de $2,5 \text{ mL min}^{-1}$; vazão do gás carregador (N_2) de $0,3 \text{ L min}^{-1}$).

III.13 – Análise multivariada

Os tratamentos dos dados experimentais relativos às correlações entre as características estruturais das substâncias húmicas, índices fluviométricos, pluviométricos e concentrações de mercúrio foram feitos utilizando-se o software STATISTICA 6.0.

III.14 – Fracionamento das SHA extraídas de amostras coletadas periodicamente

As substâncias húmicas extraídas de amostras de água do Rio Negro-AM foram fracionadas em sistema de fracionamento seqüencial de ultrafiltração (SFSUF), como ilustram as Figuras 9 e 10.

De acordo com a Figura 9, quando as frações do SFSUF são aspiradas dos reservatórios R_1 - R_5 pela bomba peristáltica (com cinco canais), a pressão do sistema é controlada com o ajuste dos reguladores de pressão P_1 - P_5 , conectados nos respectivos tubos de retorno do material não filtrado.

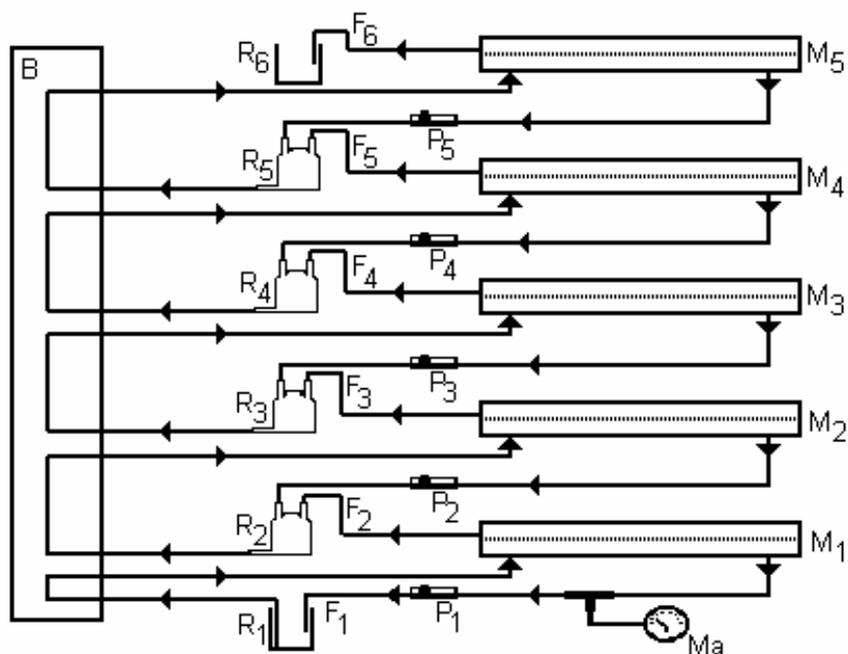


Figura 9 – Esquema do sistema de fracionamento seqüencial por ultrafiltração para substâncias húmicas extraídas de amostras de águas coletadas no Rio Negro-AM. **Condições:** filtros equipados com membranas comerciais (Sartorius), com 50 cm² **M₁**: 100, **M₂**: 50, **M₃**: 30, **M₄**: 10 e **M₅**: 5 kDa; frações obtidas e respectivos intervalos de tamanhos moleculares médios de **F₁** (>100), **F₂**: (100 - 50), **F₃**: (50 - 30), **F₄**: (30 - 10), **F₅**: (10 - 5) e **F₆**: (< 5 kDa); **B**: bomba peristáltica de 5 canais com tubos de bombeamento de Tygon®; **R₂** a **R₅** (25 mL), **R₁** (250 mL) e **R₆** (500 mL): reservatórios de frações; **P₁** a **P₅**: reguladores de pressão; **Ma**: manômetro; 250 mL de solução de substâncias húmicas 1,0 mg mL⁻¹ em pH 5,0; fluxo tangencial com vazão de 85 mL min⁻¹ em todos os filtros; pressão inicial de 0,2-0,3 bar; fluxo de permeação através das membranas 0,8-1,4 mL min⁻¹; limpeza do sistema com 200 mL de água.

Na Figura 10 é ilustrado um reservatório para coleta das frações, construído em vidro de borossilicato e suas respectivas dimensões. A solução de SH entra pelo ponto (1) e é aspirada pelo ponto (2), o qual está conectado a um dos filtros de membrana (M) do sistema ilustrado na Figura 9, com fluxo no interior do filtro tangencial sobre a membrana. Essa circulação contínua evita o entupimento da membrana e concentra o material não filtrado no reservatório, fracionando o extrato húmico em diferentes tamanhos moleculares. O reservatório R₁ (Figura 9), no qual concentra a fração F₁, é o próprio frasco da solução de SH, a qual está sendo fracionada. Por outro lado, R₆ é um frasco com cerca de 400 mL para coletar a fração F₆. Esta é composta pelo volume inicial do extrato a ser fracionado, mais cerca de 200 mL de água que, após fracionamento da amostra, são aspirados através de todo o SFSUF para limpeza preliminar do sistema e recolhidos em R₆.

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

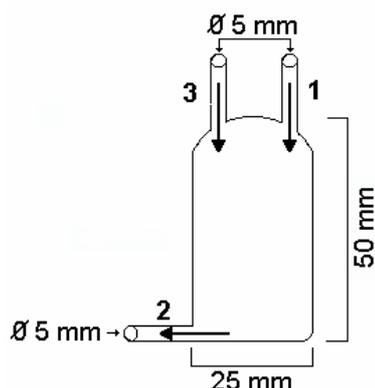


Figura 10 – Reservatório com volume interno de 25 mL, para coletas das frações durante o fracionamento dos extratos húmicos utilizando-se o sistema de fracionamento seqüencial por ultrafiltração. 1: entrada do filtrado húmico; 2: aspiração do filtrado húmico para o próximo filtro de membrana com fluxo tangencial; 3: retorno para circulação do material não filtrado no próximo filtro.

III.15 - Determinação do carbono orgânico total (COT)

As determinações foram feitas utilizando-se o método de combustão catalítica, sob atmosfera de oxigênio em equipamento Shimadzu TOC-5000 Analyzer e subsequente detecção por infravermelho em Analisador Shimadzu TOC-5000 com limite de detecção de (3s) 0,1 mg L⁻¹ COT.

III.16 - Determinação da capacidade de complexação da matéria orgânica dissolvida e SHA por íons Hg(II)

Para a determinação da capacidade de complexação das frações de SHA por íons Hg(II), utilizou-se o procedimento analítico proposto por Burba *et al.* (2001) ilustrado na Figura 11. Este procedimento baseia-se na utilização de um sistema de ultrafiltração tangencial (Sartorius Ultrasart X) equipado com membrana de celulose de 1 kDa (Millipore), a qual impede passagem das substâncias húmicas e dos complexos SH-Metal com tamanho molecular maior que 1 kDa. Logo, os íons metálicos livres não complexados às SH ou trocados por elas passam pela membrana (Burba *et al.* 2001). Antes da adição da solução de mercúrio, deixou-se o sistema bombeando por aproximadamente cinco minutos a solução de SHA (250 mL) para condicionamento da membrana. A seguir, filtrou-se a primeira alíquota (2 mL), a qual é correspondente ao tempo zero, ou seja, antes da adição da solução de mercúrio. Volumes de 2 mL de uma solução 1 mg L⁻¹ de Hg(II) em 1% (v/v) de ácido

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

nítrico foram adicionados à solução de SHA. Depois de alcançado cada equilíbrio, em 15 min e com agitação constante, foram coletadas alíquotas (2 mL) das frações da solução contendo íons Hg(II), isolados pelo procedimento de filtração. Nos filtrados foram adicionadas soluções de cloreto de bromo para fixar Hg²⁺ e evitar perdas. Antes da leitura no espectrômetro de absorção atômica com geração de vapor frio (cerca de 5 min), acrescentou-se solução de cloridrato de hidroxilamina (12% (m/v)). Para fixar e quantificar o possível mercúrio reduzido foi utilizado um frasco contendo permanganato de potássio acoplado ao sistema (Figura 11).

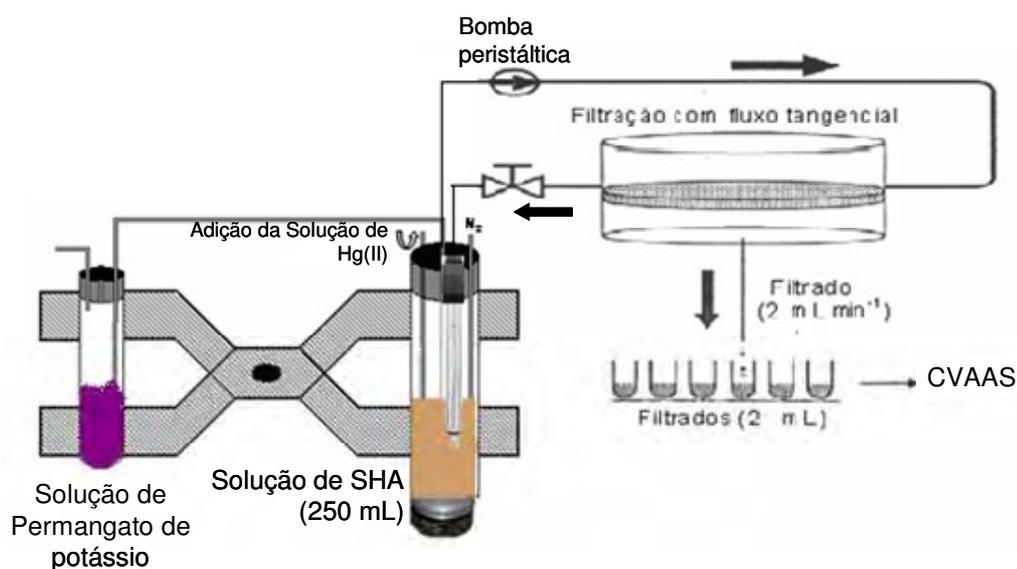


Figura 11 – Esquema do sistema utilizado para determinação da capacidade de complexação das substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras coletadas mensalmente no Rio Negro por íons Hg(II). Condições: sistema de ultrafiltração (Sartorius Ultrasart X), equipado com membrana de porosidade de 1 kDa e 47 mm de diâmetro (cellulose, Gelman Pall-Filtron OMEGA). pH da solução de SHA ou MOD 6,0; Solução de permanganato de potássio: 0,024 % (m/v), em solução de ácido sulfúrico, 4 % (v/v).

III.17 - Espectroscopia na região do infravermelho

As amostras das frações húmicas aquáticas foram preparadas misturando 1 µL das frações (pH 5,0) com 500 mg de KBr. Os espectros na região do infravermelho foram obtidos usando Espectrômetro Nicolet modelo Nexus 670, equipado com acessório Smart Collector para análise por reflectância difusa (DRIFT). O instrumento teve uma resolução espectral de 16 cm⁻¹ e foram coletados com 200 scans.

III.18 - Descarte de resíduos

Os resíduos foram armazenados em galões plásticos, rotulados, adicionado hidróxido de sódio em lentilhas, até pH superior a 10 e semanalmente enviados à Comissão de Segurança do IQ – Araraquara - UNESP, a qual é responsável pela destinação final dos resíduos gerados nesta unidade.

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 – Análise exploratória de dados para amostras de SHA

A região da Bacia do Rio Negro-AM é influenciada por regime de cheias e vazantes, como verifica-se pelos dados de índices fluviométricos (Tabela 2). As medidas feitas entre Março/02 e Fevereiro/03 mostraram que os níveis mais baixos das águas ocorreram entre Outubro e Novembro (entre 18,67 m e 19,69 m) e os mais altos entre Junho e Julho (28,7 m) (Tabela 2). Com os períodos de enchentes, as águas do Rio Negro alagam as florestas, várzeas e igarapés. A partir de Junho, iniciam-se as vazantes retirando as águas da floresta e no período de seca, entre Outubro e Fevereiro, os igarapés permanecem em seus pequenos canais. O baixo valor de pH nas águas dos tributários do Rio Negro é devido ao grande aporte de substâncias húmicas oriundas de extensivas áreas de solos podzóis hidromórficos, na porção superior da bacia. Os valores de condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$) das chamadas "águas pretas" indicam baixo teor de íons livres em solução, devido à elevada concentração de matéria orgânica, isto é devido principalmente a capacidade de complexação da matéria orgânica presente nas águas.

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

Tabela 2 – Características físico-químicas das amostras de águas coletadas mensalmente na Bacia do Rio Negro-AM, de acordo com a Figura 5.

Mês de coleta	Índice pluviométrico (mm)*	Índice fluviométrico (m)*	pH	Temp. (°C)	Cond. ($\mu\text{S cm}^{-1}$)
Março/2002	310	24,3	4,5	29	13
Abril/2002	290	26,1	4,5	26	12
Maio/2002	260	27,6	4,5	25	13
Junho/2002	100	28,7	4,5	35	10
Julho/2002	90	28,7	4,5	32	9
Agosto/2002	60	27,3	4,5	34	11
Setembro/2002	80	24,8	5,0	32	10
Outubro/2002	110	19,7	5,0	34	11
Novembro/2002	180	18,6	4,5	33	11
Dezembro/2002	210	20,9	4,4	33	11
Janeiro/2003	260	22,1	4,7	31	13
Fevereiro/2003	290	22,3	4,8	31	12

*Fonte: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

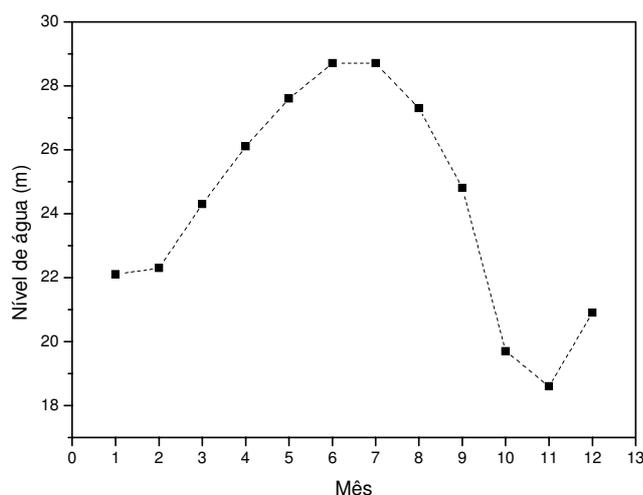


Figura 12 – Média anual dos níveis de água do Rio Negro-AM (Fonte: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA).

Inundações sazonais regulares causam o aumento do nível do rio de 8-10m (Julho/02, nível mais alto) em relação ao nível mais baixo (Novembro/02) conforme Figura 12.

As razões atômicas H/C, C/N, C/O obtidas pela análise elementar (Tabela 3) têm sido utilizadas para auxiliar na caracterização de SH e a comparação com resultados das SH de diferentes matrizes pode indicar o grau de similaridade entre elas (Sargentini Jr. *et al.*, 2001). Utilizando essas razões, Leenheer (1980) e Ertel

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

(1986) verificaram semelhança estrutural das SHA em comparação com SH de amostras de solo da região central da Bacia Amazônica, indicando que as SHA dos rios de águas pretas são originárias de solos do tipo podzóis.

As razões atômicas H/C e C/N fornecem indicativos sobre estruturas e formas moleculares das substâncias húmicas (Stelink, 1985). O teor de hidrogênio está relacionado com o grau de saturação, ou seja, um aumento no teor de hidrogênio indica maior número de carbonos alifáticos (CH₂) que aromáticos (C=C) (Traina, 1990). Os valores das razões atômicas H/C para as amostras de SHA variaram entre 1,17 e 1,33 (Tabela 3). Esses valores estão próximos aos citados pela literatura em trabalhos afins (Tabela 4). As amostras indicaram carbonos de características alifáticas em comparação com os dados de Leenheer (1980) e Ertel (1986). Entretanto, em relação aos dados obtidos por Sargentini Jr. (1999), que caracterizou substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras coletadas no Rio Negro no período de Fevereiro a Setembro de 1998, as amostras são formadas por monômeros de caráter aromático.

Tabela 3 – Valores das razões atômicas (H/C, C/N e C/O) e da concentração de spins (concentração de radicais livres orgânicos) de substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras de água coletadas mensalmente no Rio Negro-AM.

Mês de coleta	Razões atômicas			Concentração de spins (por g de C) × 10 ¹⁷
	H/C	C/N	C/O	
Março/2002	1,2 ±0,2 ^a	26,5 ±1,8	1,4 ±0,3	1,61 ±0,03 ^b
Abril/2002	1,2 ±0,1	24,8 ±1,6	1,6 ±0,5	1,05 ±0,03
Mai/2002	1,3 ±0,1	27,4 ±2,2	1,6 ±0,2	1,54 ±0,05
Junho/2002	1,2 ±0,2	26,2 ±1,9	1,6 ±0,7	1,14 ±0,04
Julho/2002	1,2 ±0,3	23,6 ±1,3	1,8 ±0,1	0,78 ±0,02
Agosto/2002	1,3 ±0,2	21,8 ±1,0	1,8 ±0,8	0,49 ±0,01
Setembro/2002	1,3 ±0,2	21,0 ±0,9	1,8 ±0,9	0,84 ±0,02
Outubro/2002	1,3 ±0,1	20,7 ±2,1	1,7 ±0,5	0,82 ±0,02
Novembro/2002	1,3 ±0,2	24,4 ±1,8	1,6 ±0,7	1,89 ±0,03
Dezembro/2002	1,3 ±0,1	24,8 ±1,6	1,6 ±0,9	1,60 ±0,02
Janeiro/2003	1,2 ±0,3	17,1 ±0,5	2,2 ±0,5	2,81 ±0,04
Fevereiro/2003	1,3 ±0,1	23,9 ±0,7	1,9 ±0,1	1,43 ±0,02

a, b) Desvio médio

Tabela 4 – Razões atômicas (H/C, C/N e C/O) para diferentes amostras de matéria orgânica e substâncias húmicas extraídas de amostras coletadas na Bacia Amazônica, de acordo com a literatura.

Amostras	Razões atômicas			Referências
	H/C	C/N	C/O	
SHA (Rio Negro)	1,18	33,3	1,42	Leenheer, 1980
SHA (Rio Negro)	1,70	25,6	1,60	Sargentini Jr., 1999
AH (Rio Negro)	1,47	24,7	0,98	Sargentini Jr., 1999
AF (Rio Negro)	1,52	24,7	0,97	Sargentini Jr., 1999
AH (Rio Negro)	0,79	58,1	nd	Ertel <i>et al.</i> , 1986
AF (Rio Negro)	0,95	85,0	nd	Ertel <i>et al.</i> , 1986
MOD (Rio Negro)	nd	25,0	nd	McClain <i>et al.</i> , 1997
MO partículas > 63 µm (Rio Amazonas)	nd	24,0	nd	Hedges <i>et al.</i> , 2000
MO partículas (0,1 – 63 µm) (Rio Amazonas)	nd	15,0	nd	Hedges <i>et al.</i> , 2000
MOD (0,001-0,1 µm) (Rio Amazonas)	nd	34,0	nd	Hedges <i>et al.</i> , 2000

nd – não disponível; SHA – Substâncias húmicas aquáticas; AH – Ácidos húmicos; AF – Ácidos fúlvicos; MOD – Matéria orgânica dissolvida; MO – Matéria orgânica.

A razão atômica O/C está relacionada com os teores de carboidratos das substâncias húmicas. Elevados valores dessa razão indicam maior grau de humificação devido à diminuição nos teores de carboidratos (Stevenson, 1994). Valores de O/C podem representar também maior presença de grupos COOH e OH (aromático e alifático). Pelos resultados obtidos, observa-se que as razões atômicas C/O variaram entre 1,32 a 2,20, inferindo diferenças no grau de humificação das SHA.

Os radicais livres orgânicos (RLO) em SH, detectável por ressonância paramagnética eletrônica, são atribuídos a semiquinonas, possivelmente conjugadas a anéis aromáticos, sendo estes grupos formados na MO pela desidrogenação oxidativa de compostos fenólicos (Riffaldi & Schnitzer, 1972; Stevenson, 1994). É uma hipótese, pois não há ainda consenso sobre a origem exata do sinal de radical livre em SH (Senesi, 1990; Cheshire & McPhail, 1996).

De acordo com a literatura, quanto maior concentração de RLO, maior a humificação das substâncias húmicas (Senesi, 1990; Martin-Neto *et al.*, 1998; Olk *et al.*, 2000; Novotny & Martin-Neto, 2002; Pajaczkowska *et al.*, 2003). Normalmente, a maior humificação está relacionada à formação de compostos mais aromáticos (Kögel-Knaber *et al.*, 1991; Leinweber *et al.*, 1993). Assim, a determinação da

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

concentração de RLO fornece uma estimativa indireta do grau de aromaticidade das SH e a Tabela 2 indica que os valores da concentração de RLO variaram de $0,49 \cdot 10^{17}$ a $2,81 \cdot 10^{17}$ spins por g de C, amostras 6 (Agosto/02) e 11 (Janeiro/03). Estes valores mínimo e máximo indicam uma substancial variação na concentração de RLO das SHA analisadas. Contudo, estão abaixo dos valores normalmente encontrados para ácidos húmicos (AH) de solo. Martin-Neto e colaboradores, estudando amostras de ácidos húmicos extraídos de superfícies de solos coletados na região dos Pampas, Argentina (Região de clima temperado), determinaram valores de concentração de spins variando de $0,84$ a $2,40 \cdot 10^{18}$ spins por g de C. Rosa *et al.* (2005) observaram $0,10$ a $7,55 \cdot 10^{18}$ spins por g de C para amostras de substâncias húmicas extraídas de solos coletados na Bacia do Médio Rio Negro-AM, região de clima Tropical.

Os resultados de RMN¹³C indicaram diferenças significativas nos teores de grupos funcionais presentes nas amostras de SHA (Tabela 5). As amostras mais alifáticas foram as extraídas de amostras de águas coletadas nos meses de Março/02; Abril/02 e Maio/02; e as mais aromáticas as de Outubro/02, Novembro/02; Dezembro/02; Janeiro/03 e Fevereiro/03, podendo-se inferir maior grau de humificação nestas amostras.

Rocha *et al.* (1999), investigando substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras coletadas no Rio Negro-AM por ressonância magnética nuclear de hidrogênio um e carbono treze, observaram a presença de alta aromaticidade com pouca substituição, pequena quantidade de carbono carboxílico e razão 1:1 de grupos alifáticos/aromáticos. Estas apresentaram maior aromaticidade que as amostras destes estudos (Tabela 5).

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

Tabela 5 – Porcentagens dos diferentes tipos de carbono presentes nas substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras de água coletadas mensalmente no Rio Negro-AM.

Mês de coleta	Atribuições do tipo de ^{13}C (%) / deslocamento químico (δ)				
	C Alquil Metoxil e N-alkil (0-65)	O alquil (65-110)	C aromático e C fenólico (110-165)	C carboxílico (165-185)	C carbonílico (185-230)
Março/2002	53,1	17,1	9,3	9,6	10,9
Abril/2002	56,8	16,1	7,5	10,6	8,9
Maio/2002	65,1	5,6	9,1	10,3	9,8
Junho/2002	50,5	21,8	8,5	10,1	9,1
Julho/2002	47,9	24,3	9,2	9,3	9,3
Agosto/2002	47,5	23,9	8,7	10,4	9,5
Setembro/2002	47,5	23,2	11,2	10,0	8,1
Outubro/2002	36,8	29,2	18,9	9,7	5,3
Novembro/2002	36,6	29,4	18,5	10,2	5,3
Dezembro/2002	36,9	28,7	19,8	10,1	4,5
Janeiro/2003	37,1	28,8	19,8	9,6	4,6
Fevereiro/2003	36,9	29,7	18,2	10,3	4,9
(Rocha <i>et al</i> , 1999)	33,00	17,00	35,00	12,00	3,00

A Tabela 6 a seguir lista as concentrações médias de mercúrio determinadas nas amostras de SHA.

Tabela 6 – Concentrações médias de mercúrio^{*} presentes nas substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras de água coletadas mensalmente no Rio Negro-AM.

Amostras de SH	Concentração de Hg ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Março/2002	8,24
Abril/2002	8,64
Maio/2002	9,44
Junho/2002	7,30
Julho/2002	6,70
Agosto/2002	6,90
Setembro/2002	7,11
Outubro/2002	7,20
Novembro/2002	25,70
Dezembro/2002	35,32
Janeiro/2003	46,12
Fevereiro/2003	39,63

(^{*} Determinações feitas em duplicata)

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

As concentrações de mercúrio variaram entre 6,70-46,12 $\mu\text{g g}^{-1}$, indicando diferenças significativas nos teores de mercúrio, presentes nas amostras de SHA coletadas mensalmente na Bacia do Rio Negro-AM. Para correlacionar os resultados obtidos dessas concentrações com a sazonalidade (Tabela 2) e com as características estruturais das SHA (radicais livres semiquinonas (RLS), razões atômicas C/H, C/N, C/O; Tabela 3 e grupos funcionais – Tabela 5), foram utilizadas as técnicas de análise exploratória AHA (análise hierárquica de agrupamento) e ACP (análise de componentes principais).

As técnicas de análise exploratória utilizadas têm como objetivo separar agrupamentos naturais das amostras a partir de suas similaridades, em estrutura hierárquica de sistemas de grupos e subgrupos, dependendo do grau de similaridade entre elas (Hair *et al.*, 1995).

Na AHA, as estruturas hierárquicas são organizadas na forma de gráficos bidimensionais chamados dendogramas, nos quais é possível observar as correlações e similaridades entre as amostras (Ribeiro, 2001).

Os métodos estatísticos de análise exploratória, análise hierárquica de agrupamentos (AHA) e análise de componente principal (ACP) foram utilizados para interpretação dos dados experimentais gerados a partir das diferentes determinações utilizando o software STATISTICA 6.0. A análise hierárquica de cluster (Figura 13) mostrou a formação de 3 grupos principais: (a) razão atômica H/C, carbono alifático, carbono de carbonila e fluviometria; (b) C/N, derivados de ácidos carboxílicos, RLO e pluviometria; (c) C/O, pH, éter, aromático, fenólico e concentração de mercúrio.

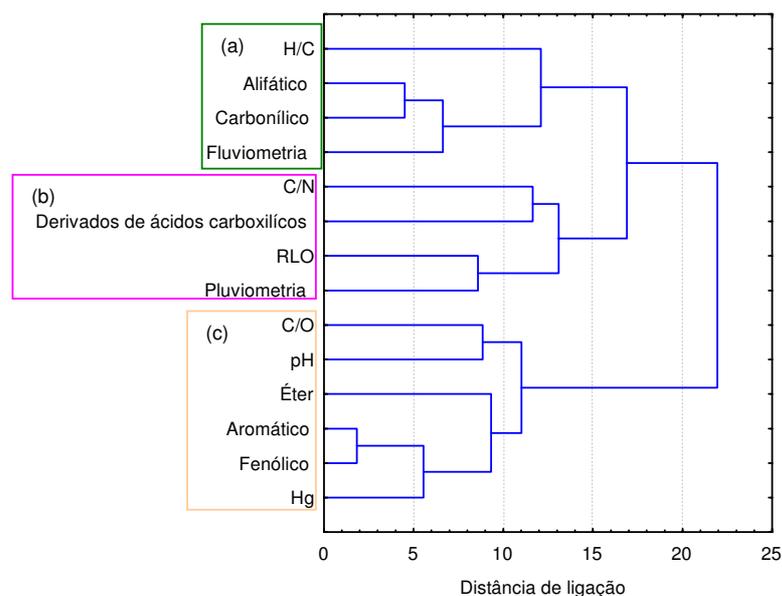


Figura 13 – Dendrograma para as determinações feitas nas substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras de água coletadas mensalmente no Rio Negro-AM: razões atômicas C/H, C/N, C/O; grupos funcionais a partir dos dados de RMN¹³C, radicais livres tipo semiquinona (obtidos a partir dos dados de EPR), concentrações de mercúrio e parâmetros sazonais.

O grupo (a) indica que quanto maior o nível do rio, maior a alifaticidade das SHA e, portanto, maior razão atômica H/C. Assim, as SHA extraídas no período onde o índice pluviométrico é maior, o grau de humificação dessas SHA é menor. O grupo (b) mostra a relação direta entre razão atômica C/N, RLO, pluviometria e grupos carboxílicos. Estes parâmetros estão interligados pelo grau de humificação. Martin-Neto *et al.* (1998) encontraram significativa correlação linear positiva com a concentração de RLO e o índice pluviométrico. De acordo com Stevenson (1994), quanto maior as razões atômicas C/N, maior o grau de humificação das SH. A presença dos grupos carboxílicos nesse cluster provavelmente é devida a esses grupos serem os mais oxidados e, portanto relacionados com a MO mais refratária. O grupo (c) indica que quanto maior a razão atômica C/O maior a aromaticidade dessas substâncias húmicas. Stevenson (1994) descreveu a relação entre razões atômicas C/H, C/N e C/O e o grau de humificação das substâncias húmicas. Quanto maior essas razões, maior é o grau de humificação e maior a aromaticidade das SH. De acordo com as análises estatísticas (grupo c), as concentrações de mercúrio também estão relacionadas com as razões atômicas C/O, grupos aromáticos, ou seja, parâmetros que sugerem maior grau de humificação das SH. Assim, as maiores concentrações de mercúrio estão presentes nas amostras mais humificadas

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

de SHA. Devido ao efeito tampão das SH, o pH das águas não varia significativamente conforme observado na Tabela 2, e assim, não está relacionado com os parâmetros de fluviometria (Grupo a) e pluviometria (Grupo b).

A análise de componentes principais é uma técnica estatística multivariada que objetiva reduzir a dimensão dos dados originais, facilitando a interpretação das informações em menor número de fatores ou componentes principais (CPs) (Haswell, 1992).

Geralmente a escolha do número de CPs deve permitir a descrição do sistema com um número mínimo de fatores, os quais representem a variação máxima, evitando informações desnecessárias. Entretanto, isto não significa que o número de variáveis originais utilizadas para descrever o sistema será menor. Todas as variáveis originais serão utilizadas, a diferença é que serão escolhidas as combinações dessas variáveis que melhor descrevam o conjunto com o máximo de variação, sem introduzir ruído ou informações irrelevantes (Haswell, 1992).

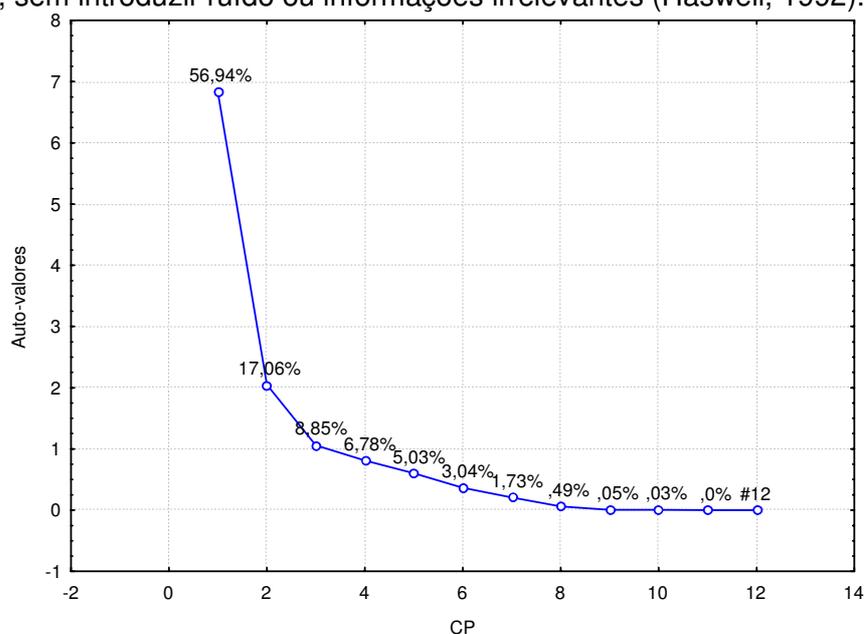


Figura 14 – Autovalores e suas porcentagens obtidas pelas componentes calculadas a partir das determinações feitas nas amostras de substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras de água coletadas mensalmente no Rio Negro-AM: razões atômicas (C/H, C/N, C/O), grupos funcionais, radicais livres do tipo semiquinona, concentrações de mercúrio e parâmetros sazonais.

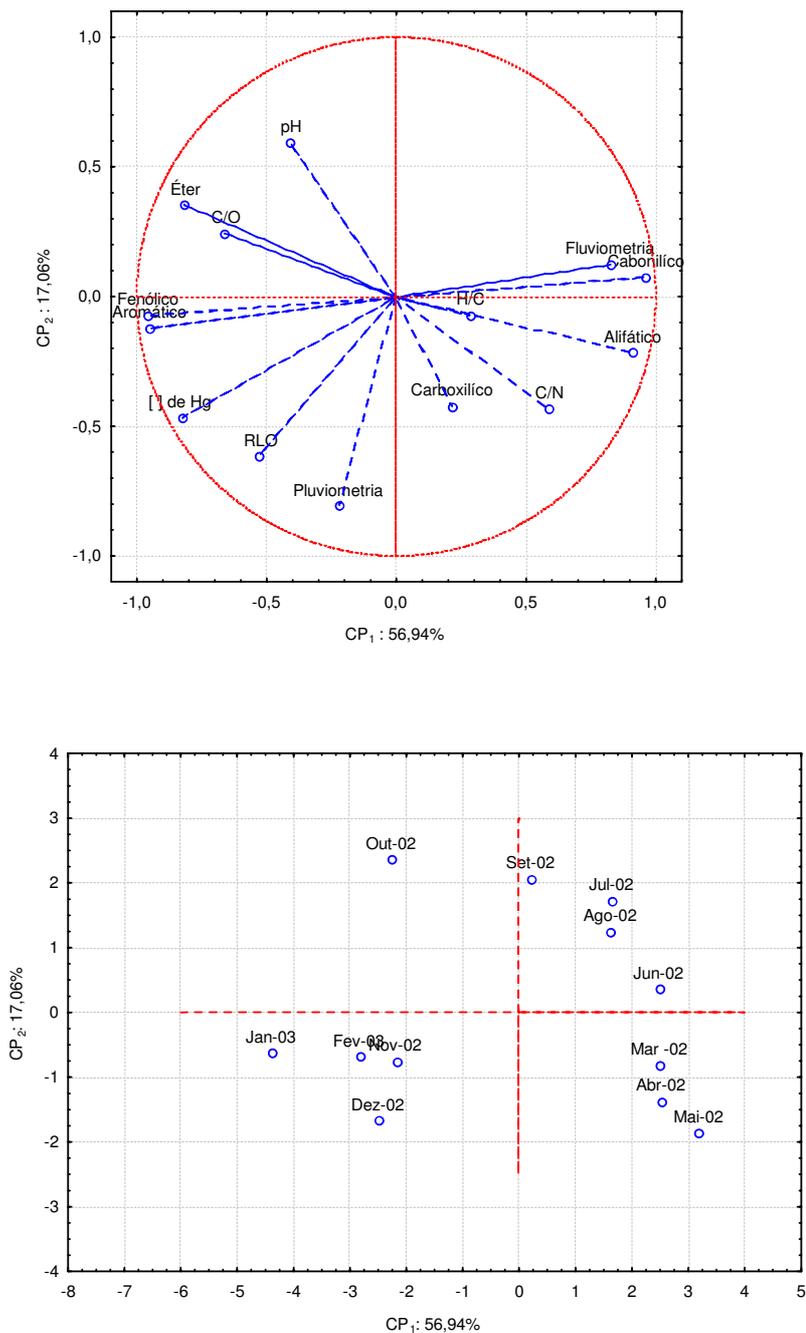
A CP₁ descreve 56,94 % da variância total dos dados, o que é insuficiente, pois a variância residual ainda é muito grande. A CP₁ e CP₂ juntas descrevem 74,00 %. A CP₃ descreve 8,85 % o que aumentaria para 82,85% de variância total descrita. Embora haja um aumento na variância total dos dados, a quantidade de informação descrita pela CP₃ (assim como as CPs subseqüentes) é relativamente pequena e

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

sua inclusão poderia estar inserindo um resíduo desnecessário à descrição dos dados. Além disto, segundo Hair *et al.*, (1995) para um grupo com menos de 50 amostras, só autovalores acima de 1,0 podem ser explicados com certeza. Assim, consideram-se as duas primeiras CPs como suficientes (Figura 14).

Os pesos das variáveis mostram quais variáveis originais têm maior importância na combinação linear de cada CP (Ribeiro, 2001). Essas informações possibilitam saber, por exemplo, quais variáveis contribuem para a descrição do conjunto de amostras. A projeção de cada amostra no eixo das CPs fornece os escores, cada amostra terá então um valor de escore para cada um dos novos componentes indicando sua contribuição naquela CP. Tanto os valores dos pesos das variáveis quanto dos escores estão ilustrados em gráficos em função das CPs (Figura 15a e 15b).

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.



Figuras 15a e 15b – Pesos das variáveis e escores das substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras de água coletadas mensalmente no Rio Negro-AM nas componentes principais 1 e 2 obtidas a partir das determinações das razões atômicas, grupos funcionais, radicais livres do tipo semiquinona, concentrações de mercúrio e parâmetros sazonais.

Na Figura 15a observa-se na CP₁, a qual explica 56,94 % da variância total dos dados, pesos positivos das variáveis fluviometria, carbonílicos, alifáticos, C/N, carboxílicos, H/C e negativos das variáveis, fenólicos, aromáticos, concentrações de mercúrio, C/O e éteres.

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

As variáveis com pesos positivos em CP₁ estão relacionadas com SHA, contendo maior teor de ácidos fúlvicos. Isto pode ser observado devido aos parâmetros índice fluviométrico, grupos alifáticos, carbonílicos e carboxílicos com elevados valores positivos nesta componente principal. As variáveis com pesos negativos na CP₁ estão relacionadas com amostras contendo maior teor de ácidos húmicos (presença de grupos fenólicos, aromáticos). Quando o índice fluviométrico é alto (período de cheia), ocorre principalmente aporte de MO formada mais recentemente. Assim, as amostras com valores positivos nessa CP possuem menor grau de humificação.

Devido aos parâmetros concentração de RLO, concentração de mercúrio e índice pluviométrico serem variáveis de pesos negativos e com forte influência na CP₂, observa-se que esta CP está relacionada com o grau de humificação das SH. O processo de lixiviação de MO para o sistema aquático causado pela chuva é evidenciado nesta CP. Neste caso, trata-se de drenagem mais lenta, ocorrendo arraste de SH em estágio de decomposição mais avançado. As amostras com valores negativos na CP₂ têm maior grau de humificação e, como descrito no parágrafo anterior, as amostras com valores negativos na CP₁ também possuem maior grau de humificação (Figura 15b). Logo, amostras com valores negativos nas duas CPs possuem maior grau de humificação. Em resumo, analisando conjuntamente os gráficos da Figura 15a e 15b, pode-se estabelecer a seguinte ordem decrescente de humificação das SHA em função da sazonalidade: Novembro/2002 a Fevereiro/2003 > Março/2002 a Maio/2002 > Junho/02 a Outubro/02.

As análises estatísticas mostraram que as amostras mais humificadas possuem os maiores teores de mercúrio, e os grupos fenólicos, aromáticos e éteres, foram predominantes na interação com mercúrio. De acordo com Sargentini Jr. *et al.*, (2001), o complexo metal-MO tende a se estabilizar em função do tempo, ocorrendo rearranjos inter e/ou intramoleculares, com transferência da espécie metálica para os sítios de complexação mais internos das estruturas húmicas. Assim, os resultados obtidos mostram que as amostras mais humificadas possuem maiores teores de grupos fenólicos/aromáticos/éteres e também maior concentração de mercúrio.

Como mostrado anteriormente na página 50 dos resultados e discussão, as SHA extraídas de amostras coletadas periodicamente na Bacia do Rio Negro-AM

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

foram classificadas de acordo com o grau de humificação, separando-se em 3 principais grupos:

- Novembro/02-Fevereiro/03 (maior grau de humificação)
- Março/02-Maio/02 (grau de humificação intermediário)
- Junho/02-Outubro/02 (menor grau de humificação).

Para evitar um grande número de experimentos devido ao fracionamento em seis diferentes frações de cada amostra, nos estudos feitos neste capítulo foram utilizadas uma amostra de SHA de cada um dos três grupos.

IV.2 - Distribuição de carbono e determinação da capacidade de complexação em função do tamanho molecular.

De acordo com Thurman (1985), 50% do carbono orgânico dissolvido é composto por ácidos fúlvicos e húmicos aquáticos, sendo as substâncias húmicas aquáticas geralmente constituídas de 90% de ácidos fúlvicos e 10% de ácidos húmicos (Figura 16).

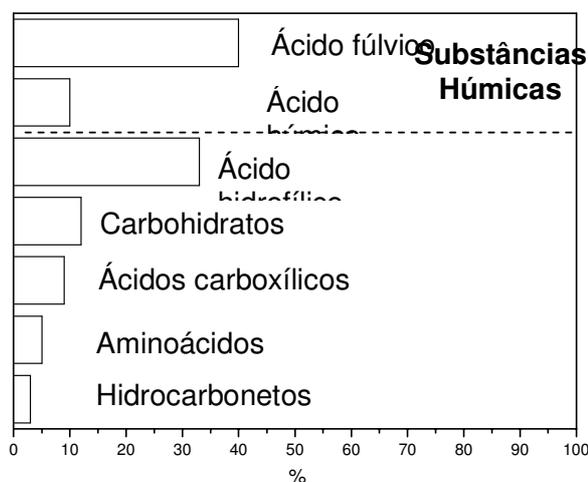


Figura 16 – Histograma do carbono orgânico dissolvido para água do rio (Thurman, 1985).

Na Figura 17 observa-se a distribuição de carbono e as capacidades complexantes das frações de diferentes tamanhos moleculares de substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras coletadas no Rio Negro-AM. Para as frações de SHA da amostra de Março/02, observa-se que aproximadamente 65% do teor de carbono está igualmente distribuído entre as frações F₁ e F₆ (Figura 16).

Para as frações de SHA extraídas de amostras coletadas em Julho/02 observa-se que F₁ (>100 kDa) é a fração com maior teor de carbono, e de F₂ a F₅

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

ocorre diminuição nos teores. A somatória dos teores de carbono determinados em F₁, F₂ e F₃ para esta amostra é aproximadamente 78% (Figura 17), indicando que a maior distribuição de carbono está nas primeiras frações. De acordo com Guetzloff e Rice (1996), o ácido húmico e o ácido fúlvico isolados de um mesmo ambiente são constituídos por moléculas com tamanhos distintos. O ácido húmico é constituído de moléculas maiores, enquanto que o fúlvico de moléculas menores, como mostra também o intervalo dos tamanhos de partículas aquosas (Figura 18). Assim, pode-se inferir que a amostra de Julho/02 é formada preferencialmente por moléculas maiores, ácidos húmicos e como as substâncias húmicas aquáticas geralmente são constituídas 90% de ácidos fúlvicos e 10% de ácidos húmicos, as SHA deste período possuem grande influência da matéria orgânica de solos, corroborando com os dados de índice fluviométrico para este período onde o nível do rio é elevado (Tabela 3 página 28) e ainda que, em geral, substâncias húmicas extraídas de rios e riachos são de origem alóctone, provenientes da matéria orgânica de solos e plantas (Thurman, 1985).

Ainda na Figura 17 observa-se que para as SH extraída de amostra de água coletada em Dezembro/02 a Fração 6 (F₆) possui aproximadamente 75% da distribuição do carbono, mostrando que esta amostra é constituída preferencialmente por moléculas menores.

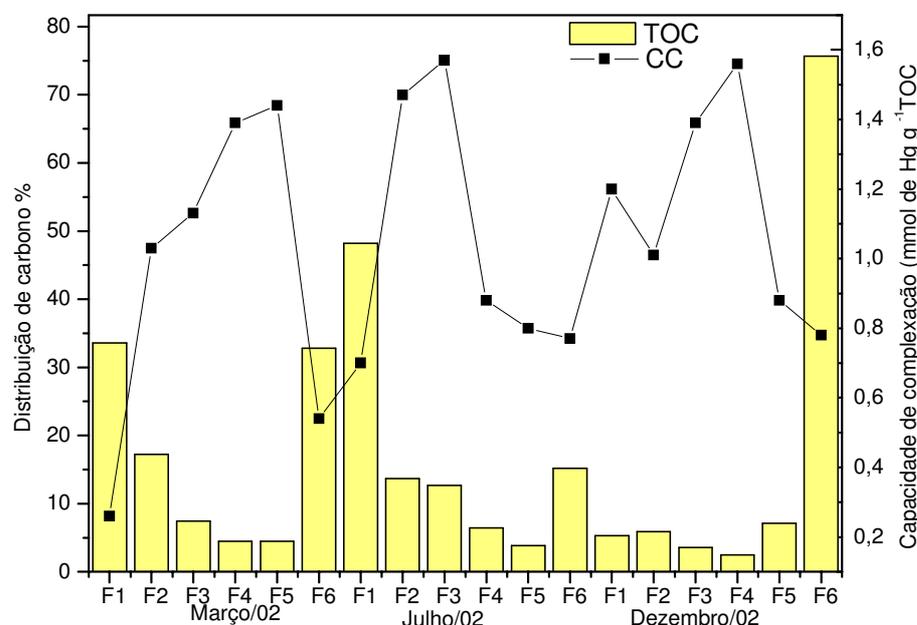


Figura 17 – Distribuição do teor de carbono e capacidade de complexação das frações húmicas de diferentes tamanhos moleculares por íons Hg(II) extraídas de amostras de água coletadas em Março/02, Julho/02 e Dezembro/02 no Rio Negro-AM e fracionadas por sistema de ultrafiltração sequencial em múltiplos estágios e fluxo tangencial.

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

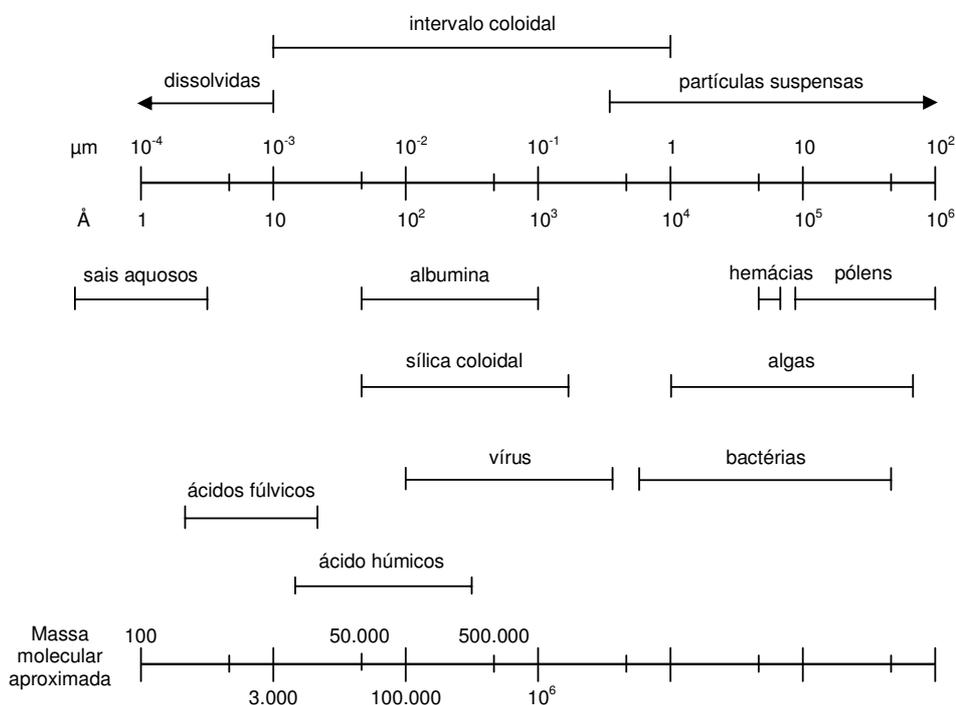


Figura 18 – Intervalos dos tamanhos moleculares de partículas aquosas (Thurman, 1985).

Pela distribuição de carbono nas diferentes frações obtidas por fracionamento seqüencial, fica evidente a influência sazonal nas frações de substâncias húmicas aquáticas.

De acordo com os resultados obtidos, a amostra de substâncias húmicas aquáticas de Dezembro/02 possui elevado grau de humificação e, pelo fracionamento físico, é constituída principalmente por moléculas menores. Assim, de acordo com esses resultados, pode-se inferir que as amostras mais humificadas (Dezembro/02) são constituídas por moléculas menores, nestes estudos.

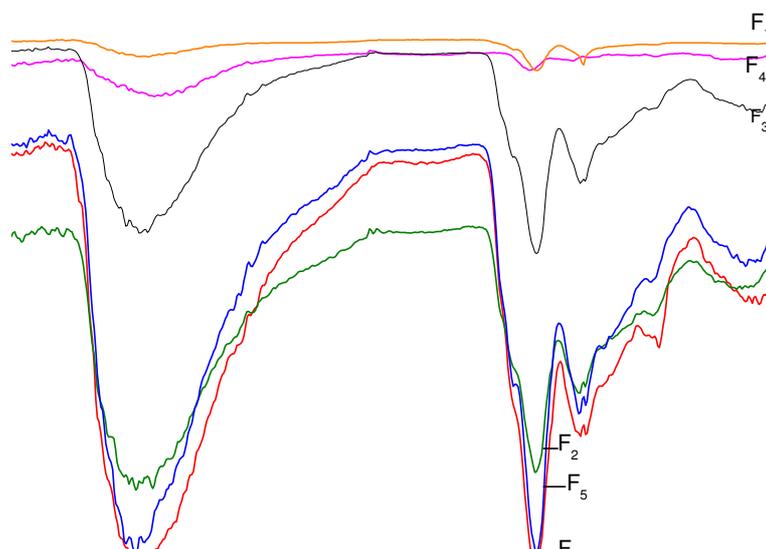


Figura 19 – Espectros na região do infravermelho para as frações de substâncias húmicas aquáticas de diferentes tamanhos moleculares, extraídas de amostras de água coletadas em Dezembro/02 no Rio Negro-AM, utilizando-se sistema de ultrafiltração sequencial em múltiplos estágios e fluxo tangencial. Condições: 250 mL de SHA 1 mg mL⁻¹; pH 5,0; frações F₁: > 100; F₂: 50-100; F₃: 30-50; F₄: 10-30; F₅: 5-10; F₆: <5 kDa.

A Figura 19 mostra espectros na região do infravermelho das frações húmicas de substâncias húmicas aquáticas de diferentes tamanhos moleculares, extraídas de amostras de água coletadas em Dezembro/02 no Rio Negro-AM e obtidas pelo sistema de ultrafiltração sequencial em múltiplos estágios e fluxo tangencial.

As principais bandas de absorção nos espectros das frações húmicas estão associadas a:

1) Estiramento OH na região de 3500 - 3300 cm⁻¹ referentes aos estiramentos OH de álcoois, fenóis e ácidos carboxílicos ou estiramentos NH de aminas;

2) Presença de anéis aromáticos pode ser verificada em razão do estiramento CH de aromáticos acima de 3000 cm⁻¹, banda na região de 1600 cm⁻¹, referente ao estiramento C=C de aromáticos;

3) Banda de absorção em 1600 cm⁻¹ é devido a estiramento C=O de grupos carbonílicos ou carboxílicos conjugados.

Todas as frações mostraram semelhantes espectros na região do infravermelho, com bandas mais nítidas nas frações F₅ e F₆.

IV.3 - Determinação da capacidade de complexação da matéria orgânica dissolvida e SHA por íons Hg(II)

O rendimento da extração das substâncias húmicas aquáticas é relativamente baixo (cerca de 100 L de amostra para obter \cong 1,5 g de SHA). Para evitar consumo desnecessário de amostra, as condições experimentais para determinação da capacidade de complexação da matéria orgânica por íons mercúrio foram estabelecidas primeiramente utilizando matéria orgânica dissolvida (MOD) do Rio Negro, e posteriormente utilizaram-se as amostras de SHA extraídas e fracionadas. Para tal, concentrou-se água do Rio Negro em evaporador rotativo e fizeram-se experimentos com diferentes concentrações de MOD (2, 10, 30 e 80 mg L⁻¹ de carbono orgânico total - COT).

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

A capacidade de complexação das SH é convencionalmente expressa em mmol de metal por grama de COT (Carbono Orgânico Total) e caracteriza a máxima quantidade de metais, que podem ser complexados às SH em solução aquosa. Assim, trata-se de um importante parâmetro de qualidade ambiental, pois devido a esta capacidade das SH, a disponibilidade de várias espécies para participar de reações no ambiente, incluindo metais, é minimizada. Entretanto, na literatura há poucos trabalhos referentes à determinação da capacidade de complexação de SHA por íons Hg(II). Cheam e Gamble (1974) e Yin *et al.* (1997) determinaram a capacidade complexante de SH extraídas de amostras de solos por íons mercúrio utilizando eletrodo íon seletivo de iodo. Para SHA, há alguns trabalhos na literatura que determinam a constante de estabilidade condicional das SHA por íons mercúrio, contudo não apresentam o resultado para a sua capacidade complexante (Benoit *et al.*, 2001; Haitzer *et al.*, 2002; Drexel, 2002). Também, na literatura não há trabalhos determinando a capacidade complexante de SHA por íons Hg(II) utilizando a técnica de ultrafiltração. A ultrafiltração apresenta-se como um procedimento interessante, simples e aplicável a amostras reais, e vêm sendo utilizado para determinar a capacidade complexante de SH por íons Cu(II) (Romão *et al.*, 2003; Burba *et al.*, 2001).

O procedimento de ultrafiltração para especiação de metais baseia-se na separação da matéria orgânica e/ou SH das espécies metálicas livres/complexadas pela filtração em membrana de 1 kDa. Como as SH apresentam tamanhos moleculares maiores, estas são retidas pela membrana, enquanto que os metais livres e aqueles complexados por moléculas com tamanhos moleculares menores que a porosidade da membrana são filtrados.

A concentração de Hg(II) é determinada no filtrado, assumindo que os metais não complexados pelas SH são separados das espécies SH-Hg (as quais não passam pela membrana de 1 kDa), coletados nos filtrados e determinados, por exemplo, pela análise de espectrometria de absorção atômica com geração de vapor de mercúrio a frio (CVAAS).

Na Figura 20 está exemplificada uma curva típica da capacidade complexante das SH por íons metálicos em que a capacidade complexante é determinada pela intersecção das duas retas, sendo que o valor determinado é dividido pelo teor de carbono da amostra (Romão, *et al.* 2003).

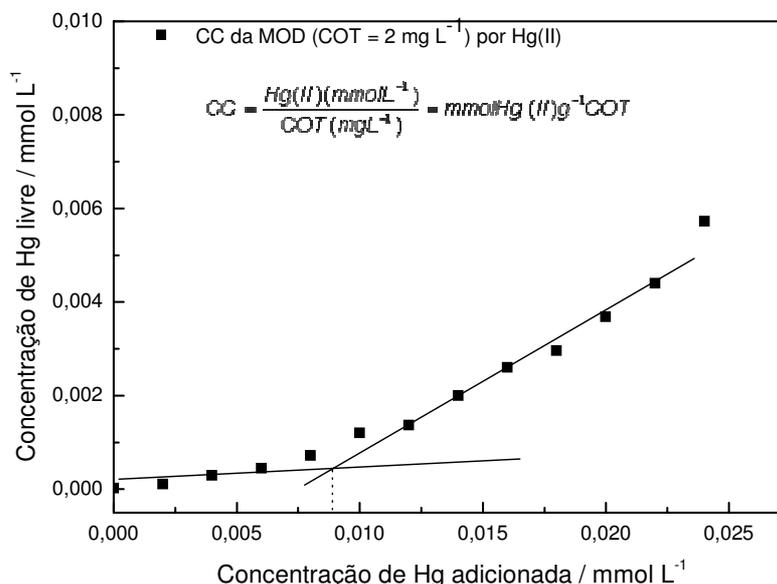


Figura 20 – Curva típica para determinação da capacidade de complexação da matéria orgânica por íons Hg(II) (Condições: Temperatura $\approx 25^{\circ}\text{C}$, pH: 5-6).

Tabela 7 - Capacidade de complexação (CC) da matéria orgânica dissolvida em diferentes concentrações por íons Hg(II) (Temperatura $\approx 25^{\circ}\text{C}$, pH: 5 – 6)

Concentração de carbono da amostra (mg L^{-1})	Capacidade complexante (mmol de Hg(II) g^{-1} de Carbono)
2	$4,15 \pm 0,08$
10	$0,64 \pm 0,03$
30	$0,30 \pm 0,04$
80	$0,20 \pm 0,05$

Os resultados das capacidades complexantes da MOD para as diferentes concentrações de íons Hg estão listados na Tabela 7. Os resultados indicam que a capacidade complexante da MOD por íons mercúrio é inversamente proporcional à concentração de carbono. Isso muito provavelmente está relacionado com a disponibilidade dos sítios para complexação, ou seja, considerando o modelo supramolecular proposto por Piccolo (2001), onde as macromoléculas húmicas seriam formadas por agregados de pequenas moléculas ou micelas, durante a pré-concentração da MOD ocorrem rearranjos moleculares em sua estrutura, e devido a impedimentos estéricos os sítios preferenciais para complexação com íons mercúrio (sítios reduzidos de enxofre) podem ficar menos disponíveis para complexação (Sargentini Jr, *et al.* 2001).

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

Nestes ensaios preliminares, observou-se que com COT de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ ocorreu redução dos íons Hg(II) adicionados (Figura 21). Rocha *et al.* (2000) estudaram a redução de mercúrio iônico por substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras de águas também do Rio Negro-AM. A redução dos íons Hg(II) em função do tempo mostrou que aproximadamente 40% dos íons Hg(II), adicionados às substâncias húmicas aquáticas, foram reduzidos, e o restante provavelmente complexados por grupamentos presentes na estruturas das SHA. Ou seja, de acordo com esses autores, existe competição entre os processos de complexação, principalmente por grupamentos tiofenólicos (Xia *et al.*, 1999; Rocha *et al.*, 1998) e redução dos íons Hg(II) pela matéria orgânica (Allard e Arsenie, 1991). Rocha *et al.* (2000) verificaram também que a concentração de SHA é um importante parâmetro na redução de íons Hg(II), pois segundo estes autores, a eficiência da redução de íons Hg(II) por substâncias húmicas aquáticas é inversamente proporcional à concentração de SHA, e o processo de redução é favorecido em função da menor concentração de carbono.

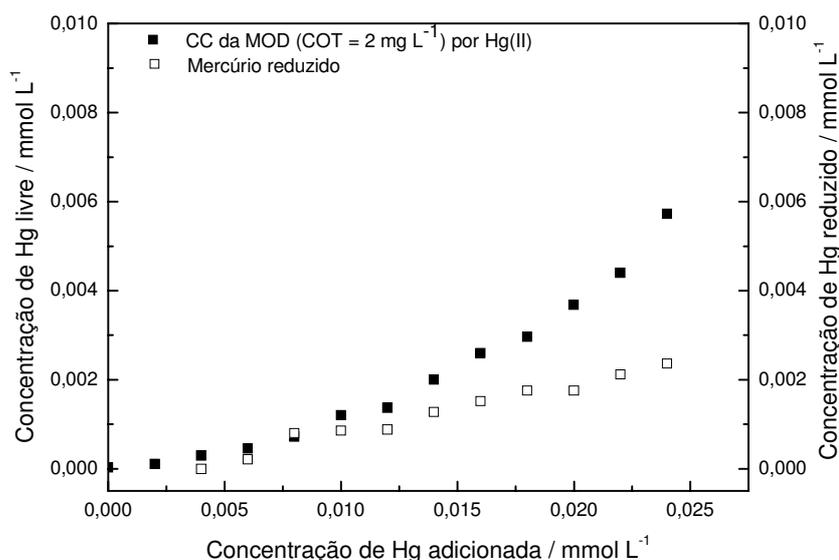


Figura 21 – Redução de Hg (II) e capacidade de complexação da matéria orgânica dissolvida por íons Hg(II) de amostras de água coletadas na Bacia do Rio Negro–AM, com COT de aproximadamente 2 mg L^{-1} , pH: 5,0-6,0, temperatura: 25°C .

Para determinar a capacidade complexante nas frações de SHA, foi necessário trabalhar com a menor quantidade de carbono possível. Considerando que são amostras coletadas em diferentes períodos e que, neste trabalho, tem-se caracterizado influências da sazonalidade nas características estruturais das SHA, durante o procedimento de fracionamento, o volume obtido nas diferentes frações foi

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

variável entre amostras e entre frações. Assim, a partir destes testes preliminares, a capacidade complexante das substâncias húmicas aquáticas por íons Hg(II) nas frações de substâncias húmicas aquáticas foram determinadas em COT = 10,0 mg L⁻¹, pois a redução da MOD não foi detectada pelo equipamento CVAAS, e o interesse maior neste trabalho é verificar a complexação do metal pelas substâncias húmicas. Mesmo assim, na determinação das capacidades de complexação por íons Hg(II), a possível redução de íons Hg(II) foi monitorada pelo trapp contendo solução de permanganato de potássio (Figura 11 item III.6).

A Tabela 8 lista as ordens decrescentes do teor de carbono orgânico total e das capacidades complexantes das substâncias húmicas aquáticas por íons Hg(II), nas diferentes amostras de substâncias húmicas aquáticas extraídas de água coletadas mensalmente no Rio Negro-AM, fracionadas em função do tamanho molecular.

Tabela 8 – Ordem decrescente do teor de carbono orgânico total e da capacidade de complexação, estabelecidas para as frações húmicas de substâncias húmicas aquáticas de diferentes tamanhos moleculares extraídas de amostras de água coletadas mensalmente no Rio Negro-AM.

Amostra	Parâmetro	Ordem Decrescente
Julho/02	Carbono orgânico total	F ₁ >F ₆ >F ₂ >F ₃ >F ₄ >F ₅
	Capacidade de complexação da SHA por íons Hg(II)	F ₃ >F ₂ >F ₄ >F ₅ >F ₆ >F ₁
Dezembro/02	Carbono orgânico total	F ₆ >F ₅ >F ₂ >F ₁ >F ₃ >F ₄
	Capacidade de complexação da SHA por íons Hg(II)	F ₄ >F ₃ >F ₁ >F ₂ >F ₅ >F ₆
Março/02	Carbono orgânico total	F ₁ >F ₆ >F ₂ >F ₃ >F ₄ ≈F ₅
	Capacidade de complexação da SHA por íons Hg(II)	F ₅ >F ₄ >F ₃ >F ₂ >F ₆ >F ₁

Pelos resultados das distribuições de carbono (Figura 17), observa-se que na amostra de Março/02, os maiores teores de carbono foram nas frações F₁ e F₆. Para amostra de Julho/02, o maior teor de carbono foi na Fração F₁, e para Dezembro/02 em F₆. Dentre as frações de Março/02, F₁ e F₆ possuem as menores capacidades de complexação para Hg(II) e os maiores teores de carbono. Embora as frações F₁ sejam constituídas por moléculas maiores e as frações F₆ por moléculas menores,

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

as capacidades complexantes dessas frações foram semelhantes. Isso possivelmente está relacionado com a conformação que a molécula assume, levando a um arranjo molecular que permite a complexação com mercúrio. Nas frações de Julho/02, observa-se a menor capacidade complexante para a fração F₁, e para a amostra de Dezembro/02, a fração F₆ possui menor capacidade complexante e a F₄ maior capacidade complexante. Assim, verifica-se, de maneira geral, que em um grupo de amostras, as que têm menores capacidades complexantes foram as que possuem maior teor de carbono. Estes resultados corroboram com os anteriormente obtidos para matéria orgânica dissolvida (Tabela 7), indicando que a quantidade de carbono em uma amostra de SH não é proporcional a quantidade de grupos funcionais presentes.

Estudos ambientais geram inerentemente muitos dados experimentais e as técnicas exploratórias têm se mostrado eficientes para correlacionar e auxiliar na interpretação dos resultados obtidos. Logo, utilizou-se análise hierárquica de agrupamentos para verificar a influência da sazonalidade nas amostras de SHA fracionadas em função do tamanho molecular.

Pela Figura 22 observa-se a formação de dois grupos: a) pluviometria e carbono orgânico total; b) capacidade complexação das substâncias húmicas aquáticas por íons Hg e índice fluviométrico.

Na Figura 23 observa-se a formação de 3 principais grupos de amostras: (a) F₁, F₆ de Março e F₆ de Dezembro; (b) F₂, F₃, F₄ e F₅ de Março e F₁, F₂, F₃, F₄, F₅ de Dezembro; (c) F₁, F₂, F₃, F₄, F₅ e F₆ de Julho. O grupo (a) é formado basicamente pelas amostras que apresentaram a menor capacidade de complexação e o maior teor de carbono. Nos grupos (b) e (c), observa-se que as amostras com maior grau de similaridade foram as coletadas no mesmo mês. Assim, não houve separação em função do tamanho molecular, mas sim devido a sazonalidade. Considerando os regimes de cheias e vazantes da Região Amazônica, mais uma vez o fator sazonal foi preponderante na caracterização das substâncias húmicas aquáticas em função do tamanho molecular.

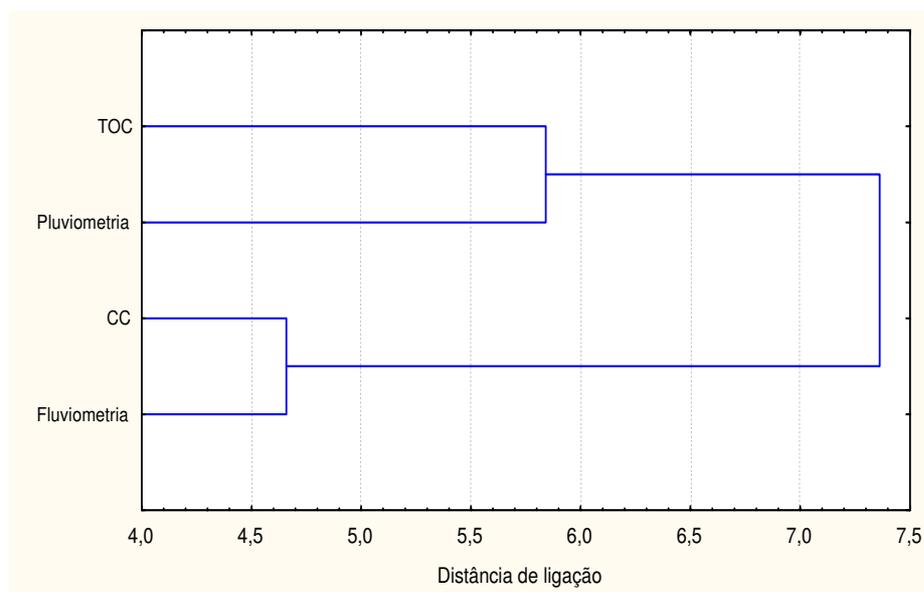


Figura 22 – Dendrograma obtido à partir das determinações da capacidade de complexação das frações de substâncias húmicas aquáticas por íons Hg(II); carbono orgânico total e índices pluviométricos e fluviométricos.

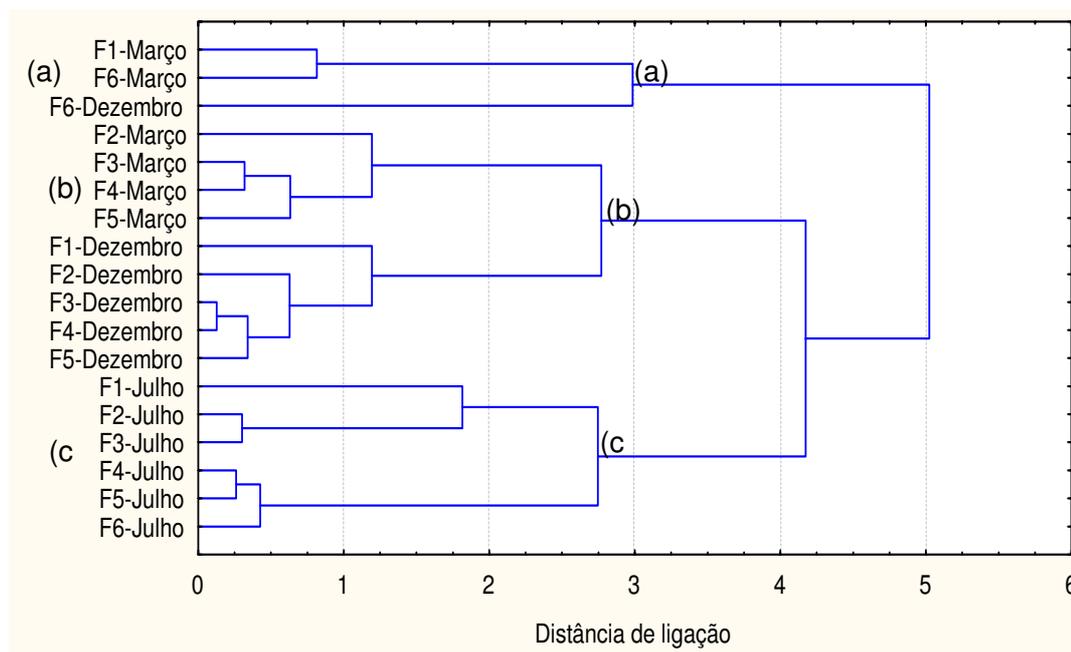


Figura 23 – Dendrograma para as amostras de substâncias húmicas aquáticas extraídas de amostras coletadas no Rio Negro e fracionadas por tamanho molecular: F₁ >100 kDa, F₂: (100 - 50), F₃: (50 - 30), F₄: (30 - 10), F₅: (10 - 5) e F₆: (< 5 kDa)

As capacidades complexantes das substâncias húmicas aquáticas por íons Hg(II) foram determinadas nas amostras originais antes de serem fracionadas. Os

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

valores determinados foram: 1,74 mmol de Hg g⁻¹ de TOC (Dezembro/02); 0,85 mmol de Hg g⁻¹ de TOC (Julho/02); 1,04 mmol de Hg g⁻¹ de TOC (Março/02). Com estes resultados, pode-se observar que nas cheias (Julho/02), a capacidade de complexação das SHA por íons Hg(II) é menor, enquanto que nas vazantes é maior (Tabela 9). A Tabela 9 sumariza qualitativamente as tendências de mudanças de características das substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM em função da sazonalidade e de parâmetros físico-químicos.

Tabela 9 – Tendências de mudanças de características das SHA do Rio Negro-AM em função da sazonalidade e de parâmetros físico-químicos.

Parâmetros	Cheias	Vazantes
Matéria orgânica	Recente	Refratária
Tamanho molecular das SH	Moléculas maiores	Moléculas menores
Carbono orgânico total	Maior nas frações maiores	Maior nas frações menores
Capacidade de Complexação das SH	Menor	Maior
Disponibilidade de Hg	Maior	Menor

Oliveira *et al.* (2006), estudando solos da região Amazônica, verificaram que em solos de regiões alagáveis o teor de mercúrio é até 2,8 vezes maior do que em regiões não alagáveis. As maiores concentrações desse metal em solos de regiões alagáveis por águas pretas podem ser explicadas pela diminuição da labilidade da espécie metálica complexada em função do tempo. Ou seja, de acordo com Sargentini Jr. *et al.* (2001), o complexo metal-MO tende a se estabilizar em função do tempo, ocorrendo rearranjos inter e/ou intramoleculares, com transferência da espécie metálica para os sítios de complexação mais internos das macromoléculas húmicas. Assim, o mercúrio aportado no solo alagável via precipitação atmosférica e retido pela matéria orgânica fica menos disponível para ser drenado via reações na interface solo/água (cheias) e para ser transportado para o compartimento atmosfera via processos de redução na interface solo/atmosfera (vazantes). Além disso, um outro fator que contribui para a maior retenção de mercúrio em solos de regiões alagáveis é o menor potencial de retenção de mercúrio pelas substâncias húmicas aquáticas nos períodos de cheias (Tabela 9).

V - CONCLUSÃO

A região Amazônica é caracterizada por grande variedade de solos, com áreas alagáveis e não alagáveis, com características particulares de biodiversidade, temperatura e umidade. Os regimes de cheias e vazantes da região influenciam fortemente a formação, as propriedades e características do material húmico presente nos rios, como indicado pelos dados das análises multivariadas.

A seguinte ordem decrescente do grau de humificação das amostras de substâncias húmicas aquáticas em função da sazonalidade pode ser estabelecida: Novembro/2002 a Fevereiro/2003 > Março/2002 a Maio/2002 > Junho/2002 a Outubro/2002. Estes resultados mostraram que quanto maior o nível do rio, menor é o grau de humificação das SHA, indicando aporte de matéria orgânica mais recente quando o nível do rio é alto.

As relações obtidas na análise hierárquica de agrupamentos mostraram fortes interações entre índices pluviométricos, radicais livres do tipo semiquinona e razão atômica C/N, parâmetros relacionados com maior grau de humificação. Isso mostra que a quantidade de matéria orgânica mais humificada, presente nos mananciais, está diretamente relacionada com o índice pluviométrico. Ou seja, quanto maior o índice pluviométrico e menor o índice fluviométrico, as substâncias húmicas aportadas no sistema aquático possuem maior grau de humificação.

As análises estatísticas também mostraram que as concentrações de mercúrio estão relacionadas com as amostras de SHA mais humificadas, ou seja, quanto maior o grau de humificação, maior a estabilidade do complexo metal-MO, devido a rearranjos inter e/ou intramoleculares, ocorrendo transferência da espécie metálica para os sítios de complexação mais internos das macromoléculas húmicas.

As amostras mais humificadas indicaram maior teor de mercúrio e maior concentração de grupos fenólicos, aromáticos e éteres, indicando que estes grupos funcionais foram predominantes na interação com íons mercúrio.

Os resultados da distribuição de carbono nas diferentes frações indicaram diferenças significativas nas estruturas das amostras de substâncias húmicas aquáticas, fracionadas em função do tamanho molecular. Pelo sistema de fracionamento seqüencial em múltiplos estágios e fluxo tangencial, a amostra Dezembro/02 indicou ser constituída preferencialmente por moléculas menores. Em Julho/02 observa-se a presença de moléculas maiores em sua estrutura, e Março/02

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

mostrou constituição intermediária entre as amostras de Julho/02 e Dezembro/02. Em Dezembro/02, o nível do rio é baixo, podendo-se inferir com estes resultados obtidos, menor influência da matéria orgânica do solo, enquanto que em Julho/02, época de cheia, as amostras de SHA apresentaram maior influência da matéria orgânica do solo em sua formação. Com estes estudos, pôde-se verificar a influência da sazonalidade na formação das substâncias húmicas aquáticas, sendo que com o fracionamento das amostras, pôde-se comprovar que as SHA coletadas em épocas diferentes são constituídas por estruturas diferenciadas.

A capacidade de complexação das substâncias húmicas aquáticas por íons Hg(II) nas diferentes frações indicou que, de maneira geral, quanto maior o teor de carbono, menor é a capacidade complexante das SHA, podendo inferir que a capacidade complexante não está relacionada diretamente com o teor de carbono, mas possivelmente com a disponibilidade dos grupos funcionais nas substâncias húmicas aquáticas.

As análises estatísticas multivariadas indicaram que as amostras agruparam-se em função dos meses de coleta, e não do tamanho molecular, indicando mais uma vez a influência da sazonalidade na caracterização das substâncias húmicas aquáticas.

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

VI - REFERÊNCIAS

ALBERTS, J. J.; SCHINDLER, J. E.; MILLER, R. W.; NUTTER, D. E. Elemental mercury evolution mediated by humic acid. **Science**, v. 184, n. 2, p. 895–897, 1974.

ALLARD, B.; ARSENIE, I. Abiotic reduction of mercury by humic substances in aquatic system—an important process for the mercury cycle. **Water, Air, Soil Pollution**, v. 56, n. 1, p. 457–464, 1991.

ANDRADE, J. C.; PASQUINI, C.; BACCAN, N.; VAN LOON, J. C. Cold vapor atomic absorption determination of mercury by flow injection analysis using a teflon membrane phase separator coupled to the absorption cell. **Spectrochimica Acta**, v. 38B, n. 1, p. 1329-1338, 1983.

ASTER, B.; BURBA, P.; BROEKAERT, J. A. C. Analytical fractionation of aquatic humic substances and their metal species by means of multistage ultrafiltration. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 354, n. 2, p. 722-728, 1996.

ASTER, B.; VON BOHLEN, A.; BURBA, P. Determination of metals and their species in aquatic humic substances by using total - reflection x-ray fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta**, v. 52, n. 1, p. 1009-1018, 1997.

BARBOSA, A. C.; SOUZA, J.; DÓREA, J. G.; JARDIM, W. F.; FADINI, P. S. Mercury biomagnification in a tropical black water, Rio Negro, Brazil. **Archive of Environmental Contamination Toxicology**, v. 45, n. 2, p. 235-246, 2003.

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

BARKER, A. A.; TILL, A. Using multistage techniques to improve diafiltration fractionation. **Journal of Membrane Science**, v. 72, n. 2, p. 1-5, 1992.

BASTOS, W. R.; ALMEIDA, R.; DÓREA, J. G.; BARBOSA, A. C. Annual flooding and fish-mercury bioaccumulation in the environmentally impacted Rio Madeira (Amazon). **Ecotoxicology**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2007.

BENOIT, J. M.; MASON, R. P.; GILMOUR, C. C.; AIKEN, G. R. Constants for mercury binding by dissolved organic matter isolated from the Florida Everglades. **Geochimica Cosmochimica Acta**, v. 65, n. 1, p. 4445–4451, 2001.

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

BISINOTI, M. C. **Biogeoquímica aquática do mercúrio orgânico na Bacia do Rio Negro, Amazônia**. 2005. 169 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de Campinas, Campinas, 2005.

BLUNTSCHLI, H. A Amazônia como organismo harmônico. **Cadernos da Amazônia**, v. 1, p. 1-37, 1921.

BOISCHIO, A. A. P.; BARBOSA, A. C. Exposure to organic mercury in riparian populations on the upper Madeira river, Rondonia, Brazil, 1991: preliminary results. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 9, n. 2, p. 155-160, 1993.

BOURGOIN, L. M.; QUEMERAIS, B.; TURCQ, P. M.; SEYLER, P. Transport, distribution and speciation of mercury in the Amazon River at the confluence of black and white waters of the Negro and Solimões Rivers. **Hydrological Processes**, v. 17, n. 1, p. 1405-1410, 2003.

BRABO, E. S.; ANGÉLICA, R. S.; SILVA, A. P.; FAIAL, K. R. F.; MASCARENHAS, A. F. S.; SANTOS, E. C. O.; JESUS, I. M.; LOUREIRO, E. C. B. Assessment of mercury levels in soils, waters, bottom sediments and fishes of Acre State in Brazilian Amazon. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 147, n. 1, p. 61-77, 2003.

BRANCHES, F. J. P.; ERICKSON, T. B.; AKS, S. E.; HRYHORCZUK, D. O. The price of gold: mercury exposure in the Amazonian rain forest. **Journal of Toxicology: clinical toxicology**, v. 31, n. 2, p. 295-306, 1993.

BUFFLE, E. H. **Complexation reactions in aquatic systems: an analytical approach**. Chichester: Horwood, 1988. 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. **Analytical Chemistry**, 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 Journal Analytical Chemistry**, 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 Journal Analytical Chemistry**, v. 371, n. 2, p. 660-669, 2001.

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

BURBA, P.; ASTER, B.; NIFANT'ÉVA, 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, n. 1, p. 977-988, 1998.

BURDON, J. Are the traditional concepts of structures of humic substances realistic? **Soil Science**, v. 66, n. 11, p. 752-769, 2001.

BURNS, W. A.; MANKIEWICZ, P. J.; BENCE, A. E.; PAGE, D. S.; PARKERS, K. R. A. Principal-component and least-squares method for allocating polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment to multiple sources. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 1119-1131, 1997.

CHEAM, V.; GAMBLE, D. S. Metal-fulvic acid chelation equilibrium in aqueous NaNO₃ solution. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 54, n. 2, p. 413-417, 1974.

CHENG, K. L. Separation of humic acid with XAD resins. **Mikrochimica Acta**, v. 2, n. 2, p. 389-396, 1977.

CHESHIRE, M. V.; McPAHIL, D. B. Hyperfine splitting in the electron spin resonance solution spectra of humic substances. **European Journal of Soil Science**, v. 47, n. 2, p. 205-213, 1996.

CHILOV, S. Determination of small amounts of mercury. **Talanta**, v. 22, n. 3, p. 205-232, 1975.

CLAPP, C. E.; HAYES, M. H. Sizes and shapes of humic substance. **Soil Science**, v. 164, n. 11, p. 777-784, 1999.

DE BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006.

DOREA, J.; BARBOSA, A. C. Anthropogenic impact of mercury accumulation in fish from the Rio Madeira and Rio Negro rivers (Amazonia). **Biological Trace Element Research**, v. 116, p. 1-12, 2006. (a)

DOREA, J.; BARBOSA, A. C.; SILVA, G. S. Fish mercury bioaccumulation as a function of feeding behavior and hydrological cycles of the Rio Negro, Amazon. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 142, part C, p. 275-283, 2006. (b)

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

DOREA, J.; BARBOSA, A. C.; FERRARI, I.; SOUZA, J. Mercury in hair and in fish consumed by Riparian women of the Rio Negro, Amazon, Brazil. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 13, n. 3, p. 239-242, 2003.

DREXEL, R. T.; HAITZER, M.; RYAN, J. N.; AIKEN, G. R.; NAGY, K. L. Mercury (II) sorption to two Florida Everglades peats: evidence for strong and weak binding and competition by dissolved organic matter released from the peat. **Environmental Science and Technology**, v. 36, n. 2, p. 4058–4064, 2002.

ERTEL, J. J. I.; HEDGES, J. E.; RICHEY, A. H.; SANTOS, U. Dissolved humic substances of the Amazon river system. **Limnology and Oceanograph**, v. 31, n. 3, p. 739-754, 1986.

FADINI, P. S.; JARDIM, W. F. Is the Negro river basin (Amazon) impacted by naturally occurring mercury? **The Science of the Total Environment**, v. 275, n. 2, p. 71-82, 2001.

FLAIG, W. Comparative chemical investigations on natural humic compounds and their model substances. **Science Process Royal Dublin Society**, v. 4, n. 2, p. 149-162, 1960.

FORSBERG, B. R.; FORSBERG, M. C. S.; PADOVANI, C. R.; SARGENTINI, E. Jr.; MALM, O. High levels in fish and human hair from the Rio Negro (Brazilian Amazon): natural background or anthropogenic contamination. In: WORKSHOP ON ENVIRONMENTAL MERCURY POLLUTION AND ITS HEALTH EFFECTS IN THE AMAZON RIVER BASIN, 1995, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro: Natural Institute for Minamata Disease; Federal University of Rio de Janeiro, 1995. p. 33-40.

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

GALPERIN, M.; SOFIEV, M.; MANTSEVA, E. A model of the chemical transformation of mercury and its long-range atmospheric transport. In: BAEYENS, W.; EBINGHAUS, R.; VALILIEV, O. (Ed.). **Global and regional mercury cycles: sources, fluxes and mass balances**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1996. p. 34-39. (Nato ASI Series, 2; Environment, 21).

GASCHO, G. J.; STEVENSON, F. J. An improved method for extracting organic matter from soil. **Soil Science Society American**, v. 32, n. 2, p. 117-119, 1968.

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

GRIGAL, D. F. Mercury sequestration in forests and peatlands. *Journal of Environmental Quality*, v. 32, n. 3, p. 393-405, 2003.

HAIR, J. F. Jr.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. C. **Multivariate data analysis with readings**. 4th ed. New Jersey: Prentice Hall, 1995. p. 745.

HAITZER, M.; AIKEN, G. R.; RYAN, J. N. Binding of mercury(II) to dissolved organic matter: the role of the mercury-to-DOM concentration ratio. *Environmental Science and Technology*, v. 36, n. 2, p. 3564–3570, 2002.

HALBACH, S. **Toxicity of detrimental metal ions**. In: BERTHON, G. (Ed.). Handbook of metal–ligand interactions in biological fluids–bioinorganic medicine. Basel: Marcel Dekker, 1995. v. 2, p. 749–754.

HASWELL, S. J. **Practical guide to chemometrics**. New York: Marcel Dekker, 1992. 895 p.

HATCH, W. R.; OTT, W. L. Determination of sub-microgram quantities of mercury by atomic absorption spectrophotometry. *Analytical Chemistry*, v. 40, n. 14, p. 2085-2087, 1968.

HAYES, M. H. B. **Humic substances II: in search of structure**. New York: John Wiley & Sons, 1989. 747 p.

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

HAYES, M. H. B.; SWIFT, R. S. The chemistry of soil organic colloids. In: GREENLAND, D. J.; HAYES, M. H. B. (Ed.). **The chemistry of soil constituents**. New York: Wiley & Sons, 1978. v. 1, p. 179-230.

HEDGES, J. I.; MAYORGA, E.; TSAMAKIS, E.; MCCLAIN, M. E.; AUFDENKAMPE, A.; QUAY, P.; RICHEY, J. E. Organic matter in Bolivian tributaries of the Amazon River: a comparison to the lower mainstream. *Limnology and Oceanography*, v. 45, n. 7, p. 1449–1466, 2000.

HEIDEN, R. W.; AIKEN, D. A. Humic acid as a preservative for trace mercury (II) solutions stored in polyolefin containers. *Analytical Chemistry*, v. 55, n. 2, p. 2327–2332, 1983.

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

IVANISSEVICH, A. Três cores para os rios amazônicos. **Ciência Hoje**, v. 11, n. 1, p. 47-51, 1990.

JACKWERTH, E.; WILMER, P. G.; HOHN, R.; BERNDT, H. A Simple accessory for the determination of mercury and the hydride-forming elements (As, Bi, Sb, Se and Te) using flameless atomic absorption spectroscopy. **Atomic Absorption Newsland**, v. 18, n. 3, p. 66-68, 1979.

KILDUFF, J.; WELBER, W. J. Transport and separation of organic macromolecules in ultrafiltration processes. **Science and Technology**, v. 26, n. 3, p. 569-572, 1992.

KÖGEL-KNABNER, I.; ZECH, W.; HATCHER, P. G. Chemical structural studies of forest soil humic acids: aromatic carbon fraction. **Soil Science Society American Journal**, v. 55, n. 2, p. 241-247, 1991.

KOLKA, R. K.; GRIGAL, D. F.; VERRY, E. S.; NATER, E. A. Mercury and organic carbon relationships in streams draining forested upland/peatland watersheds. **Journal of the Environmental Quality**, v. 28, n. 2, p. 766–775, 1999.

KONONOVA, M. M. **Soil organic matter: its nature, its role in soil formation and in soil fertility**. New York: Pergamon, 1966. 346 p.

LACERDA, L. D.; MARINS, R. V. Anthropogenic mercury emissions to the atmosphere in Brazil: the impact of gold mining. **Journal Geochemistry Explorer**, v. 58, n. 2, p. 223–229, 1997.

LACERDA, L. D.; SOUZA, M.; RIBEIRO, M. G. The effects of land use change on mercury distribution in soils of Alta Floresta, Southern Amazon. **Environmental Pollution**, v. 129, n. 1, p. 247-255, 2004.

LEENHEER, J. A. Origin and nature of humic substances in the waters of the Amazon basin. **Acta Amazonica**, v. 10, n. 2, p. 513-526, 1980.

LEENHEER, J. A.; BROWN, G. K.; MACCARTHY, P.; CABANISS, S. E. Models of metal binding structures in fulvic acid from the Suwannee river, Georgia. **Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 2410–2416, 1998.

LEINWEBER, P.; FRÜND, R.; REUTER, G. A ¹³C-NMR study on the formation of soil organic matter from grass residues. **Zeitschrift Pflanzernernährung Bodenk**, v. 156, n. 1, p. 415-420, 1993.

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

LINDBERG, S. E.; STRATTON, W. J. Atmospheric mercury speciation: Concentrations and behavior of reactive gaseous mercury in ambient air. **Environmental Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 49-57, 1998.

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

MAGARELLI, G. **Fluxos de mercúrio gasoso na interface Solo/atmosfera na bacia do rio negro utilizando câmaras dinâmicas de fluxo**. 2006. 125 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MALM, O. Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. **Environmental Research**, v. 77, n. 2, p. 73-78, 1998.

MARTIN-NETO, L.; ROSSEL, R.; SPOSITO, G. Correlation of spectroscopic indicators of humification with mean annual rainfall along a temperature grassland climosequence. **Geoderma**, v. 81, p. 305-311, 1998.

MARTIN-NETO, L.; SPOSITO, G.; VIEIRA, E. M. Mechanism of atrazine sorption by humic acids: a spectroscopy study. **Environmental Science and Technology**, v. 28, n. 11, p. 1867-1873, 1994.

MCCLAIN, M. E.; RICHEY, J. E.; BRANDES, J. A. Dissolved organic matter and terrestrial-lotic linkages in the central Amazon basin of Brazil. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 11, n. 3, p. 295-311, 1997.

MICARONI, R. C. C. M.; BUENO, M. I. M. S.; JARDIM, W. F. Compostos de mercúrio: revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 487-495, 2000.

MIRETZKYI, P.; BISINOTI, M. C.; JARDIM, W. F.; ROCHA, J. C. Factors affecting Hg (II) adsorption in soils from the Rio Negro basin (Amazon). **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 438-443, 2005.

NASCIMENTO, E. S.; CHASIN, A. A. M. **Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos**. Salvador: CRA, 2001. 176 p.

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

NIFANT'ÉVA, T. J.; 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, n. 2, p. 257-267, 1999.

NOVOTNY, E. H.; MARTIN-NETO, L. Effects of humidity and metal ions on the free radicals analysis of peat humus. **Geoderma**, v. 106, p. 305-317, 2002.

ODEN, S. The humic acids, studies in their chemistry, physics and soil science. **Kolloidchemie Beih**, v. 11, n. 2, p. 75-260, 1919.

OLIVEIRA, L. C.; SERUDO, R. L.; ROCHA, J. C.; MENDONÇA, A. G. R.; BOTERO, W. G.; SANTOS, A.; CARVALHO NETO, F. S. Distribuição de mercúrio em diferentes solos da Bacia do Médio Rio Negro-AM: influência da matéria orgânica no ciclo biogeoquímico do mercúrio. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 274-280, 2007.

OLK, D. C.; BRUNETTI, G.; SENESI, N. Decrease in humification of organic matter with intensified lowland rice cropping: a wet chemical and spectroscopic investigation. **Soil Science Society of America Journal**, v. 64, n. 2, p. 1337-1347, 2000.

PAJACZKOWSKA, J.; SULKOWSKA, A.; SULKOWSKI, W. W.; JEDRZEJCZYK, M. Spectroscopy study of the humification process during sewage sludge treatment. **Journal of Molecular Structure**, v. 651-653, n. 3, p. 141-149, 2003.

PEARSON, R. G. Hard and soft acids and bases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 22, p. 3533-3539, 1963.

PICCOLO, A. The supramolecular structures of humic substance. **Soil Science**, v. 166, n. 1, p. 810-832, 2001.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substance: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. **Advances Agronomy**, v. 75, n. 2, p. 57-134, 2002.

PIRRONE, N.; MUNTHE, J.; BARREGÅRD, L.; EHRLICH, H. C.; PETERSEN, G.; FERNANDEZ, R.; HANSEN, J. C.; GRANDJEAN, P.; HORVAT, M.; STEINNES, E.; AHRENS, R.; PACYNA, J. M.; BOROWIAK, A.; BOFFETTA, P.; WICHMANN-FIEBIG, M. **Ambient air pollution by mercury (Hg) - position paper**. Office for Official Publications of the European Communities, 2001. Disponível em :

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

<<http://europa.eu.int/comm/environment/air/background.htm#mercury>>. Acesso em: 30 jan. 2007.

POLUEKTOV, N. S.; VITKUN, R. A.; ZELYUKOVA, Y. V. Determination of milligram amounts of mercury by atomic absorption in the gaseous phase. **Zhurnal Analiticheskoi Khimii**, v. 19, n. 2, p. 937-942, 1964.

POST, B.; KLAMBERG, H. **Characterization of humic substances fractionated by organic solvents**. In: MATTHESS, G. et al. (Ed.). Progress in hydrogeochemistry. Berlin: Springer-Verlag, 1992. p. 56-61.

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

REX, R. W. Electron paramagnetic resonance studies of stable free radicals in lignins and humic acids. **Nature**, v. 188, n. 2, p. 1185-1186, 1960.

RIBEIRO, F. A. L. **Aplicação de métodos de análise multivariada no estudo de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**. 2001. 196 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

RIFFALDI, R.; SCHNITZER, M. Electron spin resonance spectrometry of humic substances. **Soil Science Society American**, v. 36, n. 2, p. 301-305, 1972.

RIMURA, Y.; MILLE, V. L. Mercury determination at the microgram level by a reduction - aeration method of concentration. **Analytica Chimica Acta**, v. 27, n. 3, p. 325-331, 1962.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H. **Substâncias húmicas aquáticas: interação com espécies metálicas**. São Paulo: Editora 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.; SANTOS, A.; SENE, J. J. Método modificado para determinação de mercúrio por espectrofotometria de absorção atômica sem chama. **Eclética Química**, v. 19, n. 3, p. 119-127, 1994.

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

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

ROCHA, J. C.; SENE, J. J.; ROSA, A. H.; TOSCANO, I. A. S. Interaction of mercury (II) with humic substances from the Rio Negro (Amazonas States, Brazil) by means of ion exchange procedure. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 9, n. 1, p. 79-84, 1998.

ROCHA, J. C.; SARGENTINI, E. Jr.; 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. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 3, p. 169-175, 1999.

ROCHA, J. C.; SARGENTINI, E. Jr.; 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.

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. **Eclética Química**, v. 27, n. esp., p. 383-391, 2002.

ROMÃO, L. P. C.; CASTRO, G. R.; ROSA, A. H.; ROCHA, J. C.; PADILHA, P. M.; SILVA, H. C. Tangencial flow ultrafiltration: a versatile methodology for determination of complexation parameters in refractory organic matter from brazilian water and soil samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, n. 1, p. 1097-1100, 2003.

ROSA, A. H. **Desenvolvimento de metodologia para extração de substâncias húmicas de turfas utilizando-se hidróxido de sódio**. 1998. 99 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1998.

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

ROULET, M.; LUCOTTE, M. Geochemistry of mercury in pristine and flooded ferralitic soils of a tropical rain forest in French Guiana, South America. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 80, n. 5, p. 1079-1088, 1995.

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

ROULET, M.; LUCOTTE, M.; SAINT-AUBIN, A.; TRAN, S.; RHÉAULT, I.; FARELLA, N.; SILVA, E. J.; DEZENCOURT, J.; PASSOS, C. J.; SOARES, G. S.; GUIMARÃES, J. R.; MERGLER, D.; AMORIM, M. The geochemistry of mercury in central Amazonian soils developed on the Alter-do-Chão formation of the lower Tapajós River Valley, Para State, Brazil. **Science Total Environmental**, v. 1, n. 24, p. 223-229, 1998.

ROULET, N.; METHA, N. C.; DUBACH, P.; DEUEL, H. Separation of carbohydrates and nitrogen compounds from humic substances by gel filtration and ion-exchange chromatography. **Zeitschrift für Planung und Unternehmenssteuerung**, v. 103, n. 8, p. 1-9, 1963.

SALAU, J. S. I.; TAULER, R.; BAYONA, J. M.; TOLOSA, I. Input characterization of sedimentary organic contaminants and molecular markers in the northwestern Mediterranean sea by exploratory data analysis. **Environmental Science and Technology**, v. 31, n. 12, p. 3482-3490, 1997.

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. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 70, n. 1/4, p. 19-28, 1998.

SARGENTINI, E. Jr. **Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-Am: extração, caracterização, fracionamentos e distribuição de metais**. 1999. 105 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1999.

SARGENTINI, E. Jr.; ROCHA J. C.; ROSA, A. H.; ZARA, L. F.; SANTOS, A. Substâncias húmicas aquáticas: fracionamento molecular e caracterização de rearranjos internos após complexação com íons metálicos. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 399-344, 2001.

SCHLÜTER, K. Review: evaporation of mercury from soils. An integration and synthesis of current knowledge. **Environmental Geology**, v. 39, n. 3, p. 249-271, 2000.

SCHNITZER, M. Reaction between fulvic acid, a soil humic compound and inorganic soil constituents. **Soil Science Society American**, v. 33, n. 3, p. 75–81, 1969.
SCHNITZER, M.; KHAN, S. U. **Soil organic matter**. Amsterdam: Elsevier, 1978. 319 p.

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

SCHNITZER, M.; SKINNER, S. I. M. Organo-metallic interactions in soils: stability constants of Cu²⁺-, Fe²⁺-, and Zn²⁺-fulvic acid complexes. **Soil Science**, v. 102, n. 3, p. 361–365, 1966.

SCHROEDER, W. H.; MUNTHER, J. Atmospheric mercury- an overview. **Atmospheric Environmental**, v. 32, n. 1, p. 809-817, 1998.

SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. Chemical model structures for soil organic matter and soils. **Soil Science**, v. 162, n. 4, p. 115-121, 1997.

SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. Three dimensional models for humic acids and soil organic matter. **Naturwissenschaften**, v. 82, n. 2, p. 487-498, 1995.

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. **Environmental Science and Technology**, v. 33, n. 3, p. 546-552, 1999.

SENESI, N. Application of electron spin resonance (ESR) spectroscopy in soil chemistry. **Advances Soil Science**, v. 14, n. 5, p. 77-130, 1990.

SENESI, N.; SCHNITZER, M. Effects of pH, reaction time, chemical reduction and irradiation on ESR spectra of fulvic acids. **Soil Science**, v. 123, n. 4, p. 224-234, 1977.

SENESI, N.; MIANO, T. M.; BRUNETTI, G. Methods and related problems for sampling soil and sediment organic matter: extraction, fractionation and purification of humic substances. **Química Analítica**, v. 13, n. 2, p. 26-33, 1994.

SHKINEV, V. M.; FEDOROVA, O. M.; SPIVAKOV, B.; MATTUSCH, J.; WENNRICH, R.; LOHSE, M. Speciation of metals associated with natural water components by on-line membrane fractionation combined with inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometries. **Analitica Chimica Acta**, v. 327, p.167, 1996.

SILVEIRA, L. C.; VENTURA, D. F.; PINHEIRO, M. C. N. Toxicidade mercurial: avaliação do sistema visual em indivíduos expostos a níveis tóxicos de mercúrio. **Ciência e Cultura**, v. 56, n. 1, p. 36-38, 2004.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Spectrometric identification of organic compounds**. New York: John Wiley , 1991. 387 p.

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

SIOLI, H. **Amazônia**: fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais. Petrópolis: Vozes, 1985. 72 p.

SIOLI, H. Hydrochemistry and geology in the Brazilian Amazon region. **Amazoniana**, v. 1, n. 2, p. 267–277, 1968.

SPITZY, A.; ITTEKKOT, V. Dissolved and particulate organic matter in rivers, in Ocean Margin Processes in Global Change. In: MANTOURA, R. F. C.; MARTIN, J. M.; WOLLAST, R. (Ed.). **Ocean margin processes in global change**. New York: John Wiley, 1991. p. 5-17.

SPRINGER, U. The present status of humus investigation methods especially with respect to the separation, determination and characterization of humic acid types and application to characteristics forms of humus. **Bodenk Pflanzenernahr**, v. 6, n. 3, p. 312-373, 1938.

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

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: Wiley & Sons, 1994. 435 p.

STUMM, W.; MORGAN, J. J. **Aquatic chemistry**. New York: Wiley & Sons, 1981. 654 p.

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

SWIFT, R. S. Molecular weight, size, shape and charge characteristics of humic substances: some basic considerations. In: HAYES, M. H. B.; MACCARTHY, P.; MALCOLM, R. L. (Ed.). **Humic substances II: in search of structure**. New York: Wiley & Chichester, 1989. p. 450-466.

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

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

SWIFT, R. S.; POSNER, A. M. Gel chromatography of humic acid. **Journal of Soil Science**, v. 22, n. 3, p. 237-249, 1971.

THENG, B. K. G.; WAKE, J. R. H.; POSNER, A. M. Fractional precipitation of soil humic acid by ammonium sulfate. **Plant and Soil**, v. 29, n. 4, p. 305-316, 1968.

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

THURMAN, E. M.; MALCOLM, R. L. Preparative isolation of aquatic substances. **Environmental Science and Technology**, v. 15, n. 3, p. 463-466, 1981.

TOWN, R. M.; POWELL, H. K. J. Elimination of adsorption effects in gel permeation chromatographic of humic substances. **Analytica Chimica Acta**, v. 256, n. 5, p. 81-86, 1992.

TRAINA, S. J.; NOVAK, J.; SMECK, N. E. An ultraviolet absorbance method of estimating the percent aromatic carbon content of humic acids. **Journal of Environmental Quality**, v. 19, n. 1, p. 151-153, 1990.

TSCHÖPEL, P.; KOTZ, L.; SHULZ, W.; VEBER, M.; TÖLG, G. Zur Ursache und Vermeidung systematischer Fehler bei elementbestimmungen in wäßrigen Lösungen im ng/mL – und pg/mL. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 302, n. 3, p. 1-14, 1980.

UNEP CHEMICALS. Global mercury assessment. [S. l.: s. n.], 2002. (Report n. 54790-01, n. 1).

VALLE, C. M.; SANTANA, G. P.; AUGUSTI, R.; EGREJA FILHO, F. B.; WINDMOLLER, C. C. Speciation and quantification of mercury in Oxisol, Ultisol, and Spodosol from Amazon (Manaus, Brazil). **Chemosphere**, v. 58, n. 1, p. 779-784, 2005.

WEBER, J. H. Review of possible paths for abiotic methylation of mercury (II) in the aquatic environment. **Chemosphere**, v. 26, n. 1, p. 2063–2077, 1993.

Oliveira, L. C.; Tese de Doutorado: "Substâncias húmicas aquáticas do Rio Negro-AM: Influência da sazonalidade nas características estruturais, distribuição de carbono e capacidade de complexação por íons Hg(II) em função do tamanho molecular" – 2007.

WERSHAW, R. L. Model for humus in soils and sediments. **Environmental Science and Technology**, v. 27, n. 2, p. 814-816, 1993.

WRIGHT, J. R.; SCHNITZER, M. Oxygen containing functional groups in the organic matter of the Ao and Bh horizons of a podzol. In: BLACK, F. C.; RIBEIRO, P. R. (Ed.). In: 7th INTERNATIONAL CONGRESS OF THE SOIL SCIENCE, 7., 1960, Madison. **Proceedings...** Madison: [s.n.], 1960. p. 172-174.

XIA, K. X-ray absorption spectroscopic evidence for the complexation of Hg(II) by reduced sulfur in soil humic substances. **Environmental Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 257-261, 1999.

YIN, Y.; ALLEN, H. E.; HUANGA, C. P.; SANDERS, P. F. Interaction of Hg(II) with soil-derived humic substances. **Analytica Chimica Acta**, v. 341, n. 5, p. 73-82, 1997.